UNIVERSIDAD DE LEÓN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Cultivos celulares para el desarrollo de vacunas DNA frente a virus de peces utilizando el modelo trucha arco iris / rhabdovirus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV)

Programa de Doctorado de Sanidad Animal y Reproducción

Memoria presentada por **Neila Alvarez de Haro**
para optar al grado de Doctor.

León, enero de 2015

Los trabajos de investigación de esta Tesis Doctoral han sido cofinanciados por el Ministerio de Ciencia e Innovación mediante ayudas para los proyectos del Plan Nacional de I+D+i 2008-2011 titulados **"Nuevas estrategias de vacunación DNA frente a virus de peces utilizando el modelo trucha arcoíris/rhabdovirus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV)"** (ref. AGL2008-03519-C04-04) y **"Mejora de las vacunas DNA trucha/VHSV y transferencia del conocimiento a otras especies de peces y virus"** (ref. AGL2011-28921-C03-02). La autora ha sido beneficiaria de una ayuda predoctoral del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador (Ministerio de Ciencia e Innovación/ Economía y Competitividad) durante los años 2009 – 2013 (ref. BES-2009-027613).

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Los Drs. D. Alberto José Villena Cortés y Dª Mª Pilar López Fierro, como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Cultivos celulares para el desarrollo de vacunas DNA frente a virus de peces utilizando el modelo trucha arco iris / rhabdovirus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV)”, realizada por Dª. Neila Álvarez de Haro en el programa de doctorado Sanidad Animal y Reproducción, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, en León a 5 de enero de 2015

Fdo. Alberto José Villena Cortés

Fdo. Mª Pilar López Fierro

Agradecimientos. Acknowledgements

Ahora que me siento a escribir las últimas líneas de esta Tesis, son muchos los nombres de personas que me vienen a la cabeza, a quienes tengo que agradecerles su ayuda, conocimientos y apoyo para que este trabajo saliera adelante de la mejor manera posible.

En primer lugar, quiero agradecer a los directores de este trabajo, el Dr. Alberto José Villena Cortés y la Dra. María Pilar López Fierro, el haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral integrándome en su grupo de investigación, así como la confianza depositada en mí para llevarla a cabo. Agradecerles especialmente su dedicación y la revisión de este trabajo en la recta final desde la distancia.

A la Dra. Blanca Razquin Peralta, miembro del grupo de investigación por su visión crítica y buena disponibilidad para resolver dudas y sugerencias.

A las que fueron mis compañeras, y ahora también amigas, la Dra. Camino Fierro Castro, que me ayudó a dar los primeros pasos en el mundo de los peces y la Inmunología, y a la Dra. Leticia Barrioluengo Pérez, de quien aprendí mucho más que a extraer macrófagos y hacer PCRs.

A mis compañeras y compañeros becarios de Biología Celular, que me han enseñado que lo más importante es el compañerismo entre los becarios. A las que ya se fueron, como Irene, Sera, Laura, Rosalía, que marcaron el camino a seguir. A las que llegaron nuevas, Irene, Quique, Paloma y Marta "alevín", por traer alegría renovada al despacho y recordarme la ilusión del que comienza. Y como no, a las que se quedan: Cris, Silvia (Silvi), Berta (Bertins), María (Meri), por estar ahí siempre, por ser unas compis de despacho excelentes, y por ayudarme en tantas ocasiones. A las "chicas de Carmen Marín", Marta y Sandra, por su ayuda y buena disposición siempre que me he "paseado" por Biomedicina. A Marta "moño" y David, que a pesar de haber coincidido pocos meses en el Departamento, han sido muy buenos compañeros. A Diego, por su inestimable ayuda en todo y en todo momento, y a quien, con gusto, le cedo el testigo.

Quiero agradecer, y no menos que al resto, a todo el profesorado, personal investigador y personal técnico (Marta y María) del Área de Biología Celular, por hacer de él un lugar de trabajo inolvidable y que, en estos cinco años, me haya sentido como en casa.

Agradecer especialmente a la Dra. Amparo Estepa Pérez, del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, por haberme

acogido tan bien en su laboratorio en las diversas ocasiones a lo largo de estos años. De esas estancias siempre salieron muy buenas ideas y aún mejores resultados para el desarrollo de esta Tesis Doctoral. A mis compañeras del Laboratorio de Virología de Peces (María del Mar, Alicia, Pablo, Reglita, Beatriz), así como a los doctores Verónica Chico y Luís Pérez, por sus enseñanzas en el manejo de los virus, su ayuda en todo momento y tratarme como a una más desde el primer día. Y a todo el personal del IBMC-UMH, por facilitar mis estancias allí.

Al Dr. Julio Coll y a la Dra. Carolina Tafalla, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, investigadores del proyecto Rhabdovac, así como a las becarias de sus respectivos laboratorios, les agradezco sinceramente su colaboración.

Mein großer Dank gilt Dr. Uwe Fischer am Friedrich-Loeffler Institut, Institut für Infektionsmedizin, Insel Riems (Deutschland), der mir nicht nur den Eintritt in sein Labor ermöglicht hat, sondern mich auch in seinem Haus herzlich empfangen hat. Ich bin für seine Unterstützung, Beratung und nicht zuletzt für die Projektleitung sehr dankbar. Mein Dank gilt auch Helga Noack und Susann Schares, die mir die Arbeit im Labor erleichtert haben. To my colleagues at F.L.I., Verónica Soto-Lampe and Takuya Yamaguchi-san, for their priceless help in the Lab, and the great moments out of it. Auch Dr. Bernd Köllner, Dr. Dieter Fiechtner und Dr. Sven Bergmann, und allen Mitarbeitern im Labor und am F.L.I. möchte ich herzlich danken.

Y a todas las personas de fuera del ámbito académico, que han compartido conmigo estos años, se han preocupado por saber cómo me iba y han vivido esta Tesis como si fuera propia, especialmente a mis padres, a mi hermano y a Simon, porque me sobran los motivos.

Índice

INTRODUCCIÓN GENERAL **1**
1. LA ACUICULTURA EN EL SIGLO XXI 3
1.1. Situación de la acuicultura a nivel mundial 3
1.2. Situación actual en la Unión Europea 4
1.3. Situación de la acuicultura en España 5
2. CULTIVO DE TRUCHA ARCOÍRIS 5
3. ACUICULTURA Y ENFERMEDADES VÍRICAS 8
3.1. Epidemiología de la VHS 8
3.2. Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) 14
4. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A LAS INFECCIONES VIRALES 16
4.1. Respuesta inmunitaria innata 16
4.2. Respuesta inmunitaria adaptativa 26
5. VACUNAS FRENTE A RHABDOVIRUS DE PECES 30
5.1. Vacunas inactivadas 30
5.2. Vacunas recombinantes con componentes antigénicos 31
5.3. Vacunas vivas atenuadas 31
5.4. Inmunización génetica: vacunas DNA 33
JUSTIFICACIÓN, PROPÓSITO Y OBJETIVOS **37**
CAPÍTULO I **43**
1. INTRODUCCIÓN 45
2. MATERIAL Y MÉTODOS 47
2.1. Animales 47
2.2. Obtención de cultivos primarios a partir de explantes de aleta 48
2.3. Subcultivo de células de aleta 49
2.4. Criopreservación 50
2.5. Curva de crecimiento 51
2.6. Caracterización de las líneas celulares 51
2.7. Extracción de RNA y síntesis de cDNA 53
2.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 54
2.9. Ensayos de transfección 56
2.10. Análisis estadístico 57
3. RESULTADOS 57
3.1. Establecimiento de cultivos celulares de aleta 57
3.2. Evolución de las líneas celulares 60
3.3. Curva de crecimiento de la línea J86 62
3.4. Viabilidad tras la criopreservación 63
3.5. Caracterización de la línea J86 64
3.6. Expresión basal de genes reguladores de la respuesta inmunitaria 65
3.7. Ensayos de transfección y expresión de GFP 67
4. DISCUSIÓN 68
CAPÍTULO II **73**
1. INTRODUCCIÓN 75

2. MATERIAL Y MÉTODOS 77
2.1 Líneas celulares 77
2.2 Virus 77
2.3 Infección de los cultivos celulares 78
2.4 Titulación viral 78
2.5 Inmunoestimulación de las células J86 79
2.6 Inmunocitoquímica 79
2.7 Extracción de RNA 82
2.8 Síntesis de cDNA 82
2.9 PCR a tiempo real 83
2.10 Análisis estadístico 85
3. RESULTADOS 85
3.1. Susceptibilidad de la línea celular J86 de aleta de trucha arcoíris a virus de peces 85
3.2. Estudio de la infección viral temprana en la línea J86 de aleta de O. mykiss 87
3.3. Expresión de genes relacionados con la respuesta antiviral e inmunitaria tras la exposición a poli I:C o la infección con VHSV 91
4. DISCUSIÓN 109
CAPÍTULO III 119
1. INTRODUCCIÓN 121
2. MATERIAL Y MÉTODOS 124
2.1. Línea celular 124
2.2. Construcciones plasmídicas 124
2.3. Virus 124
2.4. Procedimientos de transfección 125
2.5. Inmunofluorescencia 126
2.6. Microscopía de fluorescencia 127
2.7. Citometría de flujo 128
2.8. Infección de los cultivos celulares 128
2.9. Ensayo de fusión 129
2.10. Extracción de RNA 129
2.11. Retrotranscripción 130
2.12. PCR a tiempo real 130
2.13. Tratamiento estadístico 131
3. RESULTADOS 131
3.1. Ensayos de transfección por la electroporación 131
3.2. Expresión de gpG en la línea J86 134
3.3. Funcionalidad de la proteína codificada por los plásmidos 135
3.4. Efecto de la expresión de gpG en la modulación de genes y mediadores relacionados con la respuesta inmunitaria 136
4. DISCUSIÓN 141
DISCUSIÓN GENERAL 149
CONCLUSIONES 163
BIBLIOGRAFÍA 167

Abreviaturas

ACPH: fosfatasa ácida

AKPH: fosfatasa alcalina

ANAE: α-naftil acetato esterasa inespecífica

BSA: albúmina sérica bovina

DAB: 3-3' diaminobencidina

DMSO: dimetil sulfóxido

dNTP: desoxinucleotidos trifosfatos

dsRNA: RNA bicatenario

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EPC: línea celular derivada de piel de *Pimephales promelas*

FCS: suero fetal bovino

GFP: proteína verde fluorescente

gpG: glucoproteína G

IFN: interferón

IHNV: virus de la necrosis hematopoyética infecciosa

IL: interleuquina

iNOS: enzima óxido nítrico sintasa inducible

IPNV: virus de la necrosis pancreática infecciosa

J86: línea celular derivada de aleta de *O. mykiss*

LPS: lipopolisacárido

MHC: complejo principal de histocompatibilidad

MOI: multiplicidad de infección

NCCs: células citotóxicas no específicas

NK: células citotóxicas naturales

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Poli I:C: ácido polinosínico - policitidílico

PRRS: receptores de reconocimiento de patrón

RT: retrotranscripción

RTG-2: línea celular derivada de gónada de *O. mykiss*

RTS-11: línea celular derivada de monocito/macrófago de *O. mykiss*

TCR: receptores de linfocitos T

TLRs: Receptores tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

VHSV: virus de la septicemia hemorrágica viral

Introducción general

Introducción general

1. La acuicultura en el siglo XXI

En un mundo globalizado inmerso en una vorágine de continuos cambios, en el que los recursos naturales y las fuentes de obtención de alimentos son limitados y con una población en crecimiento exponencial, sobre todo en países en vías de desarrollo, la alimentación se ha vuelto un reto de primer orden para la humanidad. Las previsiones de la Organización para la Agricultura y la Alimentación de Naciones Unidas (FAO) apuntan a que la producción mundial de alimentos debe crecer un 70% entre 2010 y 2050 para hacer frente a este aumento de la población, que también lleva aparejados cambios en la dieta relacionados con los incrementos en la renta de los países y la creciente transformación del medio rural en un medio cada vez más urbanizado. Por ello, es necesario buscar alternativas en lo referente a la producción de alimentos y obtener el mayor provecho posible de los recursos naturales de una manera sostenible que garantice el abastecimiento de la población.

En este contexto de globalización, la acuicultura, definida por la FAO como "la cría de organismos acuáticos como los peces, moluscos, crustáceos y las plantas acuáticas", cobra una gran importancia ya que es la producción animal intensiva con mayor proyección de futuro. Esto es debido a que el 70% de la superficie del planeta está cubierta por agua y que los animales acuáticos tienen un índice de conversión y tasas de reproducción superiores a los de los terrestres.

1.1. Situación de la acuicultura a nivel mundial

La importancia de esta actividad como motor de desarrollo socioeconómico y como fuente productora de alimentos de calidad, así como su impacto en la economía mundial son crecientes, dado que el valor de la producción en 2012 fue de 144.400 millones de dólares y se estima da empleo actualmente a más de 18 millones de personas en el mundo (FAO, 2014).

Según el informe SOFIA 2014 de la FAO, del total de los alimentos de origen acuático consumidos a nivel mundial más de la mitad procede de instalaciones acuícolas (Fig. 1), y antes de 2030 más del 65% de los alimentos de origen acuático procederán de la acuicultura.

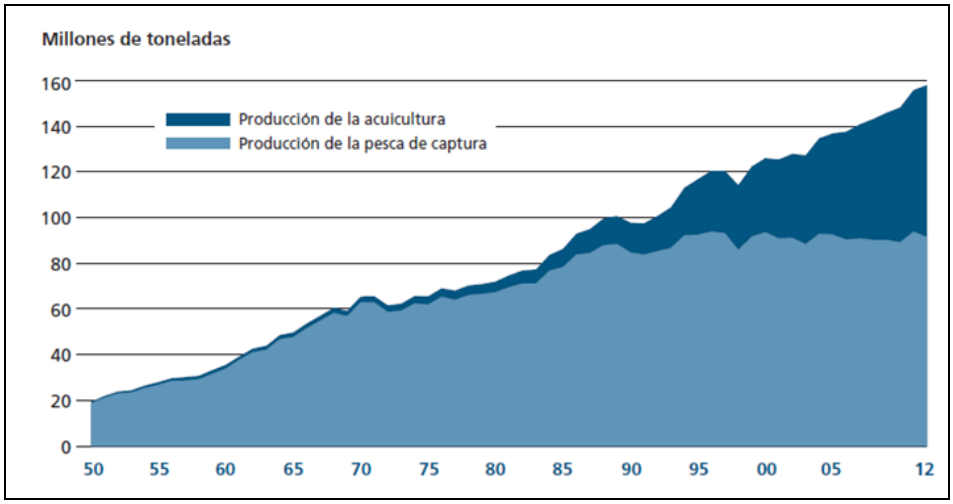

Fig. 1. Evolución de la producción de la acuicultura y pesca mundial en el periodo 1951-2012 (FAO, 2014).

Los productos acuícolas son actualmente una de las fuentes más importante de proteína y nutrientes esenciales de origen animal, representando el 30% del total de la proteína consumida en los países en vías de desarrollo y el 15% en Europa y Norteamérica. El consumo mundial de productos acuícolas (excluyendo algas) ha aumentado desde los años 60, pasando de 9 kg a alrededor de los 19 kg por persona y año, si bien hay diferencias entre los países de regiones desarrolladas y los que están en vías de desarrollo (FAO, 2014).

En cuanto a los países productores, el mayor productor mundial de acuicultura es China, con 58 millones de toneladas de producción en 2012, según las últimas estadísticas de la FAO, y destaca el decrecimiento observado en los países asiáticos como Indonesia, India y Vietnam por motivos como desastres ambientales y aparición de brotes de enfermedad (FAO, 2014).

En su informe sobre el estado mundial de la pesca y la acuicultura de 2014, la FAO ha constatado que en el mundo se cultivan más de 567 especies acuáticas diferentes entre peces, moluscos, crustáceos, algas y otros. Esta diversidad se debe a la riqueza en especies del medio acuático, a la buena adaptabilidad de estos organismos a los sistemas de producción controlada y a la continua innovación en el sector. La principal especie de peces cultivada es la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) con 5,3 millones de toneladas, aunque el cultivo más extendido es la cría de tilapia, en particular la Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

1.2. Situación actual en la Unión Europea

La importancia de la acuicultura no es igual en todos los países miembros, siendo su relevancia económica y social en algunos de ellos superior a la de la pesca.

Los principales productos de la acuicultura son pescados y moluscos. La especie con mayor producción es el mejillón (466.995 toneladas), de la que se producen dos especies, el común (*Mytilus edulis*) y el mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) (ESACUA 2014).

El informe anual de 2014 de la Federación Europea de Productores de Acuicultura (FEAP) establece que el consumo de pescado per capita en la UE es de 25 kg. La principal especie de pescado de crianza producido en la Unión Europea es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), de la que en 2013 se produjeron 239.040 Tn, seguida del salmón atlántico (*Salmo salar*), con 165.378 Tn, y la tercera la dorada (*Sparus aurata*) con 110.087 Tn. En total se han producido 625.201 toneladas de pescado procedente de la acuicultura en la Unión Europea (FEAP, 2014a).

De acuerdo con las estadísticas aportadas por los estados miembros, el principal productor de pescado en 2013 fue Reino Unido, con 166.741 Tn, siendo las principales especies criadas el salmón atlántico y la trucha arcoíris. El segundo país productor dentro de la Unión es Grecia, con 125.742 Tn mayoritariamente de lubina y dorada (FEAP, 2014a).

1.3. Situación de la acuicultura en España

España es el tercer país productor de la Unión Europea, que con 55.694 toneladas de pescado y 307 millones de euros aporta el 9,2% de la producción y el 8,8% del valor total de la piscicultura comunitaria (FEAP, 2014b).

Según recientes estadísticas del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, la producción de la acuicultura en España en 2013 supuso un total de 249.240 toneladas que incluían peces, moluscos y crustáceos. La principal especie cultivada fue el mejillón (*M. galloprovincialis*), del que se cultivaron 188.944 toneladas. En relación con la acuicultura de peces, las tres especies principales fueron la dorada (16.335 Tn), la trucha arcoíris (14.774 Tn) y la lubina (14.455 Tn) (Fig. 2) (MAGRAMA 2014, base de datos en línea [consulta: 18-11-2014]).

2. Cultivo de trucha arcoíris

La trucha arcoíris, *O. mykiss*, es una especie de la familia de los Salmónidos originaria de los ríos de Norteamérica que desembocan en las costas del Pacífico (Fig. 3).

Fue introducida en Europa durante la segunda mitad del siglo XIX con fines recreativos, deportivos y, dada su buena respuesta al cultivo intensivo, principalmente para la acuicultura.

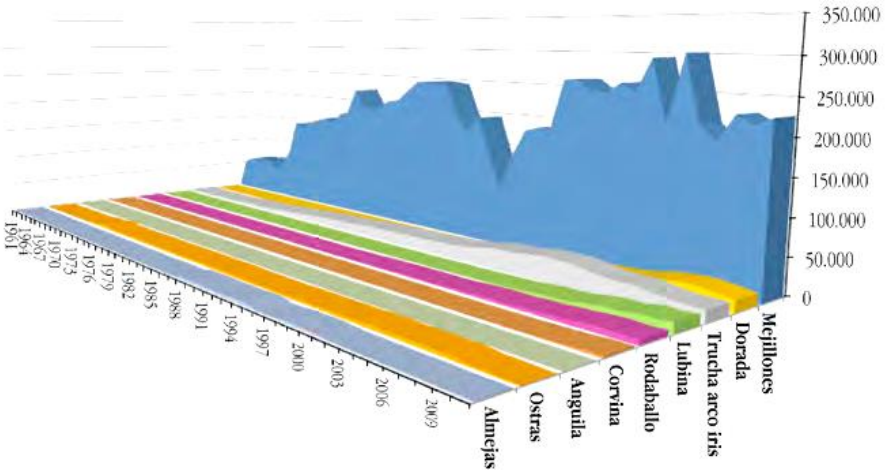

Fig. 2. Evolución de la producción de las principales especies cultivadas en España en los últimos 50 años (imagen tomada de ESACUA 2014).

Las principales características de esta especie, que la hacen tan rentable para su cultivo intensivo en cautividad, son su alto índice de supervivencia, fácil disponibilidad de reproductores y de huevos obtenidos por sistemas de reproducción artificial, rápida tasa de crecimiento alcanzando en alrededor de los 12 meses la talla de mercado (400-650 g), adaptabilidad a un amplio rango de temperaturas que van desde los 2°C a los 15°C para su cría, aunque también soporta temperaturas de hasta 28°C.

Presentan un cuerpo alargado, generalmente es de color verdoso o amarillento con una característica línea lateral ribeteada de rosa en cada lado, vientre aclarado y un característico punteado negro dorsolateral y en las aletas. Esta coloración puede variar según la época y el estado fisiológico. La cabeza es pequeña con mandíbulas fuertes y opérculo muy marcado. En los machos la mandíbula inferior se va curvando hacia arriba con la edad en forma de gancho. Posee un pliegue sobre la línea dorsomedial, a modo de aleta, desprovisto de radios llamado aleta adiposa. Tiene escamas pequeñas y aletas sin radios duros.

Fig. 3. Ejemplar adulto de trucha arcoíris. Imagen tomada de *Truchas y su cultivo* <http://truchasysucultivo-catita.blogspot.com.es> [Consulta: 27-10-2014].

Según el informe SOFIA 2014 de la FAO, actualmente se cultiva en 19 países diferentes distribuidos por todo el mundo. Los principales productores son Chile, Irán, Turquía y Noruega. España ocupa el décimo puesto de producción a nivel mundial, por detrás de Italia, Francia, Dinamarca, Perú y China. En cuanto al sistema productivo, a pesar de que la trucha arcoíris es un pez de aguas continentales, el 36% de la producción mundial se realiza en agua salada, como es el caso de Chile, Noruega o Dinamarca. Durante 2011 la producción acuícola mundial de *O. mykiss* ha sido de 770.385 toneladas, según estadísticas de FAO (FAO 2014).

La producción de trucha arco iris en España en 2013 fue 14.774 toneladas (MAGRAMA 2014, base de datos en línea [consulta: 27-10-2014]) (Fig. 4).

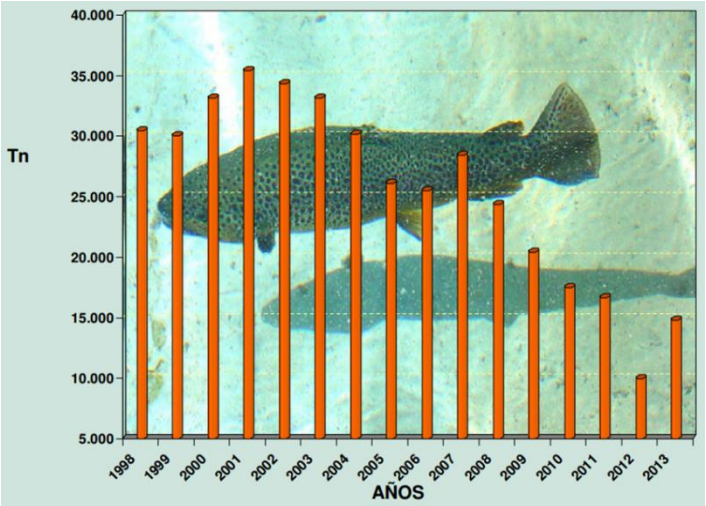

Fig. 4. Evolución de la producción acuícola nacional de trucha arcoíris en el periodo entre 1998 y 2013. Gráfico tomado del *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente* <http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/> [Consulta: 27-10-2014].

Por comunidades autónomas, en el año 2013 Castilla y León encabezó la producción nacional, con 5.845 Tn, seguida de Galicia con 2.616 Tn, repartiéndose el 50% de la producción. Le siguieron Andalucía y Cataluña, y con producciones inferiores a las 1.000 Tn La Rioja, Castilla la Mancha, Asturias y Aragón, y a mayor distancia por Cantabria, Navarra y País Vasco (MAGRAMA 2014, base de datos en línea [consulta: 27-10-2014]).

Según los datos del Panel de Consumo de la Dirección General de la Industria Alimentaria, en los hogares españoles se consumieron 14.653 kilos de trucha en 2012, un 8,4% más que en 2011, con un valor de venta al público fue de 80 millones de euros.

3. Acuicultura y enfermedades víricas

La aparición de enfermedades infecciosas es inherente al proceso de domesticación e intensificación de la producción animal, y es uno de los mayores problemas a los que se enfrenta esta industria con alto índice productivo.

De acuerdo con la Organización Internacional de Epizootías (OIE), las enfermedades virales son las más devastadoras para la acuicultura, dado que producen grandes pérdidas y suponen un problema a considerar puesto que no hay tratamientos disponibles frente a ellas. La O.I.E. establece en su lista de enfermedades de los peces la declaración obligatoria de diez enfermedades infecciosas y parasitarias, de las cuales ocho son víricas (OIE, 2014a).

En la Unión Europea, la actividad de las granjas de acuicultura está sujeta a la Directiva Europea 2006/88/EC, incorporada a la normativa española a través del Real Decreto 526/2014, que regula los aspectos relacionados con la sanidad de los animales producidos y sus productos derivados, así como también regula la prevención y control de determinadas enfermedades infecciosas. Bajo esta directiva se regula la declaración obligatoria a las autoridades veterinarias competentes de cualquier brote o la sospecha de enfermedad de anemia infecciosa del salmón (ISA), septicemia hemorrágica viral (VHS), necrosis hematopoyética infecciosa (IHN), herpesvirosis de la carpa Koi (KHV) y necrosis hematopoyética epizoótica (EHN).

3.1. Epidemiología de la VHS

Entre todos los virus que afectan a los peces teleósteos, los rhabdovirus constituyen uno de los grupos más numerosos y son los causantes de grandes pérdidas en la producción y, por lo tanto, a su vez económicas, ya que afectan tanto a peces en sus primeros estadios del desarrollo como a peces en fase adulta (OIE, 2014b).

Una de las enfermedades más importantes para la acuicultura es la septicemia hemorrágica viral (VHS) causada por el rhabdovirus de la VHS (VHSV). Esta enfermedad, cuyos brotes presentan una distribución mundial (Fig. 5), es una de las patologías virales más importantes de salmónidos cultivados (Olesen, 1998; Skall et al. 2005), siendo la trucha arcoíris uno de los principales hospedadores del virus, en la que el VSHV puede causar graves brotes de la enfermedad (Raja-Halli et al., 2006; Dale et al. 2009; Toplak et al. 2010). Sin embargo, esta enfermedad también puede afectar a muchas otras especies de peces marinos y de agua dulce, habiéndose detectado en 80 especies diferentes en el hemisferio norte (OIE, 2014b).

Se han notificado brotes naturales de VHS en piscifactorías de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) en Escocia (Ross et al. 1994), brotes en platija del Japón

(*Paralichthys olivaceus*) tanto de piscifactoría (Isshiki et al. 2001) como salvaje (Takano et al. 2000). También se han observado grandes mortalidades por infección natural en especies de peces marinos silvestres, como el arenque del Pacífico (*Clupea pallasi*), la merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) y el abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) a lo largo de la costa del Pacífico de Norteamérica (Meyers, et al. 1999). Asimismo, se han producido brotes en especies silvestres de agua dulce de interés en la región de los Grandes Lagos de Norteamérica, tales como el muskallonga americano (*Esox masquinongy*) en el Lago Saint Clair (Elsayed et al. 2006), gobis (*Neogobius melanostomus*) en el Lago Ontario y río Saint Lawrence (Groocock et al. 2007) y corvina de agua dulce (*Aplodinotus grunniens*) en el Lago Ontario (Lumsden et al. 2007).

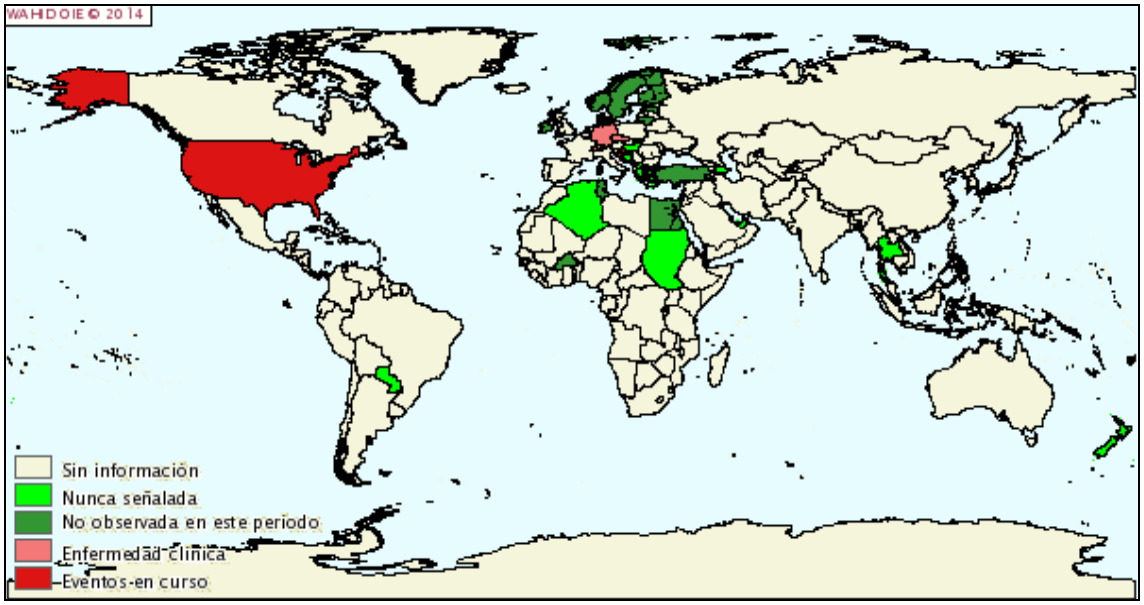

Fig. 5. Mapa de distribución mundial de los focos reportados de septicemia hemorrágica viral durante el primer semestre de 2014. Imagen tomada de la base de datos del sistema mundial de información zoosanitaria (WAHID), *Organización Internacional de Epizootías* <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home> [Consulta: 27-10-2014].

También se ha demostrado experimentalmente la susceptibilidad de especies de agua dulce autóctonas de Japón como el medaka común (*Oryzias latipes*), el cótido *Cottuss pollux*, góbidos de las especies de *Rhinogobius*, el ciprínido *Gnathopogon caerulescens*, el amblicipítido *Liobagrus reinii*, la locha rayada japonesa (*Cobitis biwae*) y el salmónido *Salvelinus leucomaenis pluvius* (Ito and Olesen, 2013).

En Europa se han citado durante el primer semestre de 2014 brotes de enfermedad clínica en Alemania, Suiza, Liechtenstein y República Checa, y actualmente Croacia mantiene el estatus sanitario oficial de enfermedad en curso (Fig. 6).

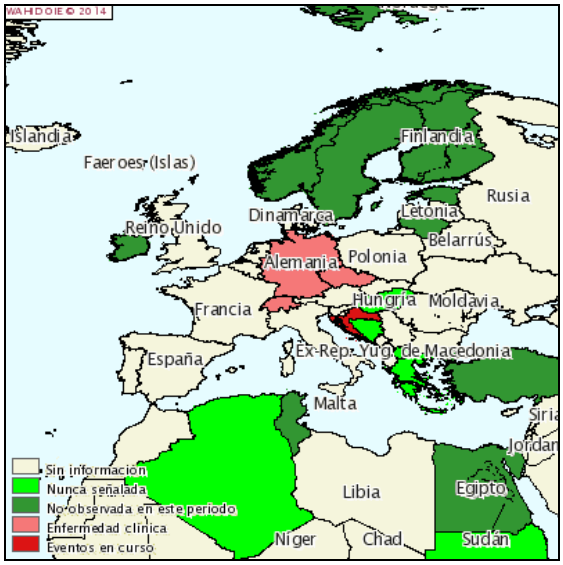

Fig. 6. Mapa de distribución de los focos reportados de VHS en Europa y cuenca del Mediterráneo durante el primer semestre de 2014. Imagen tomada de WAHID, *Organización Internacional de Epizootías* <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home> [Consulta: 27-10-2014].

Un factor de gran importancia en la epidemiología de la enfermedad es la existencia de animales persistentemente infectados (Goodwin and Merry, 2011). Los animales que sobreviven a la infección pueden convertirse en animales con enfermedad subclínica y por tanto diseminar el virus a través de fluidos corporales (Oidtmann et al. 2011). Esto tiene gran importancia para la prevalencia de la enfermedad, ya que se ha demostrado la transmisión del virus de animales silvestres a animales en sistemas de producción acuícola (Garver et al. 2013).

3.1.1. Virus de la septicemia hemorrágica viral

El VHSV pertenece al género *Novirhabdovirus*, la partícula viral tiene la característica forma de bala de los rhabdovirus y su estructura consta de una envoltura viral y una nucleocápsida interna con simetría helicoidal (Fig. 7). La envoltura está formada por una bicapa lipídica derivada de la membrana de la célula hospedadora. La nucleocápsida contiene una única molécula de RNA monocatenario de 11.1 kilobases, de polaridad negativa (Gómez-Casado et al. 2011).

Su genoma contiene cinco genes (*L*, *N*, *P*, *M*, G) que codifican para 5 proteínas estructurales y un gen que codifica para una proteína no estructural (proteína Nv) implicada en la patogenicidad del virus y en la replicación viral *in vitro* (Choi et al. 2011). La proteína L es la RNA polimerasa viral dependiente de RNA. La proteína N forma parte de la nucleocápsida, está asociada al RNA viral y es la proteína mayoritaria del virus (Gómez-Casado et al. 2011). P es una fosfoproteína asociada a

la RNA polimerasa viral con función de chaperona y M es la proteína de la matriz que une la envoltura con la nucleocápsida (Ivanov et al. 2011).

La glucoproteína G (gpG) es la proteína de superficie y forma espículas triméricas que protruyen de la membrana del virus. Esta proteína es responsable de la unión del virus a su receptor y media la fusión entre la envoltura viral y las membranas celulares (Albertini et al. 2012), además es la única capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes en el huésped (Lorenzen et al. 1990), por lo que tiene utilidad para la inmunización de los peces frente a la enfermedad (Heppell et al. 1998).

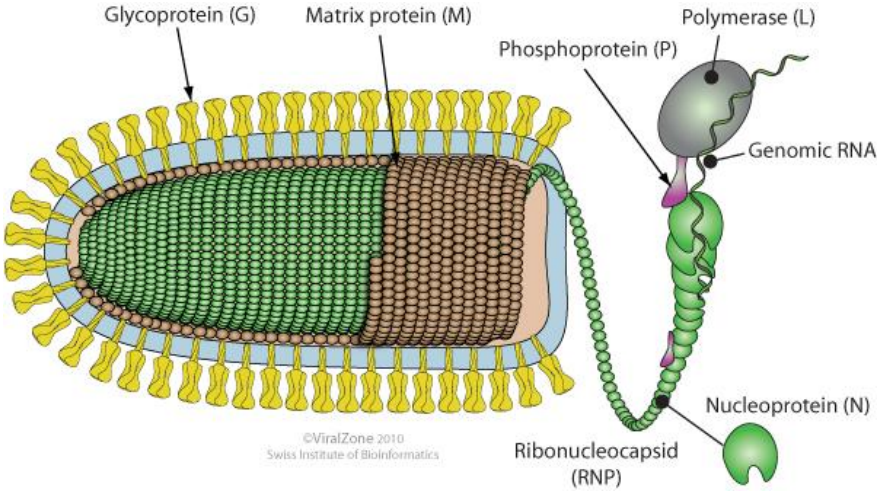

Fig. 7. Esquema representativo de la estructura del virión de VHSV, con su característica forma de bala, que mide aproximadamente 75 nm de diámetro y 180 nm de longitud. Imagen tomada del *Instituto Suizo de Bioinformática* <http://viralzone.expasy.org/> [Consulta: 27-10-2014].

En base a análisis filogenéticos de la gpG y de otras secuencias proteicas a partir de diferentes aislados virales, se han establecido 4 genotipos que difieren en 4-6% de sus secuencias de nucleótidos (Gómez-Casado et al. 2011):

- Genotipo I: comprende los sublinajes Ia hasta Ie, que contienen cepas europeas de agua dulce, cepas de la zona del Mar Negro, y un grupo de cepas marinas (sublinaje Ib) del Mar Báltico, los estrechos de Kattegat y de Skagerrak, el Mar del Norte, el Canal de la Mancha y cerca del Cabo Norte, en Noruega. Dado que el genotipo I incluye aislados de peces marinos salvajes, así como cepas que causan mortalidad en trucha arcoíris de Europa continental, se ha sugerido una posible relación entre los tipos de agua dulce y de agua marina (Skall et al. 2005).
- Genotipo II: comprende un grupo de cepas del Mar Báltico.

- Genotipo III: incluye cepas de la parte atlántica del Mar del Norte, desde el Cabo Flemish (López-Vázquez et al. 2006) a la costa noruega (Dale et al. 2009), y los estrechos de Skagerrak y de Kattegat.
- Genotipo IV: pertenecen a este genotipo las cepas de Norteamérica y japonesas/coreanas. Todas las cepas japonesas y otras cepas asiáticas, excepto una que se clasifica en el genotipo Ib europeo tradicional y que se considera introducida (Nishizawa et al. 2002), se clasifican en el genotipo IVa americano. En Norteamérica, se han encontrado dos sublinajes: el genotipo IVa en la costa del Pacífico y el genotipo IVb en la costa del Atlántico y en la zona de los Grandes Lagos (Elsayed et al. 2006).

El VHSV se transmite entre los peces principalmente de forma horizontal a través de la orina y de fluidos ováricos en aguas con temperaturas inferiores a 15°C (Kocan et al. 2001). Durante e inmediatamente después de un brote, el virus se puede aislar fácilmente en cultivo celular, siendo el riñón, el corazón y el bazo los tejidos que dan los títulos víricos más altos (Wolf, 1988).

Una vez dentro del hospedador, el virus se disemina por todo el organismo a través de la sangre y produce una infección sistémica, que inicialmente cursa con petequias y equimosis en piel, musculatura y órganos internos (pronefros y bazo) (Fig. 8). En esta fase inicial, se observa una aparición rápida de mortalidad (que puede alcanzar el 100% de la población en los alevines), letargia, oscurecimiento de la piel, exoftalmia, anemia, hemorragias en la base de las aletas, las branquias, periorbitales y la piel, y una distensión abdominal acompañada de ascitis.

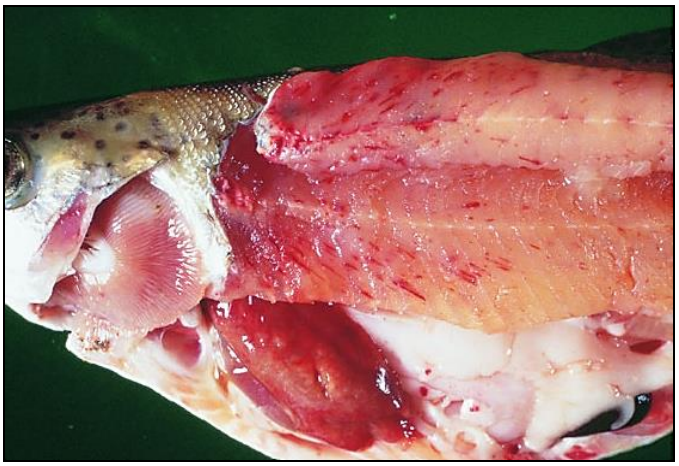

Fig. 8. Necropsia de trucha arco iris con lesiones patognomónicas de septicemia hemorrágica viral. Se observa anemia de branquias, miositis hemorrágica multifocal y petequias en la grasa peritoneal. Imagen tomada del *Departamento de Pesca y Océanos del Gobierno de Canadá* <http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/enviro/aquaculture/rd2013/rdhealth-eng.html> [Consulta: 27-10-2014].

Los estudios iniciales sobre las rutas de transmisión del virus habían propuesto el intestino como el tejido de entrada (Helmick et al. 1995). Sin embargo, los trabajos más recientes refieren a las bases de las aletas como la ruta de entrada al hospedador (Montero et al. 2011a). Trabajos realizados con anterioridad, en los que se infectaron alevines de trucha arcoíris con una cepa recombinante del IHNV, demostraron mediante ensayos de bioluminiscencia la presencia del virus de forma temprana (8 horas posinfección) en la base de las aletas, donde permaneció durante al menos 3 semanas (Harmache et al. 2006).

El mecanismo por el cual VHSV entra en la célula hospedadora tras su unión al receptor celular, de cuyo complejo forma parte la fibronectina (Bearzotti et al. 1999), es la endocitosis mediada por receptor, proceso mediado por la gpG (Albertini et al. 2012). Una vez dentro de la célula, los viriones son transportados hacia los lisosomas dentro del endosoma (Lecocq-Xhonneux et al. 1994). El medio ácido del compartimento endosómico desencadena una serie de cambios conformacionales en la gpG que cataliza la fusión entre la membrana viral y la endosómica (Albertini et al. 2012; Estepa et al. 2001), liberando así la nucleocápsida al citosol, donde se producirá la transcripción y replicación del genoma viral. Finalmente, se forman las nuevas partículas víricas que se liberan por gemación, mediante la cual adquieren su envoltura de la membrana de la célula hospedadora (Fig. 9).

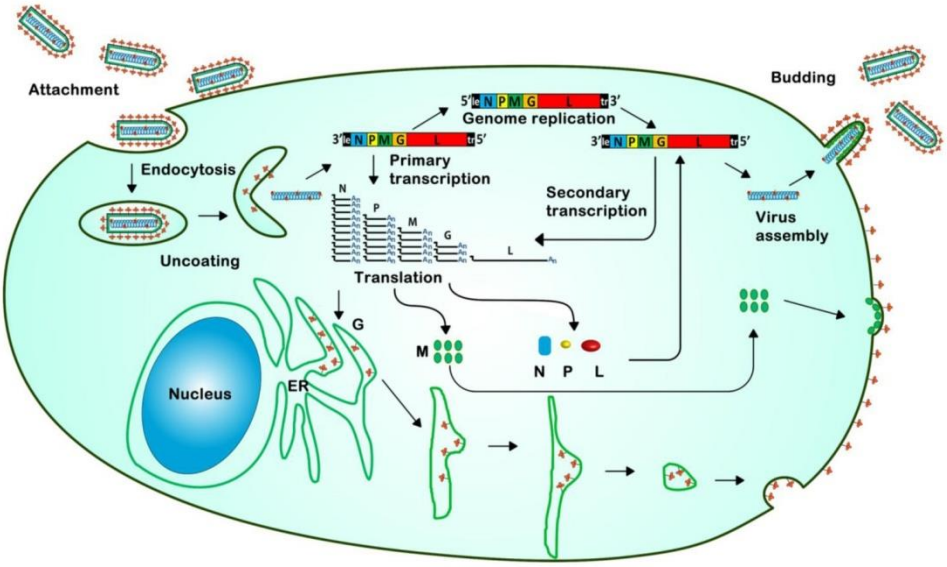

Fig. 9. Esquema representativo del prototipo de ciclo de replicación de un rhabdovirus. El primer paso es la unión al receptor celular y la internalización del virus por endocitosis mediada por receptor. Seguidamente se produce la fusión de membranas y liberación de la nucleocápsida al citosol donde ocurrirá la replicación del genoma viral, la transcripción, traducción a proteínas que serán procesadas para su correcta conformación, y el ensamblaje de los componentes virales. Finalmente la salida de los nuevos virus se producirá por gemación de la membrana, en donde espera anclada la gpG que formará parte de la nueva envoltura viral (Jianrong and Zhang, 2012).

3.2. Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN)

Aunque no es el objeto principal de estudio de esta tesis, en ella hemos utilizado como herramienta de caracterización de la susceptibilidad a la infección viral y de la respuesta inmunitaria el virus causante de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), por lo que se hace una sucinta descripción de la enfermedad y del IPNV.

Esta enfermedad vírica es muy contagiosa para los peces jóvenes de las especies de salmónidos que viven en condiciones de producción intensiva y, especialmente, para salmones juveniles cuando son transferidos de agua dulce al medio marino (Gómez-Casado et al. 2011). La enfermedad es típica de la trucha arcoíris, del salvelino *Salvelinus fontinali*), de la trucha común (*Salmo trutta*), del salmón del Atlántico (*S. salar*) y varias especies de salmones del Pacífico (*Oncorhynchus spp*.). La enfermedad se transmite tanto horizontalmente entre peces, siguiendo el curso de las aguas, como verticalmente por las huevas (Smail and Munro, 2008), y la susceptibilidad disminuye con la edad (Rodríguez Saint-Jean et al. 2003).

IPNV pertenece al género Aquabirnavirus, que constituyen un gran grupo de virus muy diversos. El virión de IPNV tiene forma esférica y presenta una estructura sin envoltura viral, con una cápsida con simetría icosaédrica (Rodríguez Saint-Jean et al. 2003) (Fig. 10).

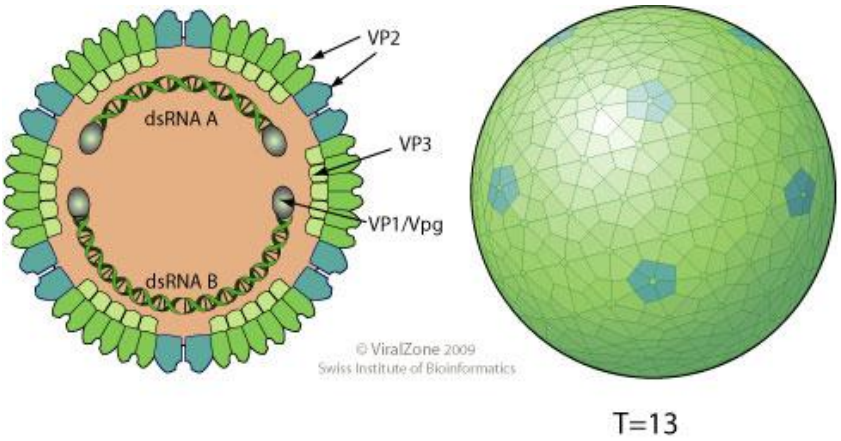

Fig. 10. Esquema representativo de la estructura del virión de IPNV, de forma esférica sin envoltura, con un tamaño aproximado de 70 nm de diámetro. Imagen tomada del *Instituto Suizo de Bioinformática* <http://viralzone.expasy.org/> [Consulta: 27-10-2014].

Su genoma está compuesto por RNA bicatenario segmentado de un tamaño de 6 kilobases. El segmento A, que codifica para la proteína no estructural VP5 y para un precursor de una poliproteína, la cual se segmentará tras la infección para generar las proteínas VP2 (proteína estructural de la cápsida), VP3 y VP4. El segmento B codifica para la proteína VP1, una RNA polimerasa dependiente de RNA, que se puede encontrar libre o asociada al genoma (Gómez-Casado et al. 2011).

Mediante el estudio comparativo de las secuencias de VP2 de diferentes aislados, se han identificado 6 genogrupos correspondientes a 10 serotipos distintos (Cutrin et al. 2000). En Europa los principales serotipos son los A2 (cepa Sp) y A5 (cepa Te) (Gómez-Casado et al. 2011).

Los síntomas clínicos de la IPN incluyen la pigmentación oscura, un abdomen hinchado y prominente exoftalmia, petequias en las vísceras abdominales (Fig. 11) y natación giratoria en espiral (Rodríguez Saint-Jean et al. 2003).

Fig. 11. Petequias en el páncreas de salmón atlántico infectado por IPNV. Imagen tomada de *Norwegian School of Veterinary Science* <http://www.nvh.no/en/Home/News/News-stories/> [Consulta: 27-10-2014].

El virus se disemina por los tejidos diana, produciendo necrosis en el páncreas exocrino debido a la replicación en las células acinares (Ferguson, 1989) y en los túbulos renales en trucha arcoíris (Ahmadi et al. 2013). También se ha aislado IPNV a partir de macrófagos de juveniles de salmón atlántico que eran portadores asintomáticos (Munro et al. 2006). En este caso, la inhibición de la apoptosis potencialmente mediada por VP5 (Hong et al. 2002) permitiría al virus permanecer en macrófagos, escapando así a la respuesta inmunitaria (Collet, 2014).

El ciclo de replicación de IPNV se ha estudiado *in vitro* en diferentes líneas celulares, donde se ha observado su adsorción a la superficie celular (De las Heras et al. 2008). En la línea celular CHSE-214, derivada de embrión de salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha)* se ha observado que se une a los receptores de la membrana celular mediante la proteína VP2 (Dobos, 1995) y penetra al interior por endocitosis mediada por receptor (Couve et al. 1992). Una vez dentro de la célula, se produce la transcripción del genoma dentro del propio virión gracias a la RNA-polimerasa viral dependiente de RNA, utilizando las cadenas de RNA negativas como molde para la replicación del genoma (Cortez-San Martín et al. 2009). El último paso en el ciclo de replicación de IPNV es el ensamblaje de los ácidos nucléicos y proteínas virales en el citosol para la formación de nuevas partículas virales, que se liberan mediante la lisis celular produciendo un efecto citopático masivo (Rodríguez Saint-Jean et al. 2003).

4. Respuesta inmunitaria frente a las infecciones virales

El sistema inmunitario de los peces teleósteos comprende dos tipos de respuestas, la innata y la adquirida, las cuales integran de manera combinada y complementaria las defensas del organismo. En esta introducción nos centraremos en la inmunidad innata, en parte objeto de estudio en esta Tesis, y que se describe a continuación, así como los mecanismos de respuesta innata frente a las infecciones víricas.

4.1. Respuesta inmunitaria innata

La respuesta inmunitaria innata es la primera defensa del organismo frente a las infecciones, suele preceder a una respuesta adaptativa, por lo que la activa y determina su perfil, así como participa en la homeostasis del organismo (Jørgensen, 2014).

A pesar de que los mecanismos de defensa innatos son relativamente limitados, su importancia radica en que actúan frente a una amplia diversidad de agentes patógenos y están muy desarrollados. Además, tras el descubrimiento de los receptores Toll y "Toll-like" se demostró que las respuestas defensivas innatas muestran un grado de especificidad muy marcado que distingue patógenos bacterianos, fúngicos y virales (Jørgensen, 2014). Esta capacidad de discriminación se fundamenta en la existencia de receptores en las células mediadoras de las respuestas que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns), los cuales son diferentes para cada uno de los tipos de patogenos antes mecionados e incluso entre subtipos de estos (Pietretti and Wiegertjes, 2014).

Los receptores para PAMPs (PRRs) pertenecen a diversas familias de proteínas que tras la unión del ligando desencadenan vías de señalización intracelular, entre las que se incluyen la cascada del complemento o de la apoptosis, y que conducen a la producción de citoquinas y activación y migración de células de la respuesta inmunitaria (Aoki et al. 2008). En peces se han descrito cinco tipos de estos PRRs: receptores tipo Toll (TLR), receptores de lectina tipo C (CLR), receptores del complemento (CR), receptores tipo NOD (NLR) y receptores tipo RIG-1 (RLR) (Zhu et al. 2013). Entre estos receptores, los mejor estudiados en teleósteos son los TLRs (Palti, 2011; Pietretti and Wiegertjes, 2014). Estos receptores son proteínas transmembrana involucradas en el tráfico de endosomas, y que reconocen principalmente PAMPs extracelulares en la superficie celular, aunque también pueden encontrarse en el citosol y reconocer patógenos intracelulares (Zhu et al. 2013) (Fig. 12).

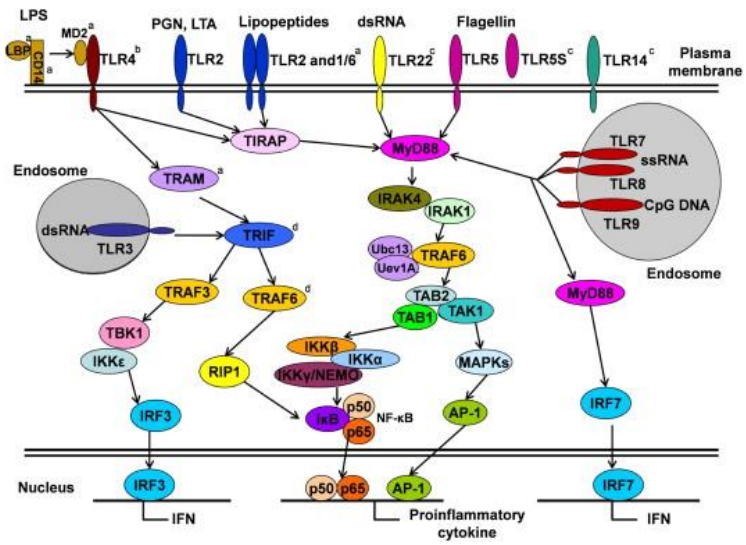

Fig. 12. Receptores tipo Toll y las vías de señalización que desencadenan (imagen tomada de Zhang et al. 2014).

En cualquier caso, el reconocimiento de PAMPs desencadena respuestas defensivas que se articulan a través de tres componentes fundamentales: las barreras físicas, el componente humoral y el celular.

4.1.1. Barreras físicas

La primera barrera de defensa del organismo frente a las infecciones está conformada por los tejidos de revestimiento que limitan con el medio externo. En el caso de los peces, estas barreras, que incluyen el tegumento, las mucosas branquiales, del tracto digestivo y de las vías urogenitales, constan del epitelio de revestimiento mucoso, una capa contínua de mucus y de escamas en la piel (Magnadóttir, 2006).

Los epitelios mucosos de los peces actúan como una barrera semipermeable frente al medio externo que permite el intercambio de elementos como gases, nutrientes, o agua, pero las propias células epiteliales de revestimiento forman una barrera física impermeable inicialmente a los patógenos. Se caracterizan además por la presencia de glándulas mucosas unicelulares, que producen glucoproteínas que forman el componente principal del mucus (Esteban, 2012). La función del mucus como elemento antimicrobiano ha sido estudiada en numerosas especies de salmónidos, sebástidos, chánidos o siluriformes (Esteban, 2012) y no sólo engloba y atrapa microorganismos patógenos, sino que además contiene secreciones humorales como lisozima, inmunoglobulinas, proteasas o péptidos antimicrobianos que juegan un papel importante en la defensa contra agentes infecciosos (Collet, 2014).

Muchos de esos componentes antimicrobianos que se encuentran en el mucus son producidos por otros tipos de glándulas unicelulares que se encuentan en los epitelios de revestimiento. Así, en la epidermis de peces se han descrito células

defensivas de diversos tipos, que secretan glucoproteínas neutras con actividad antibacteriana (Alvarez Fernández, 1992) y factores antimicrobianos (Mittal et al. 1994).

No obstante, dado que las barreras físicas son también el punto más expuesto y probable de entrada de patógenos, también puede tener una función importante en la patogenia de numerosas enfermedades. En el caso de las enfermedades virales, se ha descrito recientemente la piel de las bases de las aletas como ruta de entrada de rhabdovirus en trucha arcoíris, tal como se demostró mediante el uso de una cepa del virus IHNV recombinante en un ensayo de bioluminiscencia (Harmache et al. 2006) y mediante infecciones experimentales por VHSV (Montero et al. 2011a).

4.1.2. Componente humoral

El componente humoral de la respuesta innata comprende una gran variedad de proteínas y glucoproteínas presentes en la sangre y en el mucus que son capaces de destruir o de inhibir el crecimiento de numerosos agentes infecciosos. Dichas moléculas se agrupan en agentes microbicidas (como la lisozima o los péptidos antimicrobianos), bacteriostáticos (como la transferrina o lectinas), antiproteasas (como la α2-macroglobulina) y citoquinas (Ellis, 2001; Magnadóttir, 2006).

De todos estos grupos, las citoquinas tienen un papel clave en la modulación del sistema inmunitario durante las infecciones virales (Collet, 2014). Son producidas por las células en el punto de entrada del patógeno y actúan como señal de inicio de procesos inflamatorios, orquestan el recultamiento de células efectoras de la respuesta inmunitaria e influyen en la presentación antigénica (Wang and Secombes, 2013).

A continuación se describen las citoquinas de las principales familias estudiadas en esta Tesis.

<u>Mediadores proinflamatorios</u>

La reacción inflamatoria es un mecanismo fundamental y conservado en los Vertebrados para el establecimiento de una respuesta inmunitaria eficiente. Los peces desencadenan reacciones inflamatorias en respuesta a diversos agentes químicos y biológicos, incluyendo patógenos bacterianos, víricos, fúngicos y parasitarios (Corbett et al. 2014; Finstad et al. 2012) o asociadas a la dieta (Sahlmann et al. 2013), con manifestaciones clínicas e histopatológicas semejantes a las descritas en otros vertebrados.

Al igual que en mamíferos, en los peces la inducción de las respuestas inflamatorias está mediada por una liberación sistémica de mediadores proinflamatorios como la interleuquina-1β (IL-1β) y el factor de la necrosis tumoral α (TNFα) (Secombes and Ellis, 2012). La mayoría de las citoquinas proinflamatorias que se han aislado en peces se han estudiado con mayor profundidad en salmónidos, ciprínidos, espáridos y siluriformes (Goetz et al. 2004; Secombes et al. 2011).

La interleuquina-1β es secretada por numerosos tipos celulares como macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos y células epidérmicas y endoteliales, estimuladas por mitógenos, otras citoquinas o agentes patógenos (Aoki et al. 2008). Esta citoquina se ha clonado en diversas especies de teleósteos, entre las que se incluyen especies de salmónidos, ciprínidos, gadoideos, perciformes y anguiliformes (Secombes et al. 2011).

En el curso de las infecciones virales, se ha descrito el papel protector de péptidos derivados de IL-1β administrados intraperitonealmente en truchas infectadas con VHSV (Peddie et al. 2003). Así mismo, la expresión de IL-1β se vió incrementada en diversos órganos de trucha arcoíris tras esta infección (Tafalla et al. 2005). También se ha observado la expresión de esta citoquina en truchas vacunadas con plásmidos codificantes para la gpG de VHSV (Chico et al. 2009).

TNFα es otro factor proinflamatorio de gran importancia durante la fase aguda de la inflamación. TNFα es una citoquina pleiotrópica que regula procesos inflamatorios, apoptosis, diferenciación o inmunosupresión (Zhu et al. 2013). Esta citoquina también ha sido clonada en numerosas especies de teleósteos, como en pez cebra, atún de aleta azul, pez gato o trucha arcoíris, en la cual se han descrito diferentes isoformas (Laing et al. 2001; Zhu et al. 2013).

La expresión de esta citoquina se ha descrito tras la estimulación *in vivo* con LPS de bacterias gram negativas, componentes de *Renibacterium salmonarum*, IL-1β o el protozoo *Trypanoplasma borreli* entre otros (Goetz et al. 2004). Su expresión ha sido descrita también tras la infección viral en especies como trucha arcoíris infectada con IHNV (Purcell et al. 2004) o con VHSV y tras la inmunización con plásmidos codificantes para la gpG de VHSV (Chico et al. 2009), o en pez cebra tras la infección por SVCV (Encinas et al. 2013) y tras la administración de plásmidos codificantes para la beta-defensina-2 (García-Valtanen et al. 2014b).

También ha sido descrita su expresión *in vitro* tras la infección con VHSV en la línea celular RTS-11 (Tafalla et al. 2008) y en la línea RTG-2 transfectada con una vacuna DNA frente a VHSV (Ortega-Villaizán et al. 2011).

Factores antivirales

Los interferones (IFN) son proteínas secretables que inducen un estado antiviral en las células, teniendo un papel fundamental en la defensa antiviral (Robertsen, 2006). A pesar de estar bien descritos en mamíferos, en peces no se demostró hasta comienzos de los años 80 la actividad de moléculas similares a IFN frente a infecciones víricas en el suero de trucha arco iris (De Kinkelin et al. 1982) y los primeros genes fueron descritos a comienzos de siglo en especies como el salmón atlántico (Robertsen, 2006). Actualmente, los genes de IFN se han descrito en numerosas especies de teleósteos, entre las que se incluyen el pez gato (*Ictalurus punctatus*), carpa (*Cyprinus carpio*), trucha arcoíris o la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Zou and Secombes, 2011; Zou et al. 2014).

En peces telósteos estas moléculas se clasifican en dos familias: i) el interferón tipo I (IFN-I), que es producido por cualquier tipo celular en respuesta a virus y que desencadena vías de señalización que conducen a un estado de defensa antiviral; y ii) el tipo II (IFN-II), producido por células del tipo *Natural Killer* y linfocitos T en respuesta a IL-12, IL-18, mitógenos o antígenos (Robertsen, 2006), promoviendo la inmunidad mediada por células (Chen et al. 2014).

En peces, el IFN-I se clasifica en dos grupos, atendiendo a si tiene dos cisteínas (Grupo I) o cuatro (Grupo II) en el péptido maduro. El Grupo I está presente en todas las especies de teleósteos y parece ser específico de los peces, mientras que el Grupo II está limitado a salmónidos, siluriformes y ciprínidos. Filogenéticamente, los INF-I de teleósteos se dividen en cuatro subgrupos: a, b, c, d, formando a y d el Grupo I, y b y c el Grupo II. Recientemente se han descrito en trucha arcoíris dos nuevos subgrupos: e y f, quedando el Grupo I formado por a, e y d, y el Grupo II formado por b, c y f (Zou et al. 2014).

La expresión constitutiva de estos interferones se ha estudiado en tejidos de trucha común (*S. trutta*) resultando la del IFN-Ia la más elevada y detectándose tras la infección por VHSV un incremento significativo de la expresión temprana de IFN-Id y –e en pronefros y de IFN-Ib y –c en pronefros y bazo (Zou et al. 2014).

El INF-I se produce rápidamente en el curso de la infección viral, es liberado a la sangre y tras unirse a su receptor celular (IFNR) desencadena la vía de señalización intracelular JAK/STAT, que inducirá la transcripción de un amplio rango de genes inducidos por interferón (ISG) y la expresión de mediadores antivirales (Robertsen, 2006), tales como Mx, viperina, ISG15 o PKR (Zou and Secombes, 2011).

Entre estas moléculas la mejor estudiada en peces es la proteína Mx, una GTPasa involucrada en el transporte de vesículas intracelular y en la homeostasis celular (Haller et al. 2007). La primera actividad antiviral de Mx se demostró en mamíferos, en donde se observó que las isoformas localizadas en el núcleo (Mx1) confieren resistencia a orthomyxovirus, mientras que las isoformas localizadas en el citoplasma (Mx2) inhiben la multiplicación de virus que se replican en el citoplasma, tales como rhabdovirus, ya que se unen a componentes virales esenciales para la replicación (Haller et al. 2007).

Los genes de Mx se han identificado y clonado en diversas especies de peces, tales como perca, trucha arcoíris o salmón atlántico (Collet, 2014). Así mismo, se ha clonado el promotor de Mx en especies como la dorada (González-Mariscal et al. 2014) y la trucha arcoíris (Collet and Secombes, 2002), lo que ha sido de utilidad para estudiar la vía de señalización del interferón *in vitro* (Collet et al. 2004).

Además, se ha estudiado la expresión de Mx *in vivo* tras la infección con VHSV en trucha arcoíris (Tafalla et al. 2007) y tras la infección con IPNV (Das et al. 2007) o IHNV (Purcell et al. 2004) en salmón atlántico. También se ha estudiado su expresión *in vitro* tras la infección con VHSV en la línea celular RTG-2 (Tafalla et al. 2007) y con el reovirus del salmon Chum en células RTS-11 y RTG-2 (DeWitte-Orr et al. 2007).

La expresión de IFN y de Mx ha sido descrita también en peces tras la vacunación DNA y en respuesta a análogos sintéticos de DNA bicatenario, como el ácido polinosínico - policitidílico (poli I:C) (Tafalla et al. 2007), y oligodeoxinucleótidos ricos en motivos CpG (Ortega-Villaizán et al. 2011).

Así, se ha descrito su expresión en truchas estimuladas con poli I:C (Tafalla et al. 2007), en salmones y truchas tras la vacunación DNA contra VHSV (Acosta et al. 2005; Tafalla et al. 2007) y en truchas vacunadas con construcciones que incluían motivos CpG (Martínez-Alonso et al. 2011).

Estudios semejantes se han realizado *in vitro* en células RTG-2, RTS-11 y células de pronefros estimuladas con poli I:C (DeWitte-Orr et al. 2007; Ortega-Villaizán et al. 2012; Tafalla et al. 2007), en las líneas celulares EPC y RTG-2 y células de pronefros transfectadas para expresar gpG de VHSV (Chico et al. 2010; Ortega-Villaizán et al. 2011, 2012), en la línea ZF4 transfectada para expresar la beta-defensina-2 (García-Valtanen et al. 2014b), y en la línea RTG-2 expuesta a CpG's (Ortega-Villaizán et al. 2011).

Quimioquinas

Las quimioquinas son citoquinas responsables de la atracción de células al foco inflamatorio, además de regular procesos proinflamatorios, caracterizadas por tener cuatro residuos de cisteína conservados, que en mamíferos las dividen en cuatro subfamilias (CXC, CC, C y CX_3C) atendiendo a las dos primeras cisteínas de su secuencia (Alejo and Tafalla, 2011). Sin embargo, en peces las más abundantes son las pertenecientes a los grupos CC y CXC, mientras que la subfamilia CX_3C no ha sido descrita.

La subfamilia CC, que contiene dos residuos de cisteína adyacentes, ha sido recientemente clasificada mediante análisis filogenéticos en 7 grupos: CCL19/21/25, CCL20, CCL27/28, CCL17/22, el grupo de la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP), el grupo de la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP) y el grupo SCY específico de peces (small inducible cytokines)(Peatman and Liu, 2007). En teleósteos se han identificado diversos genes de estas quimioquinas en especies como trucha arcoíris, dorada, pez gato y pez cebra (Alejo and Tafalla, 2011; Zhu et al. 2013). Así mismo, se ha descrito la expresión constitutiva de CK12 en ovario, branquias, piel e intestino de trucha arcoíris (Chaves-Pozo et al. 2010b; Montero et al. 2011b).

Aunque todavía no se conoce con profundidad su actividad biológica, se ha demostrado en estudios *in vitro* que CK12 ejerce un efecto quimiotáctico sobre leucocitos del bazo y que se une específicamente a linfocitos IgM^+ del bazo y linfocitos del timo (Montero et al. 2011b).

El papel de las quimioquinas CK9 (CCL19/21/25), CK10 (CCL19/21/25), CK11 (CCL27/28) y CK12 (CCL19/21/25) ha sido estudiado en la infección experimental con VHSV en trucha arcoíris, en donde se demostró la expresión diferencial de los genes de estas quimioquinas dependiendo del tejido. Así, VHSV es capaz de inducir la expresión de CK9 y CK11 en branquias, mientras que en piel induce CK10 y CK12 (Montero et al. 2011a). Así mismo. se observó la modulación de la expresión de las quimioquinas CK1, CK3, CK5B, CK6, CK9 y CK12 en ovario de truchas infectadas por VHSV o IPNV (Chaves-Pozo et al. 2010b).

Recientemente, se ha descrito la sobreexpresión de esas mismas quimioquinas en la línea celular RTH, derivada de corazón de trucha arcoíris, tras la infección por VHSV, sugiriendo una función antiviral, dado que el corazón es un órgano diana para este virus (Luque et al. 2014).

La subfamilia CXC se subdivide en el grupo ELR^+, que contiene en el extremo N-terminal de su secuencia un motivo Glu-Leu-Arg, responsable de su unión al

receptor de neutrófilos y de su activación, y el grupo ELR$^-$ que no contiene dicha secuencia y que atrae monocitos y linfocitos(Alejo and Tafalla, 2011; Zhu et al. 2013). Mediante análisis filogenéticos se han identificado seis grupos: CXCa, CXCb, CXCc, CXCd, CXCL12 y CXCL14. Sin embargo, no se han identificado quimioquinas de todos los grupos en todas las especies en las que se han estudiado (Alejo and Tafalla, 2011).

De esta subfamilia, la quimioquina mejor caracterizada en peces es la IL-8, una quimioquina CXCa ortóloga de la IL-8 de mamíferos. Se ha descrito su expresión constitutiva en bazo, hígado y pronefros de trucha arcoíris (Tafalla et al. 2005). Su actividad quimiotáctica se demostró mediante la inyección de un vector codificante para IL-8 de trucha, tras lo que se vio una infiltración masiva de células inflamatorias en el punto de inyección (Jiménez et al. 2006). Así mismo, esta quimioquina atrae a células de la línea celular RTS-11 (Montero et al. 2008a).

Su papel en las infecciones virales se ha demostrado en estudios *in vivo* con truchas infectadas con VHSV, en las que se observó un aumento de su expresión en órganos del sistema inmunitario como pronefros y bazo (Tafalla et al. 2005). Igualmente, se ha observado un aumento en su expresión en músculo y bazo de truchas vacunadas con un plásmido codificante para la gpG de VHSV (Chico et al. 2009).

4.1.3. Respuesta innata celular

El tercer componente típico de la respuesta inmunitaria innata lo constituyen las poblaciones de leucocitos antígeno-inespecíficos, incluyendo monocito-macrófagos, granulocitos y células citotóxicas inespecíficas, que son activados y reclutados por las citoquinas y quimioquinas hacia el foco de inflamación y pueden reconocer a un amplio rango de agentes patógenos y destruirlos o inactivarlos (Aoki et al. 2008).

<u>Monocitos-macrófagos</u>

Los macrófagos son células especializadas en fagocitar y degradar patógenos, así como capaces de producir citoquinas y factores solubles microbicidas, como especies reactivas del oxígeno (Collet, 2014).

En peces se ha descrito un tipo específico de estas células, los melanomacrófagos, que se encuentran asociados a los vasos sanguíneos en bazo y pronefros (Herráez and Zapata, 1986; Meseguer et al. 1994). Estas células contienen en el citoplasma diversas inclusiones, como la melanina en el interior de los lisosomas, la cual parece estar relacionada con mecanismos bactericidas que incluyen la producción de radicales libres (Secombes and Ellis, 2012).

Los macrófagos pueden ser activados por tres diferentes vías (innata, clásica y alternativa), dependiendo del patógeno o estímulo al que se enfrenten. La activación innata require de un estímulo microbiano que es detectado mediante receptors de superficie, tales como TLRs, lectinas tipo C o receptores tipo scavenger. Estos macrófagos fagocitan y también producen citoquinas proinflamatorias o factores de crecimiento (Forlenza et al. 2011). La vía clásica de activación requiere de un estímulo microbiano combinado con la estimulación por interferón gamma y conduce a una respuesta proinflamatoria con la producción de citoquinas como IL-1β y TNFα, que es efectiva frente a bacterias y virus intracelulares (Ellis, 2001; Forlenza et al. 2011). La vía alternativa requiere de la presencia de IL-4 o IL-13, y conlleva una respuesta antiinflamatoria, ya que los macrófagos activados por esta via disminuyen la producción de óxido nítrico (NO) (Modolell et al. 1995).

Además, se ha descrito que en presencia de IL-10 los macrófagos de teleósteos pueden activarse y convertirse en células reguladoras de las respuestas inflamatorias (Forlenza et al. 2011).

El papel de los macrófagos en las infecciones virales se ha demostrado en salmón atlántico tras la infección *in vivo* con el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), observándose un aumento en la actividad de estas células (Falk et al. 1995). Esta activación de macrófagos también se ha demostrado en trucha arcoíris tras la infección con una cepa recombinante de IHNV, que expresaba la gpG de VHSV y la proteína reportadora GFP, observándose un aumento de la producción de NO y de la explosión respiratoria (Romero et al. 2011).

La función antiviral de los macrófagos también ha sido demostrada en estudios *in vitro*. Tras la infección con VHSV, la línea celular RTS-11 mostró una fuerte respuesta antiviral, aumentando la expresión de IFN y Mx, además de observarse una interrupción en la replicación viral (Tafalla et al. 2008). Estos mismos resultados en cuanto a la expresión de citoquinas antivirales en las células RTS-11 se han obtenido tras la infección con el virus CSV (DeWitte-Orr et al. 2007), así como agregación homotípica, un fenómeno de adhesión celular que indican la activación de dichas células en respuesta a virus (DeWitte-Orr et al. 2007). En la línea celular ASK, derivada de macrófagos de salmón atlántico, también se ha observado una modulación de la expresión génica tras la infección con el virus ISAV (Schiøtz et al. 2008).

Granulocitos

En los peces se han descrito granulocitos neutrófilos / heterófilos, basófilos y eosinófilos, caracterizados por la presencia de gránulos en su citoplasma con

distintas características tintoriales cuando son teñidos con el método de Romanovsky, de los cuales los más abundantes en teleósteos son los neutrófilos (Hine, 1992).

Los neutrófilos, también denóminados heterófilos, son los principales granulocitos defensivos en peces. Son células fagocíticas, que son reclutadas al foco inflamatorio por quimiotaxis (Collet, 2014), donde liberan gránulos con enzimas degradativas, como la mieloperoxidasa, que provocan la lisis extracelular (Secombes and Ellis, 2012). Su participación en las infecciones virales, aunque no queda clara, ha sido descrita tras la detección de altos niveles de IL-8 en infecciones virales en salmónidos (Collet, 2014). En estudios de infección *in vivo* con IHNV en trucha arcoíris se detectó una disminución en el número de estas células en el foco de infección (Amend and Smith, 1975). Esta observación se realizó también en sangre y pronefros de salmón atlántico infectado por IPNV (Rønneseth et al. 2006).

Además, se ha sugerido que el reclutamiento de neutrófilos a tejidos periféricos tras las infección con VHSV está relacionada con la disminución de la expresión del gen del receptor de IL-8 en bazo y pronefros de trucha arcoíris (Montero et al. 2008b).

Células citotóxicas

En peces se han descrito dos tipos de células con actividad similar a las células *Natural Killer* (NK) de mamífero: las células citotóxicas inespecíficas (NCC) y las células tipo NK, ambas clave en la defensa antiviral ya que destruyen células infectadas mediante la lisis osmótica mediada por granzimas y apoptosis (Fischer et al. 2013), además de producir citoquinas mediadoras de la respuesta antiviral (Fischer et al. 2006).

Las NCC son linfocitos de pequeño tamaño y agranulares, que expresan en su membrana el receptor celular de citotoxicidad inespecífica (NCCRP-1) y se encuentran en tejidos linfoides, mientras que las células tipo NK, con morfología granular similar a las de mamífero, han sido aisladas a partir de leucocitos de sangre circulante (Nakanishi et al. 2011).

La implicación de estas respuestas citotóxicas inespecíficas mediadas por células en las infecciones virales se ha descrito en diversas especies, como en trucha arcoíris tras la infección por VHVS (Utke et al. 2007) y en dorada y lubina tras la infección por el virus de la necrosis nerviosa (NVV) (Chaves-Pozo et al. 2012).

Así mismo, se ha descrito el aumento en la expresión de genes relacionados con la citotoxicidad inespecífica en respuesta a la infección viral, como un aumento en la expresión del gen del NCCRP-1 en dorada y en lubina tras la infección por NVV

(Chaves-Pozo et al. 2012) o del gen del factor activador de las células natural killer (NKEF) en trucha arcoíris y en la línea celular RTS-11 tras la infección por VHSV (Ordás et al. 2011; Utke et al. 2007).

También se ha descrito la citotoxicidad inespecífica mediada por células en trucha arcoíris tras la inmunización con una vacuna DNA codificante para la gpG de VSHV (Utke et al. 2008).

4.2. Respuesta inmunitaria adaptativa

La respuesta inmunitaria adaptativa es el resultado de la capacidad que tiene el sistema inmunitario para reconocer un determinado antígeno y desplegar una respuesta específica frente a él. Este reconocimiento específico se debe a que el sistema inmunitario genera una gran diversidad de receptores para el reconocimiento antigénico, proceso mediado por la recombinación somática y mutaciones aleatorias que suceden en los genes codificantes para dichos receptores (Castro et al. 2011).

Otra de las características de la respuesta adaptativa, que se establece de manera más lenta que las respuestas innatas, tardando entre varios días a semanas en desarrollarse, es que es más rápida y efectiva en posteriores contactos con el mismo antígeno, un proceso denominado anamnesis inmunológica (Mutoloki et al. 2014). Esto se debe a que, tras un primer contacto con el antígeno, ademas de inducirse células efectoras que median la respuesta primaria (inicial), se genera una población de células de memoria, de larga vida y con receptores y mediadores adaptados más específicos, por lo que posteriormente, cuando vuelvan a ser estimuladas por el mismo antígeno, podrán responder frente a él más rápida y efectivamente. Esta memoria inmunológica ha sido descrita en teleósteos y es el fundamento en el que se sustenta el desarrollo de vacunas para acuicultura (Van Muiswinkel et al. 2014).

Las respuestas inmunitarias adaptativas estan mediadas por las denominadas respuestas inmunitarias específicas celulares, dependientes de linfocitos T, y humorales, dependientes de linfocitos B.

4.2.1. Respuesta celular específica

En los teleósteos las células efectoras de la respuesta celular específica son los linfocitos T, similares a los de mamífero, que se producen principalmente en el timo (Zapata and Cooper, 1991). Los linfocitos T presentan el receptor antigénico de células T (TCR) en su superficie y, atendiendo al co-receptor que presentan, se clasifican en linfocitos T $CD4^+$ (colaboradores) o $CD8^+$ (citotóxicos) (Castro et al. 2011), siendo los primeros los productores de citoquinas y activadores de la

respuesta, y los segundos los efectores en la respuesta citotóxica mediada por células (Fischer et al. 2006).

Los linfocitos T CD4$^+$ o colaboradores reconocen péptidos, principalmente, unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad II (MHC-II) en la superficie de las células presentadoras de antígeno, lo que hace que proliferen y se diferencien en diferentes subpoblaciones e inicien la respuesta inmunitaria al producir diversas citoquinas y reclutar otras células como macrófagos, linfocitos citotóxicos o linfocitos B, facilitando además la activación antigénica de estos últimos (Toda et al. 2011). En mamíferos, en función de las citoquinas que producen estos linfocitos activados, los linfocitos CD4$^+$ se dividen en cuatro subpoblaciones, las cuales se han identificado también en teleósteos al identificarse algunas de las citoquinas que producen (Castro et al. 2011; Fischer et al. 2013; Núñez et al. 2014; Takizawa et al. 2011b):

- Th1: producen IL-2 e IFN gamma en respuesta a bacterias intracelulares e infecciones virales.
- Th2: producen IL-4 e IL-13, están involucrados en la respuesta antiparasitaria.
- Th17: producen IL-17, IL-21 e IL-22 en respuesta a bacterias extracelulares y hongos.
- Treg (regulador): expresan el factor de transcripción FOXP3 y producen IL-10 y TGF-β.

La función colaboradora de estos linfocitos en la respuesta antiviral en peces se ha demostrado recientemente en estudios de infección con el virus de la necrosis hematopoyética de la carpa (CHNV) en el ciprínido *Carassius auratus langsdorfii*. En estos estudios se observó una mayor y más rápida respuesta humoral frente a la infección en aquellos peces que habían sido transplantados con linfocitos T CD4$^+$ previamente sensibilizados con el virus (Somamoto et al. 2014).

Los linfocitos T CD8$^+$ o linfocitos citotóxicos reconocen, gracias a su receptor TCR, los péptidos unidos a moléculas del MHC-I que las células infectadas por virus o patógenos intracelulares presentan en su superficie (Zhu et al. 2013). Los linfocitos T citotóxicos han sido identificados en diversas especies de teleósteos, como trucha arcoíris, el ciprínido *C. auratus langsdorfii* y pez gato *I. punctatus* (Nakanishi et al. 2011) y se han generado anticuerpos monoclonales frente a la subunidad α del coreceptor CD8, lo que ha permitido identificar estapoblación de linfocitos en diferentes tejidos de trucha arcoíris (Takizawa et al. 2011a).

Al igual que en los mamíferos, en los teleósteos la cooperación entre las células T y las células presentadoras de antígenos esta restringido por el MHC (Fischer et al. 2013; Vallejo et al. 1992). Así, en caso de la actividad citotóxica específica, para que este reconocimiento antigénico se produzca, las células efectoras $CD8^+$ y las células diana deben ser singénicas o autólogas, compartiendo el MHC-I (Somamoto et al. 2013a). Estas moléculas han sido estudiadas en numerosas especies de teleósteos, incluyendo trucha arcoíris, salmón atlántico, pez cebra, carpa y medaka (Somamoto et al. 2013a), y están formadas por un heterodímero que contiene una subunidad transmembrana α (codificada por genes de MHC) y una cadena β (codificada por otro locus) (Zhu et al. 2013).

Por ello, la actividad citotóxica específica fue demostrada *in vivo*, principalmente en estudios de transplantes empleando como modelos una línea clonal triploide de *C. auratus langsdorfii* y una línea tetraploide de carpín dorado (*C. auratus)* (Nakanishi and Ototake, 1999) y una línea clonal diploide y otra triploide del salmónido *Oncorhynchus rhodurus* (Qin et al. 2002).

La implicación de las respuestas citotóxicas específicas en la respuesta antiviral se ha demostrado en estudios *in vivo* en una línea clonal del ciprínido *C. auratus langsdorfii*, inmunizada con células singénicas infectadas por IPNV o por el virus americano de la anguila (EAV), que demostraron que los linfocitos periféricos lisaron células singénicas infectadas por dichos virus, pero no células xenogeneicas infectadas (Somamoto et al. 2000). Así mismo, se ha demostrado especificidad de esta respuesta frente a virus y la restricción por MHC en estudios con leucocitos de este ciprínido que lisaron células singénicas infectadas por el virus de la necrosis hematopoyética del carpín dorado (CHNV), pero no células alogénicas (Somamoto et al. 2002). Este ciprínido se ha usado también como modelo para generar *in vitro* células T citotóxicas específicas de virus, mediante el cocultivo de linfocitos de peces infectados por CHNV con una línea celular singénica infectada con el mismo virus (Somamoto et al. 2009).

En salmónidos se han hecho estudios con el VHSV, demostrándose que linfocitos de truchas infectadas eran capaces de lisar *in vitro* células infectadas que compartían un alelo del MHC-I (Utke et al. 2007).

Así mismo, se ha estudiado este tipo de respuesta a vacunas DNA frente a rhabdovirus. Se ha demostrado que linfocitos T de la línea clonal C25 de trucha arcoíris inmunizada con un plásmido codificante para la gpG de IHNV fueron capaces de lisar células RTG-2 infectadas por el virus (Fischer et al. 2000). Estos

resultados también se observaron con linfocitos T de truchas inmunizadas con un plásmido codificante para la gpG de VHSV (Utke et al. 2008).

4.2.2. Respuesta humoral específica

La respuesta humoral específica está mediada por un grupo de proteínas denominadas inmunoglobulinas (Ig), que son producidas por los linfocitos B.

En mamíferos los linfocitos B se generan en la médula ósea y maduran en el bazo. En los peces, que carecen de médula ósea, estos linfocitos se generan y maduran en el pronefros y mesonefros, que cumple dicha función linfopoyética (Mutoloki et al. 2014).

Estos linfocitos se activan al contactar con antígenos circulantes en su forma nativa, gracias a su receptor BCR, tras lo que se diferencian hacia células plasmáticas efectoras, que producirán las inmunoglobulinas, o hacia células de memoria, aunque también se ha descrito que los linfocitos B de teleósteos presentan capacidad fagocítica y antimicrobiana (Salinas et al. 2011; Zhang et al. 2010).

Las células B de memoria sufren una hipermutación somática en el gen que codifica para la región variable (V) de las inmunoglobulinas, y permanecerán quiescentes en sangre circulante hasta que se produzca un encuentro secundario con dicho antígeno (Morrison and Nowak 2002; Ye et al. 2013).

Las inmunoglobulinas pueden ser de dos tipos, ancladas a la membrana de estas células y actuar como receptor de antígenos en la superficie celular de células B (BCR), y las secretadas por las células plasmáticas (Zhu et al. 2013).

En teleósteos se han identificado tres clases de inmunoglobulinas: IgM, IgD e IgT (en trucha) - IgZ (en pez cebra). La IgM es un tetrámero expresado como anticuerpo en suero y mucus, siendo la inmunoglobulina predominante en peces, ha sido clonada en especies como trucha arcoíris y carpa (Ye et al. 2013). La IgD fue descubierta en pez gato (Wilson et al. 1997) y puede expresarse en su forma soluble en suero, como anticuerpo, o anclada a la membrana de linfocitos B actuando como receptor (Bengten et al. 2002). La IgT es una inmunoglobulina que se secreta en forma de tetrámero en mucus o monómero en suero de trucha y se le ha atribuido una función de protección de mucosas, ya que se han descrito linfocitos B IgT^+ en la mucosa intestinal de truchas infectadas experimentalmente con el protozoo *Ceratomyxa shasta* y también puede recubrir las bacterias del intestino (Zhang et al. 2010). La IgZ, similar a la IgT de trucha, se descubrió en pez cebra al secuenciar su genoma en búsqueda del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Danilova et al. 2005).

Una particularidad de las respuestas de memoria (secundarias) humorales de teleósteos es que no existe un cambio de clase de IgM a IgG, que sucede en mamíferos, dado que no existe esta clase en los peces. No obstante, en teleósteos se produce un aumento de la afinidad de los anticuerpos que median las respuestas secundarias humorales (Kaattari et al. 2002), lo que las hace más eficaces al responder ante una menor concentración del antígeno, así como un aumento del título de anticuerpos, que en peces parece depender de la temperatura y una menor fase de adaptación ("lag phase") en la producción de anticuerpos (Secombes and Ellis, 2012).

El papel de las inmunoglobulinas en las infecciones virales se ha demostrado al detectarse anticuerpos neutralizantes (IgM) frente a rhabdovirus. Así, se han detectado en suero de trucha arcoíris tras la infección por IHNV (Ristow et al. 1989) o VHSV (Lorenzen and Lapatra, 1999). Recientemente se ha descrito la expresión de IgT en el bazo de trucha tras la infección por VHSV, sugiriendo la expansión clonal de los linfocitos B en este órgano antes de su migración a las mucosas (Castro et al. 2013).

Recientemente se ha descrito que las principales células reclutadas al punto de inyección en truchas vacunadas intramuscularmente con un plásmido codificante para la gpG de VHSV son del tipo linfocitos B IgM^+ IgT^+ (Castro et al. 2014).

5. Vacunas frente a rhabdovirus de peces

Como se ha mencionado antes, no existe tratamiento quimioterapeútico frente a las infecciones víricas de peces, pero dado que los peces pueden desarrollar inmunidad a largo plazo, la mejor opción para el control de dichas enfermedades es la inmunización.

5.1. Vacunas inactivadas

Se trata de vacunas cuya composición incluye patógenos muertos o inactivados (Munang'andu et al. 2014). La seguridad es el principal motivo del uso de estas vacunas, ya que los patógenos muertos o sus componentes no pueden causar la enfermedad.

La inactivación de virus, cuyo objetivo es anular la capacidad de replicación viral pero mantener su conformación antigénica, se realiza mediante procedimientos físicos tales como la radiación UV, el calor o la sonicación, o procedimientos químicos, como el uso de formaldehído, β-propiolactona y la etilinimina binaria (Munang'andu et al. 2014).

Así, se han intentado obtener vacunas inactivadas de VHSV e IHNV, resultando aquellas inactivadas con β-propiolactona eficaces administradas intraperitonealmente, pero poco eficientes en inmersión (Biacchesi and Brémont, 2014).

5.2. Vacunas recombinantes con componentes antigénicos

Se trata de vacunas cuya composición incluye los componentes o productos antigénicos de los patógenos, y al igual que las anteriores, su uso se basa en la seguridad que ofrecen y su eficacia en el poder inmunogénico de las proteínas de los patógenos, que son expresadas en vectores recombinantes en sistemas *in vitro*, y después purificadas (Munang'andu et al. 2014).

En el caso de los rhabdovirus, la gpG es la única proteína que induce anticuerpos neutralizantes protectores (Lorenzen et al. 1990), y por ello ha sido objeto de investigaciones para desarrollar vacunas basadas en este péptido. Se ha logrado expresar esta proteína recombinante en diferentes sistemas *in vitro*, tales como *E. coli* (Estepa et al. 1994; Lorenzen et al. 1993), *Caulobacter crescentus* (Simon et al. 2001), levadura (Estepa et al. 1994), y baculovirus (Koener and Leong, 1990). Sin embargo la inmunización con estas proteínas recombinantes no ha dado los resultados esperados en cuanto a eficacia (Estepa et al. 1994; Lorenzen et al. 1993). Además, la inmunización intraperitoneal de la vacuna junto con un adyuvante oleoso no mejoró los resultados (Lecocq-Xhonneux et al. 1994).

5.3. Vacunas vivas atenuadas

Estas vacunas contienen al agente patógeno vivo, el cual puede replicarse en el organismo del hospedador, aunque de forma controlada, ya que dicho agente etiológico está atenuado y por tanto es menos virulento (Shoemaker and Klesius, 2014).

Numerosos trabajos en el campo de la inmunología de peces demostraron que, al igual que sucede en mamíferos, los peces que sobreviven a una infección desarrollan inmunidad y son resistentes a la reinfección con el mismo patógeno (Ahne et al. 2002; Lorenzen et al. 2010), lo cual sirvió de base para el desarrollo de las vacunas vivas en el campo de la acuicultura.

Existen diferentes metodologías para atenuar la virulencia de los agentes patógenos, para así lograr que se repliquen de manera controlada en el hospedador induciendo una efectiva respuesta inmunitaria.

Uno de los primeros métodos utilizados consiste en cultivar el patógeno durante numerosos pases (hasta 350) en cultivos celulares, de forma que van perdiendo la virulencia con los sucesivos pases. Los primeros datos que se conocen para atenuar virus en el laboratorio son los trabajos que se realizaron con el virus del pez gato (Channel catfish virus, CCV), que tras 62 pases en una línea celular derivada del clárido *Clarias batrachus* demostró una protección en el 97% de los peces ensayados (Hartman and Noga, 1980). También se ha atenuado el herpesvirus de la carpa Koi (KHV) mediante pases en células de aleta de carpa Koi (Ronen et al. 2003).

Con esa metodología se obtuvieron cepas de VHSV termorresistentes (De Kinkelin et al. 1980) y cepas del IHNV (Ristow et al. 2000), que confirieron altos niveles de protección en alevines de trucha arcoíris inmunizados (De Kinkelin and Bearzotti, 1981; Enzmann et al. 1998).

Otro método consiste en realizar pases del patógeno en un hospedador que no es susceptible. Esta metodología se ha empleado para obtener cepas atenuadas del virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) y de VHSV mediante pases en cultivos de fibroblasto de pollo y además, en el caso de SVCV, aumentando la temperatura de incubación (Kölbl, 1989). Dicha cepa atenuada de VHSV se utiliza en una vacuna comercializada en Alemania frente a VHS.

A pesar de que estas vacunas inducen inmunidad mucosa, celular y humoral (Clark and Cassidy-Hanley, 2005), su uso se ha visto limitado debido a que no eran igual de eficaces en el laboratorio que en el campo y a que, debido a la variabilidad en la susceptibilidad de los peces, una cepa podía ser virulenta para una línea de peces y ser avirulenta para otra (Gómez-Casado et al. 2011).

Otra manera de abordar la producción de vacunas atenuadas es la genética reversa, para producir cepas recombinantes más seguras, incluyendo cepas con deleciones (Knockouts) (Gómez-Casado et al. 2011). Así, Zhang y Hanson (1995) produjeron una cepa de CCV recombinante mediante la deleción del gen de la timidina kinasa, la cual indujo protección en infecciones experimentales.

Por otra parte, Biacchesi y colaboradores demostraron la expresion de genes exógenos en cepas de IHNV recombinantes (Biacchesi et al. 2000). Así, usando esta cepa recombinante, se delecionó el gen Nv, lo que resultó en una disminución de la virulencia y confirió protección *in vivo* (Thoulouze et al. 2004). El uso de esta cepa recombinante de IHNV, delecionada para Nv y modificada para expresar la gpG de VHSV y la GFP confirió protección frente a la infección por VHSV en pez cebra (Novoa et al. 2006), y posteriormente Romero y colaboradores demostraron la ausencia de virulencia de esta cepa recombinante de IHNV, así como la protección

conferida a trucha arcoíris frente a la infección por las cepas silvestres de VHSV e IHNV (Romero et al. 2008).

5.4. Inmunización génetica: vacunas DNA

Las vacunas DNA se basan en el uso de genes que codifican para uno o más antígenos que desencadenan una respuesta inmunitaria protectora cuando se expresan en los animales susceptibles al patógeno portador de dichos antígenos (Biering and Salonius, 2014).

Las vacunas DNA consisten en un plásmido bacteriano purificado, que contiene los elementos reguladores para su replicación en sistemas procariotas, para su producción, y elementos reguladores de la expresión de los genes de interés en los animales vacunados (Evensen and Leong, 2013).

En mamíferos se ha descrito que tras la administración de la vacuna DNA pueden darse las siguientes situaciones en las que el plásmido: (i) puede ser adquirido por las células del punto de inyección, (ii) puede permanecer localizado en el punto de inyección, en el medio extracelular, (iii) puede ser degradado por endonucleasas *in situ*, (iv) puede ser redistribuído por células a través de la sangre y la linfa hacia otros tejidos (Tonheim et al. 2008a). La administración de estas vacunas en mamíferos se ha estudiado mayoritariamente por vía intramuscular, aunque también se han estudiado otras vías como la vía permucosa o intradérmica, como en el caso de la vacuna frente al melanoma canino. Además, junto con la inyección se han optimizado otros métodos para mejorar la eficiencia de transfección, como es la electroporación en el tratamiento de lechones lactantes o una formulación rica en agentes transfectantes, como los lípidos catiónicos (Liu, 2011).

A pesar de ser numerosas las vacunas que en fase preclínica han demostrado su eficacia para inducir una respuesta inmunitaria celular y humoral, en mamíferos sólo se encuentran disponibles en el mercado una vacuna frente a la fiebre del Nilo occidental para caballos (West Nile-Innovator, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, USA) y frente al melanoma canino (Oncept, Merial, Lyon, France), así como un tratamiento plasmídico para favorecer el crecimiento lechones lactantes (LifeTide SW 5, VGX Animal Health, Inc., The Woodlands, TX, USA), cuyos usos no están autorizados en la UE (Liu, 2011).

En peces se ha descrito que una vez que el plásmido ha penetrado en el organismo pueden suceder distintos eventos (Tonheim et al. 2008a):

- El plásmido puede ser degradado en el medio extracelular, como se ha observado en salmón atlántico y bacalao del atlántico (Seternes et al. 2007; Tonheim et al. 2008b).
- El plásmido puede transfectar las células del punto de inyección, las cuales expresarán la proteína codificada y la presentarán en las moléculas del MCH-I, simulando una infección viral (Liu 2011).
- Las células presentadoras de antígeno (APC) pueden incorporar los péptidos producidos por otras células transfectadas y presentarlos en las moléculas del MHC-II, y estas APC, tanto si han sido transfectadas como si han incorporado los péptidos, pueden redistribuirse por el organismo (Seternes et al. 2007; Tonheim et al. 2008b).

En los dos últimos casos la presentación antigénica lleva a la estimulación de la respuesta específica humoral y celular, en este útimo caso con activación de células T colaboradoras (mediante el reconocimiento de péptidos presentados en el MHC-II) y citotóxicas (mediante el reconocimiento de péptidos presentados en el MHC-I). Así mismo, el plásmido por sí mismo tiene poder inmunogénico dado que, por su origen bacteriano, contiene regiones ricas en motivos CpG no metiladas y que, una vez el plásmido está dentro del compartimento lisosomal intracelular, va a ser reconocido como un PAMP reconocido por el receptor tipo Toll-9, desencadenando también la respuesta inmunitaria (Latz et al. 2004; Ortega-Villaizán et al. 2009).

En trucha arcoíris se ha descrito que tras la administración del plásmido primeramente se produce una respuesta antiviral inespecífica, que es capaz de ofrecer protección cruzada frente a otros virus heterólogos (Lorenzen et al. 2002a). Seguidamente se produce una respuesta específica caracterizada por la aparición de anticuerpos específicos (Lorenzen et al. 1998; Purcell et al. 2004) y, finalmente, una respuesta antiviral de larga duración caracterizada por un menor título de anticuerpos y la presencia de células efectoras citotóxicas (Lorenzen et al. 2001; Utke et al. 2008).

En teleósteos, los primeros datos acerca del uso de estas vacunas para proteger frente a rhabdovirus se basan en los estudios realizados en truchas arcoíris inmunizadas por vía intramuscular con plásmidos codificantes para la gpG o para la proteína N frente a IHNV (Anderson et al. 1996), y frente a VHSV (Lorenzen et al. 1998).

Ensayos de vacunación con una única dosis vacunal bivalente frente a IHNV y VHSV demostraron la inducción de anticuerpos neutralizantes específicos de estos virus (Boudinot et al. 1998) y la protección frente a la infección (Einer-Jensen et al. 2009).

Estas primeras vacunas empleadas consistían en construcciones plasmídicas que expresaban el gen de la gpG de VHSV o IHNV, dado que esta proteína induce anticuerpos neutralizantes, bajo el control del promotor del Citomegalovirus humano (CMV). Desde entonces, son numerosos los estudios realizados para mejorar su eficacia y entender las bases inmunológicas de la protección que confieren y estudios *in vitro* han identificado cuales son estas regiones determinantes de la gpG de VHSV que desencadenan la vía del interferón (Chico et al. 2010) así como su posible uso como adyuvantes moleculares en vacunas DNA (Martínez-López et al. 2014).

Las vacunas DNA basadas en el gen de la gpG también han demostrado su eficacia al conferir una protección y supervivencia significativas en ciprínidos vacunados frente al rhabdovirus SVCV (Kanellos et al. 2006), y en platija japonesa vacunada frente al rhabdovirus Hirame (Seo et al. 2006).

Estos buenos resultados dieron lugar a la producción y comercialización de la primera vacuna DNA frente a virus de peces: la vacuna frente a IHNV comercializada para salmón atlántico en Canadá (APEX-IHN; Novartis Animal Health Canada Inc.). Sin embargo, esta vacuna no está autorizada en Europa debido a que los peces vacunados con DNA se consideran organismos genéticamente modificados (EFSA, 2013a, 2013b). Por ello, se han llevado a cabo numerosos estudios para buscar promotores alternativos al uso del CMV y secuencias reguladoras de origen piscícola (Martínez-López et al. 2012; Martínez-López et al. 2013a; Ruiz et al. 2008).

Además existen otros aspectos que deben optimizarse para que el uso de estas vacunas sea rentable, como por ejemplo, la vía de administración. A ese respecto se han realizado estudios para buscar alternativas a la inyección intramuscular, la vía más comunmante usada, como la administración por baño facilitada por ultrasonidos (Fernández-Alonso et al. 2001) o la vía oral (Adomako et al. 2012).

Otras modificación para optimizar la eficacia de las vacunas DNA, independientemente de la ruta de administración, incluyen la disminución de la secuencia codificante para el antígeno (Martínez-López et al. 2013b), expresión de antígenos solubles o secretables (Martínez-López et al. 2013b), la inclusión de secuencias inmunoestimulantes como motivos ricos en CpG (Martínez-Alonso et al. 2011) o de genes para citoquinas (Martínez-López et al. 2014) o péptidos antimicrobianos (García-Valtanen et al. 2014b).

Justificación, propósito y objetivos

Justificación, propósito y objetivos

El creciente desarrollo de la acuicultura como motor de desarrollo socioeconómico ha demandado un gran avance en el conocimiento sobre la biología de las especies cultivadas. Dado que la producción animal intensiva lleva aparejado el surgimiento de enfermedades infecciosas, muchos estudios se han dirigido al mejor conocimiento de las particularidades del sistema inmunitario de los teleósteos y a la caracterización de la respuesta inmunitaria frente a los patógenos (Campos-Pérez et al. 2000; Lindenstrøm et al. 2004; Magnadóttir, 2006; Robertsen, 2006; Secombes et al. 2011).

Entre las enfermedades que sufren los peces en cultivo intensivo, las enfermedades virales son las más devastadoras, puesto que no hay tratamiento quimioterapéutico para las mismas. Y entre ellas, la septicemia hemorrágica viral, causada por el rhabdovirus VHSV, es una de las más importantes (Crane and Hyatt, 2011; Dale et al. 2009; Garver et al. 2013; Ogut et al. 2013), estando en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Internacional de Epizootías.

Son numerosos los estudios que han demostrado que los peces pueden desarrollar inmunidad a largo plazo frente a virus (Gurunathan et al. 2000; Lorenzen et al. 2002b; Purcell et al. 2012). Por ello, la vacunación se presenta como la mejor opción para el control de estas enfermedades, lo que es de vital importancia para poder intensificar los cultivos.

Sin embargo, todavía son pocas las vacunas antivirales seguras, eficaces y económicamente viables que han podido ser desarrolladas en acuicultura (Biering and Salonius, 2014). Se han realizado numerosos intentos por controlar la septicemia hemorrágica viral, tanto con vacunas inactivadas (Amend, 1976), atenuadas (De Kinkelin et al. 1980), como con subunidades (Simon et al. 2001). Sin embargo, aunque dieron resultados prometedores en cuanto a protección, ésta era variable dependiendo de la vía de administración y no eran del todo seguras (Gómez-Casado et al. 2011).

Frente a ellas, las vacunas DNA que contienen el gen de la glucoproteína G de VHSV se presentan como una buena opción, ya que inducen una fuerte respuesta inmunitaria innata de forma temprana (Cuesta and Tafalla, 2009; Lorenzen et al. 2002a), seguida de una respuesta inmunitaria específica más tardía y duradera, con la producción de anticuerpos y activación de células citotóxicas (Lorenzen et al. 1998; Gurunathan et al. 2000; Purcell et al. 2004; Utke et al. 2008).

Así, se produjo y se comercializa para la salmonicultura en Canadá la primera vacuna DNA frente al virus IHNV (APEX-IHN; Novartis Animal Health Canada Inc.). Sin embargo, esta vacuna no está autorizada en Europa, ya que los peces vacunados con DNA tienen la consideración de alimentos transgénicos (EFSA 2013a, 2013b). A esta falta de seguridad, también hay que sumarle otros aspectos derivados de la dificultad en su administración, que deben optimizarse para que el uso de estas vacunas sea rentable.

Por otra parte, todavía se desconocen aspectos claves de la patogenia de VHSV, entre los cuales uno fundamental es entender el proceso que lleva a la infección sistémica desde el punto de entrada del virus, que parece ser principalmente las bases de las aletas (Harmache et al. 2006).

Aunque se han realizado numerosos estudios para comprender esos aspectos antes mencionados, la obtención de datos a partir de la experimentación *in vivo* no está exenta de dificultades, ya que los peces presentan una elevada variabilidad en sus respuestas dependiendo de numerosos factores endógenos (cepas, ciclos sexuales) y ambientales (temperatura, fotoperioro, contaminantes en el agua...) (Anderson, 1990; Bowden, 2008; Bowden et al. 2007).

Además, el hecho de que los peces vacunados con DNA se consideren organismos genéticamente modificados exige que la experimentación con los mismos se realice bajo medidas de control muy estrictas, conforme a las normativas de la Comisión Europea.

Por ello, la experimentación *in vitro* se presenta como una buena alternativa ya que permite controlar las condiciones experimentales, obtener resultados repetitivos y ajustarse a la política europea de reducción y reemplazo de los animales de laboratorio.

Dentro de ese contexto, el propósito del presente trabajo de Tesis Doctoral es:

- Desarrollar y utilizar novedosas metodologías de investigación para obtener nuevos modelos de contraprueba *in vitro*, que permitan minimizar todo lo posible el uso de peces durante las pruebas de inmunización/infección para el desarrollo de vacunas DNA contra la septicemia hemorrágica viral.

Este propósito enlaza con las dos situaciones expuestas arriba: la búsqueda de vacunas DNA eficaces para la acuicultura y el uso de métodos alternativos a la experimentación animal, desde un abordaje multidisciplinar desde los campos de la biología celular, inmunología y la virología, utilizando como modelo la inmunización genética de trucha arcoíris con el gen de la glucoproteina G de VHSV.

Ese modelo experimental ha sido denominado "modelo trucha arco iris/ rhabdovirus de la septicemia hemorrágica vírica" por parte de los grupos de investigación de los proyectos coordinados AGL2008-03519-C04-04 y AGL2011-28921-C03-02, financiados por el Plan Nacional de I+D+i 2008-2011, en cuyo marco se desarrollan estudios para la optimización de vacunas DNA frente a virus de peces (http://www.imtra-vac.unileon.es/), incluidos los de esta Tesis.

Por otra parte, el trabajo realizado en la Tesis continúa con una de las líneas experimentales del grupo de investigación en el que se ha realizado, que persigue desarrollar cultivos celulares de salmónidos como modelos para estudios de inmunología que permitan profundizar en aspectos básicos de la protección, eficiencia y seguridad de las vacunas en acuicultura y de patogenia *in vitro*.

Con el fin alcanzar el proposito de la Tesis, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Desarrollar una metodología estandarizada que permita el establecimiento a largo plazo de cultivos y líneas celulares bien caracterizados de tegumento de aleta de trucha arcoíris, dado que sus tejidos constituyen una puerta de entrada principal de rhabdovirus a los salmónidos.

2. La utilización de una línea celular derivada de aleta de *O. mykiss* para analizar su susceptibilidad diferencial a la infección por virus de peces y caracterizar la infección temprana por VHSV, con la finalidad de aportar nueva información que permita comprender mejor el papel que juegan las células del tegumento de las aletas en las primeras fases de la infección viral, previas a la diseminación del virus por el resto del organismo.

3. La utilización de una línea celular derivada de la aleta de *O. mykiss* para realizar estudios de mejora de la eficacia de la transfección con vectores codificantes para la gluproteína G de VHSV y analizar las respuestas inmunitarias inducidas frente a VHSV, con el fin de aportar nueva información que permita comprender mejor los mecanismos inmunológicos puestos en marcha por vacunas DNA en el órgano diana inicial de VHSV.

Capítulo I

Capítulo I: Obtención de cultivos primarios de aleta de trucha arcoíris y caracterización de una línea celular de aleta

1. Introducción

Las primeras barreras de defensa de los peces frente a las agresiones externas, como lo son la epidermis y los epitelios de las diferentes de las mucosas, tienen una gran importancia, ya que no sólo participan en el mantenimiento de la homeostasis del organismo, sino que intervienen en los procesos de relación con agentes patógenos y sustancias tóxicas presentes en el medio acuático.

Son numerosas las enfermedades y procesos patológicos descritos que afectan a dichos tejidos, lo que puede ser importante para la penetración al interior del organismo de patógenos, ya que las alteraciones de los epitelios expuestos al medio externo les proporcionan una posible vía de entrada. Tal es el caso de algunos virus que afectan a salmónidos, como los virus causantes de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) y de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). En el caso de IHNV, se han realizado ensayos de bioluminiscencia mediante los cuales se ha conseguido demostrar que las aletas son los puntos de entrada del virus, ya que a las pocas horas tras la infección son el único tejido en el que se detecta el virus (Harmache et al. 2006). Recientemente, se han desarrollado trabajos en los que se ha descrito que el tejido de la base de las aletas es la vía de entrada del VHSV, habiéndose detectado la replicación de este virus en los tejidos de la piel, especialmente en la dermis (Montero et al. 2011a).

También se ha descrito que la piel y las aletas son los primeros tejidos en ser afectados por etiologías bacterianas, como se ha demostrado recientemente para el patógeno *Yersinia ruckeri*, agente causal de la enfermedad entérica de la boca roja o yersiniosis (Khimmakthong et al. 2013) y en la infección por *Flavobacterium psychrophilum*, agente etiológico de la enfermedad bacteriana de las aguas frías (BCWD) y del síndrome de los alevines de trucha arcoíris (RTFS), cuyos signos clínicos consisten en ulceraciones en la piel del tronco y de los bordes de la aleta caudal (Aoki et al. 2005; Martínez et al. 2004).

Sin embargo, a pesar de ser numerosos estos procesos patológicos y de los costes económicos que conllevan, todavía no se conocen con profundidad muchos de los mecanismos moleculares y celulares mediante los cuales los agentes patógenos pueden anclarse a las barreras epiteliales externas y atravesarlas, causando finalmente enfermedad en los peces.

Por otra parte, el estudio de la patogenia, incluida la respuesta del hospedador *in vivo*, implica numerosos factores endógenos y exógenos, como la sensibilidad de los animales al estrés y a las condiciones experimentales, la temperatura, el fotoperiodo o la calidad del agua entre otros, los cuales influyen en las respuestas observadas (Bowden, 2008; Bowden et al. 2007).

Esto supone un problema a la hora de utilizar los peces como animales de experimentación, al que se suma la elevada variabilidad intra- e interespecífica, en función de la especie y condiciones ambientales en el origen de captura y/o de mantenimiento (Anderson, 1990; Hedrick, 1998). Frente a estos problemas, los modelos *in vitro* son sistemas experimentales que permiten un mayor control de las condiciones de los ensayos, la reducción de la variabilidad de las respuestas debido al estrés de los animales y la posibilidad de realizar numerosos ensayos repetitivos en un plazo de tiempo corto (Villena, 2003; Lee et al. 2009).

Sin embargo, existe una dificultad asociada a este tipo de experimentación para correlacionar los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* con la situación real *in vivo*. Esta problemática se acentúa cuando se usan líneas celulares estables, formadas por un solo clon o tipo celular y, generalmente, en cultivos en monocapa (bidimensionales), en los que no se reproducen las complejas interacciones celulares que se dan en los tejidos y en los órganos del animal vivo.

Por ese motivo se ha postulado que los cultivos histotípicos u organotípicos, al estar formados por diferentes poblaciones celulares, y frecuentemente en forma de cultivos tridimensionales, reproducen de manera más fiel el escenario fisiológico real y son mejores para predecir resultados *in vivo* (Fierro-Castro et al. 2012; Yamada and Cukierman, 2007).

Teniendo en cuenta que los cultivos de células de aleta pueden constituir una alternativa a la costosa, y en ocasiones tediosa, experimentación *in vivo*, sería útil establecer nuevos modelos experimentales para desarrollar ensayos *in vitro* que permitan un mayor conocimiento sobre los mecanismos patogénicos, los mecanismos de defensa del huésped y la interacción entre ellos, para su posterior aplicación en estrategias preventivas y de control sanitario de los peces de interés económico.

Por ello, el objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología para establecer cultivos primarios y subcultivos de células de aleta de trucha arcoíris, *O. mykiss*, para la realización de ensayos de patogénesis e inmunológicos de interés para la protección de peces cultivados, que al mismo tiempo permitan mantener al animal donante vivo, de forma que se puedan establecer comparaciones entre los resultados *in vivo* e *in vitro*.

2. Material y métodos

2.1. Animales

Para el desarrollo de la parte experimental de este trabajo se han utilizado alevines de trucha arcoíris (n=100), *Onchorynchus mykiss (Walbaum)*, de un tamaño aproximado de 15 cm, procedentes de la piscifactoría comercial "Los Leoneses", situada en Castrillo del Porma (León).

Los peces fueron mantenidos en las instalaciones para organismos acuáticos del área de Biología Celular, en la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León, en tanques de polietileno de 100 L de capacidad y con una densidad máxima de 15 animales por tanque (Fig. 13), a los que se suministraba agua no clorada, a una temperatura de 14 ± 2°C, proveniente de un pozo artesiano situado en el Campus de Vegazana (León).

Se utilizó un fotoperiodo de luz artificial de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Las truchas fueron alimentadas cada 48 horas con pienso comercial granulado adecuado para el peso y tamaño de los individuos (Trouw Skretting España S.A.).

Fig. 13. Instalaciones del acuario para el estudio de patologías infecciosas en peces del Área de Biología Celular utilizadas para el mantenimiento de las truchas, mostrando los tanques utilizados (izquierda) y la densidad de animales típicamente utilizada.

Todos los animales pasaron un periodo de aclimatación de dos semanas y fueron examinados diariamente para detectar cualquier posible signo de enfermedad.

El manejo de los animales se realizó conforme a la normativa por la que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (en el momento de realizar las tareas experimentales, el R.D. 1201/2005, de 10 de octubre, derogado ahora por el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero). Previamente a cualquier procedimiento experimental, los animales fueron anestesiados por inmersión en una solución de metilsulfonato de tricaína (Sigma), a dosis de 60 mg/L para anestesiar o de 200 mg/L para el sacrificio.

2.2. Obtención de cultivos primarios a partir de explantes de aleta

Los cultivos primarios se establecieron a partir de explantes de aleta anal de trucha arcoíris (Fig. 14), manteniendo por separado los explantes y subcultivos correspondientes de cada animal.

Los fragmentos de la aleta se obtuvieron en condiciones estériles, trabajando en cabina de flujo laminar vertical y fueron mantenidos en tubos Eppendorf con medio de lavado consistente en medio RPMI-1640 (Sigma) o DMEM (Sigma) suplementado con 50 μg/mL de gentamicina (GIBCO) y 2 μg/mL de anfotericina B (GIBCO).

Fig. 14. Obtención de una porción de la aleta anal.

Para la obtención de los explantes se realizaron 3 lavados en medio de lavado y se eliminó mecánicamente el mucus usando hisopos estériles. Seguidamente, el fragmento de aleta fue troceado con bisturí en explantes de 1 mm^3 aproximadamente, los cuales se dispusieron en placas de 12 pocillos (Costar), en un ratio de 6 explantes por pocillo (Fig. 15), donde se dejaron unos minutos sin medio de cultivo de explantes para favorecer su adherencia al plástico.

Fig. 15. Explantes de aleta adheridos a la placa de cultivo durante el proceso de establecimiento de cultivos primarios.

Posteriormente se añadieron a cada pocillo, gota a gota, para evitar que los explantes se despegasen, 200 µL de medio de cultivo, con DMEM o con RPMI-1640 y los componentes indicados en la Tabla I. Los cultivos se incubaron durante 3 días a 18°C, en atmósfera de aire, tras los cuales se añadió a cada pocillo 1 mL de medio de cultivo de explantes y se prosiguió la incubación.

Solución stock	Concentración final
Suero Fetal Bovino (FCS)	30% (v/v)
L-Glutamina 200 mM	2 mM
Piruvato sódico 100 mM	2,5 mM
2-Mercaptoetanol 50 mM	50 µM
Solución de nucleósidos (A,C,G,U)	0,1% p/v
Gentamicina 10 mg/mL	50 µg/mL
Anfotericina B 250 µg/mL	2 µg/mL
HEPES 1M	25 mM
DMEM o RPMI-160	Hasta 100 mL

Tabla I. Medio de cultivo utilizado para iniciar cultivos primarios a partir de explantes de aleta de trucha arcoíris, usando DMEM o RPMI-1640.

A los tres días, y a partir de muestras de 15 animales donantes, se hizo un recuento de los explantes que estaban rodeados por células adherentes y se expresó como el porcentaje total de explantes sembrados de un determinado pez, para calcular la eficiencia del método para obtener los cultivos primarios (Mauger et al. 2006).

2.3. Subcultivo de células de aleta

Una vez obtenida una monocapa confluente, los cultivos primarios fueron disociados con una solución de tripsina-EDTA al 0,05-0,02% (Biochrom), tras lo cual se añadió medio de cultivo para inactivar la tripsina y se juntaron las células y los restos de los

explantes de 4 pocillos procedentes de un mismo pez en un frasco de cultivo T12 con 2 mL de medio.

Una vez alcanzada la confluencia del primer pase, se procedió a disociar las monocapas de igual manera a la indicada anteriormente y las células fueron lavadas con PBS por centrifugación a 300 g durante 10 minutos a 4°C. A partir del tercer pase se determinó la viabilidad mediante el método de exclusión de azul tripán y se sembraron $5x10^5$ células viables en frascos de cultivo T25 con 5 mL de medio.

A partir del tercer pase, para el mantenimiento de las líneas celulares obtenidas se utilizó un medio de cultivo celular modificado, con DMEM y los mismos componentes indicados en la Tabla I, pero variando la concentración de FCS y suplementando el medio con factor de crecimiento epidérmico (EGF, ref. 354001 BD Biosciences). Se ensayaron tres porcentajes de FCS (10%, 15% y 20%). Tras seleccionar el porcentaje más idóneo de este (20%), se testaron las concentraciones de EGF indicadas en la Tabla II, manteniendo las mismas condiciones de cultivo (18°C y atmósfera de aire).

EGF (ng/mL)
10
50
75
100

Tabla II. Concentraciones ensayadas de factor de crecimiento epidérmico con medio DMEM suplementado con un 20% de FCS.

Las diferentes líneas obtenidas, procedente cada una de ellas de una trucha, se identificaron individualmente con código alfanumérico.

2.4. Criopreservación

Para determinar la capacidad de las células de aleta para ser criopreservadas se utilizaron cultivos en la fase exponencial de crecimiento, recogiendo las células por tripsinización, como se ha indicado anteriormente. Se determinó su viabilidad y se resuspendieron a una concentración de 10^6 células/mL en un medio de congelación frío compuesto por FCS y 10% de DMSO (Sigma). Después de mezclar muy suavemente, se hicieron alícuotas de la suspensión celular de 1,5 mL que fueron dispensadas en viales de plástico estériles de 1,8 mL (Corning). Las ampollas se colocaron en una caja de poliestireno y se almacenaron a -80°C durante una noche y a las 24 horas fueron transferidas al tanque de nitrógeno líquido a -196°C. Los

crioviales se retiraron del nitrógeno a los 3 meses de almacenamiento, y se descongelaron rápidamente bajo un chorro de agua corriente.

La viabilidad de las células tras la descongelación se determinó mediante el ensayo de exclusión de azul tripán y el contenido de la ampolla fue inmediatamente transferido a un frasco de cultivo T12 con medio de cultivo e incubado en las condiciones antes indicadas.

2.5. Curva de crecimiento

Para estudiar la dinámica de crecimiento, las células se sembraron en placas de 12 pocillos, a una densidad de 75.000 cél/pocillo con 1 mL de medio de cultivo y se incubaron 24 horas a 18°C en atmósfera de aire para permitir su adherencia a la placa. Tras ello, se recogieron cada 24 horas mediante tripsinización y se juntaron las células de 3 pocillos para contar las células viables mediante la tinción de exclusión con azul tripán.

2.6. Caracterización de las líneas celulares

Inmunocitoquímica. Para la caracterización inmunocitoquímica se utilizaron anticuerpos primarios contra marcadores específicos de características epiteliales y conjuntivas, mediante la técnica de la inmunoperoxidasa, utilizando diaminobencidina (DAB) para visualizar el marcaje y ensayando diversas diluciones y condiciones de incubación de los anticuerpos para optimizar los resultados. El método de fijación de las células, los anticuerpos utilizados y las condiciones finales utilizadas se muestran en la Tabla III.

Fijación	Anticuerpo 1º	Dilución y condiciones de incubación	Anticuerpo 2º	Dilución y condiciones de incubación
Acetona fría **10 min a -20°C** **Secado al aire**	Conejo anti-panqueratina (ref. Z0622, Dako)	1:500 en PBS + 1%BSA 1 hora Tª ambte	Anti-Ig de conejo conjugado con peroxidasa	1:40 30 min en PBS 0,16M
Paraformaldehído al 4% **10 min a Tª ambte.**	Ratón anti-vimentina (ref. M7020, Dako)	1:1000 en PBS + 1%BSA 1 hora Tª ambte	Anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa	1:200 30 min en PBS 0,16M

Tabla III. Anticuerpos y condiciones utilizadas para la caracterización inmunocitoquímica de las líneas celulares.

Las células se sembraron en placa de 96 pocillos a una densidad de 25.000 células por pocillo y se dejaron incubar durante 24 horas antes de proceder a la realización de la técnica.

Tras fijar las monocapas en las condiciones indicadas se lavaron los pocillos con PBS durante 5 minutos y las células se permeabilizaron con una solución de PBS + 0,5% TritonX-100 (Scharlau) durante 5 minutos. Acto seguido, las células se incubaron con el anticuerpo primario en las condiciones indicadas. A continuación, se retiró el medio de incubación y se lavaron los pocillos 3 veces con PBS durante 5 minutos, y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario en las condiciones mostradas en la Tabla III. Finalmente, se retiró el medio y se lavaron las células 3 veces con PBS durante 5 minutos. La actividad peroxidasa se puso de manifiesto utilizando 3-3' diaminobencidina tetrahidroclorhídrica (Sigma) a una concentración de 0,5 mg ml^{-1} en tampón Tris-HCl 0,05M, pH 7,6 con un 0,03% de peróxido de hidrógeno.

Como controles positivos se utilizaron secciones en parafina de tegumento de trucha arcoíris. El desenmascaramiento antigénico se realizó conforme a las instrucciones del fabricante (Dako). Para ello, los cortes de tejido se sumergieron en un baño maría con tampón citrato 10 mmol/L a pH 6 durante 30 min a 80°C. Tras lo cual, la peroxidasa endógena fue inhibida durante 10 minutos, con una solución de peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol. En todos los casos se realizaron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario.

Histoenzimática. Para la caracterización histoenzimática se realizaron tinciones específicas para detectar las actividades enzimáticas fosfatasa ácida (ACPH) (Barka and Anderson, 1962), α-naftil acetato esterasa inespecífica (ANAE) (Pearse, 1972) y fosfatasa alcalina (AKPH) (Burstone, 1958). El método de fijación de las células, los sustratos enzimáticos utilizados y los tampones empleados se muestran en la Tabla IV.

Las células se sembraron en portas con cámaras (Costar), a una densidad de 20.000 células/cámara, y se dejaron incubar durante 4 días antes de proceder a la realización de la técnica.

Tras fijar las monocapas con formol de Baker (formalina tamponada al 10% suplementada con 20% de cloruro cálcico), las células se incubaron con la solución de reacción durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se retiró esta solución y se lavaron las células con agua destilada 5 minutos. Se procedió posteriormente a contrastar los núcleos con hematoxilina durante 3 minutos y, finalmente, se lavaron las células con agua destilada durante 5 minutos, se retiraron las cámaras y se montaron los portas con glicerina.

Fijación	Actividad enzimática	Sustrato	Condiciones de incubación
Formol de Baker **30 min 4°C**	ACPH	Naftol As-BI fosfato 0,5 mg/mL	pH 5,0
Formol de Baker **30 min 4°C**	ANAE	α-Naftil acetato 0,25 mg/mL	pH 6,5
Formol de Baker **30 min 4°C**	AKPH	Naftol As-BI fosfato 0,1 mg/mL	pH 8,3

Tabla IV. Condiciones utilizadas para la caracterización histoenzimática de las líneas celulares de *O. mykiss*.

Como controles positivos de las reacciones histoquímicas se utilizaron secciones de criostato de bazo de rata, que fueron incubadas en los diferentes medios de reacción indicados en la Tabla IV, pero a 37°C, y cultivos en portas con cámaras de las líneas TSS y TPS-2, derivadas de estroma de bazo y pronefros de trucha arcoíris respectivamente (Carracedo, 2003), que se incubaron como se indica en dicha tabla. Los cortes de tejido fueron deshidratados en alcoholes, aclarados en xilol y montados con glicerina. Los cultivos de las líneas TSS y TPS-2 se procesaron de la forma indicada para los cultivos de aleta. En todos los casos se realizaron controles negativos omitiendo el sustrato correspondiente en la solución de reacción.

Para la observación microscópica se utilizó con un microscopio Nikon Eclipse TE300 equipado con una cámara digital Nikon Digital Sight.

2.7. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Para la extracción del RNA total se utilizó el método del Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron lisadas con Trizol, y tras incubar 5 minutos a temperatura ambiente se añadió cloroformo. Tras una breve incubación a temperatura ambiente, se recogió la fase acuosa en donde se encuentra el RNA. Este fue precipitado con isopropanol, y tras varios lavados con etanol, el pellet fue resuspendido en agua libre de RNAsas y almacenado a -80°C hasta su uso.

El RNA obtenido se cuantificó utilizando un equipo NanoDrop ND-1000 y se determinó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (Fig. 16).

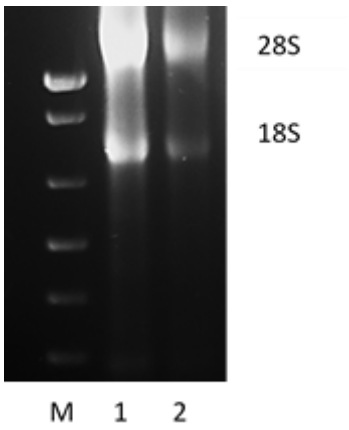

Fig. 16. Ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de muestras de RNA obtenidas de células de aleta de trucha arcoíris (carriles 2 y 3). En el carril 1 se cargó un marcador (M) de peso molecular (1Kb). El RNA aparece como un conjunto de bandas, con un rango de tamaño que se extiende desde 5 kilopares de bases a 600 pares de bases.

Se realizó una retrotranscripción de los RNAs obtenidos previamente, obteniéndose el cDNA que sirvió como molde de la reacción. Para ello se utilizó la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen).

Se incubaron 5 µg de RNA total con 1µL de oligo (dT) 12-18 (0,5 mg/mL, Invitrogen) y una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP´s) 10 mM durante 10 min a 70°C. Después de la incubación, se añadieron 4 µL de tampón de RT 5X, 2 µL de ditiotreitol (DTT) 0,1 M y 1 µL de la RNaseOUT inhibidor de la ribonucleasa recombinante (Invitrogen) y se incubó durante 2 min a 37°C. A continuación, se añadió 1 µL de M-MLV enzima transcriptasa inversa y la mezcla se incubó a 37°C durante 60 min. La reacción se detuvo por calentamiento a 70°C durante 15 minutos, y el cDNA resultante se almacenó a -20°C hasta su uso. En todos los casos, se utilizaron dos controles: un control negativo al que no se añadía RNA, para comprobar que no se formaban dímeros de cebadores, y un control retrotranscriptasa negativo, que contenía RNA pero no la enzima, para comprobar que no hubiera contaminación por DNA genómico.

2.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la detección de la expresión de genes de interés mediante la técnica de PCR se utilizaron los cebadores indicados en la Tabla V, empleando un termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), el kit Taq DNA Polimerasa (Invitrogen), conforme a las instrucciones del fabricante, y la mezcla general de reacción indicada en la Tabla VI.

Cebadores	Secuencia	Referencia
Colágeno-Iα_1	F: CAGGGACCTGGTGGCCCCTT R: TCTCCTGAGCGGGCTGAGCA	GeneBank AB052835.1
Citoqueratina –II$_{E1}$	F: AGGACATCGCCAACCGCAGC R: TTCCACCTCCAGTTCCACCTCCG	GeneBank AJ272369
Fibronectina II	F: CTGAACATCAGATCAACCAGG R: GTTGTTCTGTATGCTGTCCAG	Liu et al. 2003
β-Defensina	F: GGTTTTCCTATTGCTTAATGTTGTGG R: GACACACAGTTAAGTCATGG	Casadei et al. 2009
Cathelicidina-1	F: CTGACCTGTCTACATTTGTTTG R: GCGATTTCCATCACTGTGATCTCT	Chang et al. 2005
IL-1β	F: CTGAAGCCAGACCTGTAGCC R: GCAACCTCCTCTAGGTGCAG	Cuesta y Tafalla, 2009
TNFα	F: AGCATGGAAGACCGTCAACGAT R: ACCCTCTAAATGGATGGCTGCTT	Purcell et al. 2004
IL-8	F: GAATGTCAGCCAGCCTTGTC R: TCCAGACAAATCTCCTGACCG	Lindenstrøm et al. 2004
IFN-I	F: AGTTCCTGTGTATCACCTGTCG R: GATGCTCAGTACATCTGTCCCA	Castro et al. 2011
Mx1-3	F: TGAAGCCCAGGATGAAATGG R: TGGCAGGTCGATGAGTGTGA	Ortega-Villaizán et al. 2009
EF-1α	F: GATCCAGAAGGAGGTCACCA R: TTACGTTCGACCTTCCATCC	Chaves-Pozo et al. 2010a

Tabla V. Genes analizados y cebadores utilizados para los análisis de expresión génica en los cultivos de aletas de *O. mykiss*.

Solución	Concentración stock	Volúmen
Tampón	10x	2,5 µL
Primer Fw	10 µM	1,25 µL
Primer Rv	10 µM	1,25 µL
dNTP's	10 µM	0,75 µL
MgCl2	50 mM	1 µL
Taq polimerasa	5 U/ µL	0,15 µL
cDNA		1,1 µL
agua		Hasta 25 µL

Tabla VI. Composición de la mezcla de reacción de PCR

Las condiciones generales de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min, 40 ciclos de 94°C durante 1 min, 60°C 45 s y 72°C de extensión durante 1 min, seguidos de una extensión final de 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio bajo luz UV.

Para la cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés, respecto al gen del factor de elongación EF-1α usado como referencia, se empleó la técnica de PCR

cuantitativa utilizando el kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen). La formulación general de la mezcla de reacción contenía 10 µL de 2x Master Mix Sybr Green, 0,4 µL de cada primer, 2 µL de cDNA y agua hasta un volumen de 20 µL. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) y las condiciones generales fueron un ciclo de desnaturalización de 10 min, 95°C, 40 ciclos de amplificación a 95°C, 15 s y una curva de disociación final.

2.9. Ensayos de transfección

Para los ensayos de transfección se utilizó el plásmido pMCV1.4-GFP (Falco et al. 2009) cedido por la Dra. Amparo Estepa del Laboratorio de Virología de Peces del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, en los que la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) se encuentra bajo una versión (MCV1.4) del promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (CMV) que incluye un intron sintético de la cadena de la inmunoglobulina-globina humana (Ruiz et al. 2008).

Se ensayaron diversos sistemas para transfectar las células cultivadas de aleta, que se indican en la Tabla VII.

Método	Ratio µL reactivo / µg plásmido	Condiciones
Lipofectamina LTX + Plus	2,5:1	Incubar 15 min
(ref. 15338-100, Invitrogen)	1:1	Incubar 30 min
Fugene HD **(ref. E2313,Promega)**	2,5:1	Incubar 15 min
XtremeGENE HP **(ref. 06365752001, Roche)**	2,5:1	Incubar 30 min

Tabla VII. Métodos de transfección y condiciones ensayadas en las líneas celulares de aleta de *O. mykiss*.

Los ensayos se realizaron directamente en pocillos de placas de 96 o de 24 pocillos conteniendo monocapas subconfluentes (70 – 80%). Previamente se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se añadió medio de cultivo sin antibióticos. Las mezclas de plásmidos con reactivos de transfección se realizaron en tubos Eppendorf en medio Opti-MEM (Invitrogen) y tras los correspondientes tiempos de preincubación, fueron añadidos a las células gota a gota y se dejaron incubar 24 horas en las condiciones de

cultivo habituales. Tras esta primera incubación, se cambió el medio de cultivo a las células y se añadió el medio de cultivo rutinario (20% FCS).

Tras la transfección, las células fueron cultivadas a 18°C y observadas diariamente utilizando un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U, provisto con un sistema de epifluorescencia y una cámara digital (Nikon DS-1QM).

2.10. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, expresados como media y desviación estándar, se realizó mediante el test estadístico t de Student. El nivel de significación utilizado fue para $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Establecimiento de cultivos celulares de aleta

A partir de la técnica de los explantes de tejido cultivados *in vitro* fue posible la obtención de numerosos cultivos primarios de aleta de trucha arcoíris. En todos los cultivos primarios obtenidos se observó que compartían un patrón de crecimiento muy similar. A partir de las 24 horas, se observaron células que migraban a partir de los bordes de los explantes, formando monocapas incipientes. Acompañando a estas células en migración se observaba una cantidad variable de mucosidad, que se mantuvo mientras el explante estuvo presente (Fig. 17).

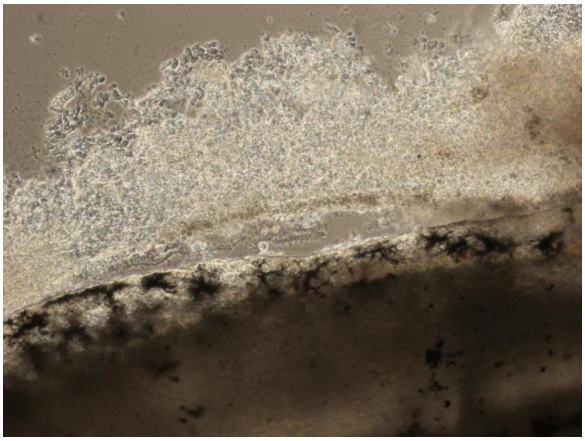

Fig. 17. Crecimiento celular a partir del explante de aleta. Se observa la presencia de mucus sobre las células en migración que enturbia la observación de la zona de crecimiento (100x).

Dichas células tenían una morfología redondeada y compacta, aunque también se observó en el explante la presencia de abundantes células con numerosas proyecciones citoplasmáticas, que contenían un material pigmentario de color pardo negruzco y que fueron identificadas como melanóforos (Fig. 18a). Estas células también migraron, extendiendo sus proyecciones del citoplasma hacia la placa de cultivo, aunque una vez formadas las monocapas este tipo celular se fue perdiendo con los pases (Fig. 18b).

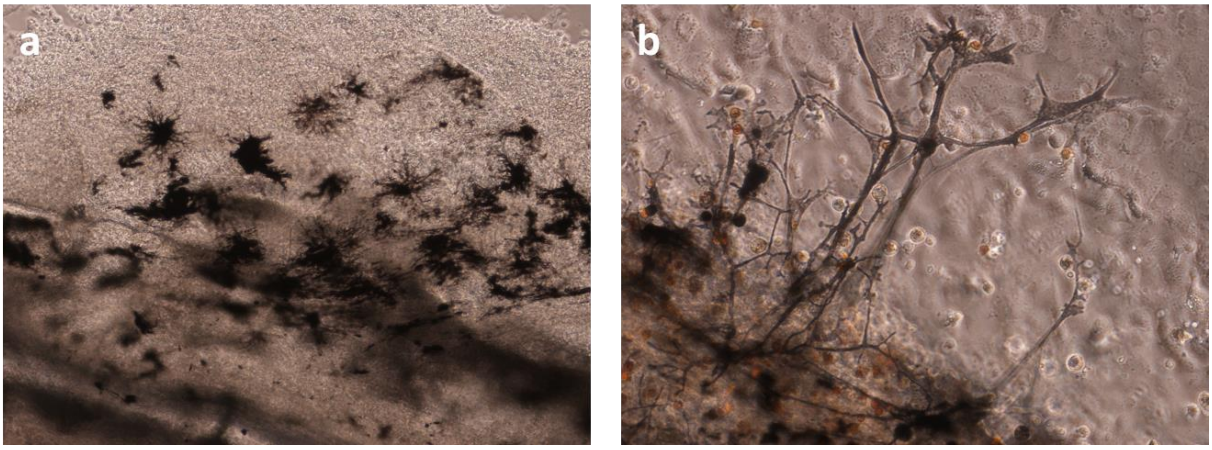

Fig. 18. a: Presencia de células pigmentarias en la zona de crecimiento alrededor del explante (100x). **b**: Melanóforos emitiendo largas prolongaciones desde el explante hacia la zona de crecimiento (100x).

Respecto a la utilización de medio DMEM o RPMI para iniciar los cultivos primarios a partir de explantes, los iniciados con medio RPMI-1640 o bien se despegaron a las pocas horas de cultivo o apenas dieron lugar a migración de células y formación inicial de monocapas. Por el contrario, los explantes incubados con medio DMEM mostraron mayor adherencia y dieron lugar a monocapas, por lo que se eligió este medio base para el establecimiento de cultivos primarios.

A los tres días de cultivo, se observaban alrededor de algunos explantes varias zonas de monocapas, momento en el que se determinó la eficiencia del método para establecer cultivos primarios. En la mayoría de los casos, la eficiencia fue superior al 50% (Fig. 19).

A partir del momento en que aparecían las monocapas se pudo observar la coexistencia de dos morfologías claramente diferenciadas (Fig. 20). Por una parte, células epitelioides, dispuestas de forma compacta en la monocapa, con forma poligonal y cuyos núcleos eran generalmente redondeados y posicionados en la parte central (Fig. 21). Bordeando los acúmulos de células epitelioides se distinguían haces de células fibroblásticas, fusiformes y con núcleos alargados.

La confluencia se alcanzó después de 2 semanas, procediéndose entonces a realizar el primer subcultivo con éxito.

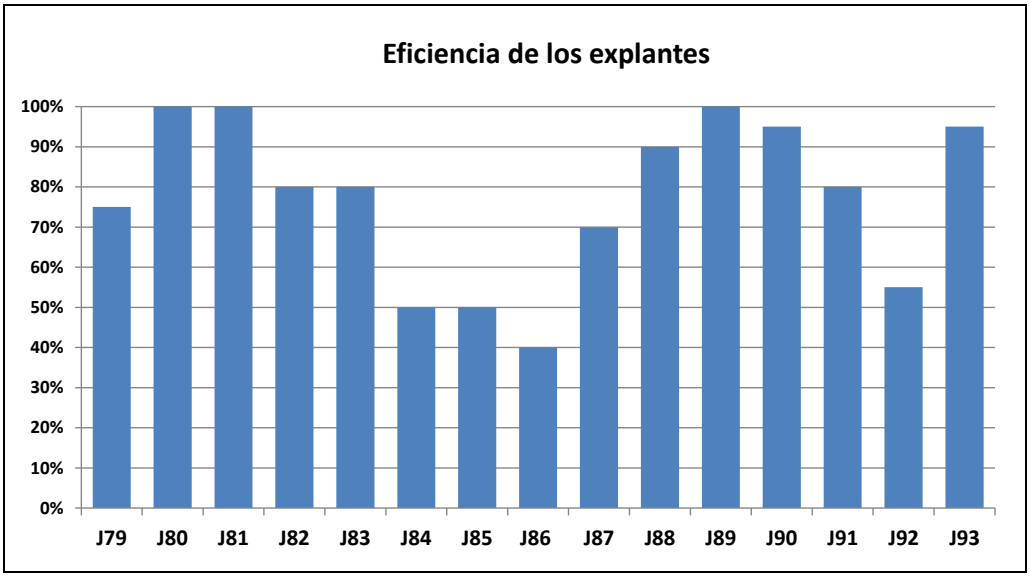

Fig. 19. Eficiencia del método para la obtención de monocapas incipientes a partir de explantes de aleta anal de *O. mykiss*. Cada número representa un animal donante (15) y las barras el porcentaje de explantes que dio lugar a monocapas respecto al total de explantes sembrados.

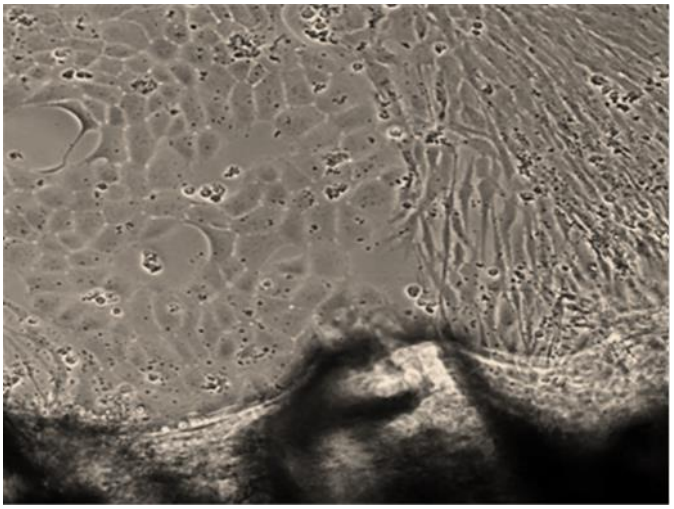

Fig. 20. Imagen de un cultivo primario de explante de aleta de 5 días en el que se observa la presencia de células epitelioides y fibroblásticas en la monocapa que se extiende desde el explante (100x).

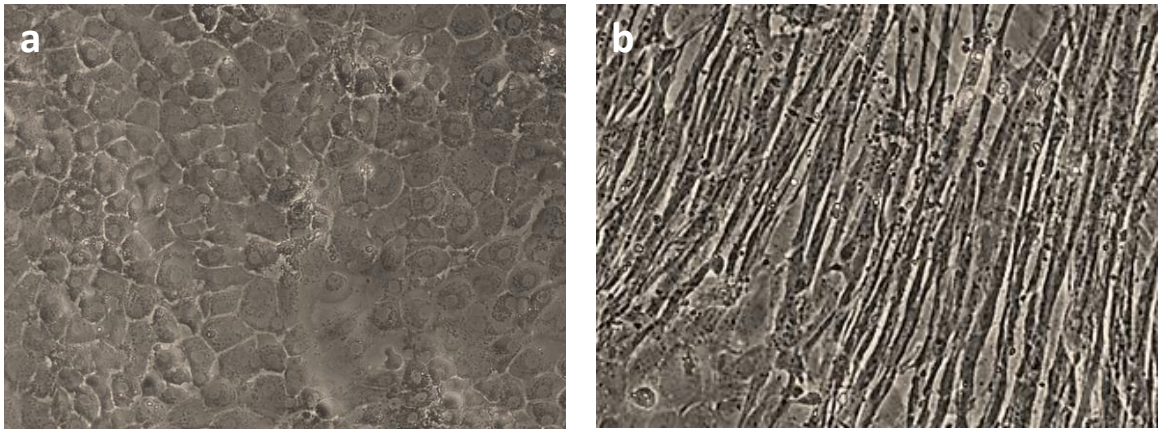

Fig. 21. Cultivos primarios de 7 días formados a partir de explantes de aletas. **a**: Detalle de una monocapa formada por células epitelioides (100x). **b**: Detalle de una monocapa de células fibroblásticas (200x).

3.2. Evolución de las líneas celulares

Después de varios pases, algunas de las distintas líneas primarias fueron perdiendo la morfología mixta que las caracterizaba al inicio y, en la mayoría de ellas, las células con morfología fibroblástica se fueron haciendo predominantes (Fig. 22).

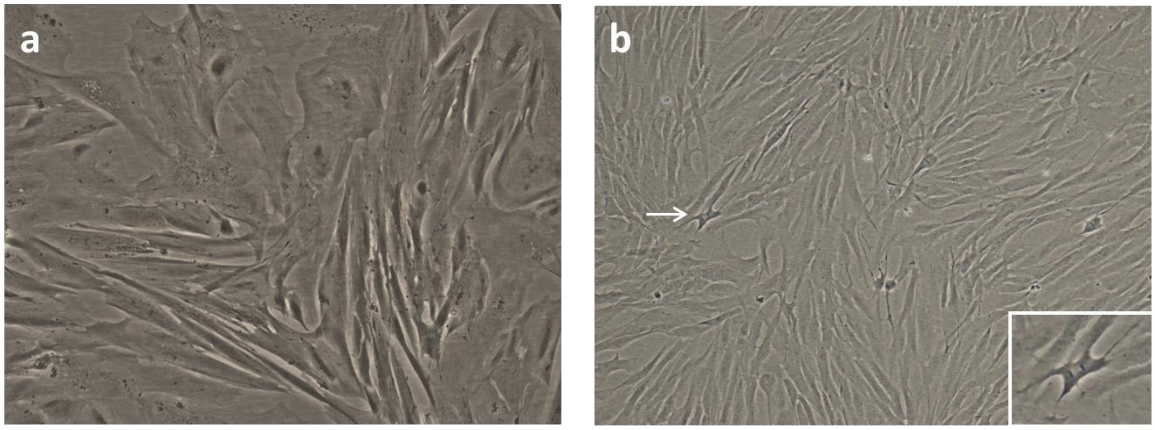

Fig. 22. Morfología de dos líneas celulares procedentes de cultivos primarios de aleta, en las que se observan distintas proporciones de células fibroblásticas. **a:** Línea J55 en pase 4 en la que se observa una igual proporción de células fibroblásticas y epitelioides (200x). **b:** Línea celular J86 en pase 42 en la que se observa la proporción mayoritaria de células fibroblásticas, así como numerosas mitosis indicadoras de actividad celular y crecimiento de la población (100x). Detalle: célula en estado de división celular, fase correspondiente a la anafase de la mitosis (150x).

En los primeros pases, el tiempo requerido por cada línea para alcanzar la confluencia y, por tanto, realizarse un nuevo pase, varió entre las distintas líneas y, en ocasiones, para una misma línea. Así, tras el primer pase, se necesitaron entre 22 y 35 días para realizar el segundo y, generalmente, entre 15 y 20 días para los siguientes (Fig. 23).

Todos los cultivos celulares consiguieron alcanzar el pase 3. En este pase se realizó un cambio en la composición del medio de cultivo, ensayándose diferentes

concentraciones de FCS en las líneas J86, J81 y J79. Las líneas tuvieron un crecimiento lento cuando fueron incubadas con medio suplementado con 10% de FCS. Con medio al 20% de FCS se observó un crecimiento más rápido y se alcanzó un mayor recuento celular (Fig. 24). Cuando fueron incubadas en medio con 15% de FCS se observó un crecimiento rápido inicial, seguido de una disminución del ritmo de crecimiento, con un recuento celular semejante al obtenido con un 10% de suero (Fig. 24).

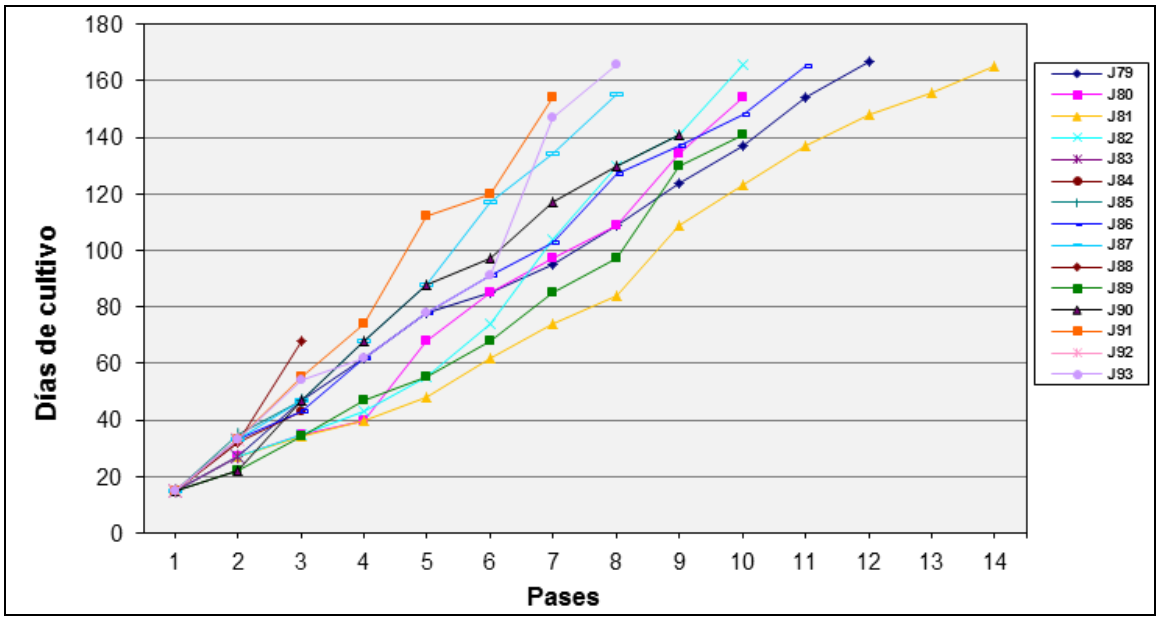

Fig. 23. Dinámica de crecimiento de diferentes líneas celulares establecidas a partir de explantes de aleta durante los primeros 6 meses tras el primer subcultivo, mantenidas con medio DMEM con un 20% FCS.

Con respecto a la utilización de EGF para favorecer el crecimiento de los cultivos, los incubados con medio suplementado con 50, 75 o 100 ng/mL presentaron una mejor morfología y adherencia sin diferencias apreciables entre las concentraciones, por lo que se eligió la concentración mínima (50 ng/mL) para suplementar el medio de mantenimiento.

Tras varios subcultivos, numerosas líneas celulares degeneraron, mostrando sus células aspecto senescente con numerosas vesículas en el citoplasma (Fig. 25).

Entre las líneas celulares que se mantuvieron más allá del quinto pase, destacaron por su ritmo de crecimiento las denominadas J54, J79, J81 y J86. Se eligió ésta última como modelo principal para los estudios posteriores.

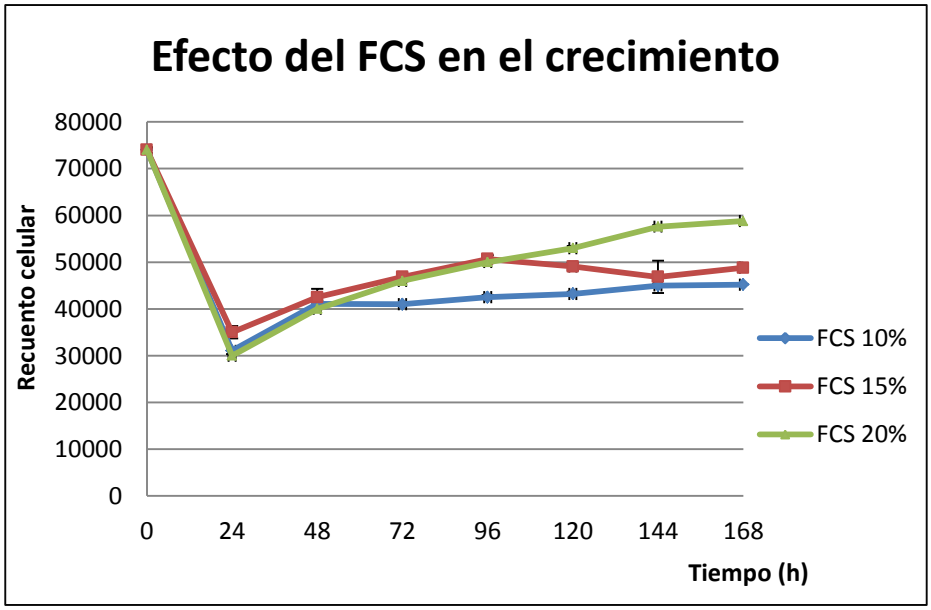

Fig. 24. Curva de crecimiento de las líneas J86, J81, J79 obtenidas de explantes de aleta en el pase 3 hasta 168 horas e incubadas con medio suplementado con diferentes porcentajes de FCS. Cada punto representa la media de 3 recuentos ± el error estándar.

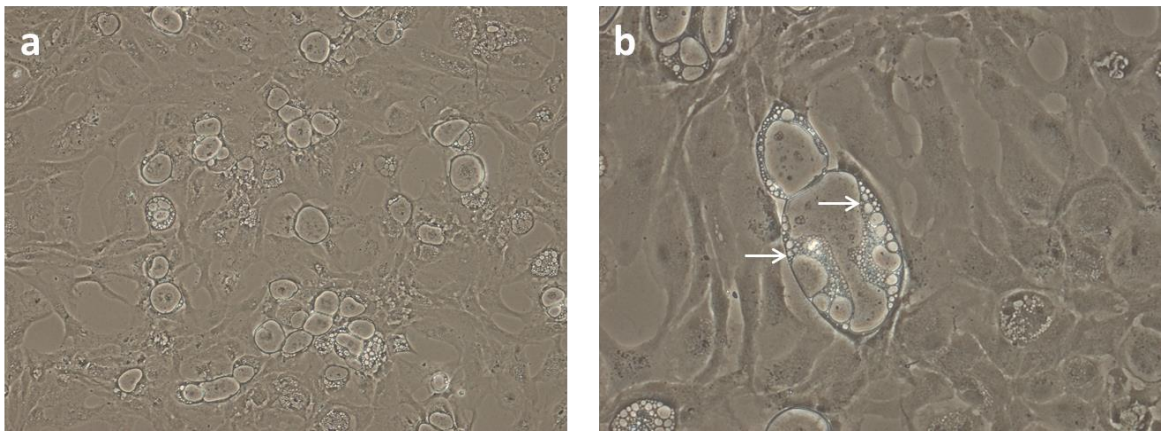

Fig. 25. a: Imagen de un cultivo de la línea J46 en pase 8 de 5 días en el que se observan numerosas células de aspecto senescente (100x). **b:** Detalle una célula en senescencia, con las características vacuolas citoplasmáticas y aumento de tamaño celular (200x).

3.3. Curva de crecimiento de la línea J86

En los estudios de crecimiento se observó que a las 24 horas tras la siembra, el número de células de la línea J86 disminuyó en torno a un 50% respecto al número de células sembradas ($7x10^4$ cél/pocillo). A partir de las 48 horas se observó un crecimiento progresivo y al máximo tiempo de observación (7 días) el número de células recuperaba los valores iniciales (Fig. 26).

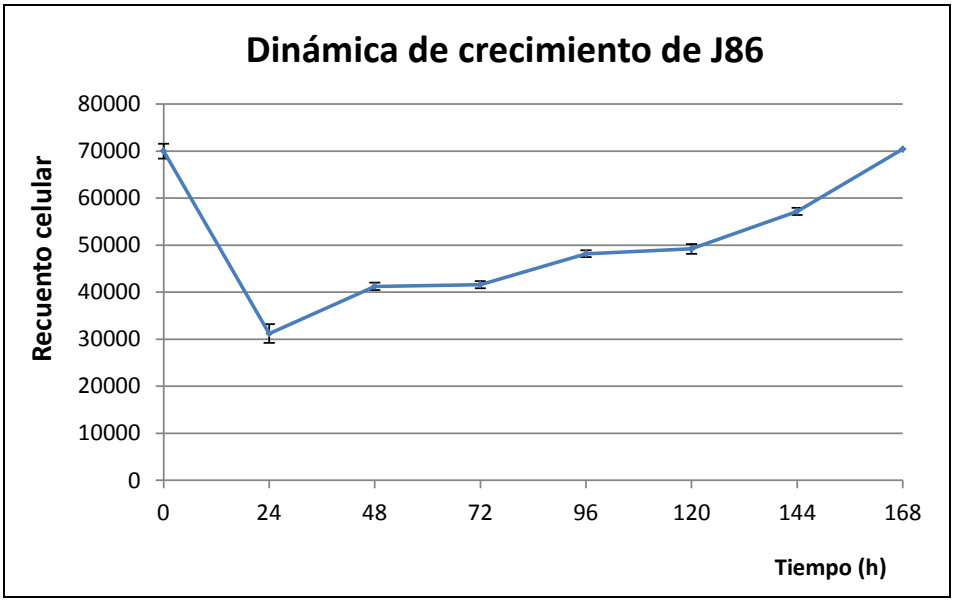

Fig. 26. Curva de crecimiento de la línea J86 en el pase 26 hasta 168 horas tras las siembra en medio DMEM con 20% de FCS, obtenida a partir de tres experimentos independientes. Cada punto representa la media ± el error estándar.

3.4. Viabilidad tras la criopreservación

Para la evaluación de la viabilidad tras la congelación se utilizaron las líneas J55, J51, J57 y J86 en pases tempranos (pases entre el cuarto y décimo). Tras la descongelación, el porcentaje de viabilidad de las distintas líneas celulares había disminuido con respecto a la viabilidad de las células antes de la congelación en todas las líneas, pero encontrándose diferencias significativas entre la pre- y la poscongelación para las líneas J55, J57 y J51 (Fig. 27).

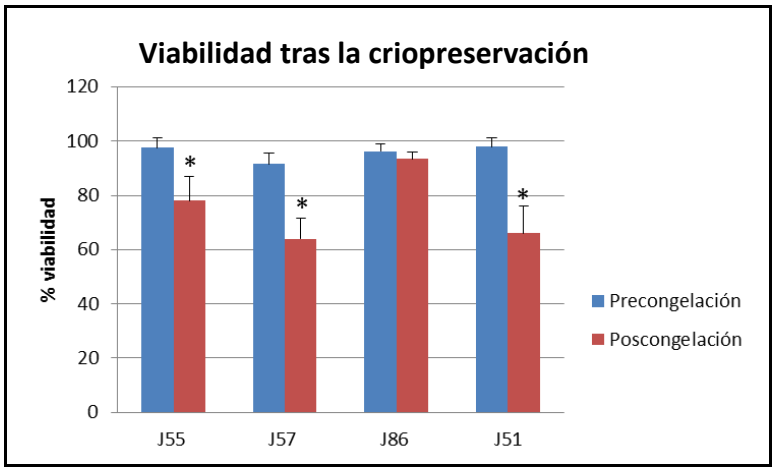

Fig. 27. Porcentaje de viabilidad de las diferentes líneas celulares tras su criopreservación durante un periodo de 3 meses en nitrógeno líquido, medida mediante el colorante vital azul tripán. Las barras rojas representan la media de la descongelación de tres viales ± la desviación estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = $p<0,05$)

Tras la descongelación no se observaron alteraciones en la morfología de las células, que mantenían el aspecto previo a la congelación, reiniciando de nuevo el cultivo.

3.5. Caracterización de la línea J86

Para la caracterización fenotípica de las distintas estirpes celulares presentes en la línea celular J86 se realizaron estudios inmunocitoquímicos para detectar citoqueratinas (anti-panqueratina) y vimentina, y reacciones histoenzimáticas para detectar las actividades fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y α-naftil acetato esterasa inespecífica. Sin embargo, mediante dichas técnicas no se logró detectar inmunomarcaje para ninguno de estos marcadores ni actividad enzimática en la línea J86, aunque sí se observó inmunomarcaje y reacciones positivas en las secciones histológicas y cultivos de las líneas TSS y TPS-2 utilizadas como controles positivos de la técnica (Fig. 28). En los controles negativos para esas técnicas no se observó inmunomarcaje o reacción histoquímica.

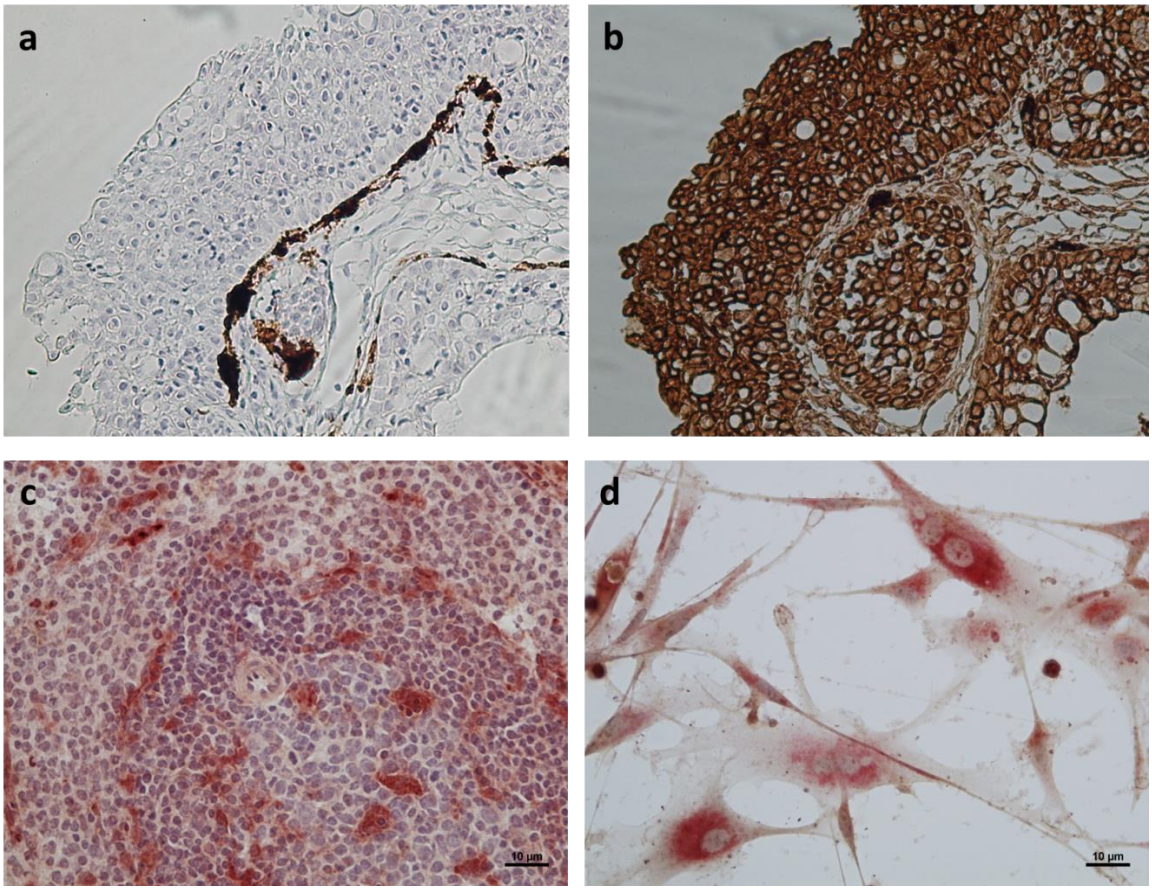

Fig. 28. Imágenes de la detección de los inmunomarcadores y de las actividades enzimáticas en los tejidos y en la línea celular TPS-2 utilizados como controles positivos para las distintas técnicas de fenotipado de la línea J86. **a**. Sección de tegumento de trucha arcoíris con inmunomarcaje positivo frente a vimentina (100x). **b**. Sección de tegumento de trucha arcoíris con inmunomarcaje positivo frente a panqueratina (100x). **c**. Sección de bazo de rata con actividad ANAE positiva (200x). **d**. Demostración de actividad fosfatasa ácida en la línea celular TPS-2 (400x).

El análisis de la expresión génica por PCR demostró que la línea celular J86 expresaba el gen del colágeno-Iα_1, pero no el de citoqueratina-II$_{E2}$ (Fig. 29). En el estudio se incluyeron también otras dos líneas para comparar los resultados. La línea J93 mostró un perfil igual a de la línea J86, mientras que la línea J89 expresaba ambos genes, de forma similar a lo encontrado para la piel de aleta, usada como control positivo.

3.6. Expresión basal de genes reguladores de la respuesta inmunitaria

El estudio mediante RT-PCR semicuantitativa de la expresión génica de las líneas celulares J51, J86, J89 y J93 derivadas de explante de aleta, demostró que expresan de forma basal (sin estimulación específica) algunos genes relacionados con la respuesta inmunitaria, como péptidos antimicrobianos (β-defensina y catelicidina-1), la proteína antiviral Mx, la citoquina proinflamatoria IL-1β o la quimioquina IL-8 (Fig. 30).

Así mismo, se utilizaron dichas líneas celulares para realizar este estudio mediante RT-PCR cuantitativa (qPCR), lo que demostró que dichas líneas expresaban de forma basal un conjunto de genes relacionados con la respuesta inmunitaria (Fig. 31).

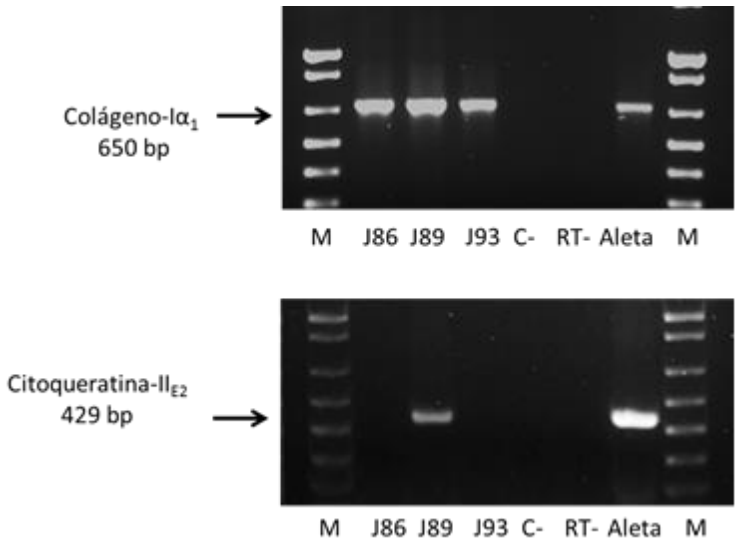

Fig. 29. Expresión génica de Citoqueratina-II$_{E2}$ y de Colágeno-Iα_1 en el pase 3 de distintas líneas celulares de aleta (J86, J89, J93). Los carriles C- y RT- corresponden a los controles usados en la retrotranscripción y en la PCR. Para comparar la expresión se utilizó piel de aleta (Aleta). Los carriles M contienen los marcadores de tamaño.

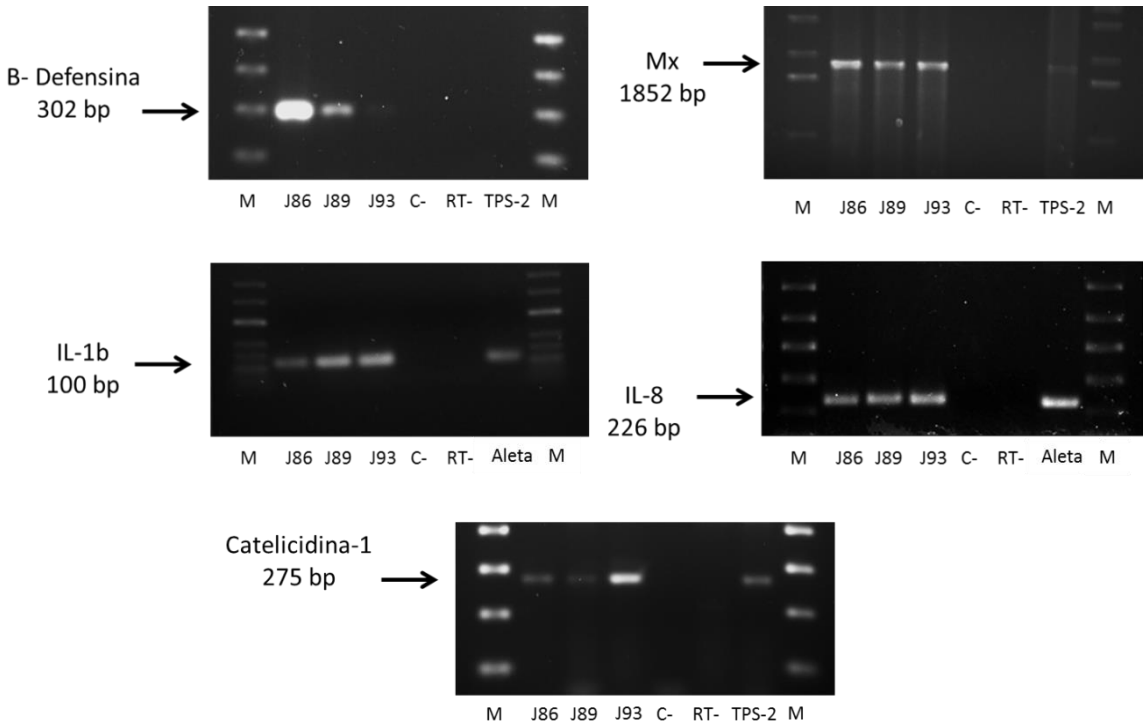

Fig. 30. Expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria en el pase 3 de distintas líneas celulares obtenidas de aleta (J86, J89, J93).). Los carriles C- y RT- corresponden a los controles usados en la retrotranscripción y en la PCR. Para comparar la expresión se utilizó piel de aleta y la línea de estroma de pronefros TPS-2 (Carracedo, 2003). Los carriles M contienen los marcadores de tamaño.

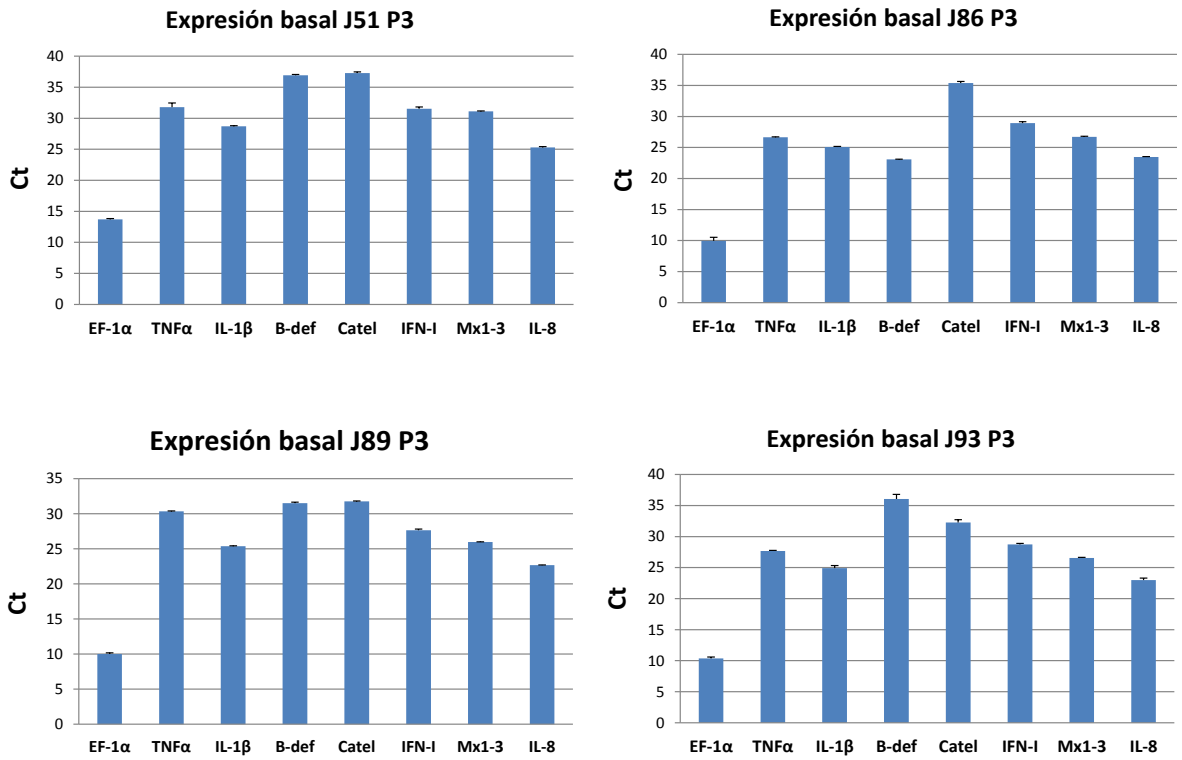

Fig. 31. Niveles de expresión basal de genes relacionados con la respuesta inmunitaria, incluyendo el gen normalizador EF-1α, en diferentes líneas derivadas de aleta en pases tempranos (pase 3). Las columnas representan la media de los valores Ct (n=3) más el error estándar.

Entre los genes estudiados destaca la expresión más alta (Ct menor) del gen de la quimioquina IL-8 en las cuatro líneas celulares utilizadas. La expresión basal de este gen fue hasta un orden de magnitud superior a la expresión de IL-1β, el siguiente gen con mayor expresión basal, en la línea J51.

En cuanto a los genes relacionados con la respuesta proinflamatoria, IL-1β y TNFα, destacó la alta expresión del gen de la IL-1β, también con altos niveles de expresión en las cuatro líneas. En el caso de las líneas J89 y J93, superaba en aproximadamente un orden de magnitud los niveles de TNFα. La expresión basal de TNFα fue débil, excepto en la línea J51, donde la expresión era equiparable a la de los mediadores antivirales.

Los genes relacionados con la respuesta antiviral, INF-I y el de la proteína inducible por interferón Mx, presentaron niveles de expresión basal moderados, siendo los niveles de expresión de Mx superiores al primero en las cuatro líneas celulares estudiadas.

La expresión de los genes de los péptidos antimicrobianos β-Defensina y Catelicidina-1 fue muy débil de manera generalizada, a excepción de la expresión de β-Defensina en la línea J86, que fue hasta 100 veces superior a la de Catelicidina-1.

3.7. Ensayos de transfección y expresión de GFP

Para comprobar la capacidad de la línea J86 para ser manipulada genéticamente se puso a punto un ensayo de transfección en estas células.

Utilizando reactivos químicos catiónicos (Fugene HD y XtremeGENE HP) no se observó la expresión del marcador GFP mediante microscopía de fluorescencia. Por el contrario, cuando se utilizó el reactivo lipídico Lipofectamina LTX se logró transfectar las células J86 con el plásmido pMCV1.4-GFP. Así, se observaron en torno a 5-10 células por pocillo que expresaban GFP. La fluorescencia era muy débil a las 24 horas postransfección (Fig. 32, panel superior), incrementándose hasta los 5 días (Fig. 32, panel inferior).

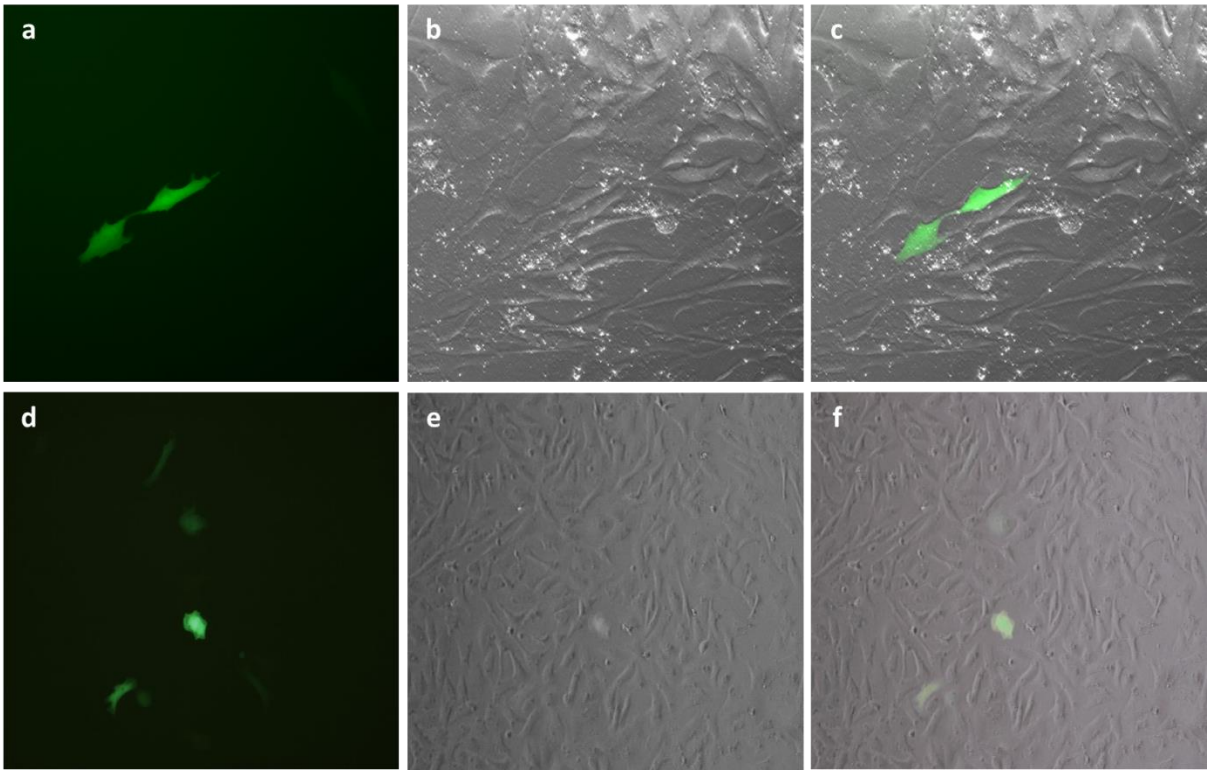

Fig. 32. Análisis de la expresión de la proteína GFP en células de la línea J86 transfectadas con pMCV1.4-GFP y Lipofectamina a las 24 horas (panel superior, 200x) y a los 5 días postransfección (100x). **a**- **d**: Imágenes de fluorescencia; **b**- **e**: Imagen de contraste de fases; **c**- **f**: Superposición de ambas imágenes.

4. Discusión

En el presente trabajo se describe el método de obtención de líneas celulares a partir de cultivos de explantes de aleta anal de *O. mykiss*, así como la caracterización de la expresión génica basal de algunas de estas líneas (J51, J86, J89 y J93). También se describe la caracterización fenotípica y de crecimiento de la línea celular J86 obtenida por este método, la capacidad para mantenerla mediante criopreservación y su uso para la puesta a punto de ensayos de transfección. Dicha línea celular ha sido subcultivada más de 70 veces y se ha mantenido viable hasta la fecha, por un período de más 48 meses.

El protocolo utilizado para el establecimiento de los cultivos primarios a través de explantes permite tomar las porciones de aleta sin causar daño físico al pez y mantener al mismo tiempo los peces donantes vivos. La técnica también permite la regeneración completa del tejido en un periodo breve de tiempo, proceso que ha sido descrito en peces teleósteos después de la escisión de la aleta (Akimenko et al. 2003). En nuestro estudio, elegimos la aleta anal como fuente de obtención de explantes, ya que la manipulación de otras aletas, como la caudal, podría alterar la mecánica natatoria del pez. Por lo tanto, este método cumple con las directivas europeas de protección de los animales utilizados para fines científicos (Directiva 2010/63/UE),

produciendo un daño mínimo, de corta duración y reversible, y cumple también con el objetivo de las "3R", ya que permitiría reducir y sustituir a los animales utilizados en los experimentos al utilizarse este método alternativo. Además, el desarrollo y la validación de métodos de ensayos *in vitro* son parte fundamental de la política de las 3Rs (reducción, refinamiento y reemplazamiento) para optimizar o reemplazar el uso de animales, según establece la legislación española (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero) y comunitaria para la protección y uso de animales para la experimentación.

El método de obtención de células de aleta a partir de explantes ha también sido utilizado para obtener células somáticas con las que realizar ensayos de transferencia nuclear (Bubenshchikova et al. 2013) y para obtener material genético para biobancos de genomas de peces (Wang et al. 2003; Zhang et al. 1998), así como para obtener líneas celulares utilizadas en ensayos de patogénesis (Ku et al. 2010; Vo et al. 2013) y toxicológicos (Yadav et al. 2011).

En cuanto al medio para iniciar los cultivos primarios de aleta, DMEM fue más adecuado que RPMI-1640. Aunque este último se ha utilizado con éxito para obtener y mantener líneas celulares de diversos órganos de trucha arcoíris, como TPS (Diago 1996), TPS-2 (Carracedo, 2003), el medio RPMI-1640 fue desarrollado para el cultivo de leucocitos de mamíferos (Mishell and Dutton, 1967), mientras que el medio DMEM fue desarrollado para el cultivo de fibroblastos de ratón para estudios de transformación y propagación de virus (Freshney, 2000). Aunque se han descrito resultados contradictorios del efecto de ambos medios en la progresión de cultivos de diferentes tipos celulares, el medio RPMI-1640 parece inducir la diferenciación de las células epiteliales (Polak-Charcon et al. 1989), mientras que el DMEM lo hace para las células de origen mesenquimático (Wu et al. 2009). Así mismo, el medio DMEM utilizado contiene el doble de concentración de calcio que el medio RPMI-1640, lo que se ha descrito que favorece la proliferación de células mesenquimáticas (Maeno et al. 2005).

De esa forma, el uso de RPMI-1640 podría inducir la diferenciación del componente epitelial de nuestros cultivos y, por tanto, la detención del crecimiento, mientras que el medio DMEM favorecía el crecimiento del componente mesenquimático, ya que dichas células son capaces de recuperar su actividad proliferativa a partir de un estado más diferenciado (Lopez-Cazaux et al. 2006).

La eficiencia de nuestro método para establecer cultivos primarios de aleta se determinó como el porcentaje de explantes adherentes que dieron lugar a crecimientos celulares frente al total de explantes. Este método de evaluación ha sido utilizado con anterioridad en el establecimiento de cultivos primarios de aleta caudal de carpín dorado (Mauger et al. 2006) y nuestros resultados, con una media del 50%

son mejores que los obtenidos en dicho estudio, en el que se obtuvo una eficiencia del 27%. Sin embargo, dicha eficiencia no se correlacionó con el posterior progreso de las líneas celulares finalmente obtenidas, como se pudo observar al estudiar la pervivencia y dinámica de crecimiento de las líneas celulares obtenidas de los explantes (ver Fig. 23).

Las células de aleta se conservaron adecuadamente en congelación y, aunque se produjo una disminución en el recuento de células viables, la viabilidad tras la descongelación fue lo suficientemente alta como para que los cultivos se reactivaran y reiniciaran de nuevo el crecimiento. Nuestros resultados concuerdan con las observaciones realizadas tras la criopreservación de cultivos celulares establecidos a partir de explantes de aleta caudal de pez gato americano (*I. punctatus)*, cuya viabilidad tras ser mantenidos en nitrógeno líquido durante tres meses fue estimada entre el 70 y 100% (Zhang et al. 1998).

Los cultivos primarios de explantes de aleta mostraron inicialmente una población mixta de células epitelioides y fibroblásticas, de forma similar a como se ha descrito anteriormente en cultivos de aleta caudal obtenidos de otras especies de teleósteos, tales como *I. punctatus* (Zhang et al. 1998) o *C. auratus*, en los que se ha observado una presencia simultánea de ambas poblaciones y los cambios transitorios de un tipo de célula a la otra (Mauger et al. 2009). Sin embargo, después de varios subcultivos, en nuestros cultivos se observó el predominio creciente de células con morfología fibroblástica. Un proceso similar se ha descrito previamente en cultivos de células de aleta en especies como el Medai (*Pagrus major*) (Ku et al. 2010), la dorada (*S. aurata*) (Bejar et al. 1997) o el Mahseer dorado (*Tor putitora*) (Prassana et al. 2000), en los cuales este tipo de morfología se vuelve predominante con los sucesivos pases.

Sin embargo, el aspecto fibroblástico de las células J86 no se pudo correlacionar con la expresión fenotípica de marcadores proteicos característicos de este tipo celular, como vimentina. Este resultado concuerda con las observaciones realizadas en cultivos primarios de tegumento (Flaño, 1995), cuya población celular con morfología fibroblástica no mostraba reactividad al inmunomarcaje de colágeno ni de queratinas usando anticuerpos contra estos marcadores de mamífero. Estas mismas observaciones fueron realizadas para la línea celular TPS, originada a partir de estroma de pronefros de trucha arcoíris, en la cual no se lograron detectar queratinas, colágeno y vimentina mediante el uso de anticuerpos generados frente a esos marcadores de mamífero (Diago, 1996).

No obstante, mediante la técnica de PCR, sí se logró detectar la expresión basal de colágeno-Iα y queratina-II$_E$ en diferentes líneas originadas a partir de los explantes de aleta (J86, J89, J93) en pases tempranos. La línea J86, que hemos utilizado como

modelo principal en los estudios subsiguientes, expresaba el gen del colágeno tipo Iα, que es un marcador de células mesenquimáticas (Alt et al. 2011), pero no expresaba el marcador de células epiteliales citoqueratina-IIE (Porter and Pappas, 1959). Todo ello sugiere que el origen de estas células podría ser fibroblástico, pero que cuando se cultivan *in vitro* se produce una deficiencia en la ruta de síntesis del colágeno, perdiéndose así su perfil inmunocitoquímico para este marcador (Diago, 1996).

El estudio del perfil génico de las diferentes líneas estudiadas (J51, J86, J89, J93), mediante la técnica de PCR convencional, demostró que dichas líneas en pases tempranos expresaban de forma basal, es decir, sin estimulación previa, diferentes genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata. La optimización de la técnica de PCR a tiempo real permitió confirmar y cuantificar dicha expresión. Así, de manera general, estas líneas presentaban altos niveles de expresión basal de IL-8, que también ha sido descrita en piel (Montero et al. 2011a) y en órganos linfoides (Tafalla et al. 2005) de trucha arcoíris. Esta quimioquina se considera importante en la inmunidad mucosa y sistémica en relación con el reclutamiento de leucocitos (Baggiolini and Clark-lcwisb, 1992; Montero et al. 2008a; Mukaida et al. 1998).

Las líneas celulares de aleta que se obtuvieron también expresaban genes relacionados con la respuesta antiviral, como IFN-I (Zou and Secombes, 2011) o la proteína inducible por interferón Mx (Wu et al. 2010). Igualmente, mostraron niveles basales de expresión de los genes de los péptidos antimicrobianos β-defensina y catelicidina-1, cuya expresión constitutiva ha sido descrita en la piel de *O. mykiss*, habiéndoles atribuido un papel importante en la inmunidad antibacteriana en las mucosas (Chang et al. 2006). En este sentido, también se ha indicado que tienen una posible función en la defensa antiviral mediada por la vía del interferón, como se ha observado en la línea celular EPC transfectada para expresar una proteína similar a β-defensina-1 de *O. mykiss*, en la que se vio una inhibición de la infección con VHSV, que se correlacionaba con un aumento en la expresión de Mx y la producción de sobrenadantes con efecto protector frente a la infección (Falco et al. 2008).

La capacidad de las células de la aleta para su manipulación con genes exógenos se demostró mediante ensayos de transfección en la línea J86. Utilizando como marcador de transgénesis la expresión de la proteína GFP bajo el control del promotor CMV, estas células solo se transfectaron utilizando el reactivo Lipofectamina LTX. Nuestras observaciones difieren de las realizadas en la línea celular EPC, en la que la mayor expresión de β-galactosidasa se obtuvo con Fugene (Lopez et al. 2001; Rocha et al. 2005) y en la línea celular Z3, derivada de embrión de pez cebra, en la que la mayor eficiencia de transfección se obtuvo con XtremeGENE HP (Sandbichler et al. 2013).

Esas diferencias podrían ser debidas a que dichos reactivos de transfección, que no están formados por liposomas, fueron desarrollados para su uso en células de mamífero, que crecen a 37°C, una temperatura más próxima a los 28°C utilizados para mantener las líneas celulares EPC y Z3 de ciprínido, mientras que la línea celular J86 se mantiene a 18°C y esta diferencia de 10 grados de temperatura podría ser suficiente para afectar a la eficiencia de dichos reactivos. Una explicación para ello podría fundamentarse en el contenido en lípidos saturados de la membrana plasmática, que es más alto en los peces que en los homeotermos. La mayor cantidad de ese tipo de lípidos da mayor rigidez a la membrana, que además aumenta con la disminución de la temperatura (Hazel, 1979; Roy et al. 1997), formando así una barrera a la penetración de DNA mediante estos agentes de transfección (Lopez et al. 2001). En cambio, agentes formados por liposomas, como la Lipofectamina LTX, son menos afectados por cambios en la rigidez de la membrana y así pueden ser más eficientes para transfectar líneas celulares de teleósteos de aguas frías.

Respecto al uso del promotor CMV para inducir la expresión de GFP, nuestros resultados concuerdan con las observaciones realizadas en la línea celular CTE derivada del timo de catla (*Catla catla*), una especie de ciprínido, en la que también se ha descrito una eficiencia de transfección del 30-35% (Chaudhary et al. 2013) y en la línea celular fibroblástica RSBF-2, derivada de aleta dorsal de Medai (*P. major*) en la cual se observaron células fluorescentes a partir de las 30 horas (Ku et al. 2010), más tardíamente que en nuestra línea celular.

A manera de conclusión de ese capítulo, aunque algunas de las líneas celulares de aleta no progresaron más allá del tercer o cuarto pase, nuestros resultados permiten asegurar que el método de producción de cultivos de aleta a partir de explantes y su amplificación por subcultivos, aún en número limitado, constituye una metodología útil para la obtención de líneas celulares de piel de aleta de *O. mykiss*. Estas células pueden mantenerse a largo plazo por criopreservación y poseen características genotípicas de interés para su utilización como modelo *in vitro* para el estudio de la respuesta inmunitaria de la piel frente a infecciones bacterianas o víricas. Además, pueden ser utilizadas para la expresión de genes exógenos de interés, bajo el promotor heterólogo MCV1.4, cuando son transfectadas en presencia del reactivo Lipofectamina.

Capítulo II

Capítulo II: Uso de la línea de aleta J86 para el estudio *in vitro* de infecciones con virus de peces

1. Introducción

Los virus son patógenos intracelulares que requieren de la maquinaria de las células del hospedador para su replicación y así poder completar su ciclo. Son numerosas las enfermedades víricas descritas en peces teleósteos (Crane and Hyatt 2011), así como los estudios para caracterizar la respuesta inmunitaria del hospedador frente a estas infecciones (Chen et al. 2014; Collet, 2014; Ellis 2001; Van Muiswinkel and Nakao, 2014). Las condiciones de producción intensiva de las piscifactorías favorecen la aparición de estas enfermedades infecciosas (Murray, 2013). Entre ellas, se encuentran las causadas por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) (Julin et al. 2013; Ogut et al. 2013) y por el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) (Dale et al. 2009; Toplak et al. 2010), que tienen un gran impacto económico en la salmonicultura.

El IPNV, perteneciente a los *Aquabirnavirus*, aislado por primera vez en Norte América, es en la actualidad uno de los más extendidos por el continente americano (Cortez-San Martin et al. 2012; Glenney et al. 2012; Salgado-Miranda et al. 2014), Europa y Asia (OIE, 2006) y que causa mayores mortalidades en alevines y juveniles, cuando son transferidos de aguas dulces al medio marino, en cultivos de salmón (Crane and Hyatt 2011; Gomez-Casado et al. 2011; Rodriguez Saint-Jean et al. 2003). Además, los animales supervivientes se convierten en portadores asintomáticos (Crane and Hyatt 2011; Rodriguez Saint-Jean et al. 2003).

El VHSV, un *Novirhabdovirus* descrito por primera vez en Dinamarca en los años 60, está ampliamente extendido por el hemisferio norte, afectando a numerosas especies de peces marinas y continentales especialmente en Norteamérica y Europa (OIE, 2014a) y es una enfermedad de declaración obligatoria en la Unión Europea, conforme a la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE, 2014b).

Dada la importancia de estas enfermedades, son numerosos los estudios *in vivo* que se han realizado sobre la patogenia de estas enfermedades y la respuesta inmunitaria del hospedador (Chaves-Pozo et al. 2010b; Tafalla et al. 2005; Utke et al. 2007).

Igualmente, se han realizado numerosos estudios *in vitro* con el fin de determinar la modulación de la respuesta inmunitaria en distintas líneas celulares, como la línea

RTS-11 derivada de monocitos esplénicos (Ordás et al. 2011; Tafalla et al. 2008), la línea celular RTgill-W1 derivada de branquias (Pham et al. 2013) y líneas primarias establecidas a partir de ovario (Verrier et al. 2012) y la línea celular RTG-2 (Tafalla et al. 2007). Así mismo, se han realizado estudios para caracterizar esa respuesta en cultivos primarios de leucocitos de pronefros y bazo (Tafalla et al. 2007).

En el caso de los rhabdovirus, diversos estudios *in vivo* han puesto de manifiesto que el tegumento parece tener un papel importante en el inicio de la infección. Así, uno de los primeros indicios de esto fue la detección de altos títulos del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) que se pueden asilar del mucus que recubre la piel de salmón Chinook (*O. tshawytscha*) infectados de forma natural y de truchas *O. mykiss* infectadas experimentalmente (LaPatra et al. 1989).

También se ha descrito la replicación temprana de IHNV en las aletas de trucha arcoíris tras la infección experimental *in vivo* (Yamamoto et al. 1990a), así como la de VHSV tras la infección *in vitro* de fragmentos de aletas (Yamamoto et al. 1990b).

Además, para IHNV se ha descrito que la virulencia de la cepa condiciona el progreso de la infección. Así, una cepa recombinante de IHNV no virulenta es capaz de infectar alevines de trucha arcoíris y replicarse activamente pero queda confinada en la base de las aletas, sin producirse su diseminación sistémica (Harmache et al. 2006).

En el caso de VHSV y a partir de estudios *in vivo*, se ha descrito que la base de las aletas son un área de entrada de este virus en trucha arcoíris (Montero et al. 2011a; Montero et al. 2011b), así como en arenque del pacífico (*Clupea pallasii*) (Lovy et al. 2012).

Sin embargo, a pesar de los datos que indican la importancia de las aletas en la infección de peces por rhabdovirus, no hemos encontrado estudios detallados *in vitro* para comprender el papel que juega la piel, tanto como puerta de entrada del VHSV, como primera defensa del organismo frente a la infección.

El desarrollo y uso de líneas celulares ha sido esencial para los avances en la investigación y el diagnóstico en el campo de la Virología (Bols and Lee 1991; Bols 1991; Lee et al. 2009; Villena 2003) y, por ello, el objetivo de este trabajo es utilizar una línea celular derivada de la aleta anal de *O. mykiss* para analizar *in vitro* la infección temprana por VHSV, con la finalidad de aportar nueva información que permita comprender mejor el papel defensivo que juegan las células del tegumento de las aletas en las primeras fases de la infección viral, previas a la diseminación del virus por el resto del organismo.

Para ello, se abordaron dos tipos de estudios: primeramente se realizaron estudios de susceptibilidad de la línea celular a la infección por IPNV y por VHSV, y posteriormente se analizó la progresión de la infección *in vitro* con VHSV y la modulación de la expresión de genes y de proteínas relacionados con la respuesta inmunitaria innata en dicha línea celular de aleta.

2. Material y métodos

2.1 Líneas celulares

Para la realización de las infecciones con virus se utilizó la línea celular J86 de aleta de trucha arcoíris (*O. mykiss*), obtenida mediante el método de los explantes en nuestro laboratorio (Capítulo I de esta tesis), en los pases entre 40 y 47. Esta línea fue mantenida en medio de cultivo rutinario suplementado con 20% FCS y 50 ng/mL EGF, cuya composición se muestra en la Tabla I e incubada a 18°C en atmósfera de aire

Para la realización de las titulaciones virales en los sobrenadantes se utilizó la línea celular EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*), derivada del ciprínido *Pimephales promelas*. Esta línea fue mantenida en medio EPC (Tabla VIII) e incubada a 28°C en atmósfera con un 5% de CO_2.

Solución stock	Concentración final
Suero Fetal Bovino (FCS)	10% (v/v)
L-Glutamina 200 mM	2 mM
Piruvato sódico 100 mM	1 mM
Gentamicina 10 mg/mL	50 µg/mL
Anfotericina B 250 µg/mL	2 µg/mL
Medio RPMI-1640	Hasta 100 mL

Tabla VIII. Medio de mantenimiento de la línea celular EPC

2.2 Virus

Se utilizaron las cepas 07.71 de VHSV y Sp de IPNV. Los virus fueron propagados y titulados en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández (Elche, España) y en el Instituto de Infectología del Friedrich- Loeffler-Institut (Insel Riems, Alemania).

2.3 Infección de los cultivos celulares

Los ensayos de infección *in vitro* se realizaron en laboratorios de contención biológica de nivel P2 del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández (Elche, España) y del Instituto de Infectología del Friedrich-Loeffler-Institut (Insel Riems, Alemania).

Como fuente de células para las infecciones se utilizaron cultivos rutinarios de células J86 en frascos de 25 cm^2, que fueron tripsinizados según la técnica descrita en el capítulo I. Las células se resuspendieron en medio de mantenimiento (Tabla I) y fueron sembradas en placas de 96 pocillos (Corning) a una densidad celular de 40.000 cél./pocillo, lo que permite que se alcance la confluencia a las 24 horas de incubación a 18°C en atmósfera de aire.

Para el ensayo de susceptibilidad a la infección, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y, manteniendo las placas sobre hielo, se añadieron 100 µL/pocillo de una suspensión del virus (VHSV o IPNV) en medio de cultivo modificado en el que se había rebajado la proporción de FCS al 2%. Las multiplicidades de infección (MOI) utilizadas fueron 0,01 y 0,001, para lo cual se realizaron las diluciones del stock apropiadas, trabajando siempre sobre hielo. Como controles negativos, se utilizaron pocillos de las mismas placas a los cuales se añadió el medio con 2% de FCS sin el virus correspondiente. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 14°C durante 72 horas.

Para el estudio de la progresión de la infección *in vitro* con VHSV y la modulación de la respuesta inmunitaria innata, se siguió el mismo protocolo indicado en el párrafo anterior, utilizando las mismas MOI, pero para evitar las interferencias derivadas de la presencia de virus no adsorbidos, a las dos horas de incubación a 14°C, se retiró el medio de los pocillos experimentales y control, se lavaron una vez las células con medio de cultivo (2% FCS) y se añadieron nuevamente 100 µL de medio de cultivo con un 2% FCS. Las placas se volvieron a sellar y se incubaron hasta las 24 o 48 horas posinfección, a 14°C y atmósfera de aire.

2.4 Titulación viral

Los sobrenadantes procedentes de los cultivos infectados con VHSV a una MOI de 0,01 durante 24 y 48 horas se recogieron y titularon como se describe a continuación. Sobre una placa de 96 pocillos con células EPC sembradas en confluencia (100.000 cél./pocillo) se añadieron diluciones seriadas 1:10 de los sobrenadantes, en medio de cultivo con un 2% FCS, trabajando siempre sobre hielo. Dichas diluciones se añadieron a razón de 100 µL/ pocillo, de forma que cada columna de pocillos correspondiese a una dilución. Se dejó una columna final de células control, a las que

se les añadió medio con un 2% FCS. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 14°C ± 1°C durante 7 días.

Tras el periodo de incubación, se retiró el medio de los pocillos y se tiñeron con una solución de Cristal Violeta–Metanol durante 5 horas. Se lavaron las placas en agua destilada y se procedió a la observación y recuento de los pocillos con efecto citopático. La dosis infecciosa ($TCID_{50}$/mL) se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$TCID_{50} = 10^{\log \text{ dilución } >50\% + I}$$

En dónde:

$$I = \frac{\%\text{ pocillos infectados a la dilución } > 50\% - 50\%}{\%\text{ pocillos infectados a la dilución } > 50\% - \%\text{ de pocillos infectados a la dilución} < 50\%}$$

2.5 Inmunoestimulación de las células J86

Paralelamente a los cultivos utilizados para los estudios de seguimiento de la infección con VHSV y análisis de la modulación de las respuestas inmunitarias innatas, se estableció un grupo control positivo de la inmunoestimulación consistente en cultivos en los cuales se estimularon las células con ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C). Para ello, se sembraron $4x10^4$ cél./pocillo en placas de 96, que se incubaron durante 24, 48 o 72 horas con medio de cultivo rutinario (Tabla I) (suplementado con 40 µg/mL de poli I:C (Sigma).

2.6 Inmunocitoquímica

Para la detección de focos de infección *in vitro* se utilizaron anticuerpos comerciales o cedidos por otros investigadores (Tabla IX). El anticuerpo monoclonal 2C9 (anti-N) frente a la proteína N del VHSV (Lorenzo et al. 1996) fue cedido por la Dra. Amparo Estepa, del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

El método de fijación de las células en los pocillos, los anticuerpos y las condiciones de incubación optimizadas que finalmente fueron utilizadas para la detección de focos de infección se muestran en la Tabla IX.

Para la detección de la proteína N de VHSV y de la proteína VP2 de IPNV mediante la tinción de inmunoperoxidasa, tras la fijación las células fueron lavadas con PBS durante 5 minutos e incubadas con el anticuerpo primario. A continuación se retiró el anticuerpo, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario diluido en el tampón de dilución (Tabla X) Cuando este se retiró, se hicieron otros 3 lavados de 5 minutos con PBS y se incubaron las placas con

una solución que contenía 0,8mg/mL de 3,3'-diaminobencidina (Sigma) en PBS pH 6,8 suplementado con 0,3% de peróxido de hidrógeno. Cuando el producto de la reacción fue visible a microscopía óptica, en forma de depósitos pardos, las placas se lavaron con agua destilada, dejando 100 µL para la observación microscópica.

Para la detección de la proteína N de VHSV mediante la tinción de inmunofluorescencia, tras la fijación y posterior lavado con PBS, las células se incubaron con una solución de bloqueo consistente en PBS suplementado con 0,1% BSA y 0,5% TritonX-100 durante una hora a temperatura ambiente. Inmediatamente después se incubaron con el anticuerpo primario diluido en PBS + 0,1% TritonX-100 durante una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación se hicieron 3 lavados con PBS durante 5 minutos y se procedió a incubar con el anticuerpo. Tras ello, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se contrastaron los núcleos con yoduro de propidio (Sigma).

Fijación	Anticuerpo 1º	Dilución y condiciones de incubación	Anticuerpo 2º	Dilución y condiciones de incubación
Metanol frío 15 min a -20°C	Monoclonal anti-VP2 de IPNV (Aquatic Diagnostics)	1:75 en tampón de dilución 90 min a Tª ambiente	Conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa (SIGMA, A9044)	1:300 en tampón de dilución 45 min a Tª ambte
Metanol frío 15 min a -20°C	Monoclonal anti-N de VHSV (2C9, Lorenzo et al. 1996)	1:1000 en tampón de dilución 1 hora Tª ambiente	Conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa (SIGMA, A9044)	1:300 en PBS+1% BSA 45 min en oscuridad
Metanol frío 15 min a -20°C	Monoclonal anti-N de VHSV (IP5B11, Bio-X Diagnostics SPRL)	1:20 en PBS + 1%BSA 1 hora Tª ambiente	cabra anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen, A11017)	1:600 en PBS+ 0.1% TritonX-100 30 min en oscuridad

Tabla IX. Anticuerpos utilizados para la detección de focos de infección y condiciones de incubación.

Para la inmunodetección de mediadores de la respuesta inmunitaria innata se utilizaron los anticuerpos mostrados en la Tabla XI. Los anticuerpos monoclonales frente a citoquinas de trucha arcoíris (IL-8, iNOS) fueron cedidos por el Dr. Luís Mercado, de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. El anticuerpo policlonal frente a la proteína Mx (Chico et al. 2010) fue cedido por la Dra. Amparo

Estepa, del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Reactivo	Concentración
Mertiolato	0,24 mM
Tween 20	5 g
Rojo fenol	50 mg
Suero de conejo	0,3% v/v
Agua	1 L

Tabla X. Composición del tampón utilizado para la dilución de los anticuerpos en la técnica de la inmunoperoxidasa.

Para la detección de citoquinas, tras fijar las monocapas en las condiciones indicadas en la Tabla XI, se lavaron los pocillos con PBS durante 5 minutos y se incubaron con tampón de bloqueo (PBS + 5% suero de cabra + 0,3% TritonX-100) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido, las células se incubaron con el anticuerpo primario en las condiciones indicadas. A continuación, se retiró el medio de incubación y se lavaron los pocillos 3 veces con PBS durante 5 minutos y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario diluido en un tampón consistente en PBS suplementado con 1% de BSA y 0,3% de TritonX-100. Finalmente, se hicieron 3 lavados con PBS durante 5 minutos, dejando tras el lavado final 100 µL de PBS y contrastando los núcleos con DAPI (Molecular Probes) para la observación microscópica.

Fijación	Anticuerpo 1io	Dilución y condiciones de incubación	Anticuerpo 2io	Dilución y condiciones de incubación
Paraformaldehído al 4% 15 min a Tª ambiente **Metanol frío** **15 min a -20°C**	Monoclonal anti-IL-8 Monoclonal anti-iNOS	1:50 en tampón AD	Cabra anti-ratón conjugado con TRITC (ref. Sigma)	1:300 12 horas a 4°C en oscuridad
Paraformaldehído al 4% 15 min a Tª ambiente **TritonX-100 5 min a Tª ambiente**	Policlonal anti-Mx	1:300 en tampón AD	Cabra anti-conejo conjugado con TRITC (ref. Sigma	1:300 12 horas a 4°C en oscuridad

Tabla XI. Anticuerpos y condiciones de incubación finales utilizadas para caracterizar la respuesta inmunitaria en la línea de aleta de *O. mykiss*.

Las células fueron observadas con un microscopio Nikon Eclipse TE300 dotado de una lámpara de mercurio y una cámara digital Nikon DS-1QM.

2.7 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA total se utilizó el kit de columnas RNeasy Plus Micro (Qiagen), el cual incluía una columna de eliminación de DNA genómico. El procedimiento general se detalla a continuación:

- Para lisar las células se añadieron 100 μL de tampón de lisis RLT suplementado con 1% de mercaptoetanol y se procedió al homogeneizado pipeteando suavemente.
- Acto seguido, las muestras se transfirieron a una columna de eliminación de DNA genómico y se centrifugaron a 8.000 g durante 15 s.
- Los filtrados se transfirieron a un tubo en el que se añadió un volumen igual de etanol al 70%.
- Las muestras se transfirieron a las columnas de extracción de RNA y se centrifugaron a 8.000 g durante 15 s.
- Tras descartar el eluido, se añadieron 700 μL de tampón RW1 y las columnas se centrifugaron a 8.000 g durante 15 s.
- Tras descartar nuevamente el eluido, se añadieron 500 μL de tampón RPE y las columnas se centrifugaron a 8.000 g durante 10 s.
- Se desechó el tubo con el eluido y se colocó la columna en un nuevo tubo. A continuación, se añadieron nuevamente 500 μL de tampón RPE y las columnas se centrifugaron a 12.000 g durante 2 min.
- Tras desechar el eluido, se centrifugaron las columnas durante 5 min con las tapas abiertas para el completo secado de la membrana.
- Finalmente, se añadieron 30 μL de agua a cada columna y se centrifugaron a 8.000 g durante 1 min.

El RNA se cuantificó con un equipo NanoDrop ND-1000, considerándose aptas para la posterior realización de la retrotranscripción aquellas muestras que presentaban unos ratios 260/280 entre 1,5-2 y su integridad fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio.

2.8 Síntesis de cDNA

Para la obtención de cDNA que serviría de molde para la reacción de PCR, se utilizó para la retrotranscripción la enzima Superscript III (Invitrogen) y una mezcla general de reacción detallada en la Tabla XII.

El RNA se incubó con oligo (dT) 12-18 y una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato durante 5 min a 65° C. Después de la incubación, se añadió a la mezcla tampón RT,

ditiotreitol (DTT), RNaseOUT (inhibidor de la ribonucleasa recombinante, Invitrogen) y la enzima Superscript III. Se incubó durante 5 min a 25°C, 60 min a 50°C y 15 min a 70°C. La reacción se detuvo por calentamiento a 70°C durante 15 min, y el cDNA resultante se almacenó a -20°C hasta su uso.

Solución	Concentración stock	Volumen
Oligo (dT) 12-18	0,5 mg/mL	1µL
dNTP's	10 mM	1µL
Tampón RT	5X	4 µL
Ditiotreitol (DTT)	0,1 M	1µL
RNaseOUT	40 U/ µL	1 µL
Superscript III	200 U/ µL	1 µL
RNA	5 µg	
Agua		Hasta 20 µL de vol. final

Tabla XII. Mezcla general de reacción de retrotranscripción.

2.9 PCR a tiempo real

La modulación de la expresión de los genes estudiados fue cuantificada a partir del cDNA obtenido mediante la técnica de PCR a tiempo real. Para ello se empleó el kit con marcador fluorescente Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen). La mezcla general de reacción se preparó con 10 µL de la Master Mix SYBR Green 2x, 0,4 µL de cada cebador, 2 µL de cDNA y agua hasta un volumen final de 20 µL. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) con las condiciones generales mostradas en la Tabla XIII.

Ciclo		Temperatura	Tiempo
Activación de la polimerasa		95°C	10 min
Amplificación (40 ciclos)	Desnaturalización	95°C	15 s
	Anillamiento y extensión	60°C	1 min
Curva de disociación final			

Tabla XIII. Protocolo general de los ciclos usados para la amplificación de los genes estudiados mediante PCR cuantitativa con el kit Power SYBR Green PCR Master Mix.

Los genes estudiados y la secuencia de los cebadores usados para el seguimiento de la infección por IPNV y VHSV, así como del gen de fibronectina II, que forma parte

del receptor de *rhabdovirus* (Bearzotti et al. 1999), se muestran en la Tabla XIV. Para la detección de la replicación de VHSV se detectó la expresión del gen de la proteína de la nucleocápsida (N). En el caso de IPNV se utilizó el gen del segmento A del genoma viral, que contiene los genes de la proteína Vp5 y de la poliproteína precursora de Vp2, Vp3 y Vp4 (Crane and Hyatt 2011).

Cebadores	Secuencia	Referencia
Nvhsv	F: GACTCAACGGGACAGGAATGA R: GGGCAATGCCCAAGTTGTT	Ortega-Villaizán et al. 2011
IPNV-A	F: TCTCCCGGGCAGTTCAAGT R: CGGTTTCACGATGGGTTGTT	García et al. 2011
Fibronectina II	F: CTGAACATCAGATCAACCAGG R: GTTGTTCTGTATGCTGTCCAG	Liu et al. 2003

Tabla XIV. Genes analizados y cebadores utilizados para el análisis de la progresión de la infección viral.

La Tabla XV muestra los genes y secuencias de los cebadores utilizados para el estudio de la modulación *in vitro* de la respuesta innata tras la infección con VHSV.

En ambos casos, se utilizó el gen del factor de elongación EF-1α como referencia interna para valorar los cambios en la expresión de los otros genes.

Cebadores	Secuencia	Referencia
EF-1α	F: GATCCAGAAGGAGGTCACCA R: TTACGTTCGACCTTCCATCC	Chaves-Pozo et al. 2010b
IFN-I	F: AGTTCCTGTGTATCACCTGTCG R: GATGCTCAGTACATCTGTCCCA	Castro et al. 2011
Mx1-3	F: TGAAGCCCAGGATGAAATGG R: TGGCAGGTCGATGAGTGTGA	Ortega-Villaizán et al. 2009
IL-1β	F: CTGAAGCCAGACCTGTAGCC R: GCAACCTCCTCTAGGTGCAG	Cuesta y Tafalla, 2009
TNFα	F: AGCATGGAAGACCGTCAACGAT R: ACCCTCTAAATGGATGGCTGCTT	Purcell et al. 2004
iNOS	F: CCAACCATGCACATCAAAAGTT R: CTGAGGTAGGATTTCAAGAGTAGAAA	Fierro-Castro et al. 2013
IL-8	F: GAATGTCAGCCAGCCTTGTC R: TCCAGACAAATCTCCTGACCG	Lindenstrøm et al. 2004
CK9	F: GGCTCTTATGGGAACTGCTG R: CTGGGATTGGCACAAACAG	Montero et al. 2011a
CK10	F: ATTGCCAAGATCCTCTTCTGTGTTC R: CTGAGGCTGGTAACCTATGACAAC	Montero et al. 2011a
CK12	F: GACATCGATGCCACTGTGTT R: GGAGATGGTTCGCTCCAGAC	Montero et al. 2011a

Tabla XV. Genes analizados y cebadores utilizados para los análisis de expresión génica en ensayos de infección en la línea de aleta de *O. mykiss*.

Los cambios en la expresión de los genes de interés se cuantificó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), en donde ΔCt se obtiene al sustraer el valor del Ct del gen de referencia EF-1α al valor del Ct de la muestra. Como control se utilizaron células sin infectar y los cambios de expresión se calcularon de forma relativa a los niveles de expresión de dichos genes en estas células.

2.10 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, expresados como media y error estándar, se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de un test posthoc de Tukey, considerándose que existían diferencias significativas para valores $p<0,05$ y altamente significativas para valores de $p<0,01$.

3. Resultados

3.1. Susceptibilidad de la línea celular J86 de aleta de trucha arcoíris a virus de peces

Para realizar un análisis inicial de la susceptibilidad de la línea celular de aleta J86 a VHSV y a IPNV se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa en cultivos que habían sido incubados, de forma continua, con suspensiones de VHSV a dos MOI diferentes.

3.1.1. Infección por VHSV

Para la detección de VHSV se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-N 2C9. Como control negativo del ensayo se utilizaron cultivos no expuestos al virus y que fueron procesados para el inmunomarcaje de la misma forma que los expuestos. En los cultivos control no se observó marcaje anti-N (Fig. 33a).

Tras la incubación durante 72 horas de los cultivos de la línea J86 con suspensiones virales a una MOI de 0,01 se observó un marcado efecto citopático, con patentes calvas en la monocapa e inmunomarcaje positivo generalizado para el anticuerpo monoclonal anti-N de VHSV (Fig. 33b). Cuando se utilizó una MOI más baja (0,001), a las 72 horas posexposición, se observaban focos de células positivas para el inmunomarcaje, que aparecían diseminadas por toda la monocapa, bien aisladas o bien como múltiples focos formados por un número variable de células (Fig. 33c-d).

Para ambas MOIs, tras una semana de incubación las monocapas de los cultivos infectados aparecían totalmente desintegradas (Fig. 34).

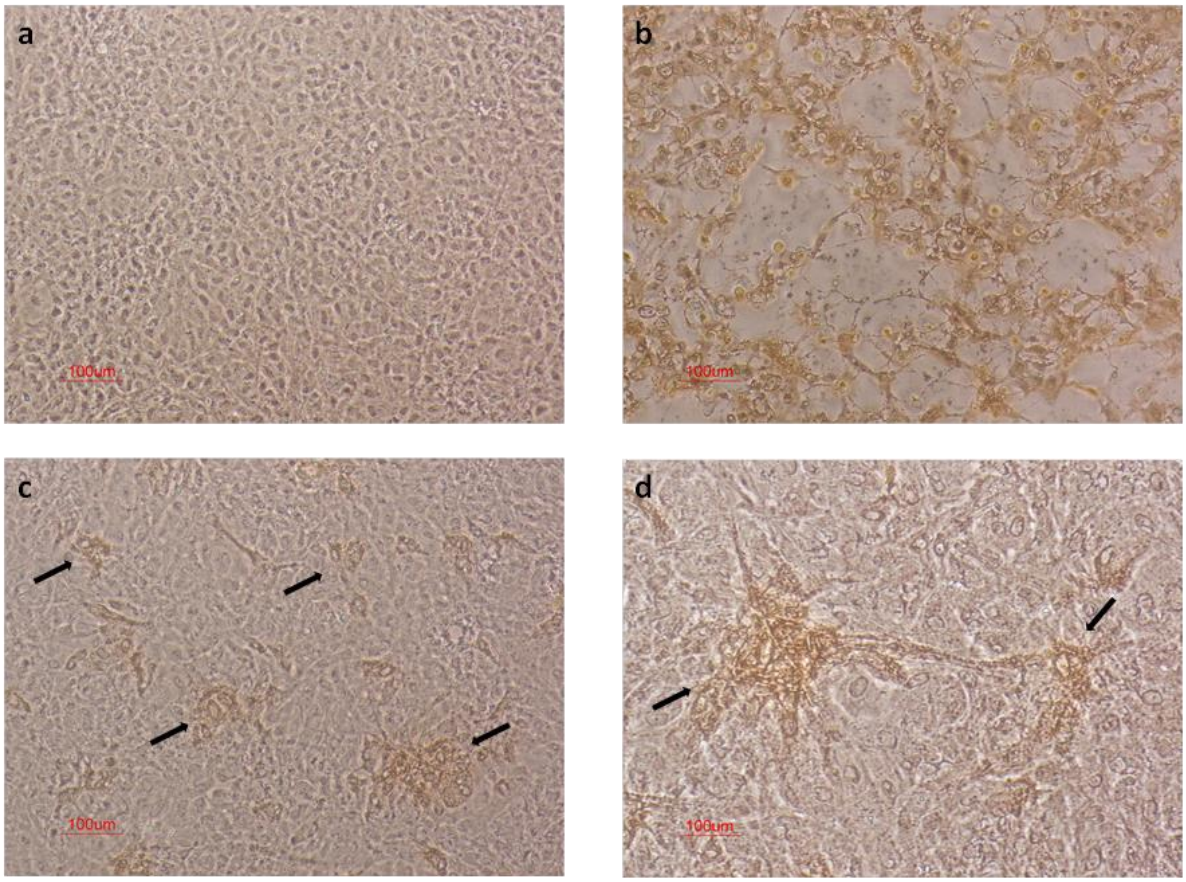

Fig. 33. Ensayo de susceptibilidad de la línea celular J86 a la infección por VHSV demostrada mediante inmunodetección de la proteína N del virus a las 72 horas posinfección. **a.** Cultivo control, no expuesto al virus; **b.** Cultivo expuesto a una MOI de 0,01; **c – d:** Cultivos expuestos a MOI de 0,001.

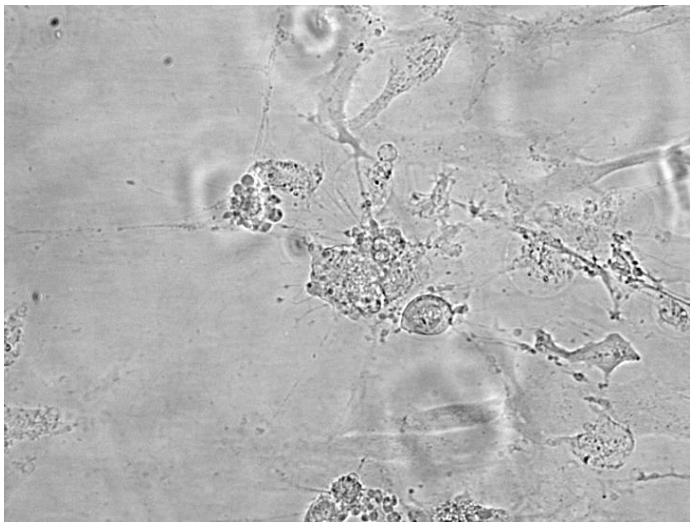

Fig. 34. Imagen de un cultivo de la línea J86 a los 7 días de incubación tras la inoculación con VHSV a una MOI de 0,01 (200x).

3.1.2. Infección por IPNV

Para la detección de IPNV en los cultivos mediante la técnica de inmunoperoxidasa se utilizó en anticuerpo monoclonal anti-VP2. Como control negativo del ensayo se utilizaron cultivos no expuestos al virus y que fueron procesados para el

inmunomarcaje de la misma forma que los expuestos. En los cultivos control no se observó marcaje (Fig. 35a).

Tras la incubación durante 72 horas de los cultivos celulares con suspensiones virales de IPNV a diferentes MOI (0,01 y 0,001) no se observó efecto citopático ni inmunomarcaje con el anticuerpo anti-Vp2 (Fig. 35b-c) y las células presentaban una morfología normal, comparable a la de los cultivos control.

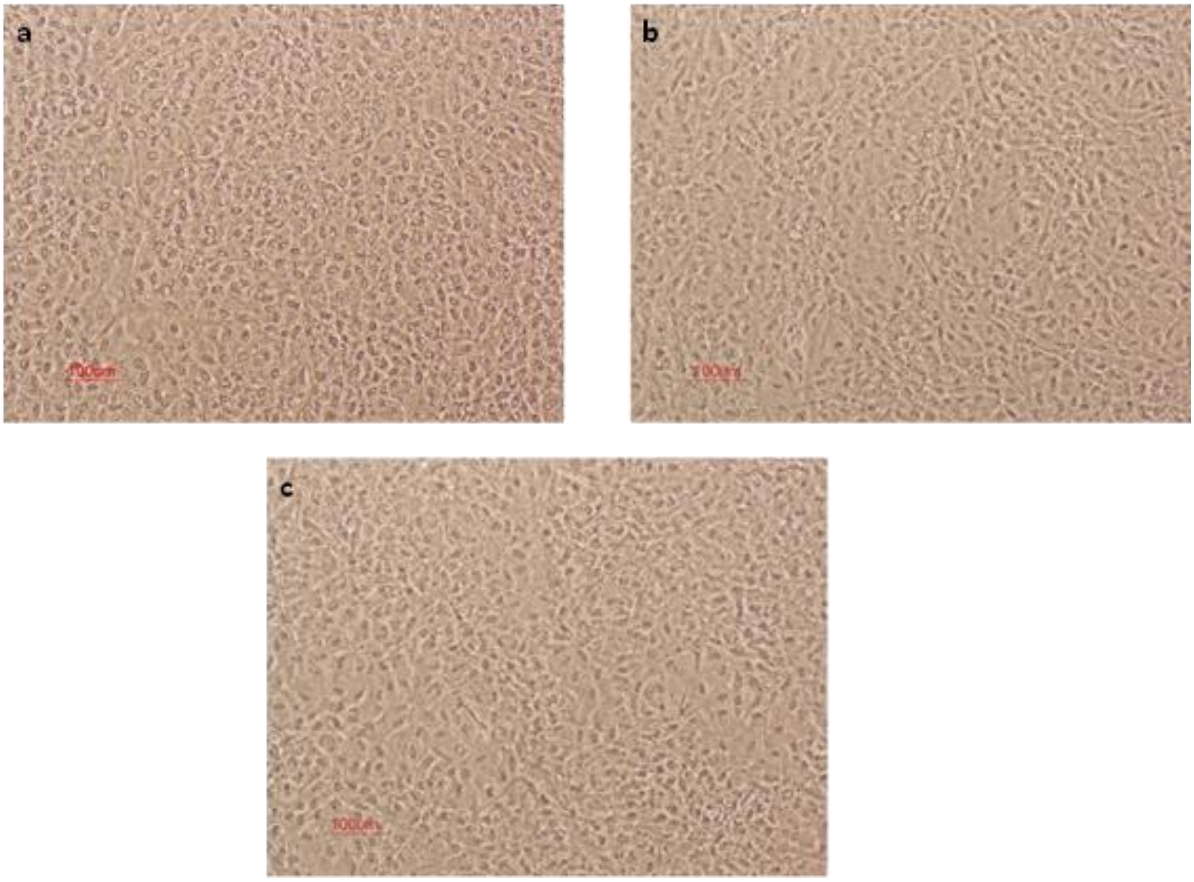

Fig. 35. Ensayo de susceptibilidad de la línea celular J86 a la infección por IPNV demostrada mediante inmunodetección de la proteína Vp2 del virus a las 72 horas posinfección. **a**. Cultivo control, no expuesto al virus; **b**. Cultivo expuesto a una MOI de 0,01; **c.** Cultivo expuesto a una MOI de 0,001.

3.2. Estudio de la infección viral temprana en la línea J86 de aleta de *O. mykiss*

Una vez comprobado que la línea J86 es susceptible a la infección por VHSV y que este *rhabdovirus* causa efecto citopático en ella, mientras que este efecto no se pudo demostrar para IPNV, se procedió a analizar la progresión de la infección *in vitro* y la producción viral. Para ello se utilizaron cultivos sometidos a un pulso de 2 horas de exposición al virus, de forma que tras ese tiempo se retiró la suspensión viral de los pocillos y se lavaron las células con medio de cultivo para eliminar los virus no adsorbidos.

3.2.1. Análisis de la infección con VHSV

La progresión de la infección con VHSV se monitorizó utilizando la técnica de inmunofluorescencia con el anticuerpo IP5B11 anti-N de VHSV, la amplificación por PCR del gen *N* de esa proteína de la nucleocápsida y por titulación viral.

El análisis por inmunofluorescencia puso de manifiesto la presencia de focos de células positivas a las 24 horas posexposición para ambas MOI, diseminados en la monocapa y, en general, más pequeños en los cultivos infectados con la MOI de 0,001 (Fig. 36).

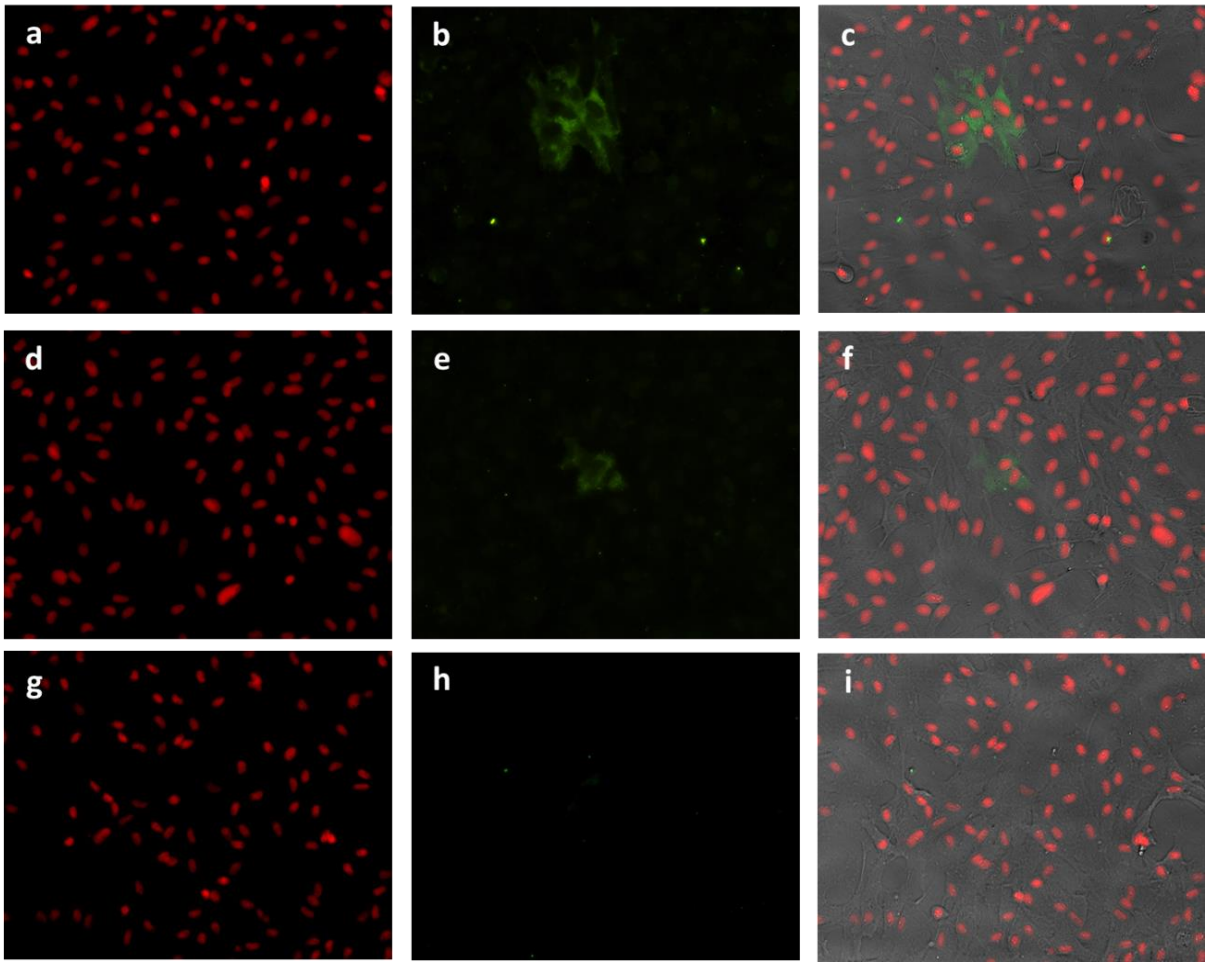

Fig. 36. Imágenes de cultivos de la línea J86 de los ensayos de infección con un pulso de 2 horas de exposición a VHSV con una MOI de 0,01 (**a**-**c**) o de 0,001 (**d-f**) e incubados durante 24 horas, comparados con el control sin infectar (**g-i**). Los núcleos celulares se contrastaron con yoduro de propidio (**a**, **d**, **g**) y los focos de infección fueron detectados mediante la aplicación de un anticuerpo monoclonal frente a la proteína N de la nucleocápsida (**b**, **e**, **h**). La columna de la derecha muestra la superposición de las imágenes de contraste de fases con las de los canales de fluorescencia. 200x.

A las 48 horas posinfección se detectaron células positivas individuales y focos positivos, de aspecto y tamaño similar a los detectados a las 24 horas, sin apreciarse una mayor cantidad de ellos (Fig. 37).

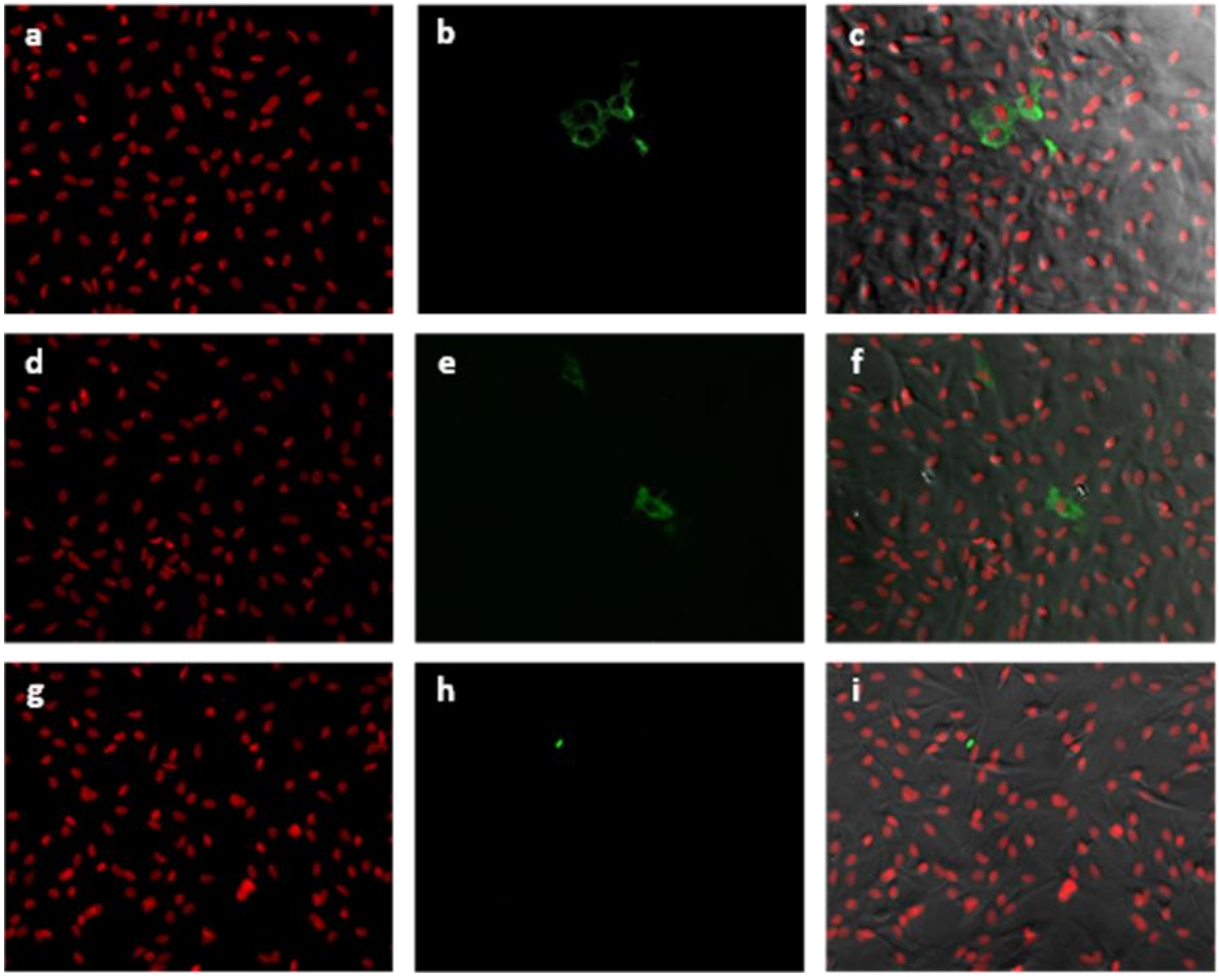

Fig. 37. Imágenes de cultivos de la línea J86 de los ensayos de infección con un pulso de 2 horas de exposición a VHSV con una MOI de 0,01 (**a-c**) o de 0,001 (**d-f**) e incubados durante 48 horas, comparados con el control sin infectar (**g-i**). Los núcleos celulares se contrastaron con yoduro de propidio (**a**, **d**, **g**) y los focos de infección fueron detectados mediante la aplicación de un anticuerpo monoclonal frente a la proteína N de la nucleocápsida (**b**, **e**, **h**). La columna de la derecha muestra la superposición de las imágenes de contraste de fases con las de los canales de fluorescencia. 200x.

Utilizando PCR cuantitativa para el análisis de la expresión del gen *N* de la proteína N de la nucleocápsida viral en las células de la línea J86 expuestas al pulso de 2 horas de infección por VHSV, a las 24 horas en los cultivos infectados con una MOI alta (0,01) las medias de las ratios de expresión alcanzaban valores en torno a las 20.000 veces las de los controles. En los cultivos expuestos a una MOI de 0,001 los valores de las ratios de expresión estaban en torno a 2.500 veces las de los controles (Fig. 38).

La expresión del gen *N* aumentó de manera proporcional a la MOI tras 48 horas posinfección. El máximo pico de expresión se dio en los cultivos infectados a MOI 0,01, detectándose un valor de la media de las ratios de expresión de 1.900.000, siendo significativa la diferencia respecto al valor detectado a las 24 horas, y respecto al valor alcanzado en los cultivos infectados a MOI 0,001. Así mismo, en los cultivos infectados a baja MOI (0,001) la ratio se elevó de manera significativa con respecto al valor alcanzado a las 24 horas (Fig. 38).

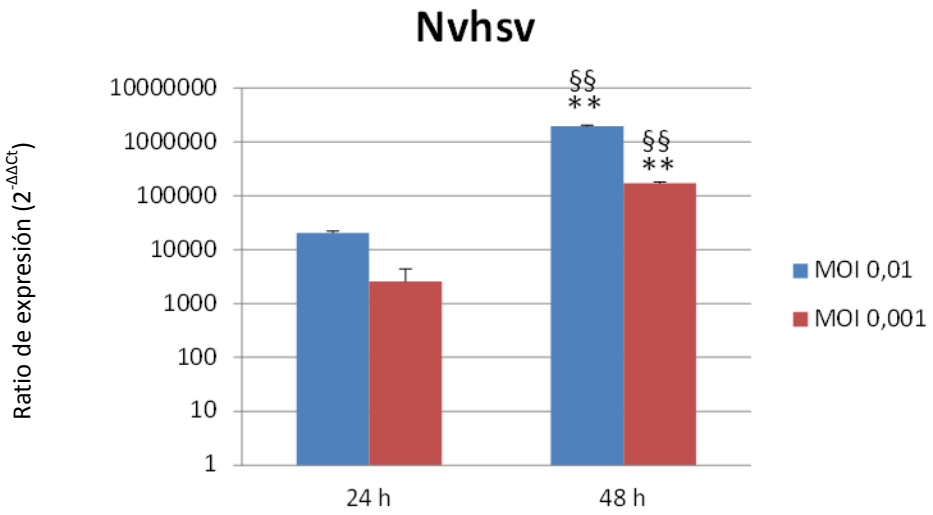

Fig. 38. Expresión del gen *N* de VHSV a las 24 y 48 horas en células infectadas con VHSV a diferentes MOI. El eje de ordenadas muestra los ratios de expresión N/ EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los tratamientos a distintos tiempos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Para el ensayo de la titulación viral se utilizaron cultivos de la línea EPC que fueron expuestos a diluciones seriadas de los sobrenadantes recogidos de los cultivos infectados de la línea J86 a las 24 y 48 horas. Se observó efecto citopático en los cultivos de la línea EPC tras 7 días de incubación, cuyo grado era proporcional a la dilución seriada (Fig. 39).

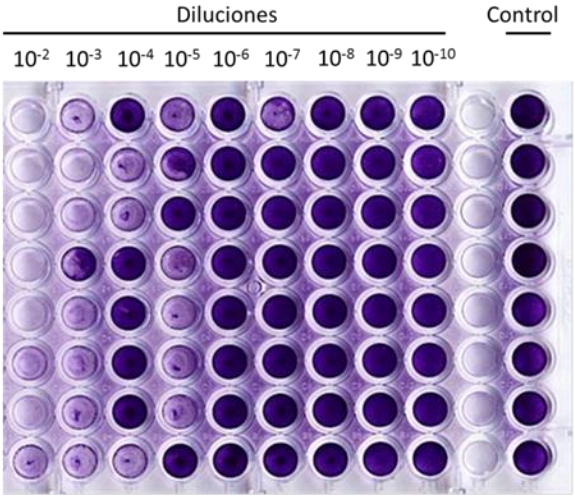

Fig. 39. Placa de titulación por dilución límite de sobrenadantes recogidos a las 24 horas tras la infección de cultivos de la línea J86 con el virus VHS a una MOI de 0,01. El método utilizado detecta el efecto citopático producido por el virus sobre las monocapas de células EPC, de forma que el mayor grado de lisis corresponde a la tinción más pálida.

La titulación viral por dilución límite de los sobrenadantes procedentes de los cultivos J86 infectados durante 24 horas a una MOI de 0,01 alcanzó un valor medio de 10^5 $TCID_{50}$/ml. A las 48 horas posinfección el valor medio del título viral detectado descendió a $10^{1,5}$ $TCID_{50}$/ml.

3.2.2. Análisis de la infección con IPNV

En el caso del IPNV, dado que no se había observado la presencia de células positivas para el inmunomarcaje con el anticuerpo anti-Vp2 ni efecto citopático en los cultivos incubados con suspensiones del virus independientemente de la MOI, no se realizaron los mismos ensayos que los descritos anteriormente para VHSV. No obstante, para detectar si el virus había infectado las células se utilizó la técnica de PCR semicuantitativa para detectar el genoma viral en cultivos expuestos durante 72 horas al virus y lavados con medio previamente a recoger las células para la extracción del RNA. Este método puso de manifiesto la presencia RNA viral en dichos cultivos (Fig. 40).

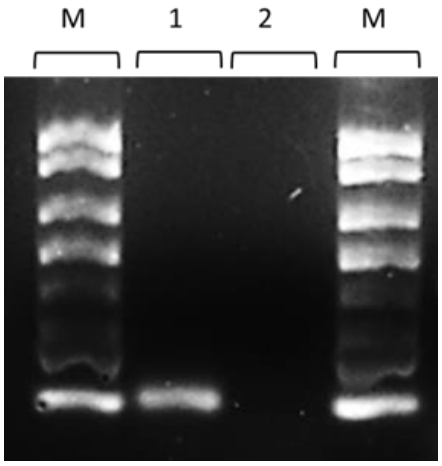

Fig. 40. Gel de agarosa en el que se muestra el producto de la amplificación del cDNA por PCR. Los carriles M muestran la escalera molecular de 1 kb. El carril 1 muestra la amplificación del cDNA del segmento A de IPNV, correspondiente a las células infectadas a una MOI de 0,01 durante 72 horas. El carril 2 corresponde a los cultivos control sin infectar en los que no se observa amplificación.

3.3. Expresión de genes relacionados con la respuesta antiviral e inmunitaria tras la exposición a poli I:C o la infección con VHSV

Una vez comprobado que la línea J86 es infectada por VHSV, con replicación y efecto citopático, y que se mantiene la presencia de IPNV en los cultivos, al menos como se detecta por la detección del segmento A por PCR, se analizó el efecto de la exposición a los virus en la expresión de genes relacionados con la respuesta innata en dicha línea. Dadas las diferencias observadas tras la exposición a los dos tipos virales, se utilizaron metodologías diferentes en este estudio.

Previamente a dichos estudios, se estudiaron los niveles basales de expresión de los genes de interés en la línea J86.

3.3.1. Perfil de la expresión génica basal de J86

Los resultados del estudio de la expresión basal de los genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata en cultivos no estimulados del pase 46 de la línea J86, el cual se utilizó en las experiencias descritas posteriormente, se muestran en la Fig. 41.

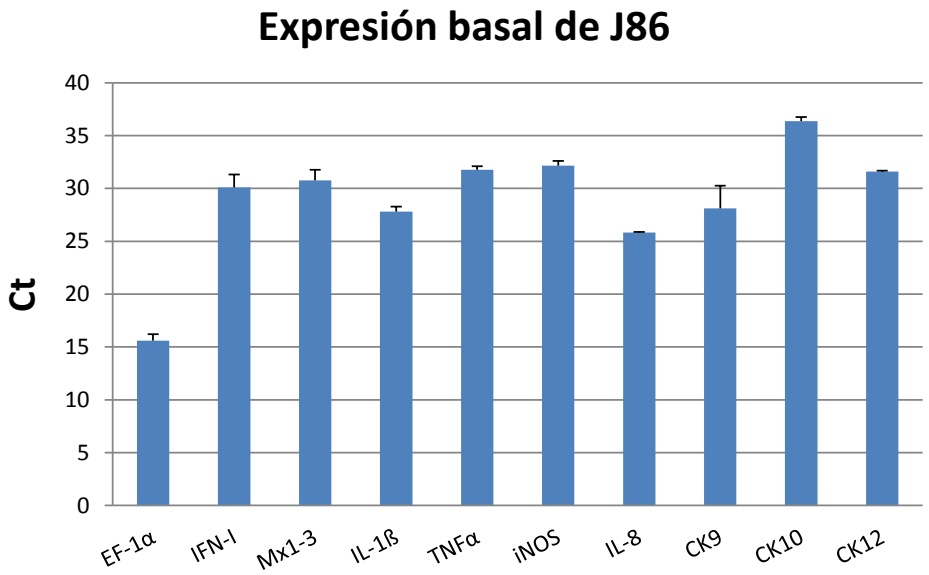

Fig. 41. Expresión de los genes considerados en el estudio, incluyendo el gen normalizador *EF-1α*, en cultivos no estimulados de la línea J86. Se representa la media de los valores Ct de 3 experimentos independientes más el error estándar obtenidos en los ensayos de qPCR.

Se observaron niveles basales de expresión de los genes *IL-8* y CK9 comparativamente altos respecto a los otros genes, lo cual se había detectado ya en los pases tempranos de dicha línea (Capítulo I de esta tesis, 3.2). En orden decreciente se observó también la expresión basal del gen *IL-1β* y del de la proteína inducible por interferón *Mx*. Los genes *IFN-I*, *TNFα*, *iNOS* y *CK12* mostraron una expresión basal más moderada, mientras que el resto de genes estudiados se expresaban con niveles muy bajos, como en el caso del gen *CK10*.

3.3.2. Expresión de genes relacionados con la respuesta antiviral

Para este ensayo se utilizaron réplicas de los cultivos expuestos a un pulso de 2 horas de exposición al virus VHSV, tal como se ha descrito en el apartado anterior (3.2) pero en las cuales algunos pocillos fueron expuestos a poli I:C (40 µg/mL), como control positivo de la inmunoestimulación.

<u>Interferón tipo I.</u> La media de la ratio de expresión del gen *INF-I* en la línea celular J86 se modificó tras la exposición al virus VHSV y al inmunoestimulante poli I:C, presentando claras diferencias entre ambos tratamientos. La máxima ratio de

expresión se encontró en las células expuestas a poli I:C durante 24 horas, no superándose en ningún caso un valor medio de 10 (Fig. 42).

Células tratadas con poli I:C

A las 24 horas, la mayor ratio de expresión de IFN-I sucedían en las células tratadas con poli I:C, con diferencias altamente significativas respecto a los controles. Estas diferencias también fueron significativas respecto a las ratios de expresión encontradas en las células infectadas.

Tras la exposición a poli I:C durante 48 horas la ratio de expresión de IFN-I descendió significativamente respecto a las 24 horas, pero se mantenía la diferencia respecto a los controles.

Células infectadas con VHSV

En los cultivos infectados con VHSV a una MOI de 0,01 la media de la ratio de expresión del gen *IFN-I* se incrementó ligeramente a las 24 horas, pero sin diferencias significativas respecto a la de los controles. Por otro lado, las células infectadas a una MOI de 0,001 mostraron un incremento de la expresión mayor que el observado en las células infectadas con la MOI más alta, pero también sin diferencias significativas respecto a los controles.

A las 48 horas posinfección se detectó un incremento en los niveles de expresión con respecto a los controles y a los valores encontrados a las 24 horas, sin ser en ningún caso significativos. Así mismo, la ratio la expresión era ligeramente más alta en las células infectadas a una MOI de 0,001.

Proteína Mx. La expresión del gen de la proteína inducible por interferón Mx fue inducida tanto en las células infectadas como en las células inmunoestimuladas, observándose nuevamente claras diferencias entre ambos tratamientos y con respecto a los controles en el caso de la exposición a poli I:C. Los valores máximos alcanzados para las medias de las ratios de expresión se dieron a las 48 horas tras la exposición a poli I:C (Fig. 43).

Células tratadas con poli I:C

La exposición de las células al poli I:C durante 24 horas indujo un incremento de la ratio de expresión de *Mx* muy significativa, de hasta 1000 veces, respecto a los controles. Esta ratio de expresión se incrementó significativamente a las 48 horas, alcanzando un valor próximo a 5000 veces los controles (Fig. 43).

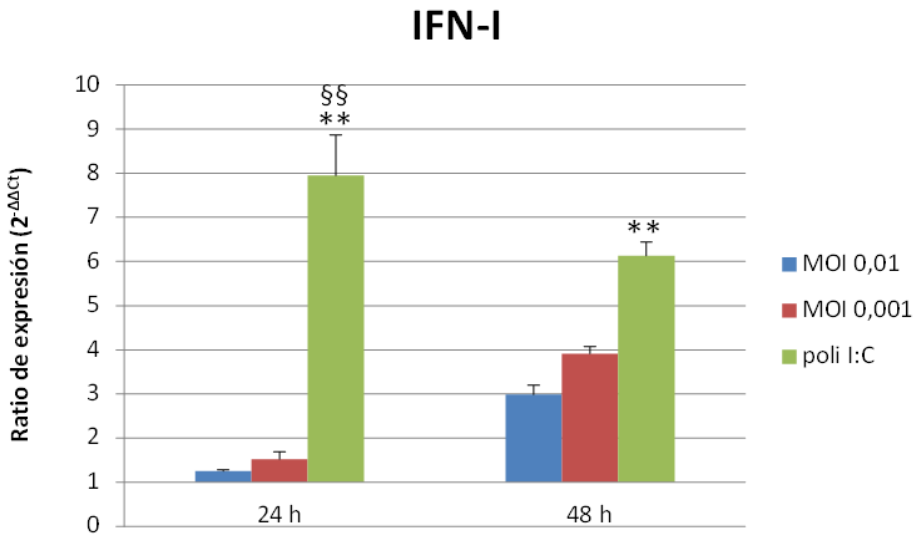

Fig. 42. Expresión del gen *IFN-I* a las 24 y 48 horas en células tratadas con poli I:C o infectadas con VHSV a diferentes MOI. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión IFN-I/EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los tratamientos a distintos tiempos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Células infectadas con VHSV

No se observaron diferencias significativas respecto a los controles o entre diferentes MOI ni a las 24 o 48 horas posinfección en las ratios de expresión de Mx (Fig. 43).

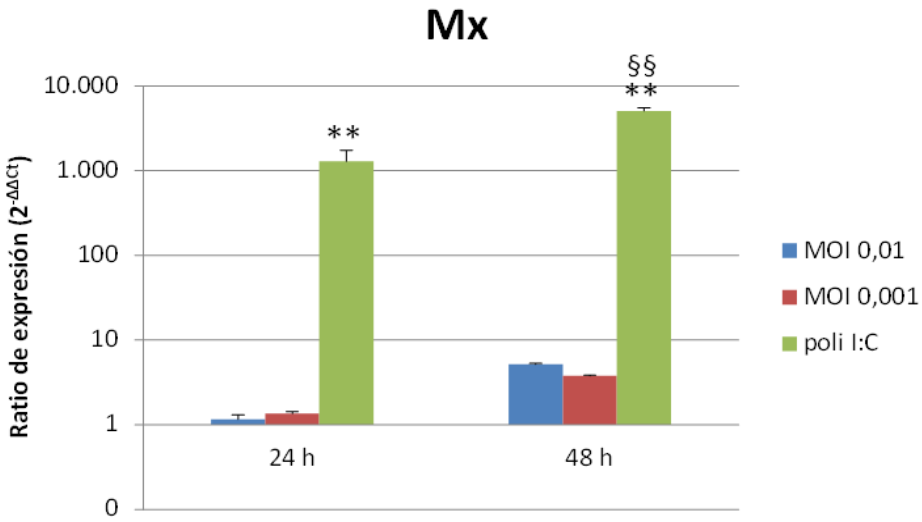

Fig. 43. Expresión del gen *Mx* a las 24 y 48 horas en células tratadas con poli I:C o infectadas con VHSV a diferentes MOI. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión Mx/EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los tratamientos a distintos tiempos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

3.3.3. Expresión de genes relacionados con la respuesta proinflamatoria

Interleuquina 1 beta. La expresión del gen *IL-1β* aumentó en los cultivos tras la exposición a los distintos tratamientos, especialmente en los cultivos infectados a la MOI más baja. La respuesta de las células a ambas dosis infectivas fue similar, mientras que se detectaron claras diferencias respecto a la respuesta inducida por el poli I:C (Fig. 44).

Células tratadas con poli I:C

En los cultivos expuestos a poli I:C durante 24 horas no se detectaron cambios significativos respecto a los controles, si bien hubo un aumento de la media de las ratios de expresión de IL-1β (Fig. 44). A las 48 horas la ratio de expresión se reducía con respecto a los controles (Fig. 44).

Células infectadas con VHSV

En los cultivos expuestos durante 24 horas a VHSV, independientemente de la MOI, la expresión de la IL-1β aumentó de manera significativa con respecto a los controles, alcanzando valores en torno a 18 veces el valor del control (Fig. 44).

Este aumento de la media de las ratios de expresión se mantuvo, para ambos grupos de cultivos infectados, a las 48 horas, siendo significativo respecto a los controles y respecto a los valores observados para los mismos a las 24 horas (Fig. 44).

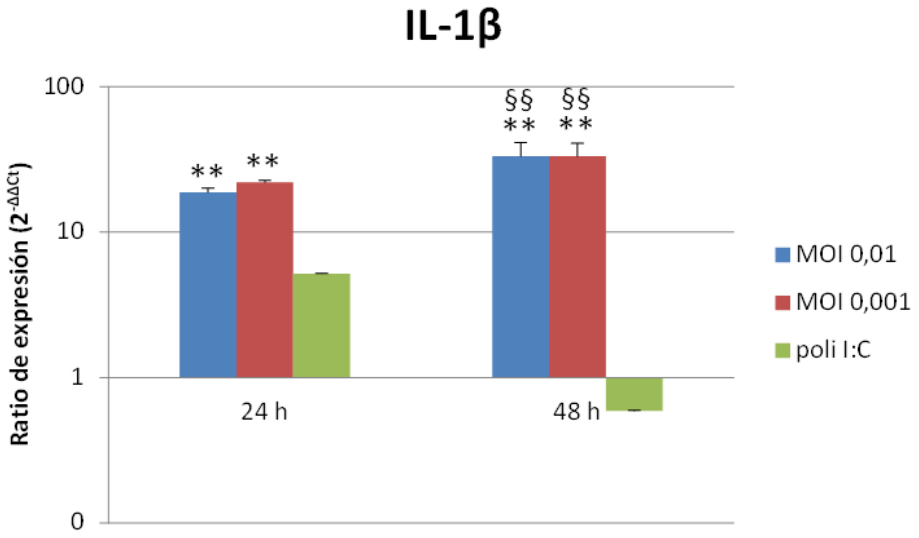

Fig. 44. Expresión del gen *IL-1β* a las 24 y 48 horas en células tratadas con poli I:C o infectadas con VHSV a diferentes MOI. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión IL-1β/EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los tratamientos a distintos tiempos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Factor de necrosis tumoral alfa. La expresión del gen *TNFα* tuvo una modulación similar a la observada para el gen de IL-1β, viéndose aumentada en los cultivos infectados, especialmente a la MOI más baja, y observándose diferencias respecto a la respuesta inducida por el poli I:C (Fig. 45).

Células tratadas con poli I:C

El tratamiento de las células con poli I:C durante 24 horas indujo un descenso de la expresión del gen *TNFα* con respecto al control, que se mantuvo a las 48 horas, pero en ningún caso fue estadísticamente significativo (Fig. 45).

Células infectadas con VHSV

En los cultivos infectados con una MOI de 0,01 se detectaron ratios de expresión de TNFα significativamente mayores que en los controles, con valores en torno a 10 (Fig. 45). Para la MOI de 0,001 el incremento de la ratio de expresión de este gen fue también significativo respecto a los controles y también significativamente mayor que el observado para los cultivos infectados a la MOI más alta (Fig. 45).

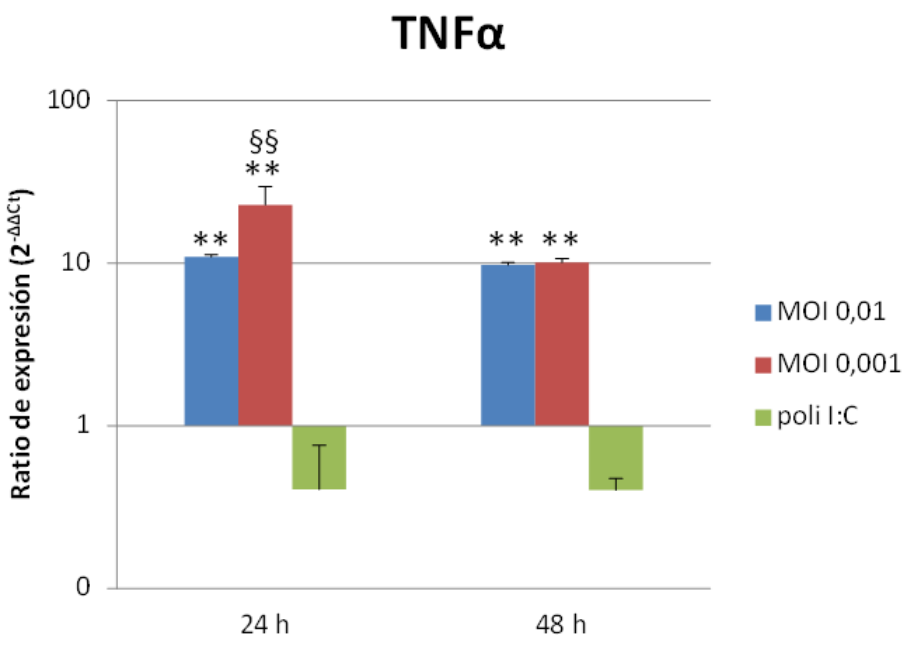

Fig. 45. Expresión del gen *TNFα* a las 24 y 48 horas en células tratadas con poli I:C o infectadas con VHSV a diferentes MOI. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión TNFα /EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los tratamientos a distintos tiempos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

A las 48 horas las ratios de expresión de TNFα se mantuvieron aumentadas significativamente con respecto a los controles para ambos grupos de infección, y

muy similares entre sí, con valores cercanos a 10 (Fig. 45). Para la MOI de 0,001 se produjo un descenso estadísticamente significativo en la ratio de expresión respecto a las 24 horas (Fig. 45).

Óxido nítrico sintasa inducible. De manera general, la expresión del gen *iNOS* para ambos tratamientos (poli I:C, VHSV) se vio disminuida en los tiempos estudiados. Únicamente se detectó un incremento de la expresión a las 48 horas en los cultivos tratados con poli I:C (Fig. 46).

Células tratadas con poli I:C

El tratamiento con poli I:C indujo un pequeño pero estadísticamente significativo descenso de la expresión de iNOS a las 24 horas, que se incrementó, también significativamente, frente a los controles a las 48 horas (Fig. 46).

Células infectadas con VHSV

La infección con VHSV produjo una disminución estadísticamente significativa de las ratios de expresión de iNOS con valores semejantes para ambas MOI (Fig. 46).

A las 48 horas e independiente de la MOI las ratios de expresión se mantuvieron significativamente por debajo de los controles, pero con valores más próximos a los de ellos y diferencias significativas con respecto a las 24 horas.

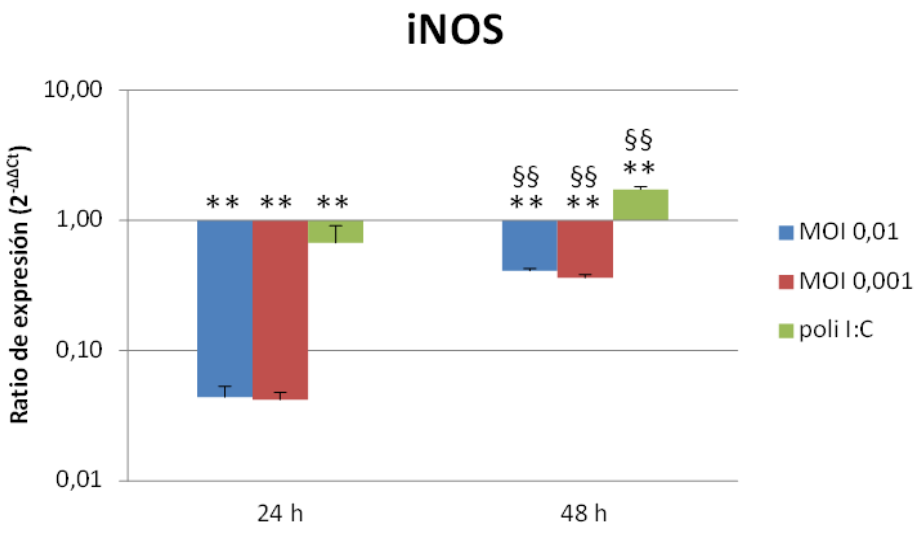

Fig. 46. Expresión del gen *iNOS* a las 24 y 48 horas en células tratadas con poli I:C o infectadas con VHSV a diferentes MOI. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión iNOS/EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los tratamientos a distintos tiempos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

3.3.4. Expresión de genes de quimioquinas

Interleuquina 8. La ratio de expresión del gen *IL-8* se vio claramente incrementada en los cultivos infectados y tratados con poli I:C a las 24 horas. Sin embargo, las ratios de expresión de los cultivos infectados aumentaron a las 48 horas, mientras que disminuyeron en los cultivos tratados con poli I:C (Fig. 47).

Células tratadas con poli I:C

A las 24 horas el tratamiento con poli I:C indujo un incremento estadísticamente significativo de la ratio de expresión del IL-8 respecto a los controles (Fig. 47). A las 48 horas la ratio de expresión de IL-8 cayó brusca y significativamente, alcanzando valores inferiores a los controles (Fig. 47).

Células infectadas con VHSV

A las 24 posinfección e independientemente de la MOI se incrementó significativamente la expresión de IL-8 con respecto a los controles. A las 48 horas esta sobreexpresión se incrementó aún más, con diferencias significativas respecto a las 24 horas, para ambas MOI (Fig. 47).

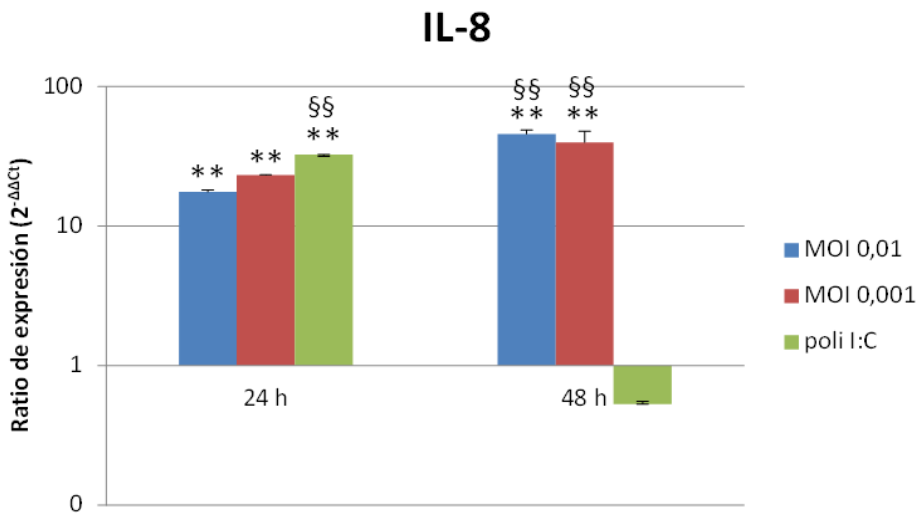

Fig. 47. Expresión del gen *IL-8* a las 24 y 48 horas en células tratadas con poli I:C o infectadas con VHSV a diferentes MOI. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión IL-8/EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los tratamientos a distintos tiempos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Quimioquina 9. La expresión del gen *CK9* en los cultivos de J86 se vio modificada tras la exposición al VHSV y a poli I:C, con un incremento inicial tras la infección y descensos significativos a las 48 horas (Fig. 48).

Células tratadas con poli I:C

La exposición a poli I:C indujo un descenso estadísticamente significativo de las expresión de CK9 tanto a las 24 como a las 48 horas con valores inferiores a los de los controles (Fig. 48).

Células infectadas con VHSV

Tras la infección de los cultivos durante 24 horas la ratio de expresión de CK9 se incrementó significativamente con respecto a los controles para ambas MOI, siendo mayor para la MOI de 0,001 (Fig. 48).

A las 48 horas tras la infección se produjo un marcado descenso, estadísticamente significativo respecto a las 24 horas, de las ratio de expresión de este gen, con valores inferiores al del control (Fig. 48).

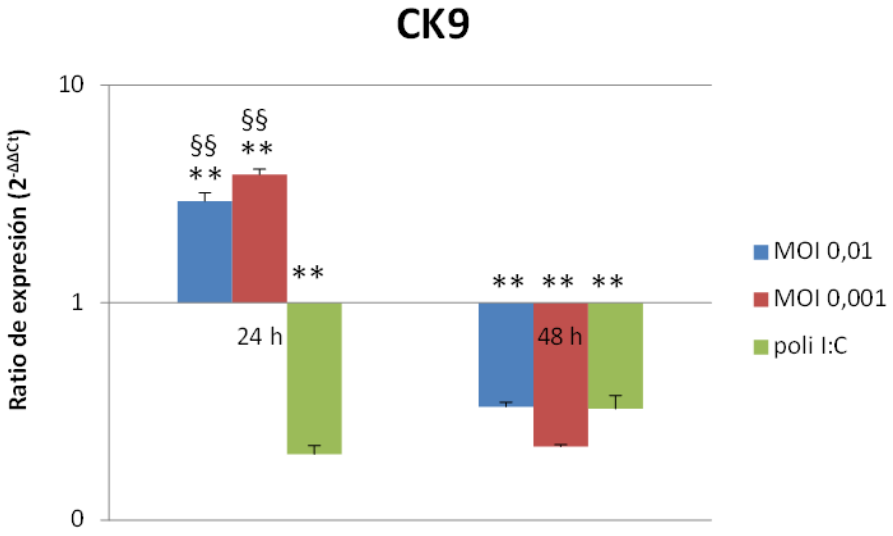

Fig. 48. Expresión del gen *CK9* a las 24 y 48 horas en células tratadas con poli I:C o infectadas con VHSV a diferentes MOI. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión CK9/ EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los tratamientos a distintos tiempos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Quimioquina 10. La expresión del gen CK10 se vio inducida en todos los casos, tanto en los cultivos infectados a las diferentes MOI como en los inmunoestimulados con poli I:C, alcanzando valores máximos de las ratios de expresión de hasta 30.000 veces sobre los controles (Fig. 49).

Células tratadas con poli I:C

El tratamiento de los cultivos con poli I:C indujo una fuerte sobreexpresión de CK10 a las 24 horas, alcanzando valores significativamente más altos (hasta 8.000 veces) que el control (Fig. 49).

La sobreexpresión de CK10 se incrementó significativamente a las 48 horas, alcanzando los máximos valores detectados para la expresión de este gen, en torno a 30.000 veces por encima de la ratio del control (Fig. 49).

Células infectadas con VHSV

Tras la infección con VHSV, tanto a 24 como a 48 horas e independientemente de la MOI, se incrementó la expresión de CK10, pero sin diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles ni entre los dos tiempos analizados, aunque se alcanzó un valor máximo en torno a 275 veces respecto a ellos para la MOI de 0,01 a las 24 horas (Fig. 49).

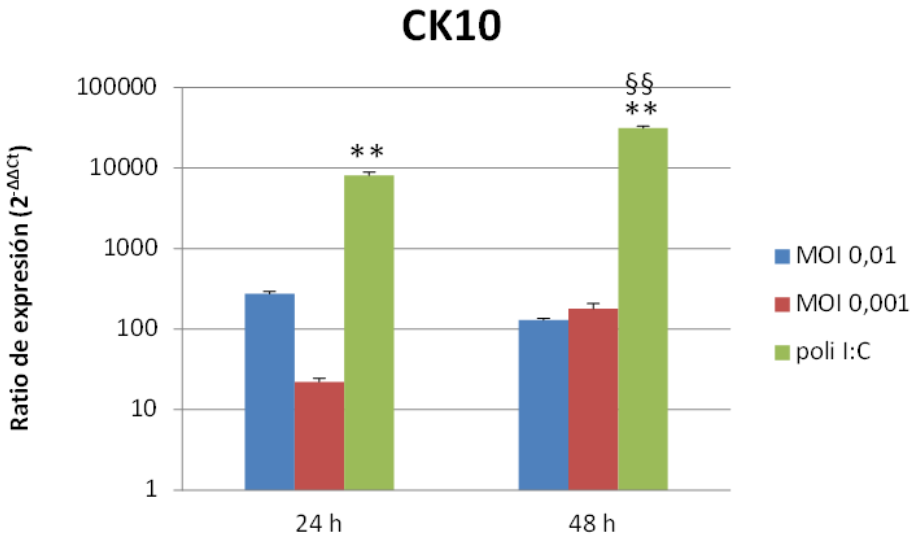

Fig. 49. Expresión del gen *CK10* a las 24 y 48 horas en células tratadas con poli I:C o infectadas con VHSV a diferentes MOI. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión CK10/EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los tratamientos a distintos tiempos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Quimioquina 12. De manera similar a lo observado para CK10, la expresión del gen de la quimioquina CK12 se incrementó significativamente tras el tratamiento con poli I:C, pero no tras la infección con VHSV (Fig. 50).

Células tratadas con poli I:C

La inmunoestimulación de la línea J86 con poli I:C indujo un pico de expresión con respecto al control a las 24 horas, y un pequeño pero significativo descenso a las 48 horas (Fig. 50).

Células infectadas con VHSV

Tras la exposición al virus se detectó un incremento de las ratios de expresión de CK12 tanto en los cultivos infectados con alta MOI (0,01) como en los infectados a la MOI más baja, pero sin diferencias significativas respecto a los controles ni entre los dos tiempos estudiados (Fig. 50).

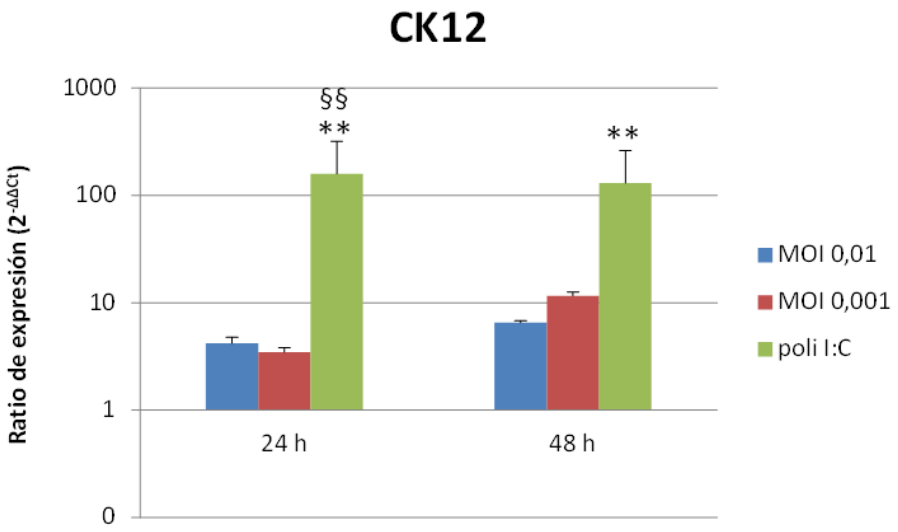

Fig. 50. Expresión del gen *CK12* a las 24 y 48 horas en células tratadas con poli I:C o infectadas con VHSV a diferentes MOI. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión CK12/EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los tratamientos a distintos tiempos (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

3.3.5. Expresión del gen *Mx* tras la infección con IPNV o exposición a poli I:C

Para este ensayo se utilizaron réplicas de los cultivos expuestos a un pulso de 2 horas de exposición al virus IPNV, tal como se ha descrito en el apartado anterior (2.3), pero en las cuales algunos pocillos fueron expuestos a poli I:C (40 µg/mL), como control positivo de la inmunoestimulación. Solo se analizó la expresión a las 72 horas.

Células tratadas con poli I:C

Tras 72 horas de exposición a poli I:C se produjo un incremento significativo en la ratio de expresión del gen *Mx* respecto al control, con valores en torno a 5000 veces los de estos (Fig. 51).

Células infectadas con IPNV

En los cultivos infectados con IPNV las ratio de expresión de Mx se elevaron de forma no significativa respecto a los controles para ambas MOI (Fig. 51).

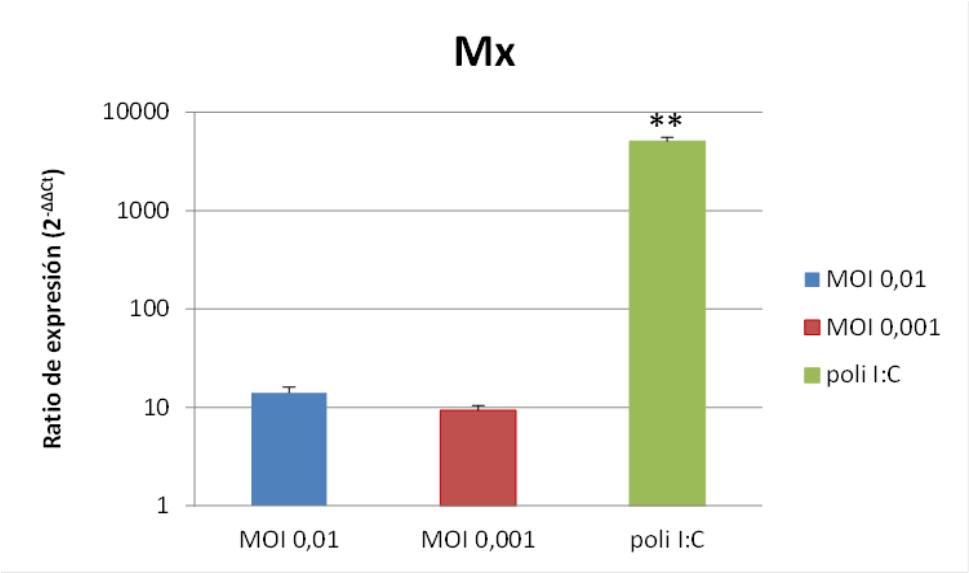

Fig. 51. Expresión del gen *Mx* a las 72 horas en células tratadas con poli I:C o infectadas con IPNV a diferentes MOI. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión Mx/EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01).

3.3.6. Inmunodetección de mediadores inmunitarios

Además del estudio de la expresión génica mediante qRT-PCR, se analizó la expresión de las proteínas Mx, IL-8 e iNOS en los cultivos de la línea J86 expuestos a VHSV, utilizando la técnica de inmunofluorescencia y los anticuerpos y condiciones indicadas en la Tabla XI.

Para ello se utilizaron réplicas de los cultivos sometidos a un pulso de 2 horas de exposición al virus VHSV a una MOI de 0,01 y como control positivo cultivos expuestos a poli I:C (40 µg/mL), tal como se ha descrito en el apartado anterior (3.2) en este mismo capítulo. Como control negativo del ensayo se utilizaron cultivos no expuestos al virus ni a poli I:C y que fueron procesados para el inmunomarcaje de la misma forma que los inoculados.

3.3.6.1. Detección de Mx

En los cultivos control, no inoculados con VHSV, se encontró un patrón de inmunofluorescencia para Mx disperso en el citoplasma de la mayoría de las células, de aspecto finamente granular (Fig. 52a-c).

A las 24 horas posinfección con VHSV se observó que el patrón de un inmunomarcaje variaba, de forma que muchas células mostraban patentes gránulos con mayor intensidad de fluorescencia, distribuidos perinuclearmente (Fig. 52d-f). Este mismo patrón de inmunofluorescencia se observó en los cultivos expuestos a poli I:C (Fig. 52g-i).

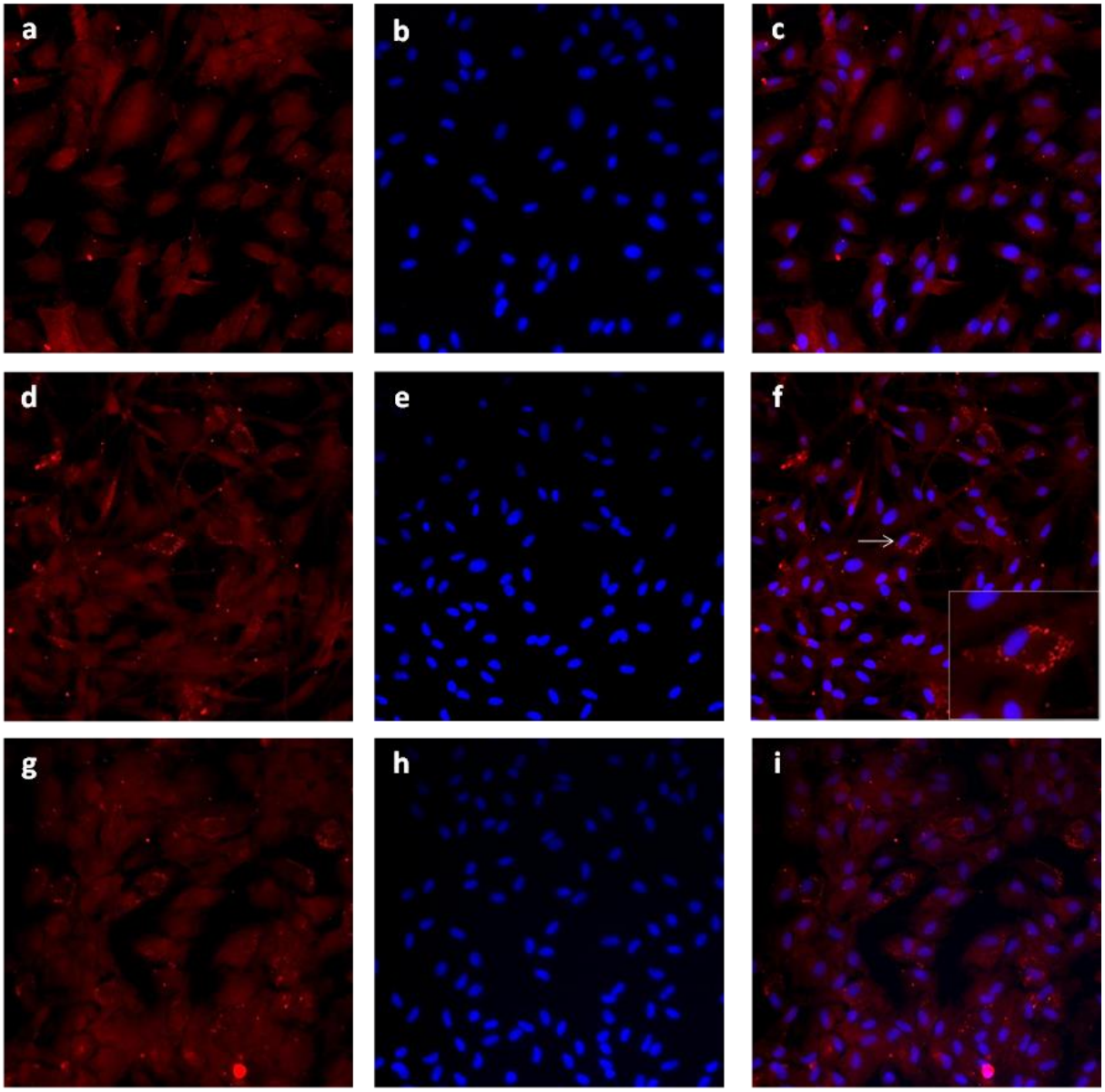

Fig. 52. Imágenes de inmunofluorescencia para la detección de proteína Mx en cultivos de la línea J86 tras 24 horas de incubación. **a-c**) Cultivos control negativo, no tratados; **d-f**) Cultivos expuestos a pulso de 2 horas de exposición a VHSV con una MOI de 0,01. Detalle: 400x; **g-i**) Cultivos expuestos a poli I:C. Los núcleos celulares se contrastaron con DAPI (b, e, h) y la columna de la derecha muestra la superposición de las imágenes de los dos canales de fluorescencia. 200x.

A las 48 horas de cultivo, los cultivos control seguían mostrando un aspecto similar al descrito para las 24 horas (Fig. 53a-c). En los cultivos infectados con VHSV, aunque no se realizó un recuento, se apreciaba un aumento en el número de gránulos fluorescentes por célula (Fig. 53d-f), fenómeno que era aún más patente en los cultivos expuestos a poli I:C (Fig. 53g-i).

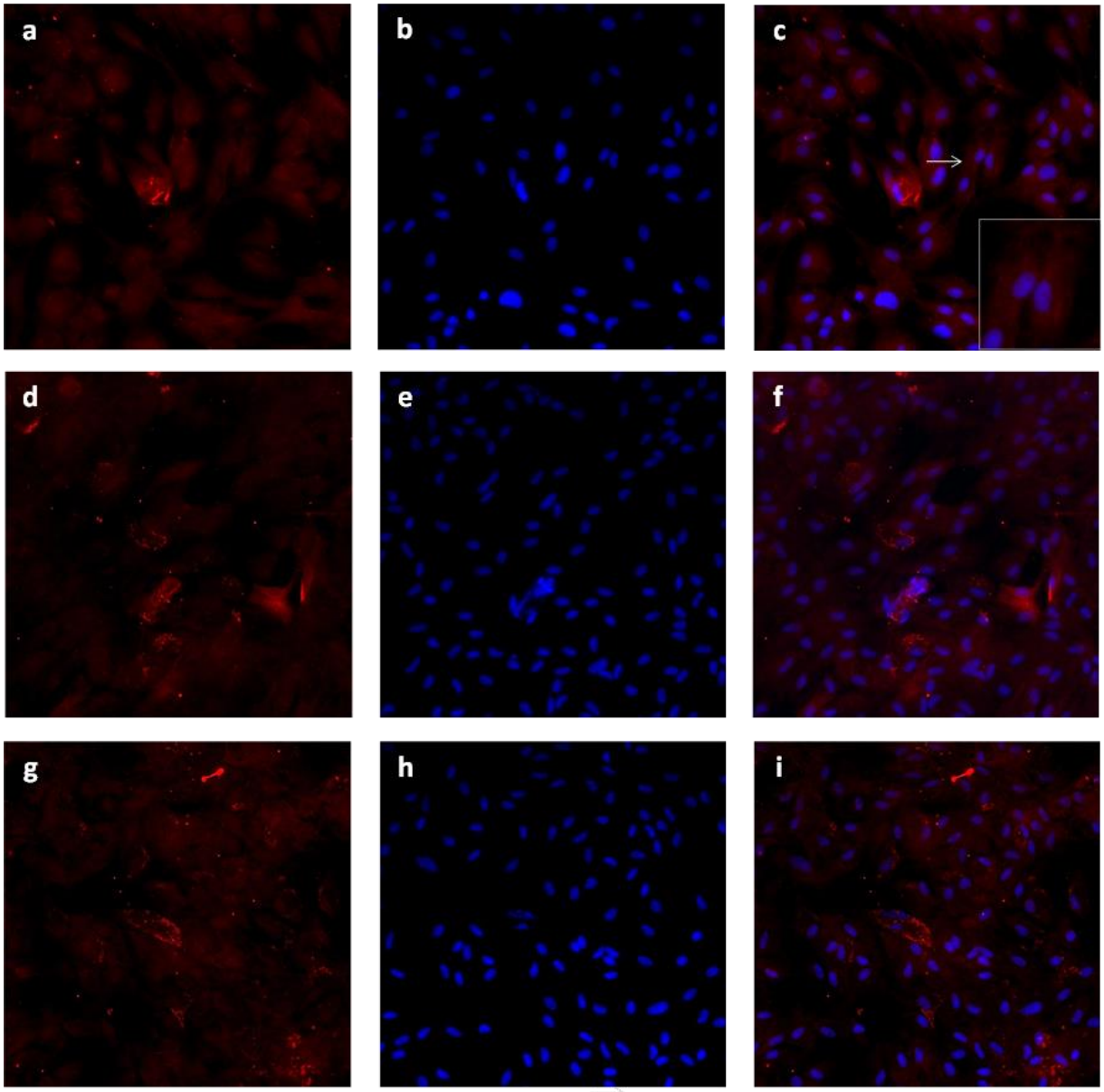

Fig. 53. Imágenes de inmunofluorescencia para la detección de proteína Mx en cultivos de la línea J86 tras 48 horas de incubación. **a-c**) Cultivos control negativo, no tratados. Detalle: 400x; **d-f**) Cultivos expuestos a pulso de 2 horas de exposición a VHSV con una MOI de 0,01. **g-i**) Cultivos expuestos a poli I:C. Los núcleos celulares se contrastaron con DAPI (b, e, h) y la columna de la derecha muestra la superposición de las imágenes de los dos canales de fluorescencia. 200x.

3.3.6.2. Detección de iNOS

En los cultivos control la mayoría de las células mostraron inmunomarcaje positivo, pero débil, para iNOS, en forma de acúmulos de pequeños gránulos localizados a un lado del núcleo (Fig. 54a-c).

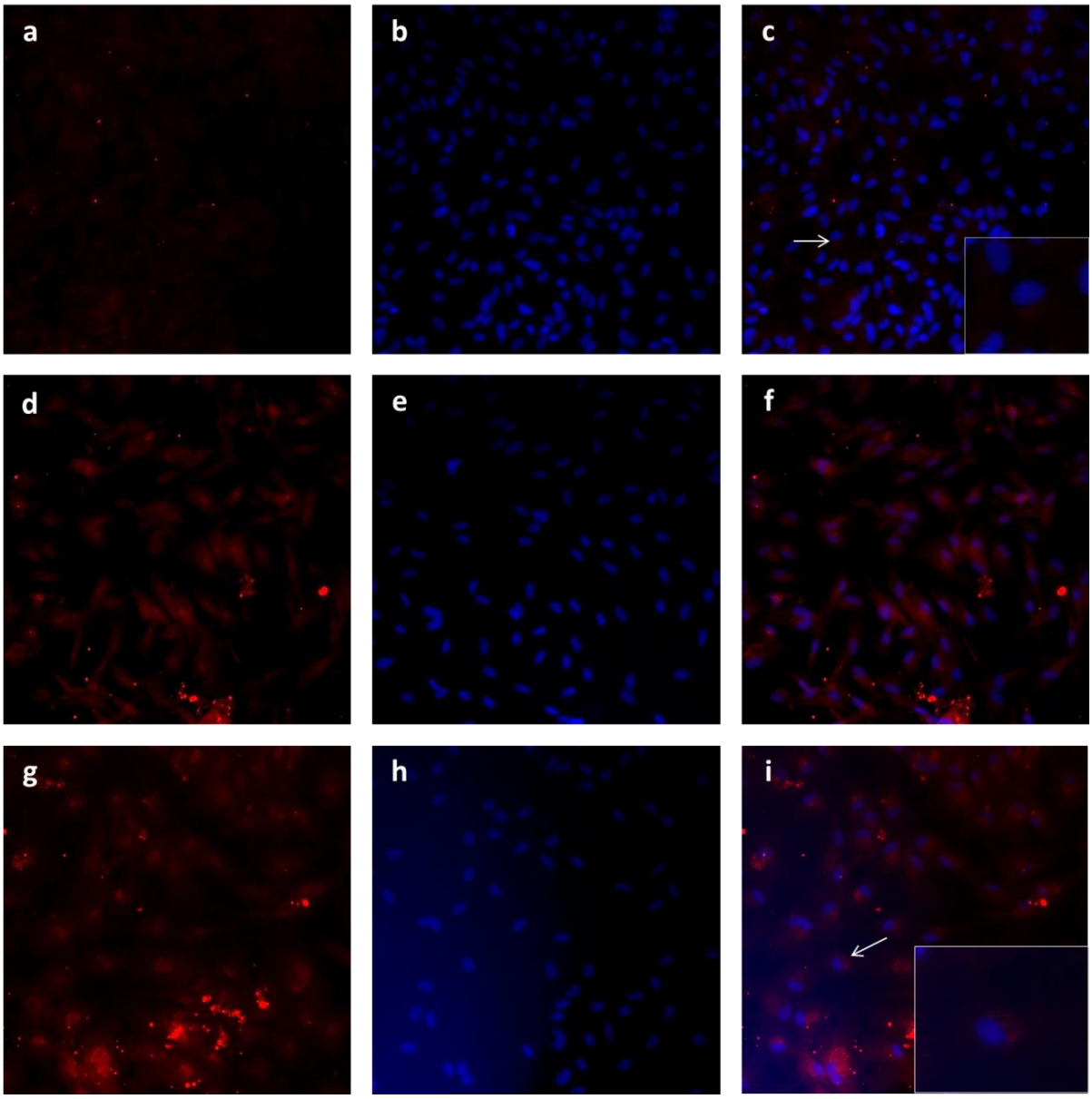

Fig. 54. Imágenes de inmunofluorescencia para la detección de proteína iNOS en cultivos de la línea J86 tras 24 horas de incubación. **a-c**) Cultivos control negativo, no tratados. Detalle 400x; **d-f**) Cultivos expuestos a pulso de 2 horas de exposición a VHSV con una MOI de 0,01. **g-i**) Cultivos expuestos a poli I:C. Detalle: 430x. Los núcleos celulares se contrastaron con DAPI (b, e, h) y la columna de la derecha muestra la superposición de las imágenes de los dos canales de fluorescencia. 200x.

A las 24 horas posinfección con VHSV se observó una mayor cantidad de células inmunomarcadas, así como un aumento de la intensidad de la fluorescencia, que presentaba el mismo patrón de distribución en acúmulos situados en proximidad a un polo nuclear, pero de mayor tamaño que en los controles (Fig. 54d-f). Estos

mismos cambios, pero con mayor intensidad se observaron en los cultivos que fueron expuestos a poli I:C durante 24 horas (Fig. 54g-i).

A las 48 horas, los cultivos control mostraban un patrón de inmunomarcaje similar al observado a las 24 horas (Fig. 55a-c) y los cambios observados en los cultivos expuestos a VHSV (Fig. 55d-f) o a poli I:C (Fig. 55g-i) también eran semejante a los descritos para ese tiempo, pero un menor incremento de la intensidad de la fluorescencia citoplasmática.

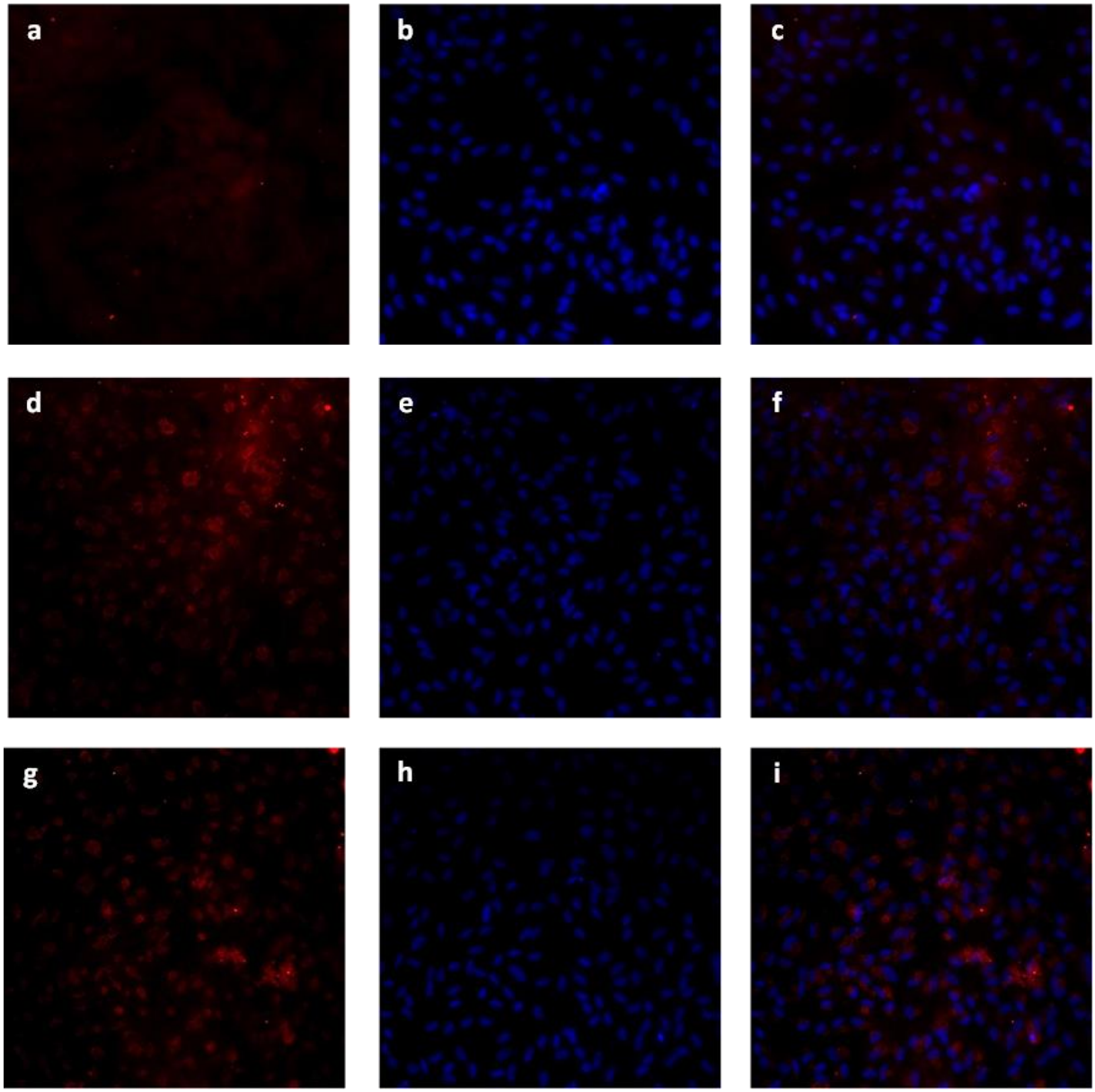

Fig. 55. Imágenes de inmunofluorescencia para la detección de proteína iNOS en cultivos de la línea J86 tras 48 horas de incubación. **a-c**) Cultivos control negativo, no tratados; **d-f**) Cultivos expuestos a pulso de 2 horas de exposición a VHSV con una MOI de 0,01. **g-i**) Cultivos expuestos a poli I:C. Los núcleos celulares se contrastaron con DAPI (b, e, h) y la columna de la derecha muestra la superposición de las imágenes de los dos canales de fluorescencia. 200x.

3.3.6.3. Detección de IL-8

En los cultivos control la mayoría de las células, pero no todas, presentaban un patrón de inmunomarcaje en el citoplasma para IL-8 débil, de aspecto finamente granular que se concentraba en proximidad a un polo del núcleo (Fig. 56a-c).

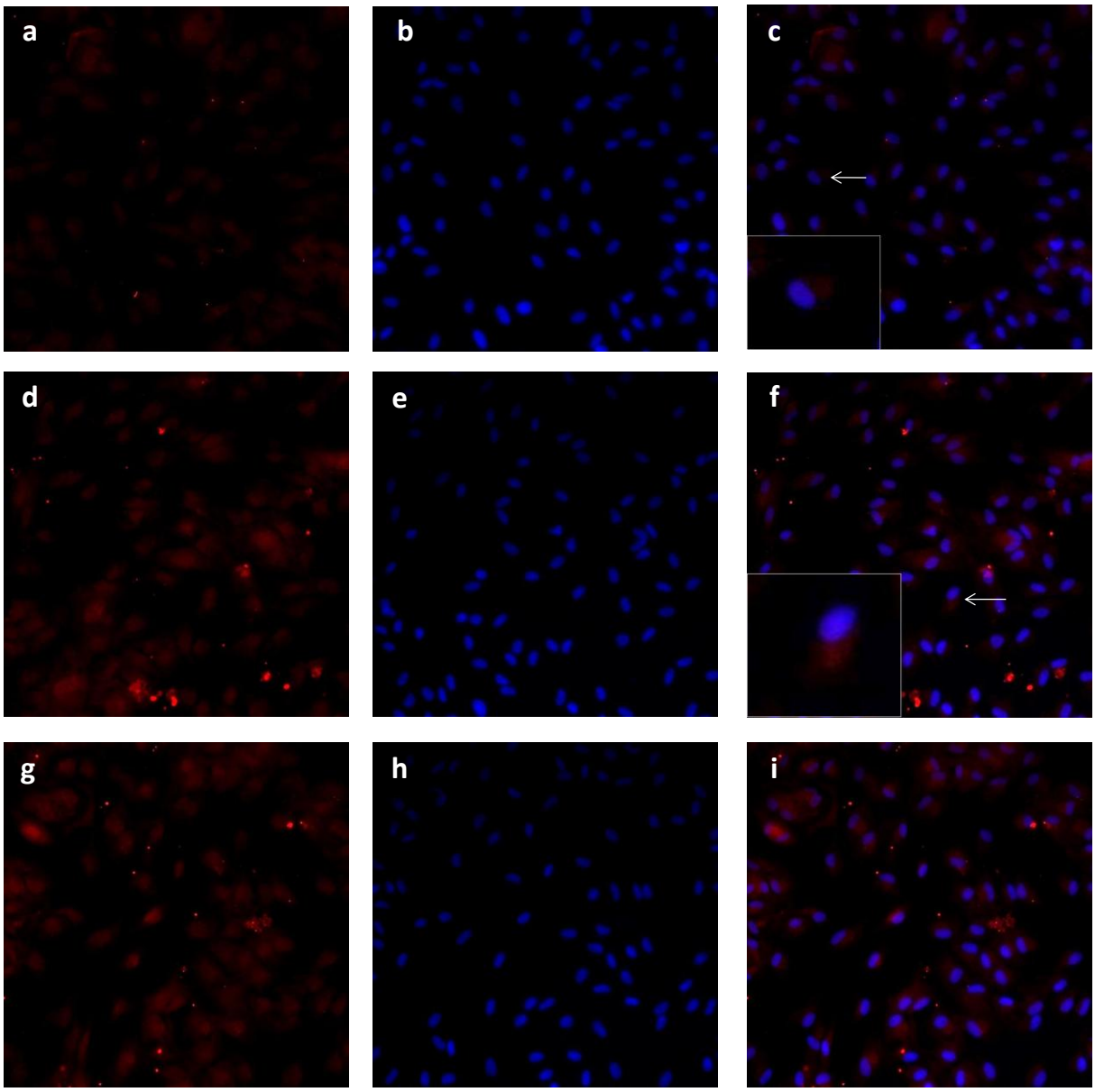

Fig. 56. Imágenes de inmunofluorescencia para la detección de proteína IL-8 en cultivos de la línea J86 tras 24 horas de incubación. **a-c**) Cultivos control negativo, no tratados; **d-f**) Cultivos expuestos a pulso de 2 horas de exposición a VHSV con una MOI de 0,01. Detalle: 475x; **g-i**) Cultivos expuestos a poli I:C. Los núcleos celulares se contrastaron con DAPI (b, e, h) y la columna de la derecha muestra la superposición de las imágenes de los dos canales de fluorescencia. 200x.

A las 24 horas posinfección con VHSV se apreciaba un notable aumento en el número de células inmunomarcadas y de la intensidad de la fluorescencia citoplásmica, que presentaba el mismo patrón de distribución en acúmulos situados en proximidad a un polo nuclear, que eran mayor de tamaño que en los controles (Fig. 56d-f). En los cultivos expuestos a poli I:C durante 24 horas se observaron cambios similares a los

descritos para la infección con VHSV, pero con un mayor número de células que presentaban inmunomarcaje y mayor intensidad de fluorescencia (Fig. 56g-i).

A las 48 horas, los cultivos control mostraban un patrón de inmunomarcaje similar al descrito para las 24 horas (Fig. 57a-c), mientras que en los cultivos infectados con VHSV (Fig. 57d-f) y en los expuestos a poli I:C (Fig. 57g-i) se apreciaba un incremento en el inmunomarcaje para IL-8, con un patrón de distribución celular de la fluorescencia semejante al observado a las 24 horas, pero con un mayor número de células positivas e intensidad de la fluorescencia, especialmente para poli I:C.

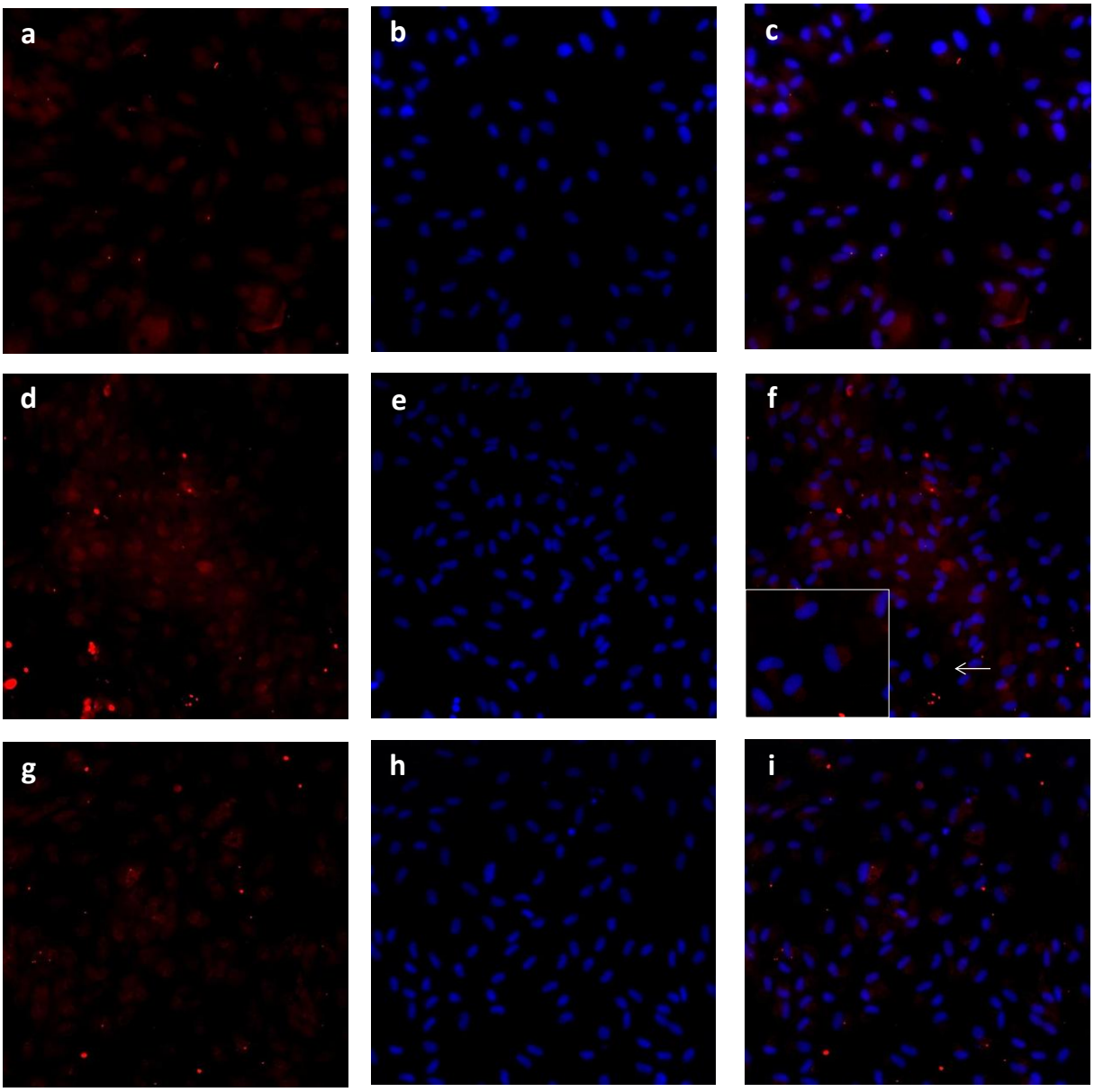

Fig. 57. Imágenes de inmunofluorescencia para la detección de proteína IL-8 en cultivos de la línea J86 tras 48 horas de incubación. **a-c**) Cultivos control negativo, no tratados; **d-f**) Cultivos expuestos a pulso de 2 horas de exposición a VHSV con una MOI de 0,01. Detalle: 400x; **g-i**) Cultivos expuestos a poli I:C. Los núcleos celulares se contrastaron con DAPI (b, e, h) y la columna de la derecha muestra la superposición de las imágenes de los dos canales de fluorescencia. 200x.

4. Discusión

En el presente trabajo se ha utilizado la línea J86, obtenida a partir de explantes de aleta de *O. mykiss*, para estudiar la susceptibilidad de dichas células a virus de distintos géneros de importancia para salmónidos (VHSV e IPNV) y caracterizar la infección temprana por VHSV, con especial interés en la modulación de la respuesta inmunitaria innata. El objetivo es aportar un mayor conocimiento sobre el papel de la piel como primera defensa frente a las infecciones y como ruta de entrada de patógenos virales.

La elección de utilizar líneas celulares derivadas de aleta se fundamenta en los resultados de estudios realizados en los últimos años para analizar la ruta de entrada de IHNV y VHSV en trucha arcoíris, que demuestran que comienza en la base de las aletas (Harmache et al. 2006; Montero et al. 2011a; Montero et al. 2011b; Quillet et al. 2001).

Nuestros resultados demuestran que la línea J86 es resistente a la infección por IPNV y susceptible a la producida por VHSV. En cuanto a IPNV, los ensayos de detección de partículas virales en el citoplasma de las células mediante inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-VP2 de IPNV, y de expresión del segmento A de IPNV mediante RT-PCR, demuestran que IPNV es capaz de infectar las células de la línea celular fibroblástica de aleta J86, pero que esta infección no produce efectos citopáticos ni resulta en la producción de partículas virales. Así, a las 72 horas posexposición a IPNV, no se detectaba la presencia de la VP2 en las células, pero sí se detectaba la presencia de RNA viral correspondiente al segmento A.

Aunque se ha descrito que hay líneas celulares infectadas de manera persistente con IPNV que no muestran efecto citopático (García et al. 2011; Kim et al. 2012; Rodriguez Saint-Jean et al. 2003), la no producción de la proteína VP2 indica que en la línea J86 este virus es incapaz de completar su ciclo de replicación. Éste fenómeno ha sido descrito para otros virus, como el virus de la necrosis nerviosa (NNV), un Betanodavirus cuyo genoma está compuesto por RNA monocatenario, que es capaz de infectar a las células de la línea celular ACL, derivada de larvas de bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), detectándose en ellas su genoma, pero no produce efecto citopático ni partículas infecciosas (Jensen et al. 2013).

En el caso de VHSV, a las 24 y 48 horas posinfección se encontraban células J86 positivas para el inmunomarcaje anti-proteína N de VHSV y el análisis de la expresión del gen *N* confirmó que el VHSV era capaz de transcribir su genoma, y para la MOI de 0,01 a las 72 horas aparecían numerosos focos de lisis en las monocapas, con una destrucción total de los cultivos tras una semana de incubación.

Además, el ensayo de titulación viral de los sobrenadantes de los cultivos de la línea J86 inoculados con VHSV demostró que los cultivos se producen partículas virales infectivas.

La diferente susceptibilidad de la línea J86 a la infección por IPNV o por VHSV puede atribuirse, parcialmente, a: i) que estos virus tienen distintos tipos celulares diana principales, las células acinares del páncreas exocrino para IPNV (Rodriguez Saint-Jean et al. 2003) y las células endoteliales del sistema vascular para VHSV (OIE, 2014a); y ii) a la diferente intensidad de despliegue de mecanismos de defensa antiviral intracelular que induce la infección y a la diferente sensibilidad viral a ellos (Haller et al. 2007). Por ejemplo, la línea celular RTH, endotelial derivada de corazón de *O. mykiss*, se ha descrito como resistente a la infección por IPNV, ya que no se observó transcripción viral ni efecto citopático tras la inoculación con este virus, pero sí que es susceptible a la infección por VHSV (Luque et al. 2014).

IPNV es capaz de infectar las células de la línea J86, pero en algún punto del ciclo de infección éste se interrumpe antes de que se traduzcan los genes virales. Esto se ha relacionado con el efecto antiviral de las proteínas Mx, mediante la inhibición de la síntesis de RNA viral, tal como se ha demostrado en un estudio con células derivadas de cerebro de barramundi (*Lates calcarifer*) infectadas con NNV, en el que se observó una disminución del título viral a la par que un aumento en la expresión de Mx y que esta proteína colocaliza y coinmunoprecipita con la RNA-polimerasa viral (Wu et al. 2010). Igualmente, otro estudio realizado en la línea celular HINAE (Chen et al. 2004), derivada de embrión de la platija japonesa (*P. olivaceus*), transfectada para expresar la proteína Mx homóloga, demostró una reducción significativa de la replicación de los rhabdovirus Hirame y VHSV (Caipang et al. 2003). De forma similar, se ha descrito que Mx tiene un efecto protector contra el efecto citopático de VHSV en la línea celular EPC, correlacionándose esa protección con la inducción de su transcripción (Schyth et al. 2006).

En nuestro estudio, la línea J86, que es capaz de incrementar notablemente la expresión de Mx tras la estimulación con poli I:C, mostró un incremento moderado de este gen (10 veces sobre los controles, Fig. 51), aunque no estadísticamente significativo, tras las 72 horas posinfección con IPNV. No obstante, esta moderada sobreexpresión era más alta que la detectada a las 48 horas en los cultivos infectados con VHSV (Fig. 43). Aunque no se puede hacer una comparación directa entre ambos resultados, ya que se refieren a tiempos posinfección diferentes, es posible que esas diferencias en la expresión de Mx contribuyan a explicar la diferente susceptibilidad de la línea J86 a la infección por un virus u otro. En este sentido, es significativo que a las 48 horas posinfección con VHSV se apreció una aparente disminución en el

número de células positivas para la proteína N de VHSV y un descenso del título viral en los sobrenadantes, coincidiendo con el incremento en la expresión de Mx.

Atendiendo a la susceptibilidad de la línea J86 a la infección por VHSV se eligió este modelo experimental para estudiar *in vitro* la respuesta defensiva temprana tras la infección.

Para analizar la modulación de la respuesta inmunitaria innata en las células infectadas, se llevaron a cabo estudios de la expresión de genes relacionados con dicha respuesta mediante qRT-PCR y de detección mediante inmunofluorescencia de mediadores inmunitarios. Como control positivo de la estimulación inmunitaria, las células fueron estimuladas con poli I:C, un análogo sintético del RNA de doble cadena, ampliamente utilizado en estudios de inmunoestimulación para simular infecciones virales (Fierro-Castro et al. 2013; Sever et al. 2014). Los genes estudiados se eligieron en base a las principales familias estructurales y funcionales de moléculas efectoras en las infecciones virales (Purcell et al. 2012; Robertsen, 2006; Tafalla et al. 2005; Wang and Secombes, 2013; Zou and Secombes, 2011).

La línea J86 expresa de forma basal genes de factores antivirales (INF-I y Mx), de mediadores proinflamatorios (IL-1β, TNFα, iNOS) y de quimioquinas (IL-8, CK9, CK10, CK12). La expresión basal, sin estimulación experimental, de genes de estos efectores inmunitarios se ha descrito también en otras líneas celulares de peces, tanto de origen leucocitario (Brubacher et al. 2000; Laing et al. 2001; Montero et al. 2008a) como no leucocitario (Caipang et al. 2003; DeWitte-Orr et al. 2007; Fierro-Castro et al. 2013; Ingerslev et al. 2010; Luque et al. 2014; Picchietti et al. 2013). Dicha expresión, a veces descrita como constitutiva, puede ser debida a un cierto grado de estimulación inespecífica, debida al proceso de aislamiento celular, o a componentes del medio de cultivo que sean reconocidos como PAMPs.

La exposición al inmunoestimulante poli I:C indujo en las células J86 una marcada modulación de la expresión de todos los genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata analizados, pero de diferente signo y cinética. Así, a las 24 y 48 horas se observó sobreexpresión de los genes IFN-I, Mx, CK10 y CK12 e inhibición de la expresión de TNFα y CK9, mientras que para IL-8 y IL-1β a un incremento inicial seguía una represión a las 48 horas. Para el gen *iNOS* se observó un pequeño, pero estadísticamente significativo, incremento a las 48 horas.

El efecto inductor poli I:C sobre la expresión de algunos de esos genes (Mx1, TNFα, iNOS, IL-1β, IL-8, IFN-I) también se ha descrito en otras líneas celulares fibroblásticas de peces, como en las líneas celulares de trucha arcoíris RTG-2 (DeWitte-Orr et al. 2007) y TPS2 (Fierro-Castro et al. 2013), y la línea de dorada SAF-1 (Picchietti et al.

2013), así como en la línea macrofágica RTS-11 y en leucocitos de pronefros de trucha arcoíris (Zou et al. 2014). En general, y al igual que se ha indicado en esos casos, nuestros resultados demuestran que la línea celular J86 es capaz de reconocer un PAMP de tipo viral y de desplegar una respuesta defensiva innata, que incluye las sobreexpresión de factores antivirales y la modulación de mediadores proinflamatorios y quimioquinas.

La inoculación de los cultivos con VHSV indujo también la modulación de los genes inmunitarios en la línea J86, pero con perfiles diferentes a los observados para poli I:C. Así, se produjo sobreexpresión a 24 horas, que aumentaba a las 48 horas, de INF-I y Mx, una sobreexpresión mantenida a 24 y 48 horas de IL-1β y TNFα, IL-8, CK10 y CK12, inhibición de la expresión de iNOS a ambos tiempos y una sobreexpresión inicial de CK9 seguida de una marcada represión a las 48 horas. Estos resultados indican que la línea celular J86 retiene la capacidad para desplegar una fuerte respuesta antiviral, de forma similar a la que se ha demostrado en células fibroblásticas de peces *in vitro* (DeWitte-Orr et al. 2007; Ingerslev et al. 2010) e *in vivo* (Cuesta and Tafalla, 2009; Montero et al. 2011a).

Una posible explicación a las diferencias entre las respuestas observadas tras la exposición a poli I:C o la inoculación con VHSV debe ser atribuida al efecto de la infección viral, tanto en los procesos de señalización intracelular (García-Valtanen et al. 2014a) y, por tanto, de regulación de expresión génica, como al proceso citopático. En este sentido, se ha descrito que la infección por VHSV induce apoptosis (Avunje et al. 2012), lo que produciría dicha alteración de los mecanismos intracelulares que llevan a la producción de mediadores inmunitarios.

En ese sentido, la modulación de la expresión de los genes de INF-I y CK9 por la inoculación con VHSV aparecía relacionada, de forma inversa, con la MOI utilizada, mientras que para los otros genes no se apreciaba un efecto significativo de la MOI. La relación inversa entre expresión y MOI para los dos primeros genes podría ser atribuida a que, a una mayor dosis infectiva, la entrada y replicación de VHSV en las células desencadene un efecto inhibitorio de su expresión, que no afectaría a los otros genes.

Un aspecto importante de nuestro trabajo es que los estudios de expresión transcripcional de los genes *Mx*, *IL-8* e *iNOS* se han correlacionado con la inmunodetección *in situ* de las correspondientes proteínas de *O. mykiss*, utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra IL8 e iNOS (Luis Mercado, resultados no publicados) y un anticuerpo policlonal anti-Mx (Chico et al. 2010). Aunque estos estudios no son cuantitativos, los resultados confirman que la infección por VHSV modula la expresión de esos mediadores a nivel de proteína.

En cuanto a los genes relacionados con la respuesta antiviral, el incremento de la expresión de INF-I y de la proteína Mx, inducible por INF-I, tras la inoculación con VHSV se correspondía con cambios notables en el patrón de inmunomarcaje para Mx, con la aparición de gránulos perinucleares positivos (Fig. 52 y Fig. 53). Nuestros resultados concuerdan con las observaciones en la línea celular CHSE-214 estimulada con poli I:C, en la que la proteína Mx1 se observa como un patrón granular perinuclear y la proteína Mx3 difusa en el citoplasma (Trobridge et al. 1997). Esta expresión diferencial de las diferentes isoformas de Mx se ha observado también en la línea ASK-1, derivada de pronefros de salmón (*S. salar*) (Das et al. 2007), en condiciones de no estimulación.

En mamíferos, las proteínas Mx se localizan en cuerpos nucleares y en el citoplasma, dependiendo del tipo, y las citoplasmáticas se pueden translocar al núcleo (Verrier et al. 2011). El proceso observado en nuestros resultados se puede relacionar con la descripción de que Mx colocaliza y coinmunoprecipita con la RNA-polimerasa viral en células de cerebro de barramundi tras la infección con NNV (Wu et al. 2010) y de que en la línea celular 3T3 de ratón la isoforma Mx1 se localiza en forma de gránulos nucleares y es capaz de inhibir al rhabdovirus de la estomatitis vesicular (VSV), mientras que la isoforma Mx3, incapaz de inhibir al virus, se localiza de forma difusa por el citoplasma (Meier et al. 1990). De esta forma, aunque la utilización del anticuerpo policlonal usado en este trabajo no permite discriminar las isoformas de Mx, la formación de gránulos positivos para Mx es un reflejo del proceso de internalización y replicación de VHSV en las células de la línea J86.

Respecto a las moléculas mediadoras de los procesos proinflamatorios, se estudiaron los niveles de expresión de IL-1β, TNFα e iNOS. Tras la inoculación con VHSV, los genes de IL-1β y TNFα se sobreexpresaban, lo que concuerda con el desarrollo de una respuesta proinflamatoria. El caso del gen *iNOS*, que presentaba variaciones muy pequeñas, pero estadísticamente significativas de expresión relativa, se observó una represión inicial tras la infección, que disminuía a las 48 horas.

A pesar de que el rol de IL-1β en las respuestas antivirales todavía no ha sido claramente determinado, se ha descrito un papel de esta citoquina en la promoción de la migración de leucocitos y la resistencia frente a VHSV (Peddie et al. 2001). Así, en estudios realizados *in vivo* con trucha arcoíris se ha descrito un aumento en la expresión de IL-1β en bazo y pronefros a las 24 y 48 horas tras la infección con VHSV (Cuesta and Tafalla, 2009). Además, esta interleuquina es una inductora de otros mediadores inflamatorios y asociados a las respuestas inmunitarias en peces, como COX2, MHC-I, MHC-II, TNF, GCSF, microglobulina-β2, CD20, IRF4, TLR1, tanto *in vivo* como *in vitro* (Secombes et al. 2011; Zou and Secombes, 2011).

La expresión génica de TNFα en la línea J86 se vio incrementada a los dos tiempos estudiados tras la infección con VHSV, mientras que disminuía en ambos casos tras la estimulación con poli I:C. Respecto a la estimulación con poli I:C, la represión del gen TNFα tras la exposición *in vitro* a este PAMP ha sido también descrita en la línea fibroblástica TPS2, derivada de estroma de pronefros de trucha arcoíris (Fierro-Castro et al. 2013), pero no hemos encontrado resultados en la bibliografía del efecto de la exposición a o infección por VHSV u otros rhabdovirus de peces en la expresión de este gen en líneas celulares de peces. No obstante, si se ha analizado el efecto de la exposición a TNFα recombinante sobre la susceptibilidad a rhabdovirus, *in vivo* e *in vitro*, como se indica a continuación

Estudios realizados en pez cebra (*Danio rerio*) han demostrado que sucede un pequeño aumento en la expresión del gen *TNFα* en larvas de pez cebra a las 48 horas posinfección con el rhabdovirus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) (López-Muñoz et al. 2010), pero la administración de TNFα recombinante homólogo aumenta la susceptibilidad de esta especie a la infección *in vivo* por SVCV así como induce la expresión de genes de la respuesta inmunitaria innata (IFN, Mx, IL-8, CCL4) (Roca et al. 2008).

Por el contrario, en la línea celular EPC se ha demostrado un efecto protector de la exposición a TNFα recombinante frente a la infección por VHSV (Kim and Kim, 2013), mientras que la exposición de la línea ZF4, derivada de embrión de pez cebra, a TNFα recombinante incrementaba la expresión de genes antivirales (IFN-I, Mx), pero también la replicación de SVCV (Roca et al. 2008).

Se ha sugerido que el diferente efecto que el TNFα tiene en la susceptibilidad a VHSV o SVCV puede deberse a la existencia de diferentes mecanismos de interacción entre estos dos rhabdovirus y la vía de señalización del TNFα (Kim and Kim, 2013). Esta explicación concordaría también con nuestros resultados en la línea J86, ya que existen marcadas diferencias en la expresión del gen *TNFα* tras la inoculación con VHSV o exposición a poli I:C, lo que sugiere que inducen diferentes vías de señalización o interaccionan de forma distinta con ellas. Esta doble vía se ha demostrado para el reconocimiento de virus RNA en peces, de forma que el receptor MDA5 (*melanoma-differentiation-associated gene 5*) reconoce RNAs bicatenarios largos (más de 2 kb), como poli I:C, mientras que la helicasa RIG-I detecta RNAs bicatenarios cortos (hasta 1 kb) y algunos RNAs monocatenarios (Zou et al. 2009). Los genes para ambos PRRs se encuentran presentes en el genoma de teleósteos (Zou et al. 2009) y los dos participan de la respuesta antiviral innata, como se ha demostrado en la línea celular HINAE, en la cual la sobreexpresión de MDA5 reduce

el efecto citopático de la infección con los rhabdovirus VHSV o Hirame y con IPNV (Ohtani et al. 2011).

En consecuencia, nuestros resultados de modulación de expresión del gen *TNFα* en la línea J86 demuestran que estas células reconocen la infección por VHSV, generando una respuesta que trata de ser protectora, en cuanto al incremento de la expresión de esta citoquina, que es distinta de la mera inmunoestimulación con un análogo de RNA bicaternario como el poli-I:C.

En el caso del gen *iNOS*, los pequeños pero significativos cambios observados en la expresión génica no concuerdan, inicialmente, con los resultados de inmunodetección de la proteína iNOS. Así, la exposición a poli I:C o la inoculación con VHSV produjeron una disminución significativa de su expresión en la células J86 a las 24 horas, que se mantuvo, aunque menos marcada, a las 48 horas para VHSV. Por el contrario, la intensidad del inmunomarcaje anti-iNOS a las 24 horas era mayor en los cultivos infectados o tratados con poli I:C que en los controles, disminuyendo la intensidad de la fluorescencia a las 48 horas, pero manteniéndose por encima de los controles.

Estas discrepancias podrían deberse a que el pico de expresión génica de iNOS suceda más tempranamente de las 24 horas, como se ha descrito en cultivos primarios de macrófagos de trucha arcoíris estimulados con poli I:C en los que el pico de expresión génica de iNOS se producía a las 4 horas, disminuyendo con el tiempo, y alcanzando valores bajos a partir de las 8-12 horas (Fierro-Castro 2009; Fierro-Castro et al. 2013). No obstante, la modulación de la expresión de gen *iNOS* tras a la exposición a poli I:C deber ser también dependiente de la línea celular, ya que en líneas celulares derivadas de estroma de bazo y pronefros estimuladas con poli I:C los valores de expresión se mantenían por debajo o en torno a los de los controles a las 4 horas y aumentaban ligeramente a las 24 horas (Fierro-Castro 2009; Fierro-Castro et al. 2013).

Por otra parte, aunque *in vivo* la infección por VHSV induce la sobreexpresión de iNOS en bazo, hígado y pronefros de trucha arcoíris (Tafalla et al. 2005), se ha descrito que en la línea celular RTS-11, derivada de monocito/macrófagos de trucha arcoíris, la infección por VHSV no induce la expresión de iNOS ni a 24 ni a 48 horas (Tafalla et al. 2008). Sin embargo, nuestros resultados en la línea J86 demuestran que VHSV reprime la expresión génica de iNOS a las 24 horas, pero no la producción de esta proteína. En este sentido, en diversos estudios de infección viral *in vitro* de macrófagos de mamíferos se ha descrito el papel del óxido nítrico como inhibidor del ciclo de replicación viral, al disminuir la síntesis del genoma viral, la producción de proteínas virales y una menor producción de partículas virales infecciosas (Benencia

and Courreges, 1999; Kreil and Eibl, 1996; Lin et al. 1997; Takhampunya et al. 2006). Además, el patrón de fluorescencia granular para iNOS en J86 coincide con lo descrito en células hepáticas de humano y rata, donde se colocaliza con peroxisomas (Collins et al. 2003).

La disminución de la represión génica de iNOS a las 48 tras la infección con VHSV, que coincide con la sobreexpresión tras la estimulación con poli I:C, podría deberse a la estimulación por TNFα que se encuentra sobreexpresado fuertemente a las 24 horas en esas condiciones y que, al igual que otras citoquinas, regulan la expresión de *iNOS* a través de la vía de señalización intracelular mediada por el factor de transcripción NFκβ en fibroblastos de peces (Goetz et al. 2004; Mehta et al. 2012).

En referencia a las quimioquinas, la línea J86 muestra expresión basal de los genes para IL-8, CK9, CK10 y CK12, lo que concuerda con la expresión de los mismos genes en los tejidos que forman las bases de las aletas de trucha arcoíris (Montero et al. 2011a). Esta expresión basal de CK9, CK10 y CK12 también ha sido descrita recientemente en la línea celular RTH derivada de corazón de trucha arcoíris (Luque et al. 2014).

Tras la inoculación con VHSV las células J86 mostraron sobreexpresión mantenida a 24 y 48 horas de IL-8, CK10 y CK12, y una sobreexpresión inicial de CK9 seguida de una marcada represión a las 48 horas. Una respuesta semejante para CK10 y CK 12 se producía tras la exposición a poli I:C, mientras que se reprimía la expresión de CK9 a los dos tiempos analizados e IL-8 presentaba un incremento inicial y una represión a las 48 horas.

Esos datos indican que las células J86 responden a la infección por VHSV de forma diferencial respecto a la inmunoestimulación para IL-8 y CK9, pero de forma semejante para CK10 y CK12. Estos resultados coinciden sustancialmente con los de estudios *in vivo* en *O. mykiss* que han demostrado que la infección por VHSV produce una marcada sobreexpresión de CK10 y CK12 en las bases de las aletas a las 72 horas posinfección, pero no de IL-8 ni de CK9 (Montero et al. 2011a). Así mismo, se ha descrito la inhibición de la expresión de CK9 en ovario de trucha arcoíris tras la estimulación con poli I:C (Chaves-Pozo et al. 2010b).

Estudios *in vitro* de la infección por VHSV en la línea celular RTH indicaron que este virus es capaz de aumentar significativamente la expresión de CK10 y CK12 a las 24 y 48 horas posinfección, y sin embargo, aunque aumentó la expresión de CK9 a esos mismos tiempos, los niveles detectados fueron muy similares a los de los controles (Luque et al. 2014).

Por otra parte, los resultados para la expresión basal de CK9 y su no modulación por la infección con VHSV indican que la línea J86 retiene características propias del tegumento, ya que coinciden con lo descrito *in vivo* y, de esta forma, confirman que la regulación de la expresión génica de quimioquinas tras la infección viral es tejido específica (Montero et al. 2011a).

Los ensayos de inmunodetección de IL-8 demostraron que la infección por VHSV, así como la estimulación con poli I:C, inducen un incremento de la expresión de esta proteína frente a los controles a las 24 (Fig. 56) y 48 horas (Fig. 57). Este incremento en la expresión ha sido descrito en el bazo y pronefros de truchas arcoíris infectadas con VHSV (Tafalla et al. 2005). El patrón de expresión de IL-8 en las células J86 coincide con el descrito en células de cordón umbilical humano, en forma de un granulado asociado al aparato de Golgi (Wolff et al. 1997).

El papel de las quimioquinas en la defensa antiviral parece ser la atracción de diferente subpoblaciones de leucocitos al punto de infección. Así, se ha descrito que IL-8 atrae específicamente neutrófilos (Alejo and Tafalla, 2011) y que CK12 tiene un papel fundamental en la atracción de linfocitos B y T (Montero et al. 2011b).

Estos resultados en conjunto acerca de la modulación de los genes relacionados con la respuesta inmunitaria y de las proteínas que codifican, sugieren que estas células de aleta tienen un importante papel en los primeros estadios de la infección.

Así, a manera de conclusión de ese capítulo, nuestros resultados demuestran que la línea celular de aleta J86 expresa genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata y que se han descrito como factores importantes en la respuesta temprana del tegumento, particularmente de la base de la aletas de *O. mykiss*, tales como mediadores antivirales (IFN-I, Mx), citoquinas y factores proinflamatorios (IL-1β, TNFα, iNOS), y quimioquinas (IL-8, CK9, CK10, CK12) en condiciones basales. La susceptibilidad a la infección por VHSV y la aparente resistencia a IPNV, junto con el hecho de responder al PAMP de tipo viral poli I:C, justifican nuestra hipótesis de que esta línea, y probablemente otras derivadas de aletas utilizando nuestra metodología, pueda ser utilizada en modelo experimental para analizar la respuesta inmunitaria temprana en las barreras mucosas y el rol de las células de la piel en las infecciones virales, alternativo a los estudios *in vivo*.

Capítulo III

Capítulo III: Uso de la línea de aleta J86 para el estudio *in vitro* de candidatos a vacunas DNA frente a *rhabdovirus* de peces.

1. Introducción

El rápido crecimiento de la acuicultura en la última década y la intensificación de la producción conllevan la aparición de brotes epizoóticos que requieren de medidas adecuadas para su control. De acuerdo con la Organización Internacional de Epizootías (OIE), las enfermedades víricas son las más devastadoras para la producción de peces de acuicultura, dado que pueden causar mortalidades masivas y no existe tratamiento quimioterapéutico frente a ellas. Dado que los peces presentan inmunidad adquirida (Lorenzen et al. 2001; Purcell et al. 2012), la única opción actualmente viable de control de las mismas es mediante el uso de métodos de inmunoprofilaxis, especialmente la vacunación (Heppell and Davis, 2000). No obstante, todavía son pocas las vacunas antivirales seguras, eficaces y económicamente viables que han sido desarrolladas para su uso en acuicultura (Gomez-Casado et al. 2011). Es por ello que muchas de estas enfermedades, cuyos brotes causan graves pérdidas económicas, son de declaración obligatoria a la OIE y en los estados miembros de la Unión Europea.

Entre las enfermedades de la lista de declaración obligatoria, la septicemia hemorrágica viral, causada por el rhabdovirus VHSV, es una de las más importantes, no sólo por las pérdidas, sino por su amplia distribución a nivel mundial, ya que afecta tanto a especies de agua dulce como marinas (Crane and Hyatt, 2011; Dale et al. 2009; Garver et al. 2013; Ogut et al. 2013).

Los primeros intentos por controlar esta enfermedad con vacunas clásicas, que usaban virus atenuados o inactivados, dieron resultados poco prometedores debido a que las cepas utilizadas se volvían virulentas para algunos peces, en el caso de las primeras, o al coste de la producción a gran escala, en el caso de las segundas (Gómez-Casado et al. 2011). Frente a ellas, las vacunas DNA que contiene secuencias codificantes del gen de la glucoproteína G (gpG) de rhabdovirus se presentan como una buena opción, ya que inducen una fuerte respuesta inmunitaria innata temprana, que además protege frente a otros virus (Cuesta and Tafalla, 2009; Lorenzen et al. 2002a), y una respuesta inmunitaria específica más tardía y duradera, con la producción de anticuerpos y activación de células citotóxicas antígeno-específicas (Gurunathan et al. 2000; Utke et al. 2008).

Sin embargo, a pesar de la protección que confieren dichas vacunas DNA, su uso sólo está autorizado en Canadá. La Unión Europea las ha prohibido alegando motivos de seguridad, ya que los peces vacunados podrían ser considerados organismos genéticamente modificados (Hølvold et al. 2014) y si dichas vacunas utilizan el promotor del citomegalovirus humano (CMV) representan un riesgo potencialmente oncogénico para las personas (Evensen and Leong, 2013; Soroceanu and Cobbs, 2011). A este respecto, se han realizado estudios dirigidos a la búsqueda de nuevos promotores de origen piscícola, así como a la modificación de las secuencias reguladoras para aumentar la seguridad y eficiencia de dichas vacunas (Chico et al. 2009; Martínez-Alonso et al. 2011; Martínez-López et al. 2012; Martínez-López et al. 2013a; Ruiz et al. 2008). Además, existe la dificultad añadida de la administración a gran escala, por lo que se ha intentado mejorar los resultados de la vacunación por vía oral (Adelmann et al. 2008) o por baño (Fernández-Alonso et al. 2001), así como aumentar la versatilidad de dichas vacunas independientemente de la ruta de administración (Martínez-López et al. 2013b).

Son numerosos los estudios realizados *in vivo* para conocer cómo funcionan las vacunas DNA contra VHS que expresan la glucoproteína de este virus (gpG) en peces (Chico et al. 2009; Heppell et al. 1998; Lorenzen et al. 2001; Lorenzen et al. 2002a; Lorenzen et al. 2002b; McLauchlan et al. 2003), así como factores que pueden influir en la aparición de la respuesta inmunitaria o la persistencia de la misma, como es la temperatura del agua (Castro et al. 2014; Lorenzen et al. 2009).

Sin embargo, son menos numerosos los estudios realizados *in vitro* para comprender las bases inmunológicas que confieren la protección antiviral (Biering and Salonius, 2014) y, sobre ese conocimiento, poder seleccionar nuevas vacunas DNA experimentales a partir de ensayos realizados en condiciones controladas y menos costosas que los experimentos *in vivo* y que permitan mejorar la inmunogenicidad y seguridad de este tipo de vacunas.

Entre esos estudios referidos a vacunas DNA contra la VHS, destacan los realizados con dos tipos de construcciones que difieren en el promotor utilizado:

a) Con el plásmido pAE6-Gvhsv, que codifica para el gen completo de la gpG de VHSV bajo una versión del promotor de la β-actina de carpa (Brocal et al. 2006). Los estudios *in vitro* con esta construcción incluyeron el análisis de la eficiencia de transfección y de la modulación de la expresión de genes de la respuesta inmunitaria en cultivos primarios de pronefros (Ortega-Villaizán et al. 2012) y en las líneas celulares EPC (Chico et al. 2009) y RTG-2 (Martínez-López et al. 2013a), así como estudios de protección contra la infección por VHSV en ésta última línea celular (Ortega-Villaizán et al. 2011).

b) Con la construcción pMCV1.4-Gvhsv, que contiene la secuencia completa del gen de la gpG de VHSV bajo una versión del promotor inmediato temprano de CMV (Rocha et al. 2005), con el cual se realizaron los mismos ensayos en la línea celular EPC (Chico et al. 2009). Además, esos mismos ensayos se han realizado con la construcción pMCV1.4-Gvhsv en la que se habían introducido fragmentos ricos en motivos CpG, los cuales aumentan su poder inmunogénico (Martínez-Alonso et al. 2011). El mismo tipo de plásmido, con el promotor de CMV, se ha utilizado también para analizar la expresión de los fragmentos comprendidos entre los aminoácidos Leu_{280} y Ala_{310} (péptido p31) y entre la His_{340} y Asn_{370} (p33) de la gpG, que se han descrito como responsables de desencadenar la vía del INF-I (Martínez-López et al. 2014).

Puesto que el uso de modelos *in vitro* ha sido de gran importancia para los avances en el desarrollo de nuevas vacunas (Bearzotti et al. 1992; Fernández-Alonso et al. 1999; Heppell and Davis, 2000; Villena 2003), el objetivo de este trabajo es utilizar la línea celular J86, derivada de la aleta anal de *O. mykiss*, para analizar *in vitro* la eficiencia y la protección conferida por dos vacunas DNA experimentales frente a VHSV. Esta línea celular ha sido elegida para estos ensayos en base a: i) la susceptibilidad que ha demostrado tener a la infección por VHSV (ver Capítulo I); y ii) puesto que la infección por VHSV *in vivo* comienza en la base de las aletas en salmónidos (Harmache et al. 2006), es de interés el conocer el papel que puedan tener estas células en la protección conferida por la inmunización frente a la infección, con la finalidad de aportar nueva información que permita comprender mejor los mecanismos inmunológicos puestos en marcha por vacunas DNA en el órgano diana inicial de VHSV (Montero et al. 2011a).

Para ello, primero se evaluó la eficiencia de transfección de la línea celular con dos construcciones de DNA diferentes: la construcción pAE6-Gvhsv, que codifica la proteína gpG completa bajo el promotor de β-actina de carpa (Brocal et al. 2006) y la denominada pcDNA3-vhsvG (Heppell et al. 1998), que codifica el gen completo de la gpG. A continuación, para ambas vacunas DNA experimentales se estudió la funcionalidad de la proteína expresada en las células J86 y, finalmente, se analizó la modulación de la expresión de genes y de mediadores relacionados con la respuesta inmunitaria innata en los cultivos de esa línea celular de aleta.

2. Material y métodos

2.1. Línea celular

Se utilizó la línea celular J86 derivada de aleta de trucha arcoíris, obtenida mediante el método de los explantes en nuestro laboratorio (Capítulo I de esta tesis), entre los pases 40 a 49.

Esta línea fue mantenida en medio de cultivo rutinario suplementado con 20% FCS y 50 ng/mL EGF, cuya composición se muestra en la Tabla I e incubada a 18°C en atmósfera de aire

2.2. Construcciones plasmídicas

Para los ensayos de transfección/electroporación se utilizaron los plásmidos pAE6-GFP y pMCV1.4-GFP cedidos por la Dra. Amparo Estepa del laboratorio de Virología de Peces del Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

- El plásmido pAE6-GFP, que porta el promotor de la β-actina de carpa (AE6), contiene la secuencia del gen de la proteína reportadora GFP (Brocal et al. 2006).
- La construcción pMCV1.4-GFP codifica la proteína verde fluorescente (GFP) bajo una versión (MCV1.4) del promotor inmediato temprano de CMV (Falco et al. 2009).

Para el estudio de la expresión de la gpG de VHSV se emplearon los plásmidos pAE6-Gvhsv y pAE6 (vector vacío, usado como control), cedidos por la Dra. Amparo Estepa del IBMC; y los plásmidos pcDNA3-vhsvG y pcDNA3 (vector vacío) cedidos por el Dr. Uwe Fischer del Instituto de Infectología del Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) (Insel Riems, Alemania).

- La construcción pAE6-Gvhsv, que porta una versión del promotor de la β-actina de carpa (AE6), contiene la secuencia del gen de la gpG de VHSV (cepa 07.71) (Chico et al. 2009).
- El plásmido pcDNA3-vhsvG contiene la secuencia de la gpG del VHSV (cepa DK-3592B) bajo el promotor CMV (Heppell et al. 1998).

2.3. Virus

Para los estudios de infección *in vitro* se utilizó la cepa 07.71 de VHSV. Las alícuotas de virus utilizadas procedían de stocks propagados y titulados en el IBMC de la

Universidad Miguel Hernández (Elche, España) y en el Instituto de Infectología del Friedrich- Loeffler- Institut (Insel Riems, Alemania).

2.4. Procedimientos de transfección

Se utilizaron dos metodologías distintas para transfectar las células J86 con los distintos plásmidos.

Por una parte, para intentar mejorar la eficiencia de transfección y en los estudios de expresión génica de mediadores inmunitarios, se empleó el método de electroporación con el sistema Neon Transfection (Invitrogen). Este estudio fue realizado en el IBMC de la Universidad Miguel Hernández de Elche y en el Instituto de Inmunología del Friedrich- Loeffler- Institut (Insel Riems, Alemania). Las células, obtenidas a partir de frascos de 25 cm^2 de cultivos rutinarios de la línea J86, fueron tripsinizadas y lavadas con PBS en viales Eppendorf durante 10 min a 300 g. Los pellets celulares fueron resuspendidos con 10 µL de Tampón R (Invitrogen) y 1 µg del plásmido correspondiente. A continuación, se procedió a someterlas a 1 pulso o a 2 pulsos eléctricos de 1300 mV de 20 mS cada uno, tras lo que fueron inmediatamente sembradas en placas de 24 pocillos en medio sin antibióticos a razón de $7x10^4$ cél./pocillo. Como control se sembraron células que fueron transfectadas con el vector vacío correspondiente e incubadas en las mismas condiciones que las experimentales.

Por otra parte, para los ensayos de inducción de fusión de membranas en cultivos transfectados para la expresión de gpG se utilizó el protocolo previamente puesto a punto en el Capítulo I de esta Tesis, que utiliza Lipofectamina como vehículo de transfección, puesto que para la electroporación se requiere el uso de suspensiones celulares que tras la transfección no llegaban a formar monocapas competas. Se utilizaron frascos de 25 cm^2 de cultivos rutinarios de la línea J86 como fuente de obtención de células. Los cultivos se tripsinizaron según la técnica descrita en el Capítulo I y las células se resuspendieron en medio de cultivo rutinario (Tabla I) y sembraron en placas de 48 pocillos (Corning) a una densidad celular de $3,5x10^4$ cél./pocillo. Las células se incubaron durante 24 horas a 18°C en atmósfera de aire, tras las cuales se cambió el medio a los pocillos por medio de mantenimiento sin suplementar con antibióticos.

Los plásmidos se disolvieron en medio Opti-MEM (Invitrogen) en tubos Eppendorf y se añadió Plus Reagent (Invitrogen) en un ratio 1:1. Las mezclas se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se añadió la Lipofectamina LTX (Invitrogen) a cada tubo Eppendorf en un ratio 2,5:1. Las mezclas se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente para la formación de los complejos

lípidos-DNA. A continuación, se añadieron 20 µl de las correspondientes mezclas a los pocillos y las células se incubaron 72 horas a 18°C en atmósfera de aire. Como control se utilizaron células que fueron transfectadas con el vector vacío correspondiente e incubadas en las mismas condiciones que las experimentales.

2.5. Inmunofluorescencia

Para la detección de la expresión de la gpG completa de VHSV codificada por la construcción pAE6-Gvhsv se utilizó un cóctel de anticuerpos monoclonales anti-gpG (Chico et al. 2010), que incluye dos anticuerpos conformacionales (3F1A2, C10) (Béarzotti et al. 1995) y un anticuerpo no conformacional (I10) (Mourton et al. 1990), cedido por la Dra. Amparo Estepa del IBMC. Para la detección de gpG codificada por pcDNA3-vhsvG se empleó un suero policlonal frente a VHSV (Utke et al. 2008), cedido por el Dr. Uwe Fischer del Instituto de Infectología del Friedrich-Loeffler-Institut (Insel Riems, Alemania).

El método de fijación de las células, los anticuerpos y las condiciones de incubación utilizadas se muestran en la Tabla XVI.

Fijación	Anticuerpo 1º	Dilución y condiciones de incubación	Anticuerpo 2º	Dilución y condiciones de incubación
Paraformaldehído 4% 15 min Tª ambte	Cóctel mAbs ratón anti-gpG (Chico et al. 2010)	1:500 en PBS+1% BSA 60 min a Tª ambte	Cabra anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen)	1:300 en PBS+1% BSA 45 min en oscuridad
Acetona-Metanol 5 min a -20°C.	conejo anti-gpG (Utke et al. 2008)	1:1000 en PBS+1% BSA 1 hora Tª ambte	Cabra anti-conejo Alexa 488 (Invitrogen)	1:300 en PBS+1% BSA 45 min en oscuridad

Tabla XVI. Anticuerpos y condiciones de incubación utilizadas para la detección de Gvhsv en células transfectadas.

En el caso de los cultivos fijados con acetona-metanol las monocapas se dejaron secar al aire durante 10 minutos para eliminar los restos de fijador. Tras la fijación las células se lavaron con DMEM (Sigma) durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario. Seguidamente se hicieron 3 lavados con DMEM durante 5 minutos y las células se incubaron con el anticuerpo secundario. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con DMEM durante 5 minutos.

Para la detección de la proteína Mx de *O. mykiss* se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo (Chico et al. 2010). Tras fijar las monocapas en las condiciones indicadas en la Tabla XVII, se lavaron los pocillos con PBS durante 5 minutos y se incubaron con tampón de bloqueo (PBS + 5% suero de cabra + 0,3% TritonX-100) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido, las células se incubaron con el anticuerpo primario en las condiciones indicadas. A continuación, se retiró el medio de incubación y se lavaron los pocillos 3 veces con PBS durante 5 minutos y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario diluido en un tampón consistente en PBS suplementado con 1% de BSA y 0,3% de TritonX-100. Finalmente, se hicieron 3 lavados con PBS durante 5 minutos, dejando tras el lavado final 100 µL de PBS y contrastando los núcleos con DAPI (Molecular Probes) para la observación microscópica.

Fijación	Anticuerpo 1io	Dilución y condiciones de incubación	Anticuerpo 2io	Dilución y condiciones de incubación
Paraformaldehído 4% 15 min Tª ambiente TritonX-100 5 min Tª ambiente	Policlonal conejo anti-Mx (Chico et al. 2010)	1:300 en tampón AD	Cabra anti-conejo conjugado con FITC (Sigma)	1:300 12 horas a 4°C en oscuridad

Tabla XVII. Anticuerpos y condiciones de incubación finales utilizadas para caracterizar la respuesta inmunitaria en la línea de aleta de *O. mykiss.*

2.6. Microscopía de fluorescencia

La fluorescencia de GFP y de los cultivos procesados para el inmunomarcaje de gpG inducida por la transfección con la construcción pAE6-Gvhsv fue observada y fotografiada con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U dotado de una lámpara de mercurio y una cámara digital Nikon DS-1QM, en el laboratorio de Virología de Peces del IBMC (Universidad Miguel Hernández, Elche).

La observación y fotografiado de la inmunofluorescencia para gpG y proteína Mx en los cultivos transfectados con pcDNA3-vhsvG se realizó con un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse TE300 en los laboratorios de microscopía del FLI (Insel Riems, Alemania).

2.7. Citometría de flujo

La expresión de GFP y gpG de VHSV en las células transfectadas mediante electroporación se cuantificó mediante citometría de flujo. Como fuente de células se utilizaron cultivos en las placas de células J86 tras 72 horas postransfección, sin fijar. Para la detección de gpG los cultivos fueron procesados primero para la detección por inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos y condiciones indicados en la Tabla XVI, excepto la fijación.

Las monocapas se disociaron con PBS sin calcio y utilizando un rascador (*Cell Scraper*, Corning), se lavaron con PBS sin calcio durante 10 min a 300 g y fueron resuspendidas en tampón FACS (PBS suplementado con 1% BSA y 0,1% de azida sódica, Sigma). La fluorescencia asociada a las células se analizó con un citómetro de flujo BD FACS CantoTM II (BD Biosciences). Como controles se utilizaron cultivos sin transfectar procesados de igual forma que los anteriores. En el caso de las células transfectadas para la expresión de gpG, en los controles negativos se omitió la incubación con el anticuerpo primario. Para cada muestra se adquirieron 10.000 eventos. Como control de la autofluorescencia se utilizaron células no electroporadas.

Los resultados se analizaron usando el software WinMDI 2.9 (http://en.biosoft.net/other/WinMDI.html).

2.8. Infección de los cultivos celulares

Las infecciones *in vitro* se realizaron en laboratorios de contención biológica de nivel P2 del IBMC de la Universidad Miguel Hernández (Elche, España) y del Instituto de Infectología del Friedrich-Loeffler-Institut (Insel Riems, Alemania).

Como fuente de células para las infecciones se utilizaron cultivos rutinarios de células J86 en frascos de 25 cm^2, que fueron tripsinizados según la técnica descrita en el Capítulo I. Las células se resuspendieron en medio de mantenimiento y sembradas en placas de 24 pocillos (Corning) a una densidad celular de $3{,}5 \times 10^4$ cél./pocillo para obtener la confluencia a las 24 horas de incubación a 18°C en atmósfera de aire.

Tras retirar el medio de cultivo de los pocillos se añadieron 200 µL/pocillo de una suspensión del VHSV en medio de cultivo rutinario suplementado con 2% de FCS. La MOI utilizada fue 0,01, para lo cual se realizaron las diluciones del stock apropiadas. En todo momento se mantuvieron las placas y las alícuotas de virus sobre hielo. Como controles negativos se utilizaron pocillos de las mismas placas a los cuales se añadió únicamente medio de cultivo suplementado con 2% de FCS. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 14°C durante 72 horas.

2.9. Ensayo de fusión

Para el ensayo de inducción de la fusión de membranas citoplasmáticas (Estepa et al. 2001) se utilizó como fuente de células las placas de 48 pocillos utilizadas para los ensayos de transfección con Lipofectamina incubadas durante 72 horas.

Tras este periodo de incubación, se retiró el medio cuidadosamente mediante aspiración con pipeta y se añadieron 200 μL/pocillo de medio RPMI-1640 sin bicarbonato, tamponado con ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico (MES) 20 mM y HEPES 20 mM (Sigma) a pH 6. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron durante 30 minutos a 14°C. Acto seguido, se retiró el medio de las células mediante aspiración con pipeta y se añadieron 200 μL/pocillo de medio de fusión consistente en RPMI-1640 sin bicarbonato, tamponado con MES 20 mM y HEPES 20 mM a pH 7,6. Las células se incubaron durante 2 horas a 14°C, tras lo cual se retiró el medio de los pocillos, se añadió metanol frío a -20°C durante 10 minutos para fijar las células y se tiñeron con Giemsa.

Como control negativo se utilizaron pocillos de células no transfectadas y como control positivo se utilizaron pocillos de células infectadas con VHSV (ver apartado 2.8 de este capítulo), ambos procesados de igual forma para inducir la fusión.

2.10. Extracción de RNA

El RNA total se extrajo utilizando el kit de columnas RNeasy Plus Micro (Qiagen), el cual incluía una columna de eliminación de DNA genómico. El procedimiento general se detalla a continuación:

- Lisado de las células: se añadieron 100 μL de tampón de lisis RLT suplementado con 1% de mercaptoetanol y se procedió al homogeneizado pipeteando suavemente.
- Acto seguido, las muestras se transfirieron a una columna de eliminación de DNA genómico y se centrifugaron a 8.000 g durante 15 s.
- Los filtrados se transfirieron a un tubo en el que se añadió un volumen igual de etanol al 70%.
- Las muestras se transfirieron a las columnas de extracción de RNA y se centrifugaron a 8.000 g durante 15 s.
- Tras descartar el eluido, se añadieron 700 μL de tampón RW1 y las columnas se centrifugaron a 8.000 g durante 15 s.
- Tras descartar nuevamente el eluido, se añadieron 500 μL de tampón RPE y las columnas se centrifugaron a 8.000 g durante 10 s.

- Se desechó el tubo con el eluido y se colocó la columna en un nuevo tubo. A continuación, se añadieron 500 µL de tampón RPE y las columnas se centrifugaron a 12.000 g durante 2 min.
- Tras desechar el eluido, se centrifugaron las columnas durante 5 min con las tapas abiertas para el completo secado de la membrana.
- Finalmente, se añadieron 30 µL de agua a cada columna y se centrifugaron a 8.000 g durante 1 min.

El RNA se cuantificó con un equipo NanoDrop ND-1000, considerándose aptas para la posterior realización de la retrotranscripción aquellas muestras que presentaban unos ratios 260/280 entre 1,5-2 y que no presentaran fragmentación del RNA, lo que fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio.

2.11. Retrotranscripción

Para la obtención de los cDNA, que servirían como molde en su posterior uso en la PCR, se utilizó la enzima retrotranscriptasa Superscript III (Invitrogen) y el cebador oligo-dT (Invitrogen). Para la mezcla general de reacción se incubaron 5 µg de RNA total con 1µL de oligo (dT) 12-18 (0,5 mg/mL, Invitrogen) y una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP´s) 10 mM durante 5 min a 65° C. Después de la incubación, se añadieron a la mezcla 4 µL de tampón RT 5X, 1 µL de ditiotreitol (DTT) 0,1 M, 1 µL de RNaseOUT (inhibidor de la ribonucleasa recombinante, Invitrogen) y 1 µL de la enzima Superscript III. La mezcla se incubó durante 5 min a 25°C, 60 min a 50°C y 15 min a 70°C. La reacción se detuvo por calentamiento a 70°C durante 15 min, y el cDNA resultante se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.12. PCR a tiempo real

La expresión génica fue cuantificada con el kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen) mediante la técnica de PCR a tiempo real. La formulación general de la mezcla de reacción se indica en la tabla a continuación (Tabla XVIII).

Reactivo	Concentración stock	Volúmen
2x Master Mix Sybr Green	2x	10 µl
Primer F	10 µM	0,4 µl
Primer Rw	10 µM	0,4 µl
cDNA		2 µl
Agua		7,2 µl

Tabla XVIII. Formulación de la mezcla de reacción para PCR cuantitativa.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) y las condiciones de la reacción se indican en la Tabla XIII.

Los genes estudiados y los cebadores utilizados para su amplificación están detallados en la Tabla XIX.

Para normalizar los cambios en la expresión de los genes se utilizó como referencia interna el gen del factor de elongación EF-1α. Los cambios en la expresión relativa de dichos genes se cuantificaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). Como control se utilizaron células sin transfectar y los cambios de expresión se calcularon de forma relativa a los niveles de expresión de dichos genes en estas células.

Cebadores	Secuencia	Referencia
IL-1β	F: CTGAAGCCAGACCTGTAGCC R: GCAACCTCCTCTAGGTGCAG	(Cuesta and Tafalla, 2009)
TNFα	F: AGCATGGAAGACCGTCAACGAT R: ACCCTCTAAATGGATGGCTGCTT	(Purcell et al. 2004)
IL-8	F: GAATGTCAGCCAGCCTTGTC R: TCCAGACAAATCTCCTGACCG	(Lindenstrøm et al. 2004)
Mx1-3	F: TGAAGCCCAGGATGAAATGG R: TGGCAGGTCGATGAGTGTGA	(Ortega-Villaizán et al. 2009)
MHC-Iα	F: GACAGTCCGTCCCTCAGTGT R: CTGGAAGGTTCCATCATCGT	(Chaves-Pozo et al. 2010a)
EF-1α	F: GATCCAGAAGGAGGTCACCA R: TTACGTTCGACCTTCCATCC	(Chaves-Pozo et al. 2010b)

Tabla XIX. Genes analizados y cebadores utilizados para los análisis de expresión génica en los cultivos de la línea J86 derivada de aleta de *O. mykiss*.

2.13. Tratamiento estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos, expresados como media y error estándar, se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test posthoc de Tukey, considerándose que existían diferencias significativas para valores $p<0,05$ y altamente significativas para valores de $p<0,01$.

3. Resultados

3.1. Ensayos de transfección por la electroporación

Para incrementar la eficiencia de la transfección de las células de la línea J86 se ensayaron dos condiciones de la técnica de electroporación con el sistema Neon Transfection, que diferían en el número de pulsos eléctricos. Cuando se utilizó un solo pulso eléctrico de 1.300 mV y 20 mS se pudo detectar a las 24 horas poselectroporación la expresión de la proteína reportadora GFP en numerosas células (Fig. 58).

El uso de dos pulsos eléctricos, del mismo potencial y duración incrementó notablemente el número de células que expresaban GFP a las 24 horas (Fig. 59).

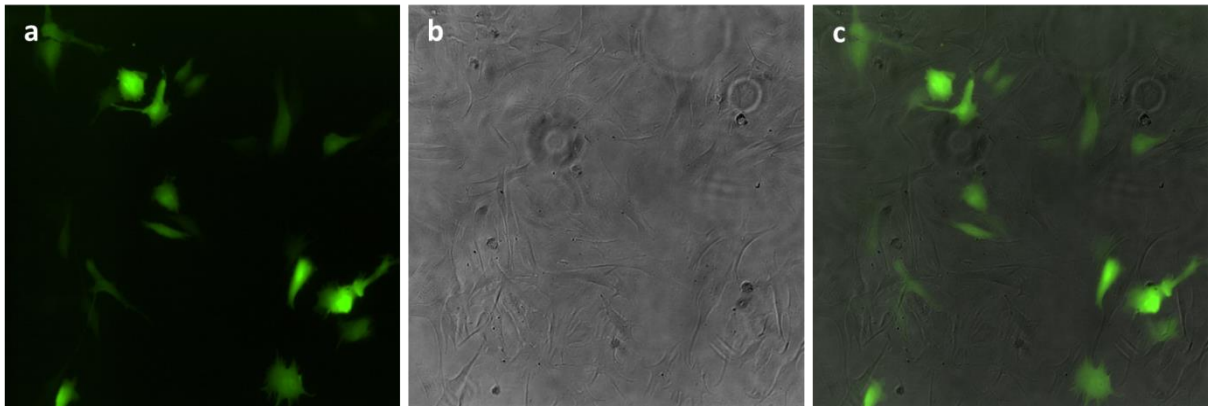

Fig. 58. Cultivo de la línea J86, en el pase 42, electroporado con pMCV1.4-GFP mediante el sistema Neon Transfection utilizando un pulso eléctrico, tras 24 horas de incubación (200x). **b.** Imagen de las células electroporadas en cultivo obtenida con contraste de fases. **c**. Superposición de las imágenes de contraste de fases y de fluorescencia.

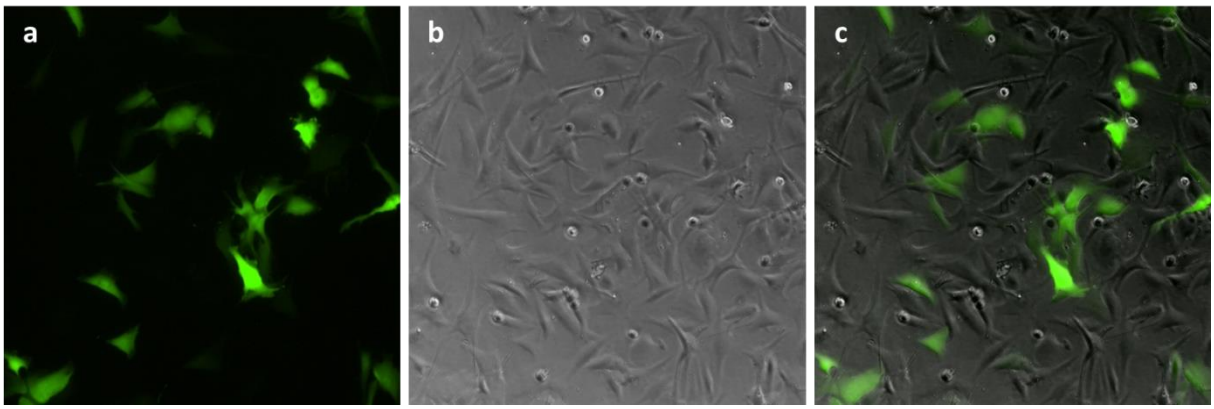

Fig. 59. Cultivo de la línea J86, en el pase 42, electroporado con pMCV1.4-GFP mediante el sistema Neon Transfection utilizando 2 pulsos eléctricos, tras 24 horas de incubación (200X). **b.** Imagen de las células electroporadas en cultivo obtenida con contraste de fases. **c**. Superposición de las imágenes de contraste de fases y de fluorescencia.

Así mismo, utilizando dos pulsos eléctricos se apreciaron diferencias en la expresión de GFP cuando se utilizaron las distintas construcciones de DNA ensayadas (pAE6-GFP, pMCV1.4-GFP). Las células transfectadas con la construcción pAE6-GFP mostraron una señal fluorescente muy débil (Fig. 60a), que no se incrementó con el tiempo de incubación, mientras que con el plásmido pMCV1.4-GFP se obtuvo la mayor la intensidad de fluorescencia (Fig. 60b), que se mantuvo en los días siguientes sin alteración evidente de la morfología celular.

Para determinar la eficiencia de la electroporación se cuantificó la población de células que expresaban la GFP a las 72 horas tras la electroporación mediante citometría de flujo, usando células no fijadas. La población de células que expresaban

la GFP bajo el promotor AE6 fue el 4,28 %, mientras que con el promotor MCV1.4 esta población fue el 30,65% (Fig. 61).

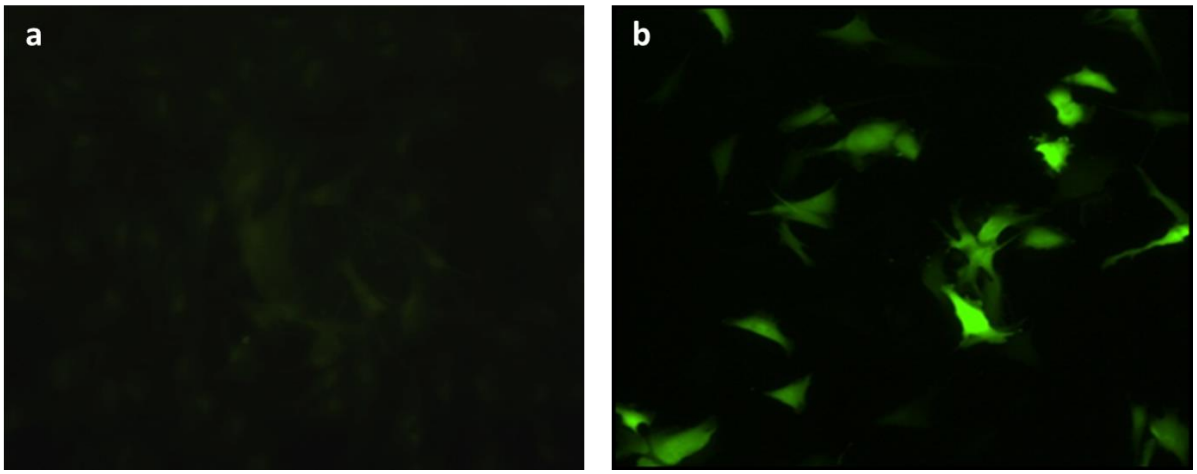

Fig. 60. Cultivos de células de la línea J86, en pase 42, electroporadas con el sistema Neon Transfection utilizando dos pulsos eléctricos, tras 24 horas de incubación. **a:** Células electroporadas con el plásmido pAE6-GFP. **b:** Células electroporadas con la construcción pMCV1.4-GFP. (200x).

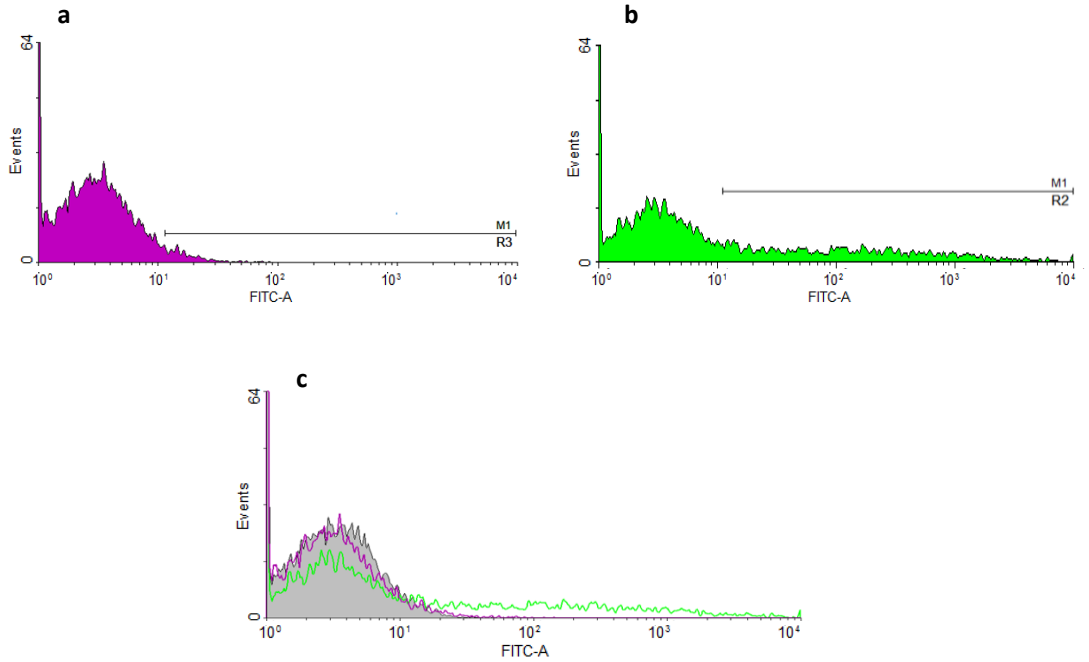

Fig. 61. Histogramas de fluorescencia que muestran la población de células transfectadas mediante el método de la electroporación Neon Transfection y dos pulsos eléctricos, que expresan la proteína fluorescente GFP. **a:** Cultivo transfectado con pAE6-GFP. **b:** Cultivo transfectado con pMCV1.4-GFP. **c:** Superposición de la fluorescencia procedente de los cultivos transfectados con los dos plásmidos con respecto a la autofluorescencia de las propias células. Se consideraron células positivas para la expresión de GFP las que mostraban una intensidad de fluorescencia mayor que el valor de autofluorescencia.

3.2. Expresión de gpG en la línea J86

La capacidad de las construcciones de DNA pAE6-Gvhsv y pcDNA3-vhsvG para inducir la expresión de la gpG *in vitro* en la línea celular J86, transfectadas con el sistema Neon Transfection y utilizando dos pulsos eléctricos, fue evaluada mediante inmunofluorescencia indirecta, usando anticuerpos contra esa glucoproteína (Tabla XVI).

A las 72 horas postransfección, se detectó expresión de gpG en una población pequeña de las células transfectadas con el plásmido pAE6-Gvhsv, que con la técnica utilizada mostraban un patrón de distribución de la fluorescencia en membrana (Fig. 62).

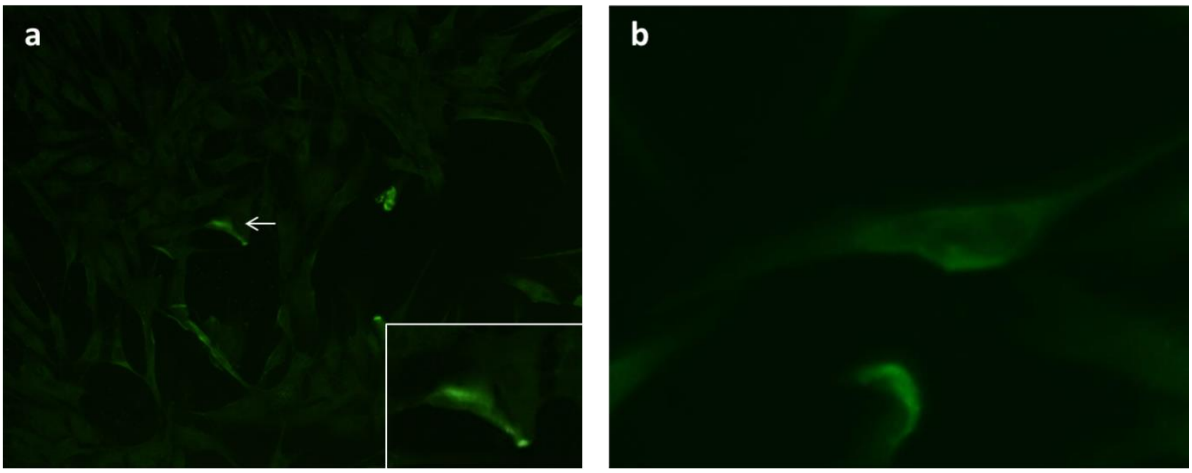

Fig. 62. Imágenes de dos cultivos de la línea J86, en el pase 43, transfectados con el sistema Neon Transfection (dos pulsos eléctricos) y el plásmido pAE6-Gvhsv e incubadas durante 72 horas, en los que la expresión de gpG fue detectada con un cóctel de anticuerpos monoclonales. **a:** Panorámica de un pocillo. 100x (Detalle 180x). **b:** Detalle de otro pocillo en el que se aprecia el patrón difuso de expresión de gpG en membrana. 400x.

En el caso de las células transfectadas con el plásmido pcDNA3-vhsvG la técnica utilizada, que permite la detección intracitoplasmática, demostró la expresión de gpG tras 72 horas de incubación en numerosas células, que presentaban alta intensidad de fluorescencia y un patrón granular disperso en el citoplasma (Fig. 63).

Se determinó el porcentaje de células que expresaban gpG en membrana para cada una de las construcciones ensayadas a las 72 horas postransfección, mediante citometría de flujo utilizando células no fijadas. En el caso de las células transfectadas con el plásmido pAE6-Gvshv, un 4% de la población de células expresaba la gpG (Fig. 64a), mientras que en los cultivos transfectados con pcDNA3-vhsvG el 37% de la población expresaba el fragmento gpG (Fig. 7b).

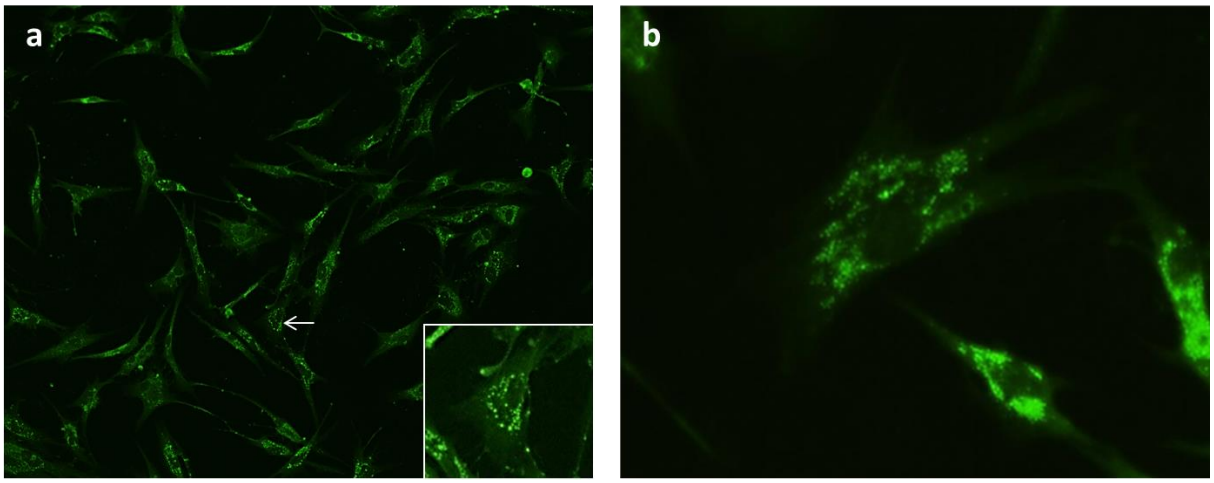

Fig. 63. Imágenes de dos cultivos de la línea J86, en el pase 43, transfectados con el sistema Neon Transfection (dos pulsos eléctricos) y con el plásmido pcDNA3-vhsvG e incubadas durante 72 horas, en los que la expresión de gpG fue detectada con un anticuerpo policlonal de conejo anti-gpG de VHSV. **a:** Panorámica de un pocillo. 100x (Detalle 250x). **b:** Detalle de otro pocillo mostrando el patrón granular de la expresión de gpG en las células. 400x.

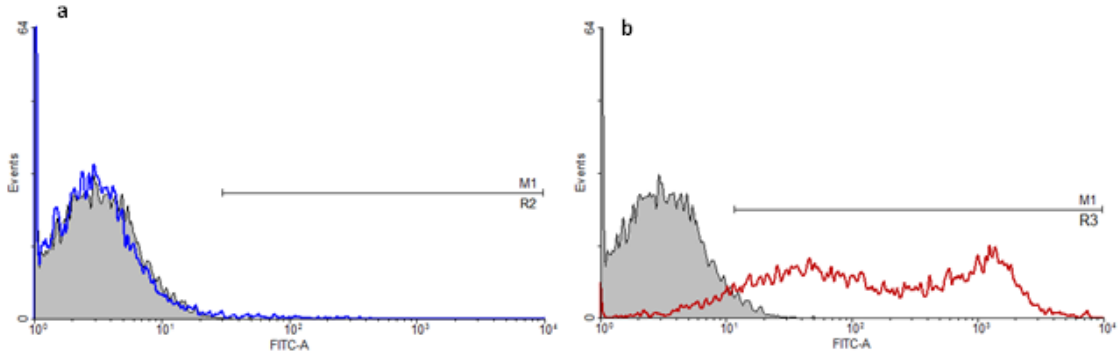

Fig. 64. Histogramas de fluorescencia que muestran la población de células transfectadas mediante electroporación y que expresan la gpG del VHSV en membrana. **a:** Células transfectadas con pAE6-Gvhsv. **b:** Células transfectadas con pcDNA3-vhsvG. Se consideraron células positivas para la expresión de gpG las que mostraban una intensidad de fluorescencia mayor que el valor de autofluorescencia (región en gris).

3.3. Funcionalidad de la proteína codificada por los plásmidos

Una vez comprobado que las células de la línea J86 son transfectadas mediante electroporación y expresan gpG, se procedió a comprobar la funcionalidad de la proteína expresada con cada plásmido mediante el ensayo de fusión de membranas citoplasmáticas.

En los cultivos usados como control negativo, no transfectados, las condiciones de incubación utilizadas para inducir la fusión (incubación con medio a pH 6 durante 30 min, seguida de incubación con medio a pH 7,6 durante 2 horas a 14°C) produjo una contracción celular, que permitía distinguir claramente las células individuales (Fig. 65a). En los cultivos utilizados como control positivo, infectados con VHSV, se

observaron zonas de lisis con pérdida de la integridad de las monocapas, así como zonas donde las células se fusionaban (Fig. 65b).

Tanto en los cultivos transfectados con pAE6-Gvhsv (Fig. 65c) como con pcDNA3-vhsvG (Fig. 65d) se observó la formación de sincitios, cuyos núcleos quedaban concentrados en el centro.

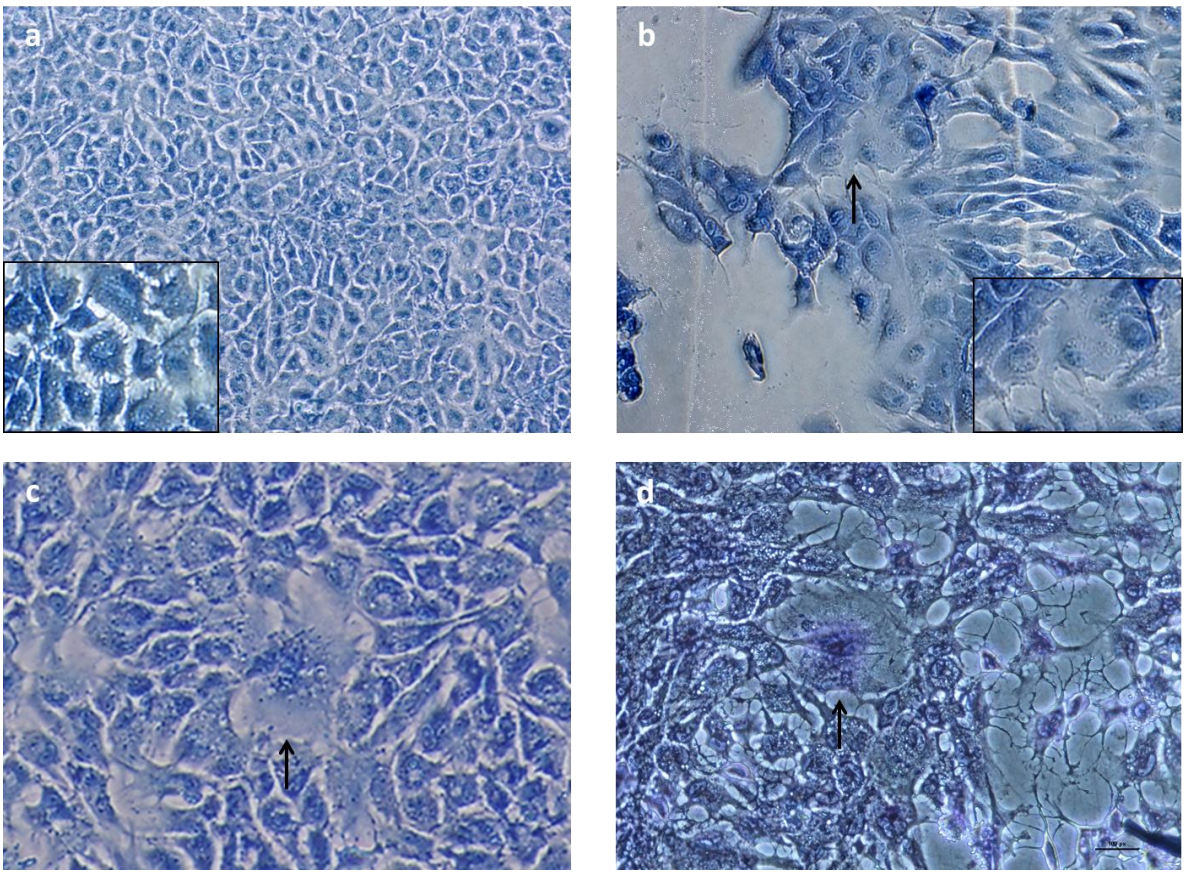

Fig. 65. Imágenes de cultivos de la línea J86 usados en los ensayos de fusión, teñidos con Giemsa. **a**: Cultivo control negativo, no transfectado ni infectado. 100x. Detalle 200x. **b**: Cultivo control positivo infectado con VHSV a una MOI de 0,01. Se observan placas de lisis y fusión celular. 200x. Detalle 300x. **c**: Cultivo de células de la línea J86, pase 45, transfectadas para la expresión de gpG con pAE6-Gvhsv. 200x. **d**: Cultivo de células de la línea J86, pase 45, transfectadas para la expresión de gpG con pcDNA3-vhsvG. 200x.

3.4. Efecto de la expresión de gpG en la modulación de genes y mediadores relacionados con la respuesta inmunitaria

Una vez comprobado, mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo, que la línea J86 expresa la gpG de forma funcional para la inducción de fusión de membranas tras ser transfectada con las diferentes construcciones plasmídicas, las cuales contienen distintos promotores, se analizó el efecto de la expresión de dicha glucoproteína viral en la expresión de factores relacionados con la respuesta innata en dicha línea.

Proteína Mx

A las 72 horas postransfección con el plásmido pAE6-Gvhsv se observó un incremento estadísticamente significativo de la expresión de Mx respecto al control negativo (células no transfectadas) y respecto a la expresión en la células transfectadas con el vector vacío pAE6 (Fig. 66).

En el caso de las células transfectadas con pcDNA3-vhsvG, a las 72 horas postransfección se observó un ligero incremento de expresión con respecto al control, mientras que la transfección con el vector vacío produjo una pequeña represión, que en ambos casos no eran estadísticamente distintos del valor de los controles ni entre sí y, en cualquier caso, inferiores a las observadas para las construcciones con el plásmido pAE6 (Fig. 66).

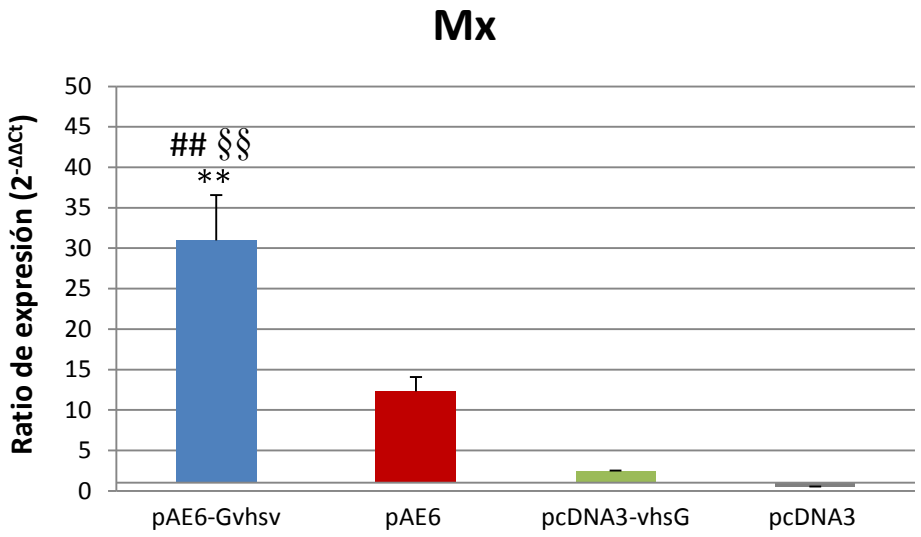

Fig. 66. Expresión del gen *Mx* a las 72 horas postransfección. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión Mx/EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01), entre los dos plásmidos codificantes (§ = p<0,05; §§ = p<0,01), y entre el vector codificante y el correspondiente vector vacío (# = p<0,05; ## = p<0,01).

Utilizando el anticuerpo policlonal de conejo anti-Mx de *O. mykiss* se detectó también la expresión de esta proteína en las células J86 transfectadas con pAE6-Gvhsv o pcDNA3-vhsvG a las 72 horas postransfección (Fig. 67). Mientras que en los cultivos control, no transfectados, no se observó inmunomarcaje (Fig. 67a-c), las células de los cultivos transfectados con el plásmido pAE6-Gvhsv (Fig. 67d-f) o con pcDNA3-vhsvG (Fig. 67g-i) presentaban patentes gránulos positivos con distribución perinuclear.

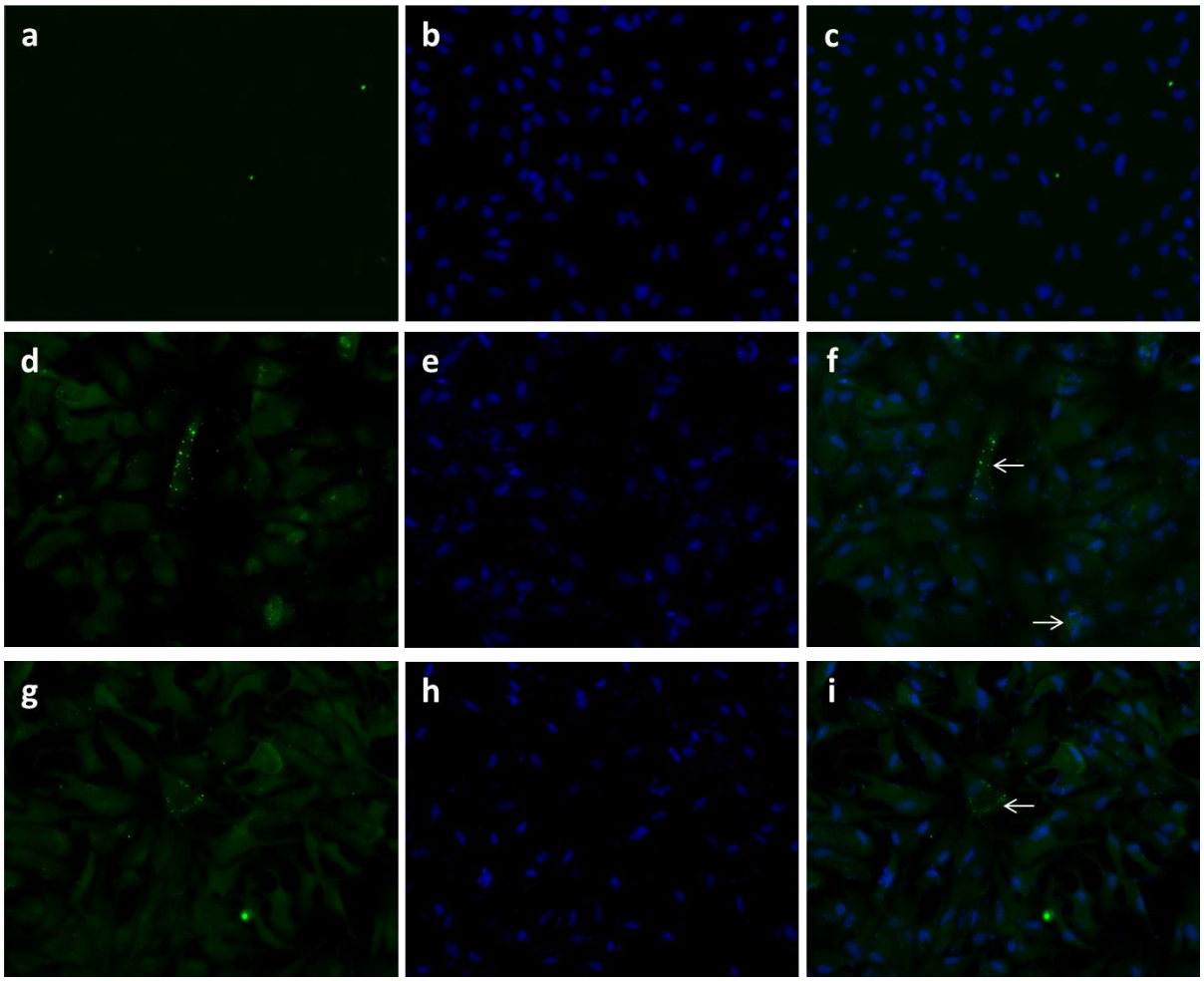

Fig. 67. Imágenes de inmunofluorescencia para la detección de proteína Mx en cultivos de la línea J86 electroporados con el sistema Neon Transfection tras 72 horas de incubación. **a**-**c**: Cultivos control negativo, no transfectados. 200x. **d**-**f**: Cultivos transfectados con el plásmido pAE6-Gvhsv. 200x. **g**-**i:** Cultivos transfectados con la construcción pcDNA3-vhsvG. 200x. Los núcleos celulares se contrastaron con DAPI (b, e, h) y la columna de la derecha muestra la superposición de las imágenes de los dos canales de fluorescencia. 200x.

MHC-Iα

En los cultivos transfectados con pAE6, independientemente de si codificaba gpG o se trataba del vector vacío, la expresión de la cadena α de MHC-I aumentó de manera significativa a las 72 horas con respecto a los controles, pero con un valor más alto para el plásmido codificante de gpG (Fig. 68). Este incremento también fue significativo respecto a la inducida por el plásmido pcDNA3-vhsvG, vector que no produjo cambios en la expresión frente al control, observándose sólo un ligero incremento, no significativo, respecto a los controles, en los cultivos transfectados con el vector no codificante (Fig. 68).

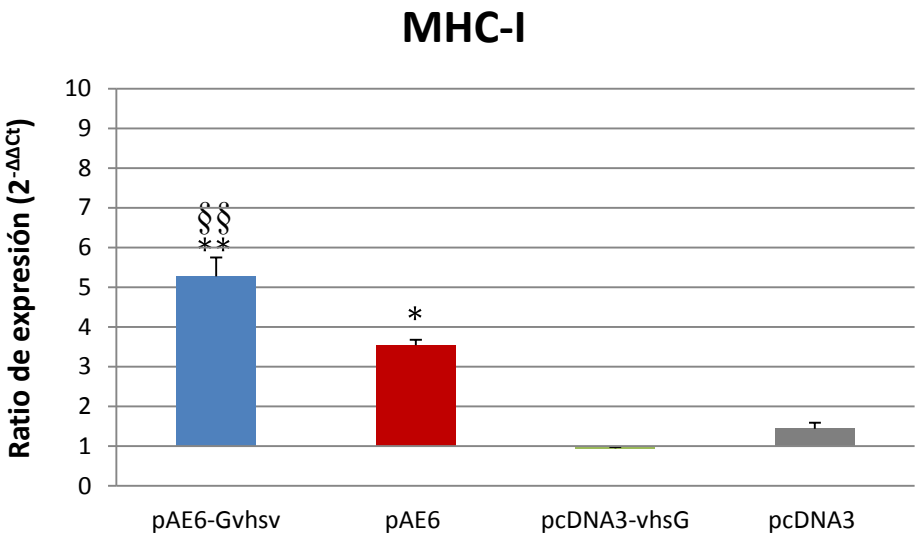

Fig. 68. Expresión del gen *MHC-Iα* a las 72 horas postransfección. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión MHC-I/EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los dos plásmidos codificantes (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Factor de necrosis tumoral alfa

La expresión del TNFα se incrementó a las 72 horas tanto en los cultivos transfectados con construcciones del plásmido pAE6 como pcDNA3, pero con valores no estadísticamente diferentes respecto a los controles (Fig. 69). Para ambos plásmidos la expresión de TNFα fue mayor para las construcciones codificantes de gpG, pero sin diferencias entre ellas.

Interleuquina 1β

Igualmente, la transfección de los cultivos con las construcciones de pAE6 y de pcDNA3 indujo un incremento de la expresión de IL-1β respecto a los controles, pero que solo era estadísticamente significativa para pAE6 (Fig. 70). Además, la expresión tras la transfección con la construcción pAE6-Gvhsv era mayor que para pcDNA3-vhsvG.

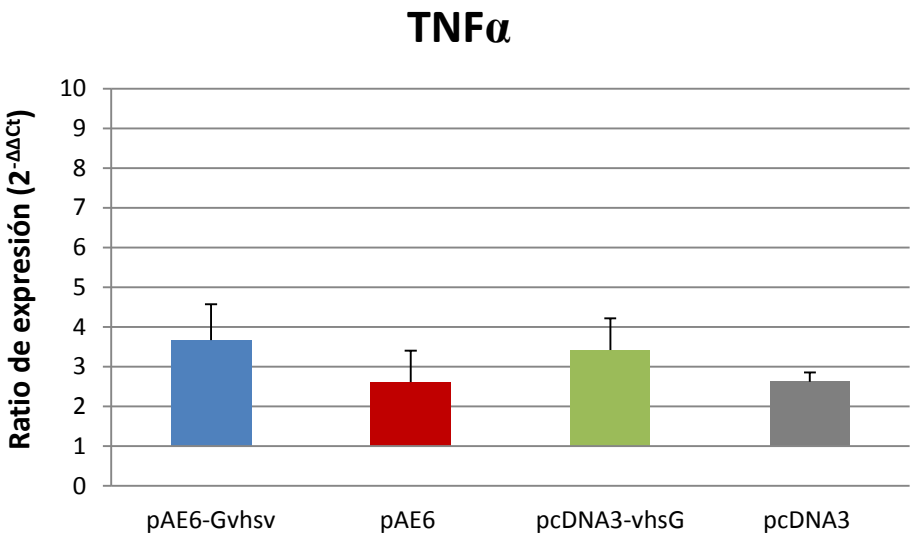

Fig. 69. Expresión del gen *TNFα* a las 72 horas postransfección. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión TNF*α*/EF-1*α* respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los dos plásmidos codificantes (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

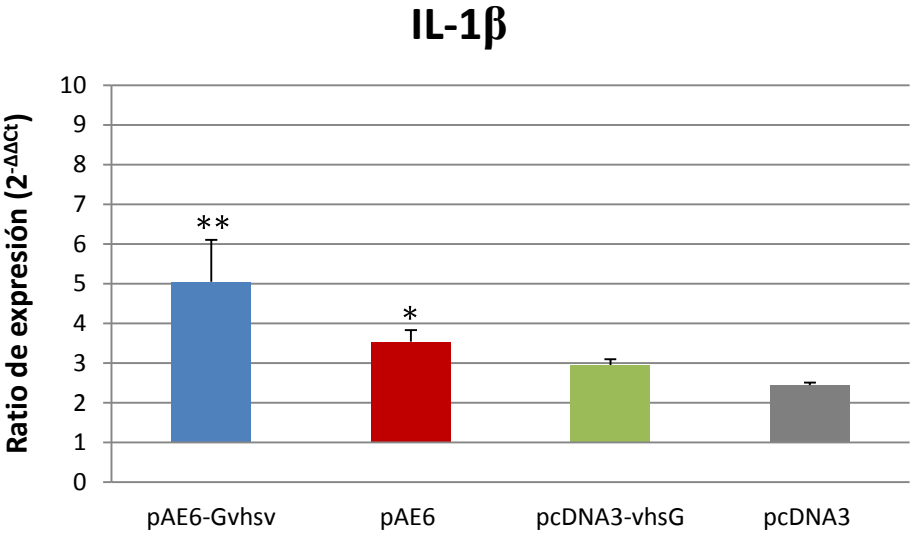

Fig. 70. Expresión del gen *IL-1β* a las 72 horas postransfección. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión IL-1β/ EF-1*α* respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01) y entre los dos plásmidos codificantes (§ = p<0,05; §§ = p<0,01).

Interleuquina 8

En los cultivos transfectados con pAE6-Gvhsv se observó un pequeño pico de expresión de IL-8, que no fue significativo respecto al control, mientras que para el resto de las condiciones experimentales se observó una represión, que en estos casos no fueron estadísticamente significativas frente a los controles (Fig. 71). La pequeña diferencia de expresión de IL8 inducida por la transfección con pAE6-Gvhsv o con

pcDNA3-vhsvG fue estadísticamente significativa, así como la diferencia entre el vector codificante pAE6 y el vacío (Fig. 71).

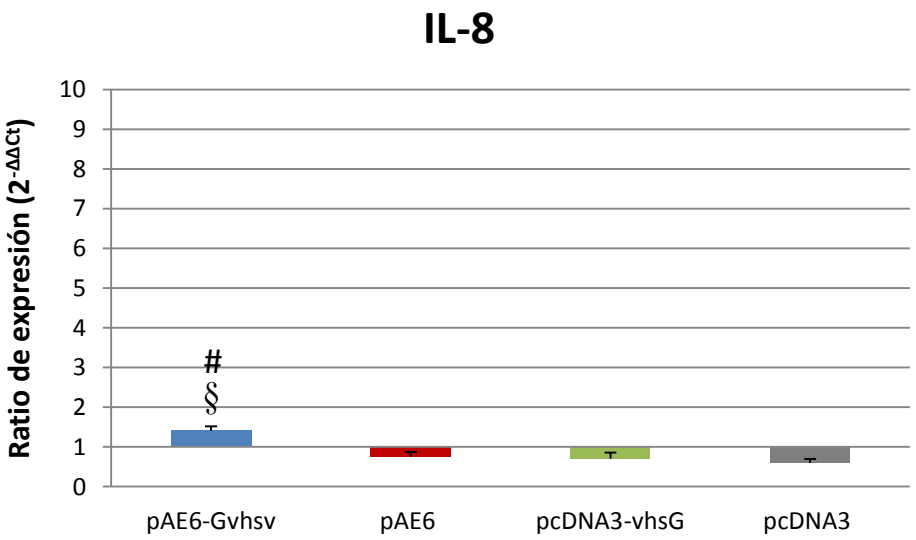

Fig. 71. Expresión del gen *IL-8* a las 72 horas postransfección. El eje de ordenadas muestra las ratios de expresión IL-8/ EF-1α respecto a la expresión en los controles (=1). Las columnas representan la media (n=3) más el error estándar. Se indican las diferencias significativas respecto a los controles (* = p<0,05; ** = p<0,01), entre los dos plásmidos codificantes (§ = p<0,05; §§ = p<0,01), y entre el vector codificante y el correspondiente vector vacío (# = p<0,05; ## = p<0,01).

4. Discusión

En el presente trabajo se ha evaluado la utilidad de la línea celular J86, obtenida a partir de explantes de aleta de *O. mykiss*, para la selección de nuevas vacunas DNA contra VHS estudiando su capacidad para expresar la glucoproteína G de VHSV y la modulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria antiviral.

En primer lugar se intentó mejorar la técnica de transfección de la línea celular J86, usando para ello la expresión de GFP bajo distintos promotores como modelo. En el Capítulo I ya demostramos que estas células J86 pueden ser transfectadas utilizando agentes catiónicos, como Lipofectamina, pero con una baja eficiencia en la expresión de GFP bajo el promotor MCV1.4. Dado que este promotor se ha mostrado muy eficaz para inducir la expresión de diversas proteínas en diversos tipos celulares de peces, como la glucoproteína G de rhabdovirus, el péptido antimicrobiano pleurocidina de limanda (*Limanda limanda*) (Brocal et al. 2006) o β-galactosidasa (Lopez et al. 2001), concluimos que la baja eficiencia de expresión podría deberse al método de transfección.

En esta parte del trabajo hemos demostrado que la electroporación, combinada con agentes químicos cuya naturaleza no está declarada, que utiliza el sistema Neon Transfection (Invitrogen) produce una mayor eficiencia de transfección en las células J86, estimada por microscopía de fluorescencia, que cuando se utilizan agentes catiónicos. Esta observación concuerda con las reportada para la línea celular PC12, derivada de feocromocitoma de rata, que también presenta dificultad para ser transfectada con agentes catiónicos, en las que el uso del sistema Neon Transfection resulta más eficiente para la transfección con GFP (Covello et al. 2014).

Además, hemos observado diferencias en el patrón de expresión de GFP entre las dos construcciones que difieren en el promotor, de forma que las células de los cultivos transfectados con pMCV1.4-GFP mostraron una fluorescencia más intensa que las de los cultivos transfectados con pAE6-GFP. Igualmente, en los cultivos transfectados con pMCV1.4-GFP la proporción de células transfectadas (30%) fue mayor que en los transfectados con pAE6-GFP.

Esas diferencias deben ser atribuidas al tipo promotor que contienen dichas construcciones, de forma que el de CMV ha sido descrito como más eficiente para inducir la expresión de GFP en líneas celulares derivadas de órganos de peces con un componente epitelial, como aletas (Ku et al. 2010) y área rostro-nasal (Zhou et al. 2007) o inmunitario como el bazo (Qin et al. 2006) o el timo (Chaudhary et al. 2013), con valores de poblaciones transfectadas semejantes al encontrado por nosotros (30 – 35%). Por el contrario, en otros tipos celulares de peces, como cultivos primarios de pronefros de *O. mykiss* (Ortega-Villaizán et al. 2012) y en la línea celular EPC (Brocal et al. 2006), el promotor de β-actina de carpa, contenido en el plásmido pAE6, fue más eficiente para la expresión de GFP que el promotor CMV.

Aunque en principio podría pensarse que los promotores de genomas de peces deberían ser más eficientes que los de origen viral o de mamífero para inducir la expresión génica en células o animales transgénicos de esta clase de Vertebrados, lo cierto es que ello depende del gen que va a expresarse (Du et al. 1992; Dunham et al. 2002; Hwang et al. 2003), así como del tipo celular en el que se exprese (Brocal et al. 2006; Ruiz et al. 2008).

De forma similar, hemos comprobado que la línea celular J86 es capaz de expresar gpG de VHSV, pero que dicha expresión está también modulada por el tipo de promotor utilizado y la variante de proteína codificada. Así, utilizando la metodología de transfección por electroporación, existían diferencias en el porcentaje de la población que expresaba gpG entre los cultivos transfectados con plásmidos pAE6 y pcDNA3.

En cuanto al patrón de expresión celular de la gpG analizado por microscopía de fluorescencia en los cultivos, nuestros resultados no permiten hacer una comparación directa entre aquellos transfectados con pAE6-Gvhsv o con pcDNA3-vhsvG, ya que se utilizaron diferentes métodos de fijación: en el primer caso para marcaje de expresión en membrana y en el segundo para marcaje citoplasmático (estas diferencias de procedimiento se deben a que los ensayos de inmunofluorescencia en cultivo estaban dirigidos inicialmente solo a determinar si existía o no expresión de gpG). No obstante, los resultados de los ensayos de citometría de flujo, en los que se utilizaron células no fijadas, confirman que con ambas construcciones se produce expresión de gpG en membrana.

En cualquier caso, la expresión en membrana inducida por pAE6-Gvhsv en las células J86 coincide con las observaciones realizadas para la línea celular EPC transfectada con este mismo plásmido (Chico et al. 2010; Martínez-López et al. 2013b) y para la línea RTG-2 transfectada con la construcción pJAC-G, una variante del plásmido pAE6-Gvhsv que contiene como terminador la secuencia del gen de la β-actina de pez cebra (Martínez-López et al. 2013a). En el caso de la construcción pcDNA3-vhsvG también se ha observado mediante inmunocitoquímica la expresión de gpG en la membrana de las células RTG-P1 (Acosta et al. 2006), una línea celular derivada de RTG-2 que expresa de forma permanente el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de Mx (Collet et al. 2004).

Sin embargo, el análisis mediante citometría de flujo de la proporción de células J86 transfectadas demostró que la construcción pcDNA3-vhsvG era más eficiente, de forma que en estos cultivos había un porcentaje más alto de células que expresaban gpG (37%) que el de células que la expresaban tras la transfección con pAE6-Gvhsv (4%).

Las diferencias de eficiencia entre esas dos construcciones plasmídicas codificantes de gpG concuerdan con las que obtuvimos para la expresión de GFP tras la transfección con las construcciones pAE6-GFP y pMCV1.4-GFP, conteniendo este último el promotor MCV1.4. Este mismo fenómeno se ha descrito en estudios *in vitro* realizados para evaluar las eficiencias de diferentes construcciones plasmídicas para expresar la gpG de VHSV en la línea celular EPC, en los cuales la eficiencia de transfección de la construcción pMCV1.4-Gvhsv, estimada por citometría de flujo, fue mayor que la de pAE6-Gvhsv (Chico et al. 2009; Ruiz et al. 2008). No obstante, en esta línea celular de carpa el vector pAE6-Gvhsv indujo una expresión de gpG notablemente superior (24%) (Ruiz et al. 2008) que la encontrada por nosotros en la línea J86. Esta diferencia podría deberse a que el promotor de β-actina de carpa se

expresa mejor en un modelo celular homólogo que en las células heterólogas de trucha.

Por otra parte, la eficiencia de transfección con pcDNA3-vhsvG en la línea J86 fue muy superior que la descrita para este mismo vector en la línea RTG-P1 (Acosta et al. 2006), en la que solo un 3% de la población expresaba gpG. Esta diferencia se puede explicar por el hecho de que en ese trabajo se utilizó Lipofectamina como agente de transfección, que como hemos demostrado es menos eficiente que la electroporación empleada por nosotros.

En la segunda parte del trabajo hemos analizamos si la forma de gpG que se expresaba en las células transfectadas mantenía su funcionalidad, lo que es necesario para la infectividad del virus (Albertini et al. 2012; Gaudin et al. 1999) y –de interés para el objetivo de esta tesis– para inducir una respuesta inmunitaria eficaz tras la vacunación (Béarzotti et al. 1995). Nuestro estudio en las células J86 de aleta de *O. mykiss* confirma que, aunque el promotor CMV es más eficiente en la inducción de la expresión de gpG, para ambas construcciones se obtuvo la expresión de gpG funcional para la inducción de fusión de membranas, tal como demostraron los ensayos de formación de sincitios inducido por bajo pH (Estepa et al. 2001).

La formación de sincitios con esta técnica fue descrita como un marcador de la progresión de la infección por VHSV en la línea celular EPC (Estepa and Coll 1997; Mas et al. 2004), de la expresión de gpG de VHSV en cultivos de EPC transfectados con las construcciones G3-pcDNAI/Amp, pAE6-gpG1-507 y pMCV1.4-G (Estepa et al. 2001; Martínez-López et al. 2013b; Rocha et al. 2004) y en cultivos de esta línea celular expuestos a un péptido correspondiente al fragmento 11 (aminoácidos 56-110) de la gpG, el cual tiene propiedades fusogénicas (Estepa et al. 2001; Núñez et al. 1998). La formación de sincitios en estos modelos se ha atribuido a los cambios conformacionales que suceden en la gpG funcional inducidos por el pH bajo (Gaudin et al. 1993), lo cual es de gran importancia dado que en el caso de los rhabdovirus la gpG no sólo reconoce a los receptores en la superficie de las células del hospedador (Albertini et al. 2012; Da Poian et al. 2005), sino que, tras la internalización del virus por endocitosis (Marsh and Helenius, 1989; Superti et al. 1984), media también en su liberación al citoplasma (Gaudin et al. 1993; Matlin et al. 1982).

Por tanto, la transfección de las células J86 de aleta, bien con pAE6-Gvhsv o con pcDNA3-vhsvG, induce la expresión en membrana de formas funcionales de gpG de VHSV, que es un requisito importante, si no necesario, para la obtención de vacunas DNA efectivas (Heppell et al. 1998).

La expresión de esas formas funcionales de gpG puede explicar la modulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata en los cultivos de la línea J86 transfectados para la expresión de esa glucoproteína, que hemos determinado mediante qRT-PCR. Los factores inmunitarios estudiados fueron elegidos teniendo en cuenta que representasen los principales grupos de mediadores de inflamación, incluyendo iniciación de la respuestas (IL-1 y TNF) y quimiotaxis (IL-8), de respuesta antiviral (Mx) y de presentación de antígenos virales (MHC-I).

De forma estadísticamente significativa frente a los controles, a las 72 horas postransfección, pAE6-Gvhsv indujo en las células J86 la sobreexpresión de Mx, MHC-I e IL-1β, mientras que con pcDNA3-vhsvG no hubo cambios significativos para ninguno de los genes. Además, el efecto de la transfección con pAE6-Gvhsv en la expresión de los genes de Mx e IL8 fue significativamente mayor que el producido con el vector vacío (pAE6). Además, el estudio inmunocitoquímico para analizar la expresión de la proteína Mx también confirmó que la transfección con cualquiera de los dos vectores plasmídicos codificantes de gpG resultaba en la producción de dicha proteína. Para el factor TNFα, para los dos vectores, e IL-1β en las células transfectadas con pcDNA3-vhsvG, se observó un incremento de la expresión génica de unas 3 veces respecto a los controles, pero sin diferencias estadísticamente significativas respecto a ellos.

Estos resultados concuerdan, en general, con el incremento de la expresión génica de mediadores inmunitarios *in vitro* reportada en estudios semejantes, incluyendo IL-1β y TNFα y, particularmente, Mx en líneas celulares de peces transfectadas para la expresión de gpG, bien con pAE6-Gvhsv, tales como la línea celular RTG-2 (Ortega-Villaizán et al. 2011) y cultivos primarios de pronefros de *O. mykiss* (Ortega-Villaizán et al. 2012), con pcDNA3-vhsvG en la línea celular transgénica RTG-P1, en la cual la expresión de luciferasa es un marcador de la producción de Mx y de la liberación de INF-I (Acosta et al. 2006), o con pMCV1.4-Gvhsv en RTG-2 (Martínez-López et al. 2014).

En cualquier caso, el perfil de expresión *in vitro* de genes inmunitarios en las células J86 transfectadas para la expresión de gpG, así como los de las otras líneas celulares indicadas en el párrafo anterior, concuerda con los resultados obtenidos en vacunaciones experimentales con vacunas DNA anti-VHSV *in vivo*. En el caso de pcDNA3-vhsvG, la vacunación de alevines de *O. mykiss* y de salmón atlántico (Acosta et al. 2005), así como de trucha arcoíris adulta (McLauchlan et al. 2003), indujo un aumento significativo en la expresión de Mx en el hígado. Igualmente, tras la vacunación intramuscular con pAE6-Gvhsv se ha descrito la sobreexpresión de IL-1β, TNFα, Mx, IL-8 en músculo, bazo y pronefros de trucha arcoíris (Chico et al.

2009). Además, la administración intramuscular de pMCV1.4-Gvhsv en esa misma especie indujo un aumento en la expresión de IL-1β, Mx y MHC-I en bazo, pronefros y leucocitos circulantes (Cuesta y Tafalla, 2009) y de Mx y de IL-1β en músculo y bazo de trucha arcoíris, así como MHC-I en bazo a las 48 horas tras la inyección (Martínez-Alonso et al. 2011).

Con respecto a la expresión de IL-8, una quimioquina relacionada con la atracción de leucocitos al foco de inflamación, su expresión en la línea J86 no se vio incrementada de forma significativa con ninguna de las dos construcciones que hemos ensayado. Un hecho similar se ha descrito *in vivo* tras la infección con VHSV de truchas arcoíris infectadas, en las que no se detectó sobreexpresión de este gen en el tegumento (Montero et al. 2011). De esta forma, la expresión de IL-8 no parece ser un buen indicador de la respuesta a las vacunas DNA anti-VHSV y su papel en el reclutamiento leucocitario hacia el punto de entrada de este virus parece muy limitado.

Sin embargo, tal vez la parte más interesante de los resultados de esta parte del estudio estribe en las diferencias observadas entre ambas construcciones plasmídicas en cuanto a los cambios de expresión génica de los factores inmunitarios. En nuestro caso, la transfección con pAE6-Gvhsv indujo los mayores incrementos en la expresión de Mx, MHC-I, IL-1β y, de forma no tan clara, TNFα, aunque con este vector se obtenía una menor eficiencia de transfección que con pcDNA3-vhsvG. Por tanto, no parece haber una correlación entre el número de células que expresan gpG y la inducción de una respuesta antiviral *in vitro*. Esto podría explicarse por dos motivos: a) la forma de gpG expresada en la membrana difiere entre una construcción y la otra; o b) que un exceso de gpG en el cultivo origine procesos de represión, bien a nivel génico o bien por bloqueo de la señalización intracelular.

En cuanto a la primera hipótesis, es interesante resaltar que en un estudio *in vivo*, que comparaba el efecto de la vacunación con pAE6-Gvhsv o con pMCV1.4-Gvhsv en alevines de trucha arcoíris, a las 72 horas pAE6-Gvhsv indujo un mayor incremento de la expresión génica de Mx, IL-8, TNFα en músculo, bazo y pronefros que pMCV1.4-Gvhsv, lo cual también se ha sugerido que tenga relación con procesos transcripcionales (Chico et al. 2009).

Respecto a la segunda, se ha demostrado que proteínas virales del rhabdovirus de la rabia, principalmente la proteína P, interfieren en la vía JAK/STAT del interferón, al retener al factor STAT en el citoplasma, mientras que la presencia de bajas cantidades de la proteína viral no interfiere con dicha vía de señalización (Brzózka et al. 2006). El acúmulo de gpG en el citoplasma de las células J86 transfectadas con pcDNA3-

vhscvG, que hemos detectado en el estudio por inmunofluorescencia, podría ejercer una actividad similar en nuestro modelo.

Por otra parte, existían también diferencias en expresión de MHC-I entre las células J86 transfectadas con una construcción plasmídica u otra, de forma que pAE6-Gvhsv indujo significativamente la expresión de MHC-I, mientras que la construcción pcDNA3-vhsvG no produjo cambios. Este mismo fenómeno se ha descrito en truchas arcoíris vacunadas con una construcción conteniendo el promotor CMV (Chaves-Pozo et al. 2010a; Martínez-Alonso et al. 2011). En nuestro modelo la no sobreexpresión de MHC-I en las células J86 transfectadas con pcDNA3-vhsvG puede correlacionarse también con la no inducción de la expresión de Mx en las mismas, lo que sugiere que la transfección con ese vector no activa eficientemente la vía de INF-I, el cual es un inductor de la expresión de MHC-I (Zou and Secombes, 2011).

Apoyándonos en lo expuesto en el párrafo anterior, las diferencias observadas entre las células J86 transfectadas con pAE6-Gvhsv o con pcDNA3-vhsvG en cuanto a la expresión génica de mediadores inmunitarios importantes en la defensa antiviral innata podrían atribuirse, en gran medida, a que la transfección con pcDNA3-vhsvG no activa los primeros procesos proinflamatorios, mediados por IL-1, ni la respuesta antiviral más inmediata, mediada por INF-I. La razón de esto es una cuestión a estudiar en futuros trabajos.

A modo de conclusión, nuestros resultados demuestran que mediante transfección la línea J86 es capaz de expresar GFP y diferentes formas de la proteína viral gpG, codificadas por diferentes construcciones plasmídicas, que dichas formas de gpG son funcionales en cuanto a la expresión en membrana plasmática e inducción de fusión de membranas y que modulan la respuesta inmunitaria en los cultivos de J86 al inducir la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias y antivirales. En conjunto, estos resultados abren la posibilidad de utilizar la línea J86 derivada de aleta para realizar estudios que arrojen un mayor conocimiento del papel que tienen las células de las aletas en la protección conferida por las vacunas DNA, así como para testar diferentes candidatos vacunales.

Discusión general

Discusión General

En relación con los objetivos que nos propusimos en esta Tesis Doctoral, enmarcada en una línea de investigación sobre el desarrollo y utilización de cultivos celulares para la caracterización del sistema inmunitario de los peces y el desarrollo de métodos de inmunoprofilaxis para la acuicultura, hemos realizado trabajos dirigidos a:

1. Desarrollar una metodología que permita el establecimiento rutinario de cultivos primarios del tegumento de aleta de trucha arcoíris y la obtención de líneas celulares derivadas de ellos, que puedan ser utilizados para analizar *in vitro* mecanismos de patogenicidad temprana de rhabdovirus, dado que el tegumento de las aletas de salmónidos constituye una puerta de entrada principal de esos patógenos.

2. Analizar la respuesta temprana de la línea celular J86, una de las líneas celulares derivadas de subcultivos de explantes del tegumento de aleta de *O. mykiss*, a la infección por VHSV, tanto en cuanto a la susceptibilidad a la infección como en cuanto al despliegue de mecanismos defensivos de la respuesta antiviral innata, para obtener información sobre el papel que juegan las células del tegumento de las aletas en las primeras fases de la infección viral en salmónidos.

3. Explorar la capacidad de transfectar las células de la línea celular J86 para la expresión de genes de interés para el desarrollo de vacunas DNA contra VHSV y de modelos de vacunación-contraprueba *in vitro*, incluyendo la puesta a punto de la metodología para la transfección y el análisis del efecto del promotor incluido en el vector utilizado en la expresión de la gpG de VHSV, dado que esta proteína es una de las candidatas principales para la obtención de vacunas DNA efectivas contra la septicemia hemorrágica viral.

4. Examinar las respuestas proinflamatorias y antivirales que son inducidas en la línea celular J86 por la transfección con vectores codificantes para la gpG de VHSV, para aportar información sobre los mecanismos defensivos puestos en marcha por la vacunación DNA en los tejidos de tegumento, que en salmónidos son puerta de entrada de rhabdovirus, y que puedan servir para mejorar las formulación de vacunas DNA para la acuicultura.

Los resultados obtenidos para cada uno de estos trabajos se ha discutido en los capítulos correspondientes, pero consideramos pertinente realizar una discusión

general, que correlacione unos con otros y aporte una visión más general de contenido de la Tesis.

En relación con el primer apartado, hemos establecido una metodología que permite la obtención rutinaria, con suficiente eficiencia y repetitividad, de líneas celulares a partir de cultivos de explantes de aleta anal de trucha arcoíris. La elección de utilizar cultivos de aleta se fundamenta en los resultados de estudios realizados en los últimos años para analizar la ruta de entrada de IHNV y VHSV en trucha arcoíris, que demuestran que el tegumento de la base de las aletas es una puerta de entrada de rhabdovirus en los salmónidos (Harmache et al. 2006; Montero et al. 2011a; Montero et al. 2011b; Quillet et al. 2001).

El método que hemos puesto a punto permite mejorar la tasa de éxito en la obtención de cultivos primarios y subcultivos, medida como el porcentaje de explantes adherentes que dieron lugar a crecimientos celulares frente al total de explantes, con valores de un 50% superiores a los obtenidos en estudios anteriores (Mauger et al. 2006). Nuestra metodología incluye el uso del medio DMEM, una variante enriquecida del medio MEM, que también es un medio de elección para la realización de ensayos celulares inmunológicos (Ortega-Villaizán et al. 2011; Somamoto et al. 2013b), por lo que los cultivos obtenidos podrían ser utilizados para el análisis de respuestas inmunocelulares citotóxicas, que son de interés para testar candidatos vacunales antivirales (Dijkstra et al. 2001; Utke et al. 2008).

Nuestro trabajo incluye la caracterización de los cultivos primarios y subcultivos de explantes de aleta obtenidos a partir de diversos ejemplares, los cuales inicialmente estaban mayoritariamente formados por una población mixta de células epitelioides y fibroblásticas. Este hecho es semejante a lo que se ha descrito para cultivos de aleta de otras especies de teleósteos (Mauger et al. 2009; Zhang et al. 1998). Según avanzaba el número de pases se produjo un predominio creciente de células con morfología fibroblástica, lo cual también se ha descrito en cultivos de células de aleta en especies como el Medai (*P. major*) (Ku et al. 2010), la dorada (*S. aurata*) (Bejar et al. 1997) o el Mahseer dorado (*T. putitora*) (Prassana et al. 2000).

Para completar la caracterización de los cultivos y subcultivos de aleta se analizó la expresión basal de genes relacionados con el linaje celular epitelial (citoqueratina-II_E) o fibroblástico (colágeno-Iα). En concordancia con la existencia de poblaciones de morfología fibroblástica y epitelioide, los subcultivos iniciales y los pases tempranos de las líneas celulares obtenidas expresaban ambos genes.

Igualmente, analizamos el perfil de expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria en pases tempranos de varias líneas celulares (J51, J86, J89, J93)

derivadas de explantes de aleta. Mediante PCR demostramos que, en general, dichas líneas expresaban de forma basal, sin estimulación previa, altos niveles de IL-8, IFN-I y Mx, así como de los péptidos antimicrobianos β-Defensina y Catelicidina-1. La expresión de estos genes se ha correlacionado con respuestas antivirales (Zou and Secombes, 2011; Wu et al. 2010; Falco et al. 2008) y con la inmunidad en las mucosas (Chang et al. 2006; Montero et al. 2011a).

En consecuencia, podemos afirmar que el protocolo que hemos desarrollado para el establecimiento de los cultivos primarios a través de explantes permite tomar las porciones de aleta, sin causar daño físico al pez y manteniendo los peces donantes vivos, puesto que el tejido de las aletas se regenera rápidamente (Akimenko et al. 2003) y establecer cultivos que expresan, al menos en los pases tempranos, marcadores génicos característicos del tegumento y genes de mediadores relacionados con respuestas inmunitarias innata de las mucosas.

Además, este protocolo observa las directivas europeas de protección de los animales utilizados para fines científicos (Directiva 2010/63/UE), produciendo un daño mínimo de corta duración y reversible, y también contribuye al objetivo de las "3R" (reducción, refinamiento y reemplazamiento) para optimizar o reemplazar el uso de animales, ya que permitiría sustituir la experimentación *in vivo* por métodos de ensayos *in vitro*, según establece la legislación española (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero) y comunitaria para la protección y uso de animales para la experimentación.

Por tanto, esos resultados cumplen con el propósito de la Tesis dirigido a progresar en el desarrollo de cultivos celulares de salmónidos como modelos para caracterizar respuestas defensivas de *O. mykiss* y mecanismos de patogenicidad de enfermedades infecciosas de peces.

Respecto al apartado 2 indicado anteriormente y los objetivos segundo y tercero de la Tesis, aprovechando las características de los cultivos y líneas celulares de aleta de *O. mykiss* obtenidos, se ha utilizado una de las líneas celulares (J86) para analizar *in vitro* los mecanismos iniciales de la infección por VHSV, por una parte, y para estudiar las respuestas inducidas por la vacunación DNA frente a ese virus, por otra.

Antes de comenzar con los ensayos de susceptibilidad a infección viral, transfección y de expresión de genes de la respuesta inmunitaria innata, caracterizamos fenotípicamente la línea celular J86 y analizamos su comportamiento en cultivo y capacidad para mantenerla mediante criopreservación. Dicha línea celular ha sido subcultivada más de 70 veces y se ha mantenido viable hasta la fecha, por un período de más 48 meses.

Aunque las células J86 muestran aspecto fibroblástico, no se pudo correlacionar con la expresión fenotípica de marcadores proteicos característicos de este tipo celular, como vimentina, lo que también ha sido descrito en cultivos primarios de tegumento (Flaño, 1995) y en la línea celular TPS, originada a partir de estroma de pronefros de trucha arcoíris (Diago, 1996). No obstante, J86 expresa el gen del colágeno tipo Iα, que es un marcador de células mesenquimáticas (Alt et al. 2011), pero no del marcador de células epiteliales citoqueratina-II$_E$ (Porter and Pappas, 1959). Por tanto, se trataría de células fibroblásticas en las que se ha producido una deficiencia en la ruta de síntesis del colágeno, perdiéndose así su perfil inmunocitoquímico para este marcador, como se ha descrito en otras líneas celulares fibroblásticas de *O. mykiss* (Diago, 1996).

En cuanto al estudio del proceso de infección inicial de las células de aleta por VHSV, era necesario demostrar primero si la línea celular J86 es susceptible a la infección por este virus. Además, analizamos si existían diferencias con la susceptibilidad a otro tipo de virus patógeno de *O. mykiss*, el birnavirus IPNV, lo que nos permitiría avanzar hipótesis sobre esa preferencia de VHSV por los tejidos de las aletas como diana inicial de la infección (Harmache et al. 2006; Montero et al. 2011a; Montero et al. 2011b; Quillet et al. 2001).

Nuestros resultados demuestran que la línea J86 es resistente a la infección por IPNV y susceptible a la producida por VHSV, como indica la presencia de células J86 positivas para el inmunomarcaje anti-proteína N de VHSV, la aparición de focos de lisis en las monocapas y la producción de partículas virales infectivas en los cultivos inoculados con VHSV. Por el contrario, aunque IPNV era capaz de infectar las células de la línea J86, tal como demostraba la detección del RNA viral correspondiente al segmento A del virus, pero no la expresión de la proteína VP2, la inoculación no produjo efectos citopáticos, ni producción de partículas virales. La expresión de segmento A y no producción de la proteína VP2 de IPNV indica que en las células J86 este virus es incapaz de completar su ciclo de replicación, por lo que el proceso que tiene lugar en la línea J86 tras la inoculación con IPNV es distinto al descrito en la línea EPC, también resistente, en la cual IPNV se une a las células pero no es internalizado (De las Heras et al. 2008).

Las posibles hipótesis que expliquen la diferente susceptibilidad de la línea J86 a la infección por VHSV o a IPNV pueden estribar en la diferente intensidad de despliegue de mecanismos de defensa antiviral intracelular que induce la infección y en la diferente sensibilidad viral a ellos (Haller et al. 2007). Así, la interrupción del ciclo de infección de IPNV se ha relacionado con el efecto antiviral de las proteínas Mx, que inhiben de la síntesis de RNA viral (Wu et al. 2010). Este mismo proceso se

ha descrito como responsable del efecto protector de Mx frente a VHSV en la línea celular EPC (Schyth et al. 2006).

En ese sentido, la línea J86 mostró un incremento moderado (10 veces sobre los controles) tras la infección con IPNV, que era mayor que la detectada en los cultivos infectados con VHSV. Aunque no se puede hacer una comparación directa entre ambos resultados, ya que se refieren a tiempos posinfección diferentes (72 h para IPNV y 48 h para VHSV) y las diferencias respecto a los controles no fueron estadísticamente significativas, es posible que ese incremento en la expresión de Mx sea suficientes para impedir la progresión de la infección de IPNV en las células J86.

Esas hipótesis nos llevaron a investigar la modulación de la respuesta inmunitaria innata en las células J86 infectadas, lo que se realizó mediante estudio por qRT-PCR de diversos genes (INF-I, Mx, IL-1β, TNFα, iNOS, IL-8, CK9, CK10, CK12) y la detección mediante microscopía de inmunofluorescencia de los mediadores inmunitarios Mx, IL-8 e iNOS. Como control positivo de la estimulación inmunitaria, se incluyeron también en el análisis cultivos de células J86 estimuladas con poli I:C, un análogo sintético del RNA de doble cadena, ampliamente utilizado en estudios de inmunoestimulación para simular infecciones virales (Fierro-Castro et al. 2013; Sever et al. 2014).

La línea J86 expresa de forma basal, sin estimulación previa, los genes de los factores antivirales INF-I y Mx, los de los mediadores proinflamatorios IL-1β, TNFα, iNOS y los de las quimioquinas IL-8, CK9, CK10, CK12. La expresión basal de genes de estos efectores inmunitarios se ha descrito también en otras líneas celulares de peces, tanto de origen leucocitario (Brubacher et al. 2000; Laing et al. 2001; Montero et al. 2008a) como no leucocitario (Caipang et al. 2003; DeWitte-Orr et al. 2007; Fierro-Castro et al. 2013; Ingerslev et al. 2010; Luque et al. 2014; Picchietti et al. 2013). En referencia a las quimioquinas, es importante resaltar que la expresión basal de los genes para IL-8, CK9, CK10 y CK12 en la línea J86 concuerda con la expresión de los mismos genes en los tejidos que forman las bases de las aletas de trucha arcoíris (Montero et al. 2011a).

La exposición al inmunoestimulante poli I:C indujo en las células J86 una marcada modulación de la expresión de todos los genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata analizados, que incluía la sobreexpresión de los genes antivirales IFN-I y Mx y de las citoquinas CK10 y CK12 e la inhibición TNFα y CK9, mientras que para IL-8 y IL-1β ocurría una sobreexpresión inicial (24 h) seguida de represión (48 h). Para el gen *iNOS* se observó un pequeño, pero estadísticamente significativo, incremento a las 48 horas. Estos resultados concuerdan, de manera general, con los descritos en otras líneas celulares fibroblásticas de trucha, como RTG-2 (DeWitte-Orr et al. 2007) y TPS2 (Fierro-Castro et al. 2013) y en la línea de dorada SAF-1 (Picchietti

et al. 2013) estimuladas con poli I:C, demostrando que las células de la línea celular J86 son capaces de reconocer un PAMP de tipo viral y de desplegar una respuesta defensiva innata, que incluye las sobreexpresión de factores antivirales y la modulación de mediadores proinflamatorios y quimioquinas.

Tras la inoculación de los cultivos de la línea J86 con VHSV se observó también la modulación de los genes inmunitarios, pero con perfiles diferentes a los observados para poli I:C, que incluía la sobreexpresión a 24 horas, que aumentaba a las 48 horas, de INF-I y Mx, una sobreexpresión mantenida a 24 y 48 horas de IL-1β y TNFα, IL-8, CK10 y CK12, inhibición de la expresión de iNOS a ambos tiempos y una sobreexpresión inicial de CK9 seguida de una marcada represión de este gen a las 48 horas. Por tanto, la línea celular J86, aun siendo susceptible a la infección por VHSV, es capaz de montar una fuerte respuesta antiviral, que es semejante a las descritas *in vitro* en células fibroblásticas de peces (DeWitte-Orr et al. 2007; Ingerslev et al. 2010) e *in vivo* (Cuesta and Tafalla, 2009; Montero et al. 2011a).

Parece evidente que las diferencias entre las respuestas observadas tras la exposición a poli I:C o la inoculación con VHSV deben ser atribuidas al efecto de la infección viral, que interfiere en los procesos de señalización intracelular (García-Valtanen et al. 2014a) y, por tanto, de regulación de expresión génica, así como al proceso citopático y apoptótico que induce la infección por VHSV (Avunje et al. 2012). Todo ello produciría una alteración de los mecanismos intracelulares que llevan a la producción de mediadores inmunitarios. En este sentido, la modulación de la expresión de los genes de INF-I y CK9 por la inoculación con VHSV aparecía relacionada de forma inversa con la MOI utilizada, mientras que para los otros genes no se apreciaba un efecto significativo de la MOI. La relación inversa entre expresión y MOI para los dos primeros genes podría ser atribuida a que la entrada y replicación de un mayor número de virus en las células acentúe el efecto inhibitorio de su expresión.

Un aspecto importante de nuestro trabajo es que los estudios de expresión transcripcional de los genes *Mx*, *IL-8* e *iNOS* se han correlacionado con la inmunodetección *in situ* de las correspondientes proteínas de *O. mykiss*, utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra IL-8 e iNOS (Luis Mercado, resultados no publicados) y un anticuerpo policlonal anti-Mx (Chico et al. 2010). Aunque estos estudios no son cuantitativos, los resultados confirman que la infección por VHSV modula la expresión de esos mediadores a nivel de proteína. El patrón de inmunomarcaje para la proteína Mx, en forma de gránulos perinucleares, en los cultivos inoculados con VHSV coincide con el descrito en la línea celular CHSE-214 estimulada con poli I:C (Trobridge et al. 1997).

En el caso de la expresión de la proteína iNOS, el patrón de fluorescencia granular para esta proteína en las células J86 estimuladas con poli I:C o en los cultivos inoculados con VHSV concuerda también con el descrito en células hepáticas de humano y rata, donde se colocaliza con peroxisomas (Collins et al. 2003). Sin embargo, los resultados de inmunofluorescencia no concuerdan con los pequeños, pero significativos, cambios observados en la expresión del gen *iNOS* en las células J86 tras la inoculación con VHSV, en los que se observó una disminución significativa de su expresión. Estas discrepancias podrían explicarse por la existencia de un pico de expresión del gen *iNOS* a tiempos más tempranos de las 24 horas, como se ha descrito en cultivos primarios de macrófagos de trucha arcoíris estimulados con poli I:C en los que el pico de expresión génica de iNOS se producía a las 4 horas (Fierro-Castro 2009; Fierro-Castro et al. 2013).

En cuanto a la inmunodetección de la proteína IL-8, nuestros resultados demuestran que la infección por VHSV, así como la estimulación con poli I:C, inducen un incremento de su expresión frente a los controles, lo que expresión ha sido también descrito en el bazo y pronefros de truchas arcoíris infectadas con VHSV (Tafalla et al. 2005). Igualmente, el patrón de expresión de IL-8 en las células J86, en forma de un granulado asociado a un polo nuclear, coincide con el descrito en células de cordón umbilical humano, en las cuales se asocia al aparato de Golgi (Wolff et al. 1997).

Respecto al significado de la expresión de los genes de mediadores de los procesos proinflamatorios tras la inoculación con VHSV, los resultados indican que se genera una respuesta inflamatoria, con sobreexpresión de los genes de IL-1β y TNFα y represión inicial de iNOS. A pesar de que el rol de IL-1β en las respuestas antivirales todavía no ha sido claramente determinado, se ha descrito un papel de esta citoquina en la promoción de la migración de leucocitos y la resistencia frente a VHSV (Peddie et al. 2001). Además, esta interleuquina es una inductora de otros mediadores inflamatorios y asociados a las respuestas inmunitarias en peces, como COX2, MHC-I, MHC-II, TNF, GCSF, microglobulina-β2, CD20, IRF4, TLR1, tanto *in vivo* como *in vitro* (Secombes et al. 2011; Zou and Secombes, 2011).

En cuanto al TNFα no hemos encontrado resultados en la bibliografía del efecto de la exposición a o infección por VHSV u otros rhabdovirus de peces en la expresión de este gen en líneas celulares de peces. Sin embargo, se ha descrito el efecto de la exposición a TNFα recombinante sobre la susceptibilidad a rhabdovirus, *in vivo* e *in vitro*, de forma que en dos modelos distintos (pez cebra *in vivo* y la línea ZF4 de embrión de *D. rerio*) este factor induce la expresión de genes de la respuesta inmunitaria innata, pero aumenta la susceptibilidad a la infección por SVCV (Roca et

al. 2008), mientras que en la línea EPC tiene un efecto protector frente a la infección por VHSV (Kim and Kim, 2013).

Se ha sugerido que el diferente efecto que el TNFα tiene en la susceptibilidad a VHSV o SVCV puede deberse a la existencia de diferentes mecanismos de interacción entre estos dos rhabdovirus y la vía de señalización del TNFα (Kim and Kim, 2013), lo que también podría explicar nuestros resultados en la línea J86, ya que existen marcadas diferencias en la expresión del gen *TNFα* tras la inoculación con VHSV o exposición a poli I:C. En este sentido, se ha demostrado que el reconocimiento de virus RNA en peces puede suceder a través del receptor MDA5 (*melanoma-differentiation-associated gene 5*), que reconoce RNAs bicatenarios largos (más de 2 kb), como poli I:C, mientras que la helicasa RIG-I detecta RNAs bicatenarios cortos (hasta 1 kb) y algunos RNAs monocatenarios (Zou et al. 2009).

En cuanto al significado de la modulación de iNOS, aunque *in vivo* la infección por VHSV induce su sobreexpresión en tejidos de trucha arcoíris (Tafalla et al. 2005), en la línea celular RTS-11 la infección por VHSV no induce la expresión de iNOS a 24 ni a 48 horas (Tafalla et al. 2008). Sin embargo, nuestros resultados en la línea J86 demuestran que VHSV reprime la expresión génica de iNOS a las 24 horas, pero no la producción de esta proteína. La función de iNOS se ha relacionado con respuestas proinflamatorias y microbicidas y el óxido nítrico inhibe el ciclo de replicación viral en macrófagos de mamíferos (Benencia and Courreges, 1999; Kreil and Eibl, 1996; Lin et al. 1997; Takhampunya et al. 2006), pero su función en las células J86, derivadas del tegumento, queda por aclarar en ulteriores estudios.

El papel de las quimioquinas en la defensa antiviral parece ser la atracción de diferentes subpoblaciones de leucocitos al punto de infección (Alejo and Tafalla, 2011; Montero et al. 2011b). Tras la inoculación con VHSV las células J86 mostraron sobreexpresión mantenida a 24 y 48 horas de IL-8, CK10 y CK12, y una sobreexpresión inicial de CK9 seguida de una marcada represión a las 48 hora, lo que coincide sustancialmente con lo descrito *in vivo* en truchas arcoíris infectadas por VHSV, en las que se produce una marcada sobreexpresión de CK10 y CK12 en las bases de las aletas a las 72 horas posinfección, pero no de CK9 y pequeña de IL-8 (Montero et al. 2011a). Esos datos, junto con la expresión basal de CK9 y su no modulación por la infección con VHSV, indican que la línea J86 retiene características propias del tegumento y apoyan que la regulación de la expresión génica de quimioquinas tras la infección viral es tejido específica (Montero et al. 2011a).

A manera de conclusión de este apartado, nuestros resultados demuestran que la línea celular de aleta J86 expresa genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata y que se han descrito como factores importantes en la respuesta temprana del

tegumento, particularmente de la base de la aletas de *O. mykiss*, tales como mediadores antivirales (IFN-I, Mx), citoquinas y factores proinflamatorios (IL-1β, TNFα, iNOS), y quimioquinas (IL-8, CK9, CK10, CK12) en condiciones basales. Además, la susceptibilidad a la infección por VHSV y la aparente resistencia a IPNV, junto con el hecho de responder al PAMP de tipo viral poli I:C y a la inoculación por VHSV modulando la expresión de esos mediadores, justifican nuestra hipótesis de que esta línea, y probablemente otras derivadas de aletas obtenidas utilizando nuestra metodología, pueda ser útil como modelo experimental para analizar la respuesta inmunitaria temprana en las barreras mucosas y el rol de las células de la piel en las infecciones virales, alternativo a los estudios *in vivo*.

En cuanto al apartado número tres de los indicados al comienzo de esta discusión general y en relación con el tercer objetivo de la Tesis, dirigido a explorar el uso de los cultivos de aleta para estudiar las respuestas a vacunas DNA anti-VHSV y, en consecuencia, su mejora, abordamos seguidamente el análisis de la posibilidad de transfectar a las células J86 con vectores que codificasen genes exógenos.

Utilizando un vector conteniendo el gen de la proteína GFP, bajo el control del promotor CMV, y diversos métodos y reactivos de transfección (Lipofectamina LTX, Fugene o XtremeGENE HP) demostramos que las células J86 se transfectan mejor con Lipofectamina, tal como revelaba el análisis de microscopía de fluorescencia, pero aún así con muy baja eficiencia. Estos resultados contrastan con los obtenidos en otros modelos que usan líneas celulares de peces, en los cuales las mejores eficiencias de transfección se obtuvieron con Fugene (López et al. 2001; Rocha et al. 2005) o con XtremeGENE HP (Sandbichler et al. 2013).

Esas diferencias podrían explicarse atendiendo a las diferentes proporciones de lípidos saturados que se encuentran entre las membranas plasmáticas de peces y de mamíferos y, en consecuencia, al efecto de la temperatura en la rigidez de dichas membranas, que además aumenta según disminuye la temperatura (Hazel, 1979; Roy et al. 1997). De esta forma, a la temperatura de 18°C, utilizada para incubar las células de salmónidos, la membrana formaría una barrera a la penetración de DNA cuando se utilizan agentes como Fugene o XtremeGENE HP (Lopez et al. 2001), mientras que la acción de la Lipofectamina, formado por lípidos catiónicos, se vería menos afectada por la temperatura.

Para intentar mejorar la eficiencia de la transfección, se analizó el efecto del uso de dos promotores distintos, MCV1.4 o el promotor de β-actina de carpa (plásmido pAE6), combinado con una nueva técnica de transfección por electroporación y usando la expresión de GFP como marcador. El sistema Neon Transfection (Invitrogen), que combina electroporación con agentes químicos no declarados,

produjo eficiencias de transfección en las células J86 mucho mayores que cuando se utilizaba Lipofectamina. Además, las células de los cultivos transfectados con pMCV1.4-GFP mostraron una proporción de células transfectadas (30%) y una fluorescencia más intensa que las de los cultivos transfectados con pAE6-GFP.

CMV ha sido descrito como un promotor más eficiente para inducir la expresión de GFP en líneas celulares derivadas de órganos de peces con un componente epitelial, particularmente aletas (Ku et al. 2010), o fibroblástico, como las derivadas del bazo (Qin et al. 2006) o el timo (Chaudhary et al. 2013), con valores de poblaciones transfectadas semejantes al encontrado por nosotros (30% – 35%). Por el contrario, en cultivos primarios de pronefros de *O. mykiss* (Ortega-Villaizán et al. 2012) y en la línea celular EPC (Brocal et al. 2006) el promotor de β-actina de carpa fue más eficiente para la expresión de GFP que el promotor CMV. Aunque en principio podría pensarse que los promotores de genomas de peces deberían ser más eficientes que los de origen viral o de mamífero para inducir la expresión génica en células o animales transgénicos de esta clase de Vertebrados, lo cierto es que ello depende del gen que va a expresarse (Du et al. 1992; Dunham et al. 2002; Hwang et al. 2003), así como del tipo celular en el que se exprese (Brocal et al. 2006; Ruiz et al. 2008).

De forma similar, hemos comprobado que la línea celular J86 es capaz de expresar gpG de VHSV y que dicha expresión está también modulada por el tipo de promotor utilizado y la variante de proteína codificada, lo que demostramos utilizando transfecciones con las construcciones pAE6-Gvhsv y pcDNA3-vhsvG (este último con el promotor CMV). Además, la gpG se expresa en la membrana de estas células y retiene su funcionalidad, como demostramos mediante citometría de flujo y el ensayo de fusión celular a bajo pH (Estepa and Coll, 1997; Mas et al. 2004). La retención de esta función de la gpG es de interés para para inducir una respuesta inmunitaria eficaz tras la vacunación (Béarzotti et al. 1995).

De forma semejante a lo encontrado para la expresión de GFP, el análisis mediante citometría de flujo demostró que la transfección con la construcción pcDNA3-vhsvG producía un porcentaje más alto de células que expresaban gpG (37%) que con pAE6-Gvhsv (4%). Este mismo fenómeno se ha descrito en estudios *in vitro* realizados para evaluar las eficiencias de diferentes construcciones plasmídicas para expresar la gpG de VHSV en la línea celular EPC, en los cuales la eficiencia de transfección de la construcción pMCV1.4-Gvhsv, estimada por citometría de flujo, fue mayor que la de pAE6-Gvhsv (Chico et al. 2009; Ruiz et al. 2008).

Finalmente y una vez comprobado que las células de la línea celular J86 de aleta expresan formas funcionales, en cuanto a la fusión de membranas plasmáticas, de gpG tras la transfección con vectores codificantes de esa glucoproteína de VHSV, lo

cual es un requisito importante, si no necesario, para la obtención de vacunas DNA efectivas (Heppell et al. 1998), procedimos a analizar el efecto de esa expresión de gpG sobre la modulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata (Mx, IL-1β, TNFα, IL-8, MHC-I) en los cultivos transfectados.

La transfección con pAE6-Gvhsv indujo en las células J86 la sobreexpresión de Mx, MHC-I e IL-1β, mientras que con pcDNA3-vhsvG no hubo cambios significativos para ninguno de los genes. Además, el efecto de la transfección con pAE6-Gvhsv en la expresión de los genes de Mx e IL8 fue significativamente mayor que el producido con el vector vacío (pAE6). Estos resultados concuerdan, en general, con el incremento de la expresión génica de mediadores inmunitarios *in vitro* reportada en estudios semejantes, incluyendo IL-1β y TNFα y, particularmente, Mx en líneas celulares de peces transfectadas para la expresión de gpG, bien con pAE6-Gvhsv, tales como la línea celular RTG-2 (Ortega-Villaizán et al. 2011) o cultivos primarios de pronefros de *O. mykiss* (Ortega-Villaizán et al. 2012), bien con pcDNA3-vhsvG en la línea celular transgénica RTG-P1, en la cual la expresión de luciferasa es un marcador de la producción de Mx y de la liberación de INF-I (Acosta et al. 2006) o bien con pMCV1.4-Gvhsv en RTG-2 (Martínez-López et al. 2014).

El perfil de modulación de la expresión de esos genes inmunitarios en las células J86 transfectadas para la expresión de gpG, así como los descritos en las otras líneas celulares indicadas en el párrafo anterior, concuerda con los resultados obtenidos en vacunaciones experimentales con vacunas DNA anti-VHSV *in vivo* de alevines de *O. mykiss* y de salmón atlántico (Acosta et al. 2005), así como de trucha arcoíris adulta (Chico et al. 2009; Cuesta and Tafalla, 2009; Martínez-Alonso et al. 2011; McLauchlan et al. 2003), lo que apoya claramente la validez que estos sistemas de ensayo *in vitro* pueden tener como modelos para el estudio y mejora de vacunas DNA en peces.

Así, tal vez los resultados más interesantes de esta parte del estudio estriben en las diferencias observadas entre ambas construcciones plasmídicas en cuanto a los cambios de expresión génica de los factores inmunitarios. En nuestro caso, la transfección con pAE6-Gvhsv indujo los mayores incrementos en la expresión de Mx, MHC-I, IL-1β y, de forma no tan clara, TNFα, aunque con este vector se obtenía una menor eficiencia de transfección que con pcDNA3-vhsvG. Por tanto, no parece haber una correlación entre el número de células que expresan gpG y la intensidad de la expresión con la inducción de una respuesta antiviral *in vitro*. Esto podría explicarse por dos motivos: a) la forma de gpG expresada en la membrana difiere entre una construcción y la otra, como se ha descrito en alevines de *O. mykiss* tras la vacunación con pAE6-Gvhsv o con pMCV1.4-Gvhsv (Chico et al. 2009); o b) que un exceso de

gpG en el cultivo origine procesos de represión, bien a nivel génico o bien por bloqueo de la señalización intracelular (Brzózka et al. 2006).

Además, existían también diferencias en expresión de MHC-I entre las células J86 transfectadas con una construcción plasmídica u otra, de forma que pAE6-Gvhsv indujo significativamente la expresión de MHC-I, mientras que la construcción pcDNA3-vhsvG no produjo cambios. Este mismo fenómeno se ha descrito en truchas arcoíris vacunadas con una construcción conteniendo el promotor CMV (Chaves-Pozo et al. 2010a; Martínez-Alonso et al. 2011). En nuestro modelo la no sobreexpresión de MHC-I en las células J86 transfectadas con pcDNA3-vhsvG puede correlacionarse también con la no inducción de la expresión de Mx en las mismas, lo que sugiere que la transfección con ese vector no activa eficientemente la vía de INF-I, el cual es un inductor de la expresión de MHC-I (Zou and Secombes, 2011).

Apoyándonos en lo expuesto, las diferencias observadas en la expresión génica de mediadores inmunitarios importantes en la defensa antiviral innata entre las células J86 transfectadas con pAE6-Gvhsv o con pcDNA3-vhsvG podrían atribuirse, en gran medida, a que en este último caso no se activan los primeros procesos proinflamatorios, que son mediados por IL-1, ni tampoco la respuesta antiviral más inmediata, mediada por INF-I. La razón de esto es una cuestión a estudiar en futuros trabajos, pero los resultados dan más soporte al uso de cultivos celulares órgano-específicos, como el desarrollado en esta Tesis, para establecer sistemas *in vitro* para el análisis y optimización de vacunas DNA, en este caso aplicables al modelo trucha arco iris/VHSV.

Conclusiones

Conclusiones

1. El método desarrollado en esta Tesis para la producción de cultivos de aleta a partir de explantes y su amplificación por subcultivos, aún en un número limitado de pases, constituye una metodología útil para la obtención de líneas celulares de piel de *O. mykiss*. Aunque algunas de las líneas celulares de aleta no progresaron más allá del tercer o cuarto pase, estas células pueden mantenerse a largo plazo por criopreservación, lo que facilita su posterior uso para ensayos funcionales.

2. Las líneas celulares de aleta de *O. mykiss*, que hemos obtenido por el método de explantes, expresan genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata de interés para su utilización como modelo *in vitro* para el estudio de la respuesta inmunitaria de la piel frente a agentes infecciosos.

3. Una de las líneas celulares (J86), obtenida de los cultivos de aleta, expresa de forma basal, es decir sin estimulación previa, genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata y que se han descrito como factores importantes en la respuesta antiviral temprana del tegumento, particularmente de la base de la aletas de *O. mykiss*, tales como mediadores antivirales, citoquinas y factores proinflamatorios, y quimioquinas.

4. La susceptibilidad de la línea J86 a la infección por VHSV y su aparente resistencia a IPNV, junto con el hecho de responder al PAMP de tipo viral poli I:C, permite que pueda ser utilizada como modelo experimental, alternativo a los estudios *in vivo* , para analizar la respuesta inmunitaria temprana y el rol de las células de la piel en las infecciones virales.

5. La línea celular J86 de aleta puede ser utilizada para la expresión de genes exógenos de interés mediante la transfección con diversos vectores y promotores. Para ello, la transfección más eficientemente se obtuvo usando un sistema de electroporación.

6. La transfección de la línea J86 con diversos vectores codificantes de gpG de VHSV, bajo distintos promotores, resulta en la expresión de dicha proteína en la membrana de forma funcional en cuanto a la inducción de fusión de membranas en cultivos celulares, un marcador de la actividad biológica de la gpG en la infección viral.

7. Los cultivos de la línea J86 transfectados para la expresión de gpG de VHSV presentan fenómenos de modulación de la expresión de genes que reflejan respuestas antivirales innatas, lo que abre la posibilidad de utilizar este tipo de líneas celulares derivadas de aleta para realizar estudios *in vitro* sobre la protección conferida por vacunas DNA experimentales contra rhabdovirus.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

Acosta F, Petrie A, Lockhart K, Lorenzen N, and Ellis AE. 2005. "Kinetics of Mx Expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Parr in Response to VHS-DNA Vaccination." *Fish & Shellfish Immunology* 18(1): 81–89.

Acosta F, B Collet, N Lorenzen, and AE Ellis. 2006. "Expression of the Glycoprotein of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) on the Surface of the Fish Cell Line RTG-P1 Induces Type 1 Interferon Expression in Neighbouring Cells." *Fish & Shellfish Immunology* 21(3): 272–78.

Adelmann M, B Köllner, SM Bergmann, U Fischer, B Lange, W Weitschies, PJ Enzmann, and D Fichtner. 2008. "Development of an Oral Vaccine for Immunisation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) against Viral Haemorrhagic Septicaemia." *Vaccine* 26(6): 837–44.

Adomako M, St-Hilaire S, Zheng Y, Eley J, Marcum RD, Sealey W, Donahower BC, Lapatra S, and Sheridan PP. 2012. "Oral DNA vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against infectious hematopoietic necrosis virus using PLGA [Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid)] nanoparticles." *Journal of Fish Diseases* 35(3): 203-14.

Ahmadi N, A Oryan, M Akhlaghi, and A Hosseini. 2013. Tissue distribution of infectious pancreatic necrosis virus serotype Sp in naturally infected cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): an immunohistochemical and nested-PCR study. *Journal of Fish Diseases* 36(7): 629–37.

Ahne W, Bjorklund HV, and Essbauer S. 2002. Spring viremia of carp (SVC). *Diseases of Aquatic Organisms* 52(3): 261–72.

Akimenko MA, M Marí-Beffa, J Becerra, and J Géraudie. 2003. "Old Questions, New Tools, and Some Answers to the Mystery of Fin Regeneration." *Developmental Dynamics* 226(2): 190–201.

Albertini AAV, E Baquero, A Ferlin, and Y Gaudin. 2012. "Molecular and Cellular Aspects of Rhabdovirus Entry." *Viruses* 4: 117–39.

Alejo A, and C Tafalla. 2011. "Chemokines in Teleost Fish Species." *Developmental & Comparative Immunology* 35(12): 1215–22.

Alt E, Y Yan, S Gehmert, Y-H Song, A Altman, S Gehmert, D Vykoudal, and X Bai. 2011. "Fibroblasts Share Mesenchymal Phenotypes with Stem Cells, but Lack Their Differentiation and Colony-Forming Potential." *Biology of the Cell* 103(4): 197–208.

Álvarez Fernández F. 1992. "Inmunobiología de salmónidos. Análisis morfológico de los mecanismos de defensa de *Salmo trutta* contra la infección por *Saprolegnia sp*. Estudio del tegumento y los órganos linfoides." Tesis Doctoral. Universidad de León, España.

Amend DF. 1976. "Prevention and control of viral disease of salmonids." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33: 1059–66.

Amend DF, and Smith L. 1975. "Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout: hematological and blood chemical changes in moribund fish." *Infection and Immunity* 11(1): 171-79.

Anderson DP. 1990. "Immunological indicators: Effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks." *American Fisheries Society Symposium* 8: 38-50.

Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J, and Leong JA. 1996. "Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus." *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5(2): 114–22.

Aoki M, M Kondo, K Kawai, and SI Oshima. 2005. "Experimental Bath Infection with *Flavobacterium psychrophilum*, Inducing Typical Signs of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Fry Syndrome." *Diseases of Aquatic Organisms* 67(1-2): 73–79.

Aoki T, Takano T, Santos MD, Kondo H, and Hirono I. 2008. "Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: review and future perspectives." *In*: Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress 2008. pp. 263-276, Eds. K. Tsukamoto, T. Kawamura, T. Takeuchi, TD Beard, and MJ Kaiser. Terrapub.

Avunje S, WS Kim, MJ Oh, I Choi, and SJ Jung. 2012. "Temperature-Dependent Viral Replication and Antiviral Apoptotic Response in Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV)-Infected Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*)." *Fish & Shellfish Immunology* 32(6): 1162–70.

Baggiolini M, and I Clark-lcwisb. 1992. "Interleukin-8, a Chemotactic and Inflammatory Cytokine." *Federation of European Biochemical Societies* 307(I): 97–101.

Barka T, and PJ Anderson. 1962. "Histochemical Methods for Acid Phosphatase Using Hexazonium Pararosanilin as Coupler." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 10: 741–53.

Bearzotti M, B Delmas, A Lamoureux, AM Loustau, S Chilmonczyk, and M Bremont. 1999. "Fish Rhabdovirus Cell Entry Is Mediated by Fibronectin." *Journal of Virology* 73(9): 7703–9.

Bearzotti M, AF Monnier, P Vende, J Grosclaude, P De Kinkelin, and A Ben-mansour. 1995. "The Glycoprotein of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV): Antigenicity and Role in Virulence." *Veterinary Research* 26: 413–22.

Bearzotti M, E Perrot, C Michard-Vanhee, G Jolivet, J Attal, MC Theron, C Puissant, M Dreano, JJ Kopchick, R Powell, F Gannon, LM Houdebine, and D Chourrout. 1992. "Gene Expression Following Transfection of Fish Cells." *Journal of Biotechnology* 26(2-3): 315–25.

Bejar J, JJ Borrego, and MC Alvarez. 1997. "A Continuous Cell Line from the Cultured Marine Fish." *Aquaculture* 150: 143–53.

Benencia F, and MC Courreges. 1999. "Nitric Oxide and Macrophage Antiviral Extrinsic Activity." *Immunology* 98(3): 363–70.

Bengten E, SM Quiniou, TB Stuge, T Katagiri, NW Miller, L Clem, GW Warr, and M Wilson. 2002. "The IgH locus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus,* contains multiple constant region gene sequences: different genes encode heavy chains of membrane and secreted IgD." *The Journal of Immunology* 169(5): 2488- 97.

Biacchesi, S., and Brémont, M. 2014. "Vaccination against Viral Hemorrhagic Septicemia and Infectious Hematopoietic Necrosis." *In*: Fish Vaccination, pp. 289–302. Editors: R.Gudding, A. Lillehaug, and Ø. Eversen. John Wiley & Sons, Ltd.

Biacchesi S, MI Thoulouze, M Béarzotti, Y-X Yu, and M Brémont. 2000. "Recovery of NV Knockout Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Expressing Foreign Genes." *Journal of Virology* 74(23): 11247–53.

Biering E, and K Salonius. 2014. "DNA Vaccines." *In*: Fish Vaccination, vol 2. Eds. R Gudding, A Lillehaug, and Ø Evensen. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, UK

Bols NC. 1991. "Biotechnology and Aquaculture: The Role of Cell Cultures." *Biotechnology Advances* 9(1): 31–49.

Bols NC, and Lee LE. 1991. "Technology and Uses of Cell Cultures from the Tissues and Organs of Bony Fish." *Cytotechnology* 6(3): 163–87.

Boudinot P, M Blanco, P De Kinkelin, and A Benmansour. 1998. "Combined DNA Immunization with the Glycoprotein Gene of Viral Hemorrhagic Septicaemia Virus and Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Induces Double-Specific Protective Immunity and Nonspecific Response in Rainbow Trout." *Virology* 249(2): 297–306.

Bowden TJ. 2008. "Modulation of the Immune System of Fish by Their Environ-ment." *Fish & Shellfish Immunology* 25(4): 373–83.

Bowden TJ, KD Thompson, AL Morgan, RML Gratacap, and S Nikoskelainen. 2007. "Seasonal Variation and the Immune Response: A Fish Perspective." *Fish & Shellfish Immunology* 22(6): 695–706.

Brocal I, A Falco, V Mas, A Rocha, L Perez, JM Coll, and A Estepa. 2006. "Stable Expression of Bioactive Recombinant Pleurocidin in a Fish Cell Line." *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(6): 1217–28.

Brubacher JL, Secombes CJ, Zou J, and Bols NC. 2000. "Constitutive and LPS- induced gene expression in a macrophage-like cell line from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Developmental and Comparative Immunology* 24: 565- 574.

Brzózka K, S Finke, and KK Conzelmann. 2006. "Inhibition of Interferon Signaling by Rabies Virus Phosphoprotein P: Activation-Dependent Binding of STAT1 and STAT2." *Journal of Virology* 80(6): 2675–83.

Bubenshchikova E, E Kaftanovskaya, T Adachi, H Hashimoto, M Kinoshita, and Y Wakamatsu. 2013. "A Protocol for Adult Somatic Cell Nuclear Transfer in Medaka

Fish (*Oryzias latipes*) with a High Rate of Viable Clone Formation." *Cellular Reprogramming* 15(6): 520–30.

Burstone MS. 1958. "Histochemical Comparison of Naphtol AS-Phosphates for the Demonstration of Phosphatases." *J. Nat. Cancer Inst*. 20: 601–15.

Caipang CM, I Hirono, and T Aoki. 2003. "*In vitro* Inhibition of Fish Rhabdoviruses by Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx." *Virology* 317(2): 373–82.

Campos-Pérez JJ, M Ward, PS Grabowski, AE Ellis, and CJ Secombes. 2000. "The Gills are an Important Site of iNOS Expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) after Challenge with the Gram-Positive Pathogen *Renibacterium salmoninarum*." *Immunology* 99(1): 153-61.

Carracedo del Río B. 2003. "Caracterización de Cultivos Celulares Angiogénicos Obtenidos de Órganos Linfoides de Trucha Arco Iris, *Oncorhynchus mykiss*." Tesis Doctoral. Universidad de León, España.

Casadei E, Wang T, Zou J, González Vecino JL, Wadsworth S, and Secombes, CJ. 2009. "Characterization of three novel β-defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Molecular Immunology 46: 3358–3366

Castro R, D Bernard, MP Lefranc, A Six, A Benmansour, and P Boudinot. 2011. "T Cell Diversity and TcR Repertoires in Teleost Fish." *Fish & Shellfish Immunology* 31(5): 644–54.

Castro R, Jouneau L, Pham HP, Bouchez O, Giudicelli V, Lefranc MP, and Boudinot P. 2013. "Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection." *PLoS Pathogens* 9(1): e1003098. doi:10.1371/journal.ppat.1003098

Castro R, S Martínez-Alonso, U Fischer, N Álvarez de Haro, V Soto-Lampe, T Wang, CJ Secombes, N Lorenzen, E Lorenzen, and C Tafalla. 2014. "DNA Vaccination against a Fish Rhabdovirus Promotes an Early Chemokine-Related Recruitment of B Cells to the Muscle." *Vaccine* 32(10): 1160–68.

Chang CI, YA Zhang, J Zou, P Nie, and CJ Secombes. 2006. "Two Cathelicidin Genes Are Present in Both Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss)* and Atlantic Salmon (*Salmo salar*)." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(1): 185–95.

Chaudhary DK, N Sood, TR Swaminathan, G Rathore, PK Pradhan, NK Agarwal, and JK Jena. 2013. "Establishment and Characterization of an Epithelial Cell Line from Thymus of *Catla catla* (Hamilton, 1822)." *Gene* 512(2): 546–53.

Chaves-Pozo E, A Cuesta, and C Tafalla. 2010a. "Antiviral DNA Vaccination in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Affects the Immune Response in the Ovary and Partially Blocks Its Capacity to Support Viral Replication *in Vitro*." *Fish & Shellfish Immunology* 29(4): 579–86.

Chaves-Pozo E, J Montero, A Cuesta, and C Tafalla. 2010b. "Viral Hemorrhagic Septicemia and Infectious Pancreatic Necrosis Viruses Replicate Differently in Rainbow Trout

Gonad and Induce Different Chemokine Transcription Profiles." *Developmental and Comparative Immunology* 34(6): 648–58.

Chaves-Pozo E, Guardiola FA, Meseguer J, Esteban MA, and Cuesta A. 2012. "Nodavirus infection induces a great innate cell-mediated cytotoxic activity in resistant, gilthead seabream, and susceptible, European sea bass, teleost fish." *Fish & Shellfish Immunology*, 33(5): 1159–66.

Chen SL, GC Ren, ZX Sha, and CY Shi. 2004. "Establishment of a Continuous Embryonic Cell Line from Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* for Virus Isolation." *Diseases of Aquatic Organisms* 60(3): 241–46.

Chen Y-M, T-Yu Wang, and T-Y Chen. 2014. "Immunity to Betanodavirus Infections of Marine Fish." *Developmental and Comparative Immunology* 43(2): 174–83.

Chico V, A Martínez-López, M Ortega-Villaizan, A Falco, L Pérez, JM Coll, and A Estepa. 2010. "Pepscan Mapping of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Glycoprotein G Major Lineal Determinants Implicated in Triggering Host Cell Antiviral Responses Mediated by Type I Interferon." *Journal of Virology* 84(14): 7140–50.

Chico V, M Ortega-Villaizan, A Falco, C Tafalla, L Perez, JM Coll, and A Estepa. 2009. "The Immunogenicity of Viral Haemorragic Septicaemia Rhabdovirus (VHSV) DNA Vaccines Can Depend on Plasmid Regulatory Sequences." *Vaccine* 27(13): 1938–48.

Choi MK, Moon CH, Ko MS, Lee UH, Cho WJ, Cha SJ, Do JW, Heo GJ, Jeong SG, Ham YS, Marmache A, Bremont M, Kurath G, and Park JW. 2011. "A nuclear localization of the infectious haematopoietic necrosis virus NV protein is necessary for optimal viral growth." *PLoS One* 6(7): e22362. (doi:10.1371/journal.pone.0022362)

Clark TG, and Cassidy-Hanley D. 2005. "Recombinant subunit vaccines: potentials and constraints." *In:* Progress in Fish Vaccinology. *Developmental Biology*, vol. 121, pp.153–63, (ed) PJ Midtlyng.

Collet B. 2014. "Innate Immune Responses of Salmonid Fish to Viral Infections." *Developmental and Comparative Immunology* 43(2): 160–73.

Collet B, P Boudinot, A Benmansour, and CJ Secombes. 2004. "An Mx1 Promoter-Reporter System to Study Interferon Pathways in Rainbow Trout." *Developmental and Comparative Immunology* 28(7-8): 793–801.

Collet B, and Secombes CJ. 2002. "Type I-interferon signalling in fish." *Fish & Shellfish Immunology* 12(5): 389-97.

Collins JL, Y Vodovotz, C Hierholzer, R Villavicencio, S Liu, S Alber, D Gallo, DB Stolz, SC Watkins, A Godfrey, W Gooding, E Kelly, AB Peitzman, and TR Billiar. 2003. "Characterization of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Rat and Human Liver during Hemorrhagic Shock." *Shock* (Augusta, Ga, USA) 19(2): 117–22.

Corbett PA, CK King, JS Stark, and JA Mondon. 2014. "Direct Evidence of Histopathological Impacts of Wastewater Discharge on Resident Antarctic Fish (*Trematomus bernacchii*) at Davis Station, East Antarctica." *Marine Pollution Bulletin* 87(1-2): 48–56.

Cortez-San Martin M, Villanueva RA, Jashés M, and Sandino AM. 2009. "Molecular Characterization of IPNV RNA Replication Intermediates During the Viral Infective Cycle." *Virus Research* 144: 344-349.

Cortez-San Martin M, A Rivas-Aravena, S Guajardo, MT Castillo, M Jashes, M Sandino, and E Spencer. 2012. "Simultaneous Detection of the IPN and ISA Viruses in Outbreaks of Clinical Disease and Mortality in Farmed Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., in Chile." *Journal of Fish Diseases* 35(6): 461–65.

Couve E, Kiss J, and Kuznar J. 1992. "Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHSE-214 cells." *Cell Biology International Reports* 16(9): 899-906.

Covello G, K Siva, V Adami, and MA Denti. 2014. "An Electroporation Protocol for Efficient DNA Transfection in PC12 Cells." *Cytotechnology* 66(4): 543–53.

Crane M, and A Hyatt. 2011. "Viruses of Fish: An Overview of Significant Pathogens." *Viruses* 3(11): 2025–46.

Cuesta A, and C Tafalla. 2009. "Transcription of Immune Genes upon Challenge with Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) in DNA Vaccinated Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Vaccine* 27(2): 280–89.

Cutrin JM, Olveira JG, Barja JL, and Dopazo CP. 2000."Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish, and other reservoirs in Northwestern Spain." *Applied and Environmental Microbiology* 66(2): 839–843.

Da Poian AT, FA Carneiro, and F Stauffer. 2005. "Viral Membrane Fusion: Is Glycoprotein G of Rhabdoviruses a Representative of a New Class of Viral Fusion Proteins?" *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 813–23.

Dale OB, I Ørpetveit, TM Lyngstad, S Kahns, HF Skall, NJ Olesen, and BH Dannevig. 2009. "Outbreak of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) in Seawater-Farmed Rainbow Trout in Norway Caused by VHS Virus Genotype III." *Diseases of Aquatic Organisms* 85(2): 93–103.

Danilova N, Bussmann J, Jekosch K, and Steiner LA. 2005. "The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z." *Nature Immunology* 6(3): 295–302.

Das BK, KK Nayak, M Fourrier, B Collet, M Snow, and AE Ellis. 2007. "Expression of Mx Protein in Tissues of Atlantic Salmon Post-Smolts. An Immunohistochemical Study." *Fish & Shellfish Immunology* 23(6): 1209–17.

De Kinkelin P, and Bearzotti M. 1981. "Immunization of rainbow trout against viral hemorrhagic septicaemia (VHS) with a thermoresistant variant of the virus." *Developmental in Biological Estandardization* 49: 431-39.

De Kinkelin P, M Bearzotti, and J Bernard. 1980. "Viral Hemorrhagic Septicaemia of Rainbow Trout: Selection of a Thermoresistant Virus Variant and Comparison of Polypeptide Synthesis with the Wild-Type Virus Strain." *Journal of Virology* 36(3): 652–58.

De Kinkelin P, Dorson M, and Hattenberger-Baudouy AM. 1982. "Interferon synthesis on trout and carp after viral infection." *Developmental & Comparative Immunology* (Suppl.) 2(1): 167-74.

De las Heras I, S Rodríguez Saint-Jean, and SI Pérez-Prieto. 2008. "Salmonid Fish Viruses and Cell Interactions at Early Steps of the Infective Cycle." *Journal of Fish Diseases* 31(7): 535–46.

DeWitte-Orr SJ, JAC Leong, and NC Bols. 2007. "Induction of Antiviral Genes, Mx and Vig-1, by dsRNA and Chum Salmon Reovirus in Rainbow Trout Monocyte/macrophage and Fibroblast Cell Lines." *Fish & Shellfish Immunology* 23(3): 670–82.

Diago ML. 1996. "Estudio *in vitro* de la hematopoyesis de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*. Establecimiento de una línea celular de estroma de pronefros. Caracterización y análisis de su capacidad hematopoyética". Tesis Doctoral. Universidad de León, España.

Dijkstra J.M., Fischer U., Sawamoto Y., Ototake M., Nakanishi T. 2001. "Exogenous antigens and the stimulation of MHC class I restricted cell-mediated cytotoxicity: possible strategies for fish vaccines." *Fish & Shellfish Immunology* 11(6): 437-58.

Dobos P. 1995. "The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)." *Annual Review of Fish Diseases* 5: 25–54.

Du SJ, ZY Gong, GL Fletcher, MA Shears, MJ King, DR Idler, and CL Hew. 1992. "Growth Enhancement in Transgenic Atlantic Salmon by the Use of an 'All Fish' Chimeric Growth Hormone Gene Construct." *Biotechnology* (NY) 10(2): 176–81.

Dunham RA, GW Warr, A Nichols, PL Duncan, B Argue, D Middleton, and H Kucuktas. 2002. "Enhanced Bacterial Disease Resistance of Transgenic Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Possessing Cecropin Genes." *Marine Biotechnoly* 4(3): 338–44.

EFSA. 2013a. Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). "Guidance of the Scientific Committee/Scientific Panel." pp.190. *EFSA Journal* 11(5): 3200 doi: 10.2903/j.efsa.2013.3200.

EFSA. 2013b. "Scientific advice on the suitability of data for the assessment of DNA integration into the fish genome of a Genetically Modified DNA plasmid-based veterinary vaccine." *EFSA Journal* 11(5): 3232 (doi:10. 2903/j.efsa.2013.3232).

Einer-Jensen K, L Delgado, E Lorenzen, G Bovo, O Evensen, S LaPatra, and N Lorenzen. 2009. "Dual DNA vaccination of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*) against to different rhabdoviruses, VHSV and IHNV, induces specific divalent protection." *Vaccine* 27(8): 1248–53.

Ellis AE. 2001. "Innate Host Defense Mechanisms of Fish against Viruses and Bacteria." *Developmental and Comparative Immunology* 25(8-9): 827–39.

Elsayed E, Faisal M, Thomas M, Whelan G, Batts W, and Winton J. 2006. "Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. " *Journal of Fish Diseases* 29(10): 611-19.

Encinas P, García-Valtanen P, Chinchilla B, Gómez-Casado E, Estepa A, and J Coll. 2013. "Identification of Multipath Genes Differentially Expressed in Pathway-Targeted Microarrays in Zebrafish Infected and Surviving Spring Viremia Carp Virus (SVCV) Suggest Preventive Drug Candidates. PLoS ONE 8(9): e73553. doi:10.1371/journal.pone.0073553

Enzmann P-J, D Fichtner, H Schütze, and G Walliser. 1998. "Development of vaccines against VHS and IHN: oral application, molecular marker and discrimination of vaccinated fish from infected populations." *Journal of Applied Ichthyology* 14(3-4): 179–83.

ESACUA. 2014. "Informe acuicultura 2014." Asociación Nacional de Acuicultura Continental. A Coruña, España.

Esteban MA. 2012. "An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin." *ISRN Immunology* 2012: 1–29.

Estepa A, and JM Coll. 1997. "Temperature and pH Requirements for Viral Haemorrhagic Septicemia Virus Induced Cell Fusion." *Diseases of Aquatic Organisms* 28: 185–89.

Estepa A, A Rocha, V Mas, L Pérez, JA Encinar, E Nuñez, A Fernández, JM González Ros, F Gavilanes, and JM Coll. 2001. "A Protein G Fragment from the Salmonid Viral Hemorrhagic Septicaemia Rhabdovirus Induces Cell-to-Cell Fusion and Membrane Phosphatidyl-serine Translocation at Low pH." *The Journal of Biological Chemistry* 276(49): 46268–75.

Estepa A, Thiry M, and Coll JM. 1994. Recombinant protein fragments from haemorrhagic septicaemia rhabdovirus stimulate trout leucocyte Anamnestic in vitro responses. *Journal of General Virology* 75(6): 1329–38.

Evensen Ø, and JAC Leong. 2013. "DNA Vaccines against Viral Diseases of Farmed Fish." *Fish & Shellfish Immunology* 35(6): 1751–58.

Falco A, V Chico, L Marroquí, L Pérez, M Coll, and A Estepa. 2008. "Expression and Antiviral Activity of a Beta-Defensin-like Peptide Identified in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST Sequences." *Molecular Immunology* 45(3): 757–65.

Falco A, P Encinas, S Carbajosa, A Cuesta, E Chaves-Pozo, C Tafalla, A Estepa, and JM Coll. 2009. "Transfection Improvements of Fish Cell Lines by Using Deacylated Polyethylenimine of Selected Molecular Weights." *Fish & Shellfish Immunology* 26(3): 559–66.

Falk K, Press CM, Landsverk T, and Dannevig BH. 1995. "Spleen and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) show histochemical changes early in the course of experimentally induced infectious salmon anaemia (ISA)." *Veterinary Immunology and Immunopathol*ogy 49(1-2): 115–26.

FAO. 2014. "El estado mundial de la pesca y la acuicultura." Informe SOFIA. Roma, Italia.

FEAP. 2014a. "Annual Report." Federation of European Aquaculture Producers.

FEAP. 2014b. "European aquaculture production report 2004-2013." Federation of European Aquaculture Producers.

Ferguson HW. 1989. "Gastrointestinal tract, pancreas and swim bladder." *In*: Systematic Pathology of Fish, pp.125–145, HW Ferguson (Ed.), Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

Fernández-Alonso M, F Álvarez, A Estepa, R Blasco, and JM Coll. 1999. "A Model to Study Fish DNA Immersion Vaccination by Using the Green Fluorescent Protein." *Journal of Fish Diseases* 22: 237–41.

Fernández-Alonso M., A Rocha, and JM Coll. 2001. "DNA Vaccination by Immersion and Ultrasound to Trout Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus." *Vaccine* 19(23-24): 3067–75.

Fierro-Castro C. 2009. "Utilización de líneas celulares de *Oncorhynchus mykiss* para el estudio de la acción y para la selección de agentes inmunoestimulantes utilizables en acuicultura". Tesis Doctoral. Universidad de León, España.

Fierro-Castro C, L Barrioluengo, P López-Fierro, BE Razquín, B Carracedo, and AJ Villena. 2012. "Fish Cell Cultures as *in Vitro* Models of pro-Inflammatory Responses Elicited by Immunostimulants." *Fish & Shellfish Immunology* 33(2): 389–400.

Fierro-Castro C, L Barrioluengo, P López-Fierro, BE Razquin, and AJ Villena. 2013. "Fish Cell Cultures as *in Vitro* Models of Inflammatory Responses Elicited by Immunostimulants. Expression of Regulatory Genes of the Innate Immune Response." *Fish & Shellfish Immunology* 35(3): 979–87.

Finstad OW, K Falk, M Løvoll, O Evensen, and E Rimstad. 2012. "Immunohistochemical Detection of Piscine Reovirus (PRV) in Hearts of Atlantic Salmon Coincide with the Course of Heart and Skeletal Muscle Inflammation (HSMI)". *Veterinary Research* 43(1): 27 (doi:10.1186/1297-9716-43-27).

Fischer U, Dijkstra JM, Aoyagi K, Xia C, Ototake M, and Nakanishi T. 2000. "MHC class I restricted cytotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." *Developmental & Comparative Immunology* 24: (Suppl. 1) S76.

Fischer U, EO Koppang, and T Nakanishi. 2013. "Teleost T and NK Cell Immunity." *Fish & Shellfish Immunology* 35(2): 197–206.

Fischer U, Utke K, Somamoto T, Köllner B, Ototake M, and Nakanishi T. 2006. "Cytotoxic activities of fish leucocytes." *Fish & Shellfish Immunology* 20(2): 209–26.

Flaño del Castillo E. 1995. "Establecimiento y caracterización de cultivos de trucha arco iris. Estudio *in vitro* de la infección con *Renibacterium salmoninarum*". Tesis Doctoral. Universidad de León, España.

Forlenza M, Fink IR, Raes G, and Wiegertjes GF. 2011. "Heterogeneity of macrophage activation in fish." *Developmental and Comparative Immunology* 35(12): 1246–55.

Freshney RI. 2000. "Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique." Edited by Wiley-Liss, New York, USA.

García I, A Galiana, A Falcó, A Estepa, and L Pérez. 2011. "Characterization of an Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) Virus Carrier Cell Culture with Resistance to Superinfection with Heterologous Viruses." *Veterinary Microbiology* 149(1-2): 48–55.

García-Valtanen P, MM Ortega-Villaizán, A Martínez-López, R Medina-Gali, L Pérez, S Mackenzie, A Figueras, JM Coll, and A Estepa. 2014a. "Autophagy-Inducing Peptides from Mammalian VSV and Fish VHSV Rhabdoviral G Glycoproteins (G) as Models for the Development of New Therapeutic Molecules." *Autophagy* 10(9): 1666–80.

García-Valtanen P, A Martínez-López, M Ortega-Villaizán, L Pérez, JM Coll, A Estepa. 2014b. "In Addition to Its Antiviral and Immunomodulatory Properties, the Zebrafish B-Defensin 2 (zfBD2) Is a Potent Viral DNA Vaccine Molecular Adjuvant." *Antiviral Research* 101: 136–47.

Garver KA, GS Traxler, LM Hawley, J Richard, JP Ross, and J Lovy. 2013. "Molecular Epidemiology of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) in British Columbia, Canada, Reveals Transmission from Wild to Farmed Fish." *Diseases of Aquatic Organisms* 104(2): 93–104.

Gaudin Y, WH Ruigrok, RM Knossow, and A Flamand. 1993. "Low-pH Conformational Changes of Rabies Virus Glycoprotein and Their Role in Membrane Fusion." *Journal of Virology* 67(3): 1365–72.

Gaudin Y, P De Kinkelin, and A Benmansour. 1999. "Mutations in the Glycoprotein of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus That Affect Virulence for Fish and the pH Threshold for Membrane Fusion." *Journal of General Virology* 80: 1221–29.

Glenney GW, PA Barbash, JA Coll, and WM Quartz. 2012. "Isolation and Molecular Characterization of a Novel Infectious Pancreatic Necrosis Virus Strain in Returning Atlantic Salmon, *Salmo salar,* from the Connecticut River, USA." *Journal of Aquatic Animal Health* 24(2): 63–72.

Goetz FW, JV Planas, and S MacKenzie. 2004. "Tumor Necrosis Factors." *Developmental & Comparative Immunology* 28(5): 487–97.

Gómez-Casado E, A Estepa, and JM Coll. 2011. "A Comparative Review on European-Farmed Finfish RNA Viruses and Their Vaccines." *Vaccine* 29(15): 2657–71.

González-Mariscal JA, Gallardo-Gálvez JB, Méndez T, Álvarez MC, and Béjar J. 2014. "Cloning and characterization of the Mx1, Mx2 and Mx3 promoters from gilthead seabream (*Sparus aurata*)." *Fish & Shellfish Immunology* 38(2): 311–17.

Goodwin AE, and Merry GE. 2011. "Mortality and carrier status of Bluegills exposed to viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVb at different temperatures." *Journal of Aquatic Animal Health* 23(2): 85–91.

Groocock GH, Getchell RG, Wooster GA, Britt KL, Batts WN, Winton JR, Casey RN, Casey JW, and Bowser PR. 2007. "Detection of viral hemorrhagic septicemia in round gobies in New York State (USA) waters of Lake Ontario and the St. Lawrence River." *Diseases of Aquatic Organisms* 76(3): 187-92.

Gurunathan S, CY Wu, BL Freidag, and RA Seder. 2000. "DNA Vaccines: A Key for Inducing Long-Term Cellular Immunity." *Current Opinion in Immunology* 12(4): 442–47.

Haller O, P Staeheli, and G Kochs. 2007. "Interferon-Induced Mx Proteins in Antiviral Host Defense." *Biochimie* 89(6-7): 812–18.

Harmache A, M Leberre, S Droineau, M Giovannini, and M Brémont. 2006. "Bioluminescence Imaging of Live Infected Salmonids Reveals That the Fin Bases Are the Major Portal of Entry for Novirhabdovirus." *Journal of Virology* 80(7): 3655–59.

Hartman JX, and Noga EJ. 1980. Channel catfish virus disease vaccine and method of preparation thereof and method of immunization therewith. *US Patent* No. 4.219.543.

Hazel JR. 1979. "Influence of Thermal Acclimation on Membrane Lipid Compo-sition of Rainbow Trout Liver." *The American Journal of Physiology* 236(1): 91–101.

Hedrick RP. 1998. "Relationships of the Host, Pathogen, and Environment: Implications for Diseases of Cultured and Wild Fish Populations." *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 107–11.

Helmick CM, JF Bailey, S LaPatra, and S Ristow. 1995. "The esophagus/cardiac stomach region: site of attachment and internalization of infectious hematopoietic necrosis virus in challenged juvenile rainbow trout *Onchorynchus mykiss* and coho salmon *O. kisutch*." *Diseases of Aquatic Organisms* 23: 189-199.

Heppell J, and HL Davis. 2000. "Application of DNA Vaccine Technology to Aquaculture." *Advanced Drug Delivery Reviews* 43(1): 29–43.

Heppell J, N Lorenzen, NK Armstrong, T Wu, E Lorenzen, K Einer-Jensen, J Schorr, and HL Davis. 1998. "Development of DNA Vaccines for Fish: Vector Design , Intramuscular Injection and Antigen Expression Using Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus Genes as Model." *Fish & Shellfish Immunology* 8: 271-86.

Herráez MP, and Zapata AG. 1986. "Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 12(1-4): 117-26.

Hine PM. 1992. "The granulocytes of fish." *Fish & Shellfish Immunology* 2(2): 79–98.

Hølvold LB, AI Myhr, and RA Dalmo. 2014. "Strategies and Hurdles Using DNA Vaccines to Fish." *Veterinary Research* 45: 21.

Hong JR, Gong HY, and Wu JL. 2002. "IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression." *Virology* 295(2): 217–229.

Hwang GL, M Azizur Rahman, S Abdul Razak, F Sohm, H Farahmand, A Smith, C Brooks, and N MacLean. 2003. "Isolation and Characterisation of Tilapia Beta-Actin Promoter and Comparison of Its Activity with Carp Beta-Actin Promoter." *Biochimica et Biophysica Acta* 1625(1): 11–18.

Ingerslev HC, CG Ossum, T Lindenstrøm, and ME Nielsen. 2010. "Fibroblasts Express Immune Relevant Genes and Are Important Sentinel Cells during Tissue Damage in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *PLoS One* 5(2): e9304.

Isshiki T, Nishizawa T, Kobayashi T, Nagano T, and Miyazaki T. 2001. "An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan." *Diseases of Aquatic Organisms* 47(2): 87–99.

Ito T, and Olesen NJ. 2013. "Susceptibility of various Japanese freshwater fish species to an isolate of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype IVb." *Diseases of Aquatic Organisms* 107(1): 1–8.

Ivanov I, F Yabukarski, RWH Ruigrok, and M Jamin. 2011. "Structural insights into the rhabdovirus transcription/replication complex." *Virus Research* 162(1-2): 126–37.

Jensen I, K Steiro, A-I Sommer, S Mennen, A Johansen, EK Sandaker, and M Seppola. 2013. "Establishing a Cell Line from Atlantic Cod as a Novel Tool for *in Vitro* Studies." *Fish & Shellfish Immunology* 34(1): 199–208.

Jianrong Li and Yu Zhang. 2012. "Messenger RNA Cap Methylation in Vesicular Stomatitis Virus, a Prototype of Non-Segmented Negative-Sense RNA Virus, Methylation." *In*: DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment, Chapter 10, pp. 237-269. Editors: Prof. Anica Dricu. InTech.

Jiménez N, J Coll, FJ Salguero, and C Tafalla. 2006. "Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Vaccine* 24(27–28): 5615–26

Jørgensen JB. 2014. "The Innate Immune Response in Fish." *In*: Fish Vaccination, Chapter 8, pp.85-103. Editors: R. Gudding, A. Lillehaug, and Ø. Eversen. Wiley-Blackwell, Ltd.

Julin K, S Mennen, and A-I Sommer. 2013. "Study of Virulence in Field Isolates of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Obtained from the Northern Part of Norway." *Journal of Fish Diseases* 36(2): 89–102.

Kaattari, SL., H.L. Zhang, I.W. Khor, I.M. Kaattari, and D.A. Shapiro. 2002. "Affinity Maturation in Trout: Clonal Dominance of High Affinity Antibodies Late in the Immune Response." *Developmental & Comparative Immunology* 26: 191–200.

Kanellos T, ID Sylvester, F D'Mello, CR Howard, A Mackie, PF Dixon, K-C Chang, A Ramstad, PJ Midtlyng, and PH Russell. 2006. "DNA Vaccination Can Protect *Cyprinus carpio* against spring viraemia of carp virus." *Vaccine* 24(23): 4927–33.

Khimmakthong U, S Deshmukh, JK Chettri, AM Bojesen, PW Kania, I Dalsgaard, and K Buchmann. 2013. "Tissue specific uptake of inactivated and live *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)*: Visualization by immunohistochemistry and *in situ* hybridization." *Microbial Pathogenesis* 59-60: 33–41.

Kim HJ, JK Cho, HK Hwang, MJ Oh, and T Nishizawa. 2012. "Establishment and Characterization of the Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC) Cell Line Persistently Infected with Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), an Aquabirnavirus." *Journal of Microbiology* 50(5): 821–26.

Kim MS, and KH Kim. 2013. "The Role of Viral Hemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) NV Gene in TNF-A- and VHSV Infection-Mediated NF-κB Acti-vation." *Fish & Shellfish Immunology* 34(5): 1315–19.

Kocan RM, Hershberger PK, and Elder NE. 2001. "Survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in filtered seawater and seawater containing ovarian fluid, crude oil and serum-enriched culture medium." *Diseases of Aquatic Organisms* 44(1): 75–78.

Koener JF, and Leong JA. 1990. "Expresion of the glycoprotein gene from a fish rhabdovirus by using baculovirus vectors." *Journal of Virology* 64(1): 428-30.

Kölbl O. 1989. Process for producing an avirulent cold blood virus. *World Intellectual Property Organization. WO*/1989/005154.

Kreil R, and MM Eibl. 1996. "Nitric Oxide and Viral Infection: No Antiviral Activity against a Flavivirus in vitro, and Evidence for Contribution to Pathogenesis in Experimental Infection in Vivo". *Virology* 219(1): 304–6.

Ku CC, CH Lu, and CS Wang. 2010. "Establishment and Characterization of a Fibroblast Cell Line Derived from the Dorsal Fin of Red Sea Bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel)." *Journal of Fish Diseases* 33(3): 187–96.

Laing KJ, T Wang, J Zou, J Holland, S Hong, N Bols, I Hirono, T Aoki, and CJ Secombes. 2001. "Cloning and Expression Analysis of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Tumour Necrosis Factor-a." *European Journal of Biochemistry* 268 (5): 1315–22.

LaPatra SE, Rohovec JS, Fryer JL. 1989. "Detection of Infectious Hematopoyetic Necrosis Virus in Fish Mucus." *Fish Pathology* 24(4): 197–202.

Latz E, A Schoenemeyer, A Visintin, KA Fitzgerald, BG Monks, CF Knetter, E Lien, NJ Nilsen, T Espevik, and DT Golenbock. 2004. "TLR9 Signals after Translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome." *Nature Immunology* 5: 190–98.

Lecocq-Xhonneux F, Thiry M, Dheur I, Rossius M, Vanderheijden N, Martial J, and De Kinkelin P. 1994. "A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout." *The Journal of General Virology* 75(Pt 7): 1579–87.

Lee LE, VR Dayeh, K Schirmer, and NC Bols. 2009. "Applications and Potential Uses of Fish Gill Cell Lines: Examples with RTgill-W1." *In vitro Cellular & Developmental Biology Animal* 45(3-4): 127–34.

Lin YL, YL Huang, SH Ma, CT Yeh, SY Chiou, LK Chen, L Liao. 1997. "Inhibition of Japanese Encephalitis Virus Infection by Nitric Oxide: Antiviral Effect of Nitric Oxide on RNA Virus Replication". *Journal of Virology* 71 (7): 5227-35.

Lindenstrøm T, CJ Secombes, and K Buchmann. 2004. "Expression of Immune Response Genes in Rainbow Trout Skin Induced by *Gyrodactylus derjavini* Infections." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 97(3-4): 137–48.

Liu MA. 2011. "DNA Vaccines: An Historical Perspective and View to the Future." *Immunological Reviews* 239(1): 62–84.

Liu X, Zhao Q, and Collodi P. 2003. "A truncated form of fibronectin is expressed in fish and mammals." *Matrix Biology* 22(5): 393–96.

Livak KJ, and TD Schmittgen. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402–8.

López A, A Rocha, A Estepa, and JM Coll. 2001. "Transfection of Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC) Carp Cells." *Biotechnology Letters* (23): 481–87.

López-Cazaux S, G Bluteau, D Magne, B Lieubeau, J Guicheux, and B Alliot-Licht. 2006. "Culture Medium Modulates the Behaviour of Human Dental Pulp-Derived Cells: Technical Note." *European Cells and Mater*ials 11: 35–42.

López-Muñoz A, FJ Roca, MP Sepulcre, J Meseguer, and V Mulero. 2010. "Zebrafish Larvae Are Unable to Mount a Protective Antiviral Response against Waterborne Infection by Spring Viremia of Carp Virus." *Developmental & Comparative Immunology* 34(5): 546–52.

López-Vázquez C, Raynard RS, Bain N, Snow M, Bandín I, and Dopazo CP. 2006. "Genotyping of marine viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from the Flemish Cap by nucleotide sequence analysis and restriction fragment length polymorphism patterns." *Diseases of Aquatic Organisms* 73(1): 23–31.

Lorenzen E, Brudeseth BE, Wiklund T, and Lorenzen N. 2010. "Immersion exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)* fry to wildtype *Flavobacterium psychrophilum* induces no mortality, but protects against later intraperitoneal challenge." *Fish & Shellfish Immunology* 28(3): 440–44.

Lorenzen E, K Einer-Jensen, JS Rasmussen, TE Kjaer, B Collet, CJ Secombes, and N Lorenzen. 2009. "The Protective Mechanisms Induced by a Fish Rhabdovirus DNA Vaccine Depend on Temperature." *Vaccine* 27(29): 3870–80.

Lorenzen E, N Lorenzen, K Einer-Jensen, BE Brudeseth, and O Evensen. 1998. "Protective Immunity to VHS in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Following DNA Vaccination." *Fish & Shellfish Immunology* 8: 261–70.

Lorenzen N, and LaPatra SE. 1999. "Immunity to rhabdoviruses in rainbow trout: the antibody response." *Fish & Shellfish Immunology* 9(4): 345–60.

Lorenzen N, E Lorenzen, and K Einer-Jensen. 2001. "Immunity to Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) Following DNA Vaccination of Rainbow Trout at an Early Life-Stage." *Fish & Shellfish Immunology* 11(7): 585–91.

Lorenzen N, E Lorenzen, K Einer-Jensen, and SE LaPatra. 2002a. "Immunity Induced Shortly after DNA Vaccination of Rainbow Trout against Rhabdoviruses Protects against Heterologous Virus but Not against Bacterial Pathogens." *Developmental & Comparative Immunology* 26: 173–79.

Lorenzen N, E Lorenzen, K Einer-Jensen, and SE LaPatra. 2002b. "DNA Vaccines as a Tool for Analysing the Protective Immune Response against Rhabdoviruses in Rainbow Trout." *Fish & Shellfish Immunology* 12(5): 439–53.

Lorenzen N, Olesen NJ, and Jorgensen PE. 1990. "Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein." *Journal of General Virology* 71(Pt 3): 561–67.

Lorenzen N, NJ Olesen, PEV Jorgensen, M Etzerodt, TL Holtet, and HC Thogersen. 1993. "Molecular Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the Glycoprotein Gene of VHS Virus, and Immunization of Rainbow Trout with the Recombinant Protein." *Journal of General Virology* 74(4): 623–30.

Lorenzo G, A Estepa, and JM Coll. 1996. "Fast Neutralization/immuneperoxidase Assay for Viral Haemorrhagic Septicaemia with AntiNucleoprotein Monoclonal Antibody." *Journal of Virological Methods* 58(1-2): 1–6.

Lovy, J, NL Lewis, PK Hershberger, W Bennett, TR Meyers, and KA Garver. 2012. "Viral Tropism and Pathology Associated with Viral Hemorrhagic Septicemia in Larval and Juvenile Pacific Herring." *Veterinary Microbiology* 161(1-2): 66–76.

Lumsden JS, Morrison B, Yason C, Russell S, Young K, Yazdanpanah A, Huber P, Al-Hussinee L, Stone D, and Way K. 2007. "Mortality event in freshwater drum

Aplodinotus grunniens from Lake Ontario, Canada, associated with viral haemorrhagic septicemia virus, type IV.“ *Diseases of Aquatic Organisms* 76(2): 99–111.

Luque A, A González Granja, L González, and C Tafalla. 2014. “Establishment and Characterization of a Rainbow Trout Heart Endothelial Cell Line with Susceptibility to Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV).” *Fish & Shellfish Immunology* 38(1): 255–64.

Maeno S, Y Niki, H Matsumoto, H Morioka, T Yatabe, A Funuyama, Y Toyama, T Taguchi, and J Tanaka. 2005. “The Effect of Calcium Ion Concentration on Osteoblast Viability, Proliferation and Differentiation in Monolayer and 3D Culture.” *Biomaterials* 26(23): 4847–55.

Magnadóttir B. 2006. “Innate Immunity of Fish (overview).” *Fish & Shellfish Immunology* 20(2): 137–51.

Marsh M, and A Helenius. 1989. “Virus Entry into Animal Cells.” *Advances in Virus Research* 36: 107–51.

Martínez JL, A Casado, and R Enríquez. 2004. “Experimental Infection of *Flavobacterium psychrophilum* in Fins of Atlantic Salmon *Salmo salar* Revealed by Scanning Electron Microscopy.” *Diseases of Aquatic Organisms* 59(1): 79–84.

Martínez-Alonso S, A Martínez-López, A Estepa, A Cuesta, and C Tafalla. 2011. “The Introduction of Multi-Copy CpG Motifs into an Antiviral DNA Vaccine Strongly up-Regulates Its Immunogenicity in Fish.” *Vaccine* 29(6): 1289–96.

Martínez-López A, B Chinchilla, P Encinas, E Gómez-Casado, A Estepa, and JM Coll. 2012. “Replacement of the Human Cytomegalovirus Promoter with Fish Enhancer and Core Elements to Control the Expression of the G Gene of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus (VHSV).” *Journal of Biotechnology* 164(2): 171–78.

Martínez-López A, P Encinas, P García-Valtanen, E Gómez-Casado, JM Coll, and A Estepa. 2013a. “Improving the Safety of Viral DNA Vaccines: Development of Vectors Containing Both 5′ and 3' Homologous Regulatory Sequences from Non-Viral Origin.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(7): 3007–16.

Martínez-López A, P García-Valtanen, MM Ortega-Villaizan, V Chico, RM Medina-Gali, L Pérez, JM Coll, and A Estepa. 2013b. “Increasing Versatility of the DNA Vaccines through Modification of the Subcellular Location of Plasmid-Encoded Antigen Expression in the in vivo Transfected Cells.” *PLoS One* 8(10): 1–12.

Martínez-López A, P García-Valtanen, M Ortega-Villaizan, V Chico, E. Gómez-Casado, JM Coll, and A Estepa. 2014. “VHSV G Glycoprotein Major Determinants Implicated in Triggering the Host Type I IFN Antiviral Response as DNA Vaccine Molecular Adjuvants.” *Vaccine* 32(45): 6012–19.

Mas V, A Rocha, L Pérez, JM Coll, and A Estepa 2004. “Reversible Inhibition of Spreading of in vitro Infection and Imbalance of Viral Protein Accumulation at Low pH in Viral

Hemorrhagic Septicemia Rhabdovirus, a Salmonid Rhabdovirus." *Journal of Virology* 78(4): 1936–44.

Matlin KS, H Reggio, A Helenius, and K Simons. 1982. "Pathway of Vesicular Stomatitis Virus Entry Leading to Infection." *Journal of Molecular Biology* 156: 609–31.

Mauger PE, C Labbé, J Bobe, C Cauty, I Leguen, G Baffet, and PY Le Bail. 2009. "Characterization of Goldfish Fin Cells in Culture: Some Evidence of an Epithelial Cell Profile." *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 152(3): 205–15.

Mauger PE, PY Le Bail, and C Labbé. 2006. "Cryobanking of Fish Somatic Cells: Optimizations of Fin Explant Culture and Fin Cell Cryopreservation." *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 144(1): 29–37.

McLauchlan PE, B Collet, E Ingerslev, CJ Secombes, N Lorenzen, and AE Ellis. 2003. "DNA Vaccination against Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) in Rainbow Trout: Size, Dose, Route of Injection and Duration of Protection- early Protection Correlates with Mx Expression." *Fish & Shellfish Immunology* 15(1): 39–50.

Mehta DR, AA Ashkar, and KL Mossman. 2012. "The Nitric Oxide Pathway Provides Innate Antiviral Protection in Conjunction with the Type I Interferon Pathway in Fibroblasts." *PLoS One* 7(2): e31688.

Meier E, G Kunz, O Haller, and H Arnheiter. 1990. "Activity of Rat Mx Proteins against Rhabdovirus." *Journal of Virology* 64(12): 6263-69.

Meseguer J, López-Ruiz A, and Esteban MA. 1994. "Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function." *Cell and Tissue Research* 277(1): 1-10.

Meyers TR, Short S, and Lipson K. 1999. "Isolation of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality in two new host species of Alaskan marine fish." *Diseases of Aquatic Organisms* 38(2): 81–86.

Mishell RI, and RW Dutton. 1967. "Immunization of Dissociated Spleen Cell Cultures from Normal Mice." *Journal of Experimental Medicine* 126(3): 423–42.

Mittal AK, T Ueda, O Fujimori, and K Yamada. 1994. "Histochemical Analysis of Glycoproteins in the Unicellular Glands in the Epidermis of an Indian Freshwater Fish, *Mastacembelus pancalus* (Hamilton)." *The Histochemical Journal* 26(8): 666–77.

Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, and Eichmann K. 1995. "Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines." *European Journal of Immunol*ogy 25(4): 1101–04.

Montero J, J Coll, N Sevilla, A Cuesta, NC Bols, and C Tafalla. 2008a. "Interleukin 8 and CK-6 Chemokines Specifically Attract Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS11

Monocyte-Macrophage Cells and Have Variable Effects on Their Immune Functions." *Developmental and Comparative Immunology* 32(11): 1374–84.

Montero J, A Estepa, J Coll, and C Tafalla. 2008b. "Regulation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Interleukin-8 Receptor (IL-8R) Gene Transcription in Response to Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV), DNA Vaccination and Chemokines." *Fish and Shellfish Immunology* 25: 271–80.

Montero J, J Garcia, MC Ordás, I Casanova, A González, A Villena, J Coll, and C Tafalla. 2011a. "Specific Regulation of the Chemokine Response to Viral Hemorrhagic Septicemia Virus at the Entry Site." *Journal of Virology* 85(9): 4046–56.

Montero J, MC Ordás, A Alejo, L González-Torres, N Sevilla, and C Tafalla. 2011b. "CK12, a Rainbow Trout Chemokine with Lymphocyte Chemo-Attractant Capacity Associated to Mucosal Tissues." *Molecular Immunology* 48(9-10): 1102–13.

Morrison, R.N., and B.F. Nowak. 2002. "The antibody response of teleost fish." *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11(1): 46–54.

Mourton C, M Béarzotti, M Piechaczyk, F Paolucci, B Pau, J-M. Bastide, and P De Kinkelin. 1990. "Antigen-Capture ELISA for Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus Serotype I." *Journal of Virological Methods* 29(3): 325–33.

Mukaida N, A Harada, and K Matsushima. 1998. "Interleukin-8 (IL-8) and Monocyte Chemotactic and Activating Factor (MCAF/MCP-1), Chemokines Essentially Involved in Inflammatory and Immune Reactions." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 9(1): 9–23.

Munang'andu HM, Mutoloki S, and Evensen Ø. 2014. "Non-replicating Vaccines." *In:* Fish Vaccination (pp.22-32). (eds): R Gudding, A Lillehaug, and Ø Eversen. John Wiley & Sons, Ltd.

Munro ES, SK Gahlawat, F Acosta, and AE Ellis. 2006. "In infectious pancreatic necrosis virus carrier Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts, almost all kidney macrophages *ex-vivo* contain a low level of non-replicating virus." *Journal of Fish Diseases* 29(1): 43–48.

Murray AG. 2013. "Epidemiology of the Spread of Viral Diseases under Aquaculture." *Current Opinion in Virology* 3(1): 74–78.

Mutoloki S, JB Jørgensen, and O Evensen. 2014. "The Adaptive Immune Response in Fish". *In*: Fish Vaccination, Chapter 9, pp.104–115. (eds): R Gudding, A Lillehaug, Ø Eversen. John Wiley & Sons, Ltd.

Nakanishi T, and Ototake M. 1999. "The graft-versus-host reaction (GVHR) in the ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii.*" *Developmental and Comparative Immunology* 23(1): 15–26.

Nakanishi T, Toda H, Shibasaki Y, and Somamoto T. 2011. "Cytotoxic T cells in teleost fish." *Developmental and Comparative Immunology* 35(2): 1317-23.

Nishizawa T, Iida H, Takano R, Isshiki T, Nakajima K, and Muroga K. 2002. "Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) based on partial G and P genes." *Diseases of Aquatic Organisms* 48(2): 143–48.

Novoa B, A Romero, V Mulero, I Rodríguez, I Fernández, A Figueras. 2006. "Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of vaccination against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)." *Vaccine* 24(31-32): 5806-16.

Núñez E, AM Fernández, A Estepa, JM González-Ros, F Gavilanes, and JM Coll. 1998. "Phospholipid Interactions of a Peptide from the Fusion-Related Domain of the Glycoprotein of VHSV, a Fish Rhabdovirus." *Virology* 330: 322–30.

Núñez N, M Gerdol, V Stocchi, C Marozzi, E Randelli, C Bernini, F Buonocore, S Picchietti, C Papeschi, N Sood, A Pallavicini, and G Scapigliati. 2014. "T Cell Transcripts and T cell activities in the gills of the teleost fish sea bass (*Dicentrarchus labrax*)." *Developmental and Comparative Immunology* 47(2): 309–18.

Ogut H, C Altuntas, and R Parlak. 2013. "Viral Surveillance of Cultured Rainbow Trout in the Eastern Black Sea, Turkey." *Journal of Aquatic Animal Health* 25(1): 27–35.

Ohtani M, J Hikima, H Kondo, I Hirono, TS Jung, and T Aoki. 2011. "Charac-terization and Antiviral Function of a Cytosolic Sensor Gene, MDA5, in Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*." *Developmental and Comparative Immunology* 35(5): 554–62.

Oidtmann B, Joiner C, Stone D, Dodge M, Reese RA, and Dixon P. 2011. "Viral load of various tissues of rainbow trout challenged with viral haemorrhagic septicaemia virus at various stages of disease." *Diseases of Aquatic Organisms* 93(2): 93–104.

Olesen NJ. 1998. "Sanitation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS)." *Journal of Applied Ichthyology* 14(3-4): 173–77.

Ordás MC, A Cuesta, L Mercado, NC Bols, and C Tafalla. 2011. "Viral Hemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) up-Regulates the Cytotoxic Activity and the Perforin/granzyme Pathway in the Rainbow Trout RTS11 Cell Line." *Fish & Shellfish Immunology* 31(2): 252–59.

OIE. 2006. Organización Internacional de Epizootías. "Necrosis Pancreática Infecciosa." *In*: Código Sanitario para los Animales Acuáticos, 190–99.

OIE. 2014a. Organización Internacional de Epizootías. "Septicemia Hemorrágica Viral." *In:* Manual de Pruebas de Diagnóstico para Animales Acuáticos, pp.1–24**.**

OIE. 2014b. Organización Internacional de Epizootías. "Septicemia Hemorrágica Viral." *In:* Código Sanitario para Animales Acuáticos, pp.1–6.

Ortega-Villaizán M, V Chico, A Falco, L Pérez, JM Coll, and A Estepa. 2009. "The Rainbow Trout TLR9 Gene and Its Role in the Immune Responses Elicited by a Plasmid Encoding the Glycoprotein G of the Viral Haemorrhagic Septicaemia Rhabdovirus (VHSV)." *Molecular Immunology* 46(8-9): 1710–17.

Ortega-Villaizán M, V Chico, A Martínez-López, A Falco, L Pérez, JM Coll, and A Estepa. 2011. "*In Vitro* Analysis of the Factors Contributing to the Antiviral State Induced by a Plasmid Encoding the Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus Glycoprotein G in Transfected Trout Cells." *Vaccine* 29(4): 737- 43.

Ortega-Villaizán M, A Martínez-López, P Garcia-Valtanen, V Chico, L Pérez, JM Coll, and A Estepa. 2012. "*Ex Vivo* Transfection of Trout Pronephros Leukocytes, a Model for Cell Culture Screening of Fish DNA Vaccine Candidates." *Vaccine* 30(41): 5983–90.

Palti Y. 2011. "Toll-like receptors in bony fish: From genomics to function." *Developmental and Comparative Immunology* 35(12): 1263–72.

Pearse, A.G.E. 1972. "Histochemistry: Theoretical and Applied." Vol. 2, 3rd edition, edited by (Edinburgh) Churchill Livingstone/Pelletier.

Peatman E, and Z Liu. 2007. "Evolution of CC chemokines in teleost fish: a case study in gene duplication and implications for immune diversity." *Immunogenetics* 59 (8): 613–23

Peddie S, McLauchlan PE, Ellis AE, and Secombes CJ. 2003. "Effect of intraperitoneally administered IL-1β -derived peptides on resistance to viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." *Diseases of Aquatic Organisms* 56(3): 195–200.

Peddie S, J Zou, C Cunningham, and CJ Secombes. 2001. "Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Recombinant IL-1beta and Derived Peptides Induce Migration of Head-Kidney Leucocytes in Vitro." *Fish & Shellfish Immunology* 11(8): 697–709.

Pham, P.H., J.S. Lumsden, C. Tafalla, B. Dixon, and N.C. Bols. 2013. "Differential Effects of Viral Hemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) Genotypes IVa and IVb on Gill Epithelial and Spleen Macrophage Cell Lines from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Fish & Shellfish Immu-nology* 34(2): 632–40.

Picchietti S, C.Bernini, MC Belardinelli, E Ovidi, AR Taddei, L Guerra, L Abelli, and AM Fausto. 2013. "Immune Modulatory Effects of *Aloe arborescens* Extract on the Piscine SAF-1 Cell Line." *Fish & Shellfish Immunology* 34(5): 1335–44.

Pietretti D, and GF Wiegertjes. 2014. "Ligand Specificities of Toll-like Receptors in Fish: Indications from Infection Studies." *Developmental and Comparative Immunology* 43(2): 205–22.

Polak-Charcon S, M Hekmati, and Y Ben-Shaul. 1989. "The Effect of Modifying the Culture Medium on Cell Polarity in a Human Colon Carcinoma Cell Line." *Cell Differenttiation and Development* 26(2): 119–29.

Porter KR, and GD Pappas. 1959. "Collagen Formation by Fibroblasts of the Chick Embryo Dermis." *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 5(1): 153–66.

Prassana I, WS Lakra, SN Ogale, and RR Bhonde. 2000. "Cell Culture from Fin Explant of Endangered Golden Mahseer, *Tor putitora* (Hamilton)." *Current Science* 79(1): 93–98.

Purcell MK, G Kurath, KA Garver, RP Herwig, and JR Winton. 2004. "Quantitative Expression Profiling of Immune Response Genes in Rainbow Trout Following Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV) Infection or DNA Vaccination." *Fish & Shellfish Immunology* 17(5): 447–62.

Purcell MK, KJ Laing, and JR Winton. 2012. "Immunity to Fish Rhabdoviruses." *Viruses* 4(1): 140–66.

Qin QW, Ototake M, Nagoya H, and Nakanishi T. 2002. "Graft-versus-host reaction (GVHR) in clonal amago salmon *Oncorhynchus rhodurus*." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 89(1-2): 83–89.

Qin QW, TH Wu, TL Jia, A Hegde, and RQ Zhang. 2006. "Development and Characterization of a New Tropical Marine Fish Cell Line from Grouper, *Epinephelus coioides* Susceptible to Iridovirus and Nodavirus." *Journal of Virological Methods* 131(1): 58–64.

Quillet E, M Dorson, G Aubard, and C Torhy. 2001. "*In Vitro* Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus Replication in Excised Fins of Rainbow Trout: Correlation with Resistance to Waterborne Challenge and Genetic Variation." *Diseases of Aquatic Organisms* 45(3): 171–82.

Raja-Halli M, TK Vehmas, E Rimaila-Pärnänen, S Sainmaa, HF Skall, NJ Olesen, and H Tapiovaara. 2006. "Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) Outbreaks in Finnish Rainbow Trout Farms." *Diseases of Aquatic Organisms* 72(3): 201–11.

Ristow SS, De Avila J, LaPatra SE, and Lauda K. 1989. "Detection and characterization of rainbow trout antibody against infectious hematopoietic necrosis virus." *Diseases Aquatic Organisms* 15: 109–14.

Ristow SS, LaPatra SE, Dixon R, Pedrow CR, Shewmaker WD, Park JW, and Thorgaard GH. 2000. "Responses of cloned rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to an attenuated strain of infectious hematopoietic necrosis virus." *Diseases of Aquatic Organisms* 42(3): 163–72.

Robertsen B. 2006. "The Interferon System of Teleost Fish." *Fish & Shellfish Immunology* 20(2): 172–91.

Roca FJ, I Mulero, A López-Muñoz, MP Sepulcre, SA Renshaw, J Meseguer, and V Mulero. 2008. "Evolution of the Inflammatory Response in Vertebrates: Fish TNF- Is a Powerful Activator of Endothelial Cells but Hardly Activates Phagocytes." *The Journal of Immunology* 181(7): 5071–81.

Rocha A, S Ruiz, and JM Coll. 2005. "Improvement of Transfection Efficiency of Epithelioma Papulosum Cyprini Carp Cells by Modification of Cell Cycle and Use of an Optimal Promoter." *Marine Biotechnology* 6(5): 401–10.

Rodriguez Saint-Jean S, JJ Borrego, and SI Pérez-Prieto. 2003. "Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Biology, Pathogenesis, and Diagnostic Methods." *Advances in Virus Research* 62: 113–65.

Romero A, S Dios, M Brémont, A Figueras, and B Novoa. 2011. "Interaction of the attenuated recombinant rIHNV-Gvhsv GFP virus with macrophages from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Veterinary Immunology and Immuno-pathology* 140(1-2): 119-29.

Romero A, Figueras, A, Thoulouze MI, Bremont M., and Novoa B. 2008. "Recombinant infectious hematopoietic necrosis viruses induce protection for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Diseases of Aquatic Organisms* 80(2): 123–35.

Ronen A, Perleberg A, Abramowitz J, Hutoran M, Tinman S, Bejarano I, Steinitz M, and Kotler M. 2003. "Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio.*" *Vaccine* 21(32): 4677–84.

Rønneseth A, Pettersen EF, and Wergeland HI. 2006. "Neutrophils and B-cells in blood and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)." *Fish and Shellfish Immunology* 20(4): 610–20.

Ross K, McCarthy U, Huntly PJ, Wood BP, Stuart D, Rough EI, Smail DA, and Bruno DW. 1994. "An outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in urbot (*Scophthalmus maximus*), in Scotland." *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*. 14: 213-14.

Roy R, AB Das, and D Ghosh. 1997. "Regulation of Membrane Lipid Bilayer Structure during Seasonal Variation: A Study on the Brain Membranes of *Clarias batrachus*." *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes* 1323(1): 65–74.

Ruiz S, C Tafalla, A Cuesta, A Estepa, and JM Coll. 2008. "*In Vitro* Search for Alternative Promoters to the Human Immediate Early Cytomegalovirus (IE-cMV) to Express the G Gene of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) in Fish Epithelial Cells." *Vaccine* 26(51): 6620–29.

Sahlmann C, BJG Sutherland, TM Kortner, BF Koop, A Krogdahl, and AM Bakke. 2013. "Early response of gene expression in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the development of soybean meal induced enteritis." *Fish & Shellfish Immunology* 34(2): 599–609.

Salgado-Miranda C, E Rojas-Anaya, G García-Espinosa, and E Loza-Rubio. 2014. "Molecular Characterization of the VP2 Gene of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Isolates from Mexico." *Journal of Aquatic Animal Health* 26(1): 43–51.

Salinas I, YA Zhang, and JO Sunyer. 2011. "Mucosal Immunoglobulins and B Cells of Teleost Fish." *Developmental and Comparative Immunology* 35(12): 1346–65.

Sandbichler AM, T Aschberger, and B Pelster. 2013. "A Method to Evaluate the Efficiency of Transfection Reagents in an Adherent Zebrafish Cell Line." *BioResearch* (open access) 2(1): 20–27.

Schiøtz BL, Jørgensen SM, Rexroad C, Gjøen T, and Krasnov A. 2008. "Transcriptomic analysis of responses to infectious salmon anemia virus infection in macrophage-like cells." *Virus Research* 136(1-2): 65–74.

Schyth BD, N Lorenzen, and FS Pedersen. 2006. "Antiviral Activity of Small Interfering RNAs: Specificity Testing Using Heterologous Virus Reveals Interferon-Related Effects Overlooked by Conventional Mismatch Controls." *Virology* 349(1): 134–41.

Secombes CJ, and AE Ellis. 2012. "The Immunology of Teleosts.". *In:* Fish Pathology, 4th edit. Chapter 4, pp.144–66. Edited by R. Roberts, Blackwell Publishing Ltd.

Secombes CJ, T Wang, and S Bird. 2011. "The Interleukins of Fish." *Developmental and Comparative Immunology* 35(12): 1336–45.

Seo JY, K-H Kim, S-G Kim, M-J Oh, S-W Nam, Y-T Kim, and T-J Choi. 2006. "Protection of flounder against hirame rhabdovirus (HIRRV) with a DNA vaccine containing the glycoprotein gene." *Vaccine* 24(7): 1009–15.

Seternes T, TC Tonheim, M Løvoll, J Bøgwald, and RA Dalmo. 2007. "Specific Endocytosis and Degradation of Naked DNA in the Endocardial Cells of Cod (*Gadus morhua* L.)." *Journal of Experimental Biology* 210: 2091–2103.

Sever L, NTK Vo, NC Bols, and B Dixon. 2014. "Expression of Tapasin in Rainbow Trout Tissues and Cell Lines and up Regulation in a Monocyte/macrophage Cell Line (RTS11) by a Viral Mimic and Viral Infection." *Developmental and Comparative Immunology* 44(1): 86–93.

Shoemaker CA, and Klesius PH. 2014. "Replicating Vaccines." *In*: Fish Vaccination, chapter 4, pp. 33–46. Editors: R Gudding, A Lillehaug, and Ø Eversen. Wiley-Blackwell, Ltd.

Simon B, J Nomellini, P Chiou, W Bingle, J Thornton, J Smit, and JA Leong. 2001. "Recombinant vaccines against infectious hematopoietic necrosis virus: production by the *Caulobacter crescentus* S-layer protein secretion system and evaluation in laboratory trials". *Diseases of Aquatic Organisms* 44: 17–27.

Skall HF, NJ Olesen, and S Mellergaard. 2005. "Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming." A review. *Journal of Fish Diseases* 28(9): 509–29.

Smail DA, and ES Munro. 2008. "Isolation and quantification of infectious pancreatic necrosis virus from ovarian and seminal fluids of Atlantic salmon, *Salmo salar* L." *Journal of Fish Diseases* 31(1): 49–58.

Somamoto T, M Kondo, T Nakanishi, and M Nakao. 2014. "Helper function of CD4+ lymphocytes in antiviral immunity in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*." *Developmental and Comparative Immunology* 44(1): 111–15.

Somamoto T, EO Koppang, and U Fischer. 2013a. "Antiviral Functions of CD8(+) Cytotoxic T cells in teleost fish". *Developmental and Comparative Immunology* 44(1): 111-115.

Somamoto T, T Nakanishi, and M Nakao. 2013b. "Identification of antiviral cytotoxic effector cells in the ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii.*" *Developmental and Comparative Immunology* 39(4): 370–377

Somamoto T, Nakanishi T, and Okamoto N. 2000. "Specific cell-mediated cytotoxicity against a virus-infected syngeneic cell line in isogeneic ginbuna crucian carp." *Developmental and Comparative Immunology* 24(6-7): 633–40.

Somamoto, T., Nakanishi, T., and Okamoto, N. 2002. "Role of Specific Cell-Mediated Cytotoxicity in Protecting Fish from Viral Infections." *Virolog*y 297(1): 120-27.

Somamoto T, Okamoto N, Nakanishi T, Ototake M, and Nakao M. 2009. "*In vitro* generation of viral-antigen dependent cytotoxic T-cells from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii.*" *Virology* 389(1-2): 26–33.

Soroceanu L, and CS Cobbs. 2011. "Is HCMV a Tumor Promoter?" *Virus Research* 157(2): 193–203.

Superti F, M Derer, and H Tsiang. 1984. "Mechanism of Rabies Virus Entry into CER Cells." *Journal of General Virology* 65: 781–89.

Tafalla C, V Chico, L Pérez, JM Coll, and A Estepa. 2007. "*In Vitro* and *in Vivo* Differential Expression of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx Isoforms in Response to Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) G Gene, Poly I: C and VHSV." *Fish & Shellfish Immunology* 23(1): 210–21.

Tafalla C, JM Coll, and CJ Secombes. 2005. "Expression of Genes Related to the Early Immune Response in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) after Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) Infection." *Developmental and Comparative Immunology* 29(7): 615–26.

Tafalla C, E Sánchez, N Lorenzen, SJ DeWitte-Orr, and NC Bols. 2008. "Effects of Viral Hemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) on the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Monocyte Cell Line RTS-11." *Molecular Immunology* 45(5): 1439–48.

Takano R, Nishizawa T, Arimoto M, and Muroga K. 2000. "Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*." *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*. 20(5): 186-92.

Takhampunya R, R Padmanabhan, and S Ubol. 2006. "Antiviral Action of Nitric Oxide on Dengue Virus Type 2 Replication." *Journal of General Virology* 87(10): 3003–11.

Takizawa F, JM Dijkstra, P Kotterba, T Korytaf, H Kock, B Köllner, B Jaureguiberry, T Nakanishi, and U Fischer. 2011a. "The expression of CD8α discriminates distinct T cell subsets in teleost fish." *Developmental and Comparative Immunology* 35(7): 752–63.

Takizawa F, EO Koppang, M Ohtani, T Nakanishi, K Hashimoto, U Fischer, and JM Dijkstra. 2011b. "Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments." *Molecular Immunology* 48(12-13): 1360–68.

Thoulouze MI, Bouguyon E, Carpentier C, Brémont M. 2004. "Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout." *Journal of Virology* 78(8): 4098-107.

Toda H, Y Sito, T Koike, F Takizawa, K Araki, T Yabu, T. Somamoto, H Suetake, Y Suzuki, M Ototake, T Moritomo, and T Nakanishi. 2011. "Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish." *Developmental and Comparative Immunology* 35(6): 650–60.

Tonheim TC, J Bøgwald, and RA Dalmo. 2008a. "What Happens to the DNA Vaccine in Fish? A Review of Current Knowledge." *Fish & Shellfish Immunology* 25(1-2): 1-18.

Tonheim TC, RA Dalmo, J Bogwald, and T Seternes. 2008b. "Specific Uptake of Plasmid DNA without Reporter Gene Expression in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Kidney after Intramuscular Administration". *Fish & Shellfish Immunology* 24(1): 90–101.

Toplak I, P Hostnik, D Rihtaric, NJ Olesen, HF Skall, and V Jencic. 2010. "First Isolation and Genotyping of Viruses from Recent Outbreaks of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) in Slovenia." *Diseases of Aquatic Organisms* 92(1): 21–29.

Trobridge GD, PP Chiou, and JA Leong. 1997. "Cloning of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and Characterization of Trout Mx Protein Expression in salmon cells." *Journal of Virology* 71(7): 5304-11.

Utke K, S Bergmann, N Lorenzen, B Köllner, M Ototake, and U Fischer. 2007. "Cell-Mediated Cytotoxicity in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Infected with Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus." *Fish & Shellfish Immunology* 22(3): 182–96.

Utke K, H Kock, H Schuetze, SM Bergmann, N Lorenzen, K Einer-Jensen, B Köllner, RA Dalmo, T Vesely, M Ototake, and U Fischer. 2008. "Cell-Mediated Immune Responses in Rainbow Trout after DNA Immunization against the Viral Hemorrhagic Septicemia Virus." *Developmental and Comparative Immunology* 32(3): 239–52.

Vallejo AN, NW Miller, and LW Clem. 1992. "Antigen processing and presentation in teleost immune responses." *Annual Review of Fish Diseases* 2: 73–89.

Van Muiswinkel WB, and M Nakao. 2014. "A Short History of Research on Immunity to Infectious Diseases in Fish." *Developmental and Comparative Immunology* 43(2): 130–50.

Verrier ER, C Langevin, A Benmansour, and P Boudinot. 2011. "Early Antiviral Response and Virus-Induced Genes in Fish." *Developmental and Comparative Immunology* 35(12): 1204–14.

Verrier ER, C Langevin, C Tohry, A Houel, V Ducrocq, A Benmansour, E Quillet, and P Boudinot. 2012. "Genetic Resistance to Rhabdovirus Infection in Teleost Fish Is Paralleled to the Derived Cell Resistance Status". *PLoS ONE* 7(4): e33935 (doi:10.1371/journal.pone.0033935)

Villena AJ. 2003. "Applications and Needs of Fish and Shellfish Cell Culture for Disease Control in Aquaculture." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13: 111-40.

Vo NTK, AW Bender, LEJ Lee, JS Lumsden, N Lorenzen, B Dixon, and NC Bols. 2013. "Development of a Walleye Cell Line and Use to Study the Effects of Temperature on Infection by Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus Group IVb." *Journal of Fish Diseases* 38(2): 121-36.

Wang, G., S. LaPatra, L. Zeng, Z. Zhao, and Y. Lu. 2003. "Establishment, Growth, Cryopreservation and Species of Origin Identification of Three Cell Lines from White Sturgeon, *Acipenser transmontanus*." *Methods in Cell Science* 25(3-4): 211–20.

Wang T, and CJ Secombes. 2013. "The Cytokine Networks of Adaptive Immunity in Fish." *Fish & Shellfish Immunology* 35(6): 1703–18.

Wilson M, Bengtén E, Miller NW, Clem LW, Du Pasquier L, and Warr GW. 1997. "A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (9): 4593–97.

Wolf K. 1988. "Viral hemorrhagic septicemia." *In*: Fish Viruses and Fish Viral Diseases. pp.217-49. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, USA.

Wolff B, M Zsak, and C Rabeck. 1997. "Immunofluorescence Assay for the Quantitative and Qualitative Evaluation of Intracellular Interleukin-8 in Microtiter Plates." *Analytical Biochemistry* 244(1): 33–39.

Wu X, M Lin, Y Li, X Zhao, and F Yan. 2009. "Effects of DMEM and RPMI 1640 on the Biological Behavior of Dog Periosteum-Derived Cells." *Cytotechnology* 59(2): 103–11.

Wu YC, YF Lu, and SC Chi. 2010. "Anti-Viral Mechanism of Barramundi Mx against Betanodavirus Involves the Inhibition of Viral RNA Synthesis through the Interference of RdRp." *Fish & Shellfish Immunology* 28(3): 467–75.

Yadav K, WS Lakra, J Sharma, M Goswami, and A Singh. 2011. "Development and Characterization of a Cell Line TTCF from Endangered Mahseer, *Tor tor* (Ham.)." *Fish Physiology and Biochemistry* 38: 1035-45.

Yamada KM., and E Cukierman. 2007. "Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D." *Cell* 130(4): 601–10.

Yamamoto T, WN Batts, CK Arakawa, and JR Winton. 1990a. "Multiplication of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout following immersion infection: whole body assay and immunochemistry." *Journal of Aquatic Animal Health* 2(4): 271–80

Yamamoto T, Hu K, Batts WN, and Winton JR. 1990b. "Infection of fish skin and the transmission of salmonid virus diseases." *In*: Habermehl KO, Zeichhardt H (eds) VIIIth Congress of Virology. p.488 (abstract). Institute for Clinical and Experimental Virology, Berlin.

Ye J, IM Kaattari, C Ma, and S Kaattari. 2013. "The teleost humoral immune response." *Fish & Shellfish Immunology* 35(6): 1719–28.

Zapata AG, and Cooper EL. 1991. "The immune system: Comparative histopa-thology." Cell *Biology International Reports* 15(3): 267.

Zhang Q, RK Cooper, WR Wolters, and TR Tiersch. 1998. "Isolation, Culture and Characterization of a Primary Fibroblast Cell Line from Channel Catfish." *Cytotechnology* 26: 83-90.

Zhang HG, and Hanson LA. 1995. "Deletion of Thymidine Kinase Gene Attenuates Channel Catfish Herpesvirus While Maintaining Infectivity." *Virology* 209(2): 658-63.

Zhang J, X Kong, C Zhou, L Li, G Nie, and X Li. 2014. "Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: Ligand specificity and signal pathways." *Fish & Shellfish Immunology* 41(2): 380–88.

Zhang YA, I Salinas, J Li, D Parra, S Bjork, Z Xu, SE LaPatra, J Bartholomew, and JO Sunyer. 2010. "IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity." *Nature Immunology* 11(9): 827–35.

Zhou GZ, ZQ Li, XP Yuan, and QY Zhang. 2007. "Establishment, Characterization, and Virus Susceptibility of a New Marine Cell Line from Red Spotted Grouper *Epinephelus akaara*." *Marine Biotechnology* 9(3): 370–76.

Zhu LY, L Nie, G Zhu, LX Xiang, and JZ Shao. 2013. "Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts." *Developmental and Comparative Immunology* 39(1-2): 39–62.

Zou J, M Chang, P Nie, and CJ Secombes. 2009. "Origin and Evolution of the RIG-I like RNA Helicase Gene Family." *BMC Evolutionary Biology* 9: 85. (doi:10.1186/1471-2148-9-85).

Zou J, B Gorgoglione, NG Taylor, T Summathed, PT Lee, A Panigrahi, C Genet, YM Chen, TY Chen, M Ul-Hassan, SM Mughai, P Boudinot, and CJ Secombes. 2014. "Salmonids Have an Extraordinary Complex Type I IFN System: Characterization of the IFN Locus in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Reveals Two Novel IFN Subgroups." *The Journal of Immunology* 193(5): 2273–86.

Zou J, and CJ Secombes. 2011. "Teleost Fish Interferons and Their Role in Immunity." *Developmental and Comparative Immunology* 35(12): 1376–87.