

UCHrFC
Doc-Microb
2664
C.1

**“VÍAS DE INTERNALIZACIÓN DEL VIRUS DE LA
NECROSIS PANCREÁTICA INFECCIOSA (IPNV)
EN CÉLULAS DE SALMÓN”**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias Biológicas

con mención Microbiología

Facultad De Ciencias

Por

Jorge Enrique Levican Asenjo

Diciembre, 2017

Director de Tesis Dr: Oscar Enrique León Decap

Co-Director de Tesis Dr: Aldo Andrés Gaggero Brillouet



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

JORGE ENRIQUE LEVICAN ASENJO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 28 de Noviembre de 2017.

Director de Tesis:

Dr. Oscar Enrique León Decap

Oscar León Decap

Co-Director de Tesis:

Dr. Aldo Andrés Gaggero Brillouet

Aldo Gaggero Brillouet

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Roberto Mauricio Vidal Álvarez

Roberto Vidal

Dra. Ana María Sandino García

Ana María Sandino

Dr. Omar Orlando Orellana Orellana

Omar Orellana

Dr. Marcelo Enrique Baeza Cancino

Marcelo Baeza



Resumen biográfico



Nacido en Santiago, Febrero de 1973. Luego de terminar sus estudios básicos y medios se estableció en la ciudad de Valdivia, donde estudió Tecnología Médica en la Universidad Austral de Chile. Una vez de regreso en Santiago, trabajó en diagnóstico clínico por aproximadamente 14 años. Paralelamente colaboró en diversas investigaciones y logró el grado de Magister en Ciencias Biomédicas e la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En este mismo tiempo fue padre de Salvador Antual, quien ha sido una gran fuente de inspiración en todos los ámbitos de su vida.

Dedicado a mi hijo Salvador Antual.



Agradecimientos

A mis tutores, a todos mis compañeros del Programa de Virología del Instituto de Ciencias Biomédicas, en especial a Johanna Saldías, Rosa Corvalán y Romina Catalán por su asistencia técnica.

INDICE DE MATERIAS

INTRODUCCIÓN	pág.1
Generalidades	pág.1
Taxonomía y clasificación	pág.3
Infección por IPNV en salmones	pág.4
Factores de virulencia	pág.5
Respuesta inmunológica	pág.6
Características generales y ciclo biológico de IPNV	pág.6
Internalización de IPNV	pág.9
Mecanismos virales de ingreso a la célula	pág.12
Ingreso de virus a la célula a través de endocitosis	pág.13
Endocitosis mediada por clatrina	pág.15
Endocitosis dependiente de balsas lipídicas y/o caveolas	pág.17

Macropinocitosis	pág.19
Hipótesis	pág.23
Objetivo General	pág.23
Objetivos Específicos	pág.23
MATERIALES Y MÉTODOS	pág.24
Células	pág.24
Reactivos	pág.24
Anticuerpos	pág.25
Purificación de partículas virales	pág.25
RTqPCR	pág.26
Inmunofluorescencia Indirecta	pág.26
Tinción de actina durante la infección por IPNV	pág.28
Inducción de captura de fase fluida	pág.28
Infección en presencia de inhibidores de las vías de endocitosis	pág.30
Efecto de inhibidores en etapas tempranas de la infección	pág.31
Internalización de Trf-A633, DX-TR y CTB-A594	pág.32

Análisis de co-localización de partículas de IPNV y DX-TR	pág.32
Estadísticas	pág.33
RESULTADOS	pág.34
1. Objetivo 1: Evaluar el ingreso de IPNV a la célula utilizando endocitosis mediada por clatrina y balsas lipídicas / caveolas.	pág.34
1.1 Infección del virus IPN en células CHSE-214.	pág.34
1.2 Cinética de replicación viral en la línea celular CHSE-214.	pág.35
1.3 Purificación de partículas virales	pág.36
1.4 Estandarización de los ensayos de infección	pág.38
1.5 Evaluar el ingreso de IPNV por endocitosis dependiente de clatrina en las células CHSE-214.	pág.42
1.5.1 La clorpromazina no inhibe la infección de IPNV en las células CHSE-214	pág.42
1.5.2 La transferrina no es internalizada en las células CHSE-214	pág.44

1.6	Evaluar el ingreso IPNV usando balsas lipídicas y caveolas en células CHSE-214	pág.45
1.6.1	La infección por IPNV en células CHSE-214 no es inhibida por filipina.	pág.46
1.6.2	La filipina inhibe el ingreso de la subunidad B de la toxina de cólera (CTB) en las células CHSE-214.	pág.48
2.	Objetivo 2: Demostrar que IPNV ingresa a las células CHSE-214 por macropinocitosis.	pág.50
2.1	IPNV induce la captura de fase fluida en células CHSE-214	pág.50
2.2	IPNV colocaliza con el marcador de fase fluida dextrán-Texas Red (DX-TR).	pág.52
2.3	IPNV induce cambios en la organización de la actina en células CHSE-214	pág.53
2.4	El ingreso del virus IPN en las células CHSE-214 depende de la dinámica de polimerización de la actina	pág.55
2.5	La infección por el virus IPN en las células CHSE-214 depende de la actividad del transportador NHE-1.	pág.58
2.6	Dependencia de otros factores asociados a macropinocitosis	pág.63
3.	Objetivo 3: Demostrar que la	pág.67

macropinocitosis es utilizada por IPNV para ingresar en células de salmón SHK-1

3.1 Células SHK-1	pág.67
3.2 Infección por IPNV en las células SHK-1	pág.68
3.3 Rol de la endocitosis mediada por clatrina (EMC) en el ingreso de IPNV en las células SHK-1	pág.72
3.3.1 La transferrina es internalizada en células SHK-1	pág.72
3.3.2 La clorpromazina no inhibe la infección de IPNV en células SHK-1	pág.74
3.3.3 Dynasore no inhibe la infección de IPNV en células SHK-1	pág.75
3.4 Rol de la endocitosis mediada balsas lipídicas y caveolas en el ingreso de IPNV en las células SHK-1	pág.76
3.4.1 La subunidad B de la toxina de cólera es internalizada en las células SHK-1.	pág.76
3.4.2 La nistatina no inhibe la infección de IPNV en células SHK-1	pág.78
3.5 Rol de la macropinocitosis en el ingreso de IPNV en las células SHK-1	pág.79

3.5.1 Dinámica de polimerización de la actina durante la infección por IPNV en las células SHK-1	pág.79
3.5.2 Captura de fase fluida en presencia de IPNV	pág.80
3.5.3 EIPA disminuye el ingreso de DX-TR en células las SHK-1	pág.83
3.5.4 EIPA inhibe la infección de IPNV en células SHK-1.	pág.85
3.5.5 Dependencia de otros factores asociados a macropinocitosis para el ingreso de IPNV en las células SHK-1	pág.87
DISCUSIÓN	pág.90
Rol de la endocitosis mediada por balsas lipídicas y/o caveolas en el ingreso de IPNV en células de salmón.	pág.91
Rol de la endocitosis mediada por clatrina en el ingreso de IPNV a las células de salmón.	pág.94
El virus IPN ingresa a las células de salmón vía macropinocitosis.	pág.95
Compromiso diferencial de GTPasas de tipo Rho y otros factores celulares en el ingreso	pág.97

de IPNV en las células CHSE-214 y las
células SHK-1.

Modelo propuesto para el mecanismo de
macropinocitosis en células de salmón. pág.101

CONCLUSIONES pág.104

BIBLIOGRAFIA pág.106

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Inhibidores y blancos moleculares. pág. 30

Tabla 2: Cuadro comparativo de factores requeridos para la endocitosis del virus IPN en células CHSE-214 versus SHK-1. pág. 100

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Infección de células CHSE-214 con IPNV. p á g . 3 5
- Figura 2.** Cinética de replicación del virus IPN en células CHSE-214. p á g . 3 6
- Figura 3.** Purificación viral mediante cromatografía de exclusión molecular Sepharose ® 6B. p á g . 3 7
- Figura 4.** Estandarización de los ensayos de infección de células CHSE-214 con el virus IPN. p á g . 3 9
- Figura 5.** Cinética de infección de IPNV en células CHSE-214. p á g . 4 1
- Figura 6.** Efecto de la clorpromazina (CPZ) en la infección por IPNV en células CHSE-214. p á g . 4 3
- Figura 7.** La transferrina no es internalizada en células CHSE-214. p á g . 4 5

Figura 8. La infección por IPNV en células CHSE-214 no es inhibida por filipina (Fil).	p á g . 4 7
Figura 9. La filipina inhibe el ingreso de la subunidad B de la toxina de cólera (CTB).	p á g . 4 9
Figura 10. IPNV induce la captura de fase fluida en las células CHSE-214.	p á g . 5 1
Figura 11. El virus IPN colocaliza con el marcador de fase fluida en compartimentos intra-citoplasmáticos.	p á g . 5 3
Figura 12. El virus IPN induce cambios en la organización de la actina en las células CHSE-214.	p á g . 5 5
Figura 13. A-D. La citocalasina D (Cito D) induce despolimerización de F actina en las células CHSE-214.	p á g . 5 6
Figura 13. E-H. La infección por IPNV en las células CHSE-214 depende de la dinámica de polimerización de la actina.	p á g . 5 7
Figura 14. A-C. EIPA inhibe la macropinocitosis en las células CHSE-214.	p á g . 6 0
Figura 14. D-I. Infección de IPNV en las células CHSE-214 depende de la actividad de NHE-1.	p á g . 6 0

Figura 15. Requerimiento de factores celulares para la infección por IPNV en las células CHSE-214.	p á g . 6 5
Figura 16. Crecimiento de células SHK-1.	p á g . 6 8
Figura 17. Producción de RNA de doble hebra (dsRNA) durante la infección por IPNV en las células SHK1.	p á g . 6 9
Figura 18. Infección de células SHK-1 por IPNV.	p á g . 7 1
Figura 19. Internalización de transferrina (Trf-A633) en células SHK-1.	p á g . 7 3
Figura 20. La CPZ no inhibe la infección de IPNV en células SHK-1.	p á g . 7 4
Figura 21. Dynasore no inhibe la infección por IPNV en células SHK-1.	p á g . 7 6
Figura 22. Internalización de CTB-A594 en las células SHK-1.	p á g . 7 7
Figura 23. La nistatina no inhibe la infección de IPNV en células SHK-1.	p á g . 7 8
Figura 24. Cambios de la estructura del citoesqueleto en tiempos tempranos de la infección por IPNV en células SHK-1.	p á g . 8 0

Figura 25. IPNV induce la captura de fase fluida en células SHK-1.	p á g . 8 2
Figura 26. EIPA bloquea el ingreso de DX-TR en células SHK-1.	p á g . 8 4
Figura 27. EIPA inhibe la infección de IPNV en células SHK-1.	p á g . 8 6
Figura 28. Dependencia de factores asociados a macropinocitosis en la infección por IPNV en las células SHK-1.	p á g . 8 9
Figura 29. Modelo del mecanismo macropinocítico utilizado por el virus IPN para ingresar a las células CHSE-214	p á g . 1 0 2

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

Cantidades y símbolo de las unidades de medida

Longitud	Metro	m, mm, μ m, nm
Volumen	litro	L, ml, μ l
Tiempo	Hora	h, min, s
Masa	kilogramo	Kg, g, mg, μ g, ng
Concentración	mol/l	M, mM, μ M, nM
Masa molecular	daltons	Da, kDa
Tamaño molecular	pares de bases	Pb, Kpb
Temperatura	grados Celsius	$^{\circ}$ C
Títulos virales	Dosis infecciosa 50 de cultivo tisular	TCID ₅₀
MOI	Multiplicidad de infección	MOI
Carga viral	Equivalentes de genoma	EG

Standards y convenciones

DNA	Acido desoxirribonucleico
RNA	Acido ribonucleico

dsRNA	Acido ribonucleico de hebra doble
RdRNAPol	RNA polimerasa dependiente de RNA
pH	Potencial de hidrógeno
ATP	Adenosin tri fosfato
GTP	Guanosin tri fosfato
GPI	Glico fosfatidil inositol
Ala	Alanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
His	Histidina
Thr	Treonina
C terminal	Extremo carboxilo terminal
N terminal	Extremo amino terminal
RTqPCR	Transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Abreviaturas

Adv3	Adenovirus 3
AP2	Proteína adaptadora 2
CitoD	Citocalasina D
CMV	Citomegalovirus
CPZ	Clorpromazina

CTB-A594	Subunidad B de la toxina de cólera Alexa Fluor ® 594
CVB	Coxsackievirus B
DENV	Virus del dengue
DX-TR	Dextran Texas red
EBoV	Virus del Ebola
EIPA	5-(N-etil-N-isopropil) amiloride
EMC	Endocitosis mediada por clatrina
FITC	Iso tiocianato de fluoresceína
FMDV	Virus de la fiebre aftosa
IAV	Virus influenza A
IBDV	Virus de la enfermedad infecciosa de la bursa
ICTV	Comité internacional de taxonomía viral
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IPN	Necrosis pancreática infecciosa
IPNV	Virus de la necrosis pancreática infecciosa
KSHV	Virus herpes 8 del sarcoma de Kaposi
LIMK	Lim quinasa
MEM	Medio mínimo esencial de Eagle
MLCK	Quinasa de la cadena liviana de miosina
NIV	Nipah virus
PAK1	Proteína quinasa activada por p21
PEG	Poli etilen glicol

PFA	Paraformaldehido
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PKC	Proteína quinasa C
QTL	Locus asociado a rasgo cuantitativo
SFB	Suero bovino fetal
SV40	Virus de simio 40
SVP	Partículas sub-virales
Trf-A633	transferrina conjugada Alexa Fluor ® 633
VACV	Poxvirus vacuna
VHS-1	Virus herpes simplex tipo 1
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VP1	Proteína viral 1, RdRNAPol
VP2	Proteína estructural 2
VP3	Proteína estructural 3, Proteasa viral
VP4	Proteína viral 4, proteasa viral
VRS	Virus respiratorio sincicial
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
WASP	Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich
WAVE	Proteína de familia WASP con homología a veprolina

RESUMEN

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es el agente etiológico de la necrosis pancreática infecciosa, enfermedad que afecta a distintas especies de salmones y otras variedades de peces. Debido a su alta mortalidad produce grandes pérdidas económicas en países productores de salmones. IPNV es un virus desnudo, con genoma bi-segmentado de RNA de hebra doble (dsRNA), que pertenece a la familia *Birnaviridae*. Actualmente existe escasa información de las etapas tempranas de la infección y aunque se postula que IPNV ingresa a la célula hospedera mediante endocitosis, a la fecha se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en este evento.

La endocitosis es la principal ruta de ingreso a la célula y puede ser utilizada por distintos virus para alcanzar a su sitio de replicación celular. Las vías endocíticas más habituales son; la macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina (EMC) y endocitosis mediada por balsas lipídicas y/o caveolas. La macropinocitosis constituye una ruta usada por numerosos virus desnudos entre los que se cuenta el virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV), un birnavirus estrechamente relacionado con IPNV. Basado en las similitudes estructurales e identidad aminoacídica entre ambos virus, en el

presente trabajo se propone que, al igual que IBDV, IPNV ingresa a la célula por macropinocitosis. El objetivo de este estudio es determinar la vía endocítica que utiliza el IPNV para su ingreso a la célula, centrandó este análisis en la macropinocitosis. Para esto se utilizó la interrupción funcional de los componentes moleculares asociados a macropinocitosis y se determinó el efecto de cada tratamiento en la infección del virus en células CHSE-214 y SHK-1.

Este análisis mostró que el polieno filipina bloqueó el ingreso del trazador de la endocitosis dependiente de caveolas y/o balsas lipídicas, la subunidad B de toxina de cólera en las células CHSE-214 y el mismo efecto se observó con la nistatina, en las células SHK-1. Sin embargo ninguno de los dos tratamientos logró bloquear la infección por IPNV en estas células, sugiriendo que el ingreso de IPNV a las células CHSE-214 y SHK-1 es independiente de esta vía endocítica. Adicionalmente, el trazador de la EMC, la transferrina, fue internalizada en células SHK-1 y su ingreso fue bloqueado por la clorpromazina mientras que en las células CHSE-214 esta molécula no ingresó luego de 24 horas de incubación. Así mismo, la clorpromazina no afectó la infección por IPNV, sugiriendo que al menos en las células SHK-1 el ingreso de IPNV es independiente de clatrina.

Notablemente, la infección viral se redujo significativamente cuando el intercambiador de Na^+/H^+ se inhibió con 5-(N-etil-N-isopropil) amiloride (EIPA) en las células CHSE-214 y SHK-1. Del mismo modo, la infección fue bloqueada luego de la desarticulación del citoesqueleto de actina mediante el uso de

citocalasina D en las células CHSE-214. Además se observó que el virus estimuló la captación de la fase fluida (dextrán-Texas red; DX-TR) y las partículas virales co-localizaron con este marcador en tiempos tempranos de infección. Todas estas características cumplen con los criterios que definen la macropinocitosis.

Para examinar el papel de los reguladores de macropinocitosis, se ensayaron inhibidores adicionales. Los resultados obtenidos de este análisis muestran que el virus IPN utiliza distintos factores celulares para su ingreso en los dos tipos de cultivos celulares utilizados. De este modo, en las células CHSE-214 se observó el requerimiento de la GTPasa Rho Rac1, las quinasas PAK-1, PKC y la proteína motor miosina II. Por su parte, la infección en las células SHK-1 mostró dependencia de la GTPasa Ras, la GTPasa Rho Cdc42, PKC y miosina II. En conjunto los resultados permiten concluir que IPNV ingresa a la células de salmón mediante macropinocitosis.

ABSTRACT

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is the etiologic agent of infectious pancreatic necrosis, a disease that affects different species of salmon and other fish varieties. Due to its high mortality, it produces large economic losses in the salmon producing countries. IPNV is a non-enveloped (naked), double-stranded genome of RNA (dsRNA) virus, which belongs to the *Birnaviridae* family. At present there is limited information on the early stages of infection and although IPNV is postulated to enter the host cell through endocytosis, to date the molecular mechanisms involved in this event are unknown.

Endocytosis is the main route of entry into the cell and can be used by different viruses to reach their site of cellular replication. The most common endocytic pathways are; macropinocytosis, clathrin mediated endocytosis (CEM) and lipid mediated endocytosis and / or caveola endocytosis. Macropinocytosis is a route used by numerous naked viruses, including infectious bursal virus (IBDV), a closely related IPNV birnavirus. Based on the structural similarities and amino acid identity between both viruses, in the present work it is proposed that, as IBDV, IPNV enters the cell by macropinocytosis. The objective of this study is to determine the endocytic pathway that IPNV uses to enter the cell, focusing this analysis on macropinocytosis. Functional disruption of the molecular components associated with macropinocytosis was used and

the effect of each treatment on virus infection in CHSE-214 and SHK-1 cells was determined.

This analysis showed that filipine polyene blocked the entry of endocytosis dependent caveole and / or lipid rafts tracers, the B subunit of cholera toxin in CHSE-214 cells and the same effect was observed with nystatin in SHK-1 cells. However, neither treatment blocked IPNV infection in these cells, suggesting that the entry of IPNV into CHSE-214 and SHK-1 cells is independent of this endocytic pathway. In addition, the EMC tracer, transferrin, was internalized in SHK-1 cells and their entry was blocked by chlorpromazine, whereas in CHSE-214 cells, transferrin did not enter after 24 hours of incubation. Similarly, chlorpromazine did not affect IPNV infection, suggesting that at least in SHK-1 cells the entry of IPNV is independent of clathrin.

Notably, viral infection was significantly reduced when the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE-1, was inhibited with 5- (N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA) in CHSE-214 and SHK-1 cells. Similarly, the infection was blocked after disruption of the actin cytoskeleton by the use of cytochalasin D in CHSE-214 cells. It was also observed that the virus stimulated uptake of the fluid phase (Texas red dextran-DX-TR) and viral particles co-localized with this marker in the early stages of infection. All these characteristics meet the criteria that define macropinocytosis.

To examine the role of macropinocytosis regulators, additional inhibitors were tested. The results obtained from this analysis show that the IPN virus uses different cellular factors for its entry into the two types of cell cultures used.

Then, the requirement for Rho Rac1 GTPase, PAK-1 kinases, PKC and myosin II motor protein was observed in CHSE-214 cells. On the other hand, infection in SHK-1 cells showed dependence on GTPase Ras, GTPase Rho Cdc42, PKC and myosin II. In general, the results allow concluding that IPNV enters the salmon cells by macropinocytosis.

INTRODUCCIÓN

Generalidades.

La salmonicultura en Chile representa una importante fuente de ingresos para el país y actualmente constituye el segundo rubro exportador del país luego del cobre, siendo, en orden de importancia; el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), el salmón del Pacífico o Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), las principales especies producidas (Banco Central de Chile, 2017). De acuerdo al Informe Sectorial emitido por la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura en Mayo de 2017, la estimación de cosechas acumuladas de Salmón Atlántico, Trucha arcoíris y Salmón coho al mes de Abril del presente año alcanzó las 227.149 toneladas netas, cuya exportación ha significado una valoración total de US\$1.447 millones, lo que representa un 8.3% del total nacional de ingresos por exportación (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2017).

Sin embargo, históricamente esta actividad productiva ha debido superar importantes obstáculos, siendo las enfermedades infecciosas uno de los más relevantes (Kibenge y col.,2012, Ibieta y col.,2013). De este modo, durante el primer semestre de 2016, la mortalidad mensual promedio atribuida a este factor alcanzó un 13,1% para Salmón Atlántico, 24,9% para Trucha arcoíris y 9,6% para Salmón coho (Kibenge y col., 2012, Servicio Nacional de Pesca y

Acuicultura, 2016).

En este contexto, la necrosis pancreática infecciosa (IPN), es reconocida como una de las principales enfermedades infecciosas que afecta a salmones en cultivo intensivo, siendo responsable de mortalidades de hasta el 100% en la fase de desarrollo temprano en agua dulce (alevin) y de 10 a 20% durante su traspaso posterior a jaulas en el mar (post-smolts) (Hill y Way 1995, Evensen y Santi, 2008, Kibenge y col.,2012, Ibieta y col.,2013). Su agente etiológico es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), un virus pequeño (de alrededor de 60 nm de diametro), desnudo (sin membrana o manto), con genoma bi-segmentado de RNA de doble hebra (dsRNA), que pertenece a la familia *Birnaviridae*.

IPNV es un virus cosmopolita y se ha detectado en distintas especies de peces, moluscos y crustáceos (Toranzo y Metricic, 1982). Es un virus altamente resistente a las condiciones medioambientales, pudiendo permanecer infectivo por largos períodos en estuarios y aguas marinas (Ibieta y col., 2011, Roberts y Pearson, 2005)

En Chile el primer reporte de IPNV se realizó en 1984 (McAllister y Reyes, 1984; Espinoza y col., 1985), sin embargo, no fue hasta 1998 cuando se constató la infección por IPNV en stocks de salmón del Atlántico y desde entonces se ha distribuido ampliamente llegando a ser considerado endémico en nuestro medio (Ibieta col., 2011). De este modo, su detección alcanzó el 30,2% de los diagnósticos de enfermedades infecciosas de notificación obligatoria informados al Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura para el año

2015 (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, 2016).

Taxonomía y clasificación.

De acuerdo a la clasificación establecida por el *International Committee for Taxonomy of Virus* (ICTV), IPNV pertenece a la familia *Birnaviridae* y al género *Aquavirnavirus*. De acuerdo a su seroreactividad se ha dividido en 2 serogrupos, A y B, el primero de los cuales agrupa 9 serotipos (A1 al A9) mientras que el segundo contiene un solo serotipo (B1) (Hill y Way, 1995). Adicionalmente, estudios basados en análisis de secuencias aminoacídicas de la proteína principal de la cápside, VP2, han llevado a la identificación de 6 genogrupos (I-VI) los que se han correlacionado con los serotipos previamente descritos (Cutrín y col., 2004). La distribución de los sero y genotipos responde a factores geográficos más que a características del hospedero, siendo el serotipo A1 prevalente en Estados Unidos, A2-A5 en Europa y A6-A9 en Canadá (Dixon y col., 2008, Gomez-Casado y col., 2011). En Chile los salmónidos introducidos para cultivo son especies exóticas, siendo obtenidos originalmente de ovas procedentes de Estados Unidos y norte de Europa (Escocia, Islandia y Noruega), consecuentemente, el análisis de secuencia nucleotídica y aminoacídica de aislados de IPNV chilenos muestran un alto porcentaje de similitud con los serotipos aislados en dichos países, A1 y A2 respectivamente, sugiriendo un origen común (Espinoza y col., 1985, Mutoloki y Evensen, 2011).

Infección por IPNV en salmones.

El salmón es una especie anádroma, es decir, un pez que nace y cumple sus primeras etapas de desarrollo en agua dulce para luego migrar a agua de mar, donde crece y madura para retornar a agua dulce a reproducirse. Durante su ciclo de vida se pueden distinguir seis etapas de desarrollo, de las cuales las primeras cuatro (ova o huevo, alevín o espécimen recién nacido, fry y parr) ocurren en agua dulce, mientras que los estadios de smolt y el salmón maduro se desarrollan en aguas marinas. El cambio de un medio a otro produce un fuerte grado de estrés en los salmones juveniles, lo que coincide con una marcada sensibilidad frente a diversos agentes infecciosos (Klemetsen y col., 2003).

Por otra parte, se ha determinado que IPNV puede infectar diversas especies y se ha logrado detectar en al menos 32 familias de peces, moluscos y crustáceos, sin embargo se desconoce el rol que podría estar desempeñando en la mayoría de estos (Hill y Way, 1995). En salmones, IPNV se manifiesta en forma de brotes, los que pueden afectar especímenes juveniles durante la etapa de fry hasta 4 meses después del establecimiento de alimentación exógena. Durante esta etapa la mortalidad puede alcanzar un 90% y los individuos afectados presentan signos típicos como oscurecimiento del color de la piel y conducta natatoria anormal; como nado en la parte alta de la columna de agua, abatimiento lateral e hiperventilación. Los hallazgos histopatológicos frecuentemente muestran necrosis severa de las células acinares del páncreas junto con necrosis del intestino e hígado (Robert y Pearson, 2005, Smail y col.,

2006). La infección durante etapas posteriores de desarrollo en agua dulce (parr y smolt) suele ser menos severa, produciendo una mortalidad en el orden del 10 al 20% de la población afectada. Sin embargo, un segundo punto crítico se presenta durante la transferencia de agua dulce a salada, durante la etapa de smolt, generalmente luego de 2-3 meses de la transferencia, la mortalidad puede alcanzar un 50% (Bruno 2004, Robert y Pearson 2005). La infección durante esta etapa se manifiesta con conducta natatoria anormal y el pez deja de alimentarse. Durante la inspección macroscópica de los órganos internos se puede observar hígado pálido y presencia de exudado intestinal (intestino catarral)(McKnight y Roberts 1976).

Factores de virulencia.

Mediante comparación de secuencias aminoacídicas de peptidos virales provenientes de aislados de campo, se han identificado motivos supuestamente asociados a virulencia en salmón del Atlántico. De acuerdo a esto, las cepas virulentas presentaron los residuos 217Thr, 221Ala, 247Thr/Ala, y 500Tyr/His en la proteína principal de la cápside, VP2 (Santi y col., 2004). De igual modo, realizando desafíos con varias cepas recombinantes de IPNV, se determinó que los residuos 217 y 221 de VP2 son los determinantes de virulencia en cepas del serotipo Sp (Song y col., 2005). Así, se observó que los virus que presentaron 217Thr y 221Ala fueron muy virulentos; las cepas que presentaron 217Pro y en 221Ala fueron medianamente virulentas, y las cepas con 221Thr e indistinto 217 resultaron avirulentas (Song y col 2005). Sin embargo, en estudios similares

con cepas escocesas, los aislados con residuos 217Pro y 221Ala en VP2 presentaron virulencia similar a las cepas con 217Thr y 221Ala (Smail y col 2006). Estos antecedentes sugieren que en la severidad de la infección por IPNV intervendrían factores adicionales, posiblemente asociados al huésped y/o condiciones ambientales (Santi y col, 2004).

Respuesta inmunológica.

Los salmónidos presentan una respuesta inmunológica frente a IPNV mediada principalmente por interferón, el cual tiene un efecto sistémico, induciendo, entre otros efectores, a la proteína Mx la que por medio de mecanismos que no están del todo esclarecidos, interrumpe la replicación viral en las células infectadas (Larsen y col., 2004, McBeath y col., 2007). Células antivirales citotóxicas capaces de destruir células infectadas también han sido reportadas en salmónidos y juegan un rol importante en la respuesta inmunológica frente a infecciones virales (Ellis 2001).

Características generales y ciclo biológico de IPNV.

IPNV es un virus sin membrana con estructura icosaédrica que alcanza 60 nm de diámetro. Su genoma está compuesto de RNA de doble hebra (dsRNA) bisegmentado. El segmento A, de alrededor de 3 kb codifica una poliproteína precursora (pVP2-VP4-VP3) que luego de su procesamiento proteolítico mediado por VP4, produce las proteínas estructurales VP2 (54 KDa) y VP3 (31 KDa) (Dobos,1995, Birghan y col., 2000). La proteína VP2 se organiza en

trímeros y constituye el componente principal de la cápside viral (Dobos, 1995, Coulibaly y col., 2010). La proteína VP3 por su parte, se asocia al genoma viral e interactúa con la RNA polimerasa viral y con VP2, cumpliendo un rol esencial en la morfogénesis de la partícula viral (Bahar y col. 2013). Adicionalmente, a partir del segmento genómico A se produce la proteína no estructural VP5 (17 KDa) de función desconocida a la fecha (Santi y col., 2005). El segmento B, de aproximadamente 2.7 kb codifica una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRNAPol), péptido que se puede encontrar en forma libre o ligada covalentemente con ambos segmentos genómicos (Vpg) (Dobos, 1995).

El ciclo de replicación de IPNV se ha estudiado principalmente en células CHSE-214, provenientes de embrión de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*). En estas condiciones toma aproximadamente 24 horas a 15°C y comienza con la adsorción de las partículas virales a la superficie celular, posiblemente mediada por receptor(es) cuya identidad es desconocida actualmente (Couve y col., 1992, Kuznar y col., 1995, Dobos y col., 1995). Luego de 20 minutos, parte de las partículas virales adsorbidas penetran hacia los compartimentos endocíticos por un mecanismo no identificado hasta ahora (Couve y col. 1992, Kuznar y col., 1995). Entre 2 y 4 horas se detectan intermediarios de la transcripción y la síntesis de proteínas comienza alrededor de las 3 horas. Durante la transcripción, ambos segmentos genómicos dan origen a RNAs mensajeros carentes de la estructura CAP en 5' y poliadenilación en 3' (Dobos, 1977, Somogyi y Dobos, 1980, Dobos y Roberts,

1983). La replicación del genoma es semiconservativa y se realiza a partir de un complejo de ribonucleoproteína que contiene una cadena de longitud completa con sentido negativo, la que es usada como templado para la síntesis de diversas formas truncadas en 3' de la hebra positiva (Somogyi y Dobos, 1980, Dobos y Roberts, 1983, Cortez-San Martín y col., 2009). La morfogénesis de la partícula viral comprende el procesamiento proteolítico de la proteína pre-VP2 (pVP2) en el extremo C terminal, lo que lleva a la producción de la proteína VP2 madura (Dobos, 1977). Esta maduración toma lugar después del ensamblaje, paso que sería controlado por VP3 (Villanueva y col. 2004, Chevalier y col., 2004). De acuerdo a datos de modelamiento molecular se cree que la capsida viral estaría compuesta exclusivamente por trímeros de la proteína VP2 (Coulibaly y col., 2010). Así mismo, VP2 ha sido identificado como el principal blanco de anticuerpos neutralizantes y representa un importante determinante de virulencia de IPNV, probablemente como consecuencia de su afinidad por receptores celulares (Santi y col., 2004, Sano y col., 1992, Shivapa y col., 2004). Adicionalmente, la expresión de VP2 recombinante por sí misma, lleva a la producción de partículas sub-virales (SVP) conformadas por 20 trímeros de VP2 (Coulibaly y col 2010). Se ha observado que estas SVP son capaces inducir la producción de inmunidad humoral protectora frente al virus completo en salmones, sugiriendo un alto grado de similitud de conformación estructural entre ambos (Martínez-Alonso 2012, Allnutt y col., 2007).

Internalización de IPNV.

Aunque los mecanismos de entrada del virus no han sido aclarados a la fecha, estudios de ultraestructura sugieren que el virus utilizaría el sistema endosomal durante el ingreso a la célula. La ferritina cationica se ha utilizado clásicamente en estudios de internalización de la fracción membranosa de la célula ya que tiene la ventaja de adsorberse de manera inespecífica a componentes de la superficie celular con carga negativa. De este modo, las fracciones de membrana que son internalizadas mediante distintos procesos endocíticos pueden ser localizadas por su marca electrondensa bajo microscopía electrónica. Utilizando esta aproximación metodológica, Couve y cols., demostraron que el IPNV aparece internalizado en compartimentos vesiculares periféricos tempranamente luego de ser inoculado en las células CHSE-214 (Couve y col., 1992).

Adicionalmente, existen evidencias que sugieren que IPNV, como numerosos otros virus, podría utilizar la maduración endosomal para gatillar el ingreso al citoplasma (Farias y col., 1988, Kuznar y col., 1995). La maduración endosomal incluye disminución progresiva del pH intravesicular junto con cambios en la composición de los fosfolípidos de membrana, reacciones de clivaje proteolítico y reacciones redox. Estos cambios frecuentemente son utilizados por diversos virus para penetrar hacia el citoplasma. De este modo, algunos virus con envoltura reaccionan a la variación del pH mediante cambios conformacionales sus proteínas de fusión. Estos cambios se manifiestan en la exposición de residuos hidrofóbicos en las mismas, los que atacan la membrana endocítica y

gatillan la fusión de la ésta con la membrana viral. Como resultado de la fusión, la capsida viral es liberada al citoplasma (Yamauchi y Helenius, 2013). Por su parte, los mecanismos de penetración los virus no envueltos, como el virus IPNV han sido menos estudiados. No obstante existen abundantes ejemplos de virus desnudos que escapan hacia el citoplasma o vierten el contenido de sus cápsides luego de sufrir cambios conformacionales inducidos por variaciones en el pH (Yamauchi y Helenius, 2013).

Usando virus marcado con FITC, cuya intensidad de fluorescencia decrece con el pH, se ha observado que IPNV se acumula en compartimentos endocíticos ácidos luego del escape de la superficie celular (Kuznar y col., 1995). Así mismo, se ha demostrado que el cloruro de amonio, agente neutralizante del pH endosomal, inhibe la replicación del IPNV (Farias y col., 1988). Sin embargo, no se ha establecido si este agente inhibe directamente la internalización del virus o compromete etapas posteriores del ciclo replicativo. En el sentido opuesto, estudios usando el macrólido Bafilomicina A1, un poderoso inhibidor de la ATPasa vacuolar tipo H⁺, indican que a concentraciones suficientes para producir un incremento del pH endosomal, no se afecta la replicación de IPNV, desestimando la dependencia del pH endosomal como mecanismo de penetración al citoplasma (Yoshimori y col., 1991, Espinoza y Kuznar, 1997).

Adicionalmente, observaciones realizadas con microscopia electrónica durante las etapas tempranas de infección con IPNV en células CHSE-214, muestran la presencia partículas virales asociadas a estructuras similares a vesículas recubiertas de clatrina (Granzow y col., 1997). Sin embargo, la composición de

estas vesículas no fue establecida.

Recientemente Moen y cols., utilizando una aproximación genética, basada en el análisis de regiones genómicas de salmón del Atlántico que determinan resistencia a la infección por IPNV (QTL; *quantitative trait locus*), determinaron que polimorfismos en el gen de la caderina epitelial (*cdh1*) contribuyen de manera importante a este fenotipo (Moen y cols., 2015). Adicionalmente, estos mismos autores observaron que el virus co-inmunoprecipita y co-localiza con el producto de este gen en compartimentos vesiculares de secciones de tejido hepático organotípico infectado con el IPNV (Moen y cols., 2015). Esto sugiere que la caderina epitelial podría estar jugando un rol relevante durante el ingreso del virus IPN a la célula. Las caderinas representan una de las principales moléculas de adhesión de la células y juegan un rol central en la formación de las uniones adherentes intercelulares. El tráfico endocítico de membranas es reconocido como el mecanismo fundamental de modulación de su función. De este modo, los niveles de cadherina en la superficie celular están determinados por las tasas de endocitosis y degradación versus la síntesis de nuevas proteínas y reciclaje de moléculas hacia la superficie celular. Aunque la internalización de caderina por la vía endocítica dependiente de clatrina es la mejor caracterizada, se ha descrito que esta también puede ocurrir por vías independientes de clatrina, como macropinocitosis y balsas lipídicas y/o caveolas, lo cual ocurre en directa relación al estímulo que gatille la internalización y el tejido estudiado (Cadwell y cols., 2016).

Mecanismos virales de ingreso a la célula.

Los virus, al ser parásitos intracelulares obligatorios, deben entrar en la célula huésped y liberar su material genético y proteínas accesorias para iniciar su ciclo replicativo. La membrana plasmática de la célula huésped representa la primera barrera física que los virus deben sobrepasar para lograr la entrada. Algunos virus con envoltura como el virus del herpes simplex tipo 1 (VHS-1) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son capaces de ingresar a la célula mediante fusión directa de la membrana viral con la membrana plasmática de su célula blanco (Smith y Helenius, 2004).

Por otro lado, muchos virus de animales utilizan la endocitosis para entrar en la célula y desarrollar su ciclo replicativo. La endocitosis es un proceso de transporte activo, el que mediante invaginaciones de la membrana plasmática resulta en la formación de vesículas intracelulares que capturan componentes de la superficie celular y/o del medio extracelular. Estas vesículas pasan a formar parte de la red endocítica, la que comprende un intrincado sistema de membranas que se encarga del tráfico y del procesamiento de los componentes internalizados (Di Fiore y col., 2014). Se han descrito tres mecanismos o vías principales de endocitosis; macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina (EMC) y endocitosis mediada por balsa lipídicas y/o caveolas, cada uno de los cuales es utilizado por diversos agentes infecciosos, incluyendo virus, para su ingreso a la célula (Yamauchi y Helenius, 2013, Cossart y Helenius, 2014, Smith y Helenius, 2004).

La utilización de las distintas vías endocíticas ofrece numerosas ventajas a la

partícula viral al momento de ingresar a su célula hospedera, como la posibilidad sortear obstáculos como la membrana plasmática, y la red intrincada de microfilamentos de la corteza de actina. Del mismo modo, el uso de endocitosis le ofrece al virus un mecanismo de transporte intracelular hacia la porción mas interna del citoplasma, permitiendole alcanzar los compartimentos subcelulares optimos para la replicación viral (Yamauchi y Helenius, 2013). Adicionalmente, los virus ingresados por endocitosis escapan a la vigilancia del sistema inmunológico al no dejar rastros en membrana plasmática, como si ocurre durante el ingreso por fusión de membranas (Cossart y Helenius, 2014)

Ingreso de virus a la célula a través de endocitosis.

Numerosos virus utilizan la endocitosis como mecanismo de entrada a la célula, proceso que comienza con la adhesión de la partícula viral a distintos elementos de superficie celular, los que le confieren una determinada especificidad celular, un tropismo tisular y finalmente determinan el curso de la enfermedad (Yamauchi y Helenius, 2013, Cossart y Helenius, 2014).

Los elementos de adhesión pueden ser de diversa naturaleza, ya sea; proteínas, carbohidratos o lípidos. Muchos de estos sirven solo como factores de adhesión, permitiendo la concentración del virus en determinadas regiones de la superficie celular. Otras representan receptores verdaderos o factores accesorios, los que ademas de servir de puntos de anclaje, son responsables de guiar a los virus hacia una determinada via endocitica mediante la transmisión de las señales apropiadas hacia el citoplasma (Smith y Helenius,



2004, Cossart y Helenius, 2014).

Los receptores celulares generalmente no son únicos, pudiendo un virus utilizar múltiples receptores. Un claro ejemplo de esto es el caso de los miembros del género *reovirus*, los que interactúan con múltiples moléculas de superficie celular a través de diferentes dominios de las proteínas de su cápside, incluyendo varias integrinas y proteínas de shock térmico, las que actúan como receptores y factores accesorios de entrada (Lopez y Arias, 2004).

Durante la etapa de señalización celular se produce la activación de múltiples factores, tanto a nivel de superficie celular como transductores y efectores río abajo, que llevan a cambios celulares que favorecen el proceso endocítico (Yamauchi y Helenius, 2013). Un ejemplo bien caracterizado de esta etapa lo constituye la inducción de la formación de rizos de membrana y macropinocitosis por parte del poxvirus vacuna (VACV) (Mercer y Helenius, 2008, Mercer y col., 2010). Luego de la activación de receptores de fosfatidil serina, el VACV es capaz de inducir la formación de grandes protrusiones de membrana en un proceso dependiente de actina. Esto lo logra a través de la activación de la vía de señalización gatillada comúnmente por cuerpos apoptóticos, la que luego de la activación de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), conduce a la activación de la GTPasa de tipo Rho Rac1 y la quinasa activada por P21 (PAK1) (Mercer y Helenius, 2008).

De modo similar, durante la entrada viral dependiente de caveolas y balsas lipídicas son activadas más de 40 quinasas, mientras que la internalización de virus por endocitosis mediada por clatrina depende de 4,5 fosfoinositol

bisfosfato junto con más 60 proteínas diferentes, que son reclutadas secuencialmente durante el proceso endocítico (Pelkmans y Helenius, 2002, Pelkmans y col., 2005, Yamauchi y Helenius, 2013).

Endocitosis Mediada por Clatrina.

La EMC es la principal vía de internalización de diversas macromoléculas y es quizás la vía de endocítica mejor estudiada. Llamada también endocitosis mediada por receptores por el requerimiento de la unión de un ligando a su respectivo receptor como parte de la activación de este mecanismo. Durante la internalización de una molécula cargo, las moléculas de clatrina, cuya conformación recuerda un *triskelion*, son reclutadas a la membrana plasmática por el complejo adaptador AP2 (*adaptor protein complex 2*) y luego son ensambladas en una estructura poliédrica de alrededor de 100 nm (Kirchhausen y col., 2014, McMahon y Bucci, 2011).

La EMC comienza con la etapa de nucleación, durante la cual ocurre la rápida formación (1-6 min.) de pequeñas invaginaciones de la membrana recubiertas por clatrina llamados "pozos". Esto ocurre en módulos de nucleación y para que se produzca, la proteína AP2 debe ser activada. Dicha activación es gatillada por motivos endocíticos presentes en la porción citoplasmática de receptores de membrana, los que son activados anteriormente por la unión a su ligando (McMahon y Bucci, 2011, Cosart y Helenius, 2014). La formación de estos módulos requiere adicionalmente de fosfatidilinositol -4,5-bisfosfato y las proteínas auxiliares Epsin, FCHO e intersectina y usualmente puede ser inhibida

por clorpromazina (Jost y col., 1998, Yamabhai y col., 1998, Chen y col., 1999, Henne y col., 2010, Wang y col., 1993).

Durante la internalización, la vesícula recubierta de clatrina es liberada de la cara interna de la membrana plasmática por la acción de la dinamina, una GTPasa cuya actividad puede ser anulada específicamente por el compuesto Dynasore o mediante el uso de la dominante negativa dinamina-2 K44A (Macia y col., 2006, McCluskey y col., 2013). Una vez libre de la membrana, transcurridos 5-20 segundos, la cubierta de clatrina se disocia de la vesícula, paso que es asistido por la acción de Hsp70 y auxilina. Finalmente en un lapso de minutos la vesícula se fusiona y vierte su contenido en el sistema endosomal (McMahon y Bucrot, 2011, Cossart y Helenius 2014).

Aunque en líneas generales la EMC es independiente de actina, mediante el seguimiento de una sola partícula viral (single virus tracking) se ha observado que la internalización de algunos virus, con formas irregulares y tamaños medianos como el virus de la estomatitis vesicular (VSV), pueden inducir la formación de vesículas recubiertas parcialmente de clatrina con tamaños y formas irregulares. La formación de estas estructuras es dependiente de la polimerización local de actina y la internalización de VSV es parcialmente inhibida por el uso de citocalasina D (Cureton y col., 2009, Cureton y col., 2010). Al respecto, recientemente se ha descrito que la formación de las cavidades recubiertas de clatrina pueden ser dependientes e independientes de polimerización de actina, esto estaría determinado por tensión en la membrana plasmática (tensión mecánica y osmótica) que impediría la propagación del

recubrimiento de clatrina y estaría mediado por la proteína Hip1R que serviría de enganche entre la cadena liviana de clatrina y la actina (Boulant y col., 2011, McMahon y Bucrot, 2011).

Mediante el uso de partículas virales marcadas con moléculas o proteínas fluorescentes acoplado a tecnologías de visualización confocal y análisis de imagen de alta resolución en tiempo real (*live-cell imaging*) se han observado dos mecanismos de internalización durante la CME; algunos virus, como el virus Dengue (DENV), luego de un período de movimiento lateral, difunden dentro de áreas con vesículas recubiertas con clatrina preformadas, mientras que otros, como el virus influenza (IV) directamente inducen el ensamblaje de estas en el sitio de unión a su receptor (Cossart y Helenius, 2014, Rust y col., 2004, van der Schaar y col., 2008)

Endocitosis dependiente de balsas lipídicas y/o caveolas.

Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana plasmática enriquecidos de lípidos saturados y colesterol. Debido a su composición, son estructuras rígidas y altamente ordenadas. Esta característica les permite moverse lateralmente en el plano de la membrana plasmática, cuya composición, principalmente de fosfolípidos no saturados, constituye un medio más fluido. (Parton y Richards, 2003). Adicionalmente, las balsas lipídicas albergan diversas proteínas, tales como las proteínas ancladas a glicofosfatidilinositol (GPI), proteínas doblemente aciladas (ej.; las tirosina quinasas de la familia Src y las subunidades G α de las proteínas G

heterotrimericas), y proteínas palmitoiladas y asociadas a colesterol. Del mismo modo, la proteína caveolina, componente central de las caveolas, es una proteína integral de membrana residente de las balsas lipídicas (Liu y col., 2002).

Las caveolas, o caveolae, del latín "pequeñas cuevas", son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática (50-10 nm) con forma de bulbo que se han asociado a endocitosis, transitos, mantención de la composición de la membrana plasmática, protección frente a stress mecánico y señalización celular (Cheng y Nichols, 2016, Parton y Collins, 2016). Además de caveolina, la composición de las caveolas incluye 4 tipos de cavin (cavin 1-4), las que son expresadas en muchos tipos celulares y son esenciales para la biogénesis caveolar (Parton y Collins, 2016).

Los mecanismos gatillantes de la formación de las caveolas actualmente son desconocidos y son objeto de intensa investigación (Cheng y Nichols, 2016). Sin embargo, se sabe que la escisión de la vesícula estaría mediada por la GTPasa dinamina, luego de lo cual esta vesícula migraría hasta incorporarse en una estructura de pH neutral llamada caveosoma (Parton y Richard, 2003).

Se han propuesto varios cargos de esta vía endocítica, incluyendo proteínas ancladas a GPI, el receptor de la insulina, la toxina shiga y de cólera, colesterol, albúmina y el virus SV40 (Pelksman y Helenius, 2002, Cheng y Nichols, 2016).

Respecto de este último, utilizando microscopía de partículas infectivas marcadas con fluorescencia, se ha demostrado que SV40 colocaliza con caveolina 1 y la infección es bloqueada por drogas que distorsionan

selectivamente las balsas lipídicas y caveolas en las células CV-1 de mono verde africano (Anderson y col., 1996, Pelkmans y col., 2001, Pelkmans y col., 2004). En el mismo sentido, la inoculación de SV40 induce intensa fosforilación de quinasas en caveolas y el knockdown de caveolina 1 por shRNA y siRNA resulta en la disminución de endocitosis e infección por SV40 en células HeLa (Pelkmans y col., 2005). Adicionalmente, se ha descrito otros polyomavirus también pueden utilizar esta vía endocítica, como el virus BK y el polyomavirus murino (Richterová y col., 2001, Neu y col., 2009).

Macropinocitosis.

La macropinocitosis es un proceso de internalización de componentes no específicos de la fase extracelular. Es un proceso estrictamente dependiente de actina ya que requiere importantes modificaciones del citoesqueleto. Estas modificaciones llevan a la formación de grandes protrusiones que extruyen desde la membrana plasmática y se cierran sobre sí mismas para capturar una fracción del medio extracelular (Kerr y Teasdale, 2009). La macropinocitosis se manifiesta de manera constitutiva en las células dendríticas y macrófagos, en las cuales cumple un rol relevante durante la presentación de antígenos extracelulares. En otros linajes celulares debe ser inducida y responde a la activación de receptores de superficie celular. Adicionalmente, la macropinocitosis participa en la captura de nutrientes, la detección de señales extracelulares y el recambio de la membrana plasmática (Kerr y Teasdale, 2009, Buckley y col., 2016, Buckley y King, 2017)

La formación del macropinosoma requiere de cambios en la estructura tridimensional del citoesqueleto, cuya coordinación temporal y espacial recae principalmente en las GTPasas de tipo Rho y Ras y en la dinámica de fosfoinositoles regulada por quinasas y fosfatasas (Swanson, 2008; Veltman y col., 2016, Buckley y col., 2016, Buckley y King, 2017). De este modo, diversas proteínas modificadoras de la dinámica de actina son reclutadas al sitio de formación de las protrusiones de membrana para formar copas macropinocíticas. Estas estructuras, con forma de bolsillo, se cierran en vesículas de tamaños superiores a los 200 nm, se escinden de la membrana plasmática y transitan hacia el interior de la célula. Este tránsito va acompañado de un proceso de maduración, el que incluye su compactación y la adquisición de marcadores endosomales tardíos, proceso que es orquestado por las GTPasas de la familia Rab y los fosfoinositoles (Egami y col., 2014, Buckley y King, 2017, Marques y col., 2017). Finalmente, el macropinosoma puede unirse al lisosoma o, menos frecuentemente, puede ser reciclado hacia la membrana plasmática (Kerr y Teasdale, 2009, Buckley y King, 2017).

Numerosos agentes infecciosos, incluidos bacterias, virus, protozoos y priones son capaces de utilizar esta vía endocítica para ingresar a la célula, ya sea de manera pasiva o induciendo directamente su activación (Mercer y Helenius, 2009, Marques y col., 2017). El virus vacuna (VACV), enterovirus 1 (EnV1), coxsackievirus B (CVB), virus Ebola (EBOV), virus Nipah (NiV), influenza A (IAV), adenovirus 3 (Adv3), citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 8 (KSHV), virus respiratorio sincicial (VRS), virus de la fiebre aftosa (FMDV) y

virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1) se cuentan entre estos (Mercer y Helenius, 2009, Pernet y col., 2009, Raghu y col., 2009, Saeed y col., 2010, Nanbo y col., 2010, De Vries y col., 2011, Haspot y col., 2012, Krzyzaniak y col., 2013, Hetzeneker y col., 2016). Así mismo, se ha determinado que el virus aviar de la enfermedad infecciosa de la bursa (IBDV), especie prototipo del género *Avibirnavirus* y filogenéticamente relacionado con IPNV, ingresa a su célula hospedera a través de macropinocitosis (Delgui y col., 2009, Yip y col., 2012, Gimenez y col., 2015). Se ha determinado que el ingreso de IBDV comienza por la unión de la partícula viral a sus dos receptores principales, la proteína de shock térmico HSP90 e integrina $\alpha 4\beta 1$ (Lin y col., 2007, Delgui y col., 2009). La macropinocitosis estaría gatillada por la interacción entre el virus y la integrina $\alpha 4\beta 1$ dando origen a la cascada de señalización que compromete a c-Src, la GTPasa RhoA y Akt (Ye y col., 2017)

En particular, IBDV e IPNV son los birnavirus mejor estudiados y sus proteínas principales de cápside presentan alta conservación de secuencia aminoacídica la que alcanza aproximadamente 40 y 35% para VP2 y VP3, respectivamente (Pous y col., 2005, Coulibaly y col., 2005). De acuerdo a estudios cristalográficos y estudios de modelamiento tridimensional de la cápside, IBDV e IPNV también comparten importantes similitudes estructurales. Este hecho permite sugerir la hipótesis de que ambos agentes podrían tener la misma ruta de ingreso a sus respectivas células hospederas (Özel y col., 1985, Pous y col., 2005, Coulibaly y col., 2005, Coulibaly y col., 2010).

Dado que a la fecha se desconoce la vía de ingreso del virus IPN, el presente

estudio tiene como propósito determinar dicho mecanismo. De acuerdo a los antecedentes expuestos resulta plausible de que IPNV ingrese a su célula hospedera utilizando un mecanismo de endocitosis similar al utilizado por IBDV basado en macropinocitosis.

Este estudio constituye un aporte para la comprensión de la interacción virus-hospedero, perfilando nuevos blancos terapéuticos para enfrentar esta infección en el contexto del mejoramiento de los procesos de producción de este importante sector industrial en nuestro país como de otros países productores de salmón.

HIPOTESIS

“IPNV ingresa a la célula utilizando macropinocitosis”.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Identificar la vía de ingreso a la célula utilizada por el virus IPN.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el ingreso de IPNV a la célula CHSE-214 por endocitosis mediada por clatrina y balsas lipídicas / caveolas.
2. Evaluar el ingreso de IPNV a las células CHSE-214 por macropinocitosis.
3. Evaluar el ingreso de IPNV a las células SHK-1 por macropinocitosis.

MATERIALES Y METODOS

Células. Las células CHSE-214 (ATCC CRL 1681) se cultivaron a 20°C en medio mínimo esencial de Eagle (MEM), con sales de Earle y L-glutamina, suplementado con aminoácidos esenciales, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina y 2-5% de suero fetal bovino (SFB) (Corning, NY, EE.UU.). Las células SHK-1 (ECACC 97111106) se propagaron en medio Leibovitz's L-15, modificado con L-glutamina (Corning, NY, EE.UU.) suplementado con aminoácidos esenciales, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, y 10% de suero fetal bovino (SFB) a 20°C. Las células HeLa (ATCC CCL-2) se cultivaron a 37°C y en ambiente de 5% de CO₂ empleando medio MEM suplementado con 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

Se utilizó el virus IPN cepa Sp, la cual es una de las cepas prevalentes en Chile (Tapia y col., 2015).

Reactivos. 5-(N-etil-N-isopropil) amiloride (EIPA), blebbistatina, casin, clorpromazina, citocalasina D, complejo de filipina, IPA-3, nocodazol, NSC23766, rottlerina, salirasib, wortmannina, Fluoromount™, polietilenglicol 8000 y Sepharose® 6B fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). La transferrina conjugada Alexa Fluor® 633 (Trf-A633), Dextran-Texas

Red® lisina fijable (70.000 MW) (DX-TR), subunidad B de la toxina del cólera conjugada con Alexa Fluor® 594 (CTB-A594), faloidina conjugada con rodamina y la solución de Hoechst 3342 se obtuvieron de Molecular Probes Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA). Los inhibidores utilizados y su blanco molecular se muestran en la tabla 1.

Anticuerpos. El anticuerpo oligoclonal de ratón anti-VP2 / VP3 de IPNV se obtuvo de Ango, Austral biológicos, (San Ramón, CA USA), el anticuerpo monoclonal de ratón J5 anti dsRNA IgG2b fue facilitado por Scicons English and Scientific Consulting Kft (Budapest, Hungría). El anticuerpo secundario IgG de burro anti-ratón, conjugado con Alexa Fluor® 488 se obtuvo de Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Purificación de partículas virales. El virus se propagó en células CHSE-214 hasta la aparición de efecto citopático masivo (5-7 días). Se separó el sobrenadante y se clarificó por centrifugación a 2000 rpm por 20 minutos. El virus fue precipitado con 6% de polietilenglicol (PEG) 8000 y 1% de NaCl. La mezcla se dejó agitando toda la noche a 4°C y al día siguiente se centrifugó a 8000 rpm por 30 min a 4°C. El sedimento se resuspendió en 2 ml de búfer fosfato salino (PBS) pH 7,4. Finalmente las partículas virales fueron purificadas mediante cromatografía de exclusión molecular con Sepharose® 6B en PBS pH 7,4. Las fracciones obtenidas se cuantificaron por medición espectrofotométrica de su absorbancia a 260 nm (A_{260} de $1.0 \text{ cm}^{-1} = 40 \text{ ng}$ de RNA) y RTqPCR

según protocolo descrito mas abajo (Julin y col., 2009). La infectividad de las partículas virales, (*tissue culture infectious dosis* 50%; TCID₅₀) se determinó mediante titulación por dilución límite (Reed y Muench, 1938, Barbas y col., 2007, Julin y col., 2009).

RTqPCR. El RNA se extrajo usando High Pure Nucleic Acid Viral kit (Roche) o TRIZOL® (Thermo Fisher Scientific) y la reacción de transcripción reversa y amplificación se realizó en un solo paso utilizando Brilliant II Sybr® Green QRT-PCR Master Mix, one step (Agilent Technologies) en el termociclador Rotor Gene 6000 Real-Time PRC Machine (Qiagen, Hilden, Alemania). Se utilizaron los partidores dirigidos a la región codificante de la proteína de la cápside VP2 usando condiciones descritas previamente (Julin y col., 2009).

Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Las células CHSE-214 y SHK-1 se propagaron hasta 60-70% de confluencia en placas de 24 pocillos con cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro. El virus IPN se inoculó a una MOI de 1 TCID₅₀, se dejó adsorber durante una hora a 4°C y se lavó con PBS, pH 7,4. Después de 6-12 h de incubación a 20°C para la infección en células CHSE-214 y 18-24 horas a la misma temperatura en células SHK-1, las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehido al 3,7% (PFA)-4% de sacarosa durante 20 min a 20°C, se bloquearon con glicina al 0,1% a temperatura ambiente por 5 min, se permeabilizaron con tritón 0,1 % durante 5 min a temperatura ambiente y se lavaron de nuevo con PBS. El anticuerpo

primario oligoclonal anti-VP2 / VP3 de IPNV (dilución 1: 500) o el anticuerpo monoclonal J5 anti dsRNA (dilución 1:500) se aplicó durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo en exceso se eliminó mediante 3 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno. Se aplicó anticuerpo secundario de burro anti-ratón conjugado con Alexa® Fluor 488 (dilución 1: 500) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS durante 5 min cada vez y se aplicó la solución de tinción nuclear de Hoechst (1: 1500) durante 15 min a temperatura ambiente. Adicionalmente, en algunos ensayos se usó faloidina conjugada con rodamina (1:300) para marcar la actina-F en el citoesqueleto. Esta tinción se aplicó por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las preparaciones se lavaron con PBS y con agua destilada y se montaron en portaobjetos usando Fluoromount™. Las preparaciones fueron observadas usando microscopio de epifluorescencia Olympus Spinning Disk IX81 usando lente objetivo de 40X. Se grabaron al menos 10 imágenes digitales para cada preparación. Se contaron al menos 250 células en cada preparación y se determinó el porcentaje de ellas que presentó señal fluorescente, es decir, aquellas que expresaron VP2 / VP3 de IPNV, utilizando la aplicación "cell counter" del programa ImageJ para Mac OS X versión 2.2.2-rc-54/1.51h (NIH, USA). Alternativamente, durante el estudio de la infección en células SHK-1, se midió la intensidad de fluorescencia como marcador de el nivel de expresión de las proteínas estructurales VP2/VP3 usando el mismo programa. Para esto se midió el parámetro de densidad integrada de la señal verde en el área total ocupada por la células en cada imagen y se dividió por el número de células en

la imagen correspondiente. Cada experimento se realizó por triplicado.

Tinción de actina durante la infección de IPNV. Las células CHSE-214 y SHK-1 fueron propagadas hasta un 70% y 90% de confluencia en placas de 24 pocillos con cubreobjetos circulares, respectivamente. Antes del ensayo, las células SHK-1 fueron incubadas por 16 horas adicionales en medio L-15 sin SFB, mientras que las células CHSE-214 fueron procesadas directamente. Las células CHSE-214 fueron inoculadas con IPNV (MOI=10) y el virus se dejó adsorber por 1 hora a 4°C para luego ser incubadas a 20°C por distintos tiempos. Las células SHK-1 fueron inoculadas con IPNV (MOI=30). Dado que se observó previamente que la incubación a 4°C induce cambios morfológicos significativos en las células SHK-1, estas fueron incubadas directamente a 20°C por distintos tiempos. Las preparaciones se fijaron con PFA-sacarosa 4% a distintos tiempos (0, 5, 15, 30, 45, 60, 120 minutos) y fueron procesadas por IFI para VP2/VP3 de IPNV de acuerdo a protocolo descrito mas arriba. La actina F se marcó con faloidina conjugada con rodamina (1:300) y se contrastó con tinción nuclear de Hoechst (1:1500). Las preparaciones fueron observadas en microscopio confocal de escaneo laser Nikon C2 Plus espectral, usando objetivo de 100X.

Inducción de captura de fase fluida. Las células fueron propagadas en placas de 24 pocillos con cubreobjetos circulares hasta una confluencia de 70-90% en medio MEM mas 2% de SFB para CHSE-214 y medio L15 mas 10% de SFB para SHK-1. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS pH 7,4 y se les

restituyó el medio de cultivo sin SFB. Luego de 16 horas de incubación a 20°C en ausencia de SFB, las células fueron lavadas con PBS pH 7,4 y se inoculó el virus IPN purificado en medio de cultivo sin SFB (MOI=2, 10, 20, 30 y 50 para CHSE-214 y MOI=10 y 30 para SHK-1). Para los ensayos en células CHSE-214 las partículas virales se dejaron adsorber durante 1 hora a 4°C, se lavaron con PBS pH7,4 frío para eliminar los virus no adsorbidos y se aplicó el marcador DX-TR diluido en medio de cultivo a 0,25 mg/mL por 15 min. Para los ensayos en células SHK-1 no se utilizó adsorción, sino que se inoculó el virus directamente en presencia del marcador DX-TR y se incubó por 10 y 30 min a 20°C. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con PFA 3.7% - sucrosa 4% en PBS, teñidas con solución de Hoechst (dilución 1:1500) y montadas con Fluoromount™. Las preparaciones fueron observadas en microscopio confocal de escaneo laser Zeiss LSM 250 con lente objetivo 62X. Se obtuvieron 10 fotos de cada condición experimental. Las señales de los macropinosomas (DX-TR) fueron cuantificadas mediante calculo de índice macropinocítico, usando programa Image J 1.50c4 según protocolo descrito previamente (Commisso y col., 2014). El análisis estadístico T de Student fue realizado usando programa GraphPad Prism 6.0c y las diferencias con $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas. Adicionalmente, para el ensayo en células CHSE-214 se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre el índice macropinocítico versus MOI de IPNV usando el programa GraphPad Prism 6.0c.

Infección en presencia de inhibidores de las vías de endocitosis. Las células se cultivaron hasta una confluencia de 60-70% para CHSE-214 y 80% para SHK-1 en placas de 24 pocillos con cubreobjetos circulares. Se lavaron dos veces con PBS y se pre-incubaron por 1 hora con el inhibidor diluido en medio de cultivo hasta la concentración correspondiente (Tablas 1).

Tabla 1: Lista de inhibidores y su blanco molecular.

Vía endocítica	Inhibidor	Blanco molecular	Referencia
Endocitosis mediada por clatrina	Clorpromazina	Clatrina y proteína AP2	Wang y col., 1993
	Dynasore	Dinamina-2	Macía y col., 2006
Endocitosis mediada por balsas lipídicas y/o caveolas	Filipina	Colesterol de las balsas lipídicas	Orlandi y col., 1998
	Nistatina	Ergosterol de las balsas lipídicas	Schnitzer y col., 1994
Macropinocitosis	Etil isopropil amiloride (EIPA)	Bomba protón- sodio NHE1	Koivusalo y col., 2010
	Nocodazol	Microtúbulos	Vásquez y col., 1997
	Blebbistatina	Miosina II	Kovács y col., 2004
	Citocalasina D	Despolimerizante de Actina F	Cooper y col., 1997
	IPA-3	Pak1	Deacon y col., 2008
	Rottlerina	PKC	Gschwendt y col., 1994
	Wortmannina	PI3K	Walker y col., 2000
	Casina	Rho GTPasa Cdc42	Peterson y col., 2006
	NSC23766	Rho GTPasa Rac1	Gao y col., 2004
	Salirasib	GTPasa Ras	Rotblat y col., 2008

El IPNV (MOI=1) se inoculó y se dejó adsorber durante 1 h a 4°C y se mantuvo

por 1 h a 20°C en presencia del inhibidor. Las células se lavaron con PBS, se repuso el medio con el inhibidor y la infección se dejó continuar durante 6-12 horas adicionales para CHSE-214 y 18-24 horas para SHK-1. Después de la incubación, las células se procesaron para inmunofluorescencia indirecta (IFI) y se observaron en el microscopio de epifluorescencia Olympus Spinning Disk IX81 usando lente objetivo de 40X. El porcentaje de células infectadas se determinó usando el programa ImageJ como se indicó anteriormente. Cada ensayo se realizó en triplicados independientes.

Efecto de inhibidores en etapas tempranas de la infección. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos con cubreobjetos circulares, y se preincubaron con el inhibidor diluido hasta la concentración correspondiente como se indica mas arriba. El IPNV (MOI=1) se inoculó y se dejó adsorber durante 1 h a 4°C y se mantuvo por 1 h a 20°C en presencia del inhibidor. Las células se lavaron con PBS, se trataron con 50 µl de tripsina-EDTA (diluida 1:10) por 2 minutos para digerir los virus adsorbidos no internalizados. Este tiempo fue suficiente para soltar la totalidad de las células de la monocapa. Luego de esto se repuso el medio con SFB sin el inhibidor y la infección se dejó continuar durante 12 horas adicionales. Finalmente, las células se procesaron para inmunofluorescencia indirecta (IFI), se observaron en el microscopio de epifluorescencia Olympus Spinning Disk IX81 y se realizaron recuentos de células con expresión de VP2/VP3 como se indica mas arriba.

Internalización de Trf-A633, DX-TR y CTB-A594. Las células se sembraron en cubreobjetos hasta 75-80% de confluencia se lavaron 4 veces con PBS. Se añadieron los inhibidores EIPA, clorpromazina, complejo de filipina I o nistatina a las concentraciones deseadas y se incubaron durante 1 h a 20°C. Se agregaron los marcadores Tf-A633, DX-TR y CTB-594 a una concentración final de 10, 250 y 20 µg/mL, respectivamente, en presencia o ausencia del inhibidor correspondiente. Las células se incubaron a 20°C durante 15 min para Tf-A633, 15 min para DX-TR y 30 min para CTB-A594, al menos que se indique otro tiempo. Las células se lavaron tres veces con PBS para eliminar conjugados libres. A continuación, las preparaciones se fijaron con PFA-sacarosa al 4% durante 30 min. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 1: 1500 y se montaron con Fluoromount™. Las células se observaron en el microscopio confocal C2 plus eclipse TI Nikon con los lentes objetivo de 62X y 100X. Las imágenes fueron procesadas usando el software Image J.

Análisis de co-localización de partículas de IPNV y DX-TR. CHSE-214 fueron propagadas hasta 70% de confluencia y se incubaron durante 16 horas en ausencia de suero. Se inoculó el IPNV (MOI=1) y se dejó a adsorber durante 1 hora a 4°C. Las células se pulsaron con 250 µg/ml de DX-TR durante 45 minutos a 20°C, se lavaron cuatro veces con PBS frío, se fijaron con PFA-sacarosa al 4% durante 30 minutos y se procesaron para IFI usando anticuerpo oligoclonal de ratón anti-Vp2/VP3 IPNV, y anticuerpo secundario de burro anti ratón conjugado Alexa fluor® 488 como se describe anteriormente. Las

imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal de barrido láser Zeiss LSM 250 (objetivo 100X). El coeficiente co-localización de Manders se determinó con el programa Image J 1.50c4 usando las aplicaciones coloc-2 y colocalization threshold (Manders y col., 1993).

Estadísticas. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado y se calcularon como valores normalizados o porcentajes +/- desviación estándar (DE). La prueba de significación estadística (prueba t) se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6.0c y $p < 0,01$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. Objetivo 1: Evaluar el ingreso de IPNV a la célula utilizando endocitosis mediada por clatrina y balsas lipídicas / caveolas.

1.1 Infección del virus IPN en células CHSE-214.

Las células CHSE-214 se han usado clásicamente para la propagación y la titulación de IPNV y en éstas se han realizado la mayoría de los estudios de replicación de IPNV (Dobos, 1995). Consecuentemente, mucho de lo que se conoce actualmente respecto del ciclo biológico de IPNV ha sido obtenido en este modelo celular. Por otro lado, la cepa del virus utilizada en el presente estudio correspondió a IPNV serotipo Sp, el cual es representativo de las cepas prevalentes en Chile (Tapia y col., 2015). Cuando el virus fue inoculado en células CHSE-214 a MOI de 1 TCID₅₀, se observó un efecto citopático a las 24 horas de incubación a 20°C (Figura 1).

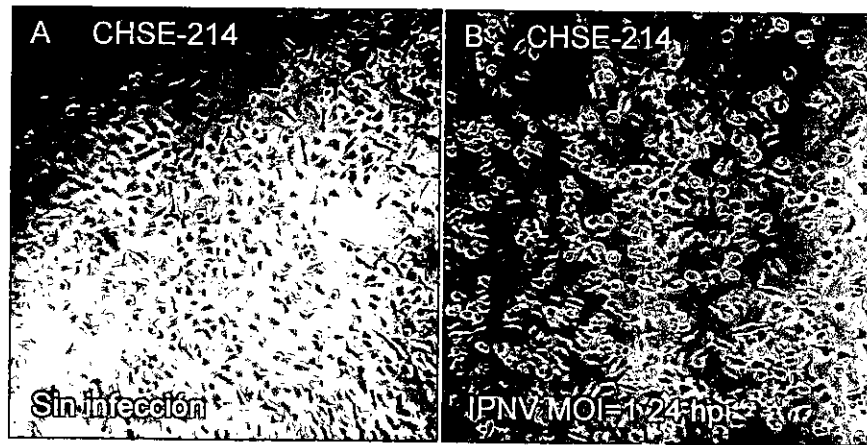


Figura 1. Infección de células CHSE-214 con IPNV. Las células CHSE-214 fueron propagadas en frasco de 25 cm² hasta 80-90% de confluencia en medio mínimo esencial de Eagle con sales de Earle y L-glutamina (MEM) suplementado con aminoácidos esenciales, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomina y 2% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich)(A). Las células fueron infectadas con IPNV a una (MOI=1) y luego de 24 horas de incubación (hpi) se observó su efecto citopático (B).

1.2 Cinética de replicación viral en la línea celular CHSE-214.

Se determinó el número de equivalentes de genoma (EG) liberados al sobrenadante del cultivo celular utilizando reacción de transcripción reversa seguida de reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (RTqPCR) de acuerdo a protocolo descrito previamente (Julin y col., 2009). Se determinó que la liberación de partículas virales comienza a aumentar de manera exponencial a partir de las 8 horas post infección y alcanza un nivel estable a las 48 horas, cuando se detecta alrededor de 10⁸ EG/mL (Figura 2) equivalente a un título de 10⁷ TCID₅₀/mL determinado por dilución límite.

Cinética de replicación de IPNV
en células CHSE-214

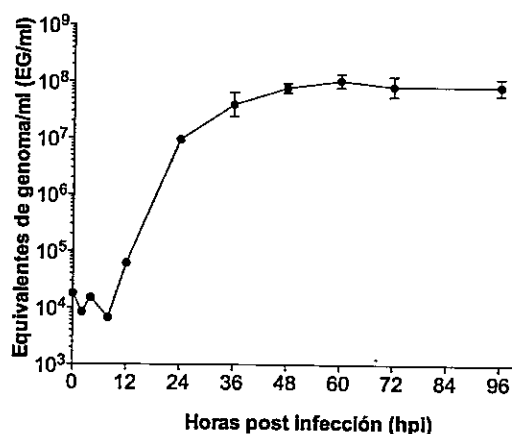


Figura 2. Cinética de replicación del virus IPN en células CHSE-214. Las células CHSE-214 fueron crecidas en un frasco de 25 cm² hasta 70-80% de confluencia. El virus IPN (MOI=1) se inoculó y se dejó adsorber por 1 hora a 20°C. Se lavó por 4 veces con solución de fosfato salino a pH 7.4 (PBS). Se restituyó el medio de cultivo con 2% de SFB y se incubó a 20°C. Se tomaron alícuotas de 100 µL del sobrenadante a las 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 y 96 horas post infección (hpi). Se extrajo el RNA viral y el número de equivalentes de genoma (EG)/ mL de sobrenadante se determinó mediante RTqPCR .

1.3 Purificación de partículas virales.

Las células CHSE-214 se propagaron en 6 frascos de 175 cm² a una confluencia de 70-80%. El virus IPN (MOI=1) se inoculó en cada frasco y estos se incubaron durante 5 días a 20°C. Se obtuvieron 100 mL de medio de cultivo rico en partículas virales con un título de 10⁷ TCID₅₀/mL y 1,5 x 10⁸ EG/mL. Las partículas virales fueron precipitadas con PEG y purificadas mediante cromatografía de exclusión molecular usando resina de Sepharose ® 6B como se describe en materiales y métodos. Las fracciones obtenidas fueron

cuantificadas espectrofotométricamente, usando lectura de absorbancia a 260 nm y RTqPCR. La infectividad de las partículas virales se determinó mediante titulación por dilución límite.

Se obtuvieron dos fracciones ricas en partículas virales (Figura 3), las fracciones 6 y 7, con concentraciones de $6,4 \times 10^8$ y $1,6 \times 10^8$ EG/mL respectivamente. Cuando se midió la infectividad de las partículas virales purificadas usando el método de dilución límite, se obtuvo títulos de 10^8 TCID₅₀/mL en ambas fracciones. Los resultados muestran que este método de purificación nos permite obtener partículas virales concentradas e infectivas excluyendo proteínas y otros componentes celulares o del medio de cultivo.

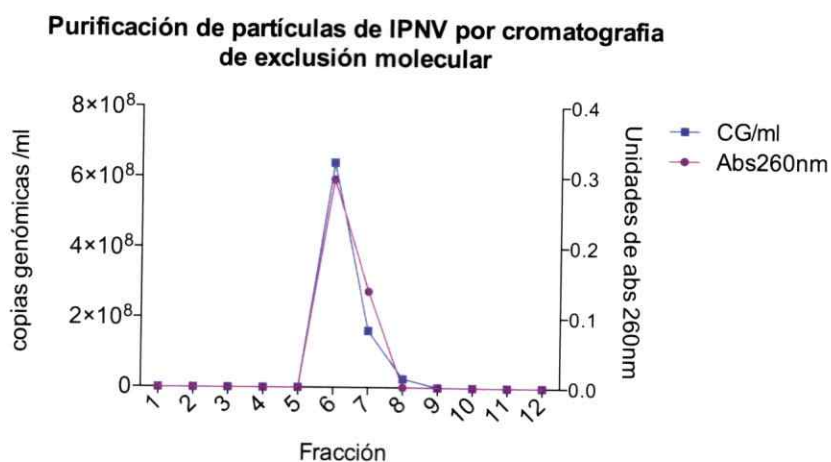


Figura 3. Purificación viral mediante cromatografía de exclusión molecular Sepharose® 6B. Las partículas virales fueron precipitadas con PEG y concentradas por centrifugación. 300 microlitros del sedimento fueron cargados en la columna con resina previamente lavada con PBS y se recuperaron 12 fracciones de 1 mL cada una. El número de copias genómicas por cada fracción se determinó por RTqPCR (azul). La absorbancia a 260 nm (Abs₂₆₀ de 1.0 cm⁻¹ = 40ng de RNA) (lila) se midió en equipo Nanodrop.

1.4 Estandarización de los ensayos de infección.

Para el estudio de las vías ingreso del virus IPN a las células CHSE-214 se utilizaron inhibidores de las diferentes vías endocíticas y se determinó el efecto de ellos en la infección por IPNV. Para observar la infección de IPNV se utilizó inmunofluorescencia indirecta (IFI) con un anticuerpo primario oligoclonal anti VP2/VP3 de IPNV y un anticuerpo secundario de burro anti-ratón marcado con Alexa fluor ® 488. La observación de las preparaciones se realizó por microscopia de epifluorescencia. Para cuantificar la infección en cada preparación se hizo recuento de células fluorescentes, es decir, células que expresaron las proteínas estructurales VP2/VP3 del virus. Se contaron al menos 250 células por preparación.

Para determinar la multiplicidad de infección (MOI) apropiada para los experimentos de infección, se realizaron recuentos de células que expresaron VP2/VP3 de IPNV luego de ser infectadas a MOIs de 0.1, 1.0 y 10. Las MOIs probadas se eligieron en base a los rangos utilizados por otros investigadores en estudios previamente descritos en la literatura (Delgui y col., 2009, Gimenez y col., 2015, Han y col., 2016). Con el objetivo de captar el máximo de células con infección, en esta etapa de estandarización se utilizó un tiempo de incubación de 24 horas ya que a que a este tiempo se completa un ciclo de infección y como se observa en la figura 2, la liberación de genomas al sobrenadante está próxima a su máximo.

De acuerdo a la figura 4, la infección por IPNV a una MOI de 1 produjo suficientes células infectadas, expresando VP2/VP3 de IPNV de manera reproducible (40-60%) en comparación a una MOI mas baja (MOI de 0.1 alcanzó un 2-6%), mientras que a una MOI de 10 se observó gran cantidad de células con señal fluorescente pero el recuento se vio obstaculizado por la presencia de abundantes señales fuera de las células, posiblemente consecuencia de lisis celular producida en las etapas tardías de la infección. Esta última observación nos llevó a trabajar con tiempos de infección menores a 24 horas.

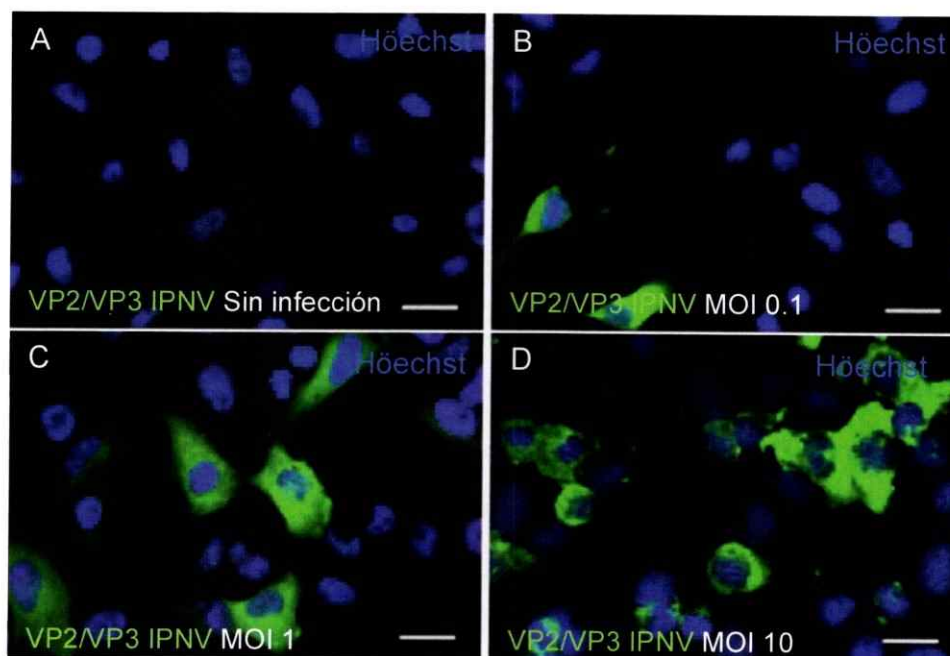


Figura 4. Estandarización de los ensayos de infección de células CHSE-214 con el virus IPN. Las células CHSE-214 fueron propagadas hasta 70-80% de confluencia en placas de 24 pocillos con cubreobjetos redondos. El virus IPN se inoculó a MOIs de 0.1 (B), 1 (C) y 10 (D) y luego de 24 horas de incubación, las células fueron fijadas, permeabilizadas y las proteínas VP2/VP3 de IPNV

fueron marcadas usando el anticuerpo oligoclonal de ratón anti VP2/VP3 y anticuerpo secundario de burro anti ratón marcado con Alexa fluor ® 488. Los núcleos de las células se tiñeron con solución de H \ddot{o} chst, se montaron con Fluoromount TM y se observaron en microscopio Olympus Spinning Disk IX81 con lente objetivo de 40X (barra de tama \acute{n} o=20 μ m).

Para determinar el tiempo \acute{o} ptimo de incubaci \acute{o} n se determin \acute{o} la producci \acute{o} n de las prote \acute{i} nas estructurales VP2/VP3 de IPNV a distintos tiempos de infecci \acute{o} n (horas post infecci \acute{o} n, hpi) usando IFI.

Como se observa en la figura 5, el ensayo de infecci \acute{o} n muestra la producci \acute{o} n de las prote \acute{i} nas virales VP2 y VP3 a partir de las 6 horas, alcanzando un porcentaje estable entre las 8 y las 12 horas, el que fluct \acute{u} a en torno al 60%. A partir de estos datos se eligi \acute{o} trabajar con MOI de 1 y 12 horas de incubaci \acute{o} n. Estas condiciones fueron utilizadas para todos los ensayos de infecci \acute{o} n, al menos que se en alg \acute{u} n caso particular se indique otra cosa.

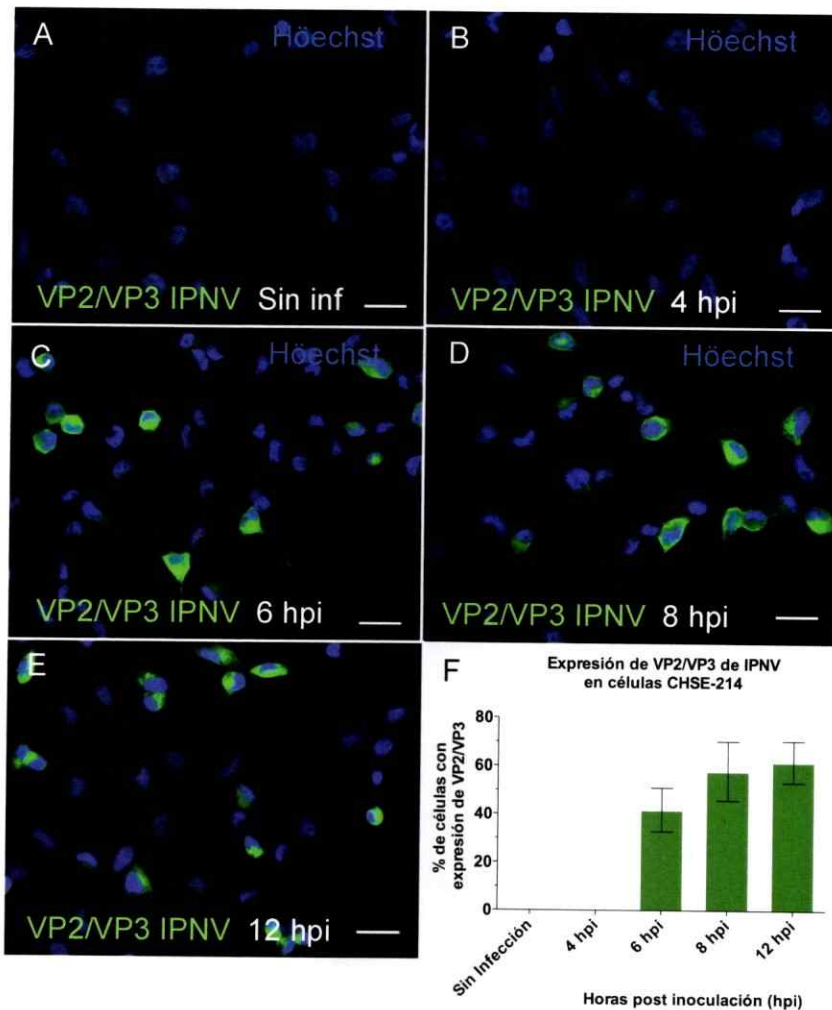


Figura 5. Cinética de infección de IPNV en células CHSE-214. Las células CHSE-214 se propagaron hasta un 70% de confluencia en placas de 24 pocillos con cubreobjetos circulares. El virus IPN (MOI=1) se inoculó y luego de 4 (B), 6 (C), 8 (D) y 12 (E) horas de incubación (hpi), las células fueron fijadas y procesadas por IFI para VP2/VP3 de IPNV. Las preparaciones fueron observadas en microscopio Olympus Spinning Disk IX81 con el lente objetivo de 40X (barra de tamaño: 20 μ m). El número de células que expresaron VP2/VP3 de IPNV se determinó contando al menos 250 células usando el programa Image J 1.50c4 y se expresó como porcentaje del total de células contadas (F).

1.5 Evaluar el ingreso de IPNV por endocitosis dependiente de clatrina en las células CHSE-214.

1.5.1 La clorpromazina no inhibe la infección de IPNV en las células CHSE-214.

La internalización de una molécula por EMC es gatillada por la interacción del cargo y su respectivo receptor, luego de lo cual las moléculas de clatrina son reclutadas a la membrana plasmática para ser ensambladas en una estructura poliédrica llamada "pozos recubiertos por clatrina" (Mac Mahon y Boucrot, 2011, Kirchhausen y col., 2014). La EMC puede ser bloqueada en sus etapas iniciales usando clorpromazina (CPZ), una droga catiónica anfifílica que produce la translocación reversible de la clatrina y la proteína AP2 hacia vesículas endosomales evitando su localización en la membrana plasmática (Wang y col., 1993).

Como se muestra en la figura 6, el tratamiento de las células CHSE-214 con 10 y 50 μM de CPZ no afectó a la infección por IPNV (Fig. 6C,D). Al realizar el recuento de las células que expresan VP2/VP3 se observa que no existen diferencias en el porcentaje de células infectadas en presencia de CPZ respecto del control sin tratamiento (Figura 6 E).

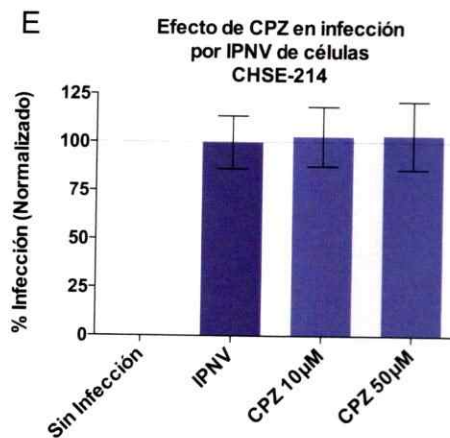
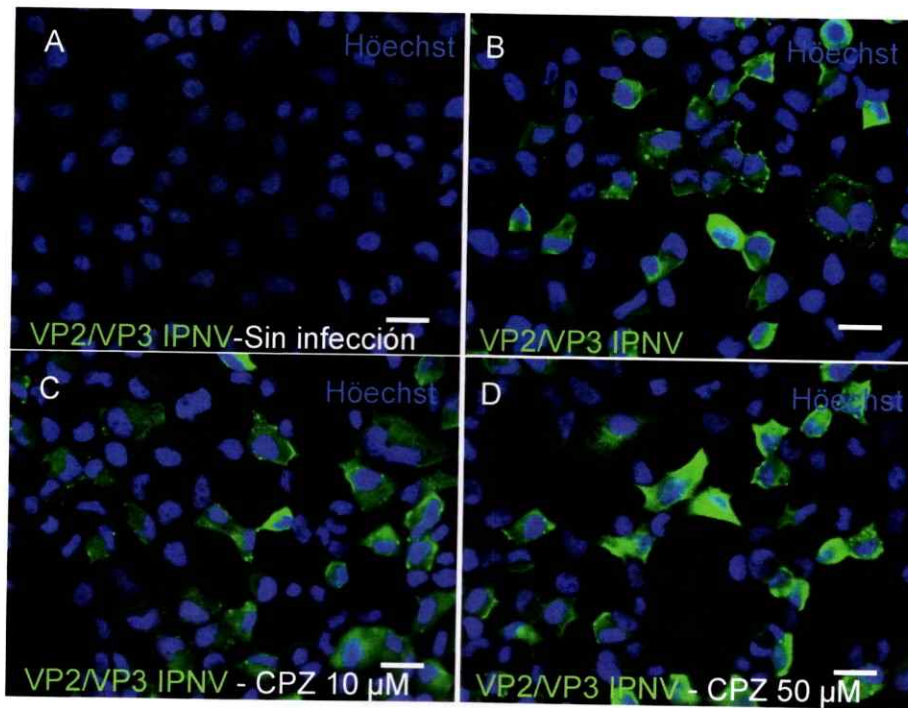


Figura 6. Efecto de la clorpromazina (CPZ) en la infección por IPNV en células CHSE-214. Las células CHSE-214 se trataron con 0 (A, B), 10 (C) y 50 μM de CPZ (D) una hora antes de la infección. IPNV (MOI=1) se inoculó en presencia del inhibidor, el que se mantuvo durante todo el experimento. Luego de 8 horas de incubación a 20°C, las células fueron procesadas para IFI de VP2/VP3 de IPNV y observadas en el microscopio de epifluorescencia Olympus

Spinning Disk IX81. Se contaron al menos 250 células en cada condición y el porcentaje células infectadas, normalizado respecto de la condición sin inhibidor, se presenta en E. (barra de tamaño= 20 μm).

1.5.2 La transferrina no es internalizada en las células CHSE-214.

La transferrina es una glicoproteína sérica monomérica que une Fe^{3+} y es internalizada en las células de vertebrados a través EMC (Rothenberger y col., 1987, Baker y col., 1987, Dautry-Varsat, 1986). La aplicación de transferrina conjugada con moléculas fluorescentes ha sido validada en células de diversos orígenes, para monitorear la actividad de esta vía endocítica (Kirchhausen y col., 2014). Cuando se aplicó transferrina conjugada con Alexa® fluor 633 (Tfr-A633) en células HeLa observamos el ingreso del marcador luego de 1 hora de incubación, el que fue bloqueado luego del tratamiento con CPZ 10 μM (Fig. 7A, B). En contraste, se observó que el marcador no ingresó a las células CHSE-214 luego de 1, o hasta 24 horas de incubación (Fig. 7C, D). Debido a la inexistencia de otros controles de CME validados para este modelo celular, no se pudo establecer la funcionalidad de este inhibidor en células CHSE-214. Como consecuencia no se puede afirmar o descartar el rol de CME en el ingreso de IPNV a la célula CHSE-214 utilizando esta aproximación metodológica.

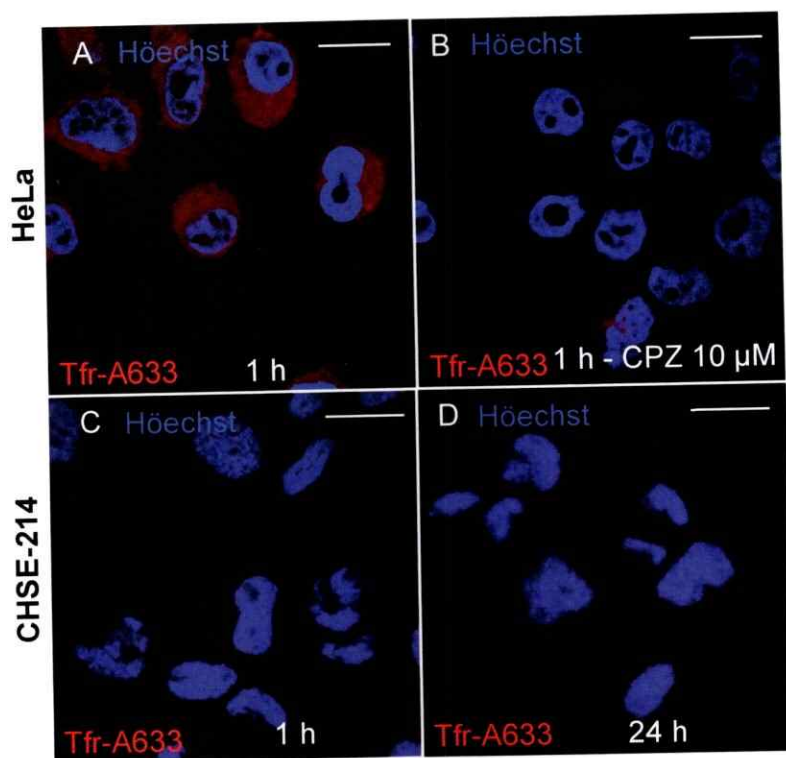


Figura 7. La transferrina no es internalizada en células CHSE-214. Las células HeLa (A, B) y CHSE-214 (C, D) se propagaron hasta 70-80% de confluencia, se pre incubaron durante 1 hora con 10 μ M de CPZ en medio de cultivo con (B) o sin inhibidor (A, C, D). Se agregó 5 μ g/mL de Tfr-A633 en ausencia y presencia de CPZ y se incubó durante 1 hora (B, C) o 24 horas (D). Las células se lavaron con PBS, se fijaron con PFA, se tiñeron con solución de Hoechst y se observaron en el microscopio confocal de barrido laser C2 plus espectral TI Nikon (objetivo de 100X, barra de tamaño=20 μ m).

1.6 Evaluar el ingreso IPNV usando balsas lipídicas y caveolas en células CHSE-214

Las balsas lipídicas son dominios de la membrana citoplasmática enriquecidos en esteroides, glicoesfingolipidos (glucolipidos y esfingomieline), proteínas

ancladas a glicofatidil-inositol (GPI), y proteínas integrales de membrana como caveolina y flotilina (Liu y col., 2002). Algunos virus, se adsorben a elementos presentes en abundancia en las balsas lipídicas y las utilizan como plataformas para su internalización (Yamauchi y Helenius, 2013).

1.6.1 La infección por IPNV en células CHSE-214 no es inhibida por filipina.

Para determinar si IPNV utiliza balsas lipídicas y/o caveolas como mecanismo de ingreso a la célula se utilizó filipina (Fil), un macrólido polieno anti fúngico que forma complejos globulares con el colesterol, distorsionando las balsas lipídicas (Orlandi y col., 1998, Schroeder y col., 1971).

Como se observa en la figura 8, el tratamiento con filipina no afectó a la infección con IPNV en células CHSE-214 cuando se utilizó a concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

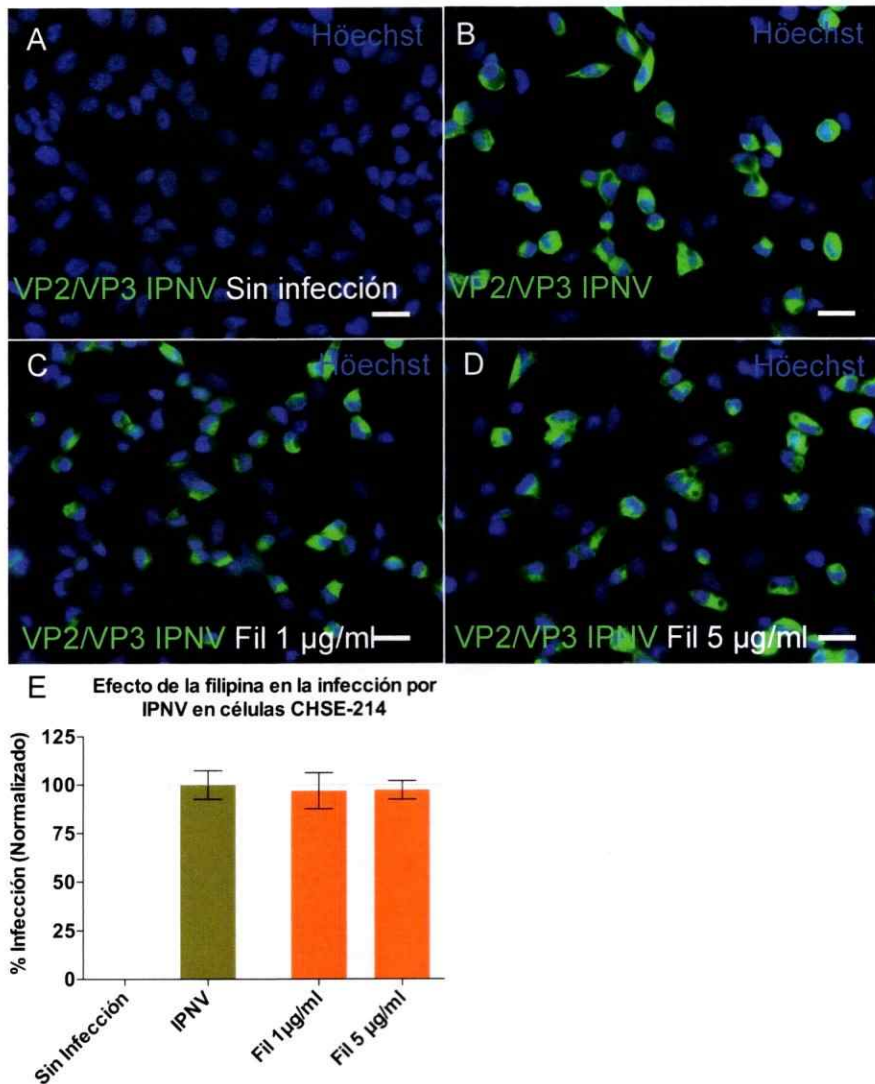


Figura 8. La infección por IPNV en células CHSE-214 no es inhibida por filipina (Fil). Las células CHSE-214 se trataron con 0 (B), 1 (C) y 5 (D) µg/mL de filipina (Fil) una hora antes de la infección y el inhibidor se mantuvo durante todo el experimento. Se inoculó el virus IPN (MOI=1) y luego de 12 horas de incubación a 20°C, las células se procesaron para IFI de VP2/VP3 de IPNV y se observaron en microscopio de epifluorescencia Olympus Spinning Disk IX81 con lente objetivo de 40X (barra de tamaño=20µm). Se contaron al menos 250 células en cada condición y el porcentaje de células infectadas se presenta como porcentaje normalizado en relación a la condición sin infección (E).



1.6.2 La filipina inhibe el ingreso de la subunidad B de la toxina de cólera (CTB) en las células CHSE-214.

La toxina de cólera (CT) está compuesta por las subunidades A y B y depende de esta última para ingresar a la célula y migrar al retículo endoplásmico, lugar en donde se produce la disociación de ambas subunidades (Hazes y col., 1997). La internalización de la CT comienza luego de que subunidad B se une con alta afinidad al gangliósido de membrana GM₁, el que se encuentra principalmente en balsas lipídicas. Esta característica ha sido aprovechada por numerosos autores, en distintos tipos celulares, para estudiar la internalización dependiente de balsas lipídicas (Orlandi y col., 1998). En el presente estudio se utilizó la subunidad B de la CT, conjugada con Alexa ® fluor 594 (CTB-A594), para evaluar la funcionalidad de la vía endocítica dependiente de balsas lipídicas y/o caveolas las células CHSE-214. Como se muestra en la figura 9, cuando se agregó CTB-A594 a las células HeLa, esta fue internalizada luego de 1 hora de incubación y la adición de 5 µg/mL de filipina bloqueó el ingreso de este marcador (Fig. 9B, C). En cambio la internalización de CTB-594 en las células CHSE-214 requirió un mayor tiempo de incubación y fue bloqueada por la filipina (Fig. 9D-F).

Estos datos sugieren que IPNV no utiliza las balsas lipídicas o la vía de las caveolas para el ingreso a las células CHSE-214.

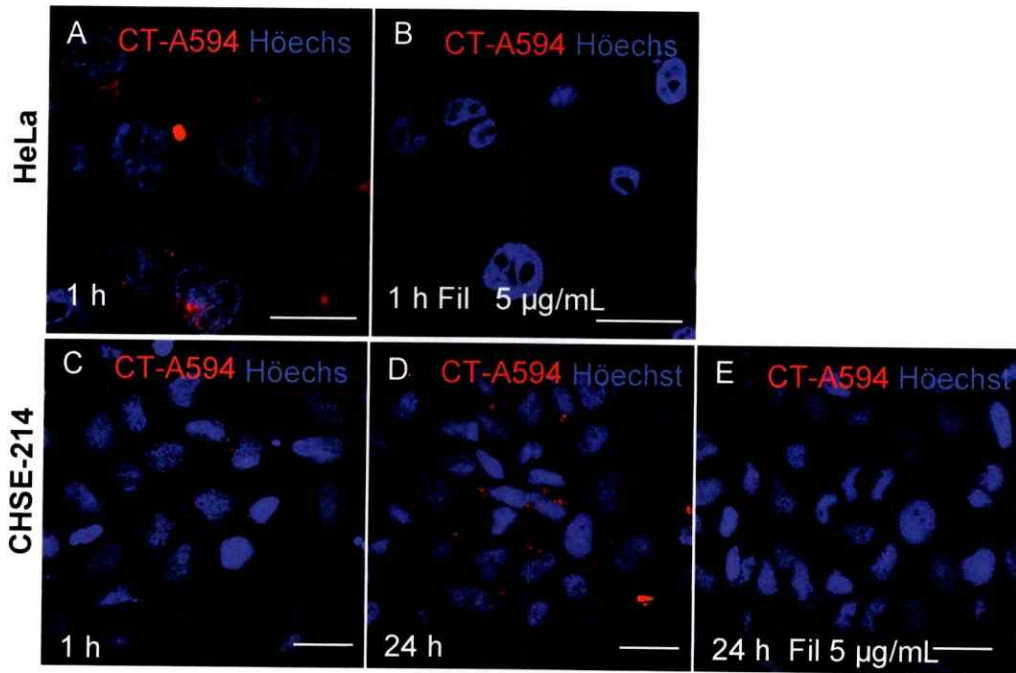


Figura 9. La filipina inhibe el ingreso de la subunidad B de la toxina de cólera (CTB). Las células HeLa y CHSE-214 fueron pre-tratadas con 5 µg/mL de filipina (Fil) (B y E) o sin el inhibidor durante 1 hora. Luego se agregó 2.5 µg/mL de CTB-A596 y se incubó 1 hora (para las células HeLa; A, B) o 1 y 24 horas (para CHSE-214; C-E) en presencia y ausencia de filipina. Posteriormente, las células se lavaron con PBS, se fijaron con PFA, se tiñeron con solución de Hoechst (núcleo; azul) y se observaron usando microscopio confocal C2 plus eclipse TI Nikon con lente de 100X (barra de tamaño=20µm).

2. Objetivo 2: Demostrar que IPNV ingresa a las células CHSE-214 por macropinocitosis.

2.1 IPNV induce la captura de fase fluida en células CHSE-214.

La macropinocitosis es un mecanismo inespecífico de captura de fluido extracelular que lleva a la formación de vesículas intracelulares conteniendo diversos elementos de la fase fluida. Muchos virus son capaces de inducir y utilizar esta vía endocítica para ingresar a la célula hospedera. Este fenómeno es caracterizado por un aumento de la captura de la fase fluida gatillado por la adsorción del virus a dichas células (Mercer y Helenius, 2012).

Para demostrar que IPNV induce la macropinocitosis se utilizó el marcador soluble dextrán-Texas Red® 70.000 MW (DX-TR). Para evitar la inducción de la macropinocitosis mediada por factores de crecimiento comúnmente presentes en el SFB, las células CHSE-214 fueron privadas de suero por 16 horas. El virus IPN se inoculó a distintas MOI y luego de 1 hora de adsorción se agregó el marcador DX-TR y se incubó por media hora. Después de la fijación, las células fueron observadas con microscopía confocal y se calculó el índice macropinocítico como se ha descrito previamente (Commisso y col., 2014).

La figura 10 muestra imágenes representativas de este experimento (A-E), en las cuales se observa que la captura del marcador DX-TR se incrementa linealmente con la carga viral. Así mismo, cuando se calculó el índice macropinocítico para cada MOI (Figura 4F) se observó una buena correlación entre ambas variables (Pearson $R^2=0,9824$).

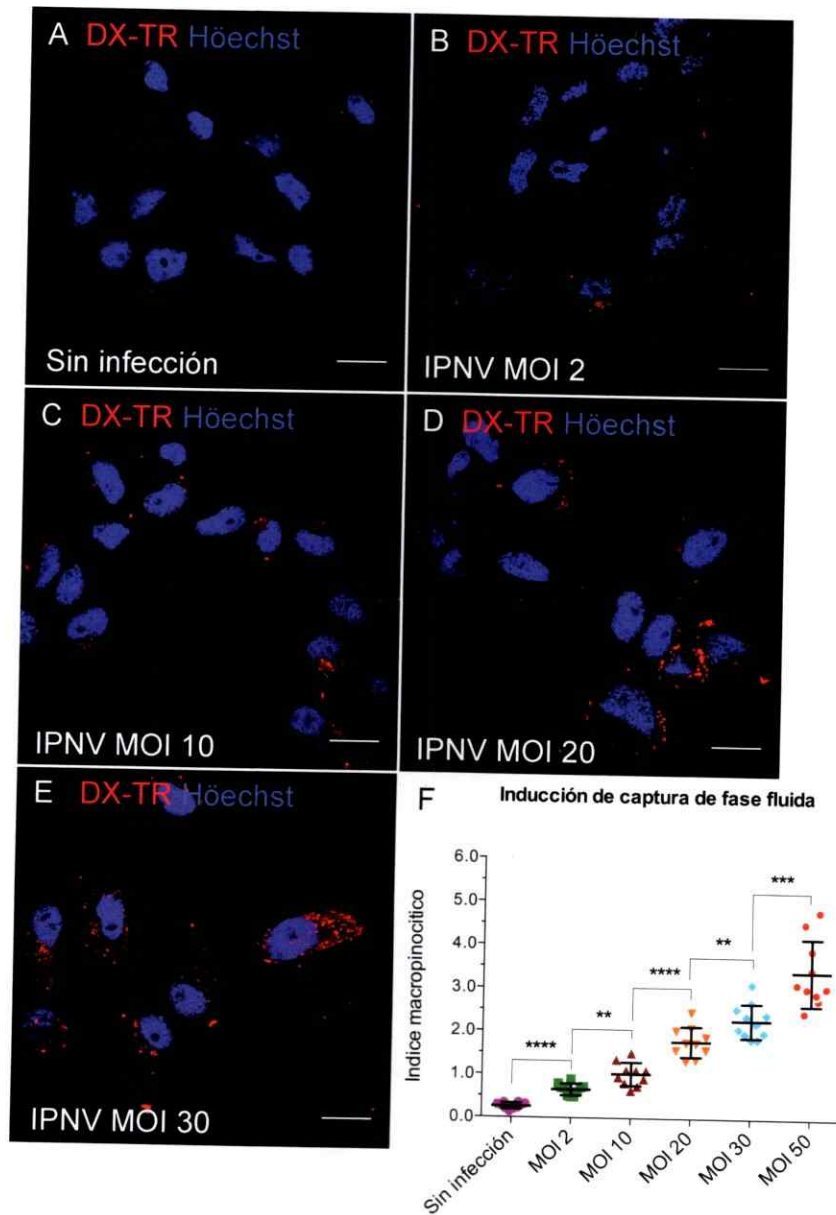


Figura 10. IPNV induce la captura de fase fluida en las células CHSE-214. Las células CHSE-214 fueron propagadas en placas de 24 pocillos con cubreobjetos circulares. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y se les restituyó el medio de cultivo sin SFB. Luego de 16 horas de incubación a 20°C, las células se lavaron con PBS y se inoculó el virus IPN purificado a MOIs de 2 (B), 10 (C), 20 (D) y 30 (E) dejando adsorber durante 1 hora a 4°C. Las células

se lavaron con PBS frío para eliminar los virus no adsorbidos y se aplicó el marcador DX-TR a una concentración final de 250 µg/mL por 30 minutos a 20°C. Finalmente, las células fueron lavadas, fijadas y teñidas con solución de Hoechst. Las preparaciones fueron montadas con Fluoromount™ y observadas en microscopio confocal Zeiss LSM 250 con objetivo 62X. (barra tamaño=10 µm). Las señales de los macropinosomas fueron cuantificadas mediante cálculo de índice macropinocítico (F), usando programa Image J 1.50c4 según protocolo descrito previamente (49). El análisis estadístico T de Student fue realizado usando programa Graph Pad Prism (****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.05).

2.2 IPNV colocaliza con el marcador de fase fluida dextrán-Texas Red (DX-TR).

Para determinar si IPNV colocaliza con el marcador de fase fluida durante su ingreso a la célula, se examinaron preparaciones conteniendo el marcador de fase fluida (DX-TR lisina-fijable) y el marcador viral (anticuerpo anti VP2/VP3 de IPNV) usando microscopía confocal. Como se observa en la figura 5, se encontraron partículas virales en vacuolas intra-citoplásmicas positivas para DX-TR (Fig. 5 C). Los análisis de la cantidad de fluorescencia de los pixeles colocalizados en cada canal, dieron como resultado un coeficiente de Manders $M1=0,39 + 0,1571$ para la señal del virus en los pixeles rojos (M1 varía entre 0 y 1, siendo 1 el máximo de colocalización)(Manders y col., 1993). Por el contrario, en presencia de 20 µM de EIPA, un reconocido inhibidor de macropinocitosis, se obtuvo un coeficiente $M1=0,0007 + 0,0036$, indicando que no hay colocalización (Fig. 5 H) (**** p <0,0001).

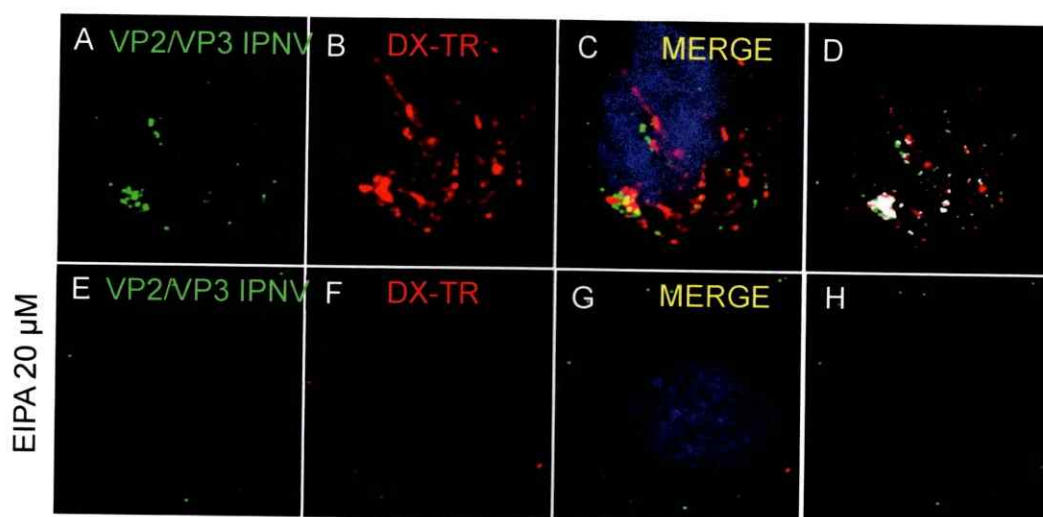


Figura 11. El virus IPN colocaliza con el marcador de fase fluida en compartimentos intra-citoplasmáticos. Las células CHSE-214 se cultivaron en placas de 24 pocillos con cubreobjetos circulares hasta 70% de confluencia y luego fueron privadas de SFB por 16 horas. El virus IPN (MOI=10) se inoculó y se dejó adsorber a 4°C por 1 hora. Se agregó DX-TR (lisina fijable) a una concentración final de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó por 45 min a 20°C. Las preparaciones fueron lavadas, fijadas y permeabilizadas. Las partículas virales se tiñeron usando anticuerpo de ratón anti VP2/VP3 de IPNV seguido de anticuerpo secundario anti ratón marcado con Alexa® Fluor 488. Se capturaron imágenes de Z-stacks con cortes cada 100 nm usando un microscopio confocal de barrido láser Zeiss LSM 250 con objetivo 100X. El coeficiente de colocalización Manders fue calculado en 10 proyecciones Z usando programa Image J 1.50c4 (D y H muestran en color blanco los pixeles con colocalización en la proyección Z del stack).

2.3 IPNV induce cambios en la organización de la actina en células CHSE-214.

La reorganización del citoesqueleto de actina es un paso crítico durante la

macropinocitosis. Para esto se requiere la activación de una serie de señales intracelulares que llevan a la polimerización de actina F, lo que conduce a la formación de protrusiones o rizos ("ruffles") de la membrana plasmática. Ocasionalmente estos rizos se curvan para converger en estructuras tipo cráter o copas en la superficie celular, fenómeno que implica la captura de parte de la fase fluida extracelular. El cierre de estas estructuras es seguido por la fusión y fisión de membranas en el margen distal de la copa, lo que conduce a la liberación del macropinosoma desde membrana plasmática hacia el citoplasma (Kerr y Teasdale 2009, Swanson 2008, Buckley y King, 2017, Marques y col., 2017). Usando faloidina conjugada con rodamina para visualizar la distribución de la actina F en células CHSE-214, nosotros observamos cambios rápidos en la distribución de la actina y la estructura citoesqueleto luego de la inoculación del virus IPN. A los 15 min post infección se visualizó una transición morfológica del citoesqueleto, inicialmente con una morfología que incluyó fibras de estrés altamente definidas (Fig. 12A; SF), filopodia (no mostrado) y lamelopodia (Fig. 12A; L), hacia a un patrón desorganizado de actina (Fig. 12B, C). En este contexto, la actina cortical se observó frecuentemente formando protrusiones y rizos, junto a los cuales se observaron partículas virales. Además, observamos cambios en la morfología global de la célula hacia formas redondeadas y de menor tamaño (Fig.12B).

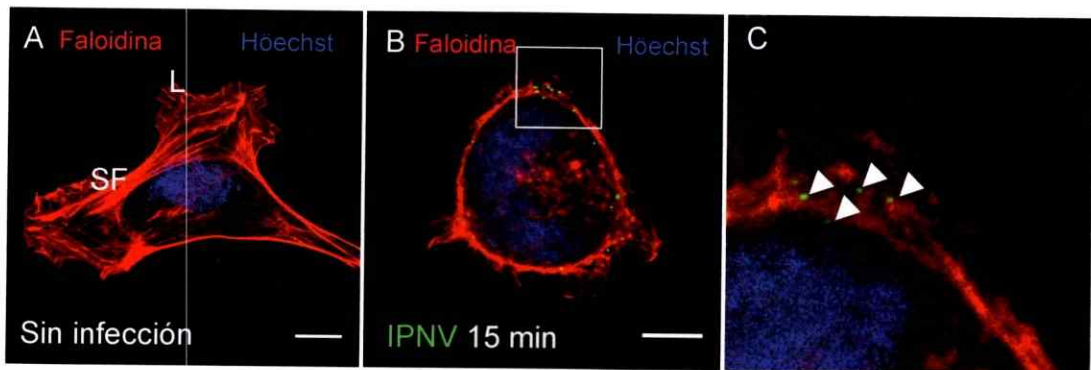


Figura 12. El virus IPN induce cambios en la organización de la actina en las células CHSE-214. Las células CHSE-214 se propagaron hasta un 70% de confluencia y el virus IPN (MOI=10) se inoculó y se dejó adsorber por 1 hora a 4°C. Las células se traspasaron a 20°C y se fijaron con PFA a distintos tiempos (0, 5, 15, 30, 45, 60, 120 minutos). Posteriormente, las células fueron lavadas, permeabilizadas y las partículas virales se marcaron con el anticuerpo anti VP2/VP3 de IPNV seguido de anticuerpo conjugado con Alexa® Fluor 488. La actina F se marcó con faloidina conjugada con rodamina y se contrastó con tinción nuclear de Hóechst. Las preparaciones se observaron con microscopio confocal de escaneo láser Zeiss LSM 250 con objetivo 100X. Se muestran imágenes representativas de la condición sin infección (A) y con IPNV a los 15 minutos de incubación (B). (L: lamelopodia; SF: fibras de estrés). En C se muestra detalle de B y se muestra con flechas blancas las partículas virales. (Barra de tamaño=5 μm)

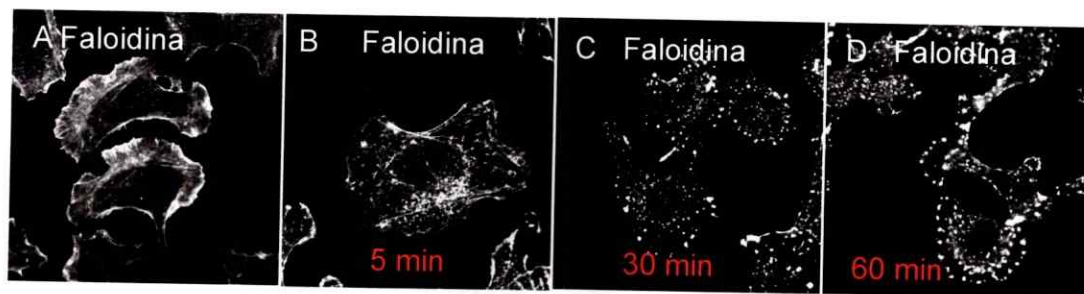
2.4 El ingreso del virus IPN en las células CHSE-214 depende de la dinámica de polimerización de la actina.

El requerimiento de la dinámica de polimerización de actina para el ingreso de IPNV en las células CHSE-214 se estudió utilizando citocalasina D (Cito D). La Cito D es un metabolito fúngico que es capaz de unirse a los filamentos de

actina y bloquear su polimerización y elongación (Cooper, 1997).

Como se muestra en la figura 13, la Cito D, a una concentración de 2 μM induce tempranamente la desorganización de las fibras de actina F en las células CHSE-214. (Fig.13A-D). Adicionalmente, a esta misma concentración, Cito D bloqueó la infección por IPNV (Fig. 13G, H).

Para confirmar que dicha dependencia es por el requerimiento de la actina durante las etapas tempranas de la infección, se realizó ensayo en presencia Cito D restringido a las primeras 2 horas de infección (Fig. 13I), tiempo en el cual ocurre la mayor parte de la internalización de IPNV (Kuznar y col., 1995). En estas condiciones se obtuvo un 63% de inhibición a una concentración de 1 μM (no mostrado) y un 95% de inhibición a 2 μM respecto del control sin inhibidor (**** $p < 0.0001$)(Fig. 13I). Estos resultados son similares a los obtenidos cuando el inhibidor se mantuvo durante todo el ciclo de infección (Fig. 13H) sugiriendo que el efecto inhibitorio de la Cito D se restringe principalmente a los primeros eventos del ciclo infeccioso de IPNV.



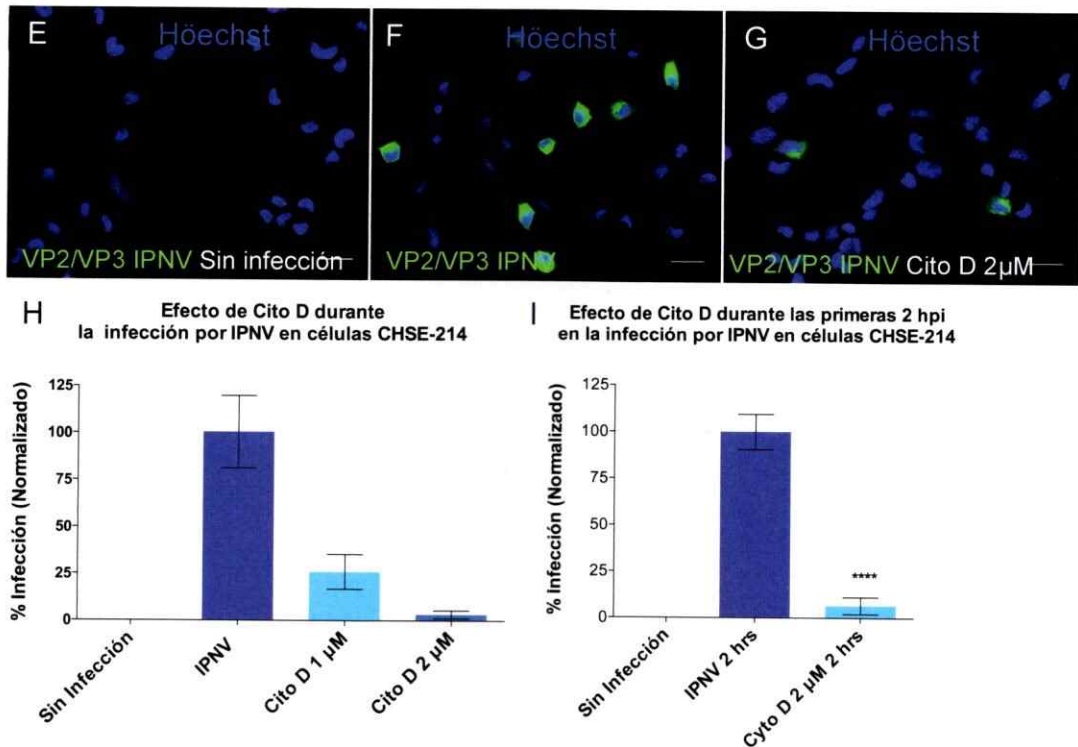


Figura 13 A-D. La citocalasina D (Cito D) induce despolimerización de F actina en las células CHSE-214. Las células CHSE-214 fueron tratadas con 2 μ M citocalasina D por 5 (B), 30 (C) y 60 (D) minutos a 20°C y fueron fijadas con PFA 3.7% y teñidas con faloidina conjugada con rodamina. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio confocal C2 Plus espectral Nikon con objetivo de 100X.

Figura 13 E-H. La infección por IPNV en las células CHSE-214 depende de la dinámica de polimerización de la actina. Las células CHSE214 se trataron con 2 μ M de Cito D (G) o sin el inhibidor (E, F) una hora antes de la infección y el inhibidor se mantuvo durante todo el experimento. El virus IPN (MOI=1) se inoculó, se incubó 1 hora a 20°C, se lavó con PBS y se restituyó el medio con o sin el inhibidor. Luego de 6 horas de incubación a 20°C, las células se procesaron por IFI para VP2/VP3 de IPNV. Se capturaron imágenes con microscopio Olympus Spinning Disk IX81 usando objetivo de 40X. Las imágenes se analizaron con programa ImageJ1.50c4. Se contaron al menos

250 células en cada condición y el porcentaje de células infectadas (con señal de VP2/VP3 de IPNV) se presenta como porcentajes normalizado respecto a la condición si el inhibidor (F). El análisis estadístico de t de Student se realizó usando programa Graph Pad Prism 6.0c (**** $p < 0,0001$)

Figura 13 I. El efecto inhibitor de Cyto D en la infección por IPNV se restringe a las 2 primeras horas de infección. Las células CHSE-214 se propagaron en placas de 24 pocillos con cubreobjetos redondos y se pre-trataron con Cito D igual que en 13 E-H. El virus IPN (MOI=1) se inoculó en presencia o ausencia del inhibidor y se dejó adsorber durante 1 hora a 4°C. Se retiró el medio de cultivo conteniendo el inóculo, se reemplazó con medio sin virus con el inhibidor y se incubó 1 hora a 20°C. Se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS, se agregaron 50 μ L de tripsina y se dejó por 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar las partículas virales adsorbidas no internalizadas. Luego se restituyó el medio MEM con 5% de SFB sin el inhibidor y se incubó durante 12 horas a 20°C. Finalmente las células se procesaron por IFI y las imágenes se analizaron como en Fig. 13E-H.

Todos los datos mostrados hasta aquí indican que la infección por IPNV en células CHSE-214 es dependiente de actina y que ésta es requerida en las etapas tempranas de la infección, posiblemente durante la internalización.

2.5 La infección por el virus IPN en las células CHSE-214 depende de la actividad del transportador NHE-1.

Una característica distintiva de la macropinocitosis en relación a las otras vías de endocitosis, es su dependencia de la actividad de la bomba NHE-1 (Mercer y Helenius, 2009, Koivusalo y col., 2010). Esta es una proteína de membrana que

juega un rol fundamental en la mantención del pH en la proximidad de la membrana mediante su actividad intercambiadora protón/sodio. NHE-1 mantiene un balance ácido-básico apropiado para la polimerización de los filamentos de actina y su inhibición mediante etil-isopropil amiloride (EIPA) provoca una rápida acidificación del citosol que conduce a la inhibición de las GTPasas Rac1 y Cdc42, cuya actividad es crítica para el remodelamiento del citoesqueleto de actina (Koivusalo y col., 2010).

La funcionalidad de EIPA en células CHSE-214 se confirmó usando el marcador fluorescente DX-TR cuya internalización en diversas líneas celulares se realiza por macropinocitosis. Como se observa en la figura 14, las células CHSE-214 incorporan el marcador DX-TR de manera espontánea en presencia de SFB (Fig.14A). Cuando se utilizó EIPA 30 μ M se observó una disminución de la internalización del marcador en relación al control sin inhibidor (Fig. 14B). Al calcular el índice macropinocítico en ambas condiciones se determinó que la diferencia es estadísticamente significativa (** $p < 0,001$) (Fig.14C). Así mismo, se observó que cuando las células CHSE-214 son tratadas con EIPA y luego infectadas con IPNV a MOI de 1, disminuye la cantidad de células que expresan VP2/VP3 de IPNV a las 12 horas de incubación en presencia permanente del inhibidor (Fig.14F-H) en relación a la infección sin el inhibidor (Fig.14E). Al realizar recuento de células que expresan VP2/VP3 de IPNV en al menos 250 células por cada condición, se determinó que EIPA disminuye infección por IPNV en un 60% y 90% a concentraciones de 20 μ M y 30 μ M respectivamente, en relación al control sin EIPA (**** $p < 0,0001$)(Fig.14I).

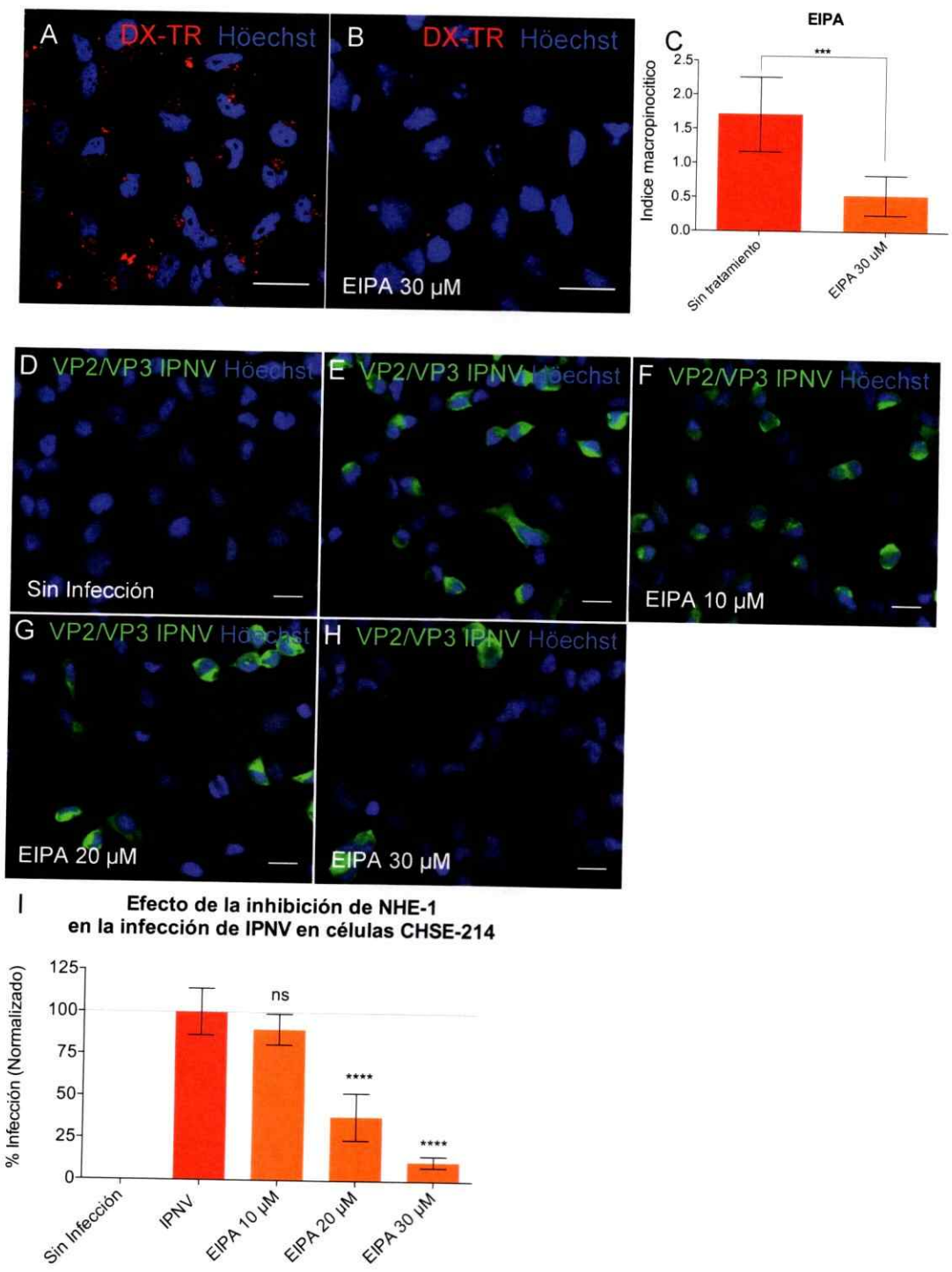


Figura 14 A-C. EIPA inhibe la macropinocitosis en las células CHSE-214. Las células CHSE-214 se propagaron en pocillos con cubreobjetos circulares en

medio MEM mas 2% de SFB hasta una confluencia de 75-80%. Se lavaron 2 veces con PBS y se pre-incubaron 1 hora en medio de cultivo con o sin 30 μ M de EIPA en presencia de 10% de SFB. Las células se lavaron nuevamente y se les añadió 1 mg/mL de DX-TR (Molecular Probes, Thermo Fisher) en ausencia de EIPA (A), o en presencia de 30 μ M EIPA (B). Después de 30 minutos de incubación, las células se lavaron cinco veces con PBS y se fijaron con 3,7% PFA-4% de sacarosa, se tiñeron con solución de H \ddot{o} echst y se montaron con Fluoromount TM. Las células se observaron en un microscopio confocal C2 plus eclipse TI Nikon (barra de escala = 50 μ m). C, Se obtuvieron 10 fotos de cada condición experimental con lente objetivo de 60X y las señales de los macropinosomas fueron cuantificadas mediante índice macropinocítico usando programa Image J 1.50c4 según protocolo descrito previamente (Commisso y col., 2014). El análisis estadístico de t Student fue realizado usando programa Graph Pad Prism 6.0c (**p<0.001).

Figura 14 D-I. Infección de IPNV en las células CHSE-214 depende de la actividad de NHE-1. Las células CHSE-214 fueron pre-tratadas con EIPA a 0 (E), 10 (F), 20 (G) y 30 μ M (H) 1 hora antes de la infección y el inhibidor fue mantenido durante todo el experimento. Se inoculó IPNV (MOI=1) y se dejó adsorber durante 1 hora a 4°C. Luego, las células se lavaron con PBS, se les restituyó el medio de cultivo con el inhibidor y se incubaron durante 12 horas a 20°C. Las láminas se procesaron por IFI para VP2/VP3 de IPNV y se montaron con Fluoromount TM. Se visualizaron y se capturaron imágenes usando el microscopio Olympus Spinning Disk IX81. Se contaron 250 células en cada condición y el número de ellas que expresó VP2/VP3 se muestra en I como porcentaje normalizado a la condición sin inhibidor (barra de tamaño=20 μ m). El análisis estadístico de t Student se realizó usando programa Graph Pad Prism 6.0c (****p<0.0001).

2.6 Dependencia de otros factores asociados a macropinocitosis.

Todos los resultados expuestos hasta aquí, indican que IPNV ingresa por macropinocitosis a las células CHSE-214. A continuación se estudiaron factores accesorios y vías de señalización y efectores utilizados comúnmente en la macropinocitosis. Varias vías de señalización están involucradas en el remodelamiento de la actina que toma lugar durante la formación de los rizos de membrana, la formación de la copa macropinocítica y el cierre de ésta (Cossart y Helenius, 2014, Yamauchi y Helenius, 2013, Mercer y Helenius 2009).

Para explorar el posible rol de algunos de estos factores en la infección por el virus IPNV, se utilizaron diversos inhibidores. Como se muestra en la figura 15, cuando se trataron las células CHSE-214 con Dynasore (inhibidor de la GTPasa grande dinamina-2), Wortmanina (inhibidor de la enzima fosfatidil-inositol 3 quinasa ,PI3K)(Walker y col., 2000), Salirasib (ácido farnesil tiosalisílico, inhibidor de Ras) (Rotblat y col., 2008) y Nocodazol (interfiere con la polimerización de los microtúbulos) (Vasquez y col., 1997), no se vio afectada la infección por IPNV.

En contraste, cuando se utilizó Rottlerina (Rott), un inhibidor farmacológico de la proteína quinasa C (PKC) (Gschwendt y col., 1994), se observó una inhibición cercana al 100%, sugiriendo un posible rol de PKC en macropinocitosis inducida por IPNV (Fig. 9). La PKC es una serina/treonina quinasa activada por diácil glicerol (DAG) y calcio como parte de la cascada de señalización inducida por factores de crecimiento. Se ha determinado que PKC cumple un rol durante la formación del macropinosoma (Gschwendt y col., 1994, Amyere y col., 2000,

Yoshida y col., 2014). Adicionalmente, PKC ha sido implicada en el ingreso de varios virus a la célula tales como rhabdovirus, alphavirus, poxvirus, herpesvirus y el virus de la influenza A (Amyere y col., 2000, Yoshida y col., 2014, Constantinescu y col., 1991, Siczarski y col., 2003).

Las GTPasas pequeñas de la superfamilia Rho son proteínas switch que regulan muchos procesos celulares, entre los que destaca la remodelación del esqueleto de actina, por lo tanto, son particularmente relevantes durante la macropinocitosis (Mercer y Helenius, 2012). Numerosos patógenos, incluyendo virus, utilizan estos reguladores para invadir su célula hospedera (Chang y col., 2016). Las GTPasas pequeñas mejor estudiadas son; GTPasa RhoA, involucrada en la formación de fibras de stress de actina, Rac1, involucrada en la formación de "ruffles" de membrana y lamelopodias y Cdc42 que regula la formación de filopodias (Amyere y col., 2001).

Notablemente, NSC-23766, un inhibidor de la GTPasa Rac1, redujo la infección por IPNV en las células CHSE-214 en un 86% a una concentración de 200 μ M (Gao y col., 2004). Mientras que Casin, un inhibidor para la GTPasa de control de división celular (Cdc42) (Peterson y col., 2006), no afectó la infección (Fig. 15). Este resultado sugiere que Rac1 podría tener un rol importante en la infección por IPNV en células CHSE-214. En este mismo sentido, la inhibición de la enzima proteína quinasa activada por p21 (Pak-1) con IPA-3 (Deacon y col., 2008), un efector río abajo de Rac1, también disminuyó la infección por IPNV en un 98% (Fig. 15).

Así mismo, el tratamiento con blebbistatina (Ble), un inhibidor que bloquea a la

miosina II fijándola en un estado desconectado de la actina (Kovács y col., 2004), disminuyó la infección por IPNV en aproximadamente 82% (Fig. 15). La miosina II, es una proteína motor que es activada por Pak-1 y forma parte esencial de la maquinaria de motilidad en la mayoría de las células eucariotas. Durante la macropinocitosis, la miosina II interactúa estrechamente con el citoesqueleto de actina y provee la actividad contráctil que puede modular el movimiento de las estructuras de tipo ruffles, pudiendo también participar en el cierre del macropinosoma (Mercer y Helenius 2012, Mercer y Helenius, 2009, Even-Faitelson y col., 2005, Sanders y col., 2009).

Dependencia de otros factores asociados a macropinocitosis en la infección por IPNV en células CHSE-214

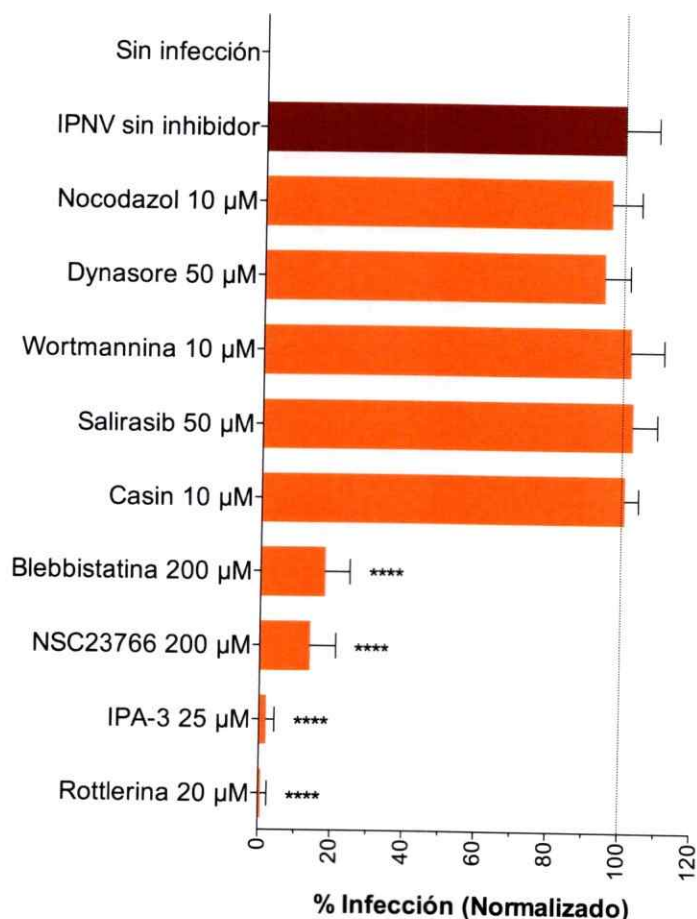


Figura 15. Requerimiento de factores celulares para la infección por IPNV en las células CHSE-214. Las células CHSE-214 fueron infectadas con IPNV (MOI=1) en presencia de diversos inhibidores de componentes celulares asociados a macropinocitosis; Nocodazol (10 µM), Dynasore (50 µM), Wortmannina (10 µM), Salirasib (50 µM), Casin (10 µM), Blebbistatina (200 µM), IPA-3 (25 µM), NSC23766 (200 µM), Rottlerina (20 µM). Luego de 12 horas de incubación a 20°C las células fueron procesadas por IFI para VP2/VP3 de IPNV y las preparaciones fueron observadas en el microscopio Olympus Spinning Disk IX81. Para cada condición se contaron 250 células y el número de ellas que expresó VP2/VP3 de IPNV fue expresada en porcentaje

normalizado en relación al control sin inhibidor. El análisis estadístico de T de Student se realizó usando programa Graph Pad Prism 6.0c (****p<0.00

3. Objetivo 3: Demostrar que la macropinocitosis es utilizada por IPNV para ingresar en células de salmón SHK-1.

3.1. Células SHK-1.

Debido a que el salmón del Atlántico representa un importante hospedero del virus IPN *in vivo*, este objetivo plantea determinar si la vía de ingreso observada en las células CHSE-214 también es utilizada en células derivadas de este pez. Para esto se eligió utilizar las células derivadas de riñón anterior de salmón del atlántico (*Salmo salar*) SHK-1 (Dannevig y col., 1995, Dannevig y col., 1997). En salmones, la porción anterior del riñón es un órgano hematopoyético que a la vez es un importante blanco de IPNV *in vivo* (Roberts y Pearson, 2005, Johansen y col., 1995, Swanson y col., 1982). Así, las células SHK-1, al ser derivadas de dicho órgano, representan un modelo real de infección y nos permitirá incrementar la significancia biológica de los resultados de esta tesis.

Las células SHK-1 se han descrito como células tipo macrófagos (macrophage-like) en base a características morfológicas, fenotípicas y funcionales (Dannevig y col., 1997). Como se muestra en la figura 16, a las 24 horas de incubación a 20°C las células son adherentes, tienden a formar una monocapa y presentan morfología de aspecto epitelial.

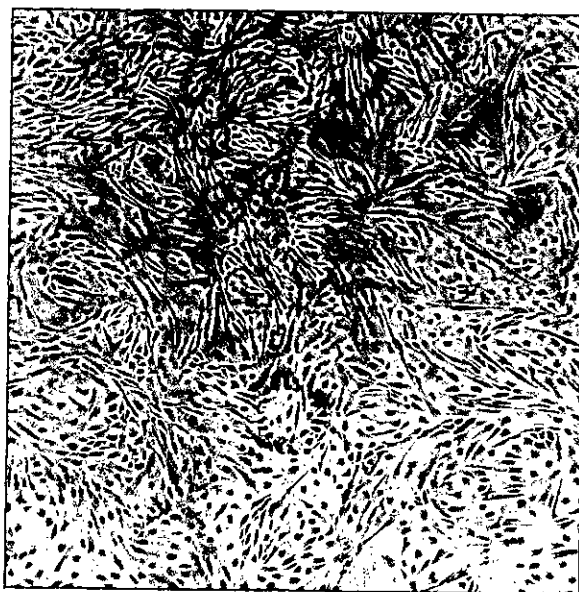


Figura 16. Crecimiento de células SHK-1. Las células SHK-1 fueron propagadas a 20°C en frasco de 25 cm² en medio Leibovitz's L-15, modificado con L-glutamina suplementado con aminoácidos esenciales, 100 U/ml de penicilina 100 µg/ml de estreptomicina y 10% de SFB (SFB).

3.2 Infección por IPNV en las células SHK-1.

Reportes previos indican que las células SHK-1 soportan la replicación de IPNV (Dannevig y col., 1995, Dannevig y col., 1997). Para observar la infección por IPNV se marcó el RNA de hebra doble (dsRNA), propio de la infección viral, usando el anticuerpo monoclonal de ratón anti dsRNA J5 a distintos tiempos de infección seguido de microscopia confocal (Figura 17). Aunque se observaron señales aisladas a las 3 horas, no es posible distinguir estas de las señales originales del virus inoculado (Fig. 17B). Sin embargo, a partir de las 6 horas se observan numerosas células con señal citoplasmática difusa (Fig. 17C). Luego de las 12 horas el número de señales aumenta y se comienza a agregar en

acúmulos perinucleares los que se resuelven claramente a las 24 horas (Fig.17 D-E).

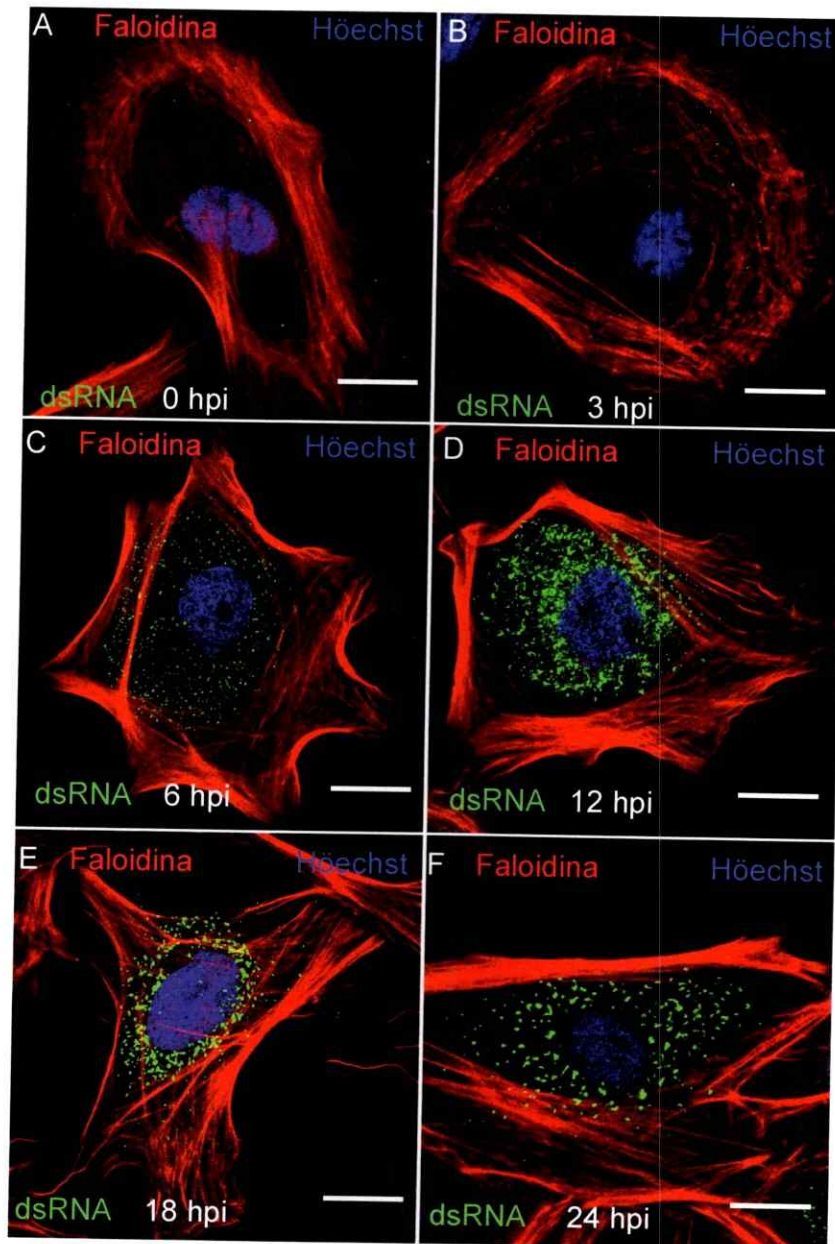
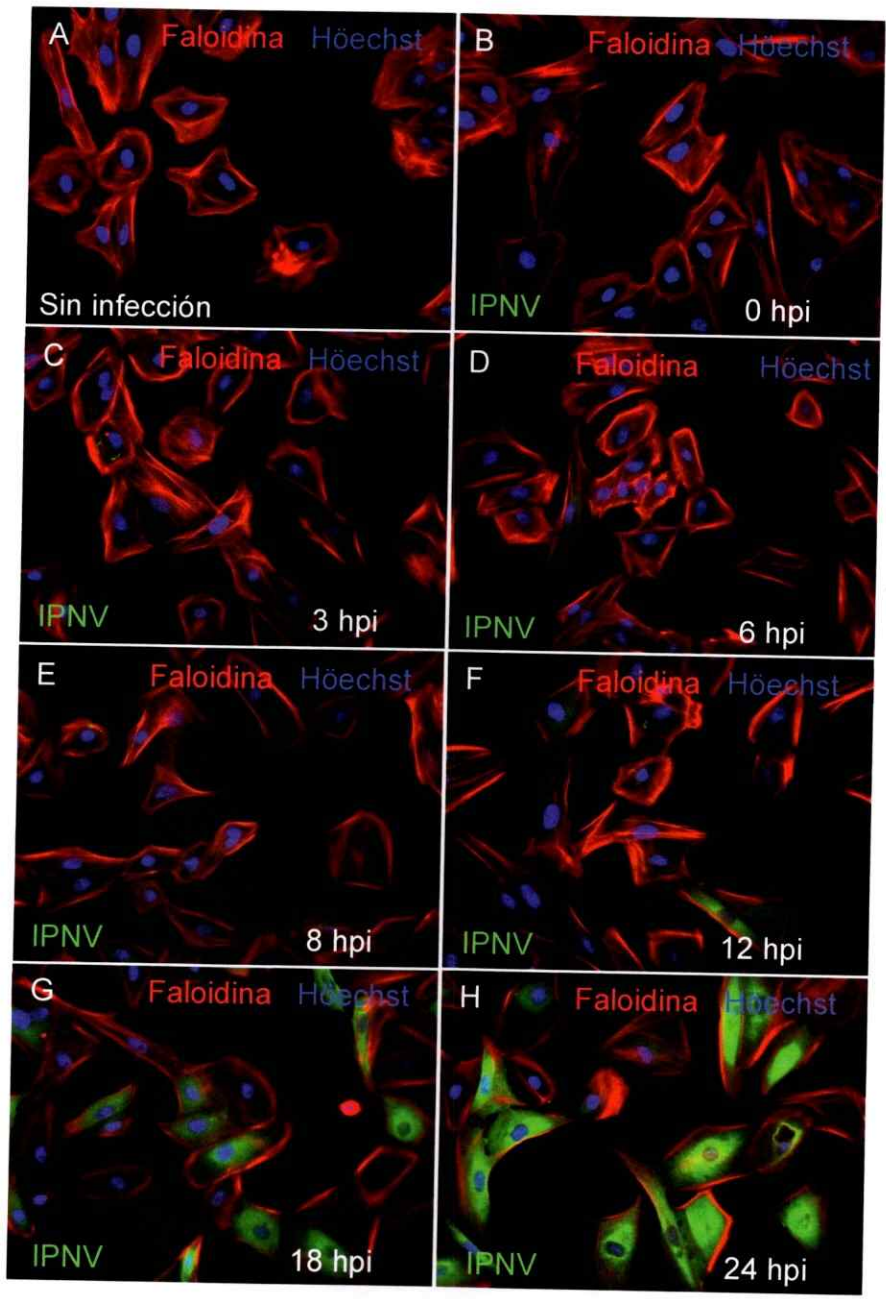


Figura 17. Producción de RNA de doble hebra (dsRNA) durante la infección por IPNV en las células SHK1. Las células SHK-1 se propagaron hasta una confluencia de 70-80% en medio L15 con 10% de SFB, se lavaron

con PBS y el virus IPN (MOI=10) se inoculó dejando adsorber por 1 hora a 4°C. Las células se lavaron con PBS, se restituyó el medio de cultivo y se incubó a 20°C. La infección se detuvo mediante fijación con PFA a las 0 (A), 3 (B), 6 (C), 12 (D), 18 (E) y 24 horas de incubación (F). El dsRNA se marcó usando anticuerpo monoclonal anti dsRNA J5 y anticuerpo secundario anti ratón marcado con Alexa®Fluor 488. El núcleo y la actina F se tiñeron con solución de Hoechst y faloidina conjugada con rodamina, respectivamente. Las preparaciones fueron observadas en microscopio confocal de barrido laser Nikon C2 plus espectral usando lente objetivo de 100X (escala=20 µm).

Para visualizar la expresión de las proteínas estructurales VP2 y VP3 de IPNV se utilizó el anticuerpo oligoclonal de ratón anti VP2/VP3 de IPNV y anticuerpo secundario de burro anti-ratón conjugado con Alexa ® Fluor 488. Como se muestra en la figura 18, la expresión de las proteínas estructurales se puede observar a partir de las 3 horas post infección (Fig. 18C), se mantiene baja hasta las 8 hpi (Fig. 18D, E) y se incrementa fuertemente a partir de las 12 hpi (Fig. 18F). Del mismo modo, al realizar un análisis de intensidad de fluorescencia, se observa una débil señal de VP2/VP3 de IPNV a partir de las 3 hpi, la que se mantiene hasta de las 12 hpi a partir de la cual aumenta y alcanza una meseta a las 24 hpi (Fig. 18I). El recuento de células fluorescentes indicó que durante la fase de meseta se alcanzó un 25-35% de células fluorescentes por la producción de las proteínas VP2 y VP3 del virus IPN . Estos datos indican que, en comparación con la cinética de infección en células CHSE-214, la infección por IPNV en las células SHK-1 ocurre de manera mas lenta y produce menos células infectadas.



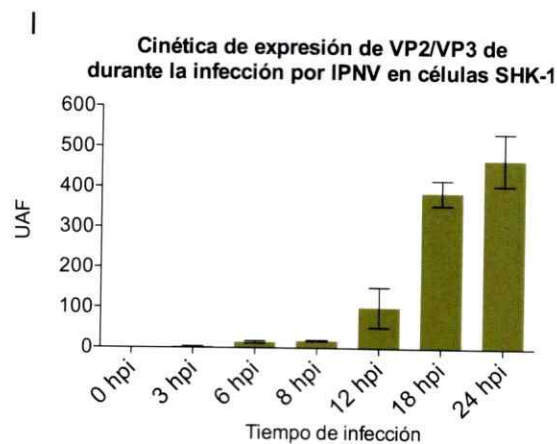


Figura 18. Infección de células SHK-1 por IPNV. Las células SHK-1 fueron propagadas hasta 70% de confluencia en placas de 24 pocillos con cubreobjetos circulares en medio L-15 con 10% de SFB. El virus IPN (MOI=1) se inoculó y luego de 0 (B), 3 (C), 6 (D), 8 (E), 12 (F), 18 (G) y 24 (H) horas de incubación (hpi) a 20°C las células fueron fijadas, permeabilizadas y procesadas para IFI para VP2/VP3 de IPNV. Las preparaciones se observaron en microscopio Olympus Spinning Disk IX81. La intensidad de fluorescencia correspondiente a la expresión de VP2/VP3 de IPNV en al menos 250 se determinó células usando programa Image J 1.50c4. El resultado se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) y se muestra en I.

3.3 Rol de la endocitosis mediada por clatrina (EMC) en el ingreso de IPNV en las células SHK-1:

3.3.1 La transferrina es internalizada en células SHK-1.

Como se describió anteriormente, no se pudo demostrar la funcionalidad de la EMC en las células CHSE-214 dado que la transferrina, un reconocido cargo de EMC en diversos modelos celulares, no ingresa en estas células, incluso luego

de tiempos prolongados de incubación (Fig. 7C-D). En contraste, como se muestra en la figura 19, en las células SHK-1 se observó que la transferrina es internalizada luego de 15 minutos de incubación (Fig. 19A). Se determinó además, que la vía de EMC en SHK-1 puede ser inhibida con 10 y 20 μM de CPZ (Fig. 19B-C). Esto indica que EMC es activa en las células SHK-1 y la transferrina conjugada puede ser usada como marcador de la actividad de la vía endocítica.

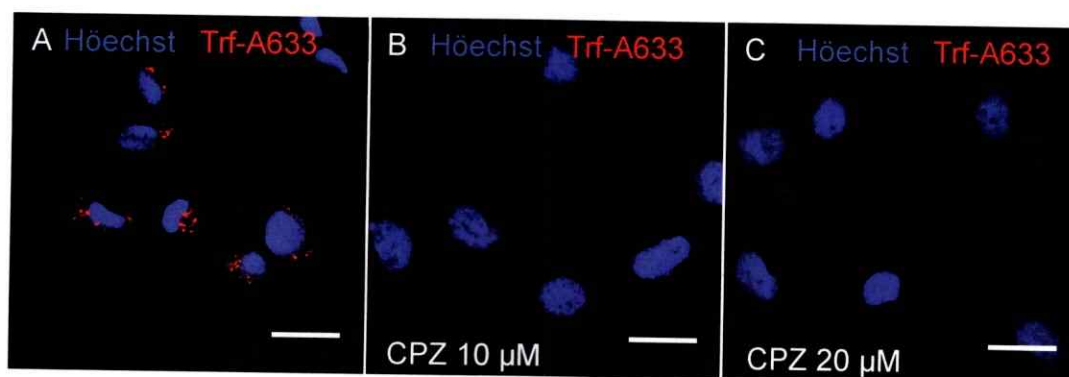
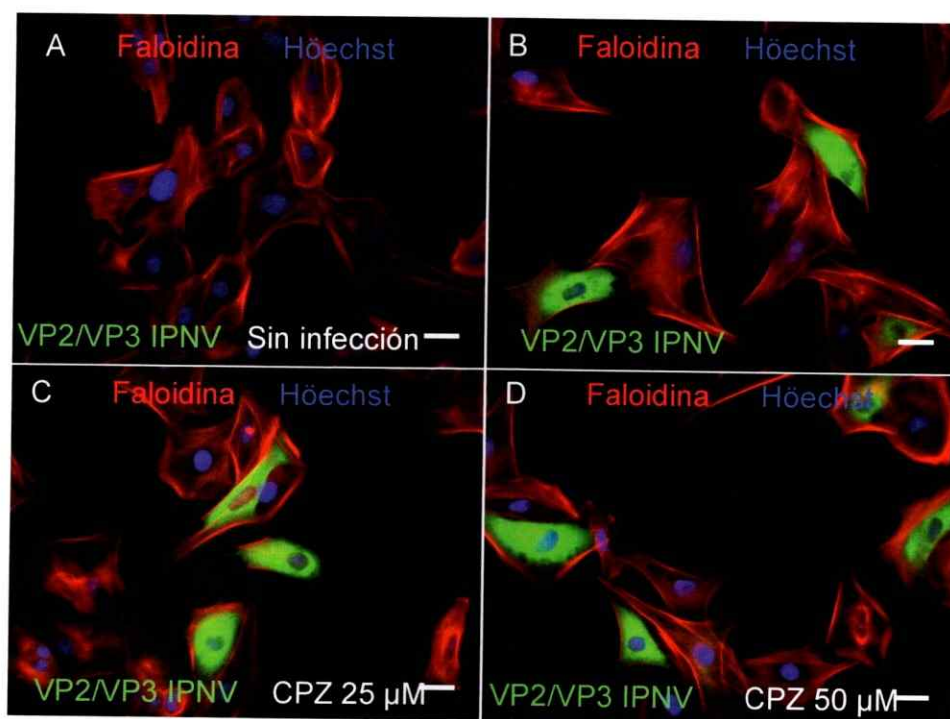


Figura 19. Internalización de transferrina (Trf-A633) en células SHK-1. Las células SHK-1 se incubaron 30 minutos en medio sin SFB por para depletar la transferrina endógena y luego se incubaron con 10 (B) y 20 μM (C) de CPZ por 30 minutos. Luego se agregó Trf-A633 a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó por 15 minutos a 20°C. Las células se lavaron con una solución de ácido acético 0.2 M, NaCl 0.5M, pH 2.5 a 4°C seguido de lavado con PBS y se fijaron con PFA durante 30 minutos. Finalmente, las células se tiñeron con solución de Hoechst y se montaron con Fluoromount™. Las preparaciones se observaron en el microscopio confocal C2 plus eclipse TI Nikon con lente objetivo de 100X (barra de tamaño= 20 μm).

3.3.2 La clorpromazina no inhibe la infección de IPNV en células SHK-1.

Para chequear el uso de la vía de EMC en el ingreso de IPNV a las células SHK-1, se utilizó el ensayo de infección en presencia de clorpromazina (Wang y col., 1993). Como se muestra en la figura 20, no se observaron diferencias en la infección en presencia de CPZ a concentraciones de 25 y 50 μM (Fig. 20C-D). Cuando se hizo recuento de las células fluorescentes se observó que no existen diferencias significativas en el porcentaje de células infectadas en presencia o ausencia de CPZ (Fig. 20E).



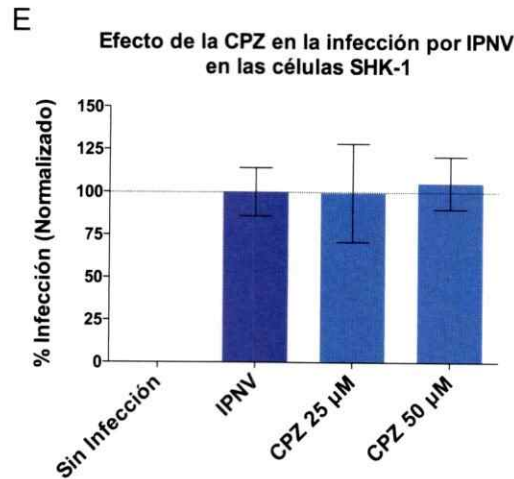


Figura 20. La CPZ no inhibe la infección de IPNV en células SHK-1. Las células SHK-1 fueron sometidas a infección por IPNV (MOI=1) en presencia de CPZ a 0 (B), 25 (C) y 50 µM (D). Luego de 24 horas de incubación, las células se procesaron por IFI para VP2/VP3 de IPNV. Las láminas se visualizaron y se capturaron imágenes usando el microscopio Olympus Spinning Disk IX81 usando lente objetivo de 40X (barra de tamaño=20µm). Se contaron 250 células en cada condición y el número de ellas que expresó VP2/VP3 se muestra en I como porcentaje normalizado a la condición sin inhibidor (E).

3.3.3 Dynasore no inhibe la infección de IPNV en células SHK-1.

Aunque se ha asociado a otras formas endocíticas, la actividad de la GTPasa grande dinamina-2 es determinante en el cierre de la vesícula durante la endocitosis mediada por clatrina. Para evaluar su participación en el ingreso de IPNV en células SHK-1 se utilizó IFI en presencia de Dynasore, que es inhibidor selectivo de esta molécula (Macia y col., 2006). Como se observa en la figura 21, Dynasore no afectó la infección por IPNV en células SHK cuando este inhibidor se agregó a una concentración de 50 y 75 µM.

**Efecto de Dynasore
en la infección por IPNV en células SHK-1**

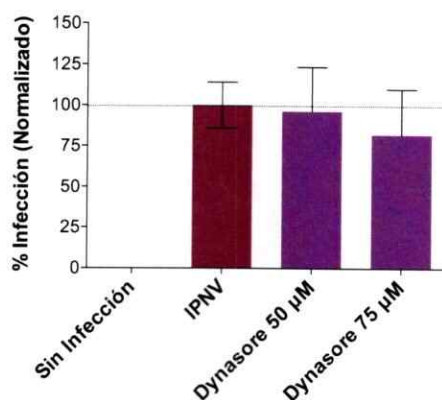


Figura 21. Dynasore no inhibe la infección por IPNV en células SHK-1. Se siguió el esquema de infección en presencia de 50 y 75 µM de Dynasore. Las células fueron procesadas por IFI luego de 24 horas de incubación y observadas en microscopio de epifluorescencia Olympus Spinning Disk IX81. Se contaron 250 células en cada condición y el número de ellas que expresó VP2/VP3 de IPNV se muestra como porcentaje normalizado a la condición sin inhibidor.

En conjunto con los resultados obtenidos con el trazador de CME, Trf-A633, los resultados obtenidos con los inhibidores CPZ y Dynasore sugieren que el ingreso de IPNV en células SHK-1 es independiente de clatrina.

3.4 Rol de la endocitosis mediada balsas lipídicas y caveolas en el ingreso de IPNV en las células SHK-1:

3.4.1 La subunidad B de la toxina de cólera es internalizada en las células SHK-1.

Para estudiar la funcionalidad de esta vía endocítica en las células SHK-1, se

utilizó el marcador CTB-A594. Como se observa en la figura 22, el marcador fue internalizado por las células luego de 45 minutos de incubación a 20°C (Fig. 22A, D). En estas mismas condiciones se probó el efecto de la filipina a una concentración de 1 y 5 µg/mL y como se observa en la figura 22, este tratamiento no bloqueó el ingreso del marcador (Fig. 22B-C).

Como alternativa para bloquear esta vía endocítica se utilizó el macrólido polieno nistatina y el tratamiento con 25 µg/mL de este compuesto si bloqueó el ingreso de la CTB-A594 en las células SHK-1 (Fig. 22E), razón por la cual se utilizó este inhibidor para determinar la participación de las balsas lipídicas y caveolas en la infección por IPNV en estas células.

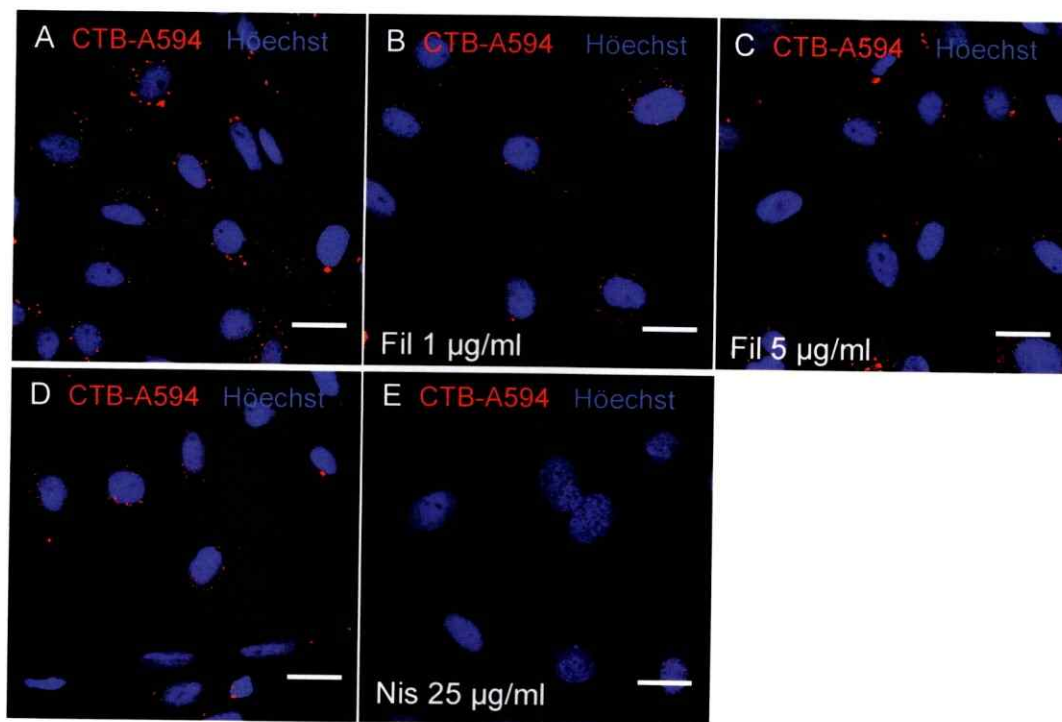


Figura 22. Internalización de CTB-A594 en las células SHK-1. Las células SHK-1 se lavaron y pre-incubaron por 30 minutos con 1 (B) y 5 µg/ml (C) de

Filipina (Fil) o 25 µg/ml de nistatina (E) o sin tratamiento (A, D). Se agregó CTB-A594 a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó por 45 minutos a 20°C. Las preparaciones se lavaron con PBS, se fijaron con PFA, se tiñeron con solución de H \ddot{o} echst y se montaron con Fluoromount™. Las células fueron observadas en microscopio confocal C2 plus eclipse TI Nikon con lente objetivo 100X (barra de tamaño=20 µm).

3.4.2 La nistatina no inhibe la infección de IPNV en células SHK-1.

Para probar la participación de la vía endocítica mediada por caveolas y/o balsas lipídicas en el ingreso de IPNV a las células SHK-1 se utilizó el ensayo de infección en presencia de nistatina. Como se observa en la figura 7, este inhibidor no produjo una disminución de la infección de IPNV en células SHK-1 a concentraciones de 20, 40 y 60 µg/ml.

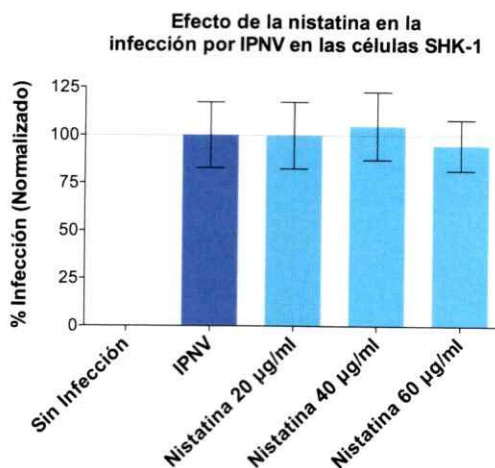


Figura 23. La nistatina no inhibe la infección de IPNV en células SHK-1.

Se utilizó el ensayo de infección en presencia de 20, 40 y 60 mg de nistatina. Se muestra el porcentaje de células que expresaron VP2/VP3 de IPNV normalizado respecto a la condición sin el inhibidor.

En suma, estos resultados sugieren que el ingreso de IPNV en células SHK-1 no requiere de las balsas lipídicas y/o caveolas.

3.5 Rol de la macropinocitosis en el ingreso de IPNV en las células SHK-1.

3.5.1 Dinámica de polimerización de la actina durante la infección por IPNV en las células SHK-1.

La dependencia de la macropinocitosis en la dinámica de la polimerización de actina es una característica fundamental de esta vía endocítica (Mercer y Helenius, 2012). En un contexto sin infección, las células SHK-1 presentan la actina F de manera estructurada, formando de fibras de stress muy definidas (SF) prácticamente en la totalidad de las células que conforman la monocapa. Adicionalmente, se observan lamelopodias discretas (L) y filopodias de longitud variable, algunas de ellas formando rizos en la periferia de la célula (Fig. 24A). En contraste, muy tempranamente, luego 2 minutos de la inoculación del virus IPN, se observan células que han perdido gran parte de sus fibras de stress y han reducido su tamaño. La actina F se observa principalmente en el cuerpo de la célula en forma de acúmulos y en la periferia formando filopodias prominentes (F) de alrededor de 10 micras de longitud, muchas de las cuales se observan en asociación con las partículas virales (Fig. 24B). Algunas partículas se observan asociadas al extremo distal de dichas filopodias, mientras otras se observan en la parte media y en la base (Fig. 24C). A tiempos posteriores se observó que las partículas virales se concentran en la parte media de estas protrusiones, a la vez que estas se contraen, engruesan y curvan formando

rizos (no mostrado).

Si bien estos resultados no permiten concluir que el fenómeno descrito sea inducido directamente por el virus, las imágenes sugieren que el virus utiliza las protrusiones de membrana para alcanzar el cuerpo celular.

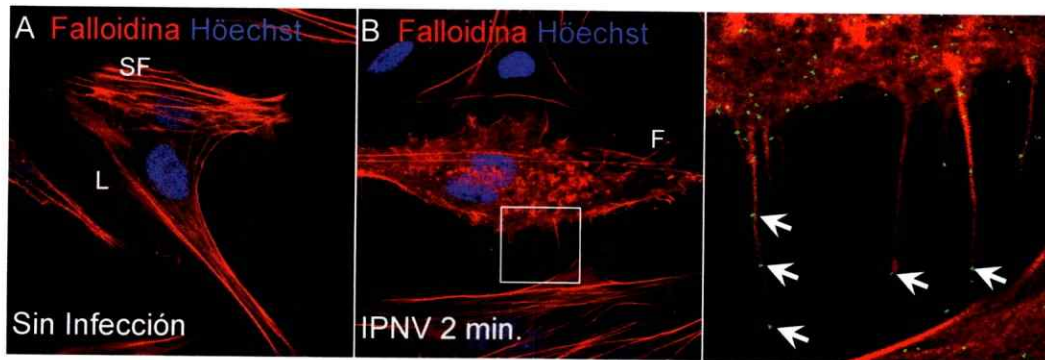


Figura 24. Cambios de la estructura del citoesqueleto en tiempos tempranos de la infección por IPNV en células SHK-1. Las células fueron propagadas hasta una confluencia de 70-80% y sometidas a hambruna de suero fetal por 16 horas. IPNV fue inoculado a una MOI de 30 e inmediatamente se incubó a 20°C. La infección fue detenida por fijación directa de la muestra con PFA a distintos tiempos (se muestra 2 minutos en B). Luego de esto, las células fueron permeabilizadas y procesadas para IFI VP2/VP3 de IPNV. Las preparaciones fueron observadas en microscopio confocal de escaneo laser Nikon C2 Plus espectral usando objetivo de 100X (SF: fibras de stress, L: lamelopodias, F: filopodia, Barra de tamaño=10 μ m).

3.5.2 Captura de fase fluida en presencia de IPNV.

Para estudiar la macropinocitosis en células SHK-1 se utilizó el marcador de la fase fluida DX-TR. Como se muestra en las figuras 25 y 26, el marcador fue internalizado por las células SHK-1 de manera constitutiva sin mediar

estimulación. Esto está en concordancia con las características previamente descritas para las células SHK-1, cuyo linaje es de tipo macrófago (Fig. 25A, D y 26A, D) (Dannevig y col., 1997).

Para determinar si IPNV induce la macropinocitosis o se beneficia de la actividad macropinocítica basal de las células SHK-1 para ingresar a la célula, se realizó ensayo de inducción de captura de fase fluida usando el marcador DX-TR. De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 25, independiente de la actividad basal de macropinocitosis, IPNV es capaz de estimular un aumento de la captura del marcador de fase fluida. Esta inducción fue proporcional a la MOI utilizada. Luego de 15 minutos de incubación con el virus, las células SHK-1 mostraron un índice macropinocítico aproximadamente 2 y 3 veces mayor al control sin inducción a MOIs de 10 y 30 respectivamente (Fig. 25D).

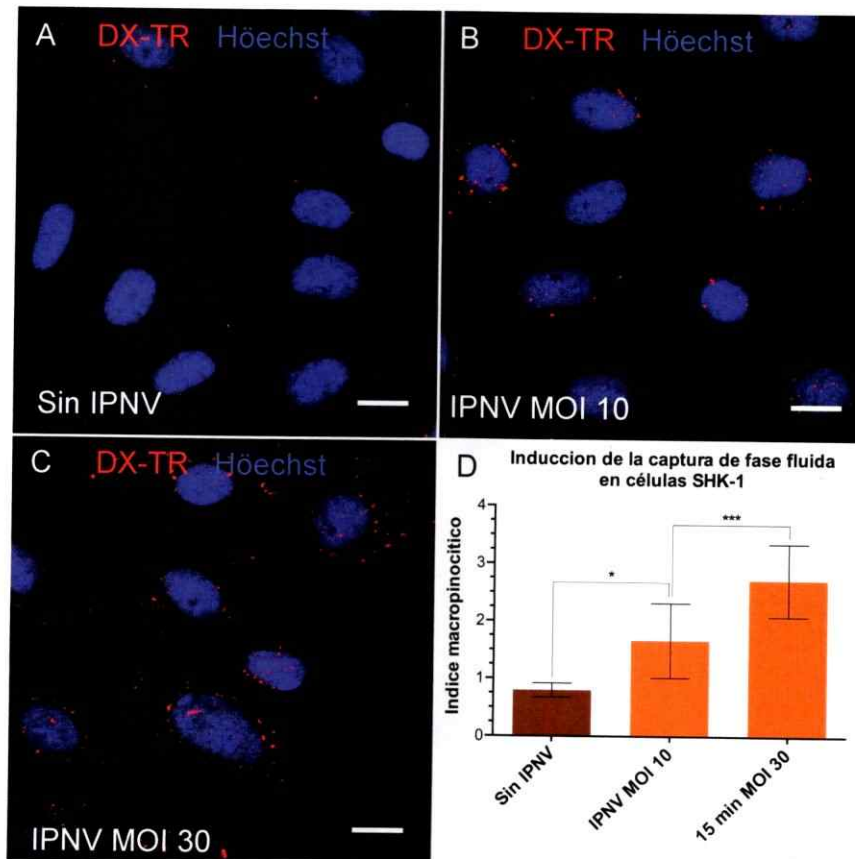


Figura 25. IPNV induce la captura de fase fluida en células SHK-1. Las células SHK-1 fueron propagadas y sometidas a 16 horas de incubación a 20°C en ausencia de SFB. El virus IPN purificado se inoculó a MOIs de 10 y 30 en presencia de 250 µg/mL del marcador DX-TR. Se incubó por 15 min a 20°C, se lavó con PBS y se fijó con PFA. Luego, las células se tiñeron con solución de Hoechst se montaron con Fluoromount® y se observaron en el microscopio confocal Nikon C2 Plus espectral con objetivo 62X. Se obtuvieron 10 fotos de cada condición experimental (al menos 50 células por cada condición). Las señales de los macropinosomas se cuantificaron usando el índice macropinocítico. El análisis estadístico t de Student fue realizado usando programa Graph Pad Prism (**p<0.001, *p<0.05).

3.5.3 EIPA disminuye el ingreso de DX-TR en células las SHK-1.

Previamente se determinó que EIPA no inhibe la internalización basal de DX-TR, lo que está en concordancia con reportes previos, que indican que la macropinocitosis constitutiva en macrófagos es resistente al tratamiento con este inhibidor (datos no mostrados) (Canton y col., 2016).

Cuando las células SHK-1 fueron incubadas con suero fetal bovino (SFB) la captura de fase fluida se incrementó por sobre el nivel basal, posiblemente como respuesta a la presencia de factores de crecimiento en el SFB (Fig. 26B). En contraste, luego de 30 minutos de incubación a 20°C en presencia del inhibidor del transportador NHE-1, EIPA, se observó una disminución de la captura de fase fluida cercano a los niveles basales (Fig. 26A,C). El análisis estadístico del índice macropinocítico, calculado en al menos 10 imágenes por cada condición, indica que esta diferencia es significativa (Fig. 26D).

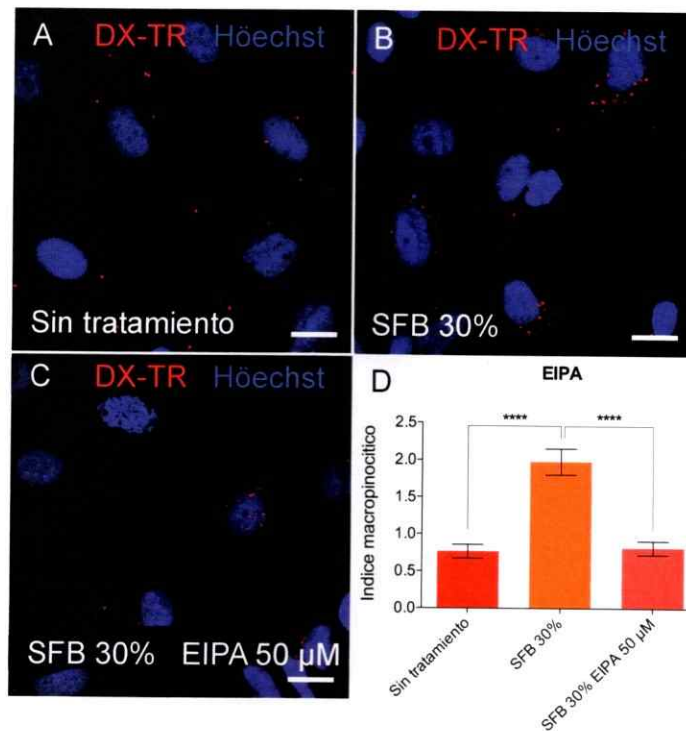


Figura 26. EIPA bloquea el ingreso de DX-TR en células SHK-1. Las células SHK-1 fueron sometidas a hambruna de SFB por 16 horas. Luego de esto, se incubaron por 30 minutos con 30% de SFB (B y C) y 50 µM de EIPA (C) o sin inhibidor (A y B). Posteriormente se les añadió DX-TR a una concentración final de 250 µg/mL en presencia de SFB (B y C) y 50 µM de EIPA (C). Después de 30 minutos de incubación, las células se lavaron cinco veces con PBS frío para eliminar el marcador libre y se fijaron con PFA, se tiñeron con solución de Hoechst y se montaron con Fluoromount™. Las preparaciones fueron observadas en microscopio confocal C2 plus eclipse TI Nikon con lente objetivo de 100X. Se analizaron al menos 10 campos microscópicos (aproximadamente 50 células) y se calculó el índice macropinocítico de acuerdo a protocolo descrito previamente (Commisso y col., 2014) y el resultados se muestra en D. El análisis de t de Student se realizó usando Graph Pad Prism (****p<0.0001) (barra de tamaño=20µm).

3.5.4 EIPA inhibe la infección de IPNV en células SHK-1.

Para estudiar el ingreso de IPNV en células SHK-1 por macropinocitosis se usó ensayo de infección en presencia de EIPA, el inhibidor de la bomba protón/sodio NHE-1, cuya funcionalidad es crítica en durante la macropinocitosis (Koivusalo y col., 2010). Luego de 24 horas de incubación en presencia del inhibidor, la infección disminuyó significativamente de manera dosis dependiente (Fig. 27). De acuerdo a lo mostrado en la figura 27, EIPA inhibe un 25, 60 y 90% la infección a concentraciones de 25 (C), 50 μ M (D) y 75 μ M (E) respectivamente, diferencias que resultaron ser estadísticamente significativas (Fig.27F).

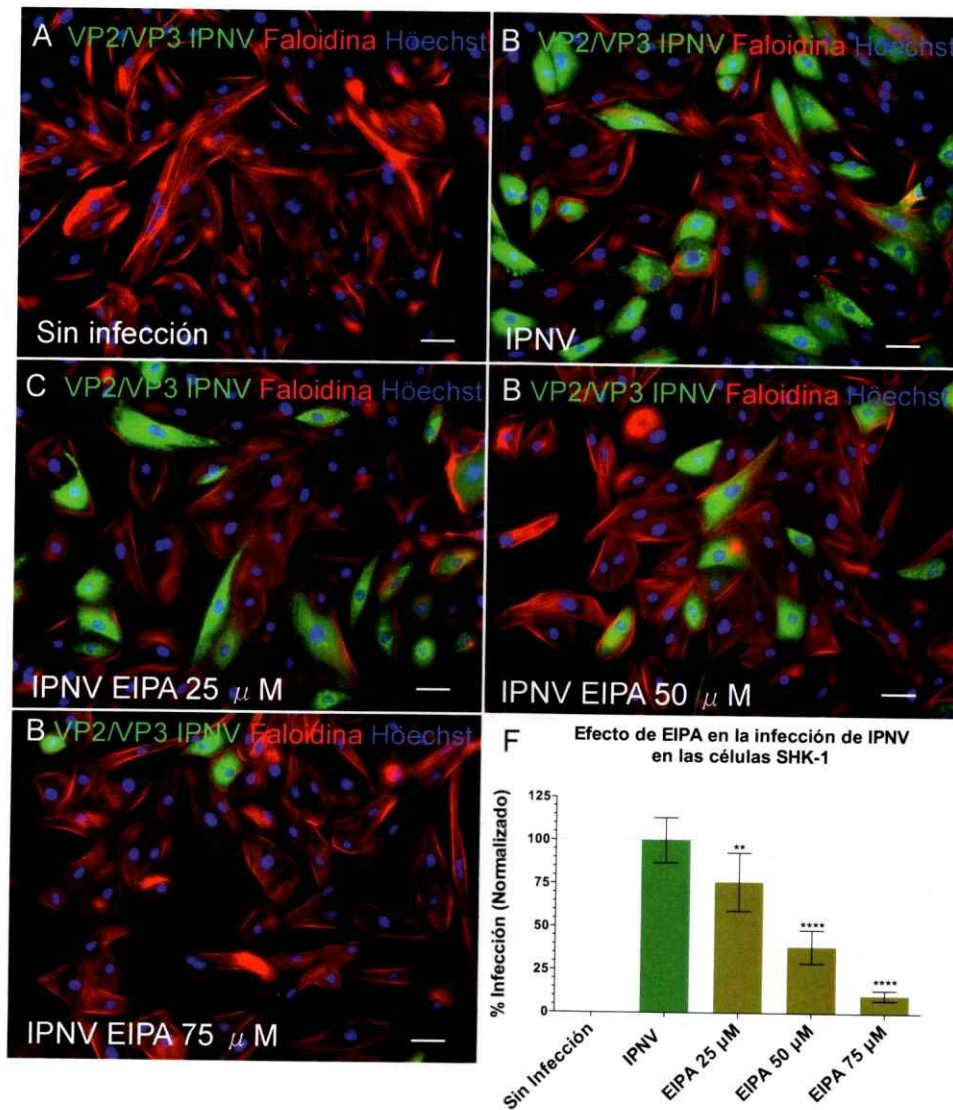


Figura 27. EIPA inhibe la infección de IPNV en células SHK-1. Se utilizó ensayo de infección en presencia de 25 (C), 50 (D) y 75 μ M de EIPA (E) o sin el inhibidor (B) y la infección se visualizó luego de 24 horas de incubación usando IFI para VP2/VP3 de IPNV. Se muestran imágenes representativas de cada condición (barra de tamaño=20 μ m). Se contaron 250 células en cada condición y el porcentaje de células infectadas se expresó como porcentaje respecto de la infección sin el inhibidor (F). El análisis estadístico de t de Student se realizó usando programa GraphPadPrism 6.0 (**p=0,0008, ****p<0,0001, NS no

significante).

3.5.5 Dependencia de otros factores asociados a macropinocitosis para el ingreso de IPNV en las células SHK-1.

Los resultados expuestos sugieren que IPNV ingresa en las células SHK-1 usando macropinocitosis al igual que en las células CHSE-214. Al igual que en el estudio realizado en CHSE-214. A continuación se presentan los resultados del estudio de la dependencia de factores accesorios y vías de señalización comunes en la macropinocitosis (Mercer y Helenius, 2009, Cossart y Helenius, 2014, Yamauchi y Helenius 2013). Para esto se utilizaron diversos inhibidores específicos en el contexto de la infección con IPNV en las células SHK-1.

Como se muestra en la figura 28, al igual que lo sucedido en las células CHSE-214, cuando se trataron las células SHK-1 con wortmanina, el inhibidor de la enzima PI3K (Walker y col., 2000, Rotblat y col., 2008), no se observó disminución de la infección por IPNV. Mientras que, a diferencia de lo sucedido en las células CHSE-214, los inhibidores IPA-3 (PAK1) y NSC23766 (Rac1) no afectaron la infección por IPNV en las células SHK-1, sugiriendo el compromiso de elementos celulares alternativos durante la infección en estas células (Fig. 28).

Del mismo modo, cuando se estudió la dependencia en la proteína GTPasa Ras y la GTPasa de tipo Rho CDC42 con los inhibidores Salirasib y Casin respectivamente, se observó inhibición parcial de la infección, sugiriendo algún grado de compromiso de estos factores celulares durante la infección por IPNV

en las células SHK-1.

Finalmente, se observó que el tratamiento con Rottlerin y blebbistatina, inhibidores de la PKC y la miosina II (Kovács y col., 2004), disminuyó significativamente la infección por IPNV en las células SHK-1 sugiriendo un rol de estas durante la infección.

Los datos hasta aquí mostrados sugieren que IPNV ingresa a la célula SHK-1 utilizando un mecanismo de tipo macropinocítico dependiente de la actividad de NHE-1, PKC, Ras y CDC42.

Dependencia de otros factores asociados a macropinocitosis en la infección por IPNV en las células SHK-1

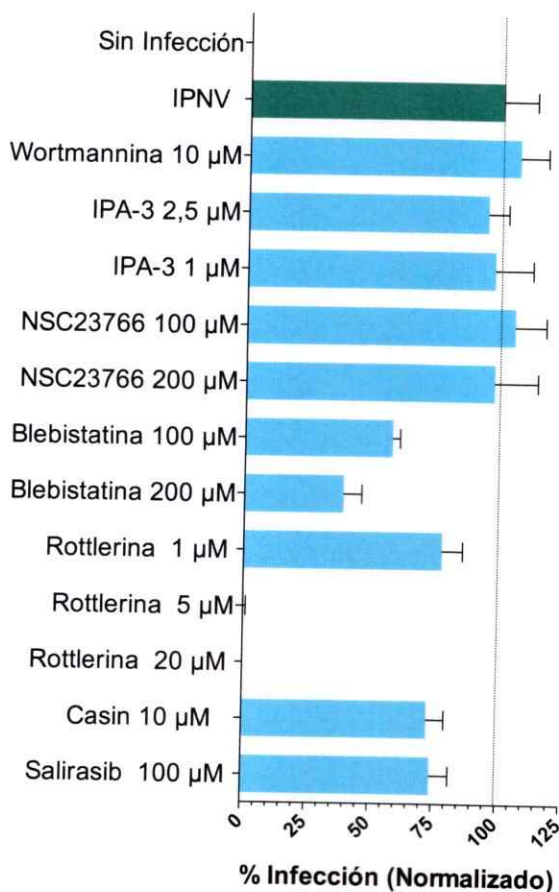


Figura 28. Dependencia de factores asociados a macropinocitosis en la infección por IPNV en las células SHK-1. Se realizó ensayo de infección por IPNV en células SHK-1 en presencia de diversos inhibidores, visualizando su efecto mediante IFI luego de 24 horas de incubación. Los porcentaje de infección fueron normalizados en relación al control sin inhibidor.

DISCUSIÓN

La endocitosis es un mecanismo general mediante el cual la célula absorbe macromoléculas y partículas del medio exterior, englobándolas en vesículas membranosas en un proceso dependiente de energía (Di Fiore y col., 2014). La endocitosis puede adoptar muchas formas, incluyendo endocitosis mediada por clatrina (EMC), endocitosis mediada por balsas lipídicas o caveolas y macropinocitosis. Los virus a menudo pueden aprovechar alguna de ellas para entrar en la célula y alcanzar el sitio óptimo para la replicación (Mercer y Helenius, 2012, Yamauchi y Helenius, 2013). Estudios previos, utilizando microscopía electrónica y ferritina catiónica como trazador endocítico, demuestran que el IPNV es co-internalizado con la ferritina en los compartimentos túbulo-vesiculares periféricos en células CHSE-214, lo que sugiere que el virus IPNV utiliza el sistema endocítico para ingresar a la célula (Couve et al. , 1992). Sin embargo, hasta la fecha no hay suficiente evidencia para establecer la naturaleza de este proceso endocítico.

Globalmente, nuestros resultados son similares a los reportados previamente para el IBDV en su respectivo modelo en células de ave, cuyo mecanismo primario de ingreso corresponde a macropinocitosis (Gimenez y col., 2015). Adicionalmente, se ha reportado que la internalización del virus se reduce significativamente después del secuestro de colesterol de la membrana

plasmática usando M β CD, sugiriendo que las balsas lipídicas y/o caveolas estarían parcialmente involucradas en la internalización del IBDV (Gimenez y col., 2015, Yip et al 2012).

Rol de la endocitosis mediada por balsas lipídicas y/o caveolas en el ingreso de IPNV en células de salmón. Utilizando CTB-A594, un trazador de la vía endocítica dependiente de balsas lipídicas, en el presente trabajo se observaron notorias diferencias en la actividad de esta vía en células CHSE-214 en relación a los datos descritos previamente en otras líneas celulares. Se observó que este marcador solo fue incorporado a la célula luego de prolongados tiempos de incubación. Mientras que en células HeLa, de origen humano y células SHK-1 de salmón del Atlántico, el marcador fue internalizado eficientemente en un corto período de incubación. Ante esta particularidad de las células CHSE-214 cabe preguntarse si dicha diferencia en la internalización de CTB responde a una baja actividad de la vía endocítica dependiente de balsas lipídicas o es consecuencia de diferencias en los receptores superficiales que determinan el ingreso de CTB a la célula. En células de mamíferos, la toxina de cólera, particularmente su subunidad B, es reconocida por el gangliósido GM₁, el que se encuentra ricamente representado en balsas lipídicas. Luego de la unión, GM₁ conduce a la toxina de cólera hacia el retículo endoplásmico, lugar donde se produce su activación (Hazes y col., 1997). Se ha observado que linajes celulares humanos pueden presentar grandes diferencias en este aspecto, como ocurre con las células HeLa, derivadas de cáncer

cérvico uterino, que presenta alta expresión de GM₁ y caveolina mientras que las células CaCo-2, provenientes de cáncer de colon humano, no expresan niveles detectables de caveolina ni GM₁. Estas diferencias impactan de manera importante la eficiencia de la internalización de CTB (Pang y col., 2004).

Los resultados mostrados en este trabajo indican que el uso del complejo filipina, un fármaco que forma complejos globulares con el colesterol de la membrana plasmática, bloquea la endocitosis por caveolas y/o balsas lipídicas en las células CHSE-214. De este modo, el tratamiento con este compuesto bloqueó el ingreso del marcador CTB pero no afectó a la infección por IPNV en estas células. En contraste, cuando se utilizó filipina en las células SHK-1 no se observó bloqueo de la internalización del marcador CTB.

Aunque la filipina se ha utilizado con éxito para bloquear la endocitosis mediada por balsas lipídicas y caveolas en células de diversos orígenes (Orlandi y col., 1998), el fenómeno de resistencia a esta droga ya se ha descrito en células de origen aviar (QM7) y su efectividad en células de salmón no se ha reportado previamente (Gimenez y col., 2015). El complejo filipina presenta alta afinidad por colesterol, un importante componente de la membrana plasmática de mamíferos (Bittman y col., 1972). Aunque no existen estudios respecto de variaciones en la composición de esteroides en membranas de células de salmón, es plausible que la resistencia observada sea consecuencia de este tipo de diferencias. En este sentido, se ha reportado que pequeñas variaciones en la estructura de los esteroides de membrana se traducen en diferencias de afinidad y resistencia frente a polienos antifúngicos por parte de diversas

especies de hongos y mamíferos (Johnson y Subden 1977, Rintoul y col., 1982). De acuerdo a esto, se probó la nistatina, un polieno antifúngico que, al igual que la filipina forma complejos globulares con esteroides de la membrana plasmática pero, a diferencia de esta, presenta menos afinidad por colesterol y mayor afinidad por ergosterol, componente abundante en membranas de hongos y algunos protistas (Coutinho y col., 2004). Así mismo, la nistatina se ha utilizado frecuentemente bloquear la endocitosis mediada por balsas lipídicas y caveolas en diversos tipos celulares (Parton y Richards, 2003, Schnitzer y col., 1994, Blot y McGraw, 2006). De acuerdo a nuestros resultados, el tratamiento con nistatina si bloqueó el ingreso de la CTB-A594 en las células SHK-1 (Fig. 22E), razón por la cual se utilizó este inhibidor para determinar la participación de las balsas lipídicas y caveolas en la infección por IPNV en estas células. Cuando este inhibidor se utilizó durante la infección por IPNV no se observó ninguna disminución significativa en el porcentaje de células infectadas, sugiriendo que al igual que en las células CHSE-214, en SHK-1 la infección por IPNV es independiente de caveolas y/o balsas lipídicas.

Por otra parte, el tratamiento con nistatina, otro macrólido con afinidad por esterol, bloqueó el ingreso de CTB a las células SHK-1 y no afectó la infección por IPNV. Esto sugiere que, a diferencia de lo observado en el IBDV, las balsas lipídicas y/o caveolas son prescindibles para la replicación de IPNV y no estarían implicadas en la entrada IPNV a la célula.



Rol de la endocitosis mediada por clatrina en el ingreso de IPNV a las células de salmón. La endocitosis mediada por clatrina (EMC) o la endocitosis mediada por receptor es una vía endocítica bien estudiada. Está universalmente distribuida entre diferentes eucariotas y desempeña papeles esenciales en diversas funciones celulares (MacMahon y Boucrot, 2011, Dergai et al, 2016). Existen numerosos virus que activan esta vía para acceder a la célula, muchos de los cuales aprovechan la migración y la maduración endosomal para gatillar su penetración hacia el citoplasma (Cossart y Helenius, 2014).

Como se muestra en este trabajo, el tratamiento de las células CHSE-214 y SHK-1 con clorpromazina, un inhibidor del ensamblaje de clatrina ampliamente utilizado en células de mamíferos, no interfirió con la infección por IPNV (Wang y col., 1993). No obstante, cuando se probó la funcionalidad de EMC en las células CHSE-214 utilizando el trazador Trf-A633, este no fue internalizado, incluso luego de un tiempo de incubación prolongado. Entre las diferentes causas que explican esta observación existe la posibilidad de que la transferrina utilizada, de origen humano, no sea reconocida por los receptores de las células CHSE-214 o bien, la vía de EMC no sea activa en estas células. En suma, la ausencia de otros trazadores de EMC validados en células de peces, no permiten descartar la utilización de esta vía en la infección por IPNV en células CHSE-214.

Contrastando con lo anterior, el marcador Trf-A633 si fue internalizado en las células SHK-1 y la internalización fue bloqueada por la CPZ. Además, el tratamiento con CPZ no afectó a la infección por IPNV en estas células, lo que

sugiere que el virus no depende de clatrina para infectar las células de salmón del Atlántico SHK-1. Estos resultados concuerdan con la evidencia de que la infección por IPNV en células CHSE-214 y SHK-1 es insensible al tratamiento con dynasore sugiriendo que la actividad de la GTPasa dinamina 2, un factor relevante durante el cierre de la vesícula en la EMC, es prescindible para la infección por IPNV en estas células (McMahon y Boucrot, 2011, Cosart y Helenius, 2014). En suma, estos resultados concuerdan con reportes previos que señalan que la infección por IPNV no requiere la disminución del pH para la entrada a la célula, factor que es frecuentemente utilizado por las partículas virales que utilizan EMC para ingresar a la célula (Espinoza y Kuznar, 1997).

El virus IPN ingresa a las células de salmón vía macropinocitosis. La macropinocitosis es constitutiva en células dendríticas y macrófagos y debe ser inducida en otros linajes celulares (Mercer y Helenius, 2012, Yamauchi y Helenius, 2013). Para activar esta vía, los virus deben establecer la interacción con moléculas específicas de superficie celular, seguido de la activación de la cascada de señalización que conduce al reordenamiento de la actina para la formación de protrusiones o rizos de la membrana plasmática. Los macropinosomas se forman cuando los rizos de la membrana se repliegan sobre la membrana plasmática para formar cavidades llenas de fluido que se cierran por fusión de membranas (Mercer y col., 2010, Yamauchi y Helenius, 2013). En consecuencia, la formación del macropinosoma se asocia con un aumento transitorio en la captación de la fase fluida extracelular (Mercer y

Helenius, 2009). Aunque hasta la fecha no se ha identificado el o los receptores o moléculas de interacción en la superficie celular, en el presente trabajo se demuestra que el virus IPN estimula la captura de la fase fluida en células CHSE-214 y SHK-1, lo que sugiere que el virus puede interactuar y desencadenar la vía de señalización apropiada para gatillar la captura macropinocítica.

Debido a la alta actividad de polimerización de actina durante la formación de rizos de membrana, la macropinocitosis tiene una alta dependencia de la dinámica de actina (Mercer y Helenius, 2009, Marques y col., 2017). Mediante el uso de Cito D como agente desarticulante del citoesqueleto, se demostró que la infección por IPNV es altamente dependiente de la polimerización de actina en las células CHSE-214, ya que la expresión de VP2/VP3 de IPNV se redujo drásticamente después de 6 horas de infección en presencia del fármaco. Así mismo, se obtuvieron resultados similares cuando la presencia de Cito D se restringió a las primeras 2 horas de infección, lo que indica que este requisito es necesario en la etapa temprana de la infección, posiblemente durante el ingreso del virus. A diferencia de lo anterior, cuando se probó este inhibidor en células SHK-1 se observó toxicidad a muy bajas concentraciones de Cito D, lo que impidió estudiar este requerimiento usando esta aproximación metodológica. No obstante, cuando se determinó el efecto de las partículas virales en el citoesqueleto de actina en tiempos tempranos de infección, se observó que IPNV se asocia con estructuras celulares enriquecidas de actina F en SHK-1 de tipo filopodias, sugiriendo la participación de este factor en el ingreso del virus a

las células SHK-1. Serán necesarios estudios posteriores usando otros inhibidores u otras aproximaciones metodológicas para responder esta interrogante.

Como consecuencia de la actividad metabólica durante la polimerización de la actina se genera una gran cantidad de equivalentes de H⁺ y el pH del citosol sub membranoso es equilibrado a través de la actividad de la bomba protón/sodio NHE-1. La dependencia de la actividad de NHE-1 es un sello distintivo de la macropinocitosis y su bloqueo induce una rápida acidificación del citosol, condición que inhibe a las Rho GTPasas Cdc42 y Rac1 (Koivusalo y col., 2010). Como se muestra, la infección por IPNV fue bloqueada por el uso de inhibidor de NHE-1 EIPA en un modo dependiente de dosis en los dos modelos celulares estudiados.

Compromiso diferencial de GTPasas de tipo Rho y otros factores celulares en el ingreso de IPNV en las células CHSE-214 y las células SHK-1.

Las GTPasas Cdc42 y Rac1 se han descrito como reguladores maestros de la dinámica de actina, de la formación de protrusiones de membrana y del tráfico vesicular (Lim y col., 1996). Cdc42 y Rac1 activan dos tipos de nucleadores de actina, WASP y WAVE que dan surgimiento a las filopodias y lamelopodias respectivamente (Egami y col., 2014). En concordancia con la respuesta de la infección frente a EIPA, cuando se chequeó el requerimiento de la actividad de las GTPasas Rho durante la infección por IPNV, se observó dependencia diferencial de Rac1 en las células CHSE-214 y Cdc42 en las células SHK-1.

Rac1 se ha asociado con la formación de rizos de membrana y es crucial para la formación de macropinosomas en diferentes tipos de células, incluyendo las células dendríticas, macrófagos, fibroblastos y células epiteliales (Egami y col., 2014, Fujii y col., 2013). Concordante con esto, el estudio morfológico de la actina en tiempos tempranos de infección mostró una tendencia hacia la formación de rizos de membrana en las células CHSE-214 mientras que en las células SHK-1 se observó la asociación de las partículas con largas protrusiones de tipo filopodias.

Varias moléculas han sido identificadas como efectores río abajo de Rac1 durante la formación de macropinosomas, tales como la quinasa activada por p21 (PAK1). PAK1 fosforila a la proteína 1 de unión al dominio C-terminal de E1A / sustrato ADP ribosilado de brefeldin A (CtBP / BARS), y esta fosforilación es un evento crítico para el cierre de la copa macropinocítica (Amstutz y col., 2008, Liberali y col., 2008). Para probar el rol de Pak1 en la infección por IPNV se utilizó IPA-3, un inhibidor alostérico no competitivo para probar el papel de PAK1 en la infección por IPNV. Nuestros resultados indican que la infección por IPNV depende de la actividad de PAK1 en las células CHSE-214 enfatizando el papel de Rac1 en este mecanismo.

La fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (PI(3)K) es una enzima implicada en diversas funciones celulares como el crecimiento, la diferenciación, proliferación, supervivencia, motilidad y el tráfico intracelular (Carracedo y Pandolfi, 2008). Además, se ha implicado en varias etapas de la macropinocitosis, desde la formación del rizo hasta el cierre de la membrana y

el tráfico del macropinosoma (Mercer y Helenius, 2012). Esta enzima cataliza la adición de un grupo fosfato en el fosfolípido fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PI (4,5) P2), generando la molécula señal PI (3,4,5) P3. La incorporación de esta señal en la membrana plasmática durante la macropinocitosis conduce a la formación de micro-dominios que son reconocidos por diversas proteínas efectoras. Además, la presencia de esta señal durante la formación del macropinosoma coincide con la unión de varias proteínas de la familia SNX-PX-BAR, que están implicadas en la formación de curvaturas y la tubulación de la membrana plasmática (Wang y col., 2010). Sorprendentemente, el tratamiento de células CHSE-214 y SHK-1 con wortmannina dio como resultado una inhibición marginal de la infección por IPNV. Dado el papel central que se ha conferido a PI(3)K en la generación y el desarrollo de macropinosoma, la resistencia al inhibidor de PI(3)K fue inesperado. Sin embargo, hasta la fecha se han descrito varios casos de virus que ingresan a través de macropinocitosis independiente de PI(3)K, entre los que se pueden citar algunas cepas del virus de la viruela (VV), el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH-1) y el virus de la fiebre aftosa (FMDV) (Mercer y Helenius 2009, Mercer y col., 2010, Carter et al. 2011, Mercer y Helenius, 2012, Han y col., 2016). Este hallazgo sugiere que otras quinasas lipídicas podrían regular la macropinocitosis en las células CHSE-214 y SHK-1.

Tabla 2: Cuadro comparativo de factores requeridos para la endocitosis del virus IPN en células CHSE-214 versus SHK-1.

			Células	
Vía endocítica	Objetivo	Tratamiento	CHSE-214	SHK-1
Endocitosis mediada por clatrina (EMC)	Bloqueo de nucleación de clatrina.	Clorpromazina	No concluyente	No
	Inhibición de escisión de la vesícula recubierta de clatrina.	Dynasore	No inhibe	No inhibe
Endocitosis mediada por balsas lipídicas y/o caveolas.	Distorsión de balsas lipídicas mediante formación de complejos con colesterol.	Filipina	No inhibe	No se realiza
	Distorsión de balsas lipídicas mediante formación de complejos con ergosterol.	Nistatina	No se realiza	No inhibe
Macropinocitosis	Inducción de captura de fase fluida	Dextran-Texas Red	Si	Si
	Inhibición de polimerización de actina.	Citocalasina D	Si	No se realiza
	Dependencia de la actividad de NHE-1.	EIPA	Si	Si
	El virus induce reordenamiento de la actina-F.	Marca de actina F con faloidina	Si	Si
	Dependencia de GTPasa de tipo Rho.	NSC23766 Casin	Rac1	Cdc42
	Dependencia de Pak1.	IPA-3	Si	No
	Dependencia de PKC.	Rottlerina	Si	Si
	Dependencia de PI3K.	Wortmanina	No	No
	Dependencia de microtúbulos.	Nocodazol	No	No
	Dependencia de Miosina II	Blebbistatina	Si	Si

Desde un punto de vista general, las observaciones presentadas en este trabajo indican que existen similitudes y diferencias en los factores celulares comprometidos durante el ingreso del virus IPN a las células CHSE-214 y SHK-1, las que se muestran en la Tabla 2.

Modelo propuesto para el mecanismo de macropinocitosis en células de salmón.

De este modo, la participación de la GTPasa de tipo Rac1 y la quinasa Pak1 resultaron relevantes durante la infección en las células CHSE-214. A partir de estos resultados se propone un modelo en el cual la unión del IPNV a un receptor, desconocido a la fecha, desencadena la vía de señalización que da como resultado la activación de Rho GTPasa Rac1. Rac1 luego puede coordinar secuencialmente una respuesta macropinocítica a través de su efector Pak1. En primer lugar, Pak1 regula la LIM quinasa (LIMK), que fosforila e inactiva directamente a los miembros de la familia de las cofilinas, lo que da como resultado la estabilización de la actina F (filamentosa) y la formación de protrusiones de membrana. Pak1 luego regula la retracción de protrusión dependiente de actomiosina a través de la activación de la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), que fosforila y activa la miosina II. El cierre macropinocítico estaría regulado también por Pak1 a través de la activación de CtBP1 (proteína de unión C-terminal 1) y la activación indirecta de la miosina II. La actividad de intercambio de protones del NHE1 mantiene el pH sub-membranoso, lo que soporta la actividad de Rac1 durante todo el proceso

(Figura 29).

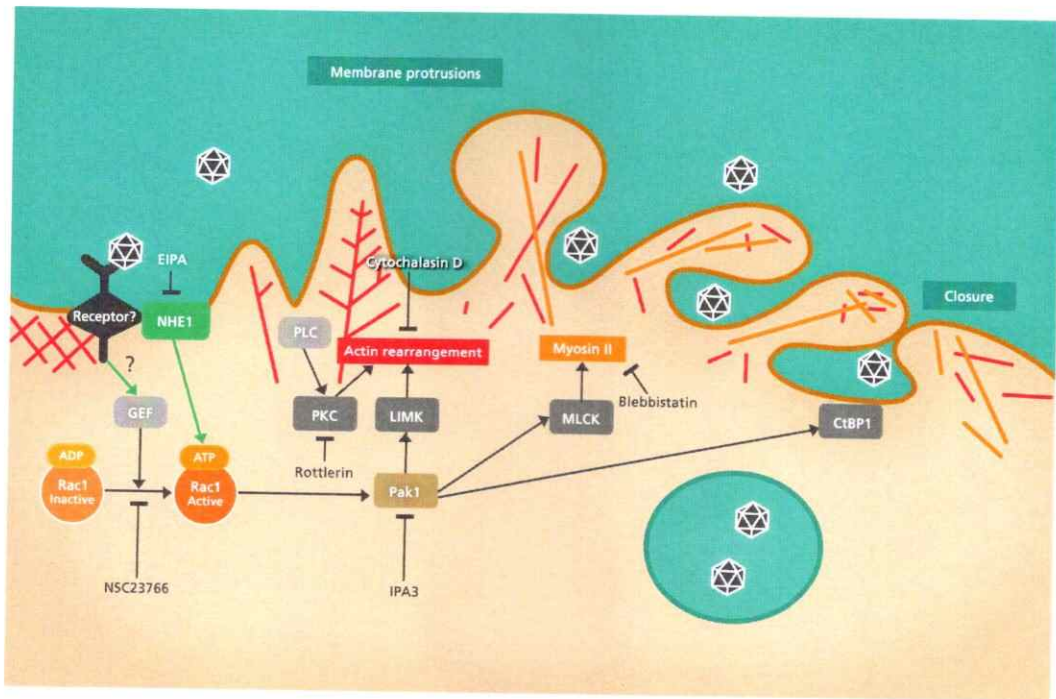


Figura 29. Modelo del mecanismo macropinocítico utilizado por el virus IPN para ingresar a las células CHSE-214 (Levican y col., 2017). GEF; factor intercambiador de nucleótido de guanina, Pak1; proteína quinasa activada por p21, LIMK; quinasa Lim, MLCK; quinasa de la cadena liviana de miosina, CtBP1; proteína 1 de unión al dominio C-terminal de E1A / sustrato ADP ribosilado de brefeldin A, PKC; proteína quinasa C.

Por otro lado, el mecanismo utilizado por el virus para ingresar a las células SHK-1 es menos claro, pero a diferencia de lo que ocurre en las células CHSE-214, existe dependencia parcial de la GTPasa Rho Cdc42 e independencia de Pak1.

En conclusión, estos resultados indican que el IPNV entra en las células CHSE-

214 por un mecanismo independiente de clatrina y caveolina y/o balsas lipídicas, mecanismo que cumple con los principales criterios utilizados para definir la macropinocitosis (Mercer y Heleinus, 2009). Así mismo, el estudio realizado en células SHK-1 sugiere que IPNV utiliza la misma vía de ingreso, aunque presenta importantes diferencias en los factores reguladores implicados en dicho mecanismo. De este modo, el mecanismo macropinocítico utilizado por el virus IPN en las células CHSE-214 es posiblemente regulada por la GTPasa de tipo Rho Rac1 y comprende varios efectores como miosina II y quinasas PAK1 y PKC. Por otro lado, en las células SHK-1 el posible regulador de la macropinocitosis es la GTPasa Rho Cdc42 y habría compromiso de la GTPasa Ras, la quinasa PKC y miosina II.

CONCLUSIONES

1. En relación al objetivo específico 1: "*Evaluar el ingreso de IPNV a la célula CHSE-214 por endocitosis mediada por clatrina y balsas lipídicas / caveolas*", los resultados mostrados sugieren que la infección por IPNV en células CHSE-214 es independiente de balsas lipídicas y caveolas. Por otro lado, el tratamiento de las células con inhibidor de la vía dependiente de clatrina, clorpromazina, no afectó la infección por IPNV. Sin embargo, al no internalizarse el marcador de esta vía, la transferrina conjugada, no nos es posible concluir sobre la significancia de este resultado. La falta de un control validado para esta vía endocítica en células CHSE-214 impide el poder descartar o afirmar la participación de la endocitosis mediada por clatrina en el ingreso de IPNV a estas células.
2. En relación al objetivo específico 2, "*Evaluar el ingreso de IPNV a las células CHSE-214 por macropinocitosis*", los resultados expuestos indican que IPNV, al igual que el birnavirus aviar IBDV en su respectivo modelo celular, ingresa por macropinocitosis a las células CHSE-214. Se presenta evidencia que se ajusta a los criterios que definen el ingreso de un virus por macropinocitosis (56); i) la dependencia de la dinámica de

actina, ii) la dependencia de la función de la bomba NHE-1 y iii) la inducción de captura de la fase fluida por parte del virus. Adicionalmente, se muestran datos que sugieren que este mecanismo es coordinado por la GTPasa de tipo Rho Rac1 y compromete la función de PAK1, PKC y miosina II.

3. Respecto al objetivo específico 3; "*Evaluar el ingreso de IPNV a las células SHK-1 por macropinocitosis*", durante el presente trabajo se observó que la infección por IPNV en las células SHK-1 fue resistente a los tratamientos con nistatina y clorpromazina, sugiriendo independencia de la endocitosis mediada por balsas lipídicas y/o caveolas y EMC respectivamente. Adicionalmente, la inoculación de IPNV en las células SHK-1 indujo la captura de fase fluida y se observaron cambios en el citoesqueleto de actina en tiempos tempranos de infección. En el mismo sentido, se observó que la infección depende de la actividad de la proteína NHE-1 ya que el tratamiento de las células con EIPA bloqueó la infección de manera dosis dependiente. Estos datos sugieren que, al igual que en las células CHSE-214, IPNV ingresa en las células SHK-1 mediante macropinocitosis. A diferencia de lo mostrado para las células CHSE-214, el mecanismo de endocitosis utilizado por el virus para ingresar en las células SHK-1 depende de la actividad de la GTPasa Rho Cdc42, PKC y miosina II.

BIBLIOGRAFIA

Allnutt, F. T., Bowers, R. M., Rowe, C. G., Vakharia, V. N., LaPatra, S. E., Dhar, A. K. 2007. Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast. *Vaccine*, 25(26), 4880-4888.

Amstutz, B., Gastaldelli, M., Kälin, S., Imelli, N., Boucke, K., Wandeler, E., Greber, U. F. 2008. Subversion of CtBP1-controlled macropinocytosis by human adenovirus serotype 3. *The EMBO journal*, 27(7), 956-969.

Amyere, M., Mettlen, M., Van Der Smissen, P., Platek, A., Payrastra, B., Veithen, A., Courtoy, P. J. 2001. Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis. *International Journal of medical microbiology*, 291(6), 487-494.

Amyere, M., Payrastra, B., Krause, U., Van Der Smissen, P., Veithen, A., Courtoy, P. J. 2000. Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. *Molecular biology of the cell*, 11(10), 3453-3467.

Anderson, H. A., Chen, Y., Norkin, L. C. 1996. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular biology of the cell*, 7(11), 1825-1834.

Bahar, M. W., Sarin, L. P., Graham, S. C., Pang, J., Bamford, D. H., Stuart, D. I., Grimes, J. M. 2013. Structure of a VP1-VP3 complex suggests how birnaviruses package the VP1 polymerase. *Journal of virology*, 87(6), 3229-3236.

Baker, E. N., Rumball, S. V., Anderson, B. F. 1987. Transferrins: insights into structure and function from studies on lactoferrin. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 350-353.

Banco Central de Chile, 2017. Informe de exportaciones industriales. Boletín Mensual Banco Central de Chile. Capítulo 4; Sector Externo, Volumen 90, N°1071, pág 104

- Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., Silverman, G. J. 2007. Quantitation of DNA and RNA. Cold Spring Harbor Protocols, 2007(11), pdb-ip47.
- Birghan C., Mundt E., Gorbalenya A.E. 2000. A non-canonical Ion proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus EMBO J., 19, pp. 114–123.
- Bittman, R., Fischkoff, S. A. 1972. Fluorescence studies of the binding of the polyene antibiotics filipin III, amphotericin B, nystatin, and lagosin to cholesterol. Proceedings of the National Academy of Sciences, 69(12), 3795-3799.
- Blot, V., y McGraw, T. E. 2006. GLUT4 is internalized by a cholesterol-dependent nystatin-sensitive mechanism inhibited by insulin. The EMBO journal, 25(24), 5648-5658.
- Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J. C., Ubelmann, F., Kirchhausen, T. 2011. Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. Nature cell biology, 13(9), 1124.
- Bruno, D. W. 2004. Changes in prevalence of clinical infectious pancreatic necrosis among farmed Scottish Atlantic salmon, *Salmo salar* L. between 1990 and 2002. Aquaculture, 235(1), 13-26.
- Buckley, C. M., King, J. S. 2017. Drinking problems: Mechanisms of macropinosome formation and maturation. The FEBS Journal.
- Buckley, C. M., Gopaldass, N., Bosmani, C., Johnston, S. A., Soldati, T., Insall, R. H., King, J. S. 2016. WASH drives early recycling from macropinosomes and phagosomes to maintain surface phagocytic receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(40), E5906-E5915.
- Cadwell, C. M., Su, W., y Kowalczyk, A. P. (2016). Cadherin tales: regulation of cadherin function by endocytic membrane trafficking. Traffic.
- Canton, J., Schlam, D., Breuer, C., Gütschow, M., Glogauer, M., Grinstein, S. 2016. Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages. Nature communications, 7, 11284.
- Carracedo, A., Pandolfi, P. P. 2008. The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. Oncogene, 27(41), 5527-5541.

- Carter, G. C., Bernstone, L., Baskaran, D., James, W. 2011. HIV-1 infects macrophages by exploiting an endocytic route dependent on dynamin, Rac1 and Pak1. *Virology*, 409(2), 234-250.
- Chang, K., Baginski, J., Hassan, S. F., Volin, M., Shukla, D., Tiwari, V. 2016. Filopodia and viruses: an analysis of membrane processes in entry mechanisms. *Frontiers in microbiology*, 7.
- Chen, H., Slepnev, V. I., Di Fiore, P. P., De Camilli, P. 1999. The interaction of epsin and Eps15 with the clathrin adaptor AP-2 is inhibited by mitotic phosphorylation and enhanced by stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3257-3260.
- Cheng, J. P., Nichols, B. J. 2016. Caveolae: one function or many?. *Trends in cell biology*, 26(3), 177-189.
- Chevalier, C., Lepault, J., Da Costa, B., Delmas, B. 2004. The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *Journal of virology*, 78(7), 3296-3303.
- Commisso, C., Flinn, R. J., Bar-Sagi, D. 2014. Determining the macropinocytic index of cells through a quantitative image-based assay. *Nature protocols*, 9(1), 182-192.
- Constantinescu, S.N., Cernescu, C.D. Popescu, L.M. 1991. Effects of protein kinase C inhibitors on viral entry and infectivity. *FEBS Lett* 292, 31-33.
- Cooper, J. A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology*, 105(4), 1473-1478.
- Cortez-San Martin M, Villanueva RA, Jashés M, Sandino AM. 2009. Molecular characterization of IPNV RNA replication intermediates during the viral infective cycle. *Virus Res. Sep*;144(1-2):344-9.
- Cossart, P., Helenius, A. 2014. Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(8), a016972.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Rey, F. A. 2005. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 120(6), 761-772.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Delmas, B., Rey, F. A. 2010. Crystal structure of an Aquabirnavirus particle: insights into antigenic diversity and virulence determinism. *Journal of virology*, 84(4), 1792-1799.

Coutinho, A., Silva, L., Fedorov, A., Prieto, M. 2004. Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation. *Biophysical journal*, 87(5), 3264-3276.

Couve E., Kiss J., Kuznar J. 1992. Infectious necrosis pancreatic virus internalization and endocytic organelles in CHSE-214 cells. *Cell Biol Int Rep* 16:899-906.

Cureton, D. K., Massol, R. H., Saffarian, S., Kirchhausen, T. L., Whelan, S. P. 2009. Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. *PLoS pathogens*, 5(4), e1000394.

Cureton, D. K., Massol, R. H., Whelan, S. P., Kirchhausen, T. 2010. The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis. *PLoS pathogens*, 6(9), e1001127.

Cutrín, J. M., Barja, J. L., Nicholson, B. L., Bandín, I., Blake, S., Dopazo, C. P. 2004. Restriction fragment length polymorphisms and sequence analysis: an approach for genotyping infectious pancreatic necrosis virus reference strains and other aquabirnaviruses isolated from northwestern Spain. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 1059-1067.

Dannevig, B. H., Falk, K., Namork, E. 1995. Isolation of the causal virus of infectious salmon anaemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *Journal of General Virology*, 76(6), 1353-1359.

Dannevig, B. H., Brudeseth, B. E., Gjøen, T., Rode, M., Wergeland, H. I., Evensen, Ø., Press, C. M. 1997. Characterisation of a long-term cell line (SHK-1) developed from the head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunology*, 7(4), 213-226.

Dautry-Varsat, A. 1986. Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor. *Biochimie*, 68(3), 375-381.

De Vries, E., Tscherne, D. M., Wienholts, M. J., Cobos-Jiménez, V., Scholte, F., García-Sastre, A., ... De Haan, C. A. 2011. Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS pathogens*, 7(3), e1001329.

Deacon, S. W., Beeser, A., Fukui, J. A., Rennefahrt, U. E., Myers, C., Chernoff, J., Peterson, J. R. 2008. An isoform-selective, small-molecule inhibitor targets the autoregulatory mechanism of p21-activated kinase. *Chemistry biology*, 15(4), 322-331.

- Delgui L, Oña A, Gutierrez S, Luque D, Navarro A, Castón JR, Rodríguez JF. 2009. The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional alpha 4 beta 1 integrin ligand motif. *Virology* 386:360–372.
- Dergai, M., Iershov, A., Novokhatska, O., Pankivskyi, S., Rynditch, A. 2016. Evolutionary Changes on the Way to Clathrin-Mediated Endocytosis in Animals. *Genome biology and evolution*, 8(3), 588-606.
- Di Fiore, P. P., von Zastrow, M. 2014. Endocytosis, signaling, and beyond. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(8), a016865.
- Dixon, P. F., Ngoh, G. H., Stone, D. M., Chang, S. F., Way, K., Kueh, S. L. F. 2008. Proposal for a fourth aquabirnavirus serogroup. *Archives of virology*, 153(10), 1937-1941.
- Dobos, P. 1977. Virus-specific protein synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of virology*, 21(1), 242-258.
- Dobos, P., Roberts, T. E. 1983. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(4), 377-384.
- Dobos, P. 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Annual Review of Fish Diseases*, 5, 25-54.
- Egami, Y., Taguchi, T., Maekawa, M., Arai, H., Araki, N. 2014. Small GTPases and phosphoinositides in the regulatory mechanisms of macropinosome formation and maturation. *Frontiers in physiology*, 5.
- Ellis, A. E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental Comparative Immunology*, 25(8), 827-839.
- Espinoza, E., Farías, G., Soler, M., Kuznar, J. 1985. Identity between infectious pancreatic necrosis virus VR-299 and a Chilean isolate. *Intervirology*, 24(1), 58-60.
- Espinoza, J. C., Kuznar, J. 1997. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) does not require acid compartments for entry into cells. *Archives of virology*, 142(11), 2303-2308.
- Even-Faitelson, L., Rosenberg, M., Ravid, S. 2005. PAK1 regulates myosin II-B phosphorylation, filament assembly, localization and cell chemotaxis. *Cell Signal* 17, 1137-1148.
- Evensen, Ø., Santi, N. 2008. Infectious pancreatic necrosis virus. *Encyclopedia*

of Virology, 3rd edition. Oxford, Elsevier, 83-89.

Fariás, G., Navarrete, E., Kiss, J., Kuznar, J. 1988. Effect of ammonium chloride on the multiplication of infectious pancreatic necrosis virus. *Archives of virology*, 98(3), 155-162.

Fujii, M., Kawai, K., Egami, Y., Araki, N. 2013. Dissecting the roles of Rac1 activation and deactivation in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation. *Scientific reports*, 3.

Gao, Y., Dickerson, J. B., Guo, F., Zheng, J., Zheng, Y. 2004. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), 7618-7623.

Gimenez, M. C., Rodríguez Aguirre, J. F., Colombo, M. I., Delgui, L. R. 2015. Infectious Bursal Disease Virus uptake Involves Macropinocytosis and Trafficking to Early Endosomes in a Rab5-dependent Manner. *Cellular microbiology*.

Gomez-Casado, E., Estepa, A., Coll, J. M. 2011. A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine*, 29(15), 2657-2671.

Granzow, H., Weiland, F., Fichtner, D., Enzmann, P. J. 1997. Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *Journal of Fish Diseases*, 20(1), 1-10.

Gschwendt, M., Muller, H. J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G., Marks, F. 1994. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications*, 199(1), 93-98.

Han, S. C., Guo, H. C., Sun, S. Q., Jin, Y., Wei, Y. Q., Feng, X., Liu, X. T. 2016. Productive Entry of Foot-and-Mouth Disease Virus via Macropinocytosis Independent of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Scientific reports*, 6.

Haspot, F., Lavault, A., Sinzger, C., Sampaio, K. L., Stierhof, Y. D., Pilet, P., ... Halary, F. 2012. Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PloS one*, 7(4), e34795.

Hazes, B., and Read, R.J. 1997. Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry* 36, 11051-11054.

- Henne, W. M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., McMahon, H. T. 2010. FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science*, 328(5983), 1281-1284.
- Hetzenecker, S., Helenius, A., Krzyzaniak, M. A. 2016. HCMV induces macropinocytosis for host cell entry in fibroblasts. *Traffic*, 17(4), 351-368.
- Hill, B.J., Way, K. 1995. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annual Review of Fish Disease* 5, 55-77.
- <https://talk.ictvonline.org/>, visitada el 05 de Octubre de 2017.
- Ibieta, P., Tapia, V., Venegas, C., Hausdorf, M., Takle, H. 2011. Chilean salmon farming on the horizon of sustainability: review of the development of a highly
- Johansen, I. H., y Sommer, A. I. 1995. Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in head kidney and blood leucocytes isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 18(2), 147-156.
- Johnson, D., Subden, R. 1977. Polyene antibiotic affinities for the sterols of resistant and sensitive strains of *Neurospora crassa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 23(1), 113-115.
- Jost, M., Simpson, F., Kavran, J. M., Lemmon, M. A., Schmid, S. L. 1998. Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Current biology*, 8(25), 1399-1404.
- Julin, K., Johansen, L. H., Sommer, A. I. (2009). Reference genes evaluated for use in infectious pancreatic necrosis virus real-time RT-qPCR assay applied during different stages of an infection. *Journal of virological methods*, 162(1), 30-39.
- Kerr, M. C., Teasdale, R. D. 2009. Defining macropinocytosis. *Traffic*, 10(4), 364-371.
- Kibenge FS, Godoy MG, Fast M, Workenhe S, Kibenge MJ. 2012. Counter measures against viral diseases of farmed fish. *Antiviral Res.* Sep;95(3):257-81.
- Kirchhausen, T., Owen, D., Harrison, S. C. 2014. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(5), a016725.
- Klemetsen, A., Amundsen, P. A., Dempson, J. B., Jonsson, B., Jonsson, N.,

- O'connell, M. F., Mortensen, E. 2003. Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of freshwater fish*, 12(1), 1-59.
- Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C. C., Kim, M., Alexander, T., Grinstein, S. 2010. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *The Journal of cell biology*, 188(4), 547-563.
- Kovács, M., Tóth, J., Hetényi, C., Málnási-Csizmadia, A., Sellers, J. R. 2004. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35557-35563.
- Krzyzaniak, M. A., Zumstein, M. T., Gerez, J. A., Picotti, P., Helenius, A. 2013. Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein. *PLoS pathogens*, 9(4), e1003309.
- Kuznar J., Soler M., Farias G., Espinoza JC. 1995. Attachment and entry of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) into CHSE-214 cells. *Arch Virol* 140:1833-1840.
- Larsen, R., Røkenes, T. P., Robertsen, B. 2004. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein. *Journal of Virology*, 78(15), 7938-7944.
- Levicán, J., Miranda-Cárdenas, C., Soto-Rifo, R., Aguayo, F., Gaggero, A., & León, O. (2017). Infectious pancreatic necrosis virus enters CHSE-214 cells via macropinocytosis. *Scientific Reports*, 7.
- Liberali, P., Kakkonen, E., Turacchio, G., Valente, C., Spaar, A., Perinetti, G., Luini, A. 2008. The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *The EMBO journal*, 27(7), 970-981.
- Lim, L., Hall, C., Monfries, C. 1996. Regulation of actin cytoskeleton by Rho-family GTPases and their associated proteins. In *Seminars in Cell Developmental Biology* (Vol. 7, No. 5, pp. 699-706). Academic Press.
- Lin TW, Lo CW, Lai SY, Fan RJ, Lo CJ, Chou YM, Thiruvengadam R, Wang AH, Wang MY. 2007. Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 81:8730-8741.
- Liu, P., Rudick, M., Anderson, R. G. 2002. Multiple functions of caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41295-41298.

- López, S., y Arias, C. F. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends in microbiology*, 12(6), 271-278.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., Kirchhausen, T. 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental cell*, 10(6), 839-850.
- Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., Aten, J. A. 1993. Measurement of colocalization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of microscopy*, 169(3), 375-382.
- Marques, P. E., Grinstein, S., Freeman, S. A. 2017. SnapShot: Macropinocytosis. *Cell*, 169(4), 766-766.
- Martinez-Alonso, S., Vakharia, V. N., Saint-Jean, S. R., Pérez-Prieto, S., Tafalla, C. 2012. Immune responses elicited in rainbow trout through the administration of infectious pancreatic necrosis virus-like particles. *Developmental Comparative Immunology*, 36(2), 378-384.
- McAllister, P. E., Reyes, X. 1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *Journal of Fish Diseases*, 7(4), 319-322.
- McBeath, A. J. A., Snow, M., Secombes, C. J., Ellis, A. E., Collet, B. 2007. Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish Shellfish Immunology*, 22(3), 230-241.
- McCluskey, A., Daniel, J. A., Hadzic, G., Chau, N., Clayton, E. L., Mariana, A., Moshkanbaryans, L. 2013. Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis. *Traffic*, 14(12), 1272-1289.
- McKnight, I. J., Roberts, R. J. 1976. The pathology of infectious pancreatic necrosis. I. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *British Veterinary Journal*, 132(1), 76-85.
- McMahon, H., Boucrot, E. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(8), 517.
- Mercer, J., y Helenius, A. 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*, 320(5875), 531-535.
- Mercer, J., Helenius, A. 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell*

biology, 11(5), 510-520.

Mercer, J., Knébel, S., Schmidt, F. I., Crouse, J., Burkard, C., Helenius, A. 2010. Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9346-9351.

Mercer, J., Helenius, A. 2012. Gulping rather than sipping: macropinocytosis as a way of virus entry. *Current opinion in microbiology*, 15(4), 490-499.

Moen, T., Torgersen, J., Santi, N., Davidson, W. S., Baranski, M., Ødegård, J., and Isdal, E. (2015). Epithelial cadherin determines resistance to infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon. *Genetics*, 200(4), 1313-1326.

Mutoloki, S., Evensen, Ø. 2011. Sequence similarities of the capsid gene of Chilean and European isolates of infectious pancreatic necrosis virus point towards a common origin. *Journal of General Virology*, 92(7), 1721-1726.

Nanbo, A., Imai, M., Watanabe, S., Noda, T., Takahashi, K., Neumann, G., Halfmann, P. and Kawaoka, Y. 2010. Ebola virus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLOS Pathog.* 6, e1001121.

Neu, U., Stehle, T., Atwood, W. J. 2009. The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology*, 384(2), 389-399.

Orlandi, P.A., and Fishman, P.H. 1998. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* 141: 905-915.

Özel, M., Gelderblom, H. 1985. Capsid symmetry of viruses of the proposed birnavirus group. *Archives of virology*, 84(3-4), 149-161.

Pang, H., Le, P. U., Nabi, I. R. 2004. Ganglioside GM1 levels are a determinant of the extent of caveolae/raft-dependent endocytosis of cholera toxin to the Golgi apparatus. *Journal of cell science*, 117(8), 1421-1430.

Parton, R. G., Richards, A. A. 2003. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*, 4(11), 724-738.

Parton, R. G., Collins, B. M. 2016. Unraveling the architecture of caveolae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201617954.

Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A. 2001. Caveolar endocytosis of

simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature cell biology*, 3(5), 473.

Pelkmans, L., y Helenius, A. 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic*, 3(5), 311-320.

Pelkmans, L., Bürli, T., Zerial, M., Helenius, A. 2004. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*, 118(6), 767-780

Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M. 2005. Genome-wide analysis of human kinases in clathrin-and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature*, 436(7047), 78.

Pernet, O., Pohl, C., Ainouze, M., Kweder, H., Buckland, R. 2009. Nipah virus entry can occur by macropinocytosis. *Virology*, 395(2), 298-311.

Peterson, J. R., Lebensohn, A. M., Pelish, H. E., Kirschner, M. W. 2006. Biochemical suppression of small-molecule inhibitors: a strategy to identify inhibitor targets and signaling pathway components. *Chemistry biology*, 13(4), 443-452.

Pous, J., Chevalier, C., Ouldali, M., Navaza, J., Delmas, B., Lepault, J. 2005. Structure of birnavirus-like particles determined by combined electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Journal of general virology*, 86(8), 2339-2346.

Raghu, H., Sharma-Walia, N., Veetil, M. V., Sadagopan, S., Chandran, B. 2009. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells. *Journal of virology*, 83(10), 4895-4911.

Reed, L. G., Muench, H. 1938. Measurement of viruses by end-point dilution assay. *Am. J. Hygiene*, 27, 493-497.

Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Forstová, J. 2001. Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *Journal of virology*, 75(22), 10880-10891.

Rintoul, D. A., Neungton, N., Silbert, D. F. 1982. Isolation and characterization of filipin-resistant LM cell variants not auxotrophic for sterol. *Journal of lipid research*, 23(3), 405-409.

- Roberts, R. J., Pearson, M. D. 2005. Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases*, 28(7), 383-390.
- Rotblat, B., Ehrlich, M., Haklai, R., Kloog, Y. 2008. The Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid (Salirasib) disrupts the spatiotemporal localization of active Ras: a potential treatment for cancer. *Methods in enzymology*, 439, 467-489.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., Anderson, R. G. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68(4), 673-682. Lisanti, M. P., Tang, Z., Sargiacomo, M. (1993).
- Rothenberger, S., Iacopetta, B. J., Kühn, L. C. 1987. Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. *Cell*, 49(3), 423-431.
- Rust, M. J., Lakadamyali, M., Zhang, F., Zhuang, X. 2004. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nature structural molecular biology*, 11(6), 567-573.
- Saeed, M. F., Kolokoltssov, A. A., Albrecht, T. and Davey, R. A. 2010. Cellular entry of Ebolavirus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLOS Pathog.* 6, e1001110.
- Sanders, L.C., Matsumura, F., Bokoch, G.M. de Lanerolle, P. 1999. Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283, 2083-2085.
- Sano, M., Kamato, N., Fukuda, H., Saneyoshi, M. Sano, T. 1992. Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA segment A). *Journal of Fish Disease* 15, 283-293.
- Santi, N., Vakharia, V.N. Evensen, Ø. 2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 322, 31-40.
- Santi, N., Song, H., Vakharia, V. N., Evensen, Ø. 2005. Infectious pancreatic necrosis virus VP5 is dispensable for virulence and persistence. *Journal of virology*, 79(14), 9206-9216.
- Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E., Allard, J. 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *The Journal of cell biology*, 127(5), 1217-1232.

- Schroeder, F., Holland, J. F., Bieber, L. L. 1971. Fluorometric evidence for the binding of cholesterol to the filipin complex. *The Journal of antibiotics*, 24(12), 846-849.
- Servicio Nacional de Pesca, Departamento de Salud Animal, Subdirección Nacional de Acuicultura. 2016. Informe Sanitario Salmoniculturas en Centros Marinos 2015.
- Shivappa, R.B., Song, H., Yao, K., Aas-Eng, A., Evensen, Ø., Vakharia, V.N. 2004. Molecular characterization of Sp serotype strains of infectious pancreatic necrosis virus exhibiting differences in virulence. *Diseases of Aquatic Organisms* 61, 23-32.
- Sieczkarski, S.B., Brown, H.A., Whittaker, G.R. 2003. Role of protein kinase C beta1 in influenza virus entry via late endosomes. *J Virol* 77, 460-469.
- Smail, D. A., Bain, N., Bruno, D. W., King, J. A., Thompson, F., Pendrey, D. J., Cunningham, C. O. 2006. Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification, histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *Journal of fish diseases*, 29(1), 31-41.
- Smith, A. E., Helenius, A. 2004. How viruses enter animal cells. *Science*, 304(5668), 237-242.
- Somogyi, P., Dobos, P. 1980. Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of virology*, 33(1), 129-139.
- Song, H., Santi, N., Evensen, Ø., Vakharia, V. N. 2005. Molecular determinants of infectious pancreatic necrosis virus virulence and cell culture adaptation. *Journal of virology*, 79(16), 10289-10299.
- Subsecretaria de Pesca y Acuicultura, 2017. Informe sectorial de Pesca y Acuicultura.
- Swanson, J. A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(8), 639.
- Swanson, R. N., Gillespie, J. H. 1982. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from the blood and blood components of experimentally infected trout. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(1), 225-228.
- Tapia, D., Eissler, Y., Torres, P., Jorquera, E., Espinoza, J. C., Kuznar, J. 2015. Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in

Chile. *Diseases of aquatic organisms*, 116(3), 173-184.

Toranzo AE, Metricic FM. 1982. Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine, and marine waters. *J. Fish Dis.* 5:223–231.

van der Schaar, H. M., Rust, M. J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X., Smit, J. M. 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS pathogens*, 4(12), e1000244.

Vasquez, R. J., Howell, B., Yvon, A. M., Wadsworth, P., Cassimeris, L. 1997. Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Molecular biology of the cell*, 8(6), 973-985.

Veltman, D. M., Williams, T. D., Bloomfield, G., Chen, B. C., Betzig, E., Insall, R. H., Kay, R. R. 2016. A plasma membrane template for macropinocytic cups. *Elife*, 5, e20085.

Villanueva, R. A., Galaz, J. L., Valdés, J. A., Jashés, M. M., Sandino, A. M. 2004. Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of virology*, 78(24), 13829-13838..

Walker, E. H., Pacold, M. E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P. T., Wymann, M. P., Williams, R. L. 2000. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular cell*, 6(4), 909-919.

Wang, J. T., Kerr, M. C., Karunaratne, S., Jeanes, A., Teasdale, R. D. 2010. The SNX-PX-BAR family in macropinocytosis: the regulation of macropinosome formation by SNX-PX-BAR proteins. *PLoS One*, 5(10), e13763.

Wang, L.H., Rothberg, K.G., and Anderson, R.G. 1993. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 123: 1107–1117.

Yamabhai, M., Hoffman, N. G., Hardison, N. L., McPherson, P. S., Castagnoli, L., Cesareni, G., Kay, B. K. 1998. Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31401-31407.

Yamauchi, Y., Helenius, A. 2013. Virus entry at a glance. *Journal of cell science*, 126(6), 1289-1295.

Ye, C., Han, X., Yu, Z., Zhang, E., Wang, L., Liu, H. 2017. Infectious Bursal

Disease Virus Activates c-Src To Promote $\alpha 4\beta 1$ Integrin-Dependent Viral Entry by Modulating the Downstream Akt-RhoA GTPase-Actin Rearrangement Cascade. *Journal of virology*, 91(3), e01891-16.

Yip, C. W., Hon, C. C., Zeng, F., Leung, F. C. C. 2012. Cell culture-adapted IBDV uses endocytosis for entry in DF-1 chicken embryonic fibroblasts. *Virus research*, 165(1), 9-16.

Yoshida, S., Gaeta, I., Pacitto, R., Krienke, L., Alge, O., Gregorka, B., Swanson, J. A. 2014. Differential signaling during macropinocytosis in response to M-CSF and PMA in macrophages. *Frontiers in physiology*, 6, 8-8.

Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., Tashiro, Y. 1991. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H (+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17707-17712.