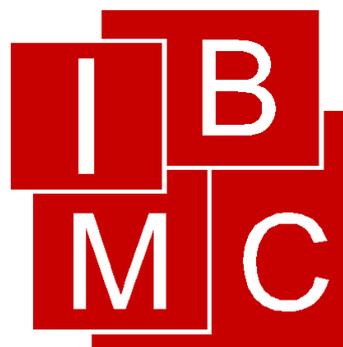


TRABAJO FIN DE GRADO



Autofagia como mecanismo de protección
frente al virus de la septicemia hemorrágica
vírica en eritrocitos de trucha arcoíris

Ricardo Requena Platek

4º Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Tutor: Luis Pérez García-Estañ

Cotutores: María del Mar Ortega-Villaizán Romo e Iván Nombela Díaz

Área de conocimiento: Bioquímica y Biología celular

Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC)

Índice

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	7
3. Antecedentes.....	13
3.1. Autofagia antiviral en RBCs.....	13
3.2. Los RBCs utilizan el sistema ubiquitina-proteasoma en la degradación de proteínas.....	13
3.3. Respuesta antioxidante en RBCs	13
4. Objetivos.....	14
5. Materiales y métodos	15
5.1. Animales	15
5.2. Virus	15
5.3. Purificación RBCs	15
5.4. Exposición al virus VHSV.....	15
5.5. Tratamientos con moduladores de autofagia y proteasoma.....	16
5.6. Extracción RNA.....	16
5.7. Síntesis de cDNA.....	17
5.8. PCR cuantitativa (qPCR).....	18
5.9. Anticuerpos.....	19
5.10. Western-blot.....	20
5.11. Tinción intracelular.....	20
5.12. FACS (Fluorescence-activated cell sorting)	21
5.13. Inmunofluorescencia.....	21
5.14. Estadística y software	21
5.15. Ética	22
6. Resultados.....	23
6.1. Expresión de genes involucrados en el proceso de autofagia en RBCs expuestos al virus VHSV.	23
6.2. Expresión de la proteína LC3 en RBCs expuestos al virus VHSV.....	24
6.3. La modulación de la actividad autofágica en RBCs varía los niveles intracelulares del virus VHSV.	25
6.4. La proteína p62 es sometida a degradación en RBCs expuestos al virus VHSV.....	26
6.5. La ubiquitinación está implicada en la respuesta de RBCs frente al virus VHSV.....	26
6.6. Expresión de genes que intervienen en el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP) en RBCs expuestos al virus VHSV.....	27
6.7. Expresión de genes de enzimas antioxidantes en RBCs de trucha arcoíris expuestos al virus VHSV.	28
7. Discusión	29
8. Conclusiones y proyecciones futuras.....	32

9. Agradecimientos	32
10. Bibliografía.....	33

Lista de abreviaturas

- 3-MA: 3-metiladenina
- Baf-A1: bafilomicina A1
- GSTP1: glutatión S-transferasa P1
- Hpe: horas post-exposición
- IL: interleucina
- IPNV: virus de la necrosis pancreática infecciosa
- ISAV: virus de la anemia infecciosa de salmónidos
- MFI: Media de la intensidad de fluorescencia
- MOI: multiplicidad de infección
- PRV: ortoreovirus acuático
- RBCs: glóbulos rojos o eritrocitos
- ROS: especies reactivas del oxígeno
- SUP: sistema ubiquitina-proteasoma
- VHSV: virus de la septicemia hemorrágica vírica
- TRX: tiorredoxina

1. Resumen

La industria acuícola se encuentra amenazada por las enfermedades que producen los patógenos virales, causando graves pérdidas económicas en el sector. Es necesario encontrar diversas estrategias antivirales y es aquí donde los eritrocitos (glóbulos rojos, red blood cells, RBCs) pueden jugar un papel importante. En este trabajo, se ha estudiado como los RBCs de teleósteos son capaces de responder mediante distintos mecanismos antivirales a la exposición al virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV). Tanto por PCR cuantitativa como por citometría de flujo, se pudo observar un aumento en la actividad autofágica en RBCs de trucha arcoíris tras ser expuestos a VHSV *ex vivo*. Según los resultados obtenidos, se ha podido observar que compuestos como 3-MA o niclosamida, capaces de modular la actividad autofágica, producen variaciones en la cantidad de VHSV intracelular. Además, observamos un aumento de ubiquitinación de proteínas en RBCs de trucha arcoíris expuestos al virus. Por otro lado, los resultados obtenidos sobre la cuantificación de proteína p62 (también denominada secuestrosoma 1) indican que está involucrada en el transporte de proteínas ubiquitinadas hacia los autofagosomas. Además, VHSV es capaz de inducir la expresión de genes de respuesta antioxidante en los RBCs. De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos concluir que los RBCs de trucha arcoíris son capaces de desarrollar respuestas antivirales frente a VHSV mediadas por el sistema de autofagia.

Palabras clave: autofagia, VHSV, eritrocitos, ubiquitinación, p62, trucha arcoíris

Abstract

Aquaculture industry is threaten by viral pathogen diseases, causing severe economic losses in this field. It is necessary to find novel antiviral strategies and here the erythrocytes (red blood cells, RBCs) play an important role. In this work, it has been studied how teleost RBCs are able to respond to the exposure to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) by different antiviral mechanisms. An increment in autophagic activity could be observed in rainbow trout RBCs after being exposed to VHSV *ex vivo*, by means of quantitative PCR and flow cytometry. According to the obtained results, compounds such as 3-MA or niclosamide, were capable of modulating autophagic activity, producing variations in the amount of intracellular VHSV. In addition, we observed an increment in cellular proteins ubiquitination in rainbow trout RBCs exposed to the virus. On the other hand, the results obtained on the quantification of protein

p62 (also called sequestosoma 1) indicated that this protein is involved in the transport of ubiquitinated proteins towards autophagosomes. Furthermore, VHSV is able to induce the expression of antioxidant response genes in RBCs. According to the obtained results, we could conclude that rainbow trout RBCs were able to develop antiviral responses against VHSV, by means of the autophagy system.

Key words: autophagy, VHSV, erythrocytes, ubiquitination, p62, rainbow trout

2. Introducción

Los teleósteos, al igual que los demás vertebrados superiores, se caracterizan por poseer un sistema inmune capaz de responder de manera inespecífica y específica a cualquier estímulo extraño, como puede ser la entrada de un patógeno. Así, el sistema inmune de los teleósteos se puede dividir en dos tipos: por un lado, tenemos el sistema inmune inespecífico o innato, que constituye la primera línea de defensa y responde de manera genérica (inespecífica) a los estímulos. Por otra parte está el sistema inmune específico, también denominado adaptativo o adquirido, que involucra una respuesta más dirigida frente a antígenos específicos, generándose células inmunes tales como linfocitos T y células de memoria, así como inmunoglobulinas que permiten una respuesta eficiente y específica frente a antígenos (Rauta, Nayak et al. 2012).

El sistema inmune de los teleósteos presenta diferencias significativas respecto al sistema inmune de los mamíferos: tienen un rango reducido de anticuerpos (Bengtén, Clem et al. 2006), una deficiente maduración de la afinidad de los anticuerpos, y una proliferación de linfocitos B muy débil (Magor 2015), lo que hace indicar que la respuesta inmune innata en teleósteos sea más importante en comparación con los mamíferos. Este hecho puede ser debido al temprano estadio evolutivo del sistema inmune en teleósteos y a su carácter poiquilotérmico (Levraud and Boudinot 2009).

La acuicultura, en los últimos años, ha crecido a un ritmo ascendente en todo el mundo, siendo China el principal país contribuidor de este aumento, abarcando 2/3 de la producción acuícola mundial, según la FAO. En cambio, son muy elevadas las pérdidas en este sector debido a las infecciones virales, causada por rhabdovirus, herpesvirus y reovirus entre otras familias de virus, por lo que es importante conocer las interacciones que se producen entre estos virus y sus hospedadores con la finalidad de llevar a cabo un tratamiento efectivo frente a estas infecciones virales (Zhang and Gui 2015). Por tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias antivirales para hacer frente a las infecciones víricas. Por esto, actualmente se están investigando y desarrollando diversos métodos para el control de enfermedades virales como son el empleo de vacunas virales, medicamentos antivirales, la aplicación de inmunoestimulantes, y también se está introduciendo el uso de aditivos alimentarios en teleósteos como estrategia de prevención e intervención contra patógenos acuáticos (Kibenge, Godoy et al. 2012). Otra de las posibilidades es la búsqueda de células u otros complejos biológicos que intervengan en la respuesta inmune innata antiviral, como es la involucración de los RBCs en esta respuesta inmune innata (Morera, Roher et al. 2011, Nombela and Ortega-Villaizan 2018).

Sabemos que los RBCs son las células mayoritarias en el torrente sanguíneo y que la proteína más abundante en estos es la hemoglobina. En mamíferos, los RBCs son enucleados y presentan una forma aplanada, ovulada y bicóncava. Además, se sabe que la ausencia de núcleo en los RBCs de los organismos mamíferos es debida a la expulsión de este durante el proceso de maduración de los eritrocitos. En cambio, en los demás vertebrados no mamíferos, los RBCs se caracterizan por ser nucleados, lo que implica que puedan iniciar una respuesta específica “de novo” al estímulo.

Se ha demostrado que en animales vertebrados no mamíferos la gran diversidad de transcritos (obtenidos por análisis RNA-seq) presentes en el citoplasma de los RBCs, les otorga a este tipo de células la capacidad para responder a ciertos estímulos de manera rápida y eficaz, como son la presencia de mRNA de genes que participan de manera activa en la respuesta inmune (Morera, Roher et al. 2011).

Además, existen virus patógenos que tienen como diana los RBCs de teleósteos. Existen virus no infectivos que son capaces de inducir respuesta inmune en RBCs pero no replican en ellos, como son VHSV e IPNV. En el caso de RBCs de trucha arcoíris expuestos a VHSV, se ha descrito un aumento en la expresión de IL-8 y β -defensina 1 y una disminución de genes estimulados por IFN (Nombela, Puente-Marin et al. 2017). También se ha descrito un incremento en la producción de Nk-lisina (Pereiro, Romero et al. 2017) en RBCs de rodaballo infectados por VHSV. Igualmente, se ha descrito que IPNV induce en los RBCs de trucha arcoíris producción de proteína Mx, además de un incremento en la expresión de los genes de la ruta IFN-1 (Nombela, Carrion et al. 2017). Por otro lado, también hay virus infectivos que son capaces tanto de inducir respuesta inmune como de replicar en RBCs, entre los que se encuentra ISAV y PRV (Nombela and Ortega-Villaizan 2018). Estudios han demostrado que los RBCs de salmón del Atlántico infectado con ISAV son capaces de expresar *inf- α* , *mx*, e *isg15*, en respuesta al patógeno viral (Workenhe, Kibenge et al. 2008), hecho que también se ha visto al infectar con PRV, que además induce en RBCs la expresión de *mx*, *pkr* y genes de respuesta antiviral estimulados por IFN (Dahle, Wessel et al. 2015).

Una de las enfermedades que tiene gran importancia en la industria acuícola es la septicemia hemorrágica vírica (VHS), causada por rhabdovirus en teleósteos. Es una enfermedad que, hasta los años 80, estaba localizada exclusivamente en Europa Occidental y afectaba a la trucha arcoíris (Walker and Winton 2010). Sin embargo, a partir de 1988, se empezó a aislar el virus causante de dicha enfermedad en salmónidos del Pacífico Norte y en la zona norte del Océano

Atlántico, llegando a causar una gran cantidad de pérdidas en los criaderos marinos de peces (Crane and Hyatt 2011).

El virus causante de la septicemia hemorrágica vírica, conocido como VHSV, es un virus del género *Novirhabdovirus*, dentro de la familia *Rhabdoviridae* del orden de los *Mononegavirales*. Este agente viral se caracteriza porque presenta envoltura viral, tiene forma de bala, una simetría helicoidal, un tamaño de aproximadamente 170 nm de largo por 80 nm de ancho y su genoma está constituido por una molécula de ARN monocatenario no segmentado de polaridad negativa.

El genoma de VHSV tiene una longitud de aproximadamente 11.000 pb, y agrupa a 6 genes que se disponen siguiendo el siguiente orden: 3'-N-P-M-G-NV-L-5' (Figura 1). El gen N codifica para una nucleoproteína que empaqueta el ARN, la P para una fosfoproteína que interviene en los procesos de replicación y transcripción, la M para la proteína de la matriz, la G para una glicoproteína de superficie y la L para la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (Schutze, Mundt et al. 1999). Además, el género *Novirhabdovirus*, al que pertenecen VHSV e IHNV, contienen un gen adicional, el gen NV, que se encuentra entre el gen G y L. Es un gen que codifica para una proteína no estructural (nonvirion protein) que le da nombre a esta género y, aunque aún no se conoce cuál es su función exacta, se ha visto que juega un papel importante en el ciclo de replicación del virus (Thoulouze, Bouguyon et al. 2004).

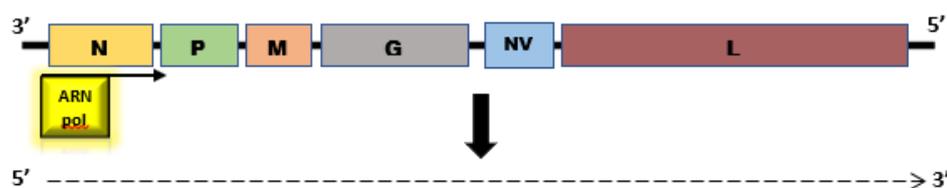


Figura 1. Genoma de VHSV (Elaboración propia).

Últimamente se ha descrito que en los RBCs existen procesos de autofagia (Pereiro, Romero et al. 2017). La autofagia es una vía degradativa celular altamente conservada de carácter catabólico, por el cual la célula es capaz de mantener la homeostasis celular gracias a la degradación de orgánulos, proteínas y otras macromoléculas celulares en estructuras denominada autofagosomas y gracias a la ayuda de los lisosomas (Parzych and Klionsky 2014). Por otro lado, el proceso de autofagia juega también un rol muy importante frente a la acción de virus en sus hospedadores celulares, ya que sirve como un mecanismo de defensa antiviral,

aunque también se ha descrito que es capaz de promover la replicación viral (Chiramel, Brady et al. 2013).

Cuando la célula necesita nutrientes y energía para subsistir se activa la vía de señalización de autofagia: la vía canónica la inician las quinasas PI3K, mTOR y AMPK (Alers, Loffler et al. 2012). La AMPK es la quinasa dependiente de AMP, por lo que cuando se produce una disminución de la energía celular, se activa esta vía que va a ocasionar la formación de autofagosomas y, por tanto, la activación de autofagia. De manera similar actúa la PI3K, proteína involucrada en la supervivencia celular por lo que activa la autofagia ayudando a la célula a conseguir una fuente energética extra. Por último, la quinasa mTOR inhibe el proceso de autofagia (Alers, Loffler et al. 2012, Wu, Feng et al. 2013)

En el proceso de autofagia y formación de autofagosomas están implicadas varias moléculas. Cuando la célula detecta falta de energía (ratio AMP/ATP es alto) la AMPK se activa, inhibiendo a mTOR y activando al complejo ULK1 (ULK1/2, ATG13, FIP200 y ATG101) (Mizushima 2010). También se puede producir la activación de este complejo por carencia de aminoácidos, glucosa o factores de crecimientos. El complejo ULK1 activa al complejo III PI3K formado, entre otras proteínas, por Beclin1, y este complejo proteico se encarga de fosforilar el fosfatidilinositol dando lugar a fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), componente de la membrana del autofagosoma. También intervienen otras proteínas involucradas en la formación y desarrollo del autofagosoma como son WIPI1 y el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1, así como proteínas involucradas en el proceso de maduración, como GABARAP. LC3 es una proteína de gran importancia en el proceso, que se puede encontrar en el citosol de la célula, en la forma LC3-I, pero cuando se activa el proceso de autofagia una serie de proteínas (ATG3, ATG4, ATG7), que poseen actividad enzimática, actúan sobre LC3-I eliminando la glicina del extremo C-terminal y conjugando la proteína con fosfatidiletanolamina (PE), dando lugar a LC3-II, que se va a unir a la membrana del autofagosoma y va a jugar un papel muy importante en la formación, elongación y fusión del autofagosoma con el lisosoma (Harnett, Pineda et al. 2017) (Figura 2).

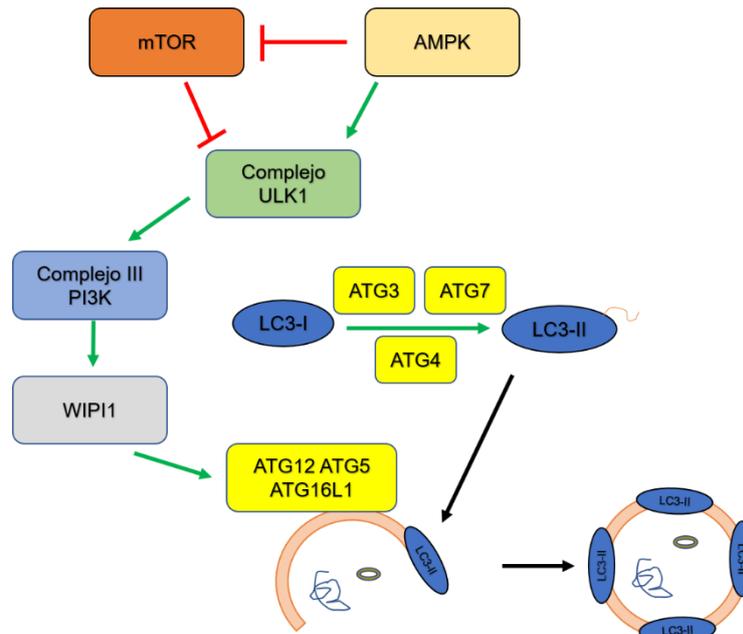


Figura 2. Mecanismo molecular de la inducción de autofagia por la vía AMPK (Elaboración propia)

Dentro de los procesos de degradación celulares, el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP) tiene un papel fundamental. El SUP es el encargado de eliminar aquellas proteínas dañadas o mal plegadas, así como proteínas reguladoras de vida corta, y de mantener y asegurar la calidad de las proteínas recién sintetizadas. En el proceso de ubiquitinación intervienen las E3 ligasas, que son tres enzimas involucradas en la activación, conjugación y unión de moléculas de ubiquitina a proteínas diana que van a ser degradadas posteriormente en el proteasoma. Por tanto, cuando se produce una infección viral en la célula, este sistema puede marcar componentes virales mediante ubiquitinación para su posterior degradación o, también, se puede producir una manipulación de este sistema por parte del virus, impidiendo su acción de defensa frente al virus y favoreciéndose la replicación viral (Luo 2016).

Es importante también destacar el papel de la proteína p62 (también denominada sequestosoma 1, SQSTM1), que actúa como una proteína adaptadora de la autofagia, de tal manera que es capaz de unirse a aquellas moléculas u orgánulos ubiquitinados y dirigirlos hacia el autofagosoma para su degradación, gracias a la afinidad existente entre p62 y LC3-II que se encuentra en la membrana del autofagosoma (Johansen and Lamark 2011). Por tanto, las moléculas ubiquitinadas pueden ser degradadas por autofagia cuando, en determinadas circunstancias, el proteasoma se encuentra saturado o su actividad está inhibida (Shaid, Brandts et al. 2013).

Finalmente, hay que destacar el papel que juegan las enzimas antioxidantes en la defensa antiviral, así como la relación que existe entre los mecanismos de respuesta antioxidante y autofagia (Filomeni, De Zio et al. 2015) . Se ha descrito la implicación de la actividad antioxidante frente a la replicación viral, donde los antioxidantes pueden suprimir el estrés oxidativo inducido por el virus y reducir la producción de RNA del virus (Gullberg, Jordan Steel et al. 2015). Separadamente, estas enzimas antioxidantes son conocidas como dianas de NF- κ B en respuesta al estímulo inflamatorio (Morgan and Liu 2011).

3. Antecedentes

3.1. Autofagia antiviral en RBCs

Los RBCs de trucha arcoíris en presencia de virus, son capaces de inducir el proceso de autofagia ya que se ha visto formación de autofagosomas en su interior. Además, se ha podido observar en estudios anteriores una asociación entre un péptido antimicrobiano (NK-lisina) y la proteína LC3 de los autofagosomas de RBCs tras ser expuestos a VHSV, lo que hace indicar que el proceso de autofagia también está involucrado en la respuesta antiviral (Pereiro, Romero et al. 2017)

3.2. Los RBCs utilizan el sistema ubiquitina-proteasoma en la degradación de proteínas

Estudios anteriores en mamíferos han demostrado la presencia de proteasoma 20S en RBCs maduros de humanos. Además, se evaluó su funcionalidad para ver si presentaba capacidad degradativa, verificándose mediante ensayos *in vitro* (Neelam, Kakhniashvili et al. 2011). En trucha arcoíris, regulación negativa en la expresión proteica de subunidades del proteasoma han sido detectadas en RBCs de trucha tras exponerlos a VHSV (Nombela, Puente-Marin et al. 2017).

3.3. Respuesta antioxidante en RBCs

Se ha descrito la relación entre la respuesta antioxidante y la respuesta al virus VHSV en RBCs de trucha arcoíris (Nombela, Puente-Marin et al. 2017). Por otro lado, el estrés oxidativo ocasionado en la célula debido al aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) puede desencadenar los mecanismos de autofagia (Filomeni, De Zio et al. 2015). Por tanto, la expresión de enzimas antioxidantes inducidas por un incremento de la autofagia podría estar involucrada en la incapacidad de replicación del VHSV en los RBCs de trucha.

4. Objetivos

La causa por la que los RBCs de trucha arcoíris atrapan o frenan la infección por VHSV es todavía desconocida. Además, el estudio del papel que juegan los RBCs en las infecciones virales está en estudio. Por tanto, los objetivos que se presentan en este trabajo son los siguientes:

- 1) Evaluar el papel de la autofagia en la respuesta de los RBCs de trucha arcoíris a VHSV.
- 2) Evaluar el papel del sistema ubiquitina-proteasoma en la respuesta de los RBCs a VHSV.
- 3) Dilucidar el mecanismo molecular de relación entre ambos procesos degradativos, a través de la proteína p62.
- 4) Expresión de genes de enzimas antioxidantes en la respuesta de los RBCs a VHSV

5. Materiales y métodos

5.1. Animales

Para la realización de los ensayos se empleó un organismo modelo en acuicultura como es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), con ejemplares de una longitud media aproximada de 10-12 centímetros. El mantenimiento y la alimentación de los ejemplares se han realizado en el animalario de la Universidad Miguel Hernández de Elche por personal especializado, controlando y manteniendo en todo momento una temperatura óptima para el bienestar de las truchas.

5.2. Virus

La cepa de VHSV empleada en este trabajo ha sido el aislado 07.71 (LeBerre, Metzger et al. 1977), propagado sobre línea celular EPC (epitelioma papuloso de carpa). Fue almacenado a -80°C hasta su uso.

5.3. Purificación RBCs

En primer lugar, las truchas fueron sacrificadas empleando como anestésico metanosulfonato de triclaína a 0,2 g/l. Tras esto, haciendo uso de jeringas de insulina (NIPRO), se sacaron en torno a 100 µl de sangre de la vena caudal del pez y se depositaron en un tubo eppendorf que contenía medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de FBS (suero fetal bovino) (Cultek), penicilina 100 U/ml (Sigma-Aldrich) y estreptomicina 100 µg/ml (Sigma-Aldrich). Luego, los RBCs fueron purificados de las muestras de sangre obtenidas mediante un gradiente de densidad Ficoll (Histopaque-1077) (Sigma-Aldrich). Para ello, las muestras de sangre se depositaron lentamente con una pipeta Pasteur 2 ml y se centrifugaron a 1600 rpm durante 30 min y, una vez pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante y los RBCs depositados en el fondo del tubo se resuspendieron con RPMI 2% FBS para ser centrifugados de nuevo en las mismas condiciones. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con RPMI 2% FBS, durante 5 minutos a 1600 rpm. Finalmente, los RBCs ya purificados se añadieron en frascos de cultivo celular con medio RPMI 10% FBS a una densidad celular de 10^7 células/ml y se incubaron a 14°C.

5.4. Exposición al virus VHSV

Los RBCs purificados fueron expuestos a VHSV a diferentes multiplicidades de infección (MOI) dependiendo del ensayo realizado, haciendo uso de medio RPMI 2% FBS, e incubando las muestras con el virus durante 3 horas a 14°C. La multiplicidad de infección es un parámetro

que hace referencia al número de partículas virales que infecta una célula, y se calcula empleando la siguiente ecuación:

$$MOI = \frac{\text{Titulo del virus} \left(\frac{\text{virus}}{\text{ml}} \right) \cdot X \cdot \text{Volumen de infección (ml)}}{\text{Número de células}}$$

Trascurrido el tiempo de incubación de los RBCs con el virus, se centrifugaron las muestras a 1600 rpm durante 5 minutos (14°C) para eliminar el virus en sobrenadante y se realizó un lavado de los RBCs con RPMI 2% FBS. Finalmente, los RBCs se incubaron en RPMI 2% FBS el tiempo indicado en cada ensayo. En los experimentos de expresión de genes a lo largo del tiempo, el virus no fue retirado.

5.5. Tratamientos con moduladores de autofagia y proteasoma

Como moduladores de la autofagia se utilizaron 3-metiladenina (3-MA) (Sigma-Aldrich) (inhibidor / activador), bafilomicina A1 (Baf-A1) (Sigma-Aldrich) (inhibidor) y niclosamida (Sigma-Aldrich) (activador). MG132 (Sigma-Aldrich) fue empleado como inhibidor del proteasoma. Los distintos tratamientos de los moduladores citados se realizaron después de exponer los RBCs al virus, como previamente se ha descrito, tras retirar el virus y realizar un lavado con RPMI 2 % FBS. Dichos compuestos se diluyeron en RPMI 2 % FBS a las concentraciones y tiempos de incubación indicados en cada figura.

5.6. Extracción RNA

Para la extracción de RNA se empleó el kit E.Z.N.A.® Total RNA Kit de Omega Bio-tek, siguiéndose el siguiente protocolo:

1. Se añadieron 300 µl de buffer de lisis TRK en un tubo de 1.5 ml que contienen las muestras de células de las que vamos a extraer el RNA. También se le añadió 20 µl de β-mercaptoetanol por cada ml de TRK empleado.
2. A cada tubo, se le añadió 600 µl de una disolución de proteinasa K (580 µl de agua libre de RNasa y 20 µl de proteinasa K) con el fin de completar la lisis celular y la degradación proteica.
3. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 55°C (temperatura óptima de la proteinasa K) para que alcance su máxima actividad catalítica.

4. Se añadieron 450 μl de etanol absoluto a cada muestra para precipitar los ácidos nucleicos.
5. Posteriormente, se cogieron 700 μl de las muestras y se añadieron a las columnas de extracción de RNA (colocadas previamente sobre un tubo recolector). Se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto y se descartó el líquido que hay en el tubo colector.
6. Se repitió el paso anterior con los 700 μl restantes.
7. A continuación, se realizaron los lavados: primero se añadieron 700 μl de WBI (Wash Buffer I) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 min. Luego, tras descartar el eluido del tubo recolector, se añadieron 700 μl de WBII (Wash Buffer II) y se volvió a centrifugar. Este último lavado se realizó dos veces.
8. Consecutivamente, se realizó un secado de la columna, donde se descartó el tubo recolector que teníamos hasta el momento, sustituyéndose por uno nuevo y se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 minutos.
9. Finalmente, se descartó el tubo recolector, la columna se colocó en un eppendorf de 1.5 ml, se añadieron 30 μl de agua libre de RNAsa para eluir el RNA que ha sido retenido en la columna y se centrifugó durante 2 minutos a 10.000 rpm. Al final, obtenemos en el eppendorf aproximadamente 25 μl de RNA, que se va a conservar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tras la extracción del RNA, se procedió a cuantificarlo haciendo uso del NanoDrop® (Nanodrop Technologies). Una vez cuantificado el RNA, las muestras fueron tratadas con enzima DNAsa haciendo uso del kit TURBO™ DNase (Thermo Fischer Scientific) con el objetivo de eliminar el ADN genómico de la muestra. Para ello se añadió a cada muestra buffer de DNAsa junto con la DNAsa y se colocaron en el termobloquer durante 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura óptima de la DNAsa). Trascorrida la media hora, se añadió el buffer inactivador de la DNAsa y se centrifugó a 11.400 rpm durante 1 minutos y 30 segundos. Al final, el sobrenadante (donde se encuentra el RNA sin restos de ADN genómico) se transfirió a un tubo eppendorf nuevo.

5.7. Síntesis de cDNA

Para obtener cDNA a partir del RNA extraído, se realizó una PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR). Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo la desnaturalización del RNA en tubos de 200 μl . A las muestras de RNA se le añadieron dNTPs (concentración final de 50nM) (Thermo Fisher) y Random hexamers (1.25 μM) (Thermo Fisher) y la desnaturalización del RNA se realizó en un ciclo a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos haciendo uso del termociclador (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems). Al terminar este proceso, los tubos se dejaron en hielo

durante un minuto. A continuación, se añadieron a los tubos la enzima, que es la transcriptasa inversa M-MLV a concentración final de 5 U/ μ l (Invitrogen & Thermo Fischer Scientific Inc.), el inhibidor de RNAsa a 0.5 U/ μ l (Invitrogen), DTT a 10 nM (Invitrogen) y First Strand Buffer RT 1x (Invitrogen). Las muestras se volvieron a introducir en el termociclador para llevarse a cabo la síntesis de cDNA haciéndose uso del RNA desnaturalizado y las condiciones que se siguieron fueron 3 ciclos distintos de 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 37 °C y 15 minutos a 70 °C. Las muestras de cDNA se mantuvieron a -20 °C hasta que fueron empleadas.

5.8. PCR cuantitativa (qPCR)

Mediante qPCR se determinaron los niveles de expresión de determinados genes de interés, con el sistema ABI PRISM 7300 (Applied Biosystem, Thermo Fischer Scientific Inc.). Para ello, se preparó una mezcla de reacción de 20 μ l que contenía el volumen de cDNA correspondiente a 12 ng, los cebadores de los genes a estudio en una concentración de 900 nM, la sonda correspondiente a una concentración 200 nM y 10 μ l de master mix Taqman PCR (Applied Biosystem, Thermo Fischer Scientific Inc.). Una vez preparadas las mezclas de reacción, estas se incorporaron a sus pocillos correspondientes de la placa de PCR, se centrifugó a 2000 rpm durante 4 minutos y se introdujo en el sistema con las siguientes: inicialmente se mantuvo a 50 °C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos para, seguidamente, aplicar 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y un minuto a 60°C.

El gen que se utilizó como control endógeno fue el rRNA 18S (Applied Biosystem, Thermo Fischer Scientific Inc.) y el análisis de la expresión génica se realizó haciendo uso del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen 2001), donde la $\Delta\Delta C_t$ se obtiene restando el promedio de las condiciones control en cada tiempo a la ΔC_t de cada tiempo.

En la Tabla 1 se recogen las secuencias de los cebadores y sondas empleados en la qPCR.

Tabla 1. Secuencia de cebadores y sondas empleados para cada uno de los genes utilizados, así como el número de acceso o de referencia

Gen	Secuencia del cebador 5'-3' hacia delante	Secuencia del cebador 5'-3' reverso	Sonda (5'-3')	Nº acceso o de referencia
<i>atg12</i>	TCCTACAGAAACGCAA AAAGATGA	GTCTGCCATCCCCGAG TCT	CCTTCAACCCCAACAACAG CTACGG	XM_021623074
<i>atg7</i>	TAGATGTGGTGGAGGT GATGTGTT	GGTTCTTCTCCATCCT ACATTCTT	AGCACAGCATCGTGTCC AGGTCAAAC	XM_021610791
<i>atg4b</i>	GATCCTGTCCCTGTGAT GATGA	CCCCTATTGGCTTCCT TCT	ACCCCCCGGGCGATTCT TC	XR_002473879
<i>beclin1</i>	GCGTGGGTGTCGTCTCA GTT	CAGGGAAGCAAGGAG AGCAT	ACCCTGGGTGTGCCCTT GACC	NM_001124429
<i>gabarp</i>	CCTCATCCATCCATTTT TACCTCTT	ATTCAACCGAAATCCC CATCT	TCTGAATTTTATTGCTT CCGGGTCTCC	NM_001165091
<i>lc3a</i>	AGGCCAGCTGTGTGTGT TTCTA	GTTGCACATAGCGTTCC TGTTTA	TTTGCCCCCGGATGAT TGA	XM_021609094
<i>pik3c3</i>	AGGCCAGCTGTGTGTGT TTCTA	GTTGCACATAGCGTTC CTGTTTA	TTTGCCCCCGGATGAT TGA	XM_021577851
<i>ulk1</i>	CTTCTGCTGCTGGGTCT TCTG	GGTGACGGAAGAACTC CTCAA	CGAAACCACAAGGACCG CATGGA	XR_002473462
<i>wipi1</i>	CAAAGACATGAAGCTG CTGAAGA	GGTTCACAGAGAGGGC ACAGA	CTCAACACGCCCCACAA CCCCT	XM_021581280
<i>keap1</i>	CCTCCACAAGCCACCA A	AAGTATCCCCCTGCCG TGTA	CACGCCCAAAGTGCCCC AGC	XM_021556738.1
<i>cul3</i>	GCAGTTACGTTACAGC ATCACA	TGGTGTGGAGCCTGTT ACCT	AACGCCACCTTCTACGGC CCAATC	XM_021587294.1
<i>n-vhsv</i>	GACTCAACGGGACAGG AATGA	GGGCAATGCCAAGTT GTT	TGGGTGTTCACCCAGGC CGC	(Chico, Gomez et al. 2006)
<i>gstp1</i>	CCCCTCCCTGAAGAGTT TTGT	GTAGTTTCTTGTAGGCG TTAGA	-	XM_021584181.1
<i>nkef</i>	CGCTGGACTTCACTTT GT	ATTTACAACCGATTTT CCTAAAC	-	XM_021589082.1
<i>trx</i>	AGACTTTACAGCGTCT GGT	ACGTGCACCTTGAGGA AAAC	-	XR_002468991.1

5.9. Anticuerpos

Los anticuerpos empleados en los ensayos fueron los siguientes:

- Anti-LC3A/B (Cell Signaling Technology).
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-N-VHSV (2C9) donado por el laboratorio del Dr. Julio Coll (Sanz, Basurco et al. 1993).
- Anti-p62/SQSTM1 (www.antibodiesonline.com).

- Anti-ubiquitina (StressMarq).
- Anticuerpo policlonal de conejo contra la α -actina humana (Sigma-Aldrich). Fue empleado como control de carga en western blot.

5.10. Western-blot

Para llevar a cabo la detección de ubiquitina mediante western-blot, las muestras de RBCs fueron lavadas con PBS 3 veces y fueron resuspendidas en PBS junto con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Tras esto, se llevó a cabo la rotura celular mediante 3 ciclos de congelación-descongelación y haciendo uso de micropistilos (Sigma-Aldrich). Se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 5 minutos, se desechó el pellet, que es donde se encuentra los restos celulares, y se recogió el sobrenadante, donde están las proteínas de interés. Para realizar el western-blot, se añadió buffer de carga reductor a las muestras de proteínas y se desnaturalizaron a 100 °C 5 minutos. Posteriormente, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 16 % (Invitrogen). La electroforesis fue llevada a cabo durante 100 minutos a un voltaje de 100 V y, al finalizar, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.4 μ M (BioRad). La transferencia se realizó durante 120 minutos a 100 V en un buffer de transferencia compuesto por Tris (concentración final 2.5 mM), glicina (concentra final 9 mM) y metanol (20 %). Finalizada la transferencia, la membrana fue bloqueada con buffer de bloqueo (5% de leche en polvo y 0.2% de Tween-20 en PBS). A continuación, la membrana se dejó incubar durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de conejo frente a la ubiquitina, o bien anticuerpo policlonal de conejo frente a la α -actina). Acabado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados (cada uno de ellos de 10 minutos) de la membrana con tampón PBS (0.2 % de Tween-20) y se procedió a incubar la membrana durante 60 minutos con anticuerpo secundario combinado con peroxidasa hecho en cabra capaz de reconocer el anticuerpo primario de conejo o ratón añadido anteriormente (Sigma-Aldrich). Para finalizar, la membrana se volvió a lavar 3 veces con PBS Tween-20 0.2 %.

Para detectar la actividad peroxidasa se emplearon reactivos de detección ECL (Amersham Biosciences) y el revelado se realizó por exposición a rayos X sobre películas de alto rendimiento a quimioluminiscencia Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

5.11. Tinción intracelular

Primero, los RBCs fueron fijados durante 20 minutos con medio RPMI que contenía paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4 % (PFA) y glutaraldehído (Sigma-Aldrich) al 0,008 %.

Tras el fijado inicial, se llevó a cabo un proceso de permeabilización donde los RBCs fueron incubados en tampón de permeabilización (PBS al 0,05 % de saponina (Sigma-Aldrich)), durante 15 minutos. A continuación, se diluyó el anticuerpo primario en el tampón de permeabilización a la dilución recomendada por el suministrador y los RBCs fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación con el anticuerpo primario, de la misma forma se procedió con el anticuerpo secundario y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar cada incubación se realizaron lavados con el tampón de permeabilización. Finalmente, se realizó la fijación final con PBS al 1 % de PFA, para posteriormente, realizar su correspondiente análisis por citómetro de flujo (FC) o inmunofluorescencia (IF). En el caso del anticuerpo LC3 A/B, se realizó una fijación con metanol de 15 minutos entre la fijación con PFA/glutaraldehído y la permeabilización.

5.12. FACS (Fluorescence-activated cell sorting)

Para realizar el análisis por citometría de flujo se utilizó el citómetro BD FACSCanto II (BD Biosciencias), un sistema HTS que utiliza buffer NaCl 0,9 % y que emplea 3 tipos de láseres: azul (488 nm), rojo (633 nm) y violeta (405 nm). Los anticuerpos secundarios que se emplearon para la detección de la fluorescencia en los RBCs analizados fueron el GAM-FITC (para el anticuerpo 2C9) y GAR-FITC (para anti-LC3 A/B). GAR-APC fue empleado como anticuerpo secundario en las tinciones en las que se empleó anti-p62.

5.13. Inmunofluorescencia

El sistema utilizado para la obtención de imágenes de epifluorescencia fue el analizador de imagen IN Cell Analyzer 6000 (GE HealthCare). Para la obtención de imágenes por inmunofluorescencia, previamente se añadió a la tinción realizada DAPI (1/3000) para la tinción del núcleo celular. La exposición a los distintos láseres fue: (0.1s DAPI) y (1.5s FITC/APC). Las imágenes mostradas son representativas de al menos 10 campos por condición.

5.14. Estadística y software

Para el análisis y representación de histogramas de los datos obtenidos por citometría flujo se empleó el programa Weasel 3.0.1. Para el cálculo estadístico y representación gráfica de los datos obtenidos por qPCR, se empleó el programa GraphPad Prism 6. El análisis estadístico empleado se indica en el pie de figura de cada ensayo. Los p-valores obtenidos se representan siguiendo la siguiente leyenda (*, p-valor < 0.05; **, p-valor < 0.01). Todas las figuras incorporadas vienen representadas con la media y la desviación estándar de las variables medidas en cada ensayo.

5.15. Ética

Todos los métodos y protocolos experimentales que se han llevado a cabo sobre animales han sido examinados y validados por el Comité de Ética en la Investigación Animal (CEIE) y Cuerpo de Bienestar Animal, y realizados bajo supervisión de personal cualificado para desempeñar dichas tareas, que han seguido unos principios éticos en conformidad con el Real Decreto 53/2013 y la Directiva UE 2010/63/UE

6. Resultados

6.1. Expresión de genes involucrados en el proceso de autofagia en RBCs expuestos al virus VHSV.

En primer lugar, con la finalidad de determinar la capacidad que tiene el virus VHSV para inducir una respuesta autofagica en RBCs, se llevó a cabo un ensayo en el que se estudió la expresión de diferentes genes que actúan en la vía de señalización de la autofagia, así como genes implicados en la formación y desarrollo de los autofagosomas, mediante qPCR.

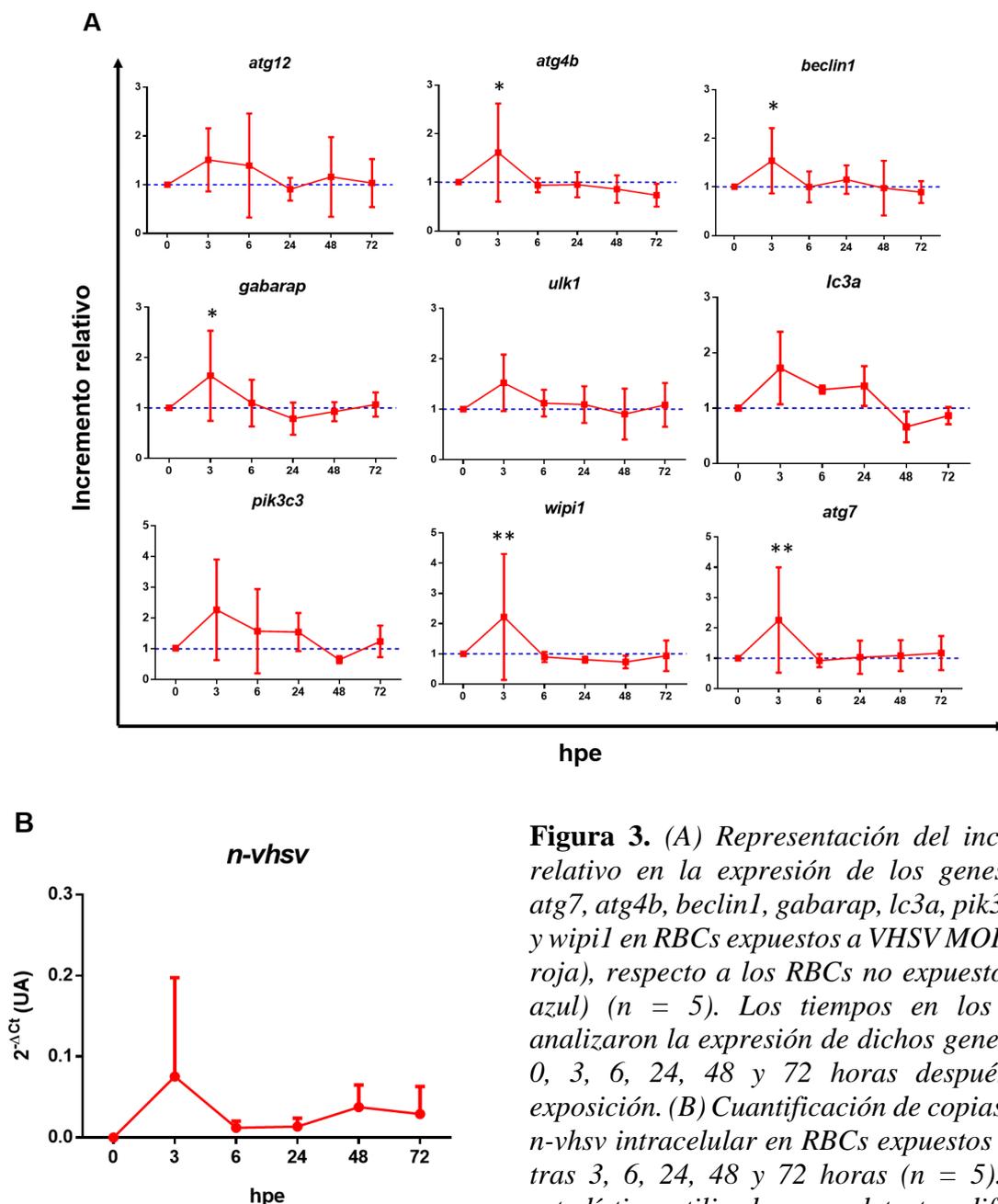


Figura 3. (A) Representación del incremento relativo en la expresión de los genes *atg12*, *atg7*, *atg4b*, *beclin1*, *gabarap*, *lc3a*, *pik3c3*, *ulk1* y *wipi1* en RBCs expuestas a VHSV MOI 1 (línea roja), respecto a los RBCs no expuestas (línea azul) ($n = 5$). Los tiempos en los que se analizaron la expresión de dichos genes fueron 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas después de la exposición. (B) Cuantificación de copias del gen *n-vhsv* intracelular en RBCs expuestas a VHSV tras 3, 6, 24, 48 y 72 horas ($n = 5$). El test estadístico utilizado para detectar diferencias significativas fue ANOVA de dos vías.

En todos los genes analizados se puede apreciar un incremento en la expresión a 3 horas post-exposición (hpe). A partir de 6 hpe no se observó ningún incremento relevante en la expresión de los genes (Figura 3A). La figura 3B representa la cinética de *n-vhsv* intracelular en RBCs, apreciándose un aumento a 3 hpe mientras que a partir de 6 hpe desciende.

6.2. Expresión de la proteína LC3 en RBCs expuestos al virus VHSV.

Se realizaron ensayos a nivel de proteína para detectar la proteína autofágica LC3 en RBCs expuestos a VHSV. Para ello se emplearon las técnicas de inmunofluorescencia y citometría de flujo, donde los RBCs fueron previamente teñidos intracelularmente con el anticuerpo anti-LC3 A/B a 24 y 72 hpe al virus.

En la Figura 4A, se puede observar que los RBCs expuestos a VHSV presentan una mayor expresión de la proteína LC3 en comparación con los RBCs no expuestos al virus, después de 24 hpe, y que los puntos fluorescentes correspondientes a LC3 se encuentran próximos al núcleo. Además, se aprecia un aumento significativo en la expresión de la proteína LC3 conforme aumenta la MOI del virus, tanto en RBCs a 24 hpe como a 72 hpe (Figura 4B).

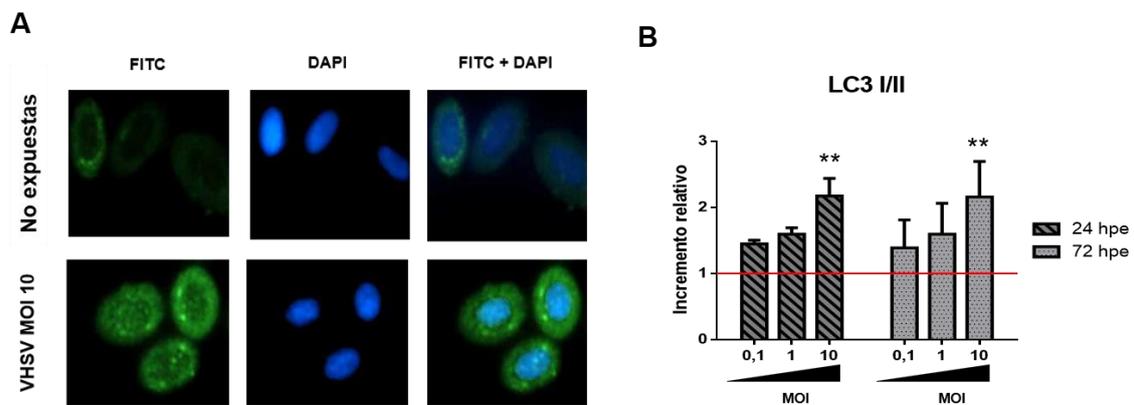


Figura 4. Expresión en la proteína LC3 I/II en RBCs de trucha tras ser expuestos al virus VHSV. (A) Inmunofluorescencia en RBCs no expuestas y expuestas a VHSV a MOI 10. Los RBCs fueron teñidos con anti-LC3 tras 24 hpe para ver el marcaje de la proteína (color verde, FITC). Los núcleos se tiñeron empleando DAPI (color azul). (B) Incremento relativo de la fluorescencia media en la expresión de la proteína LC3 I/II tras 24 y 72 hpe a MOI 0.1, 1 y 10, respecto a RBCs no expuestas (línea roja) ($n = 5$), determinado por citometría de flujo. El test estadístico utilizado para detectar diferencias significativas fue el test Kruskal-Wallis.

6.3. La modulación de la actividad autofágica en RBCs varía los niveles intracelulares del virus VHSV.

Tras los ensayos para la determinación de respuesta autofágica de los RBCs en respuesta a VHSV, se procedió a realizar ensayos en los que se trató de modular el proceso de autofagia para ser capaces de controlar su actividad degradativa. Para ello se emplearon 3 compuestos: 3-metiladenina (3-MA) (inhibidor / activador), bafilomicina (Baf-A1) (inhibidor) y niclosamida (activador).

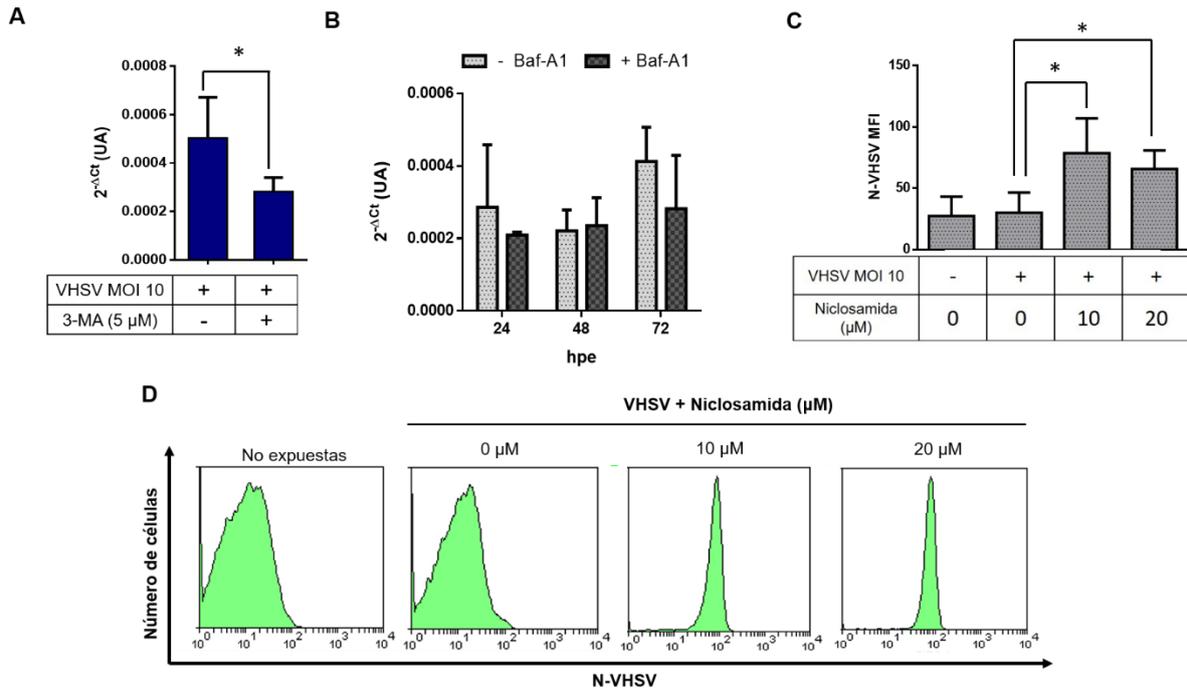


Figura 5. (A) Incremento relativo en la expresión del gen *n-vhsv* en RBCs expuestos al virus VHSV a MOI 10, tratados o no con 3-MA a 24 hpe ($n = 7$). El test estadístico empleado para establecer diferencias significativas fue Mann-Whitney. (B) Expresión del gen *n-vhsv* en RBCs expuestos a VHSV a MOI 10, tratados o no con bafilomicina, después de 24, 48 y 72 hpe ($n = 4$). (C) Medias de la intensidad de fluorescencia (MFI) de la proteína N-VHSV en RBCs de trucha arcoíris no expuestos, expuestos a VHSV y expuestos a VHSV y posteriormente tratados con niclosamida a 10 y 20 μM, después de 72 hpe. ($n = 6$). El test estadístico Kruskal-Wallis fue empleado para establecer diferencias significativas. (D) Histograma representativo de la expresión intracelular de la proteína N-VHSV en RBCs de trucha arcoíris en las condiciones indicadas después de 72 hpe.

En la Figura 5A, el tratamiento con 3-MA de los RBCs expuestos a VHSV conlleva a una disminución del nivel de expresión a nivel de RNA del gen viral *n-vhsv* a 24 hpe, determinado por qPCR. Por otro lado, al tratar los RBCs con el inhibidor de autofagia Baf-A1 tras exponerlos a VHSV, no se observan cambios en la expresión de *n-vhsv* en RBCs expuestos a VHSV MOI 10, tras 24, 48 y 72 hpe (Figura 5B). Además, se realizaron tratamientos de los RBCs con niclosamida a 10 y 20 μM tras exponer los RBCs a VHSV y, después de 72 hpe, se realizó una

tinción intracelular usando el anticuerpo 2C9. Los resultados obtenidos en los histogramas muestran un aumento de la proteína N de VHSV en RBCs expuestos al virus y tratados con niclosamida a ambas concentraciones, en comparación con los RBCs expuestos exclusivamente al virus (Figura 5C y 5D).

6.4. La proteína p62 es sometida a degradación en RBCs expuestos al virus VHSV.

Evaluamos el papel que juega la proteína p62 en el proceso de degradación autofágica en RBCs de trucha arcoíris expuestos a VHSV. Esta proteína actúa marcando proteínas ubiquitinadas para después transportarlas a los autofagosomas para su degradación. Por citometría de flujo, se cuantificaron los niveles intracelulares de p62 en RBCs expuestos a VHSV tras 6 hpe. Tanto en el histograma de la Figura 6A como en la representación de las medias de la intensidad de fluorescencia de la Figura 6B, se muestra que tras 6 hpe se puede apreciar una disminución de los niveles de p62 en RBCs expuestos a VHSV en comparación con los RBCs no expuestos.

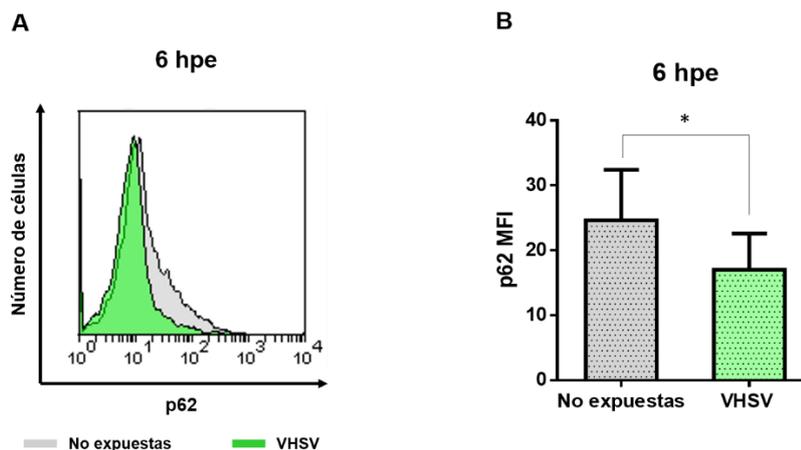


Figura 6. (A) Histograma representativo de la expresión intracelular de p62 en RBCs de trucha arcoíris expuestos a VHSV a MOI 10 o no expuestos tras 6 hpe. (B) Media de la intensidad de fluorescencia de p62 en RBCs de trucha expuestos VHSV a MOI 10 o sin exponer, tras 6 hpe ($n = 5$). El test estadístico empleado para establecer diferencias significativas fue Mann-Whitney.

6.5. La ubiquitinación está implicada en la respuesta de RBCs frente al virus VHSV.

Para comprobar la ubiquitinación de las proteínas celulares y virales en RBCs de trucha arcoíris expuestos a VHSV, se realizó un western-blot haciendo uso del anticuerpo anti-ubiquitina en muestras de RBCs no expuestos o expuestos a VHSV, con o sin el inhibidor de proteasoma MG132.

Según los resultados obtenidos, se observó un incremento de la ubiquitinación de proteínas en RBCs expuestos a VHSV con respecto a los no expuestos. También se pudo apreciar incremento en la ubiquitinación en RBCs no expuestos pero tratados con MG132 y dicho incremento fue aún mayor en RBCs expuestos a VHSV y tratados con MG132 (Figura 7A). Sin embargo, por citometría de flujo no se detectaron cambios cuantitativos a nivel intracelular de la proteína N-VHSV en RBCs expuestos a VHSV y tratados con el inhibidor de proteasoma MG132 a concentraciones de 1 y 5 μM en comparación con RBCs expuestos exclusivamente al virus (Figura 7B).

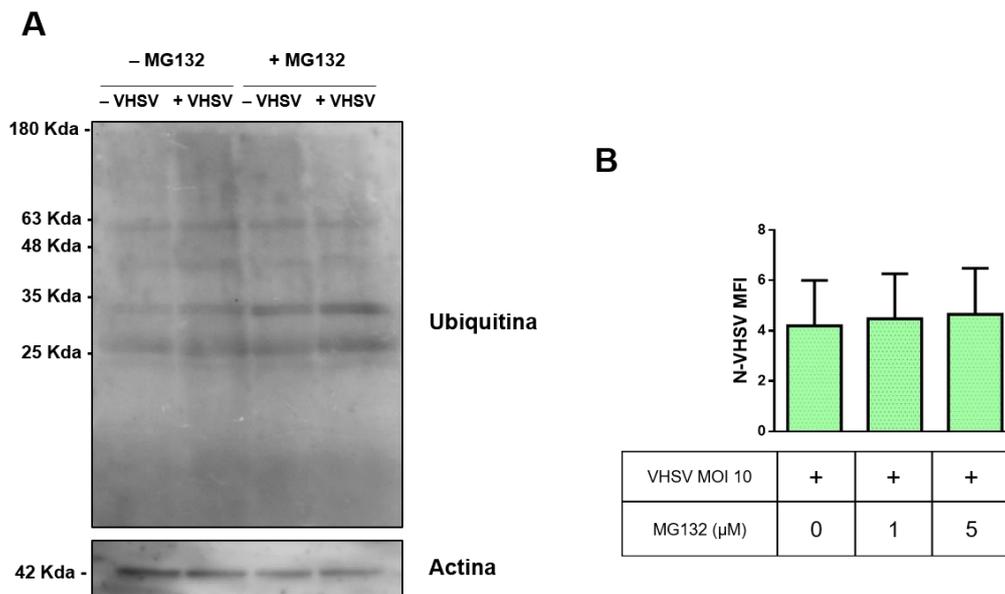


Figura 7. (A) Detección de proteínas ubiquitinadas por western-blot en RBCs expuestos a VHSV. RBCs de trucha arcoíris fueron expuestos, o no, a VHSV MOI 10, con o sin MG132 10 μM , tras 24 hpe. La proteína α -actina fue empleada como control de carga. (B) Media de la intensidad de fluorescencia en RBCs tratados o no con MG132 tras ser expuestos a VHSV a MOI 10 ($n = 4$).

6.6. Expresión de genes que intervienen en el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP) en RBCs expuestos al virus VHSV.

Con el propósito de evaluar la implicación del SUP en RBCs de trucha arcoíris tras exponerlos a VHSV, se analizó mediante qPCR la expresión del gen *cul3*, un componente fundamental de complejo E3-ubiquitina ligasa, y del gen *keap1*, una proteína que actúa como un adaptador de sustrato para el complejo E3-ubiquitina ligasa.

Según los resultados obtenidos, en la Figura 8 se puede observar un incremento en la expresión de *keap1* tras 24 hpe, mientras que el incremento en la expresión de *cul3* se observa a 3 hpe.

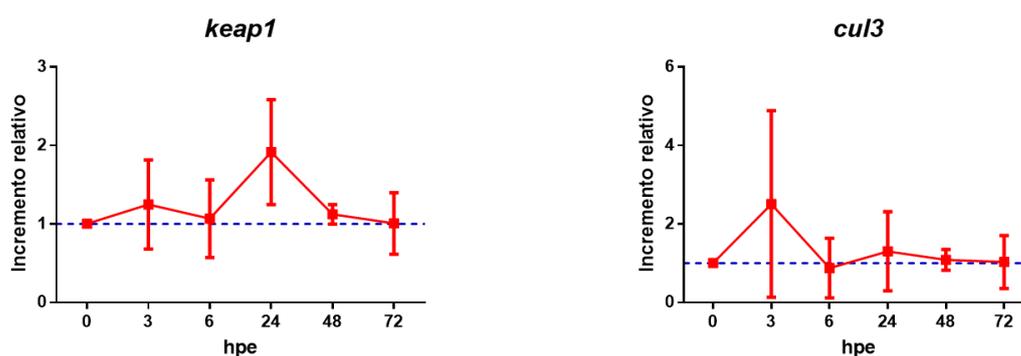


Figura 8. Incremento relativo en la expresión de los genes que intervienen en el SUP, *keap1* y *cul3*, en RBCs de trucha arcoíris expuestos a VHSV, MOI 1, respecto a los no expuestos (línea azul)(n = 4). Los tiempos en los que se analizó la expresión de dichos genes, fueron de 0, 3, 6, 24, 48, 72 hpe. El test estadístico utilizado para detectar diferencias significativas fue ANOVA de dos vías.

6.7. Expresión de genes de enzimas antioxidantes en RBCs de trucha arcoíris expuestos al virus VHSV.

Para finalizar, se determinó la expresión de genes de enzimas antioxidantes tiorredoxina (*trx*), glutatión S-transferasa P1 (*gstp1*) y factor de aumento de natural killer (*nkef*) en RBCs de trucha arcoíris expuestos a VHSV, como correlación con la respuesta autofágica.

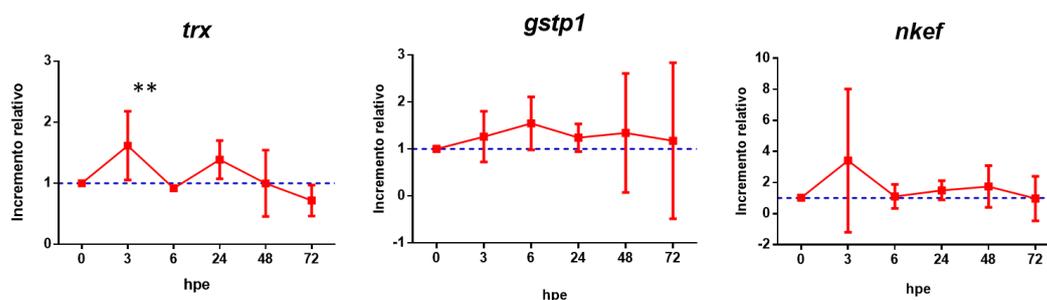


Figura 9. Incremento relativo en la expresión de los genes de enzimas antioxidantes *trx*, *gstp1*, *nkef* en RBCs de trucha arcoíris expuestos a VHSV a MOI 1, respecto a RBCs no expuestos (línea azul)(n=5). Los tiempos en los que se analizó la expresión de dichos genes fueron 0, 3, 6, 24, 48 y 72 hpe. El test estadístico utilizado para detectar diferencias significativas fue ANOVA de dos vías.

Tras obtener por qPCR los niveles de expresión de los genes *trx*, *gstp1* y *nkef*, se pudo observar en RBCs de trucha arcoíris expuestos a VHSV un incremento de la expresión de dichos genes a 3 hpe, como se puede observar en la Figura 9.

7. Discusión

Estudios previos han demostrado la implicación de los RBCs de teleósteos en la defensa antiviral (Nombela and Ortega-Villaizan 2018). En este estudio, se ha podido demostrar que en RBCs de trucha arcoíris se desencadena la autofagia como mecanismo antiviral capaz de degradar intracelularmente proteínas virales del virus VHSV, por lo que este proceso actúa como un mecanismo de protección frente al virus. Ya se tenían evidencias anteriores sobre la capacidad que tiene el VHSV y otros rhabdovirus de inducir autofagia defensiva en las células que infecta (Shelly, Lukinova et al. 2009, Garcia-Valtanen, Ortega-Villaizan Mdel et al. 2014, Wang, Chen et al. 2016) o con otros virus como el dengue (Datan, Roy et al. 2016). El aumento de la expresión de genes relacionados con la autofagia se observó a 3 hpe, coincidente con los máximos niveles de *n-vhsv* intracelular, mientras que a 24 hpe se observó un aumento de expresión a nivel de proteína (concretamente de LC3), lo que nos indica que la replicación de VHSV se inhibe o frena al poco tiempo de producirse la exposición al virus, provocando que este virus no sea infectivo. Existe también la posibilidad de alterar la actividad autofágica con el fin de inducir una mayor actividad o, en caso contrario, inhibir su actividad para que la célula sea capaz de sacar beneficio de esta modulación y, así, protegerse de la infección viral. Para ello, se ha empleado la 3-MA, un compuesto que se caracteriza por su efecto dual sobre la autofagia, de tal manera que actúa como inhibidor de la autofagia en periodos cortos de tiempo, mientras que un tratamiento prologando con 3-MA induce autofagia en la célula (Wu, Tan et al. 2010). Nuestros resultados mostraron una disminución de VHSV en RBCs expuestos al virus y tratados con 3-MA en comparación con los RBCs expuestos al virus y no tratados con 3-MA, como consecuencia de la inducción de autofagia al realizar tratamientos prolongados con 3-MA. Inesperadamente, el uso del inhibidor de autofagia Baf-A1 no produjo cambios en los niveles intracelulares del gen *n-vhsv*, posiblemente debido a una rápida degradación por lisosoma. Por otro lado, la niclosamida, un inhibidor de la degradación del autofagosoma vía lisosoma (Li, Khambu et al. 2013), provocó un aumento intracelular de la proteína N-VHSV, lo que indica que es el proceso de autofagia el principal encargado de la degradación y eliminación del virus, ya que no se observó un incremento del virus al usar el inhibidor de proteasoma MG132 en RBCs expuestos a VHSV.

Asimismo, se ha visto que las células infectadas por virus son capaces de ubiquitinar proteínas virales para su degradación posterior en el proteasoma, aunque también hay constancia de que los virus pueden sacar ventaja de este sistema induciendo la degradación de diversas proteínas celulares que limitan el crecimiento viral, generándose así un entorno favorable para el virus en

el interior celular (Luo 2016). Por ello, es importante conocer el vínculo que se establece entre la ubiquitinación y el proceso de autofagia, mediante el estudio de la proteína p62 (V. Cohen-Kaplan, I. Livneh et al. 2016), que funciona como adaptador proteico conduciendo las proteínas celulares y/o virales, que han sido previamente marcadas por ubiquitinación, hacia el autofagosoma para su degradación. Nuestros resultados mostraron que los niveles de p62 disminuían en RBCs expuestos a VHSV, indicando que éste es degradado en el autofagosoma junto con proteínas celulares y/o del virus cargadas en el autofagosoma. Por otro lado, respecto al SUP, los resultados obtenidos mostraron que los RBCs de trucha arcoíris expuestos al virus aumentaron la expresión de los genes *cul3* y *keap1*, que forman parte del complejo E3-ligasa encargada de la ubiquitinación de proteínas, lo que indica que VHSV induce la activación de la ubiquitinación. Estos resultados junto con el incremento de ubiquitinación de proteínas en RBCs expuestos a VHSV obtenido por western-blot, nos indicó que la ubiquitinación podría intervenir como mecanismo de degradación de proteínas celulares y/o virales en RBCs expuestos al virus. Además, la inhibición del proteasoma por MG132 dió lugar a un incremento aún mayor de las proteínas ubiquitinadas ya que, al estar el proteasoma inhibido, estas proteínas ubiquitinadas no se pueden degradar en él, acumulándose en el interior celular. Esta ubiquitinación también se ha visto en proteínas de la cápside del virus del Nilo Occidental (Ko, Lee et al. 2010) y el virus de la hepatitis C (Suzuki, Moriishi et al. 2009). Un esquema representativo de los procesos estudiados se refleja en la Figura 10.

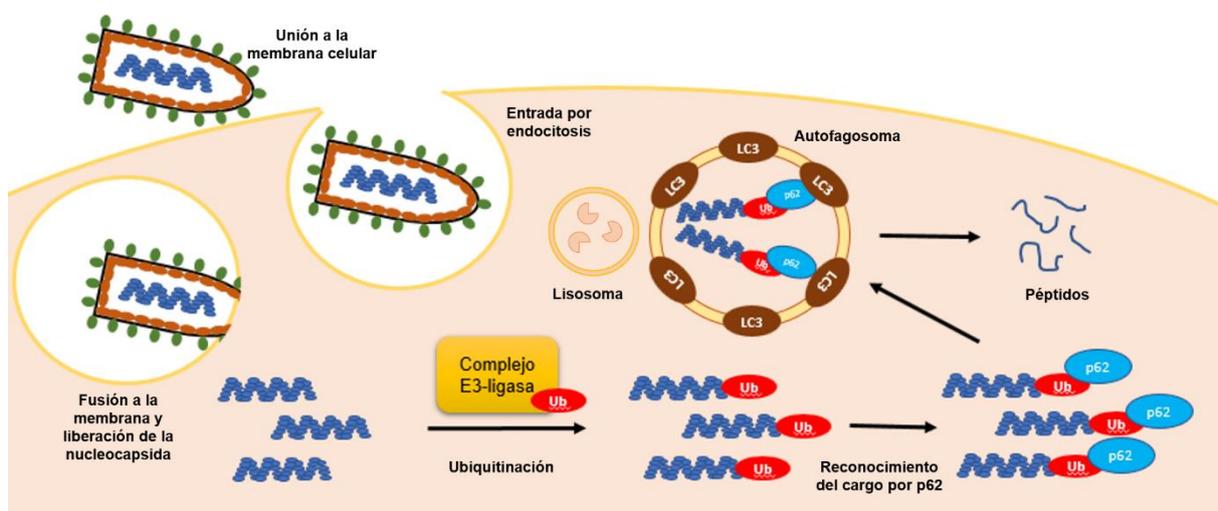


Figura 10. Representación gráfica del proceso de degradación por ubiquitinación y autofagia sugerido, reflejando las moléculas implicadas (Elaboración propia).

Finalmente, los resultados obtenidos del análisis de expresión de genes de enzimas antioxidantes en RBCs en respuesta a la exposición al virus indicaron un resultado correlativo

con la inducción de autofagia, lo que indicó una posible relación entre ambos procesos, (autofagia y estrés oxidativo) como ya estaba descrito para otros tipos celulares y en respuesta a otros estímulos (Filomeni, De Zio et al. 2015).

8. Conclusiones y proyecciones futuras

Las conclusiones que hemos obtenido son las siguientes:

- El proceso de autofagia selectiva, mediante p62, actúa como mecanismo antiviral en RBCs de trucha arcoíris.
- VHSV induce la ubiquitinación de proteínas intracelulares pero el proteasoma no está implicado en la degradación de VHSV.
- La respuesta antioxidante en RBCs expuestos a VHSV es correlativa con la respuesta autofágica.

Atendiendo a los resultados obtenidos en este trabajo, se ha podido comprobar una vez más el papel importante que juegan los RBCs en respuesta a infecciones virales. Sería conveniente reforzar y complementar los resultados obtenidos realizando ensayos *in vivo*, para evaluar si la respuesta antiviral observada *ex vivo* es extrapolable a la respuesta de los RBCs en el contexto global del organismo.

9. Agradecimientos

Me gustaría agradecer el apoyo recibido por parte de todos los miembros de mi laboratorio que me han acogido excelentemente desde el primer día. También me gustaría agradecer a mi familia y a mis amigos toda la confianza depositada en mí.

10. Bibliografia

- Alers, S., A. S. Loffler, S. Wesselborg and B. Stork (2012). "Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks." Mol Cell Biol **32**(1): 2-11.
- Bengtén, E., L. W. Clem, N. W. Miller, G. W. Warr and M. Wilson (2006). "Channel catfish immunoglobulins: repertoire and expression." Dev Comp Immunol **30**(1-2): 77-92.
- Crane, M. and A. Hyatt (2011). "Viruses of fish: an overview of significant pathogens." Viruses **3**(11): 2025-2046.
- Chico, V., N. Gomez, A. Estepa and L. Perez (2006). "Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR." J Virol Methods **132**(1-2): 154-159.
- Chiramel, A. I., N. R. Brady and R. Bartenschlager (2013). "Divergent roles of autophagy in virus infection." Cells **2**(1): 83-104.
- Dahle, M. K., O. Wessel, G. Timmerhaus, I. B. Nyman, S. M. Jorgensen, E. Rimstad and A. Krasnov (2015). "Transcriptome analyses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes infected with piscine orthoreovirus (PRV)." Fish Shellfish Immunol **45**(2): 780-790.
- Datan, E., S. G. Roy, G. Germain, N. Zali, J. E. McLean, G. Golshan, S. Harbajan, R. A. Lockshin and Z. Zakeri (2016). "Dengue-induced autophagy, virus replication and protection from cell death require ER stress (PERK) pathway activation." Cell Death Dis **7**: e2127.
- Filomeni, G., D. De Zio and F. Cecconi (2015). "Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs." Cell Death Differ **22**(3): 377-388.
- Garcia-Valtanen, P., M. Ortega-Villaizan Mdel, A. Martinez-Lopez, R. Medina-Gali, L. Perez, S. Mackenzie, A. Figueras, J. M. Coll and A. Estepa (2014). "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): 1666-1680.
- Gullberg, R. C., J. Jordan Steel, S. L. Moon, E. Soltani and B. J. Geiss (2015). "Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping." Virology **475**: 219-229.
- Harnett, M. M., M. A. Pineda, P. Latre de Late, R. J. Eason, S. Besteiro, W. Harnett and G. Langsley (2017). "From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home." Biomed J **40**(1): 9-22.
- Johansen, T. and T. Lamark (2011). "Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins." Autophagy **7**(3): 279-296.
- Kibenge, F. S., M. G. Godoy, M. Fast, S. Workenhe and M. J. Kibenge (2012). "Countermeasures against viral diseases of farmed fish." Antiviral Res **95**(3): 257-281.
- Ko, A., E. W. Lee, J. Y. Yeh, M. R. Yang, W. Oh, J. S. Moon and J. Song (2010). "MKRN1 induces degradation of West Nile virus capsid protein by functioning as an E3 ligase." J Virol **84**(1): 426-436.
- Levraud, J. P. and P. Boudinot (2009). "[The immune system of teleost fish]." Med Sci (Paris) **25**(4): 405-411.
- Li, M., B. Khambu, H. Zhang, J. H. Kang, X. Chen, D. Chen, L. Vollmer, P. Q. Liu, A. Vogt and X. M. Yin (2013). "Suppression of lysosome function induces autophagy via a feedback down-regulation of MTOR complex 1 (MTORC1) activity." J Biol Chem **288**(50): 35769-35780.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

- Luo, H. (2016). "Interplay between the virus and the ubiquitin-proteasome system: molecular mechanism of viral pathogenesis." *Curr Opin Virol* **17**: 1-10.
- Magor, B. G. (2015). "Antibody Affinity Maturation in Fishes-Our Current Understanding." *Biology (Basel)* **4**(3): 512-524.
- Mizushima, N. (2010). "The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation." *Curr Opin Cell Biol* **22**(2): 132-139.
- Moreira, D., N. Roher, L. Ribas, J. C. Balasch, C. Donate, A. Callol, S. Boltana, S. Roberts, G. Goetz, F. W. Goetz and S. A. MacKenzie (2011). "RNA-Seq reveals an integrated immune response in nucleated erythrocytes." *PLoS One* **6**(10): e26998.
- Morgan, M. J. and Z. G. Liu (2011). "Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling." *Cell Res* **21**(1): 103-115.
- Neelam, S., D. G. Kakhniashvili, S. Wilkens, S. D. Levene and S. R. Goodman (2011). "Functional 20S proteasomes in mature human red blood cells." *Exp Biol Med (Maywood)* **236**(5): 580-591.
- Nombela, I., A. Carrion, S. Puente-Marin, V. Chico, L. Mercado, L. Perez, J. Coll and M. D. M. Ortega-Villaizan (2017). "Infectious pancreatic necrosis virus triggers antiviral immune response in rainbow trout red blood cells, despite not being infective." *F1000Res* **6**: 1968.
- Nombela, I. and M. D. M. Ortega-Villaizan (2018). "Nucleated red blood cells: Immune cell mediators of the antiviral response." *PLoS Pathog* **14**(4): e1006910.
- Nombela, I., S. Puente-Marin, V. Chico, A. J. Villena, B. Carracedo, S. Ciordia, M. C. Mena, L. Mercado, L. Perez, J. Coll, A. Estepa and M. D. M. Ortega-Villaizan (2017). "Identification of diverse defense mechanisms in rainbow trout red blood cells in response to halted replication of VHS virus." *F1000Res* **6**: 1958.
- Parzych, K. R. and D. J. Klionsky (2014). "An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation." *Antioxid Redox Signal* **20**(3): 460-473.
- Pereiro, P., A. Romero, P. Diaz-Rosales, A. Estepa, A. Figueras and B. Novoa (2017). "Nucleated Teleost Erythrocytes Play an Nk-Lysin- and Autophagy-Dependent Role in Antiviral Immunity." *Front Immunol* **8**: 1458.
- Rauta, P. R., B. Nayak and S. Das (2012). "Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms." *Immunol Lett* **148**(1): 23-33.
- Sanz, F., B. Basurco, M. Babin, J. Dominguez and J. Coll (1993). "Monoclonal antibodies against the structural proteins of viral haemorrhagic septicaemia virus isolates." *Journal of Fish Diseases* **16**: 53-63.
- Schutze, H., E. Mundt and T. C. Mettenleiter (1999). "Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus." *Virus Genes* **19**(1): 59-65.
- Shaid, S., C. H. Brandts, H. Serve and I. Dikic (2013). "Ubiquitination and selective autophagy." *Cell Death Differ* **20**(1): 21-30.
- Shelly, S., N. Lukinova, S. Bambina, A. Berman and S. Cherry (2009). "Autophagy is an essential component of Drosophila immunity against vesicular stomatitis virus." *Immunity* **30**(4): 588-598.
- Suzuki, R., K. Moriishi, K. Fukuda, M. Shirakura, K. Ishii, I. Shoji, T. Wakita, T. Miyamura, Y. Matsuura and T. Suzuki (2009). "Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: a ubiquitin-dependent mechanism and a ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent mechanism." *J Virol* **83**(5): 2389-2392.
- Thoulouze, M. I., E. Bouguyon, C. Carpentier and M. Bremont (2004). "Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout." *J Virol* **78**(8): 4098-4107.

- Walker, P. J. and J. R. Winton (2010). "Emerging viral diseases of fish and shrimp." Vet Res **41**(6): 51.
- Wang, Y., N. Chen, A. M. Hegazy, X. Liu, Z. Wu, X. Liu, L. Zhao, Q. Qin, J. Lan and L. Lin (2016). "Autophagy induced by snakehead fish vesiculovirus inhibited its replication in SSN-1 cell line." Fish Shellfish Immunol **55**: 415-422.
- Workenhe, S. T., M. J. Kibenge, G. M. Wright, D. W. Wadowska, D. B. Groman and F. S. Kibenge (2008). "Infectious salmon anaemia virus replication and induction of alpha interferon in Atlantic salmon erythrocytes." Virology **5**: 36.
- Wu, L., Z. Feng, S. Cui, K. Hou, L. Tang, J. Zhou, G. Cai, Y. Xie, Q. Hong, B. Fu and X. Chen (2013). "Rapamycin upregulates autophagy by inhibiting the mTOR-ULK1 pathway, resulting in reduced podocyte injury." PLoS One **8**(5): e63799.
- Wu, Y. T., H. L. Tan, G. Shui, C. Bauvy, Q. Huang, M. R. Wenk, C. N. Ong, P. Codogno and H. M. Shen (2010). "Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase." J Biol Chem **285**(14): 10850-10861.
- Zhang, Q. and J. F. Gui (2015). "Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals." Sci China Life Sci **58**(2): 156-169.