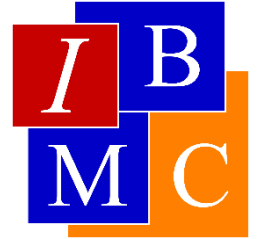




Universidad Miguel Hernández de Elche  
Instituto de Biología Molecular y Celular



**CAMBIOS A NIVEL EPIGENÉTICO Y PROTEÓMICO EN  
PEZ CEBRA EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN CON VIRUS  
DE LA VIREMIA PRIMAVERAL DE LA CARPA (SVCV).**

**REGLA MARÍA MEDINA GALI**

**TESIS DOCTORAL 2017**



El Dr. **Antonio Vicente Ferrer Montiel**, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández y Director del Instituto de Biología Molecular y Celular:

**INFORMA**, que la Tesis Doctoral titulada “**CAMBIOS A NIVEL EPIGENÉTICO Y PROTEÓMICO EN PEZ CEBRA EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN CON VIRUS DE LA VIREMIA PRIMAVERAL DE LA CARPA (SVCV)**”, para optar al grado de Doctor presentada por Doña Regla María Medina Gali, ha sido realizada en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández. Dando así conformidad a la presentación de dicha Tesis Doctoral.

Elche, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

Fdo: Dr. Antonio V. Ferrer Montiel



Los Drs. **Luis Pérez García-Estañ**, **José Antonio Encinar Hidalgo**, **María del Mar Ortega-Villaizán Romo**, miembros del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández:

**INFORMAMOS**, que la Tesis Doctoral titulada **“CAMBIOS A NIVEL EPIGENÉTICO Y PROTEÓMICO EN PEZ CEBRA EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN CON VIRUS DE LA VIREMIA PRIMAVERAL DE LA CARPA (SVCV).”**, presentada por Doña Regla María Medina Gali para optar al título de Doctor, ha sido realizada en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández desde el inicio del trabajo en 2015. Los abajo firmantes han supervisado la labor de la doctoranda en las fases de elaboración y redacción de la presente Memoria, a la que damos nuestra plena conformidad para su presentación y defensa ante el Tribunal de Tesis Doctoral correspondiente.

Elche, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

Fdo:

Dr. Luis Pérez García-Estañ

Dr. José Antonio Encinar Hidalgo

Dra. María del Mar Ortega-Villaizán Romo



***A la Dra. Amparo Estepa.***







## **GRACIAS...**

- ✓ *A la Dra. María Amparo Estepa, estés donde estés gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio y por todo el tiempo y la dedicación hacia mi persona. Por todo el apoyo que me diste desde mi llegada a España, y por incentivarme más aún en la ruta de las investigaciones. Para mi fuiste una persona maravillosa que luchó constantemente por todos nosotros y te agradezco la dedicación en cuerpo y alma a nuestra formación. ... De verdad muchas GRACIAS.*
- ✓ *A mi mamá (la persona más importante en mi vida) y a quien le agradezco todo el apoyo, y el sacrificio que ha hecho para que yo llegara hasta aquí, te quiero y aunque estés lejos no hay día que pase, que desde aquí no te mande el mayor de los besos. A ti te debo todo en la vida... GRACIAS.*
- ✓ *A Luis, mi papá por darme aliento a seguir adelante, e impulsarme a no amilanarme ante las dificultades... GRACIAS.*
- ✓ *A mis tutores Luis, Jant y María del Mar quienes, ante una situación inesperada de la vida, no han dudado ni un segundo en brindarme su ayuda y convertirse en mis tutores. Sin duda la vida me ha dado la oportunidad de conocer personas muy buenas en esta etapa y a ustedes les puedo contar entre ellos. Les doy las gracias por ayudarme en esta titánica tarea y por sufrir conmigo cada una de las correcciones de este documento.*
- ✓ *A José Antonio Fraga Castro, quien fuera director del Grupo Empresarial LABIOFAM, por ser una de las personas que más ha ayudado en mi formación laboral. GRACIAS por todo.*
- ✓ *A mis amigas la Bea, la Mañi y Stefi, a pesar de no estar cerca de mi, gracias por apoyarme y escucharme cuando más decaída estaba y por alentarme en todos los momentos... a veces las he sacado de quicio, pero bueno esas son las grandes amistades, las que no hace falta llamar, siempre están ahí... Su amistad es una de las mejores cosas que me ha pasado aquí.*
- ✓ *A María del Mar... te doy las gracias doble, gracias por las veces que me apoyaste en todas las investigaciones y además por tu ayuda en lo que se respecta a fomentar mis conocimientos de genómica.*
- ✓ *A mis amigos Vero, Reme, Efrén y Lucía porque nuestras risas siempre me han ayudado muchísimo a soportar a veces días malos, en los que sé, hacían acopio de*

*paciencia para aguantarme. Por incentivar-me a no rendirme por más malo que fuese el día, GRACIAS.*

- ✓ *A mis otros compañeros de Laboratorio: Sara, Ivan, Elena, Melisa, Helena, gracias por toda la ayuda en este tiempo.*
- ✓ *Al Dr. Ricardo Mallavia actual coordinador del programa de doctorado y un amigo, que me ha brindado su ayuda en los momentos más difíciles que he tenido en estos últimos 2 años.*
- ✓ *Quiero agradecer también al Dr. Antonio Ferrer Montiel, por acogerme en el Instituto y así como por su colaboración en la solicitud de mis muchos permisos anteriores de estancia... GRACIAS.*
- ✓ *A los chicos de secretaría: Raquel, Ruth, Salva... gracias por toda la ayuda en los trámites que necesité, y porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme. Ustedes forman parte del engranaje de este Instituto... GRACIAS.*
- ✓ *Al Dr. José Manuel González Ros, gracias por su colaboración como anterior coordinador del programa de doctorado y por toda la ayuda que me ha prestado, al Dr. Poverda, al Dr. Miguel Saceda, a la Dra. Pilar García, al Dr. Vicente Micol por su ayuda en los momentos que trabajé cromatografía, Dr. Pepe Ferragut, a la Dra. Asia fernandez por su ayuda en la realización de los Blots, en fin a todos los Profesores que forman parte de este Instituto.*
- ✓ *Al resto de compañeros del IMBC, a las técnicas (Elena, Mayte, Eva, Elisa, Irene), más de una vez me ayudaron cuando más apretada de tiempo estaba, de veras GRACIAS; a los chicos Gonzáles Ros (Marce y Lou), gracias la ayuda que me brindaron, GRACIAS; a los Micolinos: Kike, María, Almu, Veronica, Mariló, Luz y Mariló; ha sido un placer tenerlos como colegas, gracias. A los Ferrerines (Antonio, Mayte, Laura y algunos que ya no están) gracias. En fin, a todos los integrantes del Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) GRACIAS.*
- ✓ *Por último y no menos importante a ti Toni, por soportar mis malos ratos, por ayudarme y apoyarme en todo y agradezco que en todo momento hayas mantenido tu cariño para mí... Eres mi todo.*
- ✓ *A mis suegros, mis cuñados y a toda la familia Pérez-Seva, mil gracias por su aliento y por ayudarme en todo.*

- ✓ *A mis amigos de Cuba que, aunque estén lejos los siento cerca. Y si por algún motivo la vida quiso que estuviesen hoy lejos de mí, los siento más cerca por todos estos años pasados juntos.*
- ✓ *En fin, es difícil escribir gratitudes cuando se tiene que agradecer a tantas personas. Por eso Gracias a todos los que de una manera u otra me han brindado su apoyo en todos estos años. GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS.*





## Contenido

ABREVIATURAS.....	17
Resumen.....	21
INTRODUCCIÓN.....	25
La acuicultura.....	27
<i>Enfermedades víricas en la acuicultura.....</i>	29
<i>Rhabdovirus de peces.....</i>	30
<i>Virus de la viremia primaveral de la Carpa (SVCV).....</i>	33
El pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) como modelo experimental en virología e inmunología.....	35
Inmunidad innata y adaptativa en peces.....	36
<i>Inmunidad innata.....</i>	37
<i>Inmunidad adaptativa.....</i>	42
<i>Inmunidad entrenada.....</i>	43
<i>Inmunoestimulantes y su efecto en la inmunidad innata y la inmunidad entrenada, .....</i>	45
Betaglucanos.....	47
Reprogramación epigenética.....	48
OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	51
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
Animales de estudio.....	57
Virus.....	57
Células.....	57
Infecciones de peces cebra con SVCV.....	57
Inmunoprecipitación de cromatina.....	58
Secuenciación del ADN obtenido por inmunoprecipitación de cromatinas.....	60
Análisis bioinformático de los datos obtenidos de secuenciación.....	61
<i>Análisis de los conjuntos de genes enriquecidos en el listado de genes obtenidos por secuenciación mediante el GESTALT.....</i>	62
<i>Análisis del enriquecimiento de los niveles de expresión de diferentes conjuntos de genes GSEA (del inglés Gen Set Enrichment analysis).....</i>	62
Visualización de interacción de los genes.....	65
Ensayo de proteómica.....	65
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	67
Detección de proteínas de vitelogeninas mediante Western blot.....	67

Determinación de proteínas activas usando la técnica de inmunofluorescencia.....	68
Administración intraperitoneal de betaglucanos a pez cebra ( <i>in vivo</i> ). .....	69
Análisis de expresión de génica por qPCR.....	70
<i>Extracción de RNA y síntesis de cDNA.</i> .....	70
<i>qPCR para determinar expresión de genes.</i> .....	70
<i>Análisis estadístico.</i> .....	72
Capítulo I. EVALUACIÓN DE LA REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA EN PECES CEBRA INFECTADOS CON SVCV. ....	73
INTRODUCCIÓN .....	75
Epigenética. ....	75
<i>Modificaciones de las histonas.</i> .....	77
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
Estudio de la infección del pez cebra con SVCV.....	79
Estudio de la reprogramación epigenética en peces cebra infectados con SVCV. ....	80
<i>Visualización de las zonas enriquecidas de genes de interés en el sistema inmune innato.</i> .....	82
<i>Análisis global de los genes activados en muestras de pez cebra infectados con SVCV.</i> .....	84
<i>Agrupación funcional de los genes activados en peces cebra infectados con SVCV.</i> .....	86
Análisis de las rutas enriquecidas de genes activos en los peces infectados con SVCV a diferentes tiempos post infección.....	87
<i>Análisis de rutas enriquecidas de genes activos en el grupo SVCV-1d.</i> .....	88
<i>Análisis de rutas enriquecidas de genes activos en el grupo SVCV-2d.</i> .....	89
<i>Análisis de rutas enriquecidas de genes activos en el grupo SVCV -5d.</i> .....	90
Análisis de los conjuntos de genes enriquecidos utilizando el programa GSEA. ....	92
<i>Conjuntos de genes más activados en el grupo SVCV-1d.</i> .....	92
<i>Conjuntos de genes con mayor activación en el grupo SVCV-2d.</i> .....	99
<i>Conjuntos de genes más activados en grupo SVCV-5d.</i> .....	103
Incremento relativo de genes activados vinculados a la inmunidad innata y a respuesta antiviral.....	106
Validación por qPCR de la expresión de genes vinculados a la respuesta inmune innata y a la respuesta frente virus. ....	112
CONCLUSIONES. ....	117
Capítulo II: ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEÓMICO DE MUESTRAS DE PLASMA DE PECES CEBRA INFECTADOS CON SVCV. ....	119
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO.....	121
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	123

Análisis de la carga viral en peces cebra infectados con SVCV. ....	123
Perfil proteómico de muestras de plasma de peces infectados con SVCV. ....	123
Validación de los niveles de expresión de vitelogeninas y GIG2I en peces infectados con SVCV. ....	135
<i>Estimación de los niveles de vitelogeninas por Western blot.</i> .....	137
CONCLUSIONES. ....	139
Capítulo III: SEGUIMIENTO DEL EFECTO DEL BETAGLUCANO ANTE LA INFECCIÓN POR VIRUS SVCV DEL PEZ CEBRA: IMPLICACIONES EN LA “INMUNIDAD ENTRENADA”. ....	141
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO.....	143
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	145
Estudio del efecto <i>in vitro</i> de la aplicación de betaglucanos frente a la infección por el virus SVCV. ....	145
<i>Análisis de la respuesta inmune tras la aplicación de betaglucano.</i> ....	145
<i>Supervivencia en células ZF4 inmunoestimuladas con betaglucano y posteriormente infectadas con SVCV.</i> ....	147
Seguimiento del efecto protector del betaglucano en peces infectados con SVCV. ....	147
<i>Comportamiento de la supervivencia y/o protección del betaglucano frente a SVCV.</i> .....	149
<i>Expresión génica en peces inyectados con betaglucano.</i> ....	150
CONCLUSIONES. ....	155
DISCUSIÓN GENERAL.....	157
BIBLIOGRAFÍA.....	165





## ABREVIATURAS.

<b>Abreviatura</b>	<b>Descripción</b>
OIE	<i>Organización mundial de Salud Animal</i>
ARN	<i>Acido ribonucléico</i>
ADN	<i>Acido desoxirribonucleico</i>
ISAV	<i>Virus de la anemia infecciosa del salmón</i>
VHSV	<i>Virus de septicemia hemorrágica viral</i>
IHNV	<i>Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa</i>
SVCV	<i>Virus de la viremia primaveral de la carpa</i>
VSV	<i>Virus de la estomatitis vesicular</i>
kDa	<i>Kilo dalton</i>
TLR	<i>Receptores tipo Toll</i>
PRR	<i>Receptor de reconocimiento de patrones</i>
PAMPS	<i>Patrones moleculares asociados a patógenos</i>
CRP	<i>proteína C-reactiva</i>
NK	<i>natural killer</i>
NFkB	<i>factor nuclear kappa B</i>
IFN	<i>Interferón</i>
AMPs	<i>Péptidos antimicrobianos</i>
MHC	<i>complejo mayor de histocompatibilidad</i>
LPS	<i>lipopolisacárido</i>
TNF $\alpha$	<i>factor de necrosis tumoral <math>\alpha</math></i>
IL, il	<i>interleuquina</i>
ZF4	<i>zebrafish embrionic fibroblast</i>
H3K4Me3	<i>anticuerpo anti histona 3, trimetil, lisina 4</i>
EDTA	<i>Etilen di-amino tetra-acético</i>
FDR	<i>tasa de falsos positivos</i>
emPAI	<i>Índice de abundancia modificado exponencialmente</i>
PBS	<i>Tampón fosfato salino</i>
Ac GAM-PO	<i>Anticuerpo Goat anti mouse acoplado a peroxidasa</i>
Ac. GAR-PO	<i>Anticuerpo Goat anti rabbit acoplado a peroxidasa</i>
Zym-Bgc	<i>Betaglucano Zymosán</i>
<i>Ef-1<math>\alpha</math></i>	<i>Factor de elongación 1alfa</i>
<i>Bdf-2</i>	<i>Betadefensina 2</i>
<i>il1b</i>	<i>Interleuquina 1 beta</i>
<i>nod2</i>	<i>dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2</i>
<i>mavs</i>	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
<i>il17</i>	<i>Interleuquina 17</i>
<i>N-svcv</i>	<i>Gen de la proteína N del SVCV</i>
<i>il10</i>	<i>Interleuquina 10</i>
<i>vtg1</i>	<i>Vitelogenina 1</i>
<i>Vtg2</i>	<i>Vitelogenina 2</i>
<i>tnf-a</i>	<i>Factor de necrosis tumoral alfa</i>

<i>hamp</i>	<i>hepcidina</i>
<i>rsad2</i>	<i>radical SAM domain-containing 2</i>
<i>IGV</i>	<i>Integrative Genomic Viewer</i>
<i>gig2l</i>	<i>gen 2 inducido por reovirus de carpa</i>
<i>tgf-<math>\beta</math></i>	<i>factores de crecimiento transformantes tipo beta</i>
<i>GSEA</i>	<i>Análisis de los conjuntos de genes enriquecidos</i>
<i>Gestalt</i>	<i>GEne SeT AnaLysis Toolkit</i>
<i>casp3</i>	<i>Caspasa 3</i>
<i>casp8</i>	<i>Caspasa 8</i>
<i>EPC</i>	<i>Células de Epithelioma Papulosum Cyprini</i>
<i>tbk1</i>	<i>Serine/threonine-protein kinase</i>
<i>mapk</i>	<i>Proteína quinasas activadas por mitógenos</i>
<i>Irf3</i>	<i>Factor 3 de regulación de la respuesta de interferón</i>
<i>Irf7</i>	<i>Factor 7 de regulación de la respuesta de interferón</i>
<i>d.p.i.</i>	<i>Días post infección</i>
<i>Traff3</i>	<i>factor 3 asociado al receptor de TNF</i>



**RESUMEN**





## Resumen.

El sistema inmune es el encargado de generar una respuesta frente a moléculas extrañas en el organismo, y está dividido en dos ramas: el sistema inmune innato y el sistema adaptativo. El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa contra organismos invasores o patógenos incluyendo bacterias, hongos y virus. En el caso de los virus la detección temprana de la infección viral por parte del organismo es crucial, para intentar bloquear la replicación y la propagación viral, antes de que se produzca un daño irreparable. En lo que se refiere a los peces, esta respuesta está orquestada por células (monocitos/macrófagos y natural killer), componentes moleculares, químicos y físicos que son capaces de orquestar una respuesta inmune innata para combatir la presencia del patógeno. Las enfermedades virales son algunas de las que más afectan el desarrollo de la acuicultura, y específicamente las causadas por los rhabdovirus, entre estos destaca el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV), por ser uno de los virus que ocasiona mayores pérdidas económicas. Aunque no es un hospedador natural de SVCV el pez cebrá es susceptible a su infección, por lo que lo hemos empleado como modelo de estudio. Es por ello que realizamos un estudio combinado dirigido al análisis de las posibles alteraciones epigenéticas provocadas por la infección del SVCV, así como el estudio del perfil proteómico establecido en las proteínas de suero de peces infectados con este virus.

En el primer capítulo de esta memoria estudiamos la posibilidad de que la infección con SVCV, provocara la inducción de cambios epigenéticos en las histonas asociadas al ADN. En nuestro caso dirigimos el estudio al análisis de las metilaciones en la histona 3 sobre el cuarto residuo de lisina del extremo N-terminal de la histona H3, que está estrechamente asociada con los promotores de los genes activos. A partir de muestras de órganos internos procedentes de peces infectados, que resultaron activados de forma persistente (con incremento superior a 1.5 veces) sobre controles no infectados y específicamente aquellos que estuviesen asociados a la respuesta inmune innata. Los resultados obtenidos permitieron identificar aquellos conjuntos de genes que estaban mayormente activados en cada uno de los grupos generados (1, 2 y 5 días post infección) y que nos proporcionaron indicios acerca de los procesos celulares que se desatan tras la aparición de una infección y la consecuente elaboración de una respuesta antiviral. Entre estos: la detección de patógenos a través de los *tlrs*, la de la señalización de citoquinas inflamatorias como el *tnf- $\alpha$* , de proteínas de carácter antiviral como el interferón, la activación de moléculas como las CRP que también están vinculadas al sistema inmune innato y el establecimiento de la apoptosis como mecanismo de muerte celular. De igual forma se observó que entre los genes más activados por la infección con SVCV se encontraban aquellos relacionados con el

reconocimiento de patógenos, citoquinas, interferones y otras moléculas con actividad antiviral descritas en la literatura.

El segundo capítulo está dirigido al estudio del perfil proteómico establecido por las proteínas presentes en suero de peces cebra infectados con SVCV. Uno de los síntomas descritos para las infecciones con SVCV en los peces es la presencia de hemorragias, y alto contenido de ascitis, por lo que es lógico pensar que la infección viral causará la aparición o cambios de las proteínas circulantes en sangre. De ahí que nuestro interés en esta parte del trabajo estuviese dirigido a la identificación a diferentes de proteínas en plasma de pez cebra infectados a diferentes tiempos post infección con SVCV. Además de la identificación de proteínas habitualmente mayoritarias en plasma, resultó interesante la identificación de las vitelogeninas y de la proteína del gen 2 inducido por reovirus de carpa (Gig2), que mostraron un mayor incremento respecto a los peces control. Esta es la primera vez que se describe la presencia de la proteína Gig2 en suero de peces infectados. Igualmente se encontraron niveles elevados de proteínas relacionadas con proceso de apoptosis, así como otras relacionadas con la activación del complemento y la cascada de coagulación, lo que parece indicar un intento de resistencia a las hemorragias inducidas por la infección viral.

Teniendo en cuenta que se ha descrito que la memoria de la respuesta innata es, en principio, inespecífica, decidimos evaluar la posibilidad de que una molécula inmunomoduladora de origen fúngico pudiera establecer un estado antiviral duradero en pez cebra, dando lugar a lo que muchos han llamado “inmunidad entrenada”. Los resultados revelaron que, tanto *in vitro* como *in vivo*, existe un conjunto de genes relacionados con el sistema inmune innato que son estimulados tras la administración de betaglucanos y esto conduce a un incremento de la supervivencia frente a infecciones de SVCV. El abordaje conjunto de epigenética y proteómica nos ha permitido corroborar la participación en la respuesta anti-SVCV de genes, algunos ya descritos en otros modelos pez/virus, e identificar otros nuevos (*gig2l*).

## Abstract

Many economically important freshwater fish suffer diseases caused by viruses, which results in tremendous losses in aquaculture. The outcome of the virus infection relies in the virus ability to overcome the host antiviral response. In recent years transcriptomics and proteomics techniques have come up as novel tools to provide a comprehensive understanding of the specific molecular processes involved in the response of the infected fish to the pathogen and its relationship to disease resistance.

Pathogens such as viruses can modulate the host transcriptome and proteome through a variety of mechanisms. Host chromatin can be one of the targets of the pathogen leading to changes during the course of infection. Methylation is a common type of histone modification. Different histone methylation states are a reflection of the epigenetics changes that may happen after challenge with a pathogen. In this study, chromatin extracted from internal organs of SVCV-infected zebrafish was analyzed. We found over 7000 differentially methylated genes at 1, 2 and 5 days' post challenge. Analysis of ChIP-seq data revealed that several cell signaling pathways are transcriptionally activated in the infected fish: TGF- $\beta$  signaling, TLR's signaling pathways and apoptosis response, amongst others. Those pathways represent different responses of the host to external/pathogen stimuli. QRT-PCR was performed to verify the transcriptional activation of those genes identified by ChIPseq analysis. A number of genes reported to play a role in the innate immune response were shown to be up-regulated: TLRs, pro-inflammatory cytokines, interferon, c-reactive proteins, *gig2*, *mx*, *tlrs*. Overall there is a significant activation of cytokine signaling, interleukin pathways from day 2 post-infection. GSEA analysis indicated that proteosome degradation, TGF-beta and TNF pathways are differentially up-regulated in the SVCV-infected fish. At the 5 dp.i. time point the apoptosis pathway as well as serum crps are the gene sets with the highest level of expression.

To investigate the molecular mechanisms underlying SVCV pathogenesis samples from zebrafish blood were subjected to proteomic analysis. Our data revealed 139, 63, 32 altered host serum proteins at 1, 2 and 5 days p.i., respectively. Particularly, vitellogenins and *gig2* are present in large quantities in blood from virus-infected fish. Fish response to SVCV infection appears to occur rapidly, with the expression values of 20 proteins in the category of response to stimuli peaking at 24 hp.i. This number declined at later times post-infection. Moreover, up-regulation of the corresponding genes were validated by qRT-PCR, which further demonstrated raising levels of vitellogenins and *gig2*. Higher serum concentrations of vitellogenin protein in the SVCV-infected fish was confirmed by

immunoblot. This is the first report of an increase of vitellogenin and *gig2* blood levels after viral infection of fish.

To get further insight into the non-specific innate immune response to pathogens as well as to examine the capacity of fish to gain an innate immune memory (trained immunity), the immunostimulatory potential of beta-glucan and how it affects SVCV infection was analyzed both *in vitro* and *in vivo*. In a zebrafish cell line beta-glucan treatment led to a rapid induction of a number of cytokines. Real-time PCR data showed up-regulation of *il1b*, *il6*, *il8*, *il10*, *tnfa* and *gig2* genes. All these molecules are involved in the interferon-signalling pathways as well as in response to pathogen pathways. *In vivo*, intraperitoneal injection of a single dose of beta-glucan conferred partial protection against challenge with SVCV. Examination of the up-regulated genes in the SVCV-infected fish showed increased transcription of *il1b*, *il6*, *il8*, *il10*, *tnfa* and *gig2* genes in the beta-glucan treatment group, exhibiting a good correlation with the cell culture data and pointing to a link between a general activation of the innate immune system and the establishment of a temporary antiviral state in the fish.

We believe this work makes an important contribution to the understanding of the cellular and molecular basis of defense against viral pathogens in teleost fish.





**INTRODUCCIÓN**

*Miguel  
Hernández*



## La acuicultura.

La pesca en los océanos, lagos y ríos ha sido una fuente importante de alimentos, un proveedor de empleo y otros beneficios económicos para la humanidad. Sin embargo, pesar del mayor conocimiento y el desarrollo dinámico de la pesca y la acuicultura, ha llegado a ser evidente que los recursos acuáticos vivos, aunque renovables, no son infinitos y necesitan ser administrados adecuadamente, a fin de mantener su contribución al bienestar nutricional, económico y social de la creciente población mundial (Figura 1) [1].

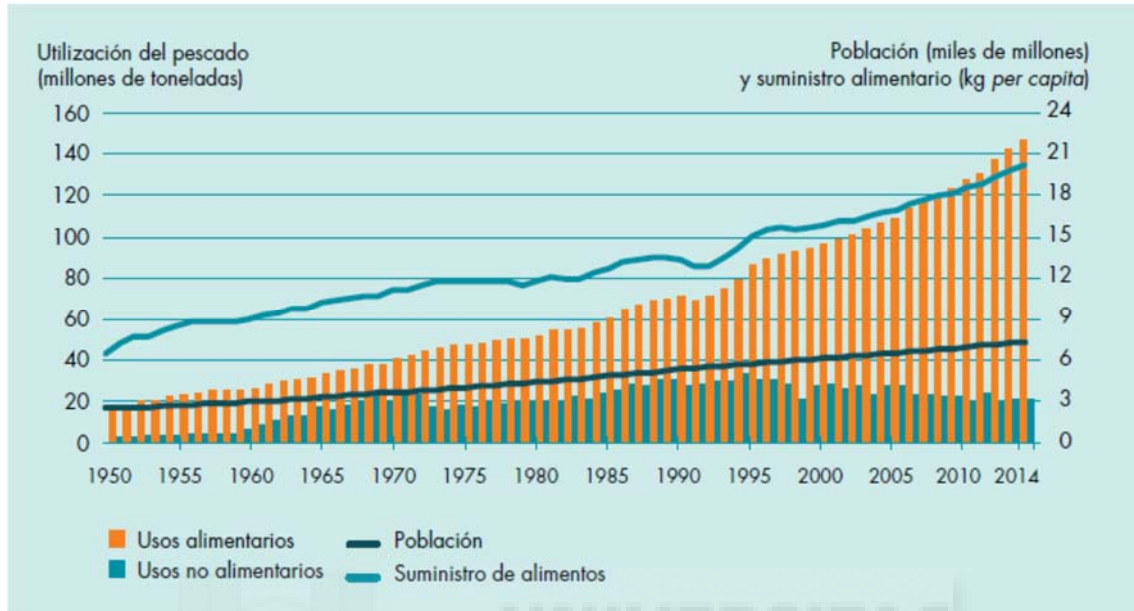
Existen varias razones por las cuales los peces tienen una gran importancia para el hombre:

- 1) Tienen un valor biológico intrínseco como uno de los eslabones de la biodiversidad al presentar una gran variedad de formas, tamaños y colonizar una gran amplitud de hábitats acuáticos.
- 2) Desde tiempos remotos han constituido una de las principales fuentes de alimentos.
- 3) Se utilizan como controladores biológicos de larvas de insectos vectores de enfermedades.
- 4) Alto valor científico como fuente de información biológica por el escaso conocimiento que se tiene de algunas especies.
- 5) Como reserva genética del ambiente acuático.

Sin embargo, varios de estos aspectos se encuentran en niveles delicados de estabilidad como consecuencia de la introducción indiscriminada de algunas especies exóticas en diversos depósitos de agua y la sobreexplotación de muchas de las especies de interés comercial.

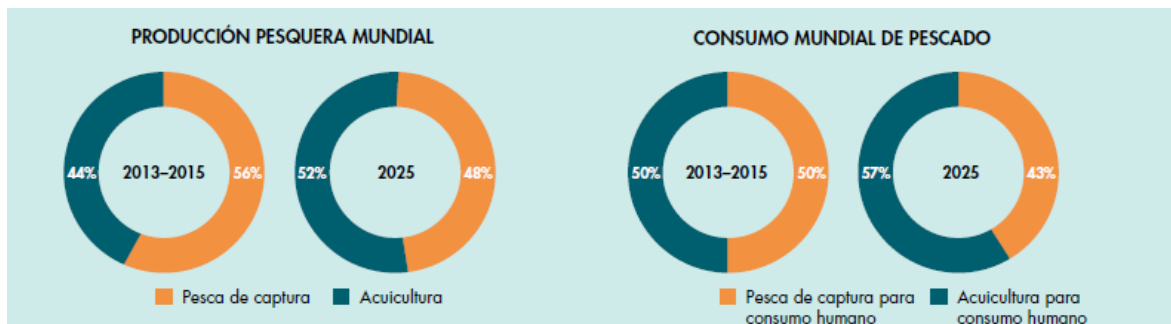
No obstante, durante casi tres décadas, debido al espectacular aumento de la contaminación, las técnicas abusivas de pesca en todo el mundo, y la pesca ilegal, no declarada y no reglamentada, las capturas y desembarques han disminuido y muchas poblaciones de peces se han reducido a un ritmo alarmante. Y aunque las perspectivas reales para la pesca de captura son difíciles de determinar porque dependen de la productividad natural de las poblaciones de peces y los ecosistemas,

y están sujetas a numerosas variables e incertidumbres. Además, se prevé que el futuro incremento de la producción pesquera y el consumo de pescado asociado se originen principalmente en la acuicultura (Figura 2).



**Figura 1: Utilización y consumo de pescado a nivel mundial, desde el año 1950.** Figura tomada del reporte de la FAO año 2016 [1].

Por otra parte el agotamiento de las poblaciones de peces tiene consecuencias negativas para la seguridad alimentaria, el desarrollo económico y además reduce el bienestar social en países de todo el mundo, especialmente en aquellos que dependen del pescado como su principal fuente de proteína animal y de ingresos para la subsistencia de pescadores en los países en desarrollo [1].



**Figura 2: Niveles obtenidos y esperados en la producción y consumo de pescado de acuicultura y de la pesca de captura.** Obtenido de los reportes del año 2016 de la FAO [1].

### *Enfermedades víricas en la acuicultura.*

Uno de los aspectos que influye negativamente en el desarrollo de la acuicultura son las enfermedades infecciosas tanto de origen vírico como bacteriano, que pueden causar una alta mortalidad y por lo tanto enormes pérdidas económicas en este sector. La incidencia de las enfermedades infecciosas es mayor en fase larvaria y alevines. Las enfermedades de peces pueden clasificarse en ocho grandes grupos: virosis, bacteriosis, micosis, protozoosis, helmintosis, enfermedades de origen nutricional y otras no infecciosas (congénitas, hereditarias o de origen ambiental).

En el caso de las enfermedades virales, en el código sanitario para los animales acuáticos del año 2016, la Organización mundial de Salud Animal, con siglas (OIE) ([www.oie.int/es/](http://www.oie.int/es/)) lista 10 enfermedades principales que afectan a los peces, de ellas 7 son causadas por virus, cinco virus con genoma ARN y dos virus con genoma ADN [2].

Son precisamente las enfermedades víricas las que ocasionan mayor pérdida al no existir agentes antivirales específicos y muy pocas vacunas eficaces y/o autorizadas para el tratamiento de estas enfermedades. Un ejemplo claro de esto lo constituyen las pérdidas económicas asociadas a las enfermedades causadas por rhabdovirus en salmónidos cultivados durante 2001-2004 en Canadá, estimadas en unos 200 millones de euros [2]. Otros brotes similares surgieron también en la misma región, durante los años 2006-2007. En los últimos años (2010-2015) en Europa se han citado brotes clínicos de rhabdovirus específicamente en Alemania Suiza, Liechtenstein y República Checa, y más recientemente en Croacia, según los datos obtenidos de la OIE [2] (consulta realizada el 24/ene/2017).

Ciertamente, la acuicultura es una actividad significativa en la generación de productos alimenticios, que proporciona también empleos e ingresos económicos importantes; en el año 2015 la producción de acuicultura a nivel mundial ascendió a 73,8 millones de toneladas, lo que se estimó en un valor de primera venta de 160.200 millones de USD [1]. Sin embargo, cada año aumentan las pérdidas por la presencia de diversas enfermedades, en su mayoría generadas por infecciones, que provocan un impacto económico significativo, lo que enfatiza la necesidad de

estudiar aspectos relacionados con las infecciones que causan mayor morbilidad y mortalidad en peces, así como los mecanismos de inmunidad involucrados y las formas de prevenir y combatir dichas infecciones.

### *Rhabdovirus de peces.*

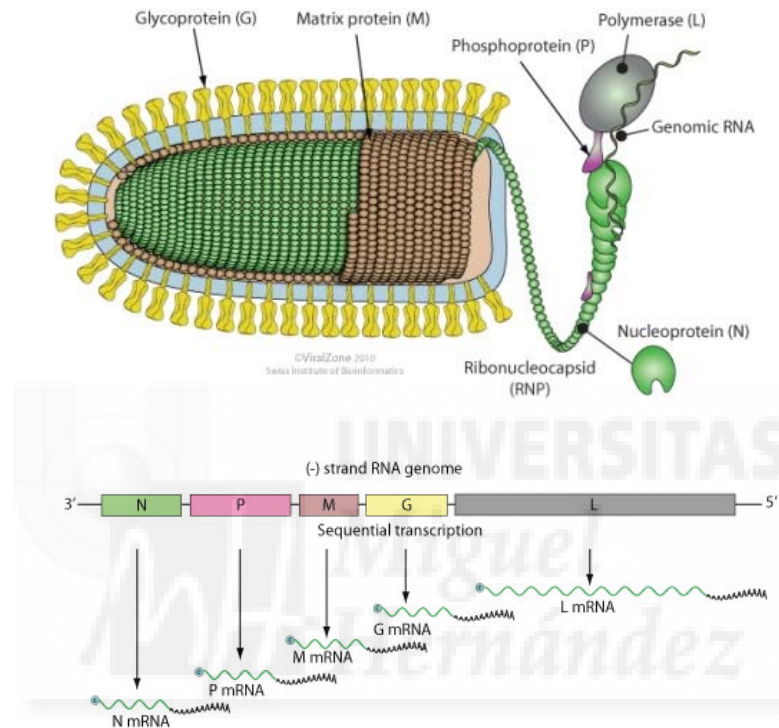
De acuerdo con la OIE, los virus son los agentes infecciosos más devastadores, dado que producen grandes pérdidas y suponen un grave problema ya que no hay tratamientos disponibles frente a ellas. La O.I.E. establece en su lista de enfermedades de los peces la declaración obligatoria de diez enfermedades infecciosas y parasitarias, de las cuales ocho son víricas [2]. De esta forma y bajo las directrices de la OIE es de obligatoria declaración cualquier brote o sospecha de las enfermedades virales incluidas en la lista [2].

En la Unión Europea, la actividad de las granjas acuícolas están bajo 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. Por tanto, es obligatoria la declaración 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) necrosis hematopoyética epizoótica (EHN) y la viremia primaveral de la carpa (SVCV). Entre todos los virus que se incluyen en la lista de la OIE, se encuentran los rhabdovirus, que afectan a los peces tanto en sus primeras etapas de desarrollo como en fase adulta, y por tanto son responsables de grandes pérdidas económicas.

**Tabla 1:** virus de peces relacionados en el género Rhabdovirus [2].

virus	abreviatura	Generi	Distribución
Hirame rhabdovirus	HIRRV		Asia, Europa
Virus de Necrosis hematopoyética infecciosa	IHNV	<i>Novirhabdovirus</i>	En todo el mundo
Virus de la Septicemia hemorrágica viral	VHSV		En todo el mundo
Rhabdovirus de la trucha de mar	STRV		Europa
Rhabdovirus de la perca	PRV	<i>Perhabdovirus</i>	Europa
Anguilid Rhabdovirus	AngRV		Europa
Virus primaveral de la carpa	SVCV		En todo el mundo
Rhabdovirus de la perca	PFRV	<i>Spirivirus</i>	Europa

La familia *Rhabdoviridae*, orden *Mononegavirales*, comprende 11 géneros de virus de acuerdo con el Comité internacional en Taxonomías de Virus [3]. Estos virus tienen forma de bala (figura 3) y están distribuidos de forma global ya que infectan tanto especies de vertebrados como de invertebrados [4]. La información necesaria para la replicación de los rhabdovirus está contenida en su genoma, una cadena simple de RNA que puede abarcar entre 9 y 18 Kb dependiendo del virus [5].

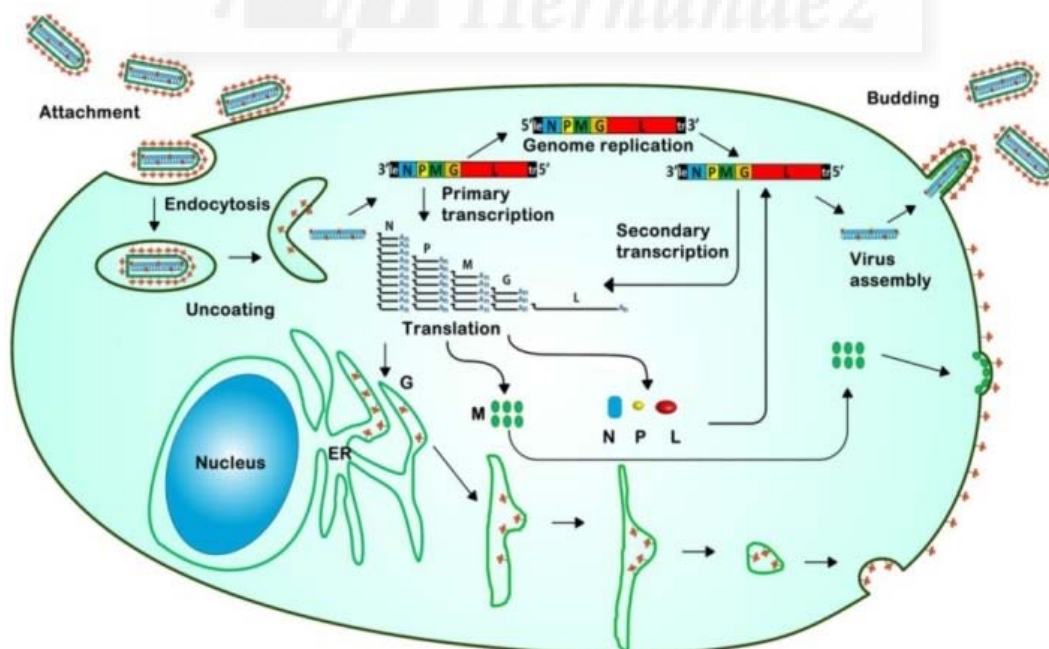


**Figura 3: A)** Organización genómica y estructura del virión septicemia hemorrágica viral, perteneciente a la familia *Rhabdoviridae*. **(B)** Muestra cómo se encuentran estructuradas las distintas proteínas junto con el ARN genómico. Cadena de polaridad positiva o antigenoma conteniendo las cinco proteínas y las regiones no codificantes. Imagen tomada de Viralzone [6, 7].

Al menos 5 proteínas estructurales son codificadas en el genoma del rhabdovirus (figura 3); en orden comenzando por extremo final 3' son las siguientes: proteína de la nucleocapsida (N, peso molecular aproximado 47kDa) se encuentra distribuida revistiendo completamente el genoma del virus, su función es conferir estabilidad y protección a las nuevas cadenas de ARN sintetizadas, además de regular el equilibrio entre transcripción y replicación; la fosfoproteína (P, 29 kDa); la proteína matriz (M, 26 kDa); glicoproteína de superficie (G, 57 kDa) y la ARN polimerasa dependiente de ARN (L, 240 kDa) (Figura 3). Aunque la organización del genoma es común a todos los miembros de la familia, en algunos casos otras

proteínas aparecen codificadas como es el caso de la proteína no viriónica (NV) en algunos miembros del género *Novirhabdovirus* [8], inclusive también se ha sugerido por parte de algunos autores que numerosos marcos de lecturas abiertas codifican variantes de proteínas en las 5 proteínas estructurales en diferentes Rhabdovirus [9].

En las últimas tres décadas las investigaciones sobre dos de los Rhabdovirus: el virus de la Rabia (RAV) y el virus de la estomatitis vesicular, han ido enfocadas al esclarecimiento del ciclo de replicación y las funciones moleculares de las diferentes proteínas que codifican el virus. Profundizando en este ciclo podemos describir que en un inicio la proteína G, es la responsable de la adhesión del virus a la membrana de célula y su subsecuente internalización a través de la endocitosis mediada por receptor (Figura 4) [10]. Una vez que las partículas virales están incluidas en el endosoma, provocan una disminución del pH, lo cual desencadena la fusión de las membranas virales y el endosoma. Este evento permite un desensamblaje de las partículas virales para una posterior liberación de su genoma en el citoplasma de la célula. La traducción de las proteínas virales y la replicación del genoma del virus ocurren completamente en el citoplasma celular.



**Figura 4: Ciclo de infección de del virus de la septicemia hemorrágica viral.** Se muestran pasos del ciclo de vida del virus: fijación, endocitosis, no recubrimiento, replicación del genoma, transcripción de ARNm, traducción de proteínas virales, ensamblaje viral y liberación del virus [10].



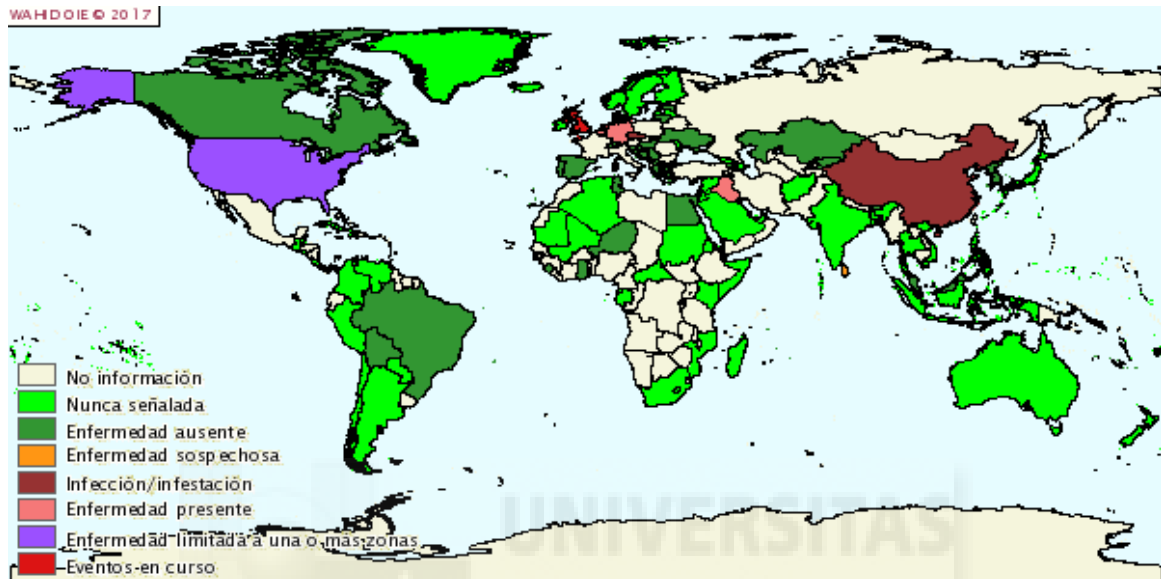
El ARN de polaridad negativa sirve de molde para la transcripción que se lleva a cabo por la polimerasa del virus, produciendo inicialmente un ARN líder de 48 nucleótidos, seguido de los cinco mensajeros que codificarán para las cinco proteínas virales, siempre en el mismo orden, N, P, M, G, L. Una vez sintetizadas las proteínas, el genoma viral pasa a ser replicado produciendo ARN de polaridad positiva o antígenoma, que servirá de molde para la síntesis del genoma que va a ser encapsidado (de polaridad negativa). La encapsidación del genoma se da al mismo tiempo que su replicación. Los eventos de adsorción, penetración, desencapsidación y transcripción primaria tienen lugar durante las primeras horas post-infección. La replicación, transcripción secundaria y ensamblaje se dan más tardíamente, se calcula que entre las 10-12 horas post-infección (figura 4). En algunos rhabdovirus la duración de un ciclo completo de infección se encuentra por tanto entre 10-12 horas, aproximadamente [6, 10].

#### ***Virus de la viremia primaveral de la Carpa (SVCV).***

La viremia primaveral de la carpa es una enfermedad ocasionada por el SVCV. Este virus induce un cuadro hemorrágico agudo. La enfermedad es contagiosa a varias especies de carpa y algunas especies de peces *Ciprínidos* e *Ictalúridos*. Este virus inicialmente fue clasificado como un vesiculovirus y recientemente ha sido incluido en el nuevo género *Sprivirus* [11]. En los últimos años científicos de China, Canadá y Estados Unidos han publicado brotes de SVCV y este virus ahora mismo supone una amenaza a especies acuáticas no solo en Europa sino alrededor del mundo (Figura 5). De acuerdo con la secuencias de nucleótidos que codifican para las proteínas G y P, hay más de 4 genogrupos Ia, Ib, Ic e Id [12-15]. En lo referente a la morfología, organización del genoma, proteínas virales y a las principales características del ciclo de replicación, SVCV es muy similar a VSV [16].

Los brotes de viremia primaveral de la carpa pueden causar una mortalidad significativa (no solo en carpa sino en otras especies) y poner en peligro la industria mundial de la acuicultura con pérdidas de millones de dólares. Estos brotes de SVCV usualmente ocurren en la época de la primavera, como bien lo indica su nombre, cuando el agua alcanza temperaturas entre 10-17 °C y la mortalidad puede llegar a alcanzar valores entre 70-90% entre los peces infectados.

La ruta natural de la infección es el agua, aunque se conocen especies vectores de invertebrados. Los síntomas de la enfermedad causada por el SVCV en ciprínidos, tales como la carpa han sido ampliamente descritos. Entre ellos se destacan nado aletargado, ascitis abdominal, piel y órganos internos hemorrágicos y exoftalmia (ojos saltones) [16].



**Figura 5. Mapa de distribución mundial de los focos reportados de viremia primaveral de la carpa.** Brotes a nivel mundial desde el año 2012. Imagen tomada de la base de datos del sistema mundial de información zoonosanitaria (WAHID), Organización Internacional de Epizootias. [Consulta: 24-01-2017].

Naturalmente se han registrado infecciones de SVCV de origen natural de las siguientes especies de ciprínidos: carpa común (*Cyprinus carpio carpio*) y la carpa koi (*Cyprinus carpio koi*), el carpín (*Carassius carassius*), la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), entre otras [16]. Aunque el virus también se ha aislado de los peces silvestres no ciprínidos como bagre europeo (*Silurus glanis*), y también se ha informado de que ha sido aislado de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) [17]. Igualmente se ha podido demostrar bajo condiciones de laboratorio que otras especies como el rutilus (*Rutilus rutilus*) y el pez cebra (*Danio rerio*) [18] son susceptibles a infecciones por el SVCV. En el caso del pez cebra en los últimos años han aumentado los estudios de infecciones con SVCV por baño de inmersión, verificando que los síntomas en los peces cebras son similares a los descritos en otras especies de peces. La infectividad y el resultado de la infección pueden ser modulados por la temperatura en diferentes especies de peces. En la mayoría de las líneas celulares de ciprínidos la temperatura óptima de infección se encuentra en un rango de 20-25°C [19].

## El pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental en virología e inmunología.

El pez cebra (*D. rerio*) (Figura 6) es un pez teleósteo, que pertenece a la familia de los Cyprinidae (Orden Cypriniformes). En los últimos años se ha incrementado su uso en las investigaciones científicas y se ha convertido en el modelo de pez más estudiado en ciencia. Es especialmente apreciado por su homología genética con el humano (compartimos con estos peces más del 80% del genoma) [20, 21] y además su genoma está totalmente secuenciado, lo que nos permite que los resultados obtenidos de los fármacos probados en estos animales sean potencialmente extrapolables al humano. Este pez normalmente se puede encontrar en ríos de aguas lentas y lagunas de la India, Bangladesh y Pakistán [22]. Esta región geográfica tiene clima monzónico, con temporadas lluviosas y secas pronunciadas que tienen un profundo efecto en los parámetros del hábitat de este pez, así como en la química de los recursos hídricos.



**Figura 6:** Individuo de Pez cebra (*Danio rerio*) en la que se observa su pigmentación característica razón por la cual recibe ese nombre.

Se sabe relativamente poco acerca de la cría de pez cebra y el comportamiento reproductivo en entornos naturales. Sin embargo, los resultados de una serie de experimentos de laboratorio, junto con observaciones anecdóticas derivadas de los años de uso de este pez como modelo de investigación, ayudan a tener una idea razonable de la reproducción en este animal. Se conoce que las hembras son capaces de desovar casi diariamente, hay autores que han encontrado que las hembras desovarían una vez cada 1,9 días si se alojan continuamente con un macho [23]. Sus embriones son transparentes y se desarrollan en tan sólo 24 horas, algo que hace

posible observar los efectos de medicamentos en sus órganos internos en formación. Otra de las ventajas de este pez es su capacidad reproductiva durante todo el año y su rápido desarrollo (las hembras son capaces de poner cientos de huevos en una semana), gracias a esto se pueden realizar diferentes experimentos en una misma generación de animales, investigar la evolución de las patologías e identificar las causas de las enfermedades investigadas.

Su pequeño tamaño hace fácil su almacenaje, ya que caben hasta un centenar de animales en contenedores de un litro de agua, y su sencillo mantenimiento decantan finalmente a favor del pez cebra las preferencias de los científicos como animal de laboratorio en el siglo XXI. Alcanzan un tamaño entre 6-7 cm como máximo.

Uno de los trabajos que más se está desarrollando en los últimos tiempos es el desarrollo de morfolinos para pez cebra, precisamente porque los embriones son sensibles a las moléculas antisentido de morfolino lo que permite analizar si un gen determinado es importante para una función en particular en el pez, logrando el bloqueo del gen en cuestión por un tiempo determinado [20, 24].

Igualmente debemos destacar el empleo de peces cebra en el desarrollo de investigaciones relacionadas con la respuesta antiviral. Precisamente por la susceptibilidad de este pez a infecciones víricas desarrolladas bajo condiciones de laboratorio existen varios trabajos realizados con infecciones de SVCV que así lo demuestran [25-29]

### **Inmunidad innata y adaptativa en peces.**

La función esencial del sistema inmune en todos los vertebrados es la defensa contra las infecciones. Esto permite la supervivencia del individuo y mantener sus funciones corporales en un medio, que por naturaleza le es hostil. Las respuestas inmunes en los vertebrados han sido clasificadas como innatas o adaptativas. El sistema innato juega un papel instructivo en la respuesta inmune adquirida y la homeostasis y por lo tanto es igualmente importante en los vertebrados superiores.

## Inmunidad innata.

Hasta hace unos años, la inmunidad innata se consideraba como una respuesta rápida frente a un primer encuentro con un patógeno, inespecífica, incapaz de generar memoria inmunológica y pobremente regulada. En el caso de la inmunidad adaptativa, que estaba mediada por los linfocitos T y B, era considerada como específica, y suficientemente capaz de elaborar una respuesta concreta y distinta para cada antígeno, además de generar memoria inmunológica adecuada para proteger frente a la reinfección y mantenerse regulada [30]. Además, se consideraban respuestas independientes. Sin embargo, este concepto ha cambiado y actualmente conocemos que ambas respuestas están interrelacionadas y funcionan cooperativamente potenciándose mutuamente (Figura 7) [31].

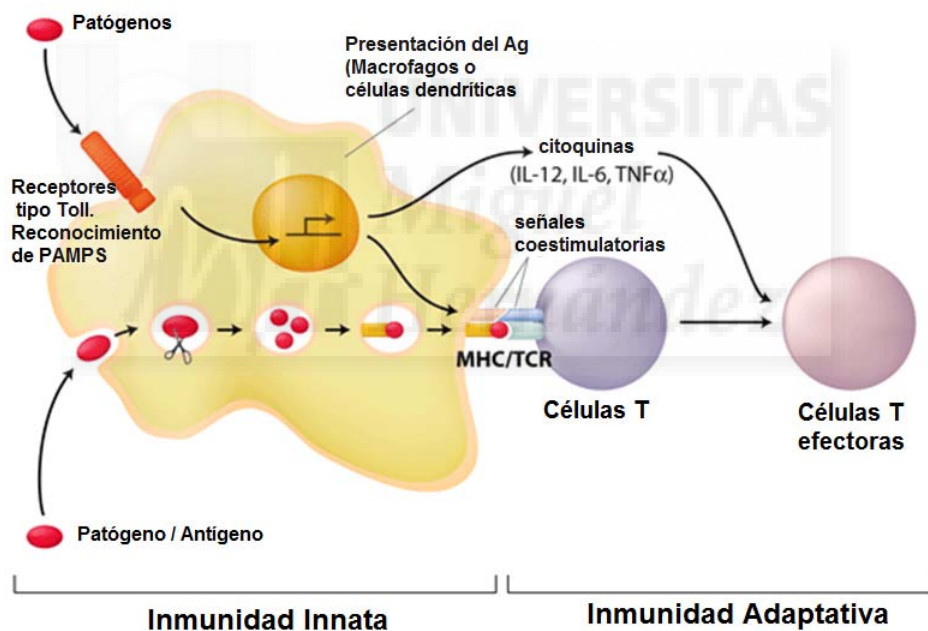


Figura 7: Relación entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa [32].

Ahora bien, para producir una respuesta inmune innata, existen en el organismo un conjunto de células encargadas de generar esta respuesta. Entre ellas se encuentran las células fagocíticas (macrófagos, monocitos y granulocitos), las células dendríticas y las células citotóxicas no específicas. Estas células poseen receptores codificados en línea germinal, que no están sujetos a recombinación genética, y que reconocen estructuras muy conservadas, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP del inglés *pathogen associated molecular patterns*), entre los que se incluyen lípidos, carbohidratos, péptidoglicanos y ácidos

nucleicos que se encuentran invariablemente en los distintos grupos de microorganismos [33].

La activación de estos receptores conlleva finalmente la expresión de distintas moléculas de secreción que diversifican la respuesta antimicrobiana y aumentan la eficacia de la misma. Este reconocimiento se realiza mediante moléculas inmunosensoras llamadas receptores de reconocimiento de patrones (PRR del inglés *pattern recognition receptors*) que no requieren de exposición previa a los PAMP para interactuar con ellos y generar una respuesta. Los PRR incluyen receptores similares a Toll (TLR del inglés *Toll-like receptor*), los receptores del complemento tipo-3 (CR3), receptores “*scavengers*” (SR), los receptores de Dectina-1 (receptores de  $\beta$ -glucano), lectina de unión a manano (MBL), proteína C-reactiva (CRP), proteína amiloide sérica (SAP), CD-14 y proteínas de dominio de oligomerización unidas a nucleótidos (NOD) [34].

En el caso de los peces, para desarrollar esta respuesta inmune lo hacen a través de un grupo de componentes que conforman la barrera de defensa primaria contra diferentes patógenos como: virus, parásitos, bacterias y hongos. Esto es debido a que poseen un sistema inmunológico que permite el estudio en profundidad de los aspectos básicos de la inmunidad, así como las respuestas y su interacción con diferentes organismos y patógenos [35-37]. Los peces poseen una organización del sistema inmunitario y mecanismos de defensa similares a los de los mamíferos, siendo la diferencia más significativa la carencia de médula ósea y nódulos linfáticos [38, 39].

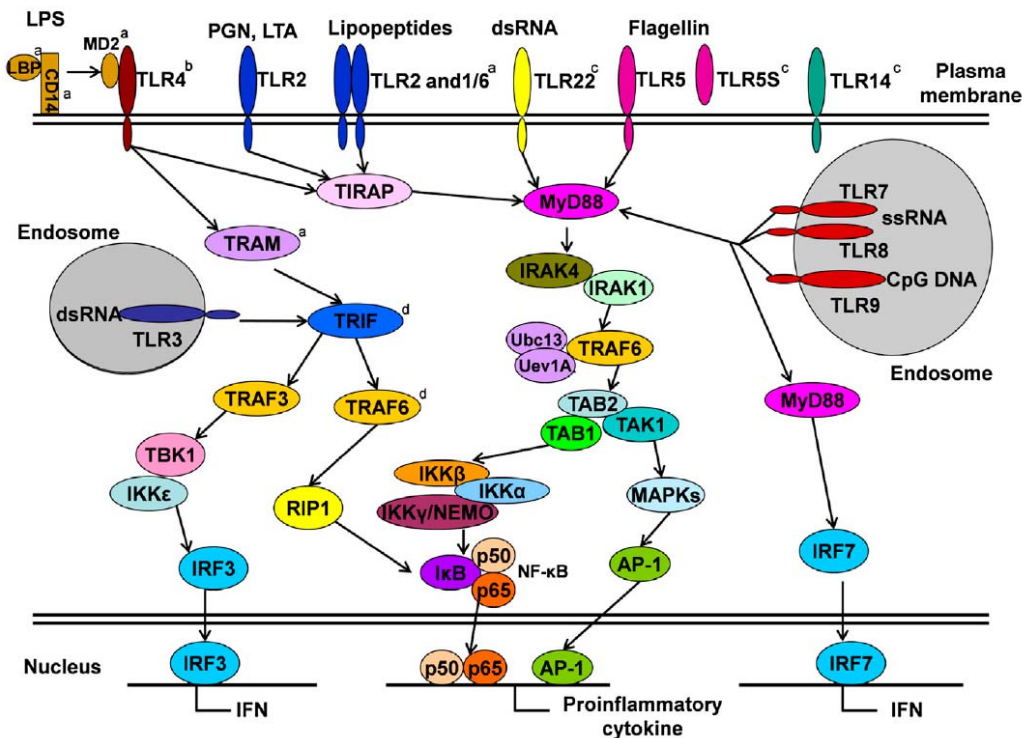
Existen otros componentes vinculados a la respuesta inmune, como es el caso de las células citotóxicas no específicas, que han sido identificadas en peces cebras y están consideradas como precursoras de las células *natural killer* de mamíferos, pero hasta la fecha no se ha descrito su funcionabilidad [40]. Un aspecto curioso de la inmunidad del pez cebra es que en sus primeros cuatro días de desarrollo, no exhiben adaptación, de ahí que resulten una herramienta valiosa para el estudio de la inmunidad innata, ya que se ha comprobado que no es hasta las 4-6 semanas que la inmunidad adaptativa se vuelve un factor funcional en estos animales [41, 42].

La existencia de múltiples PAMPs y PRRs de detección de patógenos, específicamente del tipo viral, potencia la respuesta celular y permite una defensa rápida y eficaz [43]. Los PRRs inician mecanismos de defensa antimicrobianos a través de varias vías de señalización que traen consigo la activación de genes y la síntesis de moléculas como citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión celular e inmunorreceptores que promueven una respuesta temprana del animal ante las infecciones [44], y que al mismo tiempo resultan un vínculo de unión a la respuesta inmune adaptativa [45].

La familia de los receptores Toll-like, constituye un grupo importante de PRRs que reconocen una multitud PAMPs. En la actualidad, se han identificado 24 TLRs en el genoma del pez cebra [43, 46]. Aunque no se han identificado todos los ligandos específicos para cada receptor, se sabe que muchas de las moléculas que intervienen en las vías de señalización están conservadas entre el pez cebra y los mamíferos. Los TLR han sido estudiados en el pez cebra tanto frente a bacterias como frente a estímulos virales. En cuanto al reconocimiento de virus, en el pez cebra se han relacionado con la respuesta contra estos patógenos los siguientes TLRs: TLR3, TLR7, TLR8a/b, TLR9 Y TLR22 (este último se ha descrito únicamente en peces) [47]. En la Figura 8 se muestra un diagrama de señalización vía TLR.

La detección de patógenos virales por parte de los PRR conduce a la activación de factores de transcripción tales como los factores reguladores del interferón (IRF) y el factor nuclear kappa B (NFkB) que inducen la producción de interferón y una robusta respuesta inmune inflamatoria [48]. Lógicamente esta respuesta inflamatoria que se inicia después del reconocimiento del virus, es también importante para la eliminación de patógenos virales, debido a que una activación de NFkB desencadena la transcripción de genes de citoquinas pertenecientes a la cascada de inflamación, como por ejemplo la interleucina-6 (IL6), interleucina-1b (IL1b) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) [48, 49].





**Figura 8: Vías de señalización de los TLRs**, que evidencian todos los factores que desencadenan una respuesta vía TLRs. Imagen tomada de publicación de Zhang y cols [34].

Otro componente importante de la respuesta inmune innata en peces cebras, es el epitelio y los factores que éste secreta. El mucus que desprende la piel forma la barrera de defensa primaria entre el pez y su ambiente, debido a que contiene proteínas y carbohidratos y tiene una función protectora previniendo la colonización en su superficie, de parásitos, bacterias y hongos, a través de una continua pérdida y reemplazo [50]. El mucus, además de la mucina, está compuesto por precipitinas inespecíficas, aglutininas, proteína C-reactiva (CRP) y lisozima, las cuales constituyen una barrera de defensa química primaria. También, internamente, el mucus tapiza las paredes del tracto digestivo que, junto con pH extremos y enzimas proteolíticas, sirven de defensa contra potenciales patógenos. Muchas de estas funciones de reconocimiento y de regulación son parte de la respuesta en la fase aguda de una infección y es quizás la forma más antigua de reconocimiento de “lo no propio” y que se ha conservado en la línea evolutiva. En los peces pueden representar un sistema de reconocimiento primitivo, más que una acción efectora en la destrucción del patógeno.

Otra de las moléculas con un papel clave y vinculadas en la respuesta inmune innata son los interferones (IFNs) que intervienen en la lucha frente infecciones



virales y microbianas [51]. Los IFNs son glicoproteínas producidas por macrófagos, linfocitos, fibroblastos y células *natural killer* (NK) y suelen aparecer en respuesta a una infección viral, una estimulación inmune o una variedad de estimuladores químicos [52]. Han sido identificados en muchas especies de peces y específicamente en pez cebra existen dos grupos diferentes: tipo I y tipo II, aunque comparten la misma nomenclatura que los IFN de mamíferos, presentan distintas características biológicas y estructurales [51, 53]. Entre ellos encontramos subtipos: IFN $\phi$ 1 y IFN $\phi$ 3 que pertenecen al tipo I y IFN $\phi$ 2 y IFN $\phi$ 4 que pertenecen al tipo II. La mayoría de los estudios sugieren que los IFNs tienen receptores específicos [54, 55]. Su función es participar de forma activa en una urgente respuesta antiviral. La señalización de estas moléculas da lugar a la inducción transcripcional de un gran número de genes diana ISG (genes estimuladores de la respuesta de interferón: ER-IFN) los cuales activan varias rutas provocando respuestas versátiles ante las infecciones. Entre ellos podemos destacar las moléculas los factores de estimuladores de la expresión de IFN denominados IRF-3 e IRF-7, las proteínas Mx entre otras.

Otro de los elementos vinculados a la respuesta inmune innata es el sistema de complemento. El sistema del complemento se compone de diferentes proteínas séricas y representa un sistema de defensa muy importante en los peces. El sistema del complemento consiste en una cascada enzimática compleja que comprende varias glicoproteínas inactivas, que son activadas por una de las tres rutas de activación conocidas: clásica, alternativa y la mediada por lectina [56, 57]. Las funciones del sistema del complemento incluyen actividad lítica (para virus, bacterias y parásitos) y neutralización de exotoxinas bacterianas. También proporciona señales de patógenos potenciales para el huésped y contribuye a la degradación de los patógenos a través del reclutamiento de las células inmunes y opsonización [58]. De esta forma el complemento juega un papel en el aclaramiento del complejo inmune y participa en las reacciones inflamatorias atrayendo las células fagocíticas al lugar de la lesión [56].

Además del complemento, existen otros elementos inmunes no específicos que no sólo actúan como primera línea de defensa contra todos los patógenos, sino que también desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune

adquirida. Estos elementos no específicos incluyen péptidos antimicrobianos (AMPs) que se describirán más adelante, la lisozima, lectinas, etc. entre otros.

Los AMPs, tienen un amplio espectro de acción relacionados con la interacción con el patógeno a través de su membrana, o afectando blancos internos, como la replicación del ADN y la síntesis de proteínas, e interactuando con el huésped con funciones inmunomoduladoras de la regulación del proceso inflamatorio y de la cicatrización [59]. Se ha demostrado que en condiciones fisiológicas y durante una infección, la capacidad inmunomoduladora de muchos AMPs es más importante que su actividad microbicida [29, 60-63], lo que sugiere que en muchos casos las propiedades anti-infectivas de los AMPs están directamente asociada a su actividad como reguladores de la respuesta inmune [59].

### ***Inmunidad adaptativa.***

El sistema inmune adaptativo en el pez está compuesto de un conjunto de células sistémicas que son las encargadas de procesar la información para eliminar o prevenir desafíos de patógenos. El sistema inmune adaptativo en ocasiones es activado por el sistema inmunitario innato "no específico". La inmunidad adaptativa no es una respuesta específica contra la presencia de antígenos, y juega un papel vital en la protección contra infecciones recurrentes mediante la generación de células de memoria (inmunidad mediada por células) [38, 64]. Se divide en inmunidad humoral, basada en la producción de inmunoglobulinas (Ig) por los linfocitos B, e inmunidad celular, mediada por los linfocitos T colaboradores "helper" (CD4+), los cuales inducen la producción de linfocitos T citotóxicos (CD8+) y la activación de macrófagos [65-67]. Esta respuesta desarrollada por células T e inmunoglobulinas (Ig) permite la eliminación rápida y eficiente de los patógenos específicos de los peces [66, 68]. Aunque los peces no tienen médula ósea o nodos linfoides, el timo, el riñón y el bazo asumen este papel. Los linfocitos son capaces de proliferar tras el contacto con el antígeno, generando un clon de células antígeno específicas, algunas de las cuales darán lugar a la respuesta inmune primaria, mientras que otras permanecen como células de memoria que generarán una respuesta secundaria. Esta respuesta es más rápida y de mayor magnitud frente a las subsiguientes exposiciones al antígeno (respuesta inmune secundaria) [38, 67]. Resulta notable, en peces, que los genes que codifican para los productos del

complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y del MHC de clase II se encuentran en cromosomas diferentes. La existencia de dos tipos de MHC implica la diferenciación de dos poblaciones funcionales de linfocitos T, cooperadores y citotóxicos.

En relación con la respuesta inmune adaptativa de los peces frente a virus, hay que señalar que, aunque más específica y con memoria, es más lenta que la innata y es dependiente de temperatura [68]. Así por ejemplo en salmónidos, la respuesta de anticuerpos puede tardar en elaborarse más de seis semanas. Al igual que en mamíferos, en peces son los anticuerpos los que confieren la especificidad al reconocimiento. Sin embargo, en el caso de los peces parece existir un repertorio de anticuerpos menos diversos [38] y fundamentalmente constituido por inmunoglobulinas (Ig) M e IgT que han sido descritos en trucha [69, 70]. La inmunoglobulina de membrana (sIg) con función de receptor en los linfocitos B, es la forma predominante de clase M (sIgM) que mayoritariamente es producida en peces [69, 70].

Las células B, las células plasmáticas y las Ig se han especializado en la defensa del entorno, conformando una barrera mucosal [71, 72]. Los peces tienen una microbiota asociada en cada una de sus barreras mucosales. En las secreciones de mucosas en los peces teleósteos están presentes tanto IgT y IgM, son detectables a nivel de proteína mediante immunoblotting o ELISA [50].

Actualmente existen varios ejemplos de producción de anticuerpos neutralizantes en peces contra virus. Uno de los ejemplos que más destaca es el caso del estudio realizado por Estepa y Coll, en el cual se detectó la presencia de anticuerpos neutralizante en peces supervivientes a infecciones con VHSV [27].

### ***Inmunidad entrenada.***

Los recientes avances en la inmunología de vertebrados están proporcionando un nuevo marco conceptual, con el que cambiar nuestra comprensión sobre el papel del sistema inmune innato en la concesión de resistencia a la reinfección. De hecho, informes recientes han demostrado que no sólo las respuestas adaptativas de los vertebrados tenían memoria, sino también la inmunidad innata como se describió

hace años en plantas e invertebrados [73, 74]. Además, en los mamíferos hay crecientes evidencias experimentales que indican que esta "memoria" podría ser utilizada para complementar la respuesta inmune adaptativa a las vacunas virales [75-77], aunque hay que destacar que hasta la fecha no existen evidencias en peces.

Las evidencias recientes revelan que la inmunidad innata de los vertebrados tiene también "memoria" y otras características adaptativas, como el aumento de las respuestas a las reinfecciones. El término "inmunidad entrenada" se ha propuesto para describir tales respuestas [74], a pesar de que su existencia había sido previamente demostrada en plantas e invertebrados [73]. Los principales rasgos que definen la inmunidad entrenada son los siguientes:

- i) se induce después de la infección y confiere protección a través de mecanismos independientes de células B y/o T,
- ii) aumenta la protección cruzada a patógenos homólogos y heterólogos,
- iii) en ella funcionan componentes tales como células de macrófagos y *natural killers* (NK) [78, 79],
- iv) Aumenta la detección de patógenos mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y respuestas inflamatorias [76],
- v) Y a diferencia de la memoria de las respuestas adaptativas, se asocia a la reprogramación epigenética (modificaciones de ADN/histona, miARN, etc.), en lugar de la recombinación genética [80].

Existen reportes de estudios en mamíferos los cuales sugieren que después de la inmunización, las defensas de vertebrados aumentan las respuestas de reacción cruzada de la inmunidad entrenada [76, 80-84]. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Kleinnijenhuis y cols., quienes comprobaron que tras la vacunación con *Bacillus de Calmette y Guérin* (BCG) este promueve la protección en ratones contra una infección posterior con el microorganismo *C. albicans* [83] y a su vez la activación de citoquinas inflamatorias [82]. De forma similar García Valtanen y cols, en otro estudio realizado con monocitos murinos y tratados con *C. albicans*, fueron resistentes a una reinfección con LPS, y se evidenció además el incremento de citoquinas inflamatorias [81].

Resulta de particular interés el incremento de los estudios en humanos y roedores, relacionados con la inmunidad entrenada y la administración de betaglucanos [74, 79, 81, 85]. Debido a la posición de los peces teleósteos como vertebrados iniciales en el sistema evolutivo, es de esperar que la inmunidad entrenada sea un mecanismo importante que juegue un rol activo en la estimulación inmune de los peces tras la administración de betaglucanos. Hasta este momento, ningún estudio ha investigado de forma concienzuda la inducción de inmunidad entrenada en peces teleósteos después de administrar betaglucanos. Después de una primera revisión de la literatura para obtener indicaciones claras de la inmunidad entrenada por betaglucanos en peces, nos dimos cuenta de que era difícil atribuir inequívocamente los efectos observados [86, 87].

### *Inmunoestimulantes y su efecto en la inmunidad innata y la inmunidad entrenada,*

El desarrollo en los últimos años de la industria de la acuicultura, con una gran densidad poblacional en granjas piscícolas, y asociado a esto, el incremento de enfermedades infecciosas de rápida expansión, han traído consigo el aumento del uso de inmunoestimulantes como potenciadores de la ganancia de peso y aumento de la resistencia a la enfermedad en las granjas de crías de peces.

Un inmunoestimulante es una sustancia natural o de síntesis química que estimula el sistema inmunitario por medio de vacunas específicas (vacunas o antígenos) o no específica (independientemente de la especificidad antigénica) [88]. En el caso de los inmunoestimulantes de naturaleza química, son aquellos que existen como elementos estructurales principalmente de las bacterias, hongos miceliales y levaduras, que activan los leucocitos y por tanto confieren al animal mayor resistencia a las enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos, siendo capaces de actuar sobre los mecanismos de respuesta inmune del hospedador para el control de patógenos [88, 89]. Entre ellos podemos encontrar:

a) elementos estructurales de las bacterias (lipopolisacáridos LPS, lipopéptidos, glicoproteínas capsulares y muramilpéptidos);

b) derivados de productos de  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos, provenientes de bacterias, hongos miceliales y levaduras;

c) carbohidratos con estructuras complejas (glucanos) de varias fuentes biológicas incluyendo algas;

d) péptidos presentes en extractos de ciertos animales o hechos por hidrólisis enzimática de proteínas de peces, que presentan una actividad antimicrobiana.

En acuicultura, los inmunoestimulantes no específicos han sido ampliamente utilizados probablemente debido al conocimiento limitado de la respuesta inmune en los peces y a la facilidad de sus aplicaciones. La valoración del efecto de los inmunoestimulantes va dirigida a la evaluación de parámetros vinculados a la inmunidad y sus consecuencias en el sistema inmune innato. Anteriormente habíamos planteado que el sistema inmune innato tiene componentes celulares y humorales a través de los cuales realiza su función protectora. Entre sus principales componentes a nivel celular están los leucocitos, monocitos, macrófagos y granulocitos [90].

En *Salmoniformes*, *Cypriniformes* y *Perciformes* los tipos celulares más abundante son los granulocitos y neutrófilos [91]. En el caso de los neutrófilos y los macrófagos, ellos son los responsables de la producción de moléculas bioactivas para el reconocimiento y destrucción de patógenos, establecer la comunicación celular, además de activar e iniciar una respuesta inmune adaptativa, para finalmente crear una respuesta y reparar los tejidos. Otro aspecto importante de estos tipos celulares es que son responsables de llevar a cabo la fagocitosis, lo cual constituye uno de los principales mecanismos de la inmunidad innata, al lograr eliminar bacterias, virus y parásitos. Este mecanismo de eliminación de microbios desencadena así diversos procesos antimicrobianos, incluyendo la activación de una respuesta celular, la activación de radicales libres y la producción de citoquinas, todos ellos activados por el interferón gamma (IFN-g) o por el TNF $\alpha$  [88, 92]. Otro de los aspectos que se ha logrado describir es la activación de factor nuclear KB (NF-KB) en respuestas a procesos inflamatorios [92].

En los últimos años ha habido un aumento del uso de los inmunoestimulantes para incrementar la resistencia a algunas infecciones (Nakagawa, 2007). Dentro de los inmunoestimulantes más comúnmente utilizados en peces, se encuentran los betaglucanos (principalmente extraídos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*),

los probióticos, lipopolisacáridos (LPS) y algunos péptidos antimicrobianos (betadefensinas, hepcidinas, etc.) [93].

### **Betaglucanos.**

Los betaglucanos son homopolímeros lineales de unidades de glucosa enlazadas a través de enlaces O-glicosídicos del tipo  $\beta(1,3)$ , con posibles ramificaciones a través de enlaces O-glicosídicos del tipo  $\beta(1,6)$  [86, 94]. Se encuentran en plantas, algas, bacterias, hongos y levaduras [95]. Los betaglucanos de las levaduras son heteropolímeros que contienen unidades de glucosa y manosa como principales constituyentes y están presentes en la membrana celular [86, 93].

Mucho se ha escrito en lo relacionado al mecanismo de entrada de los betaglucanos, inclusive se han propuesto los receptores de interacción con estas moléculas, describiéndose la Dectina-1 (pertenece a los receptores similares a la lectina tipo C) y el TLR2, como moléculas fundamentales en la señalización de los betaglucanos. La unión cooperativa de la Dectina-1 y el TLR2, inducen un aumento de la producción de IL-10, IFN $\gamma$  e IL-2 [96, 97]. Otros estudios han sugerido la inducción por parte de la Dectina 1 de la interleukina IL-17, la cual, a su vez, promueve la producción de Th17. El gen de esta interleukina (IL-17) se ha descrito en peces cebra, trucha arcoíris y en la lamprea [86, 98, 99]. En peces, la respuesta de estos genes es importante en la activación de células epiteliales, reclutamiento de neutrófilos, y para la migración de leucocitos hacia la mucosa por modulación de la expresión de receptores de citoquinas.

Además se ha demostrado que el reconocimiento de betaglucanos activa directamente los leucocitos, estimula la fagocitosis, la actividad citotóxica y antimicrobiana, incluyendo la producción de especies reactivas intermediarias de nitrógeno y oxígeno; adicionalmente, estos carbohidratos modulan la producción de mediadores proinflamatorios, citoquinas y quimioquinas, como IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ , otorgando una mejor y más rápida capacidad de respuesta, que repercute en una mayor resistencia a patógenos [100, 101].



## **Reprogramación epigenética.**

La epigenética se define como el estudio de los mecanismos que regulan la expresión génica sin modificar la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN). Esta disciplina representa un puente entre las influencias genéticas y ambientales en el desarrollo de un fenotipo. Los cambios epigenéticos permiten que unos genes se expresen o no, en función de condiciones exteriores, y son esenciales en la diferenciación celular y tisular que tiene lugar durante el desarrollo embrionario, y también, en los organismos adultos [102].

Las modificaciones epigenéticas son importantes en la regulación de los mecanismos celulares y vías durante el desarrollo embrionario, en la función de memoria, en la inmunidad y en la enfermedad [103, 104]. Aunque las mutaciones afectan directamente al material genético cambiando el código genético, las modificaciones epigenéticas cambian la estructura de la cromatina o modifican el ácido nucleico sin alterar el código genético. Esto hace que las modificaciones epigenéticas sean reversibles, flexibles y que rápidamente respondan a los cambios en el ambiente y otras exposiciones. Basado en esta capacidad, el estudio de las modificaciones epigenéticas es una importante interfaz entre el medio ambiente y el genoma [103]. De ahí la importancia del avance en los estudios de epigenética para ayudar en la comprensión y análisis de la inmunidad innata y adaptativa, las enfermedades infecciosas y las enfermedades oncológicas [102, 105].

Los mecanismos epigenéticos proporcionan una serie de principios reguladores que definen los cambios en la expresión génica, sin alterar la información genética codificada en el propio ADN [106]. Es importante destacar que estas modificaciones químicas del ADN o sus proteínas asociadas son estables y heredables y, por tanto, determinan el fenotipo celular. Hay un consenso en la literatura sobre el hecho de que los factores desencadenantes de estos cambios pueden tener influencia en el epigenoma, tal es el caso de los siguientes ejemplos: cambios ambientales, influencia de patógenos (incluidos los virus) y una variedad de agentes causantes de enfermedades inflamatorias y malignas [2].

Las modificaciones en las colas amino-terminales de las histonas (acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitylation) están asociadas con cambios



conformacionales en las estructuras de la cromatina [107, 108]. Se conoce que la metilación de las colas de las histonas, en algunos casos, genera una estructura abierta de la cromatina que contribuye a incitar la transcripción activa [109]. Es importante destacar que el estado epigenético de las células inmunitarias parece estar controlado tanto por programas autónomos como por factores bioambientales tales como citoquinas y factores microbianos [102]. Existen varios trabajos en los que se ha planteado que las funciones de los macrófagos están reguladas por modificaciones de las histonas, estableciendo de esta forma una reprogramación de la inmunidad [110-112]. Por ejemplo, algunos procesos de desacetilaciones y metilaciones en los residuos de lisina, de las colas de las histonas, pueden contribuir al aumento de la transcripción de genes de citoquinas inflamatorias, llevando a cabo un reclutamiento activo de macrófagos y la activación de la transformación de monocitos a macrófagos [113-117].







**OBJETIVOS DEL TRABAJO.**



## JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.

Este trabajo se desarrollado en el marco del proyecto AGL2014-15773-C3 (MINECO) denominado "Buscando aplicaciones para la memoria innata ("*trained immunity*") en peces: inmunomoduladores, agentes terapéuticos y vacunas". Decidimos desarrollar el presente trabajo de Tesis Doctoral empleando el pez cebrá como modelo animal, dadas las características de este pez, su fácil manipulación y mantenimiento. Teniendo en cuenta además que cada día aumentan las infecciones víricas por Rhabdovirus, específicamente por SVCV y que las pérdidas económicas son cada vez mayores, realizamos este trabajo para profundizar en el estudio de aspectos relacionados con el sistema inmune y el desarrollo de la respuesta antiviral.

### OBJETIVO PRINCIPAL.

Debido a la importancia del sistema inmune en la primera línea de defensa frente a las infecciones víricas con SVCV en peces cebras, así como en el presente trabajo se plantea como objetivo principal investigar las principales características de la reprogramación de la inmunidad innata en el pez durante la infección viral, así como los principales rasgos que definen la inmunidad entrenada tras una reinfección viral.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Determinar si existe reprogramación de la inmunidad *in vivo* en la respuesta generada en peces cebrá tras la infección con SVCV, centrándonos en la activación de genes del sistema inmune innato como base molecular del mejoramiento de una posible inmunidad entrenada.
2. Evaluar el perfil proteómico del plasma de peces cebrá infectados con SVCV, para estudiar las proteínas sintetizadas y liberadas al torrente sanguíneo como resultado de la infección.
3. Determinar el posible establecimiento de la inmunidad entrenada en peces cebrá, tras la administración de betaglucanos, y posterior infección con SVCV.



**MATERIALES Y MÉTODOS.**







## Animales de estudio.

Los peces cebra adultos (*D. rerio*) (6-7 cm de longitud) fueron obtenidos comercialmente y mantenidos a 28°C en tanques de 30 litros, equipados con un sistema de recirculación de agua de clorada. Los peces fueron alimentados diariamente con alimento comercial. Antes de los experimentos los peces fueron aclimatados a una temperatura de 22°C condiciones de laboratorio durante 2 semanas. Todos los procedimientos realizados en este trabajo fueron desarrollados siguiendo el protocolo aprobado por la Oficina Evaluadora de proyectos de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Cod No. 2016/VSC/PEA/00182).

## Virus.

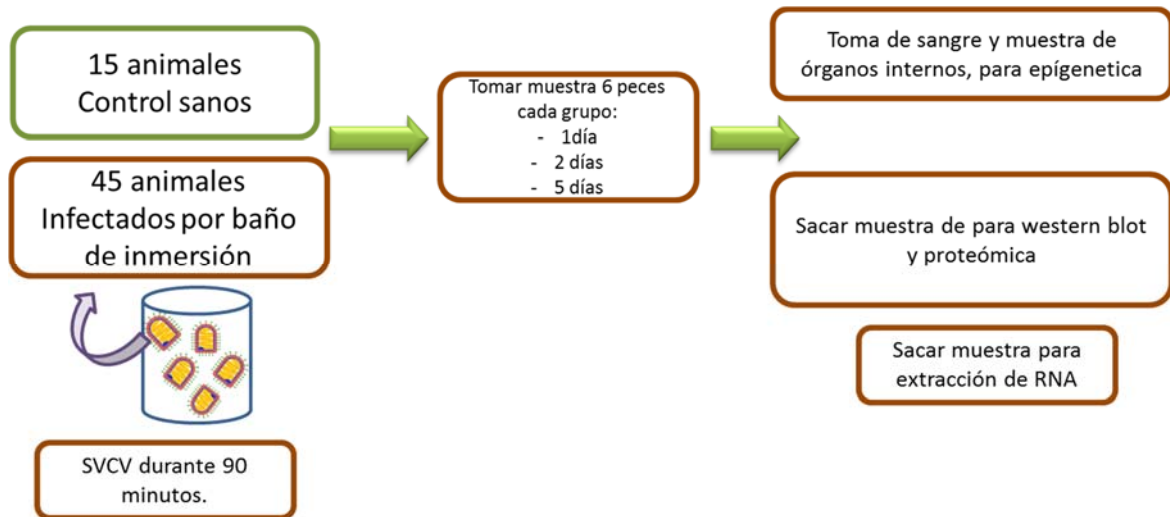
La cepa de virus SVCV 56/70, aislado de carpa fue propagado en células ZF4 a 22°C, durante 5 días hasta lisis total del cultivo celular [13]. Posteriormente el sobrenadante de células infectadas con SVCV fue clarificado por centrifugación a 4.000g por 30 minutos y almacenado en alícuotas a -80 °C hasta su uso. Los sobrenadantes clarificados fueron usados para ensayos *in vitro* e *in vivo*.

## Células.

La línea celular ZF4 (*zebrafish embryonic fibroblast*) (ATCC CRL-2050) [118] obtenida de la ATCC (*American Type Culture Collection*) fue usada en el desarrollo de este trabajo. Las células ZF4 fueron mantenidas a 28°C con un 5% de atmósfera de CO<sub>2</sub> con medio de cultivos RPMI-1640 Dutch modificado (Gibco, Invitrogen Corporation, UK) conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) (SIGMA, USA), 1 mM de piruvato (Gibco, *Invitrogen Corporation*, UK), 2mM de Glutamina (Gibco, *Invitrogen Corporation*, UK), 50 µg/mL de gentamicina (Gibco, *Invitrogen Corporation*, UK) y 2 µg/mL fungizona (Gibco, *Invitrogen Corporation*, UK).

## Infecciones de peces cebra con SVCV.

Los peces fueron aclimatados a 22 °C durante dos semanas previas a la realización del experimento. En la Figura 9 se incluye el diseño experimental.



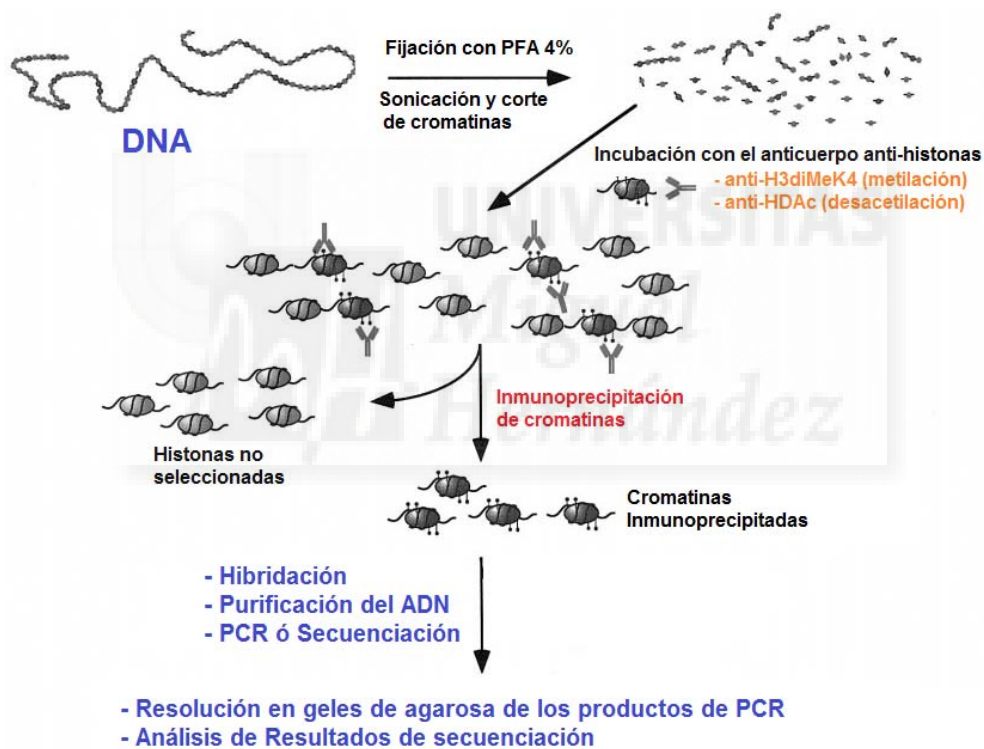
**Figura 9: Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de la infección por SVCV en el sistema inmune del pez cebra.** Los peces cebra fueron infectados con SVCV por baño de inmersión a 22°C. Pasadas 1 día post infección se inició la toma de muestras para diferentes ensayos, luego a 2 días y posteriormente 5 días.

Para esto, los peces fueron introducidos en 2 litros de agua conteniendo  $10^4$  PFU/mL de SVCV durante 90 minutos a 22 °C. Posteriormente fueron traspasados a tanques de agua declorada limpia y el flujo de aire fue restaurado (Figura 9) el diseño experimental. Pasadas las primeras 24 horas de la infección, se comenzó con la toma de muestras de órganos de los animales tratados y sin tratar para la realización de los distintos experimentos, así como la muestra de plasma para el desarrollo de experimentos de proteómica. En nuestro caso realizamos la toma de muestras a los siguientes tiempos: 1d, 2 d y 5d.

### Inmunoprecipitación de cromatina.

Para el análisis de la reprogramación epigenética se realizó una inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), utilizando el Kit Imprint CHIP (SIGMA, Missouri, EE.UU) y siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante, a continuación explicamos brevemente el procedimiento [119]. Primero realizamos la extracción del tejido. Los peces fueron sacrificados por sobreexposición al anéstesico (MS-222) y se extrajo los órganos internos de 3 peces/muestra, estableciendo un pool de 3 peces. A manera de resumen en la Figura 10 se observa un diagrama de trabajo para la obtención de ADN a partir de inmunoprecipitación de cromatinas.

Los tejidos extraídos y mezclados en pool se introdujeron en tubos Corning de 15 mL que contenían para-formaldehído (PFA) (SIGMA, Missouri, EE.UU) al 1%, y fueron fijados durante 20 minutos. Una vez pasado este tiempo se le añadió glicina (1,25M) durante 5 minutos para detener la reacción y se procedió a centrifugar para eliminar el PFA y, posteriormente los cortes de tejido se lavaron con tampón fosfato salino eliminando los lavados por centrifugación. Inmediatamente se sonicaron para obtener la cromatina cortada en fragmentos pequeños y este extracto de ADN se centrifugó y una muestra fue aplicada en geles de agarosa para verificar el corte del ADN en fragmentos de 200-500 pb.



**Figura 10: Esquema resumido de trabajo para el ensayo de inmunoprecipitación de cromatinas.** A partir de peces infectados se obtuvieron los tejidos de vísceras para proceder con la inmunoprecipitación de cromatinas, siguiendo el protocolo descrito en el kit de inmunoprecipitación.

Para inmunoprecipitar las histonas unidas al ADN, se incubó el sobrenadante obtenido anteriormente en una placa de 96 pocillos previamente tapizada con el anticuerpo anti histona 3, trimetil, lisina 4 (H3K4Me3) (SIGMA, USA) durante 90 minutos. Una vez inmunoprecipitado el ADN se procedió a revertir la reacción de fijación con un buffer provisto en Kit de ChIP. Y seguidamente se purificó el ADN

empleando las columnas y tampones provistos en el Kit, obteniendo así el ADN completamente purificado.

### Secuenciación del ADN obtenido por inmunoprecipitación de cromatinas.

Una vez purificado el ADN inmunoprecipitado, se contrataron los servicios de la Empresa Bioarrays (Elche, UMH), y se procedió con la secuenciación de las muestras. Para esta parte del trabajo se desarrolló el análisis de las siguientes muestras infectadas y sin infectar, generadas en nuestro estudio y todas ellas elaboradas con pool de órganos internos de 3 peces, es decir 6 peces por tiempo analizado: 2 muestras control (C1 y C2); 2 muestras 1d (T24h1 y T24h2); 2 muestras 2d (T48h1 y T48h2) y 2 muestras 5d (T5d1 y T5d2).

Se construyeron las librerías empleando el kit NEBNext Ultra II DNA Preparación de librerías para Illumina (Lucigen, Inglaterra) [120]. Posteriormente se secuenciaron las librerías empleando un equipo Illumina NextSeq500, en modo 2x75. Las lecturas obtenidas se sometieron a un control de calidad mediante el programa FastQC y un filtrado estándar mediante el programa Trimmomatic [121]. Seguidamente se realizó un alineamiento de las lecturas al genoma *D. rerio* GRCz10.85 empleando el programa Bowtie2 [122]. El análisis de los datos del experimento ChIPSeq se realizó empleando el programa MACS [123]. Este programa emplea un algoritmo computacional que identifica las regiones del genoma con unión a factor de transcripción/cromatina/histonas desde los datos de ChIPSeq. El análisis se divide en dos pasos:

- ✓ Detección de picos y cuantificación de cada grupo obtenido: (Metilac.xlsx). En esta fase del análisis se detectan los picos de lecturas (regiones con un número elevado de lecturas alineadas, respecto al conjunto del genoma).
- ✓ Asignación de picos a genes: Cada pico, de aproximadamente 300 pb, es asignado a un gen o genes en función de su posición, siguiendo el siguiente criterio: se define una región que incluye el propio gen y se extiende 100 kb (100.000 pb) aguas arriba. Cada pico que caiga dentro de este intervalo es asignado a dicho gen. Debido a que en una región de 100 kb pueden coexistir varios genes, cada pico puede ser asignado a un conjunto de genes.

- ✓ **Análisis diferencial:** el programa MACS, en una segunda fase, es capaz de detectar cambios de un conjunto de muestras respecto a otro. Este tipo de análisis está indicado cuando tenemos condiciones distintas, como es nuestro caso, infectados vs control.

Tras la secuenciación la empresa nos entregó los datos pertinentes, que contenían por cada muestra analizada un listado de genes, con su identificación en la base de UNIPROT [124, 125], con el número de lecturas, así como los análisis de incremento relativo respecto al control no infectado. Las regiones genómicas enriquecidas en lectura se detectaron utilizando el algoritmo de agrupación espacial para la identificación de regiones enriquecidas en ChIP (SICER) [126]. Para detectar las regiones enriquecidas utilizamos el programa IGV (*Integrative Genomics Viewer*) que permite la visualización de los picos [127]. Estos se obtuvieron ajustando el tamaño de la ventana a 10kb. Sólo se seleccionaron regiones enriquecidas estadísticamente significativas basadas en el FDR del 5%. Se realizó un análisis de algunos de los genes de interés asociados al sistema inmune innato y respuesta a infección viral.

### **Análisis bioinformático de los datos obtenidos de secuenciación.**

Inicialmente realizamos un análisis bruto de limpieza de todos los datos obtenidos, eliminando aquellas lecturas que no eran asignadas a ningún gen en específico. Una vez concluido este proceso para cada una de las muestras, se comenzó a trabajar con una serie de programas que permiten el análisis global de genes y la verificación de los conjuntos de genes que estaban enriquecidos en los listados de expresión obtenidos a partir de la secuenciación. El análisis se realizó tomando en cuenta 2 métodos:

1. Un análisis global de todos los genes obtenidos y utilizando la aplicación del GESTALT (<http://www.webgestalt.org/option.php>), la cual tiene incluido en su base de datos al pez cebra como organismo, lo que permite integrar el análisis funcional de conjuntos de genes enriquecidos y su análisis estadístico [128]. La particularidad de esta aplicación es que permite integrar vías de señalización procedentes de la BASE KEGG [129], REACTOME [130] y de WIKIPATHWAY [131].

2. El segundo método de análisis lo realizamos empleando la aplicación del GSEA (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). Este programa nos permite analizar los conjuntos de genes enriquecidos dado un listado de *pathways* obtenidos previamente y dirigidos al análisis de ruta de señalización del sistema inmune [132].

### ***Análisis de los conjuntos de genes enriquecidos en el listado de genes obtenidos por secuenciación mediante el GESTALT.***

Para determinar los conjuntos de genes enriquecidos en el listado de genes obtenidos por secuenciación, utilizamos la herramienta de análisis de conjuntos de genes GESTALT [133]. Este listado de genes fue elaborado en cada uno de los grupos generados (SVCV-1d, SVCV-2d, SVCV-5d), en este caso solo incluimos los genes identificados. Al realizar el análisis las listas de genes por cada grupo se obtuvo un listado de los conjuntos de genes que podrían ser los más enriquecidos, teniendo en cuenta los genes detectados implicados en las rutas de señalización y el conjunto total de genes de cada ruta. Siendo así un análisis cualitativo primario.

### ***Análisis del enriquecimiento de los niveles de expresión de diferentes conjuntos de genes GSEA (del inglés Gen Set Enrichment analysis).***

El análisis de expresión genómica de ADN se ha convertido en un pilar de la investigación genómica. El reto no se encuentra tanto en la obtención de perfiles de expresión génica, sino más bien en cómo interpretar los resultados para obtener más información sobre los mecanismos biológicos. En un experimento típico, se generan perfiles de expresión de miles de genes de una colección de muestras pertenecientes a diferentes grupos, por ejemplo infectados con virus y sin infectar [132]. Los genes pueden ser ordenados en una serie de listas clasificadas por el investigador en base a funciones biológicas conocidas, según su expresión diferencial entre los grupos. El desafío es a partir de esta lista de genes, obtener información para obtener pistas reveladoras de cómo transcurre el proceso de infección. Un enfoque común ha sido centrarse en aquellos genes que muestran una mayor diferencia [134]. Existen algunos factores que lógicamente debemos tener en cuenta:

- i) Que las diferencias biológicas entre grupos sean modestas en relación con el ruido inherente a la tecnología de secuenciación utilizada.
- ii) Que podamos obtener una larga lista genes con expresión estadísticamente significativa y sin ningún significado biológico unificador. Evidentemente la interpretación podría resultar desalentadora.
- iii) Además, el análisis de un solo gen puede no tener efectos importantes en las vías. Esto puede deberse a que los procesos celulares, a menudo, afectan conjuntos de genes que actúan en concierto. Y un aumento de la expresión del 20 % de todos los genes listados puede ser más importante que un aumento de 20 veces en un solo gen.
- iv) Y, por último, y no menos importante, que cuando estudiamos diferentes grupos, puede que los genes listados con diferencia significativa no tengan ningún solapamiento.

Para realizar estos análisis se utilizó un método llamado GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) que evalúa datos de conjuntos de genes. Estos conjuntos de genes son definidos basándose en conocimientos biológicos previos, por ejemplo, información publicada, rutas bioquímicas o la expresión obtenida en experimentos desarrollados. El objetivo de GSEA es determinar si los componentes de un conjunto de genes  $x$  tienden a aumentar o disminuir su expresión en cuyo caso el conjunto de genes se correlaciona con el grupo predominante [132].

Primeramente, trabajamos con los valores obtenidos de la secuenciación de ADN inmunoprecipitados de cromatina, es decir un listado de genes, con las lecturas obtenidas por cada gen. Obteniéndose un listado que integraba todos los grupos (y las lecturas para cada gen a diferentes tiempos: SVCV-1d (infectados con SVCV a 1 día vs Control no infectado), SVCV-2d (infectados con SVCV a 2 días vs Control no infectado), SVCV-5d (infectados con SVCV a 5 días vs Control no infectado)). La lista de genes secuenciados fue analizada estadísticamente con un t-test métrico. Como base de datos para el análisis de los conjuntos de genes se utilizó un documento con 84 rutas de señalización denominado New47562.GeneSetGenes.gmx y que fue generado en el laboratorio del Dr. Julio Coll (INIA, Madrid) y gentilmente donado por él.



**Tabla 1.3: Conjunto de genes (GS) seleccionados a partir del *microarray* diseñado en el laboratorio del Dr. Julio Coll, todos ellos relacionados con la respuesta inmune en pez cebra (Agilent's ID 47562).**

Nombre ruta	genes	Nombre de ruta en KEGG	genes	Nombre WIKI ruta	genes
<i>Péptidos antimicrobianos, amp.</i>	9	<i>Procesamiento y presentación de antígenos.</i>	23	<i>Señalización integrina Alpha6-beta4.</i>	36
<i>Apoptosis, apo.</i>	36	<i>Apoptosis.</i>	25	<i>Apoptosis-wikipathway.</i>	49
<i>Complemento, com.</i>	36	<i>Células epiteliales e invasión bacteriana.</i>	35	<i>Modulación de la apoptosis por hsp70.</i>	13
<i>Cluster de diferenciación de antígenos, cdi.</i>	281	<i>Señalización de receptores de células B.</i>	42	<i>Receptor de células B. Wikipathway</i>	94
<i>quimioquinas, chk</i>	45	<i>Señalización de quimioquinas.</i>	46	<i>Señalización de EGFR1.</i>	103
<i>Citocromo, cyp</i>	51	<i>Cascada del complement y coagulación.</i>	51	<i>Señalización de EPO.</i>	20
<i>Proteínas alta movilidad, hmg</i>	11	<i>Detección de ADN citosólico.</i>	24	<i>Cascada Erk1-erk2 MAPK.</i>	71
<i>Proteínas dominio homo, hom</i>	59	<i>Células epiteliales y Helicobacter pylori.</i>	31	<i>Fas y la inducción de estrés</i>	28
<i>proteínas Heat shock, hsp</i>	97	<i>Señalización de Fc epsilon RI.</i>	59	<i>Señalización FGF.</i>	62
<i>Interferón, ifn</i>	36	<i>Fc gamma R mediada por fagocitosis.</i>	38	<i>Señalización de proteína G.</i>	17
<i>Immunoglobulinas, igs</i>	45	<i>Linaje de células hematopoyéticas.</i>	58	<i>Interleukin2.</i>	50
<i>Interleuquins, ils</i>	47	<i>Hepatitis C.</i>	59	<i>Interleukin3.</i>	65
<i>Quinasas, kin</i>	60	<i>Infección de Herpes simple.</i>	85	<i>Interleukin4.</i>	38
<i>Macrófagos, mac</i>	37	<i>Infección HTLV-I.</i>	104	<i>Interleukin5.</i>	43
<i>Complejo mayor de histocompatibilidad, MHC</i>	34	<i>Sistema inmune en la vía intestinal e IgA.</i>	29	<i>Interleukin6.</i>	61
<i>Proteínas inducidas por mixovirus, MX</i>	6	<i>Influenza A.</i>	86	<i>Interleukin7.</i>	29
<i>Receptores nuevos tipos immune, NITR</i>	17	<i>Señalización Jak-STAT.</i>	23	<i>Interleukin9.</i>	14
<i>Oncogenes</i>	45	<i>Malaria.</i>	34	<i>Adhesión celular mediada por integrinas.</i>	49
<i>Receptores de células T, tcr</i>	2	<i>Señalización MAPK.</i>	99	<i>Cascada MAPK.</i>	20
<i>Receptores tipo Toll, TLR</i>	21	<i>Sarampión.</i>	65	<i>Señalización MAPK.</i>	36
<i>Tumor necrosis factor, TNF</i>	26	<i>Citotoxicidad mediada por células natural killer.</i>	59	<i>Señalización P38-MAPK.</i>	27
<i>Factores de transcripción, TRA</i>	606	<i>Señalización por receptores tipo NOD.</i>	38	<i>Activación de degradación en el proteosoma.</i>	36
<i>proteínas inducidas por VHSV, VIG</i>	2	<i>Señalización por receptores tipo RIG-I.</i>	42	<i>Senescencia and autophagia.</i>	42
<i>Factores de Zin finger, zin</i>	36	<i>Señalización receptores de células T.</i>	60	<i>Señalización del crecimiento de hepatocitos.</i>	26
<i>Proteína C reactiva, crp</i>	7	<i>Señalización de TGF-β.</i>	39	<i>Receptor células T. Wikipathway.</i>	71
		<i>Señalización receptores tipo Toll.</i>	60	<i>Receptor TGF-β Wikipathway.</i>	93
		<i>Señalización NF-kB .</i>	69	<i>Señalización TGF-β Wikipathway.</i>	26
		<i>Señalización PI3K-Akt.</i>	73	<i>Señalización TNF-α y NF-κβ.</i>	111
		<i>Salidas de proteínas.</i>	19	<i>Receptores tipo Toll Wikipathway.</i>	53
		<i>Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico.</i>	63	<i>Señalización interferon tipo II (IFNG).</i>	19
		<i>Proteólisis mediada por ubiquitina.</i>	55		

Al realizar el análisis en el programa GSEA, se obtuvieron los datos de puntuaciones para conjunto de genes (*Enrichment Score*) y la normalización de este valor (NES), para corregir los datos con respecto a los genes identificados en los



conjuntos de genes propuestos. Igualmente se incluyó en el análisis el valor de la tasa de falso positivos (FDR del inglés *false discovery rate*) y es la probabilidad estimada de que un gen establecido con un NES dado represente un hallazgo falso positivo.

En la interpretación de los resultados, por ejemplo, un FDR del 25% indica que el resultado es probable que sea válido 3 de 4 veces. Los resultados de análisis del GSEA nos indicarán los conjuntos de genes enriquecidos con un FDR menor del 25% como los más propensos a generar hipótesis interesantes, pero no obstante proporciona resultados de análisis para todos los conjuntos de genes analizados. Otro de los valores que tuvimos en cuenta y de forma principal fue el valor normalizado de  $p$  (valor- $p$ )  $<0,05$ , el cual se utilizó como valor de corte y este valor estima la significación estadística de la puntuación de enriquecimiento para un único conjunto de genes.

### Visualización de interacción de los genes.

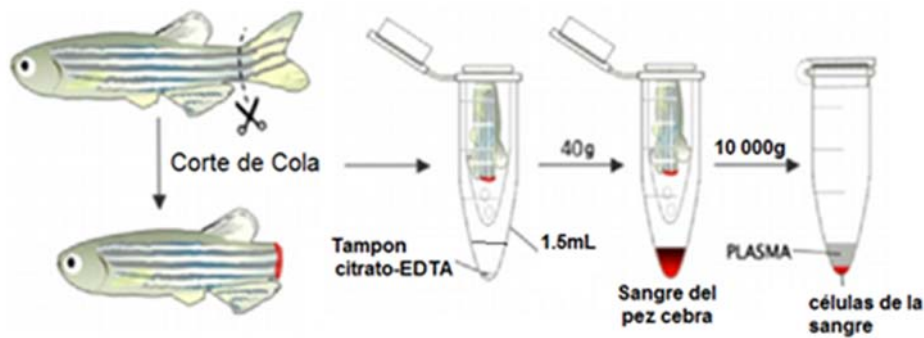
Una vez analizados los listados de genes a través del GSEA, decidimos desarrollar una visualización de las rutas, y para ello se utilizó el programa Cytoscape [135], el cual nos permitió tener una imagen global de las rutas moduladas por la expresión génica en peces infectados y a diferentes tiempos.

Igualmente se utilizó el programa STRING [136] para desarrollar visualizaciones de interacciones moleculares, lo cual nos permitió obtener una imagen de las interacciones establecidas entre los genes o proteínas de interés.

### Ensayo de proteómica.

Primeramente, se realizó un experimento de infección con SVCV *in vivo*, y siguiendo las indicaciones descritas en el apartado “Infecciones de peces cebra con SVCV”. Para la obtención del plasma, los peces fueron anestesiados, y posteriormente desinfectados con etanol al 70%. Seguidamente se les realizó un corte de la cola y se introdujeron en un tubo de 1,5mL que contenía 120  $\mu$ L de tampón citrato EDTA y se dejó fluir la sangre. A continuación, se extrajo el pez y se procedió a centrifugar a 8000 g durante 10 minutos para obtener el plasma para la

realización de los ensayos subsiguientes. En la Figura 11 se muestra en esquema de trabajo realizado para la obtención del plasma [137].



**Figura 11: Diagrama de trabajo para la obtención del plasma a partir de la sangre del pez cebra.** Figura modificada del trabajo de Fatemeh Babaei y cols [137].

Las muestras de plasma se enviaron para su análisis al grupo de trabajo del doctor Alberto Paradela del Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Y el diagrama de trabajo fue el descrito a continuación. Las muestras se lisaron con el buffer de lisis (9M urea/ 2M tiourea/ 5%CHAPS / 2mM TCEP+ cóctel antiproteasas) y se cuantificaron después con el reactivo de PIERCE 660nm Protein Assay [138]. A continuación, las muestras se precipitaron por el método de metanol/cloroformo y se realizó la digestión de las muestras empleando como enzima de corte la tripsina. Posteriormente los péptidos obtenidos de cada una de ellas se limpiaron mediante StageTip-C18 previo al análisis por espectrometría de masas.

Los digeridos obtenidos se cuantificaron a nivel de péptido por fluorimetría y se inyectó 1 ug de cada digerido en el equipo. El método empleado para la adquisición de los datos fue una combinación de: cromatografía líquida de 250 minutos a lo largo de la cual se separaron los péptidos por su polaridad (mediante una columna de fase reversa C-18) y después, los péptidos eluidos se fragmentaron en el espectrómetro de masas TRIPLE-TOF (LC-MS/MS). Los "rawdata" se exportaron y se lanzó una búsqueda usando el motor de búsqueda MASCOT frente a la base de datos de *D. rerio* de UNIPROT. Para aplicar un criterio de validez estadística, calculamos una FDR (tasa de falsos positivos) del 1% a nivel de péptido y, en base al cálculo de FDR, se filtraron los datos por el *score* de fragmentación para cada péptido correspondiente a cada muestra. De cada muestra se obtuvieron los siguientes datos PSMS que nos indican número de espectros de fragmentación

adquiridos, el número de péptidos asignados a cada proteína y emPai (*exponentially modified protein abundance index*) que proporciona una medida semicuantitativa de la abundancia de la proteína [139, 140]. Con este valor de emPAI se analizó la abundancia relativa de proteína en la muestra y se comparó a diferentes tiempos.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

Las muestras de plasma de peces infectados y sin infectar se diluyeron 4:1 en tampón de muestra 5X (Tris/HCl 60 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, azul de bromofenol 0,1% p/v pH 6,8) en presencia de 2-β mercaptoetanol 14,4 mM (condiciones reductoras) y se desnaturalizaron por tratamiento térmico (100 °C por 5 min). Posteriormente se cargaron en geles en gradiente de acrilamida [141] del 4-20% (Invitrogen) para separar el extracto de proteínas obtenidas a partir del plasma de pez cebra. En los geles se incluyó el marcador de peso molecular (Brad range, Invitrogen) y el análisis se realizó en condiciones reductoras, empleando un tampón de electroforesis Tris glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% p/v) en el sistema Biorad Mini-PROTEAN<sup>R</sup> II. En cada pocillo se adicionó una cantidad equivalente a 50 µg de proteína total. Las condiciones de electroforesis fueron 200 V; 250 mA durante 2h. Los geles se utilizaron posteriormente para realizar el ensayo de western blot.

### **Detección de proteínas de vitelogeninas mediante Western blot.**

Tras la electroforesis (1 h 30 min a 200 V, en tampón de electroforesis Tris glicina-SDS), la proteína presente en los geles se transfirió a una membrana de nitrocelulosa durante 1 h a 100 V en tampón de transferencia (25 mM Tris base pH 8,6, 192 mM glicina y 20% Metanol) (Biorad, CA, EEUU). La transferencia de proteínas se verificó mediante tinción de la membrana con rojo Ponceau (Sigma). A continuación, y tras lavado con PBS de la membrana, se bloqueó con una solución de 8% de leche en polvo desnatada (Molico, Nestle) disuelta en PBS durante 1 hora. Seguidamente la membrana bloqueada se incubó durante toda la noche con el anticuerpo (Ac) primario (Ac policlonal de ratón anti-Vitelogenina 2 (Abcam, Cambridge; United Kingdom) o con Ac policlonal de conejo anti-Actina) (SIGMA, Missouri, EE.UU) diluidos todos 1:3000 en tampón de anticuerpo (Leche, 0.5%; 0.05% de Tween-20 diluido en PBS). Una vez concluidas las incubaciones y tras 2

lavados con tampón de lavado (PBS, 0.05 % Tween-20), las membranas se incubaron durante 45 minutos con el anticuerpo secundario policlonal de cabra GAM-PO o GAR-PO en el caso necesario (ambos anticuerpos obtenidos de SIGMA. Missouri, EEUU), diluido en tampón de anticuerpo. Seguidamente, se realizaron 4 lavados. La actividad peroxidasa se detectó utilizando un kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences, UK). Las membranas se expusieron a la luz y se revelaron utilizando el procesador X-OMAT 1000 (Kodak, EEUU). Las bandas obtenidas se fotografiaron y cuantificaron por densitometría, empleando el programa Total-LAB.

### **Determinación de proteínas activas usando la técnica de inmunofluorescencia.**

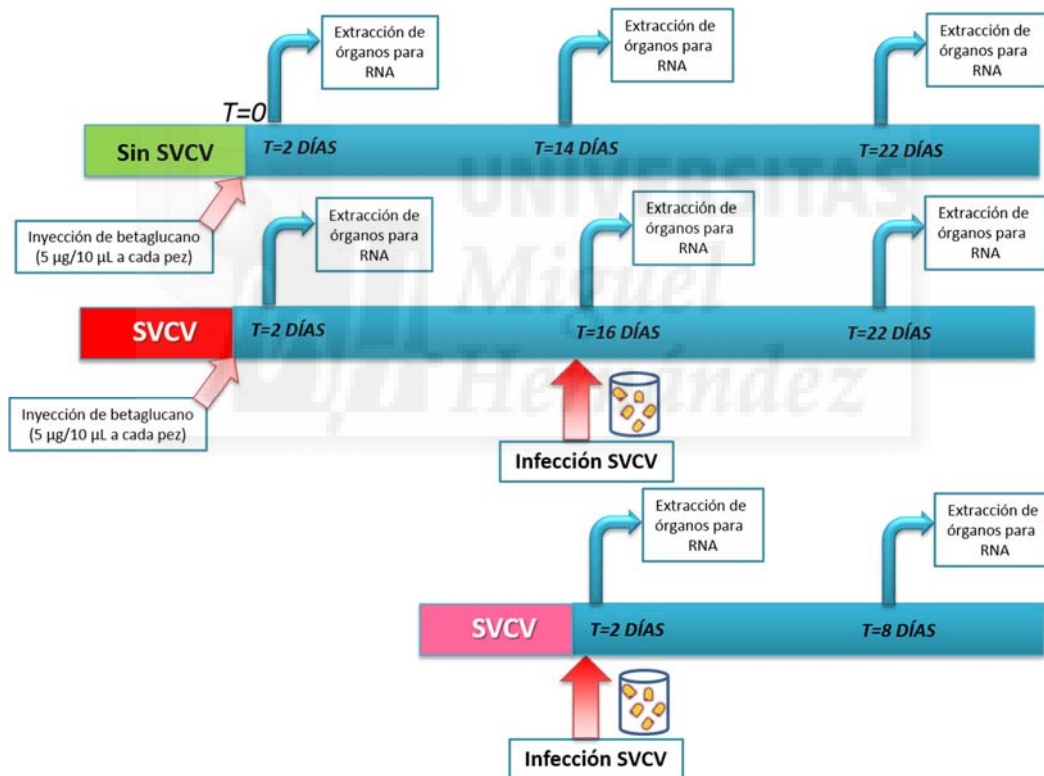
Los experimentos de determinación de proteínas activas fueron llevados a cabo sobre células ZF4 previamente tratadas con Zym-Bgc (5 $\mu$ g/mL) durante 24 horas a 28°C. Tras este periodo de incubación, las células se lavaron con medio RPMI 10% y se mantuvieron a la misma temperatura de 28°C. Tras 24 horas de incubación con betaglucono las células fueron lavadas con PBS y posteriormente fueron fijadas con una disolución de formaldehído al 4 % en PBS durante 15 min. Después del lavado, las células se fijaron otra vez con metanol frío durante 15 min a -20 °C. Seguidamente, fueron incubadas con tampón bloqueante (suero de cabra al 5 %, Tritón X-100 al 0,2 % diluido en PBS) durante 1 hora. Pasado este tiempo las células se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario (Anticuerpo primario producido en conejo contra Il-1B) diluido 100 veces en tampón de dilución: PBS conteniendo 0,3 % de Tritón X-100 y 1 % de albumina sérica bovina (SIGMA. Missouri, EEUU). Luego, las células se lavaron 3 veces con PBS y más tarde se incubaron con el anticuerpo secundario (Anticuerpo producido en conejo AF-488) (SIGMA, Misouri; USA) diluido en tampón de dilución durante 1 hora. Seguidamente las células fueron lavadas 3 veces con PBS durante 20 min. Las monocapas de células fueron observadas y fotografiadas con un equipo Incell (Analyzer 6000, Cell image system; GE Healthcare).

Para el desarrollo del ensayo de inmunofluorescencia se utilizaron los de anticuerpos que se detallan a continuación en la Tabla 4. En el caso de los

anticuerpos: Il1b estos fueron gentilmente donados por el Dr. Luis Mercado, Chile. A quien agradecemos su colaboración en la realización de parte de este trabajo.

### Administración intraperitoneal de betaglucanos a pez cebra (*in vivo*).

Para evaluar la protección frente a la infección con SVCV, o el efecto en el sistema inmune de los inmunoestimulantes, los peces cebra fueron separados en 2 grupos de 45 peces cada uno. Seguidamente fueron anestesiados por baño de inmersión con una disolución de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de MS-222 (SIGMA). Uno de los grupos fue inyectado intraperitonealmente con Zymosán (Zym-Bgc) (5 $\mu\text{g}$  disueltos en 10 $\mu\text{L}$  PBS/pez) se utilizó un grupo de control de inyección que fue inyectado solo con PBS. En la Figura 12 se observa el diseño experimental aplicado en este ensayo.



**Figura 12: Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de los inmunoestimulantes en el sistema inmune de peces cebra.** Los peces cebra fueron inyectados intraperitonealmente con inmunoestimulantes (Zym-Bgc). Pasados 14 días se procedió a realizar una infección SVCV para verificar los niveles de algunos genes vinculados al sistema inmune de estos animales.

Después de la inyección fueron transferidos a tanques de agua fresca hasta su total recuperación, logrando un nado normal. Pasadas las primeras 48 fueron tomadas muestras de órganos de cada grupo (3 peces) para determinación de expresión génica por qPCR. Pasados 14, 16 y 21 días se procedió a tomar muestras nuevamente para realizar los mismos análisis.

## Análisis de expresión de génica por qPCR.

### *Extracción de RNA y síntesis de cDNA.*

A muestras de tejidos de los peces utilizados en el ensayo *in vivo* se les extrajo el ARN utilizando el kit E.Z.N.A.® Tissue RNA (Omega Bio-Tek, Inc., United States) siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad de ARN extraída se cuantificó con un espectrofotómetro-modelo Nanodrop. Posteriormente, el ARN se trató con DNAasa (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) se resuspendió en agua-DEPC y se guardó a -80 °C hasta su uso.

En el caso de los cultivos celulares de células ZF4, tratados con Zym-Bgc (5µg/mL) durante 24 horas a 28°C, tras las incubaciones correspondientes se procedió a la extracción del ARN. En este caso utilizando el kit E.Z.N.A.® Total RNA (Omega Bio-Tek, Inc., United States) siguiendo las indicaciones del fabricante. Igualmente, la cantidad de ARN extraída se cuantificó con el espectrofotómetro modelo Nanodrop. Posteriormente, el ARN se trató con DNAasa (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) se resuspendió en agua-DEPC y se guardó a -80°C hasta su uso.

Para obtener el cDNA se utilizaron 2 µg de RNA total y la transcriptasa inversa del virus “*Moloney murine leukaemia virus*” MMLV-RT (Gibco BRL Invitrogen, CA, EEUU). Brevemente, 1µL de cebadores *random hexamers* (0,5 µg/mL) (Applied Biosystems, Melbourne, Australia) y 1µL de mezcla de dNTPs 10 mM se incubaron durante 5 min a 65 °C. Después, se añadieron 4 µL de tampón 5x (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) y 2µL de 0,1M ditiotreitól (DTT) y 1µL de la transcriptasa inversa MMLV y la mezcla se colocó en un termociclador con los siguientes pasos: 10 min a 25°C, segundo paso 50 min a 37 °C, tercer paso 15 min a 70 °C y finalmente infinito a 4 °C.

### *qPCR para determinar expresión de genes.*

Los ensayos de qPCR se hicieron usando el sistema ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, NJ, USA) y SYBR Green (Life Technologies, United Kingdom).



Tabla 3: Secuencia de *primers* utilizados para determinar la expresión génica de genes vinculados a procesos inmunidad innata e infección.

Gen	Secuencia	Numero de acceso en base de dato
<b><i>Ef-1α</i></b>	Fw: 5´-CCACGTCTGACTCCGGAAA-3´ Rv: 5´-CGATTCCACCGCATTTGTAGA-3´	AY422992.1
<b><i>Bdf-2</i></b>	Fw: 5´-AATGTGCATAATGCCGAAGTACA-3´ Rv: 5´-ACAACCATGGTGAGCAACAATATATT-3´	NM_001081554
<b><i>il1b</i></b>	Fw: 5´-GAACAGAATGAAGCACATCAAACC-3´ Rv: 5´-ACGGCACTGAATCCACCAC-3´	NM_212844
<b><i>nod2</i></b>	Fw: 5´-TTTAGCGGTGACGTCCAGAA-3´ Rv: 5´-GCCTCATAGCCAGTCACAA-3´	NM_001328044.1
<b><i>mavs</i></b>	Fw: 5´-CAGAACAACCTCAGGCGACAACA-3´ Rv: 5´-TCCTCCTCAGGCTGGTTATTAGTC-3´	NM_001080584.2
<b><i>mx ab</i></b>	Fw: 5´-GGTCTCTGGGAGTCGAAAAGG-3´ Rv: 5´-AACTCTTTCCCGAGCTTTGGT-3´	AF533769.1
<b><i>il17</i></b>	Fw: 5´-TCAATCTGAGGACGGAAAGG-3´ Rv: 5´-GCTCCATCTCCTGTTTCAGC-3´	XM_009292863.2
<b><i>N-svcv</i></b>	Fw: 5´-AGCTTGCATTTGAGATCGACATT-3´ Rv: 5´-GCATTATGCCGCTCCAAGAG-3´	U18101
<b><i>il10</i></b>	Fw: 5´-ATTTGTGGAGGGCTTTCCTT-3´ Rv: 5´-AGAGCTGTTGGCAGAATGGT-3´	NM_001020785
<b><i>inf-phi1</i></b>	Fw: 5´-AGTTGTGAAAAGCCACCTTCAGA-3´ Rv: 5´-CATGTGTGACACTCAAGGATTGAC-3´	NM_207640
<b><i>vtg1</i></b>	Fw: 5´-CTTCCTGTCTGCTGTTCCCAT-3´ Rv: 5´-TTGCAGTACAGCAGTGGTCT-3´	NM_001044897.3
<b><i>Vtg2</i></b>	Fw: 5´-GTGCAACTCATTGCTTCTTCCA-3´ Rv: 5´-GCTTTTTGGCGTAGGTGGTG-3´	AY729644.1
<b><i>tnf-a</i></b>	Fw: 5´-AAGCCACTTTTCAGTGCAATCC-3´ Rv: 5´-AGCGCCGAGGTAAATAGTGTG-3´	BC167066.1
<b><i>gig2l</i></b>	Fw: 5´-GGGGTTTTTGCCAGTCTAAGGA-3´ Rv: 5´-GCCAGGTTTTCTGCAGTGGA-3´	NM_001245989.1
<b><i>tlr3</i></b>	Fw: 5´-TGACTGCACCTGTGAGAGCAT-3´ Rv: 5´-GGACAAAGGATCAAAGTTCATTACAGA-3´	NM_001013269
<b><i>hepc</i></b>	Fw: 5´-CAGCAGGTACAGGATGAGCA-3´ Rv: 5´-AGCCTTTATTGCGACAGCAT-3´	NM_205583.2
<b><i>rsad2</i></b>	Fw: 5´-GATGGCTCTCCATGCAGGTT-3´ Rv: 5´-CTGCCGGGTGAAATGGTAGT-3´	NM_001025556.1

Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen de 20 µL, conteniendo 2 µL de ADNc, 900 nM de cada primer (tabla 3.5) y 10 µL de master mix SYBR Green (Applied Biosystems, Melbourne, Australia). Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de 50 °C, 2 min y 95 °C, 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C, 15 min, y 60 °C, 1 min. La expresión de los genes (tabla 3.5) se analizó por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  donde  $\Delta Ct$  es

determinado restándole el valor del Ct del gen EF1 $\alpha$ , usado como control endógeno, al valor del Ct objetivo. En la tabla 3, se incluyen las secuencias de *primer* utilizados para el desarrollo de qPCR.

### **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, EUA). Para comparar los datos de los distintos tratamientos con el control de células no tratadas se utilizó un test *t* de Student. Los gráficos representaron las medias de viabilidad celular de cada tratamiento con su desviación estándar. Los valores de  $p < 0,05$  o menos fueron considerados significativos y fueron representados con asteriscos (\*).





**Capítulo I. EVALUACIÓN DE LA  
REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA EN PECES  
CEBRA INFECTADOS CON SVCV.**

*Hernández*



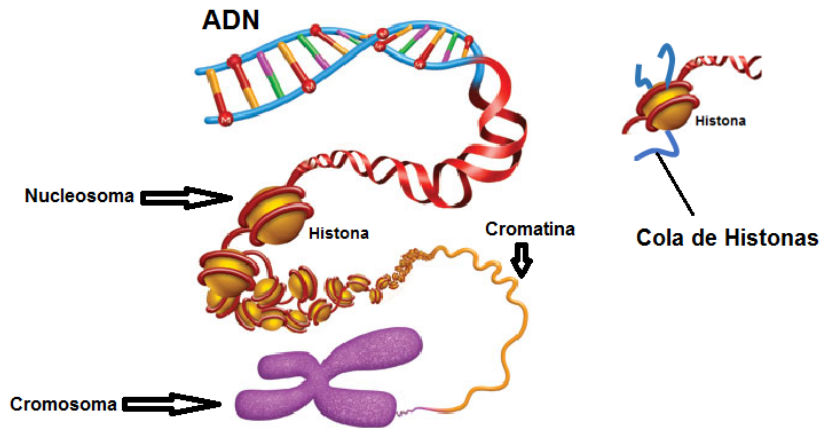
## INTRODUCCIÓN

### Epigenética.

La epigenética (del griego *epi*: “sobre” y *genetikos*: “genitivo, génesis, origen”) es la disciplina que estudia los rasgos hereditarios como consecuencia de cambios en la estructura de los cromosomas sin afectar la secuencia de ADN [1]. De esta forma, se entiende por epigenética el mecanismo mediante el cual los factores ambientales son capaces de modificar el fenotipo sin alterar el genotipo [2]. Entre estos factores se encuentran la influencia de la dieta [3], el comportamiento [5], el estilo de vida [6] y el envejecimiento [7].

El ADN no se encuentra en forma lineal dentro del núcleo celular sino extraordinariamente empaquetado. La información genética en las células eucariotas está codificada en los cromosomas y en el ADN mitocondrial. El ADN cromosómico (o cromatina) puede llegar a compactarse hasta 50,000 veces desde su tamaño original (Figura 1.1). Esta organización posibilita que dos metros de ADN se localicen en cada núcleo celular pero también deja inaccesibles la mayoría de las secuencias de nucleótidos para que se pueda producir la interacción necesaria con la maquinaria de la transcripción celular y, en consecuencia, la expresión funcional de los genes. En los cromosomas existen complejos de desoxirribonucleoproteínas llamados nucleosomas. Su organización es compleja y muestra un conjunto especializado de proteínas, las histonas, alrededor de las cuales se enrolla el ADN.

El nucleosoma se compone de un octámero de histonas fuertemente compactadas, H3, H4, H2A y H2B, alrededor de las cuales se distribuyen aproximadamente 165 pares de bases de ADN, como las cuentas de un rosario [109]. Esta estructura mantiene la estabilidad y lo que es más importante, la inaccesibilidad de los factores de transcripción al genoma del ADN, lo cual regula la transcripción de cada gen [142]. Por lo tanto, esta organización estructural debe, necesariamente, ser dinámica y atravesar por estadios de mayor o menor compactación que permitan la transcripción génica [143].



**Figura 1.1: Organización estructural de un cromosoma metafásico.** Cada octamero de histona unido a ADN es un nucleosoma. Las histonas pueden sufrir modificaciones, incluyendo fosforilación, metilación y acetilación. Se representa además las colas de histonas sobre las cuales ocurren las modificaciones.

La epigenética estudia la metilación del ADN y otros cambios químicos o modificaciones que puedan ocurrir en las histonas. A través de estos mecanismos es posible modular la unión de factores de transcripción, la expresión de genes, la utilización de sitios de inicio de transcripción alternativos y los llamados sitios de *splicing* alternativo [144, 145]. También es capaz de regular el desarrollo [146], la estabilidad del genoma, la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X y la identidad celular [147]. De ahí que podamos entender todas estas modificaciones como mecanismos reguladores de la expresión génica, capaces de modular la mayoría de los aspectos relacionados con el genoma y el transcriptoma. Es por ello, que se ha comprobado que bajo un mismo genoma se puedan expresar una inmensa variedad de fenotipos.

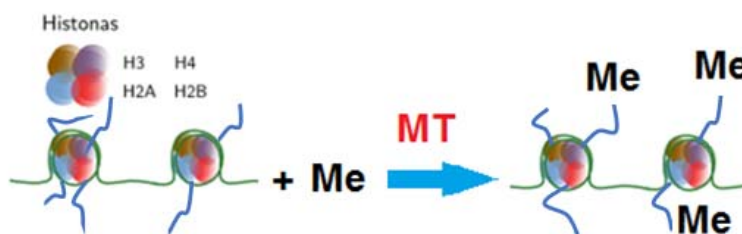
Así, un mecanismo epigenético puede ser entendido como un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales. Las modificaciones epigenéticas pueden implicar la metilación de residuos de citosina en el ADN y/o cambios en la estructura de la cromatina, que son capaces de regular la expresión génica. Estas modificaciones son fundamentalmente por acetilación y metilación, tanto de bases nitrogenadas como de aminoácidos de las histonas. La consecuencia de la acetilación y de la metilación de determinadas histonas

es un cambio en la capacidad con la que el ADN se enrolla, lo que a su vez hace que algunas regiones del ADN se puedan leer con más facilidad, mientras que otras resultan poco accesibles a los activadores de la transcripción, quedan de esta forma "silenciadas".

La regulación epigenética se establece entre el genotipo y el fenotipo, cambiando la función del locus del gen sin cambiar la secuencia del ADN subyacente. Durante la última década, los progresos en la investigación en este campo han revelado una serie de factores epigenéticos que dan forma y regulan el estado de la cromatina, dando lugar a cambios en los patrones de expresión génica del huésped, y por tanto, a las alteraciones en los fenotipos [109].

### *Modificaciones de las histonas.*

Las llamadas colas de histonas (N-terminales), se extienden desde la unidad de proteína globular y son dianas para modificaciones post-transduccionales. Hasta el momento, se han identificado y caracterizado diversas modificaciones químicas: acetilación de lisina, metilación de lisina y arginina, fosforilación de serina y treonina y la ubiquitinación. Estas modificaciones se encuentran en las subunidades de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 [148, 149]. En 2001, Jenuwein y sus colaboradores describieron el código de histonas, con la hipótesis de que un mecanismo de codificación dentro de la estructura de la cromatina está regulado por modificaciones químicas en la cola de la histona, un concepto que ahora está bien apoyado por la literatura [107]. Las metilaciones de histonas ocurren por la acción de la enzima metiltransferasa (Figura 1.2).



**Figura 1.2: Mecanismo de metilación de colas de histonas.** Metilación del histonas hace que se mantenga reprimida o activada la actividad del gen [150].

Ahora sabemos que distintas modificaciones de las colas de histonas interactúan con diferentes conjuntos de proteínas asociadas a la cromatina (Tabla 1.1). Como resultado de estas modificaciones, se pueden generar diversas combinaciones en cualquier

nucleosoma. La regulación existente a nivel de nucleosomas y el efecto que tiene sobre la estructura de la cromatina, está considerado como un factor determinante en la transcripción, la replicación y el estado de diferenciación celular.

**Tabla 1.1:** Algunas modificaciones de las histonas y su papel en la transcripción [109].

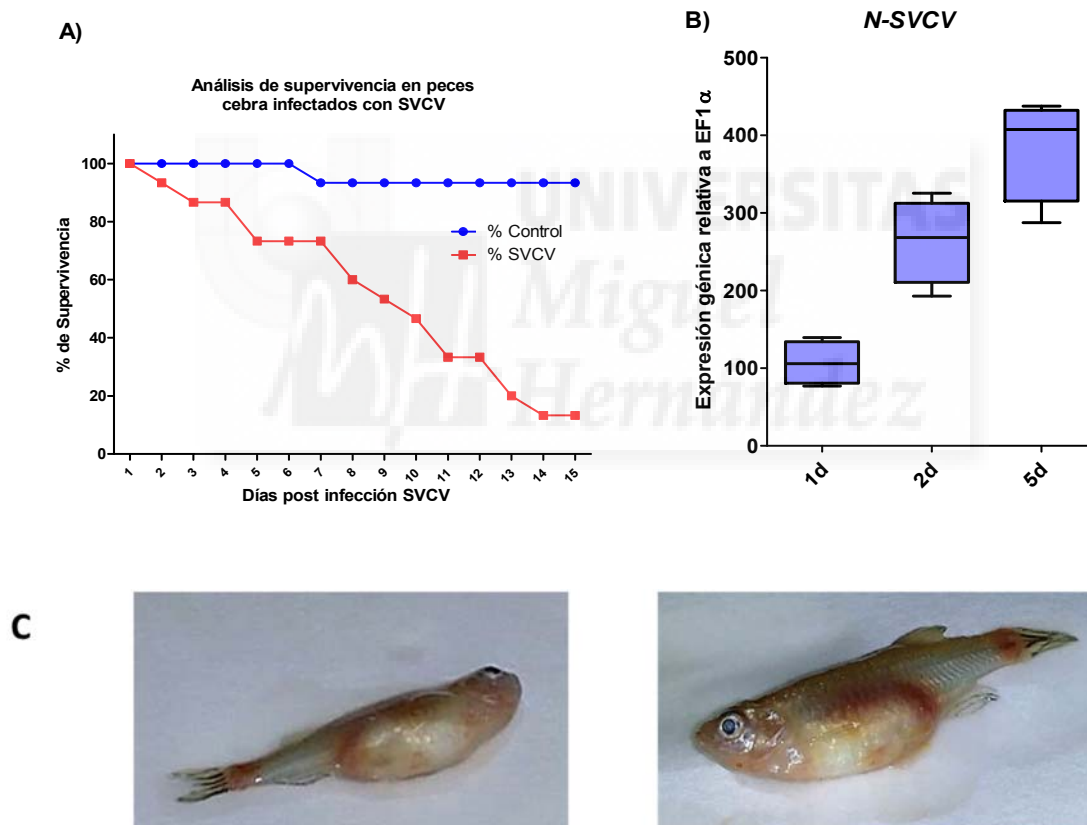
<b>Modificación</b>	<b>Rol en la transcripción</b>	<b>Sitio de modificación</b>
<b>Acetilación</b>	Activación	H3ac, H3K9ac, H3K14ac, H3K27ac
<b>Metilación</b>	Activación	H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K36me3, H3K79me2
<b>Metilación</b>	Represión	H3K9me3, H3K27me3
<b>Fosforilación</b>	Activación	H3S10

En los últimos 20 años, el desarrollo de muchos métodos bioquímicos, y en particular de alto rendimiento, ha revolucionado nuestra comprensión de la biología y la función de la cromatina. La utilización de estas herramientas resulta actualmente muy útil en una amplia variedad de disciplinas biológicas, incluyendo biología del desarrollo, oncología o enfermedades infecciosas, como las causadas por bacterias y virus. De ahí, que hayamos querido realizar este estudio con el objetivo de revisar la influencia del estado de metilación de la cromatina sobre la transcripción de genes vinculados al sistema inmune innato.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Estudio de la infección del pez cebra con SVCV.

Aunque el hospedador natural de SVCV es la carpa, el pez cebra (que también es un ciprínido) se ha utilizado como modelo experimental para el desarrollo de infecciones [18, 25, 151]. En trabajos realizados anteriormente en nuestro grupo se puso a punto el desarrollo de experimentos con infecciones de SVCV en peces cebra [28, 29, 152]. En el presente trabajo se realizó un experimento de infección por baño de inmersión, en el cual se utilizó una dosis de SVCV ( $1,8 \times 10^4$  PFU/mL) a la que los peces fueron expuestos durante 90 minutos.



**Figura 1.3: Análisis de supervivencia en peces infectados con SVCV.** A) curva de supervivencia de peces control e infectados con SVCV, B) Determinación de la carga viral por qPCR del gen N de SVCV, utilizando como gen endógeno *EF-1 $\alpha$* . C) imágenes de peces muertos por SVCV a 9 días post infección, mostrando los síntomas característicos.

En la Figura 1.3 A se muestra una curva de supervivencia de uno de los experimentos realizados, y la infección viral desarrollada en los peces tras la exposición a SVCV. En el grupo control uno de los peces falleció a día 7, pero no se observaron indicios de infección viral en el mismo. En el grupo infectado con SVCV, no hubo síntomas de

infección ni mortalidad hasta 2 días post-infección. Sin embargo, a partir de 3 días, la mayoría los peces cebra mostraron un patrón de hemorragias externas en la boca, branquias, piel lateral o bases de la aleta. Tres días después de la infección se inicia también la mortalidad en los peces infectados. A partir del día 7 post infección hay un incremento de la mortalidad, que en el día 13 ya alcanzaba valores cercanos al 80%. Al revisar el comportamiento de la carga viral de este experimento, se observó un incremento de la misma, a medida que aumentan los días post infección (Figura 1.3B), algo que ha sido descrito de forma coincidente en otros trabajos realizados con SVCV [29]. De igual forma, se puso de manifiesto la aparición de síntomas característicos a la infección viral como hemorragias en la piel, branquias, aletas, aparición de exoftalmia y nado aletargado, hasta que mueren (Figura 1.3C).

### **Estudio de la reprogramación epigenética en peces cebra infectados con SVCV.**

El estudio se realizó a partir del pool de órganos internos de peces cebra infectados con SVCV. Con él se llevó a cabo un protocolo de inmunoprecipitación de la cromatina con el ADN unido para posterior secuenciación. Para la precipitación de la cromatina, empleamos un anticuerpo anti histona 3 Lys4-trimetilado (H3K4Me3). La metilación del cuarto aminoácido (Lys) del extremo N-terminal de la histona H3, es una de las modificaciones más estudiadas y especialmente de su forma trimetilada. El alto interés en el estudio de este residuo se debe a que está estrechamente asociado con los promotores de los genes activos. Varios autores han utilizado la metilación del cuarto residuo de lisina en sus trabajos, y han referenciado la activación de grupos de genes de interés, en los que esta metilación promueve una activación persistente [153-156].

Seguidamente, pretendemos observar el repertorio de genes activado tras una infección con SVCV y verificar entre los mismos, los vinculados al sistema inmune. En la Figura 1.4 se observa un esquema de trabajo a partir del cual se obtuvo el ADN inmunoprecipitado destinado a secuenciar.



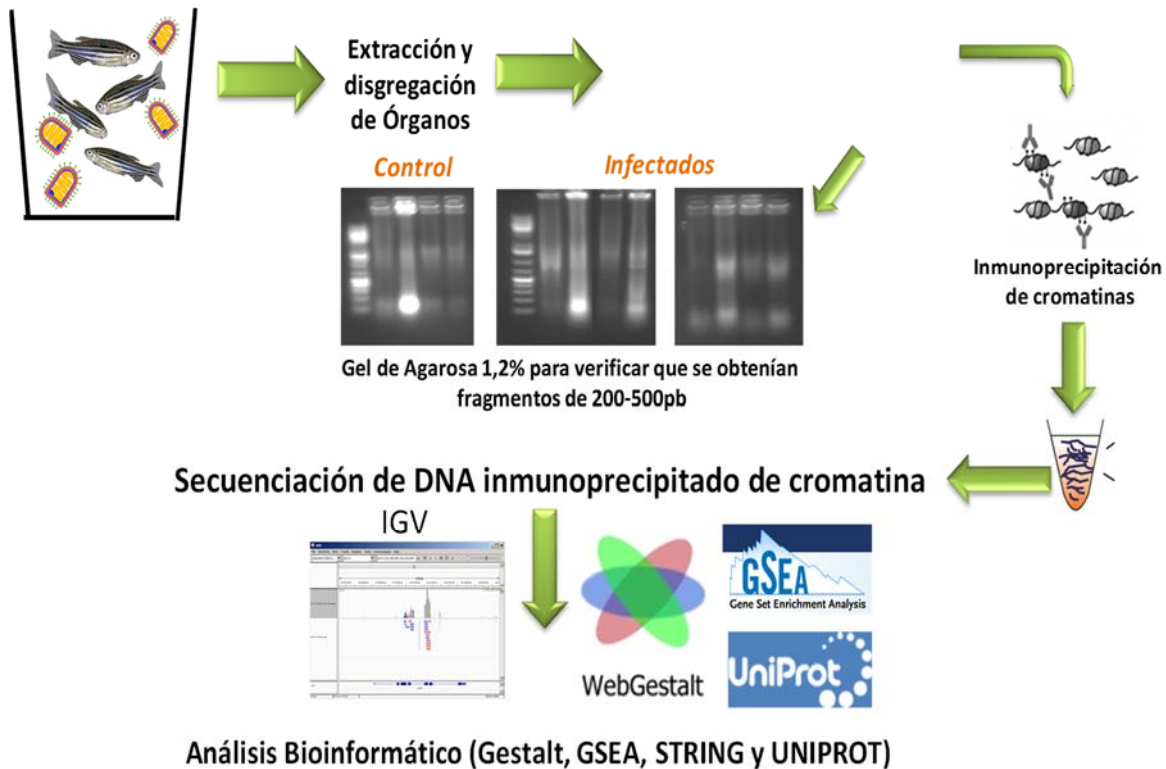


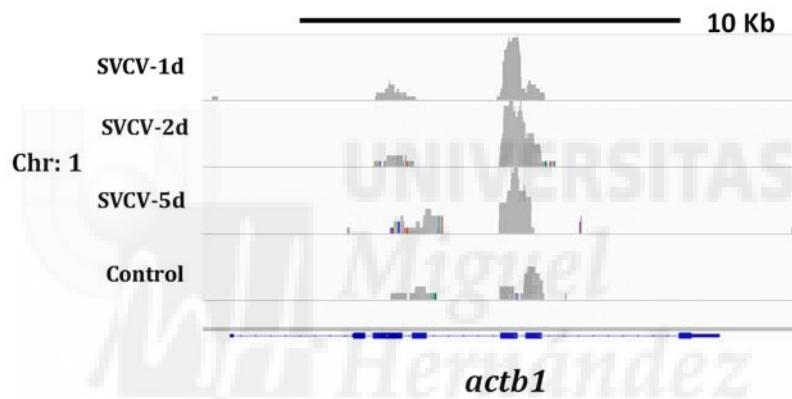
Figura 1.4: Esquema general de procesos de secuenciación de la cromatina inmunoprecipitada (ChIPSeq), desde la obtención de las muestras al procesamiento bioinformático.

Por ello realizamos un primer análisis de visualización de las zonas enriquecidas de lecturas y revisamos el comportamiento de genes asociados al sistema inmune innato. Este trabajo se realizó con los datos obtenidos a partir de la secuenciación de fragmentos de cromatina y la visualización empleando el programa IGV (*Integrative Genomic Viewer*) [127] y los datos generados a partir del programa MACS [123].

De cada uno de los grupos experimentales (control, SVCV-1d, SVCV-2d y SVCV-5d) se utilizaron dos muestras, de 3 peces cada una. En cada una de ellas se mezclaron los órganos internos de los tres peces. Los datos crudos de secuenciación fueron procesados y se eliminaron todas las lecturas no asignadas a genes concretos. Finalmente obtuvimos un listado de nombres de genes, que además incluía la identificación, según la base de datos de UNIPROT, de la proteína a la que se traducirían; los valores de lecturas, o sea, la frecuencia con la que aparecen diversos fragmentos de un mismo gen y, finalmente, las veces de su incremento respecto al control (*Fold enrichment*).

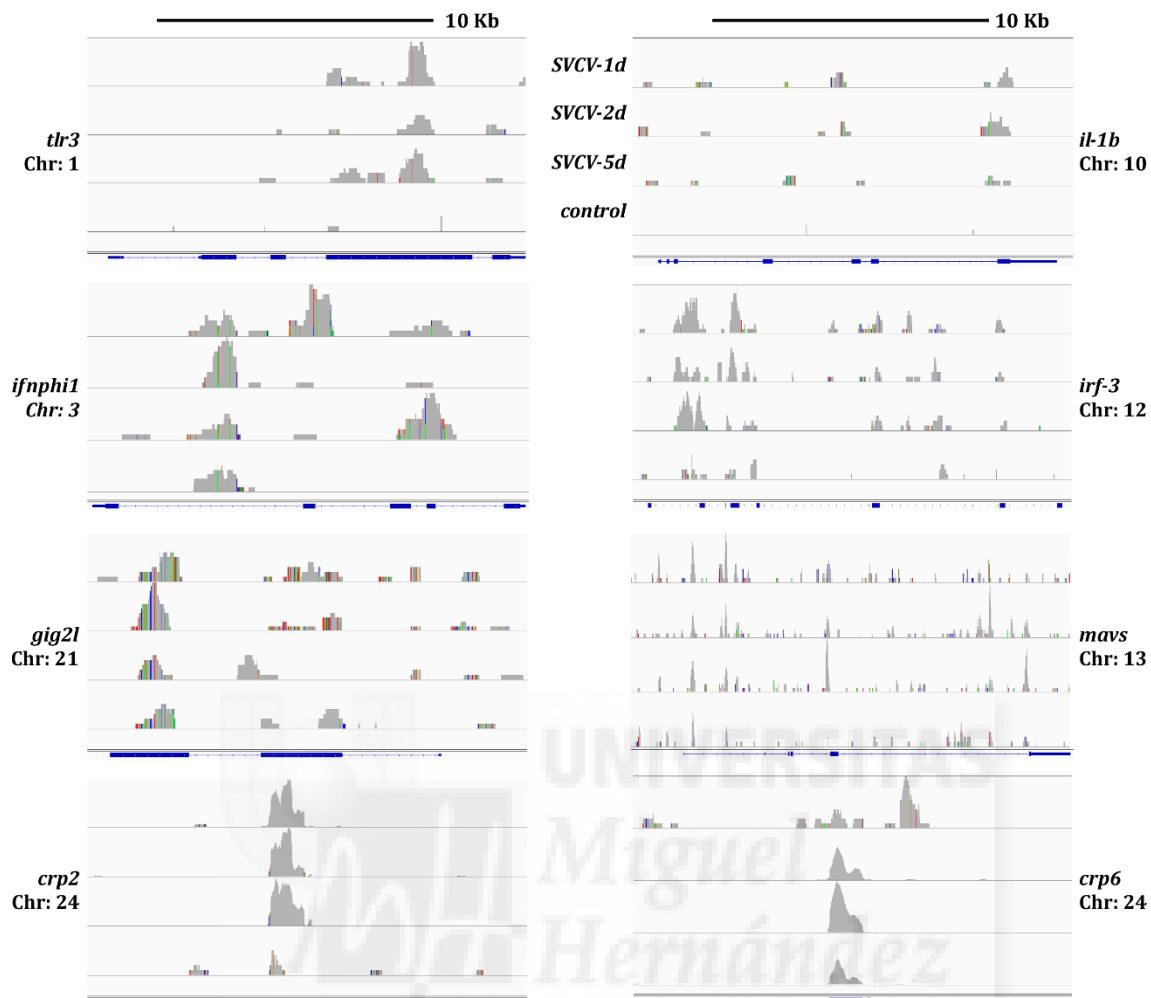
### Visualización de las zonas enriquecidas de genes de interés en el sistema inmune innato.

La cuantificación de la repetición de las secuencias ADN de genes unidos a histona H3 trimetilada nos permite observar un aumento de genes activos, potencialmente dispuestos para ser transcritos, respecto al control. Como gen de referencia interna usamos el de la actina (*actb1*), del que su número de lecturas era similar en cada uno de los tiempos evaluados (1, 2 y 5 días tras la infección) como se ve en la Figura 1.5. Lo que se observa es que este gen está constantemente activo, con independencia de las consecuencias que implique la infección viral. Como se observa en esta figura, para las regiones analizadas no hay cambios significativos en la frecuencia de las secuencias de los genes activos.



**Figura 1.5: Visualización de las zonas enriquecidas del gen de la actina.** Esta se lleva a cabo empleando el programa IGV [127] y los datos de lectura generados a partir del programa MACS [123]. La altura de los picos indica la frecuencia de las lecturas obtenidas para esa secuencia.

Seguidamente revisamos el comportamiento de una serie de genes representativos del sistema inmune innato (que además son componentes de una respuesta antiviral) y sobre los cuales queríamos examinar la abundancia de zonas enriquecidas de lectura. Como se puede observar en la Figura 1.6 todos los genes analizados en relación con sistema inmune innato: *gig2*, *tlr3*, *il1b*, *ifnphi1*, *irf3*, *mavs*, *crp2* y *crp6* se mostraban activos durante todos los tiempos evaluados tras la infección con respecto a la situación de control no infectado.



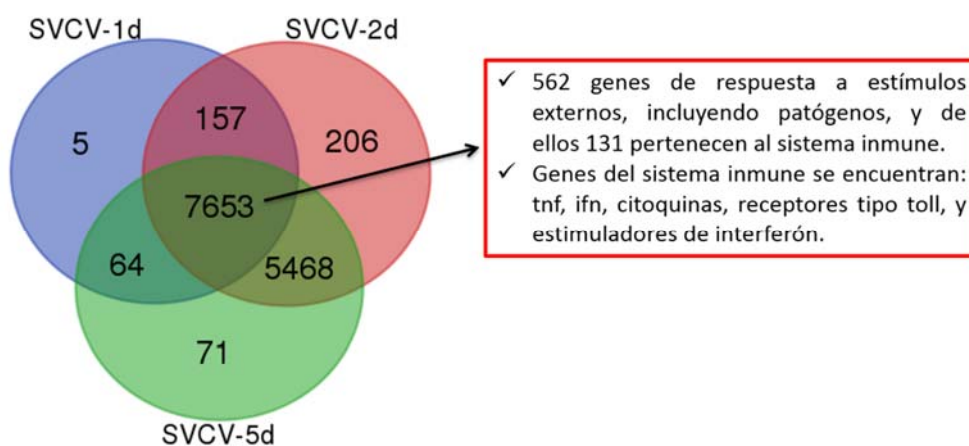
**Figura 1.6: Visualización de las zonas enriquecidas de varios genes de interés asociados al sistema inmune innato.** La visualización se desarrolló empleando el programa IGV [127] y los datos generados a partir del programa MACS [123].

La regulación de los programas de transcripción de genes requiere la interacción entre los promotores y los reguladores. Las regiones promotoras están situadas próximas a los sitios de inicio de la transcripción génica [157]. De ahí que, si son genes activos la zona de la región promotora estará activa y promoverá la transcripción del gen en cuestión. A su vez, esta trimetilación se ha visto implicada en la diferenciación de monocitos en macrófagos, estos últimos vinculados al desarrollo de una respuesta inmune innata [158, 159]. Estos cambios epigenéticos conducen a estímulos específicos que pueden activar regiones potenciadoras y conducir a la activación y diferenciación de los macrófagos. Entre estos estímulos se destacan: una señal inflamatoria a través de la vía del *tlr4*, la activación del factor *nf-kβ*, activación de los factores reguladores del interferón, entre otros [160].

### Análisis global de los genes activados en muestras de pez cebra infectados con SVCV.

Una vez finalizado el análisis de las zonas enriquecidas de algunos genes activos, decidimos revisar el estado global de los genes expresados. A partir de los listados con datos de incremento relativo obtenidos de cada gen, se construyó un diagrama de Venn (Figura 1.7) utilizando aquellos genes que tuvieron más de 1,5 veces de incremento con respecto al grupo control no infectado y, de esta forma, pudimos revisar los genes activos que estaban interrelacionados en los grupos infectados. Se encontraron un total de 7879 genes en el grupo SVCV-1d, 13484 genes en el grupo SVCV-2d y 13256 genes en el grupo SVCV-5d. Pudimos observar que existían 7653 genes comunes en los tres grupos evaluados (Figura 1.7).

Al revisar la distribución en categorías de todos estos genes utilizando la aplicación de *Gene Ontology*, que emplea el programa *Web-Gestalt*, comprobamos que 562 genes estaban agrupados en respuesta a estímulos de patógenos y específicamente 131 de ellos estaban vinculados a la respuesta del sistema inmune (Tabla 1.2). Entre estos genes destacaban el *inf-1* y 2, el *tnf- $\alpha$*  y su receptor *traf3*, algunas quimiocinas, los genes inducidos por el reovirus de la carpa (*gig2*), los *ifit 14* y *17*, *il-15*, el gen *tmem173*, el factor *nf-kb*. Todos ellos están vinculados a la respuesta mediada por el interferón. Nuestra interpretación es que el organismo infectado moviliza todo este conjunto de genes para orquestrar una respuesta antiviral que pueda promover el aumento de su transcripción.



**Figura 1.7: Diagrama de Venn de comparación de genes activos en los grupos evaluados.** Se representan aquellos genes con un incremento relativo mayor o igual a 1,5 respecto al control no infectado.

**Tabla 1.2: Listado de los genes, con mayor incremento tras la infección vírica, relacionados con la respuesta inmune, que se encuentran entre los 131 genes comunes en los 3 grupos evaluados.**

UNIPROT	Nombre de la proteína	Gen
Q4G3H4	Inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa subunidad alfa	<i>chuk ikk1</i>
Q501X6	Proteína de unión a la quinasa 1 asociada al receptor de interleucina-1	<i>irak1bp1</i>
Q1ECV8	Factor de necrosis tumoral, proteína 8 inducida por alfa (TNFAIP8)	<i>tnfaip8l2a C24</i>
Q7ZV43	Proteína de interacción Toll	<i>tollip</i>
Q7T364	Factor de necrosis tumoral, proteína 8 inducida por alfa (TNFAIP8)	<i>tnfaip8l tnfaip8l2</i>
A5PLE7	Receptor acoplado a proteína G 183-A	<i>gpr183a gpr183</i>
Q6AXL3	Regulador negativo de las especies reactivas del oxígeno	<i>nrros lrrc33</i>
Q66179	Sialoprotein K (SelK)	<i>selenic selk1</i>
Q803X0	Incorporador de Serine 5	<i>serinc5</i>
Q9W7C0	Factor de unión del potenciador de linfocitos 1	<i>lef1</i>
Q9PUT2	Molécula CD74, complejo mayor de histocompatibilidad, class II	<i>cd74a lclp-1 iclp1</i>
B8X730	Molécula CD40, miembro 5 de la superfamilia del receptor TNF	<i>cd40</i>
Q6NTI2	Zgc:77033	<i>pik3cg</i>
Q66104	Tyrosine-protein kinase (EC 2.7.10.2)	<i>Lyn</i>
Q9DFG4	Quimioquinas tipo CXC (Chemokine (C-X-C motif) ligand 14)	<i>cxcl14 scuba</i>
Q75S22	Interferon gamma	<i>ifng1-2 INF-g</i>
E7F7D7	Proteína tipo Gig2 Drel (gen 2i inducido por reovirus de la carpa (GCRV))	<i>gig2i irig</i>
Q5W7F5	Interleukina 115l (Interleukin 15,-like) (Interleukin-15_1)	<i>il15l IL-15_1</i>
Q0II00	Factor nuclear del potenciador del gen polipéptido ligero kappa en las células B 2	<i>nfbk2</i>
Q6P980	Superoxido-dismutasa (EC 1.15.1.1)	<i>sod2</i>
Q5TLE6	Interferon gamma_1 (Interferon, gamma 1-1)	<i>ifng1-1 IFNG_1</i>
Q5TYU7	Proteína tirosina quinasa (EC 2.7.10.2)	<i>blk bltk</i>
Q6DEG0	Factor 3 asociado al receptor de TNF.	<i>traf3</i>
F1Q885	Factor de transcripción asociado a la microftalmia b.	<i>mitfb</i>
Q5NE14	Protein kinase containing Z-DNA binding domains	<i>pkz</i>
Q8AWF1	Tyrosine-protein kinase (EC 2.7.10.2)	<i>yrk</i>
Q6V9B5	quimioquinas (C-X-C motif) ligand 12b	<i>cxcl12b sdf1b</i>
O93581	IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros) (Ikaros)	<i>ikzf1 znfn1a1</i>
F1QBE9	quimioquinas (C-C motif) ligand 25b	<i>ccl25b</i>
Q5PU93	Isoforma C del factor 7 de células T	<i>tcf7</i>
Q3SCC6	Interleuquina 15	<i>il15</i>
B3DIW3	Receptor tipo Toll	<i>tlr1</i>
E9QCV8	Serine/threonine/tyrosine quinasa 1	<i>styk1</i>
A0A068	Proteína inducida por interferón con repeticiones tetratricopeptídicas	<i>ifit14 ifit17a</i>
Q2N1D9	receptor Prostaglandina E2 subtipo EP4	<i>ptger4a</i>
B5KH10	proteína CD4-2	<i>CD4-2</i>
B5L332	CSF3	<i>csf3b csf3</i>
Q9PTF8	C-C motivo quimioquina	<i>ccl27a CCL1 ccl1</i>
Q7SZX8	Factor de transcripción de pez cebrá vinculante a IGHM potenciador 3a (Tfe3a)	<i>tfe3b</i>
A1L1N2	TNFAIP3 que interactúa con la proteína 1	<i>tnip1</i>
K4Q6R6	proteína transmembrana 173	<i>tmem173</i>
A9Y5K7	miembro de superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral 18	<i>tnfsf18</i>

Nos parece interesante resaltar que entre los genes comunes a los tres grupos estudiados se incluyen los de varias proteínas quinasas, hepcidina, algunas caspasas,

receptores tipo *Toll*, e igualmente genes vinculados con la cascada del *tnf- $\alpha$* . Las funciones de este tipo de moléculas en el organismo y su aumento de activación tras la infección entendemos que suponen los preparativos para la respuesta que seguidamente el pez generará ante la infección viral. Además, algunas de estas moléculas se han relacionado con un aumento de la capacidad fagocítica a nivel celular tras la llegada de un patógeno.

### ***Agrupación funcional de los genes activados en peces cebra infectados con SVCV.***

A continuación, procedimos a analizar de forma cualitativa los grupos de genes que se veían afectados como consecuencia de la infección en los tres grupos analizados (SVCV-1d, SVCV-2d y SVCV-5d) respecto al control. Empleamos la aplicación web GESTALT (*Web based Gene Set Analysis Toolkit*) que permite este análisis para el pez cebra. El programa en su base de datos incluye información de diferentes organismos localizada en NCBI, la enciclopedia de genomas de Kyoto (KEGG), Gene Ontology, REACTOME y Wikipathway [161]. GESTALT nos mostró como resultados una distribución de los genes identificados en tres categorías: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares. Nos interesamos por las categorías de procesos biológicos (dentro de ellos estarían agrupados los genes vinculados a respuesta inmune) y componentes celulares (podrían relacionarse con factores implicados en la entrada de virus y su replicación) (Figura 1.8).

Analizando la categoría de los genes agrupados en componentes celulares, los relacionados con encapsulación de partículas externas se incrementan en los grupos SVCV-2d y SVCV-5d. Además, se incrementan los genes relacionados con el sistema de endomembranas a partir del segundo día tras la infección. El sistema de endomembranas está implicado en el tránsito intravesicular entre retículo endoplásmico, endosomas y aparato de Golgi; y al verse afectado por la presencia de los componentes virales podría promover un aumento de la autofagia por parte de la célula que trata de eliminar orgánulos defectuosos. Estos fenómenos de autofagia o generación de vesículas han sido planteado por otros autores en trabajos relacionados con SVCV [162-164].



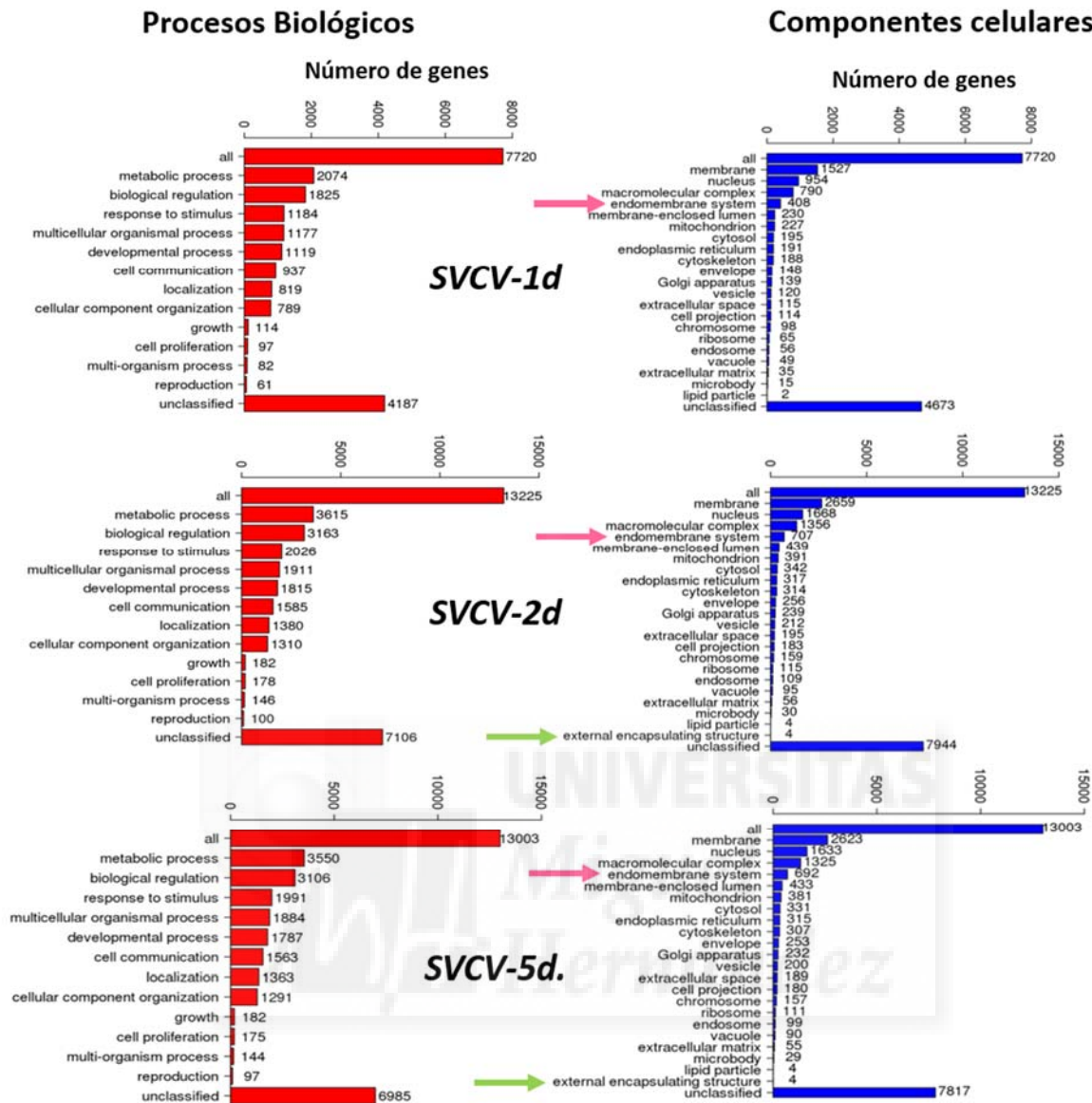


Figura 1.8: Distribución en grupos funcionales de los genes pertenecientes a las categorías “procesos biológicos” (rojo) y “componentes celulares” (azul) generada a partir del análisis realizado con GESTALT de las muestras SVCV-1d, SVCV-2d y SVCV-5d.

El análisis de la distribución de los genes de la categoría de procesos biológicos mostraba varios genes involucrados en la respuesta a estímulos externos, de los cuales focalizamos nuestra atención en los vinculados con la respuesta inmune (Figura 1.8).

### Análisis de las rutas enriquecidas de genes activos en los peces infectados con SVCV a diferentes tiempos post infección.

Para realizar el análisis por separado de los conjuntos de genes más activados en cada grupo utilizamos los datos obtenidos de la secuenciación de librerías obtenidas de la precipitación de cromatina de las muestras de peces cebra a 1, 2 y 5 días post infección

con SVCV. Se analizaron los genes que habían presentado más de 1,5 veces de incremento con respecto al grupo control no infectado. Los datos incluidos en GESTALT nos darían grupos de genes relacionados funcionalmente que se verían activados como consecuencia de la infección viral. En este caso, sólo se incluyeron 3 bases de datos de rutas de señalización e interacción: KEGG, REACTOME, Wikipathways; dado que son las más ampliamente utilizadas en el análisis de datos de interacción molecular.

### Análisis de rutas enriquecidas de genes activos en el grupo SVCV-1d.

Al revisar las rutas de interacciones moleculares para definir los conjuntos de genes mayormente enriquecidos en el grupo SVCV-1d (Tabla 1.3), comprobamos que en el caso de la base de datos KEGG incluían los conjuntos de genes de regulación de la actina y el citoesqueleto, la ruta de adhesión focal, y la ruta del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

**Tabla 1.3: Listado de conjuntos de genes enriquecidos en el grupo SVCV-1d.** Se ha usado como herramienta la aplicación web GESTALT. Se incluye además el número de entrada y el nombre de la vía de señalización, la cantidad de genes identificados del grupo en esa ruta y también el valor obtenido de FDR (tasa de falso positivos).

<b>KEGG</b>			
<b>ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>#Genes</b>	<b>FDR</b>
dre04810	Regulación de la actina en el citoesqueleto - <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	73	6.96e-01
dre04510	Adhesión focal - <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	71	8.11e-01
dre04012	Señalización de ErbB - <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	32	7.58e-01
dre04370	Señalización VEGF - <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	25	8.11e-01
<b>REACTOME</b>			
<b>ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>#Genes</b>	<b>FDR</b>
R-DRE-162582	Transducción de señales	64	7.97e-01
R-DRE-1280215	Señalización de citoquinas en el sistema inmune	17	7.97e-01
R-DRE-199418	Regulación negativa de de la PI3K/AKT.	5	7.97e-01
R-DRE-1251985	Señalización nuclear por ERBB4	5	7.97e-01
<b>WIKIPATHWAY</b>			
<b>ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>#Genes</b>	<b>FDR</b>
<b>WP1367</b>	Factor de crecimiento transformante beta ( <i>tgf-β</i> )	54	9.71e-01
<b>WP1359</b>	Señalización de IL-3	31	9.71e-01
<b>WP1319</b>	Señalización de IL-2	23	9.71e-01
<b>WP1329</b>	Señalización de integrina Alpha6-Beta4	19	9.71e-01

Todas ellas relacionadas con la necesidad del organismo de mantener su estabilidad ante una infección. En el caso de las rutas mayormente representativas de la base de datos de REACTOME aparecen la transducción de señales, la señalización de citoquinas en el sistema inmune, la señalización nuclear de ERbb4 y la vía de regulación negativa



de PI3K/AKT. La activación de la señalización de citoquinas tras una infección viral es algo conocido, son unas de las primeras moléculas que se liberan tras la presencia de un patógeno generando una respuesta inflamatoria [165]. Igualmente, existen otros factores que influyen en el reclutamiento de células del sistema inmune innato y que también participan en este proceso o también pueden estar vinculadas a la estimulación de la respuesta del interferón [53].

#### *Análisis de rutas enriquecidas de genes activos en el grupo SVCV-2d.*

De la misma manera quisimos revisar los conjuntos de genes que estaban más activados en el grupo SVCV-2d (Tabla 1.4). Enfrentando nuestros datos a la base de datos de KEGG, los conjuntos más activos eran los relacionados con la señalización de P53, los receptores tipo Toll y además genes relacionados con factores de transcripción. Existen estudios en los que la señalización a través de receptores tipo Toll constituyen una de las vías establecidas para el reconocimiento de patógenos y el establecimiento de la inmunidad innata [166-168]. De igual forma se ha comprobado que un aumento de los factores de transcripción contribuye a un incremento de la producción de citoquinas como efecto derivado de la activación de los receptores tipo Toll [164].

Adicionalmente, utilizando la base de datos REACTOME nos permitió identificar también varias vías de señalización, entre las que se destacan la del ciclo celular, el transporte mediado por vesículas y el tráfico de membranas. Anteriormente habíamos planteado que el transporte mediado por vesículas es una de las características establecidas en una infección por rhabdovirus, que necesita del sistema de membranas endoreticular de la célula para la síntesis y maduración de la proteína de su envoltura. Como se mostró en la Figura 1.8, a partir de los dos días de infección se observa un aumento de genes activos relacionados con el sistema de endomembranas.

**Tabla 1.4: Listado de conjuntos de genes enriquecidos en el grupo SVCV-2d.** Se ha usado como herramienta la aplicación web GESTALT. Se incluye además el número de entrada y el nombre de la vía de señalización, la cantidad de genes identificados del grupo en esa ruta y también el valor obtenido de FDR (tasa de falso positivos).

<b>KEGG</b>				
<b>ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>#Genes</b>	<b>FDR</b>	
dre04115	Señalización de p53 - <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	44	7.58e-01	
dre04620	Señalización receptores tipo Toll- <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	34	7.58e-01	
dre03022	Factores de transcripción basal - <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	26	7.58e-01	
<b>REACTOME</b>				
<b>ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>#Genes</b>	<b>FDR</b>	
R-DRE-1640170	Ciclo celular	40	9.79e-01	
R-DRE-69278	Ciclo celular , Mitosis	36	9.79e-01	
R-DRE-5653656	Transporte mediado por vesículas	34	9.79e-01	
R-DRE-199991	Tráfico de membranas	31	9.79e-01	
<b>WIKIPATHWAY</b>				
<b>ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>#Genes</b>	<b>FDR</b>	
WP1367	Factor de crecimiento transformante beta ( <i>tgf-β</i> )	88	6.29e-01	
WP341	Señalización Nodal	61	8.53e-02	
WP1359	Señalización IL-3	49	1.65e-01	
WP1319	Señalización de IL-2	36	7.35e-01	
WP445	Señalización de Ciclo celular, fase G1 a S cell	35	7.35e-01	

Por último, el análisis sobre la base de datos de *Wikipathway*, reveló que los conjuntos de genes más representados fueron los de las vías de señalización del factor de transformación del crecimiento *tgf-β*, las vías de señalización de *il-2* e *il-3*, así como una de las vías de señalización del ciclo celular (G1/S). Los factores de crecimiento transformantes tipo beta (*tgf-β*) son una familia de citoquinas con efectos pleiotrópicos sobre el sistema inmunológico y dependiendo de los tipos de células implicados y de las condiciones circundantes, pueden tener efectos positivos o negativos sobre la proliferación de linfocitos, respuesta de algunas citoquinas o inclusive influir en su expresión. De igual forma, hay trabajos que relacionan un vínculo de *tgf-β* con el aumento de la activación de *il-2* [169].

#### [Análisis de rutas enriquecidas de genes activos en el grupo SVCV -5d.](#)

Al analizar los conjuntos de genes activados para el grupo SVCV-5d (Tabla 1.5), frente a la base de datos KEGG, se identificaron los conjuntos de genes que estaban más representados y entre ellos se encontraban los de la vía de los receptores tipo Toll y la interacción citoquina-receptor. Ambas vías de señalización están interrelacionadas como ya hemos mencionado con anterioridad. Además, es lógico pensar que tras la activación de un proceso infeccioso con SVCV se desencadenen procesos de

reconocimiento de patrones asociados a patógenos y los mecanismos de acción del sistema inmune innato (interleuquinas y citoquinas) para tratar de contrarrestar la infección viral.

**Tabla 1.5: Listado de conjuntos de genes enriquecidos en el grupo SVCV-5d.** Se ha usado como herramienta la aplicación web GESTALT. Se incluye además el número de entrada y el nombre de la vía de señalización, la cantidad de genes identificados del grupo en esa ruta y también el valor obtenido de FDR (tasa de falso positivos).

<b>KEGG</b>				
<b>ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>#Genes</b>	<b>FDR</b>	
<b>dre04620</b>	Señalización receptores tipo Toll- <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	34	5.79e-01	
<b>dre04060</b>	Señalización de interacción de repetores citoquina, citoquina - <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	41	5.79e-01	
<b>REACTOME</b>				
<b>ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>#Genes</b>	<b>FDR</b>	
<b>R-DRE-1640170</b>	Ciclo celular	40	9.2e-01	
<b>R-DRE-69278</b>	Ciclo celular, mitosis	36	9.2e-01	
<b>R-DRE-1280215</b>	Señalización de citoquinas en el sistema inmune	22	9.2e-01	
<b>R-DRE-382551</b>	Trasnporte transmembrana de moléculas pequeñas	27	9.2e-01	
<b>WIKIPATHWAY</b>				
<b>ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>#Genes</b>	<b>FDR</b>	
<b>WP341</b>	Nodal Signaling Pathway	60	1.34e-01	
<b>WP1359</b>	Señalización de IL-3	47	3.82e-01	
<b>WP1319</b>	Señalización de IL-2	36	3.82e-01	
<b>WP1384</b>	Señalización de receptors tipor Toll	26	6.73e-01	

Analizando nuestros datos sobre la base REACTOME, observamos que los conjuntos de genes más representados fueron también los del ciclo celular, la señalización de citoquinas por el sistema inmune y el transporte a través de la membrana de partículas pequeñas. Es lógico que al quinto día post infección con SVCV uno de los conjuntos más activos sea el de la señalización de citoquinas en el sistema inmune. Precisamente porque estas tienen la capacidad de modular la amplitud de las respuestas inmunes y son muchas las citoquinas expresadas para generar una respuesta inflamatoria producto de la infección viral o inclusive para generar una respuesta antiviral como es el caso del interferón [46, 165]. En conclusión, los genes relacionados con receptores *tlrs* y citoquinas aparecen claramente activados como consecuencia de la infección analizando nuestros datos según tres bases de datos diferentes. El aumento de la carga viral, en relación al tiempo de infección, se correlaciona con el relanzamiento de la activación de los genes implicados en la detección de patógenos y el establecimiento de una respuesta inflamatoria.

## Análisis de los conjuntos de genes enriquecidos utilizando el programa GSEA.

Como estudio complementario al del apartado anterior, se llevó a cabo el análisis cuantitativo de los genes activados por la infección vírica empleando el programa GSEA. Empleamos los listados de genes generados a partir de los datos de secuenciación de ADN inmunoprecipitado. Las condiciones para realizar este análisis fueron iguales que para el GESTALT: se consideró los genes que mostraron un aumento superior a 1,5 veces respecto al control para cada uno de los grupos infectados (SVCV-1d, SVCV-2d y SVCV-5d). Se tuvieron en cuenta aquellos genes que incrementaron su valor en al menos uno de los tiempos de infección evaluados.

### Conjuntos de genes más activados en el grupo SVCV-1d.

El análisis de los conjuntos de genes activados se describe en la tabla 1.6. Se observó que 80 de los 84 conjuntos de genes analizados estaban activados en este tiempo (Tabla 1.6). Únicamente consideramos aquellos grupos de genes que mostraban un valor de  $p \leq 0,05$  y entre ellos se encontraban los relacionados con el citocromo P450, el proteosoma, los factores de transcripción, *tfg- $\beta$* , y *tnf- $\alpha$* .

Tabla 1.6: Conjuntos de genes sobreactivados en el grupo SVCV-1d. \*  $p \leq 0,05$ .

NOMBRE DEL CONJUNTO DE GENES	no de genes identificados	ES	NES	p-val
<b>CITOCROMO P450</b>	<b>44</b>	<b>0.5127</b>	<b>1,763</b>	<b>0.00521 *</b>
<b>ACTIVACIÓN DE DEGRADACIÓN EN EL PROTEOSOMA</b>	<b>30</b>	<b>0.4481</b>	<b>1,453</b>	<b>0.02808 *</b>
<b>FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, TRA</b>	<b>176</b>	<b>0.3191</b>	<b>1,226</b>	<b>0.038 *</b>
<b>SEÑALIZACIÓN DE TGF-BETA</b>	<b>14</b>	<b>0.5270</b>	<b>1,487</b>	<b>0.04179 *</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>16</b>	<b>0.4982</b>	<b>1,459</b>	<b>0.05056*</b>
SEÑALIZACIÓN DE TNF- $\alpha$ NF-KB	57	0.3651	1,283	0.081
APOPTOSIS-WIKIPATHWAY	34	0.4163	1,375	0.05811
CRP	7	0.5209	1,237	0.19520
SEÑALIZACIÓN DE NF-KB	30	0.4170	1,365	0.06432
SALIDA DE PROTEÍNAS	15	0.4611	1,344	0.09789
SEÑALIZACIÓN DE JAK-STAT	11	0.4856	1,302	0.13217
GENES ESTIMULADORES DE INTERFERON	7	0.5240	1,256	0.17265
SEÑALIZACIÓN DE CITOQUINAS	20	0.4115	1,255	0.16274
PROTEOLISIS MEDIADA POR UBIQUITINACIÓN	27	0.3738	1,201	0.20281

Tabla 1.7: Genes activados que se han identificado para los conjuntos seleccionados con valor de  $p \leq 0,05$  de la Tabla 1.6.

CYP	proteasome degradation	Transcription factors, TRA												TGF-beta	TNF
<i>cybb</i>	<i>psmc1</i>	<i>adlican</i>	<i>btaf1</i>	<i>dmf1</i>	<i>edar</i>	<i>foxq</i>	<i>coe2</i>	<i>mbtps</i>	<i>nr0b2b</i>	<i>ptprq</i>	<i>sec63</i>	<i>tcta</i>	<i>pu</i>	<i>ltbp1</i>	<i>vliinf</i>
<i>cox</i>	<i>h2afx</i>	<i>lrrc</i>	<i>bach</i>	<i>ccndx</i>	<i>eef</i>	<i>fkf</i>	<i>herpu</i>	<i>mier1a</i>	<i>nr1</i>	<i>ptprub</i>	<i>srf</i>	<i>tclvef</i>	<i>stat1a</i>	<i>tsp4</i>	<i>daxx</i>
<i>cyp17</i>	<i>psma8</i>	<i>lrc24</i>	<i>btg</i>	<i>ccne</i>	<i>efhc1</i>	<i>fkhr</i>	<i>ikaros</i>	<i>msgn</i>	<i>nr2</i>	<i>ptpla1</i>	<i>shcbp</i>	<i>tiam</i>	<i>stat3</i>	<i>cul</i>	<i>dido1</i>
<i>cyp19</i>	<i>psmb2</i>	<i>mad</i>	<i>cables</i>	<i>ccnf</i>	<i>elf</i>	<i>fkf</i>	<i>imp3</i>	<i>mesp</i>	<i>nr3</i>	<i>pterin4</i>	<i>shpb</i>	<i>teg264l</i>	<i>tap</i>	<i>rbx1</i>	<i>dl</i>
<i>cyp2aa1</i>	<i>psmd8</i>	<i>o3p</i>	<i>camel</i>	<i>ccng</i>	<i>ekn1</i>	<i>fosl</i>	<i>id</i>	<i>mtf</i>	<i>nr4</i>	<i>fhdp</i>	<i>stat2</i>	<i>tho2</i>	<i>tbx</i>	<i>ndr</i>	<i>dr</i>
<i>cyp2aa12</i>	<i>psmd13</i>	<i>pbg6b</i>	<i>crngf2</i>	<i>ccnh</i>	<i>elavl</i>	<i>fos</i>	<i>insl5</i>	<i>metm</i>	<i>nr5</i>	<i>hrp2t</i>	<i>stat4</i>	<i>thoc</i>	<i>tcf</i>	<i>pitx</i>	<i>fas</i>
<i>cyp2aa3</i>	<i>psmc6</i>	<i>phd20</i>	<i>cmg2a</i>	<i>ccni</i>	<i>elk</i>	<i>fox</i>	<i>igf1</i>	<i>metrn</i>	<i>nfxl1</i>	<i>pa004</i>	<i>stat5</i>	<i>tial1</i>	<i>treb5</i>	<i>sp4</i>	<i>faslg</i>
<i>cyp2aa4</i>	<i>psmb6</i>	<i>vg1</i>	<i>capsulin</i>	<i>ccn1l</i>	<i>elks</i>	<i>foxp</i>	<i>igf1r</i>	<i>mic21l</i>	<i>nfy</i>	<i>ppp1r</i>	<i>stat7</i>	<i>top2a</i>	<i>val</i>	<i>creb</i>	<i>litaf</i>
<i>cyp2aa7</i>	<i>psme1</i>	<i>tfng</i>	<i>clef1l</i>	<i>ccnij</i>	<i>eaf</i>	<i>fxr</i>	<i>igf2</i>	<i>mitf</i>	<i>nusap1</i>	<i>nk2.1</i>	<i>sin3a</i>	<i>tram1</i>	<i>zbp89</i>	<i>cdkn2</i>	<i>lta</i>
<i>cyp2aa8</i>	<i>psmb10</i>	<i>mads</i>	<i>muscl</i>	<i>ccnk</i>	<i>elof1</i>	<i>fxrp</i>	<i>igfbp</i>	<i>mavs</i>	<i>noc3l</i>	<i>quaking</i>	<i>sin3b</i>	<i>ap2</i>	<i>ttf1</i>	<i>myc</i>	<i>otr</i>
<i>cyp2aa9</i>	<i>psmb1</i>	<i>nfic</i>	<i>cilp</i>	<i>ccn1l</i>	<i>ell</i>	<i>fras1</i>	<i>insm1a</i>	<i>mkk3</i>	<i>npm1</i>	<i>rab</i>	<i>sim</i>	<i>taif</i>	<i>ef1a</i>	<i>tfdp</i>	<i>relt</i>
<i>cyp2ad2</i>	<i>psmc4</i>	<i>pcbd1</i>	<i>cas</i>	<i>ccn1t2</i>	<i>elp4</i>	<i>frem</i>	<i>ira</i>	<i>malt1</i>	<i>obr</i>	<i>rgl2</i>	<i>sip1</i>	<i>tce</i>	<i>trif/ticam1</i>	<i>e2f</i>	<i>traf2</i>
<i>cyp2ad3</i>	<i>psmb5</i>	<i>a2m</i>	<i>cnot</i>	<i>ccn1t3</i>	<i>elal</i>	<i>fli1</i>	<i>insra</i>	<i>mlxip</i>	<i>odf2</i>	<i>ralgdsaf6</i>	<i>ssb</i>	<i>ca150</i>	<i>troy</i>	<i>rbl</i>	<i>traf3</i>
<i>cyp2ad6</i>	<i>psmd9</i>	<i>atf7ip</i>	<i>mcl1</i>	<i>ccn1t4</i>	<i>be1</i>	<i>glscd11</i>	<i>irb</i>	<i>max</i>	<i>olig</i>	<i>rasdva</i>	<i>smchinge</i>	<i>tcerg1</i>	<i>trps1</i>	<i>id</i>	<i>traf3ip1</i>
<i>cyp2k16</i>	<i>rpn</i>	<i>apc</i>	<i>cde25</i>	<i>ccn1t5</i>	<i>eed</i>	<i>g6fl</i>	<i>itih2</i>	<i>minal</i>	<i>gats</i>	<i>chp</i>	<i>srx5</i>	<i>foggy</i>	<i>twist</i>	<i>acvr</i>	<i>traf4</i>
<i>cyp2k17</i>	<i>psma2</i>	<i>adar</i>	<i>cdc27</i>	<i>ccny</i>	<i>ebpl</i>	<i>gabp</i>	<i>irx</i>	<i>myc</i>	<i>opa1</i>	<i>rhot2</i>	<i>slc</i>	<i>tef</i>	<i>tsg</i>	<i>inhabab</i>	<i>traf5</i>
<i>cyp2k18</i>	<i>ube2d</i>	<i>agxt2</i>	<i>cdc37</i>	<i>tia1</i>	<i>erp44</i>	<i>fgf</i>	<i>ism1</i>	<i>c/ebp</i>	<i>zorba</i>	<i>rhou</i>	<i>sp1</i>	<i>smif</i>	<i>lbp1</i>	<i>fsta</i>	<i>traf6</i>
<i>cyp2k22</i>	<i>psme2</i>	<i>aicda</i>	<i>cdc73</i>	<i>d144</i>	<i>esama</i>	<i>gtf</i>	<i>jnk1</i>	<i>mef2</i>	<i>otx</i>	<i>rhov</i>	<i>sp2</i>	<i>tfam</i>	<i>ubtf</i>	<i>lft</i>	<i>traf7</i>
<i>cyp2k6</i>	<i>psmd2</i>	<i>arg2</i>	<i>cep29</i>	<i>dach</i>	<i>epas1</i>	<i>gicerin</i>	<i>jmjd5</i>	<i>myod1</i>	<i>zotx</i>	<i>ras</i>	<i>sp3</i>	<i>adfl1</i>	<i>usf</i>	<i>rps6k</i>	<i>trap1</i>
<i>cyp2n13</i>	<i>psmc5</i>	<i>arid</i>	<i>ches1</i>	<i>ddb2</i>	<i>edn1</i>	<i>gcm</i>	<i>jam</i>	<i>myf</i>	<i>otpb</i>	<i>rbj</i>	<i>sp4</i>	<i>tfap2</i>	<i>vdr</i>	<i>ppp2</i>	<i>tradd</i>
<i>cyp2p10</i>	<i>psme3</i>	<i>aanat</i>	<i>churc1</i>	<i>dax</i>	<i>ednrb</i>	<i>gfap</i>	<i>jdp2l</i>	<i>mrf4</i>	<i>nfk2</i>	<i>res1</i>	<i>sp7</i>	<i>tfb2m</i>	<i>vgll4</i>	<i>rock</i>	<i>traf1</i>
<i>cyp2p6</i>	<i>psmb4</i>	<i>ahrrb</i>	<i>cntfr</i>	<i>dbp</i>	<i>eny2</i>	<i>gli</i>	<i>kat2</i>	<i>myog</i>	<i>drp53</i>	<i>rest</i>	<i>sp8</i>	<i>tfb1</i>	<i>wsb1</i>	<i>ras</i>	<i>tnfaip</i>
<i>cyp2p7</i>	<i>sb10l</i>	<i>ahr</i>	<i>cldn</i>	<i>ddx</i>	<i>eomes</i>	<i>gcrb</i>	<i>kaiso</i>	<i>mynn</i>	<i>rel</i>	<i>f3</i>	<i>sp9</i>	<i>bt3</i>	<i>wdr</i>	<i>zfyve9a</i>	<i>tnfb</i>
<i>cyp2p8</i>	<i>psmb3</i>	<i>asb</i>	<i>cldni</i>	<i>dhx</i>	<i>eph</i>	<i>giotf1l</i>	<i>kpna</i>	<i>myhz2</i>	<i>paf1</i>	<i>rag</i>	<i>specc1la</i>	<i>cmaf</i>	<i>foxn</i>	<i>smad2</i>	<i>tnfsf</i>
<i>cyp2p9</i>	<i>psmc3</i>	<i>asf1b</i>	<i>cpsf</i>	<i>dec</i>	<i>rtk</i>	<i>grem1</i>	<i>kbtd8</i>	<i>mstn</i>	<i>ptfla</i>	<i>rcbtb</i>	<i>spag</i>	<i>cmy</i>	<i>wt1</i>	<i>skp</i>	<i>tnfa</i>

<i>cyp2u1</i>	<i>psmb7</i>	<i>atf</i>	<i>cstf</i>	<i>dis3l</i>	<i>efnb3b</i>	<i>grl</i>	<i>fmr1</i>	<i>myotl</i>	<i>pasg</i>	<i>rb1</i>	<i>ssfa2</i>	<i>tfcp</i>	<i>whn</i>	<i>mapk1</i>	<i>tp53</i>
<i>cyp2x10</i>	<i>psmd11b</i>	<i>ahctf1</i>	<i>clf</i>	<i>diversin</i>	<i>edm</i>	<i>gro</i>	<i>kilon</i>	<i>neil1</i>	<i>paxip</i>	<i>rarga</i>	<i>spic</i>	<i>tfdp</i>	<i>rfx</i>	<i>smad4</i>	<i>tnfr</i>
<i>cyp2x6</i>	<i>psmd12</i>	<i>zath1</i>	<i>clock</i>	<i>dnabe12</i>	<i>ebi3</i>	<i>gc</i>	<i>kirre</i>	<i>nw3l</i>	<i>psip1</i>	<i>rxr</i>	<i>spsb</i>	<i>tfe</i>	<i>wwtr1</i>	<i>smad6</i>	
<i>cyp2x8</i>	<i>psma5</i>	<i>satb2</i>	<i>mos</i>	<i>retp</i>	<i>erg</i>	<i>gfi1</i>	<i>krml</i>	<i>nhlh2</i>	<i>pcaf</i>	<i>rbp2b</i>	<i>spr2</i>	<i>gata</i>	<i>xbp1</i>	<i>smurf</i>	
<i>cyp2x9</i>	<i>psma4</i>	<i>birc</i>	<i>brg1</i>	<i>dnp63a</i>	<i>epb41</i>	<i>ghr</i>	<i>klf</i>	<i>nrl</i>	<i>pcam</i>	<i>retr1</i>	<i>spry</i>	<i>gbx</i>	<i>yy1</i>	<i>tgfbr2</i>	
<i>cyp2y3</i>	<i>uba</i>	<i>barh</i>	<i>cll7a</i>	<i>dmrt</i>	<i>epo</i>	<i>grpel</i>	<i>ku70aa</i>	<i>nbea</i>	<i>pet1</i>	<i>reverb</i>	<i>spt</i>	<i>her</i>	<i>zfbmal</i>	<i>tgfbr1</i>	
<i>cyp20a1</i>	<i>psmd10</i>	<i>bhlha</i>	<i>cil</i>	<i>dr</i>	<i>etsrp</i>	<i>gtpbp</i>	<i>xrcc</i>	<i>neurod</i>	<i>phf</i>	<i>rnaseh2b</i>	<i>src</i>	<i>hoxa</i>	<i>zfc2b</i>	<i>tgfb3</i>	
<i>cyp24a1</i>	<i>psmd3</i>	<i>bhlhe</i>	<i>crsp</i>	<i>dbnl</i>	<i>pea3</i>	<i>gmpr</i>	<i>larp7</i>	<i>neurog</i>	<i>pif1</i>	<i>rpp38</i>	<i>stat6</i>	<i>tfiia</i>	<i>zmx1</i>	<i>ifng1-2</i>	
<i>cyp26b1</i>	<i>psmd7</i>	<i>ndr</i>	<i>cc66</i>	<i>dsx</i>	<i>efr1</i>	<i>gng</i>	<i>lft</i>	<i>ngn</i>	<i>pit1</i>	<i>raver</i>	<i>sreb1</i>	<i>tfll1</i>	<i>p73t</i>	<i>tnfa</i>	
<i>cyp26c1</i>	<i>psmc2</i>	<i>bcl</i>	<i>crmp1</i>	<i>dup</i>	<i>erm</i>	<i>gnl</i>	<i>lrp</i>	<i>ath3</i>	<i>zfmeso</i>	<i>riken</i>	<i>stb1</i>	<i>maf</i>	<i>zranb3</i>	<i>dcn</i>	
<i>cyp27c1</i>	<i>psmb8</i>	<i>bcl2</i>	<i>cbfb</i>	<i>dnah9</i>	<i>er81</i>	<i>gbp</i>	<i>lzt1</i>	<i>ngr1</i>	<i>pcbp2</i>	<i>rilpl</i>	<i>stk</i>	<i>meis</i>	<i>bmpr</i>	<i>chd</i>	
<i>cyp3a65</i>		<i>blnk</i>	<i>cxadr</i>	<i>dynll2a</i>	<i>ets</i>	<i>h15rt</i>	<i>lztfl</i>	<i>npas</i>	<i>pbrm1</i>	<i>rnf</i>	<i>ssatr</i>	<i>tf</i>	<i>gdf7</i>		
<i>cyp3c1</i>		<i>bcap31</i>	<i>car</i>	<i>dyx1c1</i>	<i>etv</i>	<i>hey</i>	<i>lims1</i>	<i>nemo</i>	<i>polm</i>	<i>rn7sk</i>	<i>skiv2</i>	<i>nkx</i>	<i>nog</i>		
<i>cyp3c4</i>		<i>arnt</i>	<i>creb</i>	<i>e2f</i>	<i>ehmt2</i>	<i>hes</i>	<i>lmo</i>	<i>nkrf</i>	<i>polr2a</i>	<i>ctr</i>	<i>sufu</i>	<i>nrf2</i>	<i>smad1</i>		
<i>cyp39a1</i>		<i>nx</i>	<i>crx</i>	<i>e4bp4</i>	<i>etaa1</i>	<i>hncdet2</i>	<i>lmx</i>	<i>nkpl</i>	<i>polr3f</i>	<i>rogdi</i>	<i>suhl</i>	<i>osx</i>			
<i>cyp4f3</i>		<i>atoh</i>	<i>crel</i>	<i>e4f1</i>	<i>ercc</i>	<i>hells</i>	<i>lyve11</i>	<i>nsmce</i>	<i>polr3</i>	<i>rora</i>	<i>supt</i>	<i>pax</i>			
<i>cyp4t8</i>		<i>figa</i>	<i>ctbp1</i>	<i>e4tf</i>	<i>figla</i>	<i>hlif</i>	<i>smad5</i>	<i>ntla</i>	<i>polr</i>	<i>rif</i>	<i>supv3</i>	<i>pbx</i>			
<i>cyp4v7</i>		<i>bing</i>	<i>ctcf</i>	<i>zef1</i>	<i>fubp1</i>	<i>hlh1</i>	<i>maf</i>	<i>nkrab</i>	<i>pontin</i>	<i>rxrtf</i>	<i>sly1</i>	<i>pitx</i>			
<i>cyp46a2</i>		<i>bmal</i>	<i>cyca2</i>	<i>ebf11</i>	<i>ff1d</i>	<i>hlf</i>	<i>maft</i>	<i>nasp100l</i>	<i>brn</i>	<i>ruvlds</i>	<i>srpx</i>	<i>runx</i>			
<i>cyp51</i>		<i>bok</i>	<i>cycaal</i>	<i>ebf3</i>	<i>fgfr</i>	<i>hccag127l</i>	<i>mnt</i>	<i>nfil3</i>	<i>pcna</i>	<i>sltm</i>	<i>smarc</i>	<i>six</i>			
<i>cyp8b2</i>		<i>bmp</i>	<i>cycab</i>	<i>ebf3l</i>	<i>fen1</i>	<i>hgf</i>	<i>mxd</i>	<i>nfe2</i>	<i>ppp2r</i>	<i>samsn</i>	<i>taf</i>	<i>smad2</i>			
<i>cyp8b3</i>		<i>bon</i>	<i>ccnb</i>	<i>egr</i>	<i>flkl</i>	<i>hnf1</i>	<i>mga</i>	<i>nfia</i>	<i>ptpn</i>	<i>scxa</i>	<i>tax1bp</i>	<i>smad3</i>			
<i>cyp11</i>		<i>brf1</i>	<i>ccnc</i>	<i>ebvgr</i>	<i>fog</i>	<i>hnf4a</i>	<i>mxi1</i>	<i>nfatc</i>	<i>ptprf</i>	<i>scrt</i>	<i>tbp</i>	<i>smad4</i>			
<i>cyp26a1</i>		<i>brpfl</i>	<i>ccnd1</i>	<i>evi</i>	<i>fast1</i>	<i>helt</i>	<i>mlx</i>	<i>nfat</i>	<i>ptprk</i>	<i>sdf1</i>	<i>tagap</i>	<i>smaf</i>			
<i>cyp1a</i>		<i>boc</i>	<i>cyd1</i>	<i>ecsit</i>	<i>foxm</i>	<i>hdac</i>	<i>mcm</i>	<i>nfkbiab</i>	<i>ptprma</i>	<i>sec61a</i>	<i>tal</i>	<i>sox</i>			
<i>cyp2aa2</i>		<i>bs69</i>	<i>ccnd2a</i>	<i>eda</i>	<i>foxo</i>	<i>hinfp</i>	<i>med</i>	<i>ncoa</i>	<i>ptpro</i>	<i>sec61g</i>	<i>tcil1</i>	<i>sp5</i>			



En la Tabla 1.7 se muestran listados de genes concretos identificados de cada conjunto de genes activados que incluimos en la Tabla 1.6. Si nos fijamos en los genes de la ruta del citocromo P450, podemos observar que 44 de los 52 genes se encontraban activados. En la Figura 1.9a, se observa el mapa de color generado para la vía de señalización del citocromo P450.

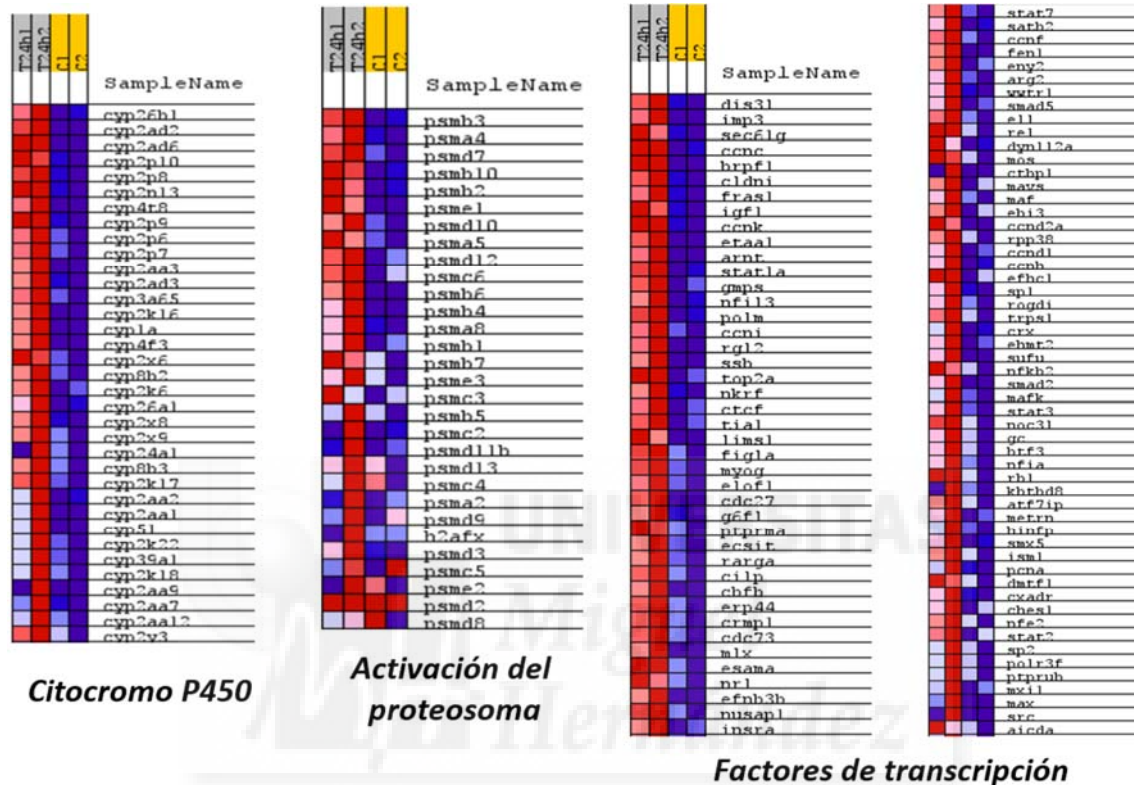


Figura 1.9a: Mapa de color de los conjuntos de genes más activados en el grupo SVCV-1d, con respecto al control no infectado. Tanto el grupo control (C1 y C2) como el infectado (T24h1 y T24h2) se muestran por duplicado. El color rojo indica genes sobreactivados, el color azul estado inhibido.

Sabemos que la inmunidad innata comprende tanto barreras físicas, como la piel, o químicas, péptidos antimicrobianos, y células fagocíticas utilizadas para mantener el organismo libre de patógenos. También hay proteínas, como las de la ruta del complemento, que son capaces de iniciar una cascada de inflamación o la expresión de citoquinas [170]. Tanto en mamíferos como en peces se ha descrito una estrecha relación entre la biotransformación de xenobióticos y el sistema inmune [171-174]. En peces se ha demostrado una activación de genes del complejo del citocromo P450 tras una infección bacteriana, además de un aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias [172, 174, 175].

Otra ruta de genes activados era la del proteosoma, con 30 de 39 genes activados (Figura 1.9a). Se sabe que el proteosoma es el sistema más importante de

degradación de proteínas defectuosas y en la célula representa un mecanismo esencial en varios procesos, incluyendo el ciclo celular, la regulación de la expresión génica y las respuestas al estrés oxidativo. Además, se ha comprobado que el proteosoma juega un papel fundamental en la degradación de proteínas exógenas virales [176]. Para que una proteína sea reconocida y degradada en el proteosoma es necesario un marcaje previo con ubiquitina [177], y como podemos observar en la Tabla 1.5 la vía de ubiquitinación de proteínas también se veía activada, aunque en menor medida que las cinco seleccionadas. Esto sugiere una estrecha relación entre los productos celulares que se generan tras la infección viral y las vías de degradación de las proteínas, tal y como sucede con otros virus, como el VSV [178].

Para el grupo de genes relacionados con los factores de transcripción observamos que 176 genes de los 615 totales de esta ruta estaban activados (Figura 1.9a). En este caso, la infección viral promueve la activación de *nf-k $\beta$* , que, a su vez, puede ser activado a través de la cascada de citoquinas pro-inflamatorias (estas también las hemos observado activadas) o el propio *tnf- $\alpha$*  (activado en todos los tiempos de infección analizados). Es más, no sólo los genes *tnf- $\alpha$*  y *nf-k $\beta$*  están activados sino también ambas rutas en las que participan los dos genes (Figura 1.9b). Un aspecto importante a tener en cuenta es que *nf-k $\beta$*  puede a su vez ser capaz de regular la expresión *il-2*, *il-6* e *il-8*. Todos estos aumentos representan un indicador de la respuesta temprana del sistema inmune innato, lo que concuerda con trabajos previos realizados en nuestro grupo [25, 27].

Otros factores de transcripción que se observan activados en el grupo SVCV-1d son los genes *smad*, en este caso vinculados a la regulación del *tgf- $\beta$*  (Figura 1.9b), un regulador general de las actividades celulares con múltiples efectos biológicos, cuya identificación ha permitido entender los mecanismos por los cuales las funciones celulares están reguladas en la salud y alteradas en muchas enfermedades, además puede actuar como estimulador de la síntesis de proteínas de matriz extracelular [179].



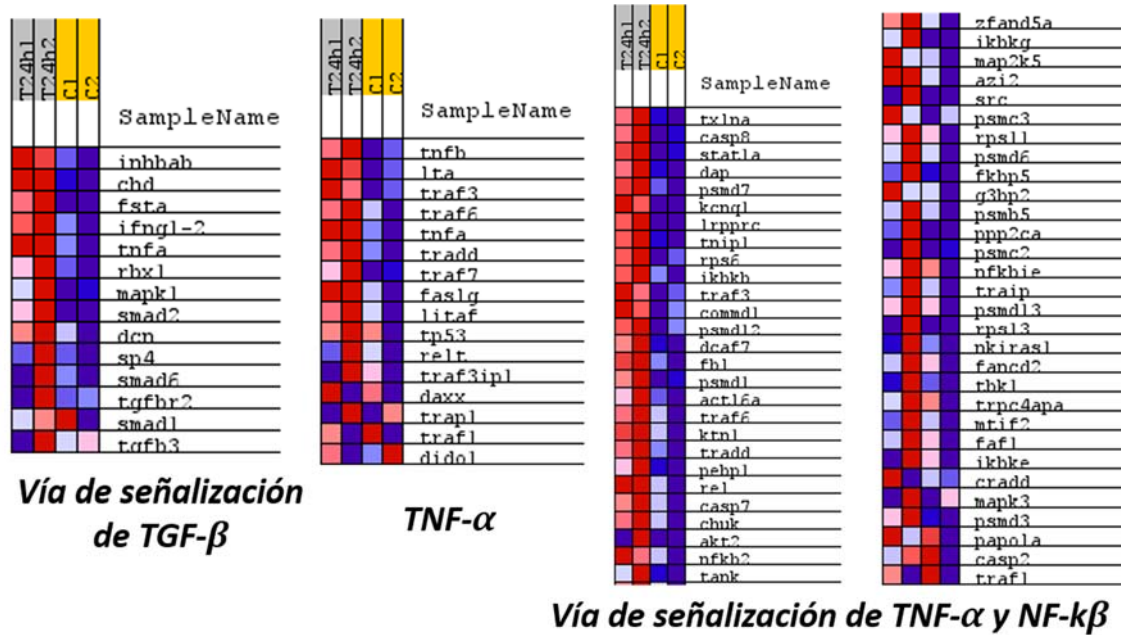


Figura 1.9b: Mapa de color de los conjuntos de genes más activados en el grupo SVCV-1d, con respecto al control no infectado. Tanto el grupo control (C1 y C2) como el infectado (T24h1 y T24h2) se muestran por duplicado. El color rojo indica genes sobreactivados, el color azul estado inhibido.

También se ha planteado que *tgf- $\beta$*  es un potente inhibidor de la proliferación de células epiteliales, endoteliales, linfoides y mieloides. Y además, se ha descrito que es producido por un gran número de células, en particular por macrófagos, pudiendo tener efectos muy diferentes, e incluso opuestos, dependiendo de la presencia de otros factores secretados como las citoquinas [179, 180]. El que ocurra uno u otro tipo de efecto está determinado principalmente por las citoquinas expresadas en cada caso. En nuestro caso hemos encontrado activados los genes de las citoquinas *il-1b*, *il-6* y *tnf- $\alpha$* , que conducen a un aumento de la vía de señalización de citoquinas inflamatorias, como también observaron Travis y cols. [180].

Tras el análisis en el GSEA pensamos que sería útil representar en un mapa de interacciones moleculares los vínculos establecidos entre los genes identificados en los grupos más representativos obtenidos en el grupo SVCV-1d. Para ello empleamos el programa Cytoscape, que nos permitió presentar de una manera visual la interrelación entre todos los genes identificados. En la Figura 1.10, podemos observar el mapa de interacciones generado y los *clusters* o grupos de genes más representativos que se identifican. Entre ellos destacan: el grupo de genes del proteosoma, la vía de interacción de citoquinas, la señalización del *tgf- $\beta$* , así como algunas moléculas relacionadas con el reconocimiento de patógenos y el ciclo celular.

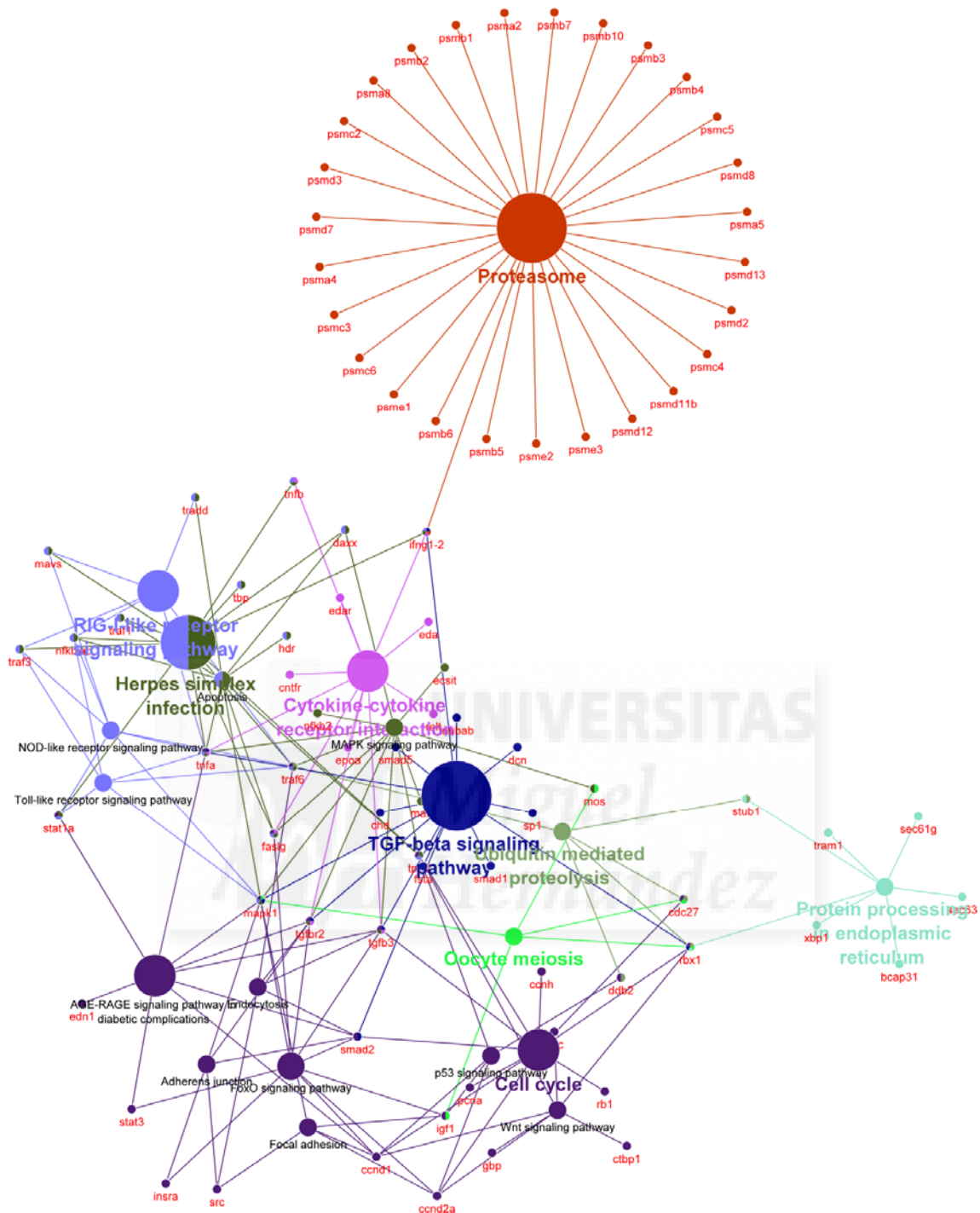


Figura 1.10: Red de relaciones existentes entre los genes detectados en los conjuntos de genes más activados en el grupo SVCV-1d.

Resulta curioso que al observar en detalle el mapa de interacciones existen genes que se establecen como denominador común entre varios procesos, tal es el caso de los siguientes genes: *mavs*, *ifn*, *faslg*, *traf6*, *traf3*, *tnf- $\alpha$* , *mapk1*, todos ellos asociados a procesos vinculados con desarrollo de una respuesta inmune. La activación de la todas estas moléculas ha sido descrita por varios autores [166, 181-185].

**Conjuntos de genes con mayor activación en el grupo SVCV-2d.**

En el análisis de GSEA de los datos del grupo SVCV-2d, se demostró que 59 de los 84 conjuntos de genes estaban activados. Cuatro conjuntos de genes mostraron diferencias significativas con un valor p ( $p < 0,05$ ): genes relacionados con apoptosis, con el interferón y dos conjuntos de genes relacionados con los receptores *tlr* (Tabla 1.8).

**Tabla 1.8: Conjuntos de genes sobreactivados en el grupo SVCV-2d. \*  $p \leq 0,05$ .**

NOMBRE	No de genes	NES	NOM p-val	FDR q-val
<b>APOPTOSIS-WIKPATHAY</b>	<b>34</b>	<b>1,552</b>	<b>0.01390*</b>	<b>1.0</b>
<b>IFN</b>	<b>17</b>	<b>1,515</b>	<b>0.03047*</b>	<b>0.895</b>
<b>SEÑALIZACIÓN DE RECEPTORES TIPO TOLL</b>	<b>34</b>	<b>1,455</b>	<b>0.03608*</b>	<b>0.727</b>
<b>TLR</b>	<b>9</b>	<b>1,476</b>	<b>0.03900*</b>	<b>0.825</b>
SEÑALIZACIÓN DE TNF- $\alpha$ NF-KB	57	1,357	0.05434	0.628
SEÑALIZACIÓN DE RECEPTORES TOLL	33	1,407	0.06794	0.817
SARAMPIÓN-KEGG	34	1,390	0.06860	0.771
SEÑALIZACIÓN PI3K-AKT	26	1,363	0.09251	0.680
GENES ESTIMULADORES DE INTERFERON	7	1,385	0.09312	0.682
SEÑALIZACIÓN DE RECEPTORES TIPO NOD	19	1,34	0.11334	0.705
SEÑALIZACIÓN TNF- $\alpha$ NF-KB SIGNALING	57	1,34	0.12823	0.637
INDUCCIÓN DE STRESS VÍA FAS.	16	1,29	0.16845	0.702

Uno de los conjuntos de genes modulados de forma significativa en el grupo SVCV-2d es el de los relacionados con la apoptosis. La mayoría de los genes detectados de esta ruta se mantienen activados, tal y como se observa en la Figura 1.11. Primeramente, el organismo detecta la presencia del virus por los cambios bioquímicos asociados con el patrón infección y establece uno o varios tipos de respuesta para contrarrestarlo, entre ellos la muerte celular programada.

La muerte celular por apoptosis es considerado como un mecanismos de defensa frente a la infección y se puede iniciar por dos vías: la vía extrínseca, que se activa desde fuera de la célula, bien a través de *tnf- $\alpha$*  o del receptor de muerte FasL, que, a su vez, activan la via de *casp 8* y/o *10*; y la vía intrínseca, que se inicia por daños en el ADN y comunicación con la mitocondria y el retículo endoplásmico, que de esta manera desencadenan la activación de las caspasas efectoras 3 y 9 [186, 187].

**Tabla 1.9: Genes activados que se han identificado para los conjuntos seleccionados en la Tabla 1.8 con valor de  $p \leq 0,05$ .**

<b>Apoptosis</b>	<b>IFN</b>	<b>Receptores tipo Toll</b>		<b>TLR</b>
<i>hells</i>	<i>igsf</i>	<i>mapk1</i>	<i>cxcl6</i>	<i>lrre</i>
<i>faslg</i>	<i>gig2</i>	<i>map3k8</i>	<i>pik3r5</i>	<i>lrrp1</i>
<i>irf1b, irf2, irf3 irf4</i>	<i>ifih</i>	<i>stm</i>	<i>crfb</i>	<i>pscapl</i>
<i>ripk</i>	<i>isgf3</i>	<i>traf3</i>	<i>tlr7</i>	<i>sarm</i>
<i>casp8, casp6, casp7 y casp9</i>	<i>ifngilr1</i>	<i>ripk</i>	<i>map2k7</i>	<i>tollip</i>
<i>ikbkg</i>	<i>mxl</i>	<i>irf7</i>	<i>nfbk2</i>	<i>tirap</i>
<i>map2k4</i>	<i>igf2</i>	<i>cxcl</i>	<i>map2k6</i>	<i>tlr1</i>
<i>cflar</i>	<i>igf1r</i>	<i>ifnphi3</i>	<i>map2k1</i>	<i>tlr18</i>
<i>tp73</i>	<i>ifi30</i>	<i>ifi30</i>	<i>fos</i>	<i>tlr19</i>
<i>dff</i>	<i>ifngr1</i>	<i>tnfr</i>	<i>il12</i>	<i>tlr20</i>
<i>pmaip1</i>	<i>ifnptt5l</i>	<i>ikbkb</i>	<i>cclc</i>	<i>tlr21</i>
<i>chuk</i>	<i>ifnitml</i>	<i>map3k7</i>	<i>cts</i>	<i>tlr22</i>
<i>mdm2</i>	<i>ifnphi1</i>	<i>mapk14</i>	<i>tlr9</i>	<i>tlr2</i>
<i>pik3r5</i>	<i>ifnphi2</i>	<i>irak3</i>	<i>tlr4</i>	<i>tlr3</i>
<i>ikbkb</i>	<i>ifnphi3</i>	<i>chuk</i>	<i>tollip</i>	<i>tlr4</i>
<i>traf1</i>	<i>irf1</i>	<i>il8</i>	<i>il18</i>	<i>tlr5-h</i>
<i>casp2</i>	<i>irf10</i>	<i>myd88</i>	<i>tirap</i>	<i>tlr5</i>
<i>cradd</i>	<i>irf11</i>	<i>rac1</i>	<i>tlr2</i>	<i>tlr7</i>
<i>irf7</i>	<i>irf2</i>	<i>mapk10</i>	<i>ikbkg</i>	<i>tlr8</i>
<i>traf3</i>	<i>irf2bp</i>	<i>il1b</i>	<i>irak4</i>	<i>tlr9</i>
<i>tnfsf</i>	<i>irf3</i>	<i>tbk1</i>	<i>casp8</i>	<i>ticam1</i>
<i>tp53</i>	<i>irf4</i>	<i>traf6</i>	<i>tlr6</i>	<i>tolloid</i>
<i>fadd</i>	<i>irf5</i>	<i>ikbke</i>	<i>pltp</i>	
<i>apaf1</i>	<i>irf7</i>	<i>fadd</i>		
<i>iapl</i>	<i>irf8</i>	<i>il6</i>		
<i>nfbkie</i>	<i>irf9</i>	<i>ccl5</i>		
<i>igf1</i>	<i>ifrd</i>	<i>akt3a</i>		
<i>nup</i>	<i>isg20l2</i>	<i>tab</i>		
<i>mapk10, mapk3</i>	<i>nsiifnl</i>	<i>stat1a</i>		
<i>tradd</i>	<i>prkri</i>	<i>nfbkiab</i>		
<i>badb</i>	<i>isg12</i>	<i>tnfa</i>		
<i>bnip</i>	<i>irf6</i>	<i>irf6</i>		
<i>birc</i>	<i>trim33</i>	<i>cd276</i>		
<i>jun</i>	<i>trim</i>	<i>tlr5</i>		
<i>tnfr</i>	<i>tfdp</i>	<i>tlr5-h</i>		
<i>tpte</i>	<i>ifng1-2</i>	<i>tlr3-h</i>		
<i>bcl2</i>		<i>tlr3</i>		
<i>xiap</i>		<i>tlr1</i>		
<i>bbc3</i>		<i>tlr6</i>		

Específicamente pudimos comprobar que algunos genes vinculados a la vía extrínseca, como es el caso del receptor *fasl*, *tradd*, *casp8* y *tnf- $\alpha$* , se encuentran sobreactivados a este tiempo de infección. El hecho de que genes de carácter antiapoptótico, como *bcl2*, presenten un alto grado de activación, indicaría que la vía extrínseca podría verse favorecida en el desarrollo de la apoptosis, a través de *tnf- $\alpha$*  [186]. Esto no quiere decir que la vía intrínseca esté totalmente desactivada, puesto los genes de *casp3* y *casp8* se mantienen activados.

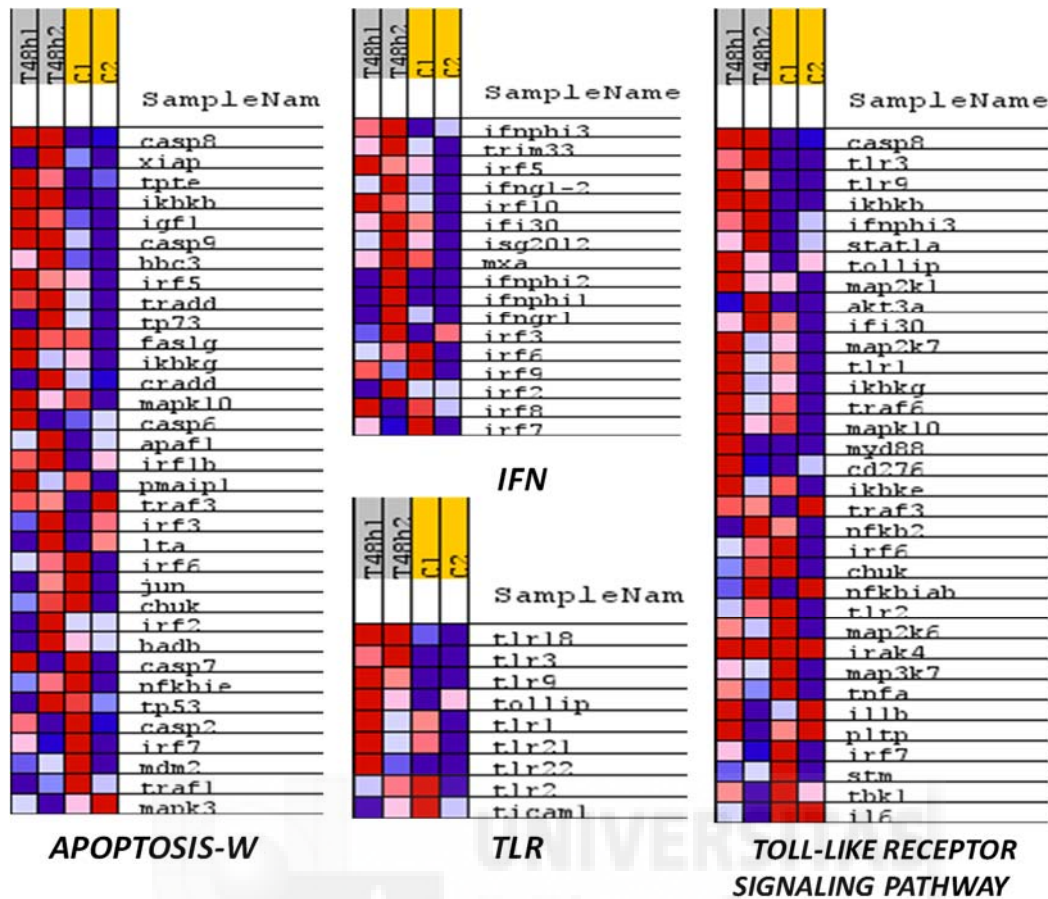


Figura 1.11: Mapa de color de los conjuntos de genes más activados en el grupo SVCV-2d, con respecto al control no infectado. Tanto el grupo control (C1 y C2) como el infectado (T48h1 y T48h2) se muestran por duplicado. El color rojo indica genes sobreactivados, el color azul estado inhibido.

Un resultado similar obtuvieron Yuan y cols, que tras un análisis transcriptómico a células EPC infectadas con SVCV, comprobaron que uno de los conjuntos de genes mayormente regulado fue el de la apoptosis, y que específicamente la infección por el virus promovía la vía extrínseca de muerte [188]. Igualmente, Bjorklund y cols, demostraron que uno de los efectos de la infección con SVCV *in vitro* (en células EPC) era provocar apoptosis como mecanismo de muerte celular [189]. En nuestro propio grupo, en un trabajo realizado con peces cebra *rag<sup>-/-</sup>*, mutantes que carecen de inmunidad adaptativa, también se comprobó que la apoptosis era la vía principal muerte celular en respuesta a la infección con SVCV [28].

Otros conjuntos de genes activados fueron los relacionados con los receptores tipo Toll (*tlrs*), especialmente los genes de los *tlrs*: 1, 2, 3, 9, 18, 21 y 22 (Figura 1.11), de entre los que *tlr3* está implicado de reconocimiento de ARN viral bicatenario. Como genes también incluidos en los dos conjuntos anteriores también se encuentran los genes *ticam1*, *tbk1*, *irf3* e *irf7*; todos ellos implicados en la activación del conjunto de



genes del interferón (Tabla 1.8). De igual manera que en peces cebra *rag*<sup>-/-</sup> para los genes de apoptosis, en este caso también los genes relacionados con interferón se ven más activados [28]. En el mismo sentido, se ha propuesto la activación de *tlr3* como vía de activación de *nf-kβ* y, a su vez, este último promoviendo la activación de *ifn* a una infección viral [166, 181]. En la Figura 1.12 se muestra el análisis realizado con el programa CYTOSCAPE y nos permite también comprobar que entre los *clusters* de genes activados se encuentran los de los receptores tipo Toll, la vía de señalización de las proteínas *mapk*, la señalización de citoquinas y la apoptosis.

Existe abundante bibliografía que relaciona la identificación de patógenos a través de la ruta de receptores tipo Toll con la señalización de citoquinas [165] y esta, a su vez, conecta con *mapk* y la degradación proteolítica de proteínas [53, 190]. Nosotros observamos como genes activados *ifnphi-1*, *ifnphi3*, *il6*, *tnf-α*, *faslg*, *casps8* y *el ifng*, lo que concuerda con la bibliografía antes mencionada.

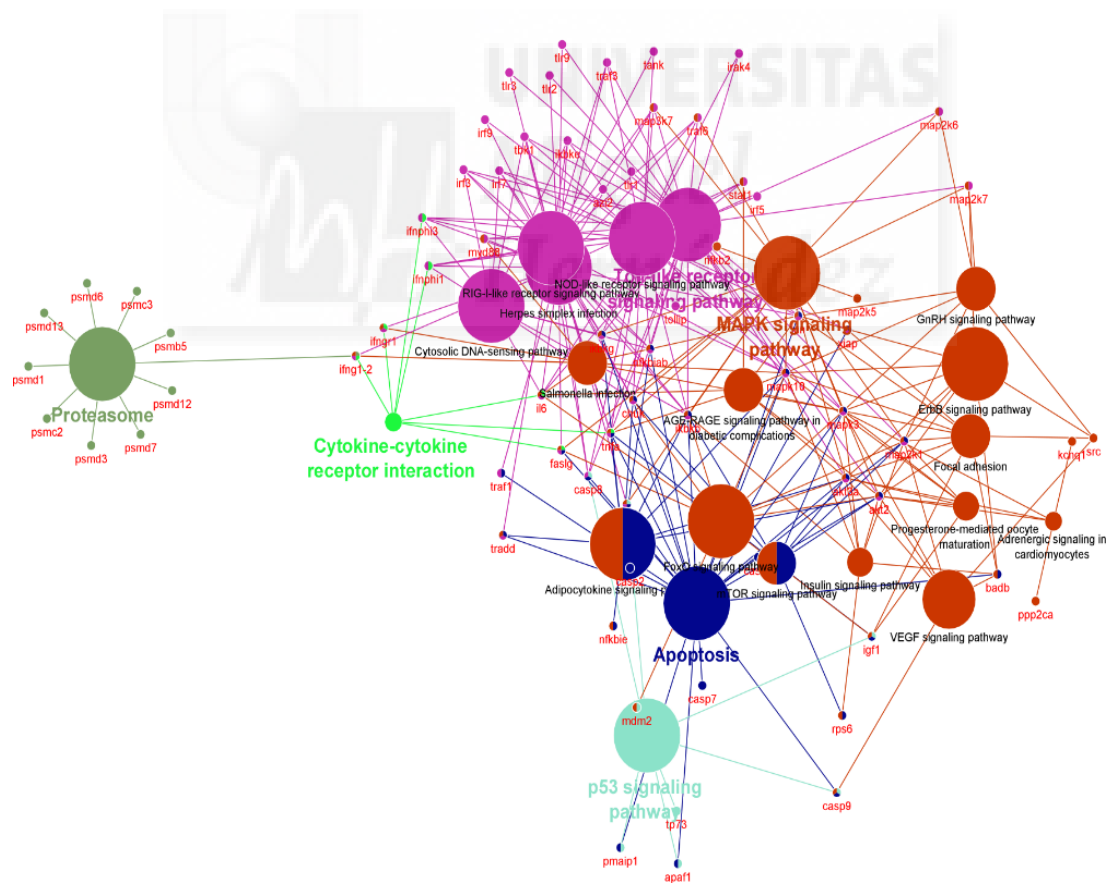


Figura 1.12: Red de relaciones existentes entre los genes detectados en los conjuntos de genes más activados en el grupo SVCV-2d.

### Conjuntos de genes más activados en grupo SVCV-5d.

Al realizar el análisis de los datos del grupo SVCV-5días, con el programa GSEA comprobamos que 12 de los 84 conjuntos de genes utilizados para el estudio, estaban activados en este grupo. Destacan entre ellos el conjunto de genes de las *crp* (del inglés *c reactive protein*), genes de apoptosis y los relacionados con los *tlr* (estos dos últimos grupos también activados a 2 días tras la infección). En la Tabla 1.10 se incluye los conjuntos de genes activados del grupo SVCV-5d y en la tabla 1.11 se detallan los genes identificados dentro de estos grupos.

**Tabla 1.10: Conjuntos de genes más activos en el grupo SVCV-5d. \*  $p \leq 0,05$ .**

NOMBRE	no. genes	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
<b>CRP</b>	<b>7</b>	<b>0.7199</b>	<b>1,872</b>	<b>0.00512*</b>	<b>0.08663</b>
<b>APOPTOSIS-w</b>	<b>16</b>	<b>0.4155</b>	<b>1,551</b>	<b>0.01886*</b>	<b>0.22589</b>
<b>TLR</b>	<b>9</b>	<b>0.5095</b>	<b>1,439</b>	<b>0.048139*</b>	<b>0.26048</b>
<b>APOPTOSIS</b>	34	0.2799	1,246	0.08064	0.38265
<b>INDUCCIÓN DE STRES VÍA FAS</b>	16	0.3651	1,288	0.14782	0.40149
<b>SEÑALIZACIÓN DE CITOQUINAS</b>	20	0.2463	0,929	0.57425	1.0
<b>GENES ESTIMULADORES DE IFN</b>	7	0.3558	0,927	0.51184	0.95484
<b>CITOTOXICIDAD MEDIADA POR CELULAS NATURAL KILLER</b>	21	0.2253	0,874	0.73033	0.96639
<b>NIR</b>	6	0.3586	0,854	0.62380	0.90579

En pez cebra se han descrito siete isoformas de *crp*, y a excepción de *crp5*, el resto se han identificado en nuestro estudio (Figura 1.13) como activadas. Es conocido que ante la presencia de una lesión en tejidos locales se activa la liberación de señales pro-inflamatorias tales como *il6*, *il1b* y *tnf- $\alpha$*  (que ya hemos visto activados desde el primer día), que son capaces de inducir la síntesis y liberación de *crp* a la sangre. Se ha planteado que las *crp* desempeñan un papel importante en la inmunidad innata, como un sistema de defensa temprano contra infecciones víricas [191]. De la misma forma, nuestro grupo ha mostrado la presencia de transcritos de los siete genes para *crps* ante infecciones de VHSV, tanto en peces infectados como en supervivientes [27].

La vía de apoptosis se activó a 2 días tras la infección y se mantiene activada a 5 días (Tabla 1.10 y Figura 1.13). Nuestro grupo ya ha descrito los mecanismos de apoptosis en respuesta a infección rabdovirus en peces cebra [27, 28]. También en células EPC, Yuan y cols mostraron que la infección por otro rabdovirus (SVCV) promovía el aumento de *casp8* y por consiguiente la apoptosis [188]. Resulta curioso observar que, tras cinco días de infección, el conjunto de genes relacionado con los *tlrs* se

encuentra activado, más aún teniendo en cuenta que constituye un primer paso de activación de la inmunidad innata. Una posible explicación sería que el aumento progresivo de la carga viral, mantiene la activación de estos genes, pero no podemos descartar otras posibilidades.

**Tabla 1.11: Genes activados que se han identificado para los conjuntos seleccionados con valor de  $p \leq 0,05$  de la Tabla 1.10.**

<b>crp</b>	<b>Apoptosis</b>			<b>TLR</b>	
<i>crp1</i>	<i>traf1</i>	<i>hells</i>	<i>irf7</i>	<i>lrrc</i>	<i>tlr9</i>
<i>crp2</i>	<i>casp2</i>	<i>faslg</i>	<i>traf3</i>	<i>lrrp1</i>	<i>ticam1</i>
<i>crp3</i>	<i>cradd</i>	<i>irf1b</i>	<i>irf5</i>	<i>pscapl</i>	<i>tolloid</i>
<i>crp4</i>	<i>casp7</i>	<i>irf2</i>	<i>tnfsf</i>	<i>sarm</i>	
<i>crp5</i>	<i>bok</i>	<i>irf3</i>	<i>tp53</i>	<i>tollip</i>	
<i>crp6</i>	<i>tnfr</i>	<i>ripk</i>	<i>fadd</i>	<i>tirap</i>	
<i>crp7</i>	<i>lta</i>	<i>casp8</i>	<i>apaf1</i>	<i>tlr1</i>	
<i>sap</i>	<i>mapk3</i>	<i>ikbkg</i>	<i>iapl</i>	<i>tlr18</i>	
<i>sapp</i>	<i>tpte</i>	<i>map2k4</i>	<i>nfkbie</i>	<i>tlr19</i>	
<i>c1q</i>	<i>bcl2</i>	<i>cflar</i>	<i>igfl</i>	<i>tlr20</i>	
<i>c1s</i>	<i>xiap</i>	<i>casp6</i>	<i>nup</i>	<i>tlr21</i>	
<i>serping1</i>	<i>bbc3</i>	<i>tp73</i>	<i>mapk10</i>	<i>tlr22</i>	
<i>c2</i>	<i>irf6</i>	<i>dff</i>		<i>tlr2</i>	
<i>c4</i>	<i>tradd</i>	<i>pmaip1</i>		<i>tlr3</i>	
<i>vwf</i>	<i>badb</i>	<i>chuk</i>		<i>tlr4</i>	
<i>c3</i>	<i>bnip</i>	<i>mdm2</i>		<i>tlr5-h</i>	
<i>c1qr</i>	<i>birc</i>	<i>pik3r5</i>		<i>tlr5</i>	
<i>serpine-h</i>	<i>casp9</i>	<i>irf4</i>		<i>tlr7</i>	
<i>serpine</i>	<i>jun</i>	<i>ikbkb</i>		<i>tlr8</i>	

El hecho de que haya un menor número de conjuntos de genes significativamente activados a 5 días tras la infección sugeriría que algunas de las respuestas más tempranas ya han pasado su máximo de expresión. Además resulta curioso que en los grupos SVCV-2d y SVCV-5d se produzca una coincidencia en la activación de los conjuntos de genes de apoptosis y *tlr*, lo cual apuntaría en la dirección de activación de este mecanismo de muerte de forma persistente tras infecciones virales [27, 28].

La distribución de los genes detectados en los conjuntos de genes más activados, a través de un mapa de interacción molecular generado con el programa Cytoscape, nos permitió visualizar las interacciones existentes entre los *clusters* más representados, como el caso de los receptores tipo Toll, la vía de señalización de las *mapk*, el conjunto de apoptosis y la señalización de la proteína P53 (Figura 1.14).



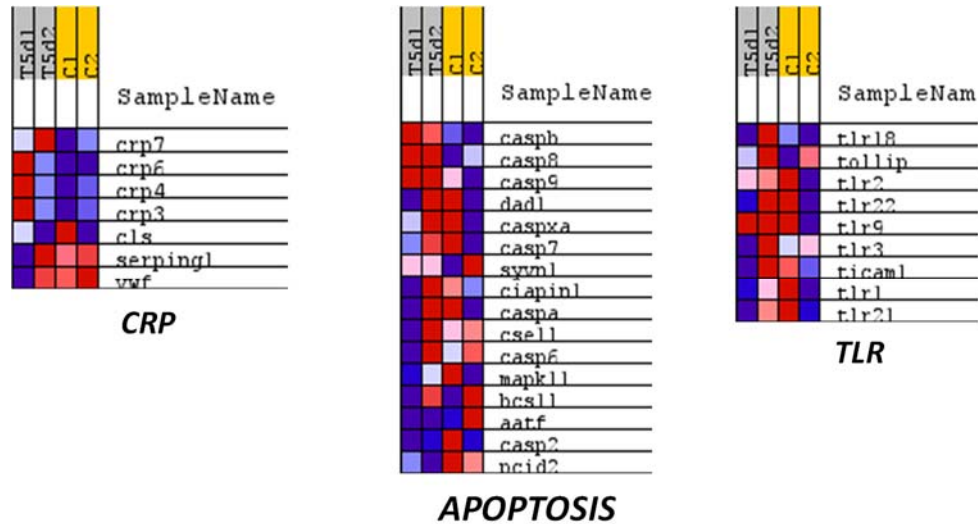
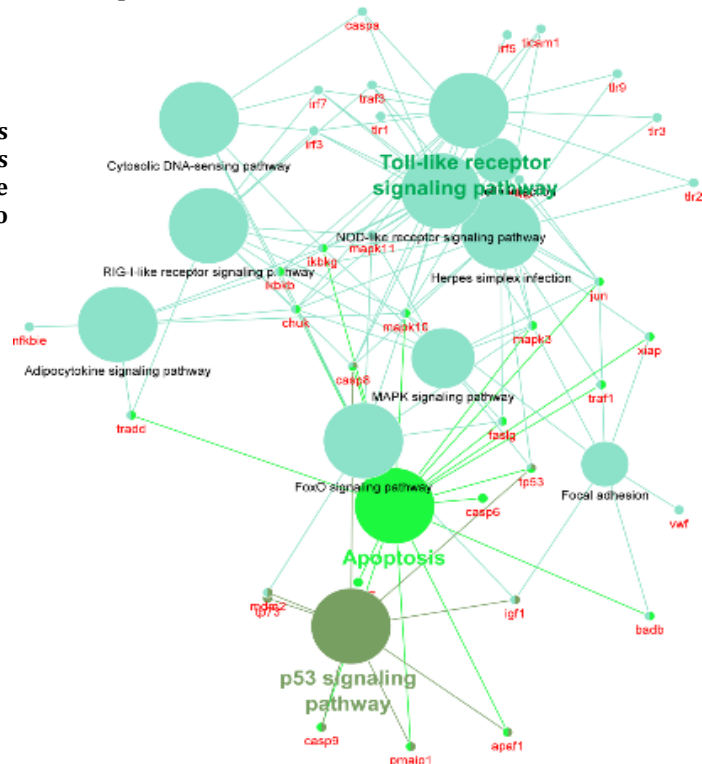


Figura 1.13: Mapa de color de los conjuntos de genes más activados en el grupo SVCV-5d, con respecto al control no infectado. Tanto el grupo control (C1 y C2) como el infectado (T5d1 y T5d2) se muestran por duplicado. El color rojo indica genes sobreactivados, el color azul estado inhibido.

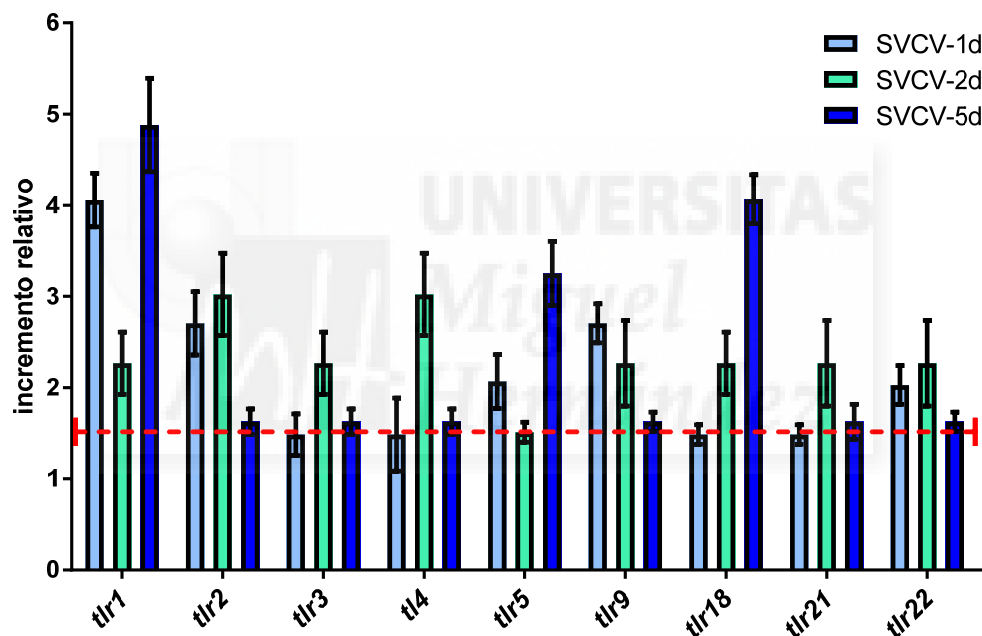
Como ya hemos mostrado anteriormente, existen evidencias en la literatura de la vinculación de los receptores tipo Toll con la cascada de citoquinas y estas, a su vez, con la activación del interferón [53, 165]. Igualmente hay trabajos que hacen referencia a la interrelación existente entre la vía de señalización de receptores tipo Toll con los procesos de apoptosis y de la activación de las proteínas quinasas y P53 [192]. Al revisar en detalle el mapa de interacciones generado a través de Cytoscape, observamos que existen genes que resultan comunes, por ejemplo: *irf3*, *irf7*, *casp8*, *faslg* y *tp53*. Todos ellos relacionados con procesos del sistema inmune y la generación de una respuesta antiviral por la activación de la cascada del interferón.

Figura 1.14: Red de relaciones existentes entre los genes detectados en los conjuntos de genes más activados en el grupo SVCV-5d.



## Incremento relativo de genes activados vinculados a la inmunidad innata y a respuesta antiviral.

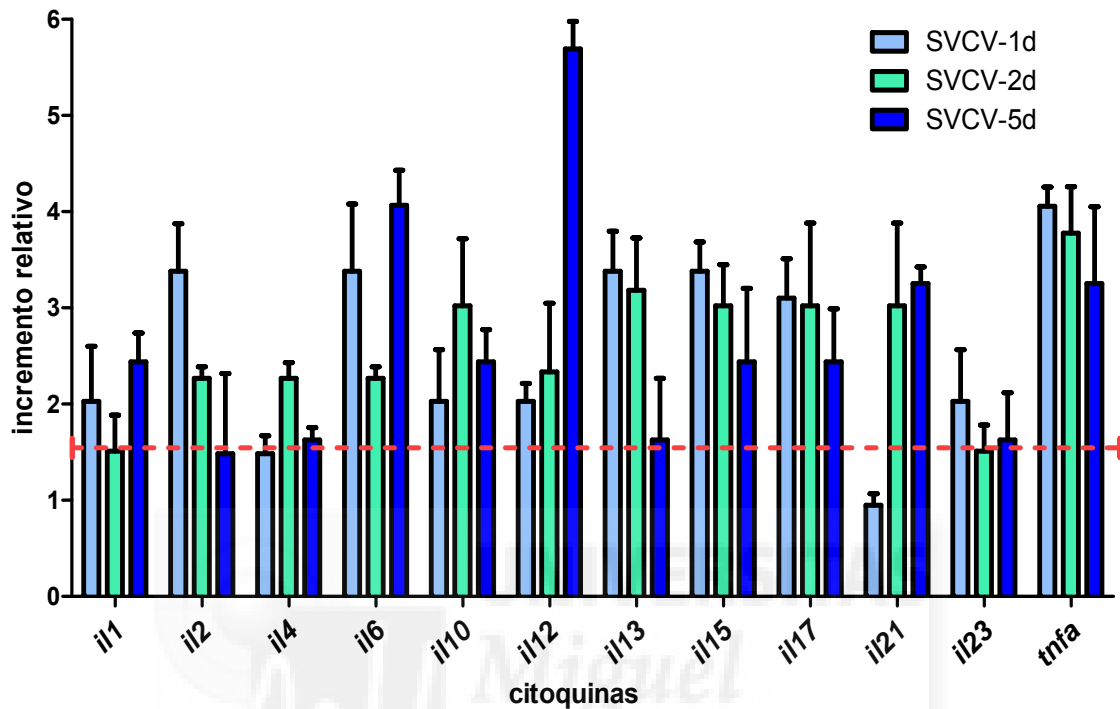
Hasta ahora hemos mencionado distintos grupos de genes que se ven activados como consecuencia de la infección viral y que podrían estar relacionados con un aumento de la diferenciación y migración de macrófagos como células implicadas en la inmunidad innata, así como la activación de otras células fagocíticas. Por ello, decidimos hacer un análisis de forma individual de los niveles de incremento relativo de algunos genes, obtenidos a partir de la secuenciación del ADN inmunoprecipitado y seguir su evolución en los 5 primeros días de infección con SVCV.



**Figura 1.15: Perfiles de incremento relativo respecto al control de cada uno de los genes *tlrs* de pez cebra infectados con SVCV a los tiempos indicados.** Los resultados obtenidos fueron evaluados tomando en cuenta los valores de activación de cada gen en comparación al control. Se consideraron valores significativos los incrementos mayores de 1,5 veces con  $p < 0,05$ .

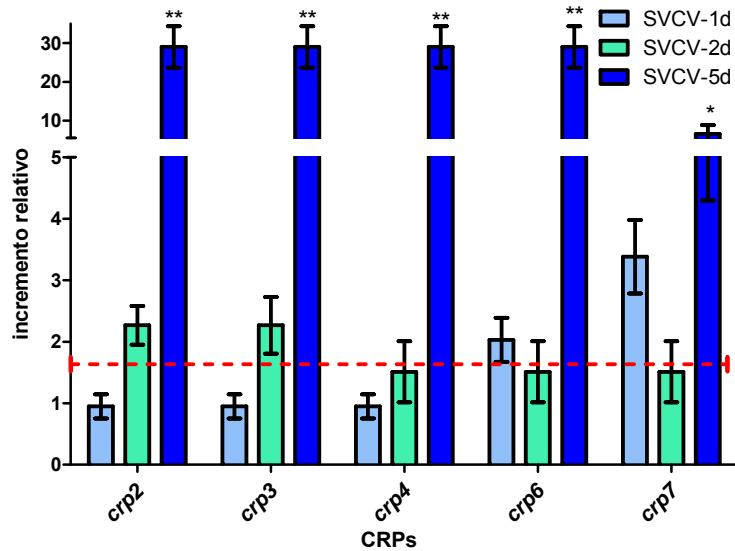
Primeramente, revisamos el comportamiento de los *tlrs*, precisamente por ser una de las primeras respuestas a la presencia de un patógeno (Figura 1.15) y vinculado a la activación de macrófagos durante una respuesta inmune innata [102, 158]. Anteriormente habíamos descrito que la entrada de un patógeno es detectada en algunos casos por los *tlrs*, con lo cual es lógica la alta activación de los mismos. Coincidiendo con nuestros resultados son varios los autores que referencian la detección de *tlrs*, ante la aparición de una infección [34, 47, 88, 193] y

específicamente en las infecciones virales [166, 167, 194-198]. De igual forma Wei y cols refieren, en un trabajo realizado con infecciones con SVCV en carpa, la activación del *tlr2* y *tlr3* con un comportamiento similar al nuestro [199].



**Figura 1.16: Perfiles de incremento relativo de algunos genes de interleuquinas, teniendo en cuenta los conjuntos de genes descritos anteriormente.** Los resultados obtenidos fueron evaluados tomando en cuenta los valores de activación de cada gen en comparación al control. Se consideraron valores significativos los incrementos mayores de 1,5 veces con  $p < 0,05$ .

Tras un análisis de los incrementos obtenidos de las citoquinas, estos nos indicaban claramente que había una activación de los genes de citoquinas inflamatorias (*il-1b*, *il6* y *tnf- $\alpha$* ) y también de las pro-inflamatorias (como *il-2* e *il-12*) (Figura 1.16) en todos los grupos evaluados infectados con SVCV. La mayoría de estas citoquinas son promotoras de la activación de la expresión del interferón, con lo cual es lógico obtener incrementos en los niveles de interferones, como se describe más adelante. Igualmente otra de las funciones que se les ha atribuido a las citoquinas *il-1b* e *il-6*, es activar el inicio de la diferenciación de linfocitos Th17 en mamíferos, proceso en el cual también se ha planteado que están vinculadas las *il-17* e *il-23* [200-202]. En el caso de la *il-12* debemos resaltar que además de ser la que más se induce, Reyes-Cerpa y cols., observaron en truchas una inducción de esta interleuquina tras infecciones con IPNV [203].



**Figura 1.17: Perfiles de incremento relativo de algunos genes de *crp*, teniendo en cuenta los conjuntos de genes descritos anteriormente.** Los resultados obtenidos fueron evaluados tomando en cuenta los valores de activación de cada gen en comparación al control. Se consideraron valores significativos los incrementos mayores de 1,5 veces con  $p < 0,05$ .

En el caso de las *il-1b* e *il-6* (Figura 1.16), también son responsables de causar elevación de las proteínas de fase aguda de infección, como las *crp*, ante un proceso inflamatorio; lo que concuerda con los niveles de activación tan elevados observados para las *crp* en el grupo SVCV-5d (Figura 1.17) [165]. En el caso de las *crp*, algunos autores refieren su vinculación con el sistema inmune innato, dada su pronta aparición en procesos infecciosos [191]. Resultados similares a los descritos en este trabajo han sido obtenidos en estudios previos en infecciones de pez cebras con otro rhabdovirus (VHSV)[27]. Otro aspecto a tener en cuenta es que las *crp* son consideradas moléculas versátiles en la respuesta inmune innata, ya que podría activar el complemento y fortalecer la fagocitosis [204, 205]. Su rápido aumento tras lesiones de tejidos o infecciones, podría estar dado por un aumento de la diferenciación y migración de macrófagos disponibles, así como de células fagocíticas y su relación con el establecimiento de una respuesta inmune frente a patógenos [206, 207].

Los IFN de tipo I tienen diversas funciones inmunes, incluyendo la activación de defensas antivirales y efectos antiproliferativos. Están distribuidos ampliamente en teleosteos, y en células de peces se induce después de infección viral o tras la activación de los patrones moleculares asociados a patógenos virales, imitando hasta cierto punto el patrón de expresión de los IFN en mamíferos [165].

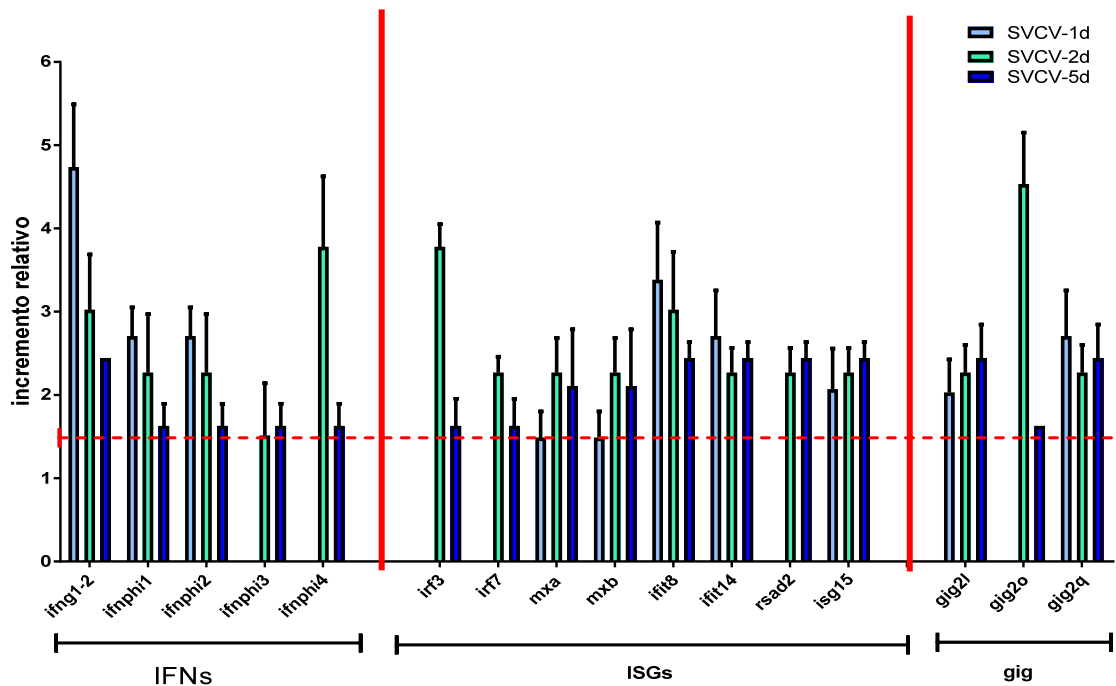


Figura 1.18: Perfiles de incremento relativo de algunos genes de interferón e inducidos por él. Los resultados obtenidos fueron evaluados tomando en cuenta los valores de activación de cada gen en comparación al control. Se consideraron valores significativos los incrementos mayores de 1,5 veces con  $p < 0,05$ .

Como observamos en la Figura 1.18, en todos los grupos los niveles de activación para genes de *ifn* están incrementados considerablemente. Algo similar mostraron Aggad y cols., quienes observaron que tras una infección con SVCV en células EPC aumentaba significativamente los transcritos para los genes *ifnphi1* e *ifnphi2*, pero curiosamente no de *ifnphi3* [208]. En general, podemos plantear que la activación de genes de *ifn* ocurre en el inicio de la infección, pero pronto empieza a disminuir. La Figura 1.18 muestra la activación de los genes *ifng1-2* e *ifnphi4* que son los que presentan mayor aumento. Los efectos estimulantes del IFN sobre monocitos y macrófagos de peces se han descrito en varias ocasiones. En algunos trabajos se ha planteado que el IFN es capaz de aumentar la producción de óxido nítrico y de especies reactivas del oxígeno, además de promover la actividad de células fagocíticas en varias especies [190, 209-211]. En carpa se ha planteado la capacidad del IFN de reclutar macrófagos y neutrófilos para mejorar su actividad antimicrobiana [210]. También se ha descrito que la activación del receptor TLR3 por la presencia de virus es capaz de promover la activación de los factores de transcripción IRF3 e IRF7, a través de TRAF3, que aumentan los niveles de INFs [212-214]. Por otro lado, se ha demostrado que los INFs son capaces de regular la respuesta de un panel de genes estimulados por interferón (ISGs), resultando

esenciales para la protección frente a virus [208, 215-220]. Los ISGs más comunes que responden a interferón son: *mx*, *isg15*, *viperina (rsad2)* y los genes inducidos por reovirus de carpa (*gig*) [165] y todos ellos se muestran activados en nuestros resultados (Figura 1.18).

En estudios realizados en diferentes especies de teleósteos se ha mostrado que la infección viral por rhabdovirus es capaz de inducir la aparición de transcritos para los genes *mx* [216, 220-222]. Para el gen *isg15*, nuestros datos muestran un modesto incremento de la activación en el periodo analizado, lo que concuerda con trabajos previos que muestran un incremento de los transcritos de *isg15* tras la activación de la respuesta de interferón en infecciones con virus de ARN [223, 224].

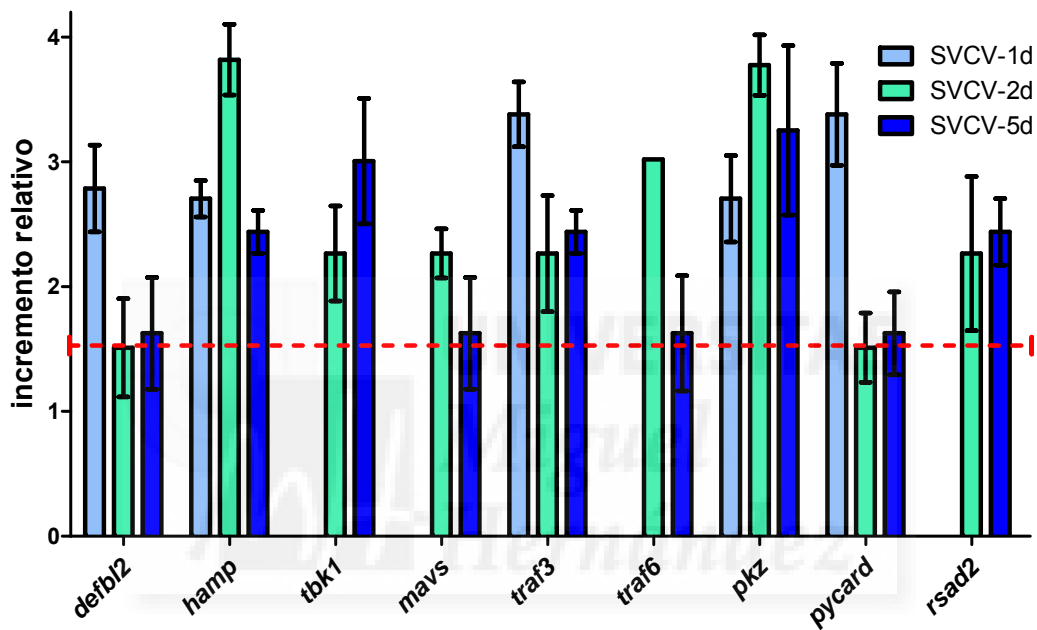
El gen *rsad2* es expresado por células endoteliales y macrófagos en respuesta a infección viral [225] y nosotros observamos un aumento de su activación a partir del segundo día tras la infección (Figura 1.18). Krasnov y cols., en salmón, observaron un aumento de transcritos *rsad2* tras la infección IPNV [226]. También las infecciones con otros rhabdovirus, SVCV [208] e IPNV [227], en otras especies de teleósteos evidenciaban el aumento de la expresión de transcritos de *rsad2*.

En el caso de los genes *gig*, descritos recientemente, que son inducidos por IFN [198, 228-230], nuestros resultados muestran una clara activación en todos los tiempos postinfección analizados (Figura 1.18). Algunos estudios plantean que tras una infección viral y la consiguiente detección de un aumento IFN, los genes *gig2* se activan conjuntamente con *mx* [213], inclusive hay investigadores que han llegado a afirmar que *gig2* pueden ser igualmente reguladas por *irf3* [231].

Finalmente, se analizaron genes relacionados con la inducción de una respuesta antiviral directa (Figura 1.19). Acorde a lo que cabría esperar, observamos una activación de los genes que expresan péptidos antimicrobianos, como la beta-defensina 2 (*defbl2*) o la hepcidina (*hamp*). Algunos autores han mostrado la activación de la hepcidina en respuesta a altos niveles de *il-6* [232, 233], con lo cual, si recordamos los resultados anteriores, esta era una de las citoquinas activadas que encontramos en todos los tiempos post infección. Otros trabajos plantean la activación de *hamp* en presencia de diversos patrones de reconocimiento de patógenos [234-236], lo que sugiere que *hamp* podría estar actuando como

mediador en una respuesta inflamatoria, limitando el crecimiento de patógenos y actuando como antimicrobiano sobre los mismos [59].

Para los genes *mavs* y *tbk1* observamos activación a partir del segundo día tras la infección (Figura 1.19). Se ha descrito que tras la presencia de ARN viral, el receptor RIG1 forma un complejo con proteínas MAVS en la membrana de las mitocondrias, que más tarde recluta a la quinasa TBK1 y esta es capaz de fosforilar a *irf3*, para promover la activación del *ifn* [185].



**Figura 1.19: Perfiles de expresión diferencial de cada uno de los genes vinculados a la respuesta a virus.** Los resultados obtenidos fueron evaluados tomando en cuenta los valores de activación de cada gen en comparación al control. Se consideraron valores significativos los incrementos mayores de 1,5 veces con  $p < 0,05$ .

En el caso de los genes *traf3* y *traf6* (*TNF Receptor associated factor*), ambos se encuentran activados en los 3 tiempos evaluados (Figura 1.19). Estas dos moléculas son mediadores de la señalización de la familia del gen *tnf* y se ha demostrado que están vinculados a la señalización de las quinasas MAP3K. Recordemos que los genes de *mapk* estaban activados en todos los grupos evaluados. Varios autores han coincidido en señalar la importancia de estas moléculas: en el caso de *traf3* algunos plantean que su acción puede estar vinculada a la activación *irf3* y, por tanto, activando una respuesta antiviral mediante la vía de señalización del interferón [237]. Por su parte, en el caso del *traf6*, muchos plantean que estaría vinculado a la

activación de las *map3k* y la activación de *nf-kβ* promoviendo la activación de la transcripción de genes vinculados a la inmunidad [183].

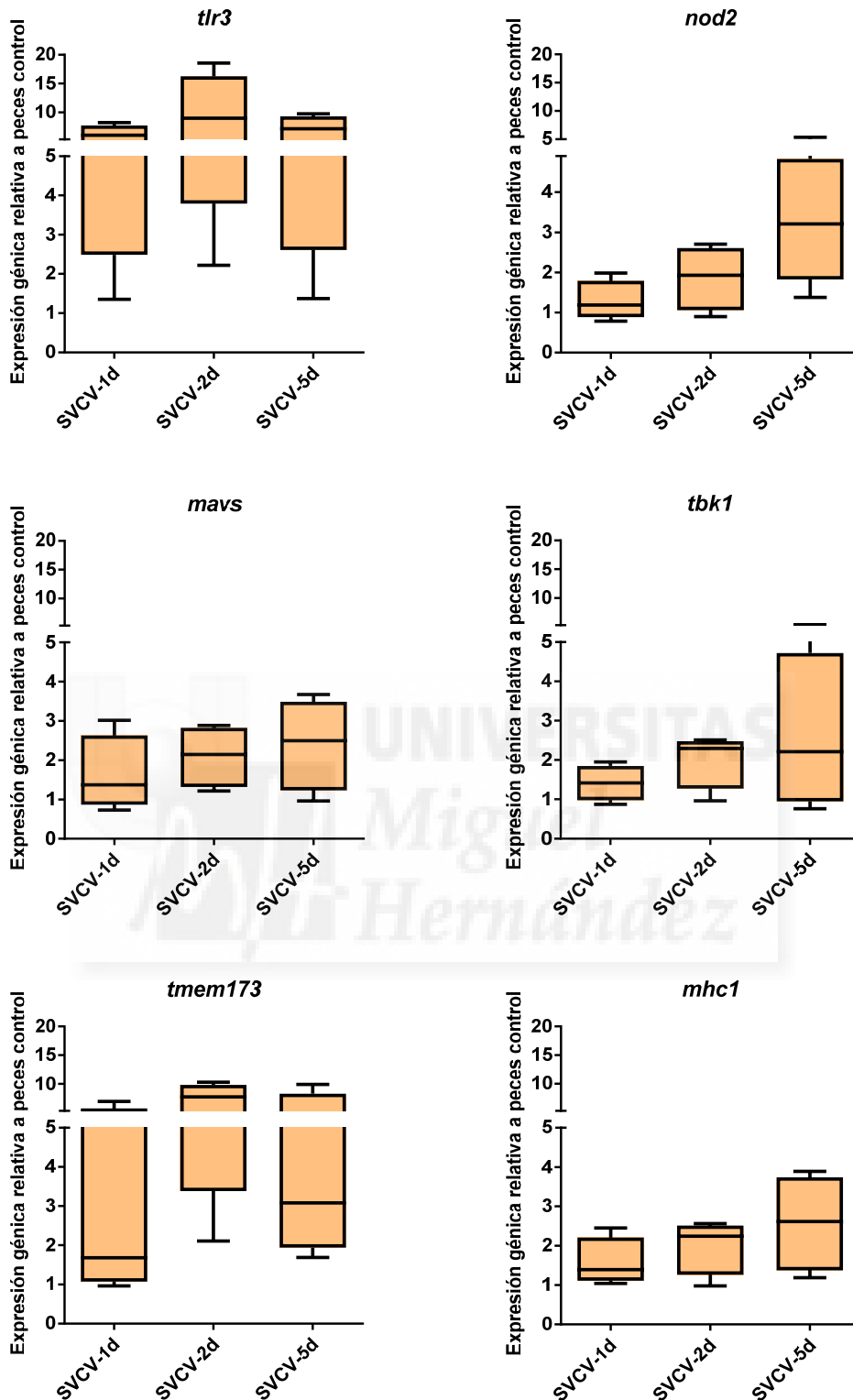
### **Validación por qPCR de la expresión de genes vinculados a la respuesta inmune innata y a la respuesta frente virus.**

Un estado de metilación de la cromatina que provoque una activación persistente de algunos promotores debe corresponderse con una mayor transcripción de los correspondientes genes. Por ello, seguidamente realizamos una validación por qPCR de la expresión de algunos genes vinculados a la respuesta inmune innata y a la respuesta frente virus. Se realizó en ensayo de infección de pez cebra con SVCV en las mismas condiciones que el experimento de CHIP-Seq. En él, se utilizaron muestras de ADNc, obtenidas a partir de ARN extraído de peces control y de peces infectados, a los mismos tiempos evaluados anteriormente 1, 2 y 5 días.

La inducción de la respuesta inmune innata antiviral depende del reconocimiento de los componentes virales por el huésped. Las células del sistema inmune detectan virus a través de receptores de reconocimiento de patrones localizados dentro de la célula o en su membrana plasmática. En los vertebrados existen varios tipos entre éstos los receptores *tlr*. En nuestro caso evaluamos el *tlr3* y observamos un aumento de la expresión de transcritos a partir del segundo día tras la infección (Figura 1.20), acorde a como sugerían nuestros resultados de inmunoprecipitación de cromatinas. En varios trabajos se han observado resultados similares a los nuestros con incrementos de la transcripción de genes *tlr* y su posible relación con el aumento de la producción de INF [47, 196, 238-241].

Los transcritos *mavs* y de *tbk-1* presentaron incrementos en los diferentes tiempos evaluados (Figura 1.20) y se ha descrito que están vinculados a la detección de virus de ARN en el interior de la célula y son encargados posteriormente de activar la respuesta del IFN a través del gen *irf-3* [197, 225, 242] y además, se ha planteado que estaría vinculado a la activación del gen *rsad2* [225].

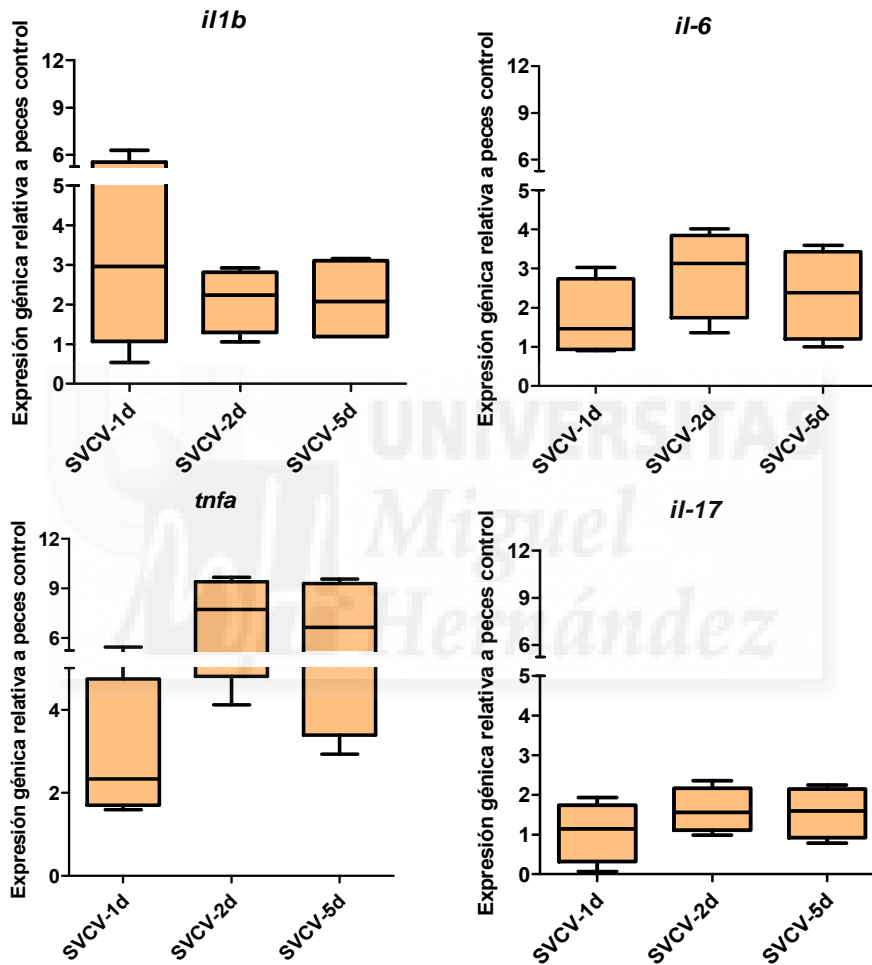




**Figura 1.20:** Cambios en los perfiles de expresión de varios genes en peces cebra infectados con SVCV. Los transcritos se evaluaron por qPCR y se expresaron como número de veces de incremento respecto al control. Se promedia los valores obtenidos de 3 peces para los tres tiempos post infección analizados.

Respecto al gen *tmem173* (*sting*) se observó un aumento de sus transcritos para todos los tiempos evaluados (Figura 1.20). Estos resultados se hallan en la misma

línea que los mostrados por otros autores que evalúan los efectos de la infección por virus tanto con genoma de ADN como de ARN, donde *sting* promueve una respuesta antiviral a través de su acción sobre *irf3* [243-247]. En el caso del gen del complejo de histocompatibilidad tipo I (*mhc1*), también se ve incrementado con respecto al control a lo largo del periodo estudiado, de modo similar a lo publicado en otros trabajos [26, 248].

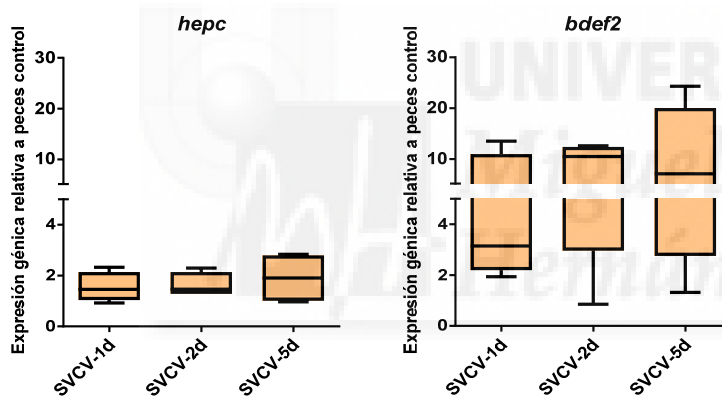


**Figura 1.21: Cambios en los perfiles de expresión de genes de citoquinas en peces cebra infectados con SVCV.** Los transcritos se evaluaron por qPCR y se expresaron como número de veces de incremento respecto al control. Se promedia los valores obtenidos de 3 peces para los tres tiempos post infección analizados.

Es sabido que los receptores TLR desencadenan un conjunto de respuestas a través de varias vías que conducen a la expresión de citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular e inmuno-receptores. Nuestros datos muestran un aumento de los transcritos de citoquinas inflamatorias, contribuyendo así a orquestar una respuesta antiviral (Figura 1.21). Se ha mostrado que un aumento de la migración de leucocitos, en respuesta al incremento de *il-1b*, podría estar asociado con la

rápida liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y con la regulación de los niveles de transcripción de los receptores de varias citoquinas [249, 250]. El gen *tnf- $\alpha$*  es uno de los primeros en ser expresados tras la infección vírica, jugando un papel clave en la inflamación. Muestra funciones similares a *il-1b* y ambos son capaces de activar la respuesta de macrófagos y fagocitos, que aumentan la secreción de interferón [251-253].

El análisis de los transcritos de los genes para la hepcidina (*hepc*) y betadefensina 2 (*bdef2*) mostró un aumento respecto al control, especialmente para *bdef2* (Figura 1.22). Se han publicado trabajos que muestran resultados similares no sólo tras la infección vírica de los peces [254-256] sino también siendo tratados con poli(I:C) [257]. También se ha visto que la activación por *il-6*, ante infecciones víricas, aumenta la expresión del péptido antimicrobiano hepcidina [258-262].



**Figura 1.22: Cambios en los perfiles de expresión de genes de péptidos antimicrobianos en peces cebra infectados con SVCV.** Los transcritos se evaluaron por qPCR y se expresaron como número de veces de incremento respecto al control. Se promedia los valores obtenidos de 3 peces para los tres tiempos post infección analizados.

Para finalizar este análisis, también seguimos la aparición de transcritos de los genes *gig2l*, *mx-ab*, *irf-3*, *irf-7*, *rsad2* y *ifn-phi1* en respuesta a la infección con SVCV en peces cebra (Figura 1.23). La transcripción de estos genes se ve incrementada en respuesta a INF ante infecciones víricas [28, 29, 213, 228]. Todos estos datos corroboran los resultados obtenidos en los análisis CHIP-Seq mostrados con anterioridad.

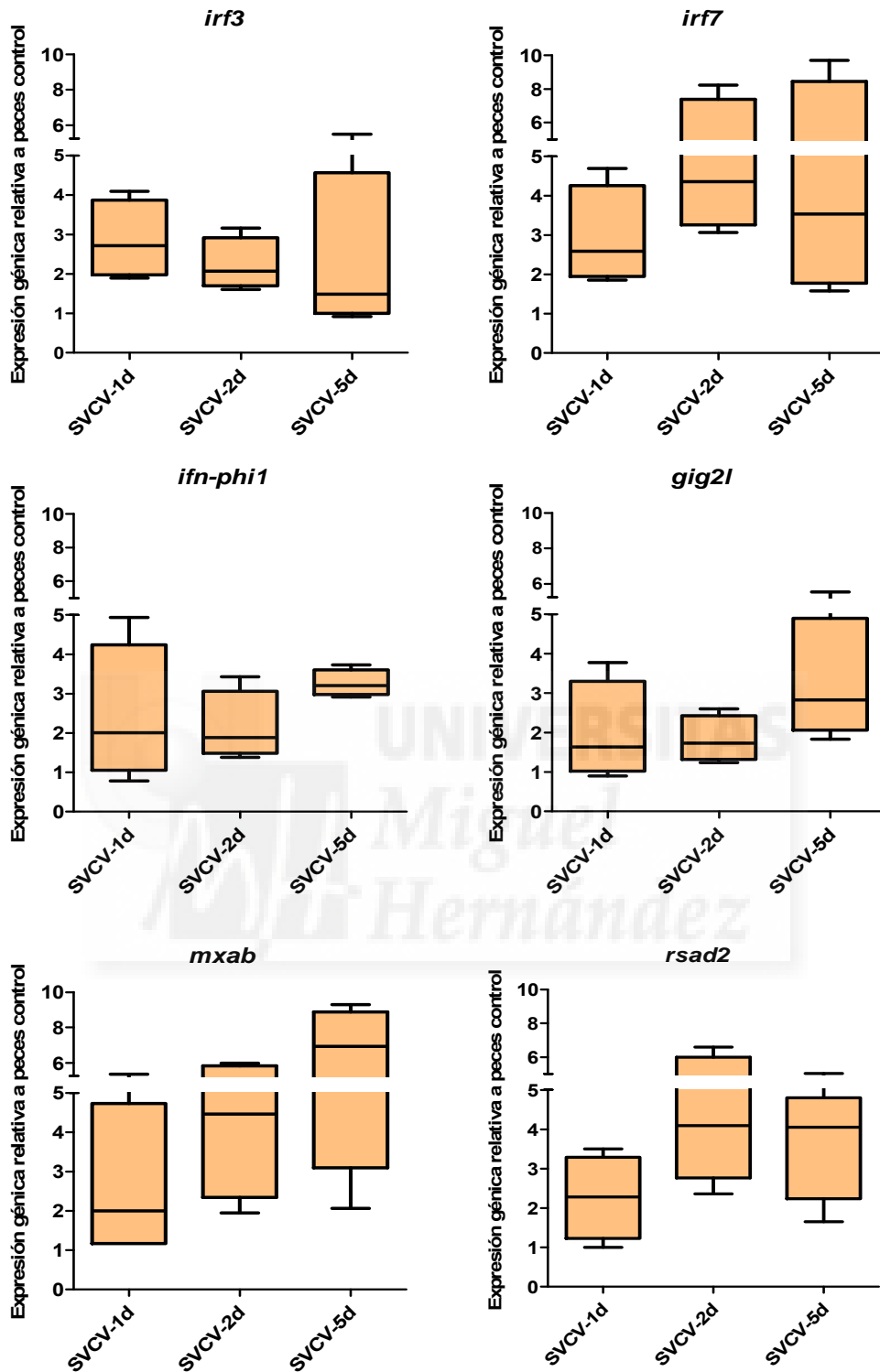
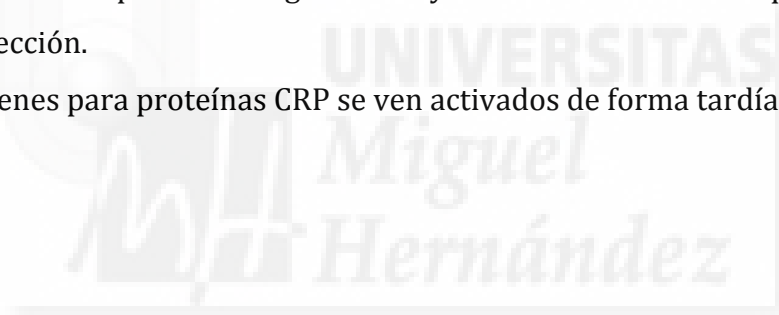


Figura 1.23: Cambios en los perfiles de expresión de genes inducidos por interferón en peces cebra infectados con SVCV. Los transcritos se evaluaron por qPCR y se expresaron como número de veces de incremento respecto al control. Se promedia los valores obtenidos de 3 peces para los tres tiempos post infección analizados.

## **CONCLUSIONES.**

1. La respuesta antiviral del organismo ante la infección supone una activación continuada de genes asociados al sistema inmune innato.
2. Tras la infección, la primera línea de respuesta genómica por el organismo viene representada por la activación de grupos de genes relacionados con la degradación proteica por el proteosoma, con TNF- $\alpha$  y con diversos factores de transcripción; estos últimos responsables de la activación de rutas de genes que veremos aumentados conforme avanza la infección.
3. La activación de genes relacionados con interferón es temprana pero pronto desaparece, como cabría esperar ante su conocido bloqueo por parte de ciertas proteínas víricas.
4. Los genes relacionados con receptores TLR y con apoptosis se activan y transcriben a partir del segundo día y se mantienen hasta el quinto día tras la infección.
5. Los genes para proteínas CRP se ven activados de forma tardía.





**Capítulo II: ANÁLISIS DEL PERFIL  
PROTEÓMICO DE MUESTRAS DE PLASMA DE  
PECES CEBRA INFECTADOS CON SVCV.**







## **INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO.**

Una vez comprobado que existía reprogramación epigenética y cambios en los niveles de transcripción de ciertos genes en peces cebra, tras la infección con SVCV, decidimos comprobar si, además, se veían afectados los niveles de las proteínas, por ellos codificadas, circulantes en plasma. El empleo de técnicas proteómicas permiten el estudio a gran escala de las proteínas presentes en el organismo y cómo estas varían ante diversas circunstancias [263]. El uso generalizado de técnicas proteómicas durante las últimas décadas ha generado gran cantidad de información sobre los perfiles proteicos de los tejidos evaluados [264-269].

La sangre periférica es el medio más comúnmente usado para indicar el estado fisiológico de un organismo. Cambios en diferentes índices hematológicos son indicativos de las condiciones de salud o de los ciclos reproductivos y estos, a su vez, dependen en gran medida de las condiciones ambientales [270]. Estos índices pueden usarse para monitorizar las respuestas de los peces a diversos factores estresantes [271]. Además, debemos tener en cuenta que en plasma hay un conjunto de biomarcadores para diversas enfermedades, ya que contiene no sólo proteínas de la sangre sino también secretadas por todos los tejidos [272].

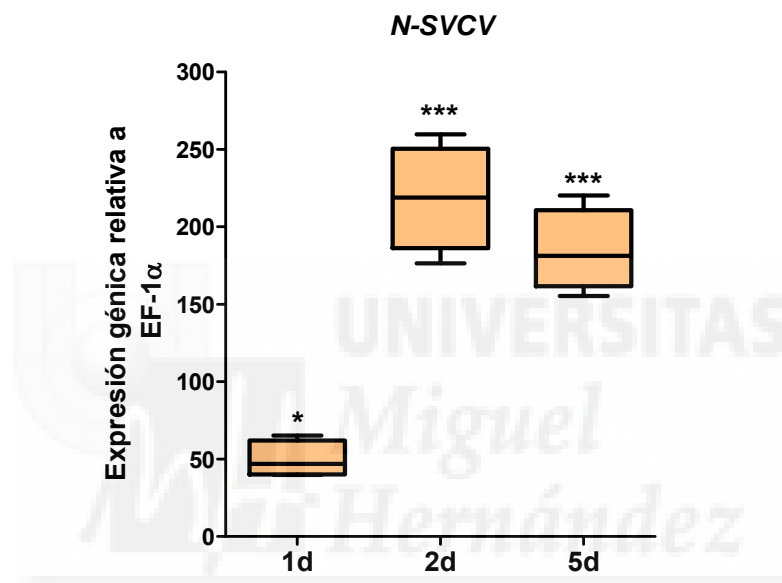
En este capítulo el estudio está dirigido al análisis proteómico de muestras de plasma, obtenidas a diferentes tiempos tras la infección, de peces cebra con SVCV.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Análisis de la carga viral en peces cebra infectados con SVCV.

El análisis de la carga viral de los peces infectados se siguió analizando los niveles de transcritos del gen para la proteína N del virus. Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo de los transcritos de este gen respecto al control, ya desde el primer día tras la infección, pero especialmente dramática a partir del segundo (Figura 2.1).



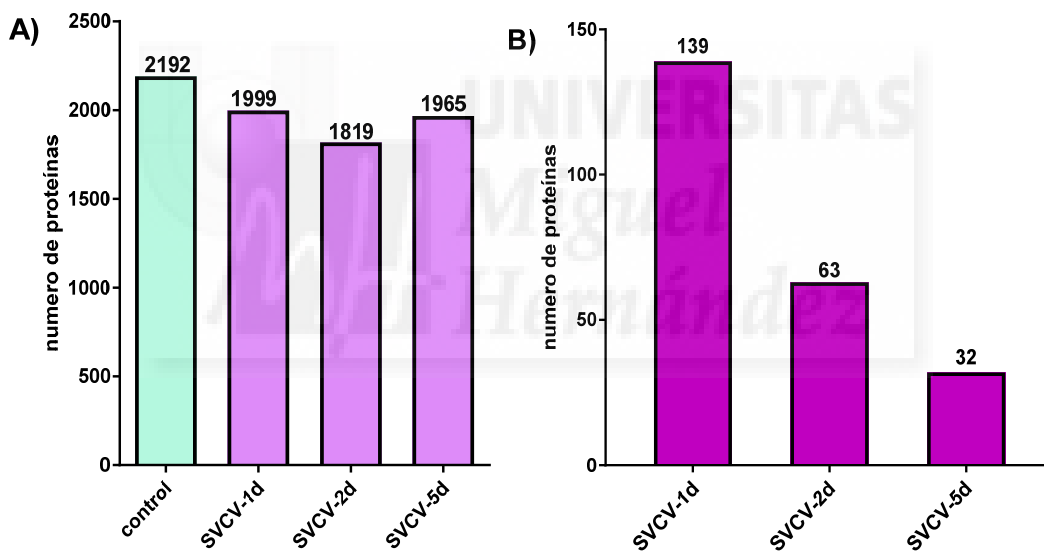
**Figura 2.1: Expresión relativa del gen de la proteína N-SVCV en peces infectados por baño de inmersión con este virus.** Se extrajeron muestras de un *pool* de órganos internos de 4 peces por cada grupo estudiado. Se dan valores medios y desviación estándar. Un \* representa una diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ) y \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

### Perfil proteómico de muestras de plasma de peces infectados con SVCV.

Llevamos a cabo un análisis proteómico para la determinación del patrón de proteínas presentes en el plasma de los peces infectados y compararlo con el de los peces control sin infectar. Se tomaron muestras de sangre a los siguientes tiempos: 1, 2 y 5 días post infección. Paralelamente procedimos a tomar muestras de órganos internos para determinar la expresión génica, tal y como se indica en el apartado correspondiente de la sección de materiales y métodos.

Recientemente se ha empezado a utilizar el parámetro *emPAI* para determinar la abundancia relativa de una proteína corregida por el número de aminoácidos de la proteína [139, 273]. Este índice nos permite describir la composición proteica en una muestra dado con valores normalizados respecto al total.

Analizamos un total de 3062 proteínas diferentes y para cada una de ellas se determinó la abundancia relativa en la muestra (*emPAI*). En la Figura 2.2A se muestra el número de proteínas identificadas en cada uno de los grupos. En el panel B de esta figura se muestra, del total de proteínas identificadas en cada grupo, aquellas cuya abundancia se ve aumentada respecto al control en al menos 1,5 veces. Curiosamente, este número disminuye a medida que transcurren los días tras la infección (Figura 2.2B).



**Figura 2.2: Número de proteínas detectadas en cada grupo de muestras.** A) total de proteínas identificadas en cada muestra. B) proteínas detectadas con incrementos superiores a 1,5 veces respecto al control en cada tiempo evaluado.

Del total de proteínas en suero control, el 98% se corresponde con las 150 más abundantes, las restantes 2042 se encontraban en concentraciones traza. Entre las más abundantes destacaban hemoglobina, apolipoproteínas, serotransferrinas, actinas, componentes del sistema del complemento, así como algunas serpinas. Estas proteínas identificadas son características en plasma de peces sanos [137, 270]. En la Tabla 2.1 se muestran las 20 proteínas más abundantes en el grupo control.

**Tabla 2.1: Listado de las proteínas más abundantes detectadas en plasma de pez cebra control.** Se indica el valor promedio del % y la desviación estándar del valor *emPAI* respecto al total de proteína de la muestra (n= 3 peces).

UNIPROT	Nombre del gen	Descripción	<i>emPAI</i> , %
Q803Z5	<i>hbaa1</i>	Proteína Hbaa1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=hbaa1 PE=2 SV=1	20,951±8,944
B3DG37	<i>ba1</i>	Proteína Ba1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=ba1 PE=1 SV=1	20,698±18,108
Q1JQ69	<i>hbaa1</i>	Hbaa1 protein OS= <i>Danio rerio</i> GN=hbaa1 PE=1 SV=1	18,152±9,388
Q6ZM17	<i>si:ch211-5k11.8</i>	Novel protein similar to zebrafish hemoglobin alpha-adult 1 (Hbaa1) OS= <i>Danio rerio</i> GN=si:ch211-5k11.8 PE=1 SV=1	12,932±7,539
Q1RM32	<i>ba1</i>	Ba1 globina OS= <i>Danio rerio</i> GN=ba1 PE=2 SV=1	7,781±9,731
Q7SZV9	<i>hbaa1</i>	nueva alpha-globina OS= <i>Danio rerio</i> GN=hbaa1 PE=3 SV=1	7,347±8,852
Q90485	<i>ba2</i>	Hemoglobina subunidad beta-2 OS= <i>Danio rerio</i> GN=ba2 PE=1 SV=3	6,179±8,280
Q6XG62	<i>icn</i>	Protein S100 OS= <i>Danio rerio</i> GN=icn PE=1 SV=1	0,344±0,128
A0A0R4IKF0	<i>apoa1b</i>	Apolipoproteína A-Ib OS= <i>Danio rerio</i> GN=apoa1b PE=1 SV=1	0,245±0,205
A3FKT8	<i>icn2</i>	Proteína S100 OS= <i>Danio rerio</i> GN=icn2 PE=1 SV=1	0,213±0,160
Q6DGG4	<i>zgc:92880</i>	Zgc:92880 OS= <i>Danio rerio</i> GN=zgc:92880 PE=2 SV=1	0,127±0,047
Q5BJC7	<i>si:ch211-5k11.6</i>	Si:xx-by187g17.5 OS= <i>Danio rerio</i> GN=si:ch211-5k11.6 PE=2 SV=1	0,125±0,001
B3DFP9	<i>apoa2</i>	Apolipoproteína A-II OS= <i>Danio rerio</i> GN=apoa2 PE=1 SV=1	0,123±0,093
Q7ZVF9	<i>actbb</i>	Actina, citoplasmica 2 OS= <i>Danio rerio</i> GN=actbb PE=2 SV=2	0,121±0,032
Q7ZV17	<i>actba</i>	Actina, citoplasmica 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=actba PE=2 SV=2	0,120±0,032
Q7SXL4	<i>nme2b.2</i>	Difosfato nucleoside quinasa OS= <i>Danio rerio</i> GN=nme2b.2 PE=1 SV=1	0,116±0,062
Q9DDU5	<i>gstp1</i>	Glutation S-transferasa pi OS= <i>Danio rerio</i> GN=gstp1 PE=1 SV=1	0,114±0,055
B2GS08	<i>actb1</i>	Proteína Beta-actina1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=actb1 PE=2 SV=1	0,110±0,009
Q6ZM13	<i>si:ch211-5k11.6</i>	Nueva alpha globina OS= <i>Danio rerio</i> GN=si:ch211-5k11.6 PE=1 SV=1	0,094±0,039
X1WGM1	<i>si:dkey-108k21.12</i>	Histona H4 (Fragmento) OS= <i>Danio rerio</i> GN=si:dkey-108k21.12 PE=1 SV=1	0,092±0,011

En el plasma extraído de los peces infectados después un día encontramos 139 proteínas con un incremento en su concentración superior a 1,5 veces respecto al control; 63 a los dos días y 32 a los 5 (Figura 2.2B). Utilizando la aplicación web GESTALT obtuvimos una distribución de estas proteínas en distintas categorías de procesos biológicos (Figura 2.3). Algunas de ellas se incluyen en más de una categoría.

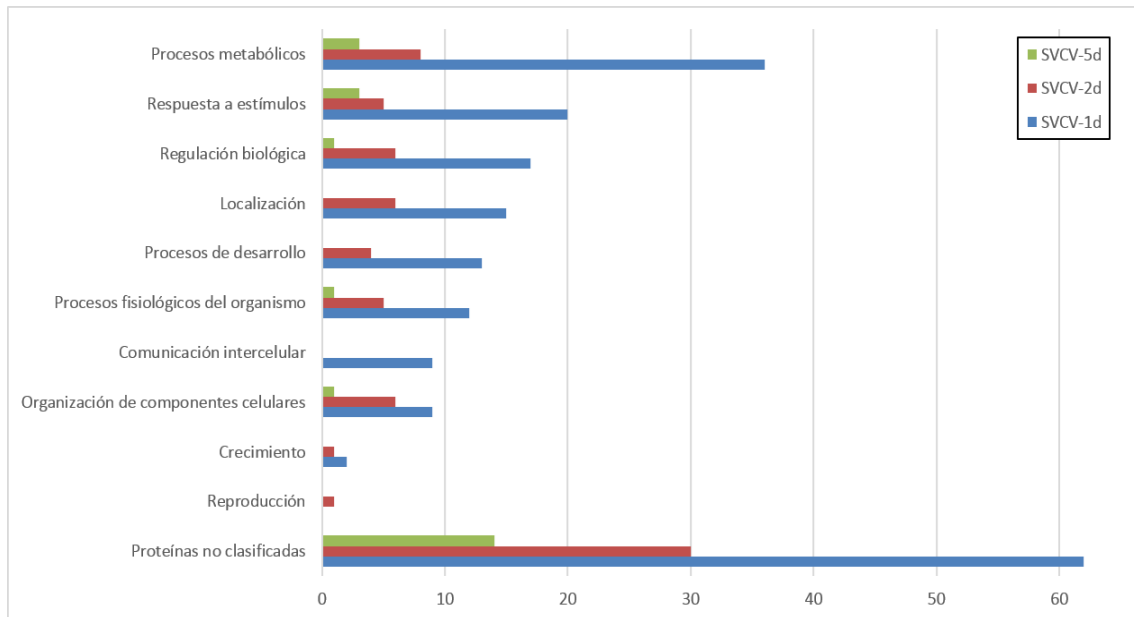


Figura 2.3: Resultado comparativo del análisis proteómico del plasma de peces cebra extraído a diferentes tiempos tras la infección con SVCV.

Entre las proteínas más abundantes en plasma de peces infectados destacaba la presencia de varias vitelogeninas, que en la literatura se han relacionado con la inmunidad que transfiere la madre al huevo. En machos sometidos a cambios ambientales o químicos también se ha observado aumentos de la presencia de vitelogeninas en plasma [270, 274]. Otra proteína que destaca es GIG-2I (codificada por el gen inducido por reovirus de carpa, isoforma tipo I). Este es un resultado interesante si tenemos en cuenta que el gen *gig2* está vinculado con la respuesta a interferón y participa en la respuesta antiviral del hospedador [226, 228, 229, 275]. Normalmente esta proteína sólo se ha detectado en órganos [276], por lo que podríamos pensar que su detección en sangre (descrita aquí por primera vez) es producto de su secreción al suero sanguíneo de los peces infectados.

Tabla 2.2: Listado de las primeras proteínas con mayor incremento en las muestras SVCV-1d. Se indica las veces de incremento respecto al control determinadas sobre el % de *emPAI* (n=3 peces).

UNIPROT	Nombre del gen	Descripción	Incremento de <i>emPAI</i> , %
Q3T7B3	vtg2	Vitelogenina 2 (Fragment) OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg2 PE=2 SV=1	9,7
O42364	apoeb	Apolipoproteína Eb OS= <i>Danio rerio</i> GN=apoeb PE=2 SV=1	7,7
A0A0R4IBP7	rpl8	Proteína ribosomal 60S L8 OS= <i>Danio rerio</i> GN=rpl8 PE=1 SV=1	7,4
A8WGJ1	vtg2	Vitelogenina 2 protein OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg2 PE=2 SV=1	7,1
Q1LWN2	vtg1	Vitelogenina 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg1 PE=1 SV=1	7
F1QC84	f13a1a.1	Factor de Coagulación XIII, A1 polipéptido, tandem duplicate 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=f13a1a.1 PE=4 SV=1	7
F1QGK0	gpd1b	Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa [NAD(+)] OS= <i>Danio rerio</i> GN=gpd1b	6,3
Q1MTC4	vtg2	Vitelogenina 2 OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg2 PE=1 SV=1	6,6
Q90YN8	vtg1	Vitelogenina 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg1 PE=2 SV=1	6

F1R2S5	vtg5	Vitelogenina 5 (Fragment) OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg5 PE=1 SV=1	5,9
F1QF30	tceb2	Factor de transcripción de elongación B (SIII) OS= <i>Danio rerio</i> GN=tceb2 PE=1 SV=1	5,8
F1QV15	vtg6	Vitelogenina 6 (Fragment) OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg6 PE=1 SV=1	5,7
E9QFD8	vtg4	Vitelogenina 4 OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg4 PE=1 SV=2	5,7
F1RBA0	vtg4	Vitelogenina 4 OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg4 PE=1 SV=2	5,1
Q0P421	vtg3	Vitelogenina 3 protein (Fragment) OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg3 PE=2 SV=1	5,1
F1Q7L0	vtg4	Vitelogenina 4(Fragment) OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg4 PE=1 SV=1	5
Q1LY08	cpox	Coproporfirinogeno oxidasa OS= <i>Danio rerio</i> GN=cpox PE=1 SV=2	5
A0A0R4IY49	vtg7	Vitelogenina 7 OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg7 PE=1 SV=1	4,9
A1XF92	crtac1a	Proteína ácida del cartílago 2 OS= <i>Danio rerio</i> GN=crtac1a PE=2 SV=1	4,9
A0A0R4IUA0	vtg7	Vitelogenina 7 OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg7 PE=1 SV=1	4,7
F1R2T3	vtg7	Vitelogenina 7 OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg7 PE=1 SV=1	4,7
Q503D8	txndc12	Proteína similar a la tioredoxina OS= <i>Danio rerio</i> GN=txndc12 PE=1 SV=1	4,6
Q5BJA1	zgc:114188	Zgc:114188 OS= <i>Danio rerio</i> GN=zgc:114188 PE=1 SV=1	4,6
Q9DFT9	vtg3	Vitelogenina 3 (Fragment) OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg3 PE=2 SV=1	4,6
Q1L8Q7	rpl30	Proteína ribosomal L30 OS= <i>Danio rerio</i> GN=rpl30 PE=1 SV=1	4,4
F1R1U1	flna	Filamina A, alpha (actin-binding protein 280) (Fragment) OS= <i>Danio rerio</i> GN=flna	4,3
F1QPC0	vtg3	Vitelogenina 3, sin fosvitin (Fragment) OS= <i>Danio rerio</i> GN=vtg3 PE=1 SV=2	4,2
B8JLZ3	anxa1b	Annexina OS= <i>Danio rerio</i> GN=anxa1b PE=1 SV=1	4,2
E7FFW9	gig2l	Gig2-like protein DreL OS= <i>Danio rerio</i> GN=gig2l PE=2 SV=1	4,1
F1Q9Y2	lgals1l1	Galectina OS= <i>Danio rerio</i> GN=lgals1l1 PE=4 SV=2	4,1
P62084	rps7	Proteína ribosomal 40S S7 OS= <i>Danio rerio</i> GN=rps7 PE=2 SV=1	3,8
Q7ZWJ4	rpl18a	Proteína ribosomal 60S L18a OS= <i>Danio rerio</i> GN=rpl18a PE=2 SV=1	3,8
Q804G6	anxa5b	Annexina OS= <i>Danio rerio</i> GN=anxa5b PE=2 SV=1	3,6
F1QVK5	ostf1	Factor estimulante de los osteoclastos 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=ostf1 PE=4 SV=2	3,6
Q7ZW95	rpl4	Proteína ribosomal L4 OS= <i>Danio rerio</i> GN=rpl4 PE=1 SV=1	3,6
F1QS51	eea1	Antígeno endosómico temprano 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=eea1 PE=1 SV=1	3,4
Q8JHI0	slc25a5	Familia transportadora de solutos 25 alpha, member 5 OS= <i>Danio rerio</i> GN=slc25a5 PE=1 SV=1	3,4
U6BMH5	mhc1zla	Variante del complejo de histocompatibilidad MHCI 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=mhc1zla	3,4
A0A0B5JQA2	c1qc	Fragmento C1q1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=c1qc PE=2 SV=1	3,3
Q6NWD9	twf1a	Twinfilina, proteína de unión a actina, homolog 1a OS= <i>Danio rerio</i> GN=twf1a	3,3
Q6DGX1	suclg1	ligasa Succinato-CoA, GDP-forming, OS= <i>Danio rerio</i> GN=suclg1 PE=2 SV=1	3,2
Q7T3L3	hsp90b1	Proteína chaperona GP96 OS= <i>Danio rerio</i> GN=hsp90b1 PE=1 SV=1	3,2
B3DFS9	myh11a	Miosina, polipeptido pesado 11, OS= <i>Danio rerio</i> GN=myh11a PE=1 SV=1	3,1
A2RV19	zgc:158619	Proteína Zgc:158619 OS= <i>Danio rerio</i> GN=zgc:158619 PE=2 SV=1	3,1

Otra proteína que se incrementa de forma considerable (7 veces) es el factor de coagulación XIII (f13a1a.1), un factor anticoagulante. Resultados similares fueron obtenidos por Choi y cols [277] infectando doradas con diferentes patógenos.

También detectamos un incremento notable de una variante del complejo de histocompatibilidad tipo 1 (MHC1). Estas moléculas son las encargadas de exponer

a la superficie de las células infectadas los fragmentos peptídicos generados por los proteosomas a partir de proteínas víricas ubiquitinadas y de esta manera se desarrolla la presentación antigénica, indicando la presencia de infección para que células del sistema inmune eliminen estas células. La presencia de estas proteínas en plasma podría explicarse por la ruptura de células infectadas por el virus.

Igualmente, otras proteínas que aumentan su presencia son las vinculadas a procesos proteolíticos como calpains (CAPN2A), catepsinas (CTSK) y las proteínas de apoptosis (ANXA1B, ANXA5B, CASP6L1).

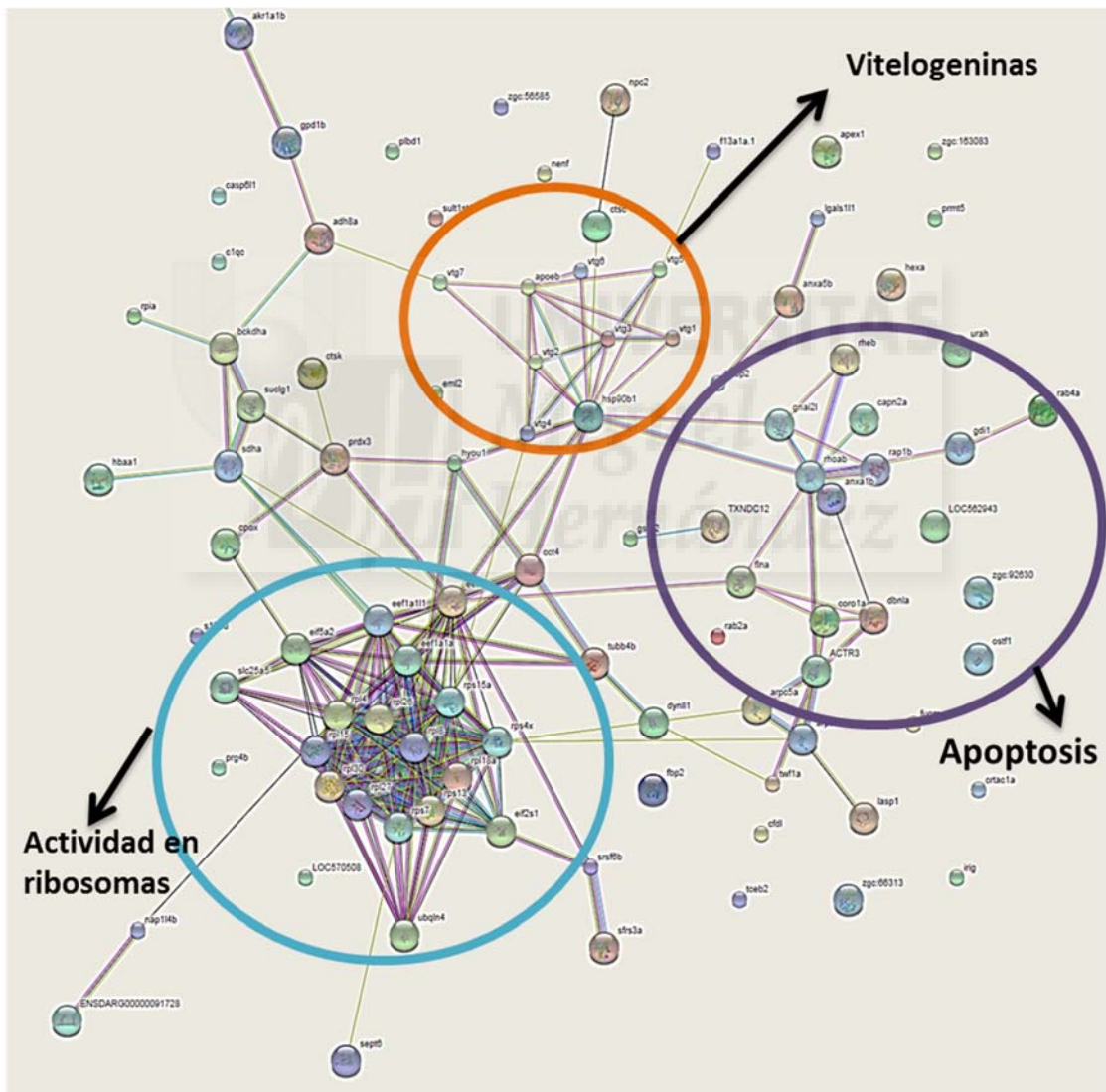


Figura 2.4: Red de interacción de proteína-proteína en el grupo SVCV-1d. Generada empleando el programa STRING, utilizando como modelo el pez cebrá y las proteínas con aumentos en su expresión mayores de 1,5 veces respecto al control.

Finalmente, quisimos agrupar las proteínas sobreexpresadas tras la infección en función de sus interacciones con otras y para ello empleamos el programa STRING,



que genera mapas de interacción proteína-proteína (Figura 2.4). De esta forma distinguimos 3 *clusters*: vitelogeninas, proteínas relacionadas con apoptosis y proteínas ribosomales. Como proteína denominador común entre los tres grupos se encontró la HSP90B1, la cual estaría vinculada a procesos de inmunidad y señalización de TLRs, a través de su función como chaperona de proteínas de membrana [278, 279]. Hay autores que también describen su participación en procesos de infección por virus [280].

Un análisis similar se realizó en las muestras obtenidas en peces infectados por SVCV, tras 2 días de infección (SVCV-2d), obteniéndose resultados similares en lo que se refiere a la identidad y distribución del conjunto de proteínas más abundantes detectadas en el grupo SVCV-1d. En el grupo de muestras SVCV-2d sólo se detectaron 63 proteínas con aumentos superiores a 1,5 veces (Figura 2.3). Al revisar las proteínas más representativas en el grupo SVCV-2d, nuevamente destacan las vitelogeninas, la proteína GIG21, factor de coagulación (F13A1A.1) y el complejo MHC1 (Tabla 2.3).

Otra proteína de interés que aparece incrementada es C1Q1, una molécula perteneciente al sistema de complemento. En la literatura se ha descrito la función de esta proteína en el sistema de complemento y su implicación en el sistema inmune innato [56, 90, 270, 281]. También se detectaron aumentos respecto al control en proteínas como la anexina (ANXA2A) y la caspasa 3 (CASP3B), que estarían vinculadas al proceso de apoptosis en el organismo, como ya se discutió en el capítulo anterior.

**Tabla 2.3: Listado de las primeras proteínas con mayor incremento en las muestras SVCV-2d.** Se indica las veces de incremento respecto al control determinadas sobre el % de *emPAI* (n=3 peces).

UNIPROT	Nombre del gen	Descripción	Incremento de <i>emPAI</i> , %
Q3T7B3	<i>vtg2</i>	Vitelogenina 2 (fragmento) OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg2</i> PE=2 SV=1	9,9066
E7FFW9	<i>gig21</i>	Proteína Gig2-like DreL OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>gig21</i> PE=2 SV=1	9,4958
A8WGC1	<i>vtg2</i>	Vitelogenina 2 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg2</i> PE=2 SV=1	8,0899
Q1MTC4	<i>vtg2</i>	Vitelogenina 2 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg2</i> PE=1 SV=1	6,3312
Q3T7B1	<i>vtg4</i>	Vitelogenina 4 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg4</i> PE=2 SV=1	6,1328
F1QV15	<i>vtg6</i>	Vitelogenina 6 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg6</i>	6,0274
Q1LWN2	<i>vtg1</i>	Vitelogenina 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg1</i> PE=1 SV=1	6,0156
O42364	<i>apoeb</i>	Apolipoproteína Eb OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>apoeb</i> PE=2 SV=1	5,7921
F1QC84	<i>f13a1a.1</i>	Factor de coagulación XIII, A1 polipeptido OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>f13a1a.1</i>	5,7495
Q0P421	<i>vtg3</i>	Vitelogenina 3 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg3</i> PE=2 SV=1	5,6804
Q1LY08	<i>cpox</i>	Coproporfirinogeno oxidasa OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>cpox</i> PE=1 SV=2	5,5455
Q90YN8	<i>vtg1</i>	Vitelogenina 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg1</i> PE=2 SV=1	5,4985
E9QFD8	<i>vtg4</i>	Vitelogenina 4 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg4</i> PE=1 SV=2	5,1122
B0BLV9	<i>c1ql4l</i>	Proteína Si:rp71-1g18.3 (Fragment) OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>c1ql4l</i>	4,9138
F1R2S5	<i>vtg5</i>	Vitelogenina 5 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg5</i>	4,8815



datos muestran interacciones entre las vitelogeninas y el factor de coagulación F13A1A.1, o entre moléculas de caspasa 3 y la actina.

Finalmente realizamos el análisis de los resultados de las muestras de suero de peces infectados con SVCV extraídas después de 5 días de iniciada la infección. En este grupo sólo 32 proteínas mostraron un aumento superior a 1,5 veces respecto al control. De ellas, sólo 3 estaban agrupadas en respuesta a estímulos y otras 3 en procesos metabólicos (Figura 2.3). El hecho de que aparezca un menor número de proteínas de estos dos grupos puede deberse al deterioro del sistema inmune del pez infectado. En la Tabla 2.4 incluimos las proteínas con mayor incremento en este grupo. La tabla muestra que la proteína GIG2I alcanza el mayor incremento, lo que probablemente se relaciona con la progresión de la infección. También están muy incrementadas las vitelogeninas. Nuevamente se detecta el aumento del factor de coagulación, de la proteína MHC1 y de algunas anexinas.

**Tabla 2.4: Listado de las primeras 32 proteínas con mayor incremento en las muestras SVCV-5d.** Se indica las veces de incremento respecto al control determinadas sobre el % de *emPAI* (n=3 peces).

UNIPROT	Nombre del gen	Descripción	Incremento de <i>emPAI</i> , %
E7FFW9	<i>gig2l</i>	Proteína Gig2-1 DreL OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>gig2l</i> PE=2 SV=1	6,3736
Q3T7B3	<i>vtg2</i>	Vitelogenina 2 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg2</i> PE=2 SV=1	3,4336
A8WGJ1	<i>vtg2</i>	Vitelogenina 2 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg2</i> PE=2 SV=1	3,1735
Q1MTC4	<i>vtg2</i>	Vitelogenina 2 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg2</i> PE=1 SV=1	2,7863
Q0P421	<i>vtg3</i>	Vitelogenina 3 (Fragmento) OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg3</i> PE=2 SV=1	2,7287
F1R1M3	<i>LOC101886968</i>	Proteína <i>cst14b.2</i> OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>LOC101886968</i> PE=4 SV=2	2,7192
F1Q9Y2	<i>lgals111</i>	Galectina OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>lgals111</i> PE=4 SV=2	2,3921
Q1LWN2	<i>vtg1</i>	Vitelogenina 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg1</i> PE=1 SV=1	2,3287
Q9DFT9	<i>vtg3</i>	Vitelogenina 3 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg3</i> PE=2 SV=1	2,2839
F1R2S5	<i>vtg5</i>	Vitelogenina 5 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg5</i> PE=1 SV=1	2,2123
F1QC84	<i>f13a1a.1</i>	Factor de coagulación XIII OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>f13a1a.1</i> PE=4 SV=1	2,0759
Q90YN8	<i>vtg1</i>	Vitelogenina 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg1</i> PE=2 SV=1	2,0613
A0A0R4IJT8	<i>cct8</i>	Chaperonina- TCP1 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>cct8</i> PE=1 SV=1	2,0531
O42363	<i>apoa1</i>	Apolipoproteína A-I OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>apoa1</i> PE=2 SV=1	2,0436
A0A0R4ISK8	<i>khdrbs1a</i>	Proteína Kh de union RNA-, OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>khdrbs1a</i>	2,0104
Q6NWD9	<i>twf1a</i>	Twinfilina, proteína de union a actina, 1a OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>twf1a</i>	1,9938
A0A0R4IBP7	<i>rpl8</i>	proteína ribosomal 60S L8 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>rpl8</i> PE=1 SV=1	1,9291
U6BMH5	<i>mhc1zla</i>	Variante del complejo de histocompatibilidad MHC1 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>mhc1zla</i>	1,9195
F1QV15	<i>vtg6</i>	Vitelogenina 6 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg6</i> PE=1 SV=1	1,8953
E9QFD8	<i>vtg4</i>	Vitelogenina 4 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg4</i> PE=1 SV=2	1,8694
F1RBA0	<i>vtg4</i>	Vitelogenina 4 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg4</i> PE=1 SV=2	1,7940
F1QS51	<i>eea1</i>	Antígeno de endosoma temprano 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>eea1</i>	1,7058
F1Q7L0	<i>vtg4</i>	Vitelogenina 4 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg4</i> PE=1 SV=1	1,6980

A0A0R4IY49	<i>vtg7</i>	Vitelogenina 7 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg7</i> PE=1 SV=1	1,6717
A0A0R4IUA0	<i>vtg7</i>	Vitelogenina 7 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>vtg7</i> PE=1 SV=1	1,6129
Q1L8Q7	<i>rpl30</i>	Proteína ribosomal L30 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>rpl30</i> PE=1 SV=1	1,5962
Q5BLH5	<i>capn2a</i>	Calpaina 2, (M/II) large subunit a OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>capn2a</i>	1,5893
Q6ZM17	<i>si:ch211-5k11.8</i>	Proteína de homoglobina nueva, subunidad alfa 1 (Hbaa1) OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>si:ch211-5k11.8</i> PE=1 SV=1	1,5778
A0A0A0MPR4	<i>si:ch211-15j1.4</i>	Proteína Si:ch211-15j1.4 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>si:ch211-15j1.4</i>	1,5568
Q804G9	<i>anxa2a</i>	Annexina OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>anxa2a</i> PE=2 SV=1	1,5539
Q802Z4	<i>zgc:66156</i>	Proteína Zgc:66156 OS= <i>Danio rerio</i> GN= <i>zgc:66156</i> PE=2 SV=1	1,5268

En el caso del mapa de interacción proteína-proteína generado a partir de las proteínas con mayor incremento en las muestras SVCV-5d empleando el programa STRING, se observa que el cluster de las vitelogeninas sigue manteniendo una posición preferente y una conexión con el factor de coagulación (Figura 2.6).

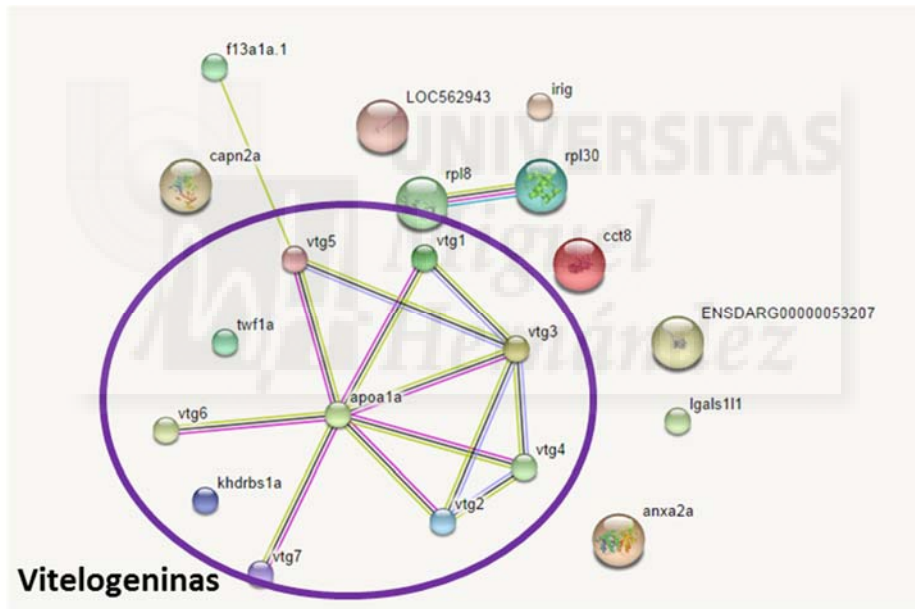


Figura 2.6: Red de interacción de proteína-proteína en el grupo SVCV-5d. Generada empleando el programa STRING, utilizando como modelo el pez cebra y las proteínas con aumentos en su expresión mayores de 1,5 veces respecto al control.

Cuando analizamos de forma pormenorizada los niveles expresión de vitelogeninas en el suero de los peces infectados podemos observar que para todas ellas se incrementa su concentración varias veces respecto al control no infectado. Dicho incremento va disminuyendo conforme avanzan los días tras la infección (Figura 2.7). La vitelogenina es una proteína precursora de la yema de huevo, presente en las hembras de todas las especies ovíparas, incluyendo peces, anfibios, reptiles, aves, invertebrados y el ornitorrinco. Se sintetiza de forma extraovárica y es transportada

a través del sistema circulatorio al ovario, donde se internaliza en el ovocito en crecimiento y es proteolizada para generar otras proteínas de yema de huevo que posteriormente se utilizan como nutrientes en el desarrollo de los embriones [282, 283]. Inicialmente se creyó que su síntesis sólo se desarrollaba en hígado pero estudios recientes han demostrado que también se expresa en diferentes tejidos que incluyen piel, agallas, corazón, cerebro, tejido adiposo y musculo [276, 284, 285]. Además, se consideraba que esta proteína sólo se expresaba en las hembras, sin embargo, se ha demostrado que también está presente en animales machos sexualmente inmaduros, aunque en menor concentración [286, 287]. Recientemente se ha descrito en peces su vinculación con la respuesta patógenos, incluyendo bacterias y virus [288-292].

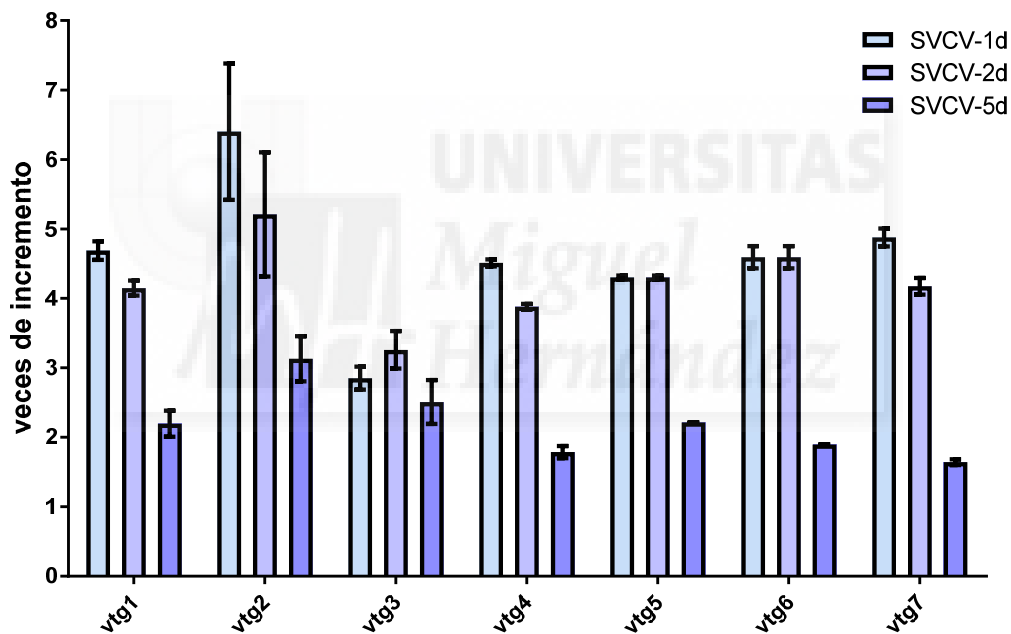


Figura 2.7: Niveles de aumento de concentración las siete vitelogeninas detectadas en el análisis proteómico para peces infectados respecto al control no infectado.

Esta proteína en los últimos años ha sido vinculada a la transferencia materna de la inmunidad, de hecho hay trabajos que así lo refieren y plantean que su expresión podría estar ligada a la presencia de patógenos, así como la opsonización de moléculas extrañas [288, 293]. Inclusive hay autores que han asociado su expresión como marcador de polución en aguas contaminadas [290]. En nuestro estudio se observó un claro aumento de la abundancia de esta proteína en las muestras de plasma de peces infectados con SVCV a 1 día y a 2 días. Ya a los 5 días post infección

con SVCV se observó una caída. Esto podría sugerir una vuelta a los niveles basales de expresión tras la estimulación inicial. Otra proteína con una abundancia relativa mayor que en la muestra control fue la proteína GIG2I. Las moléculas GIG han sido identificadas en los últimos años y están vinculadas al IFN como estimuladores de este último y por consiguiente se han implicado en la respuesta inmune innata [294-296]. Se ha encontrado expresión de *gig2* en diferentes órganos, como es el caso del timo, agallas, piel, corazón, cerebro, riñón anterior, bazo, y muy poca expresión en hígado [230]. Este trabajo describe por primera vez la presencia de esta proteína en sangre como respuesta a una infección viral.

A modo de conclusión, en la Figura 2.8 se muestra un gráfico en el que se incluyen las proteínas cuya concentración en suero de peces infectados aumenta más de 1,5 veces, para todos los tiempos testados post infección. Cuatro tipos de proteínas destacan claramente durante todo el periodo analizado: vitelogeninas, GIG2I, MHC1 y el factor de coagulación XIII (f13a1a.1).

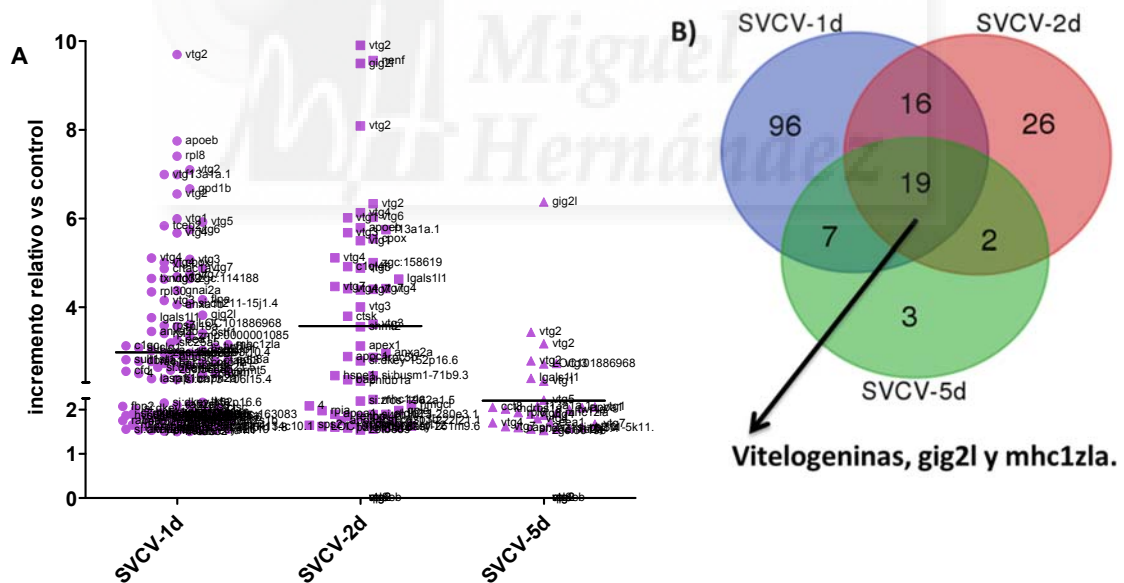


Figura 2.8: Representación de todas las proteínas con mayor incremento respecto al control en las muestras de plasmas de peces cebra infectados con SVCV. A) Gráfico que muestra los aumentos de cada conjunto de proteínas a distintos tiempos post infección. B) Diagrama de Venn que representa el análisis de coincidencia de las proteínas con mayor incremento en los distintos tiempos.



## Validación de los niveles de expresión de vitelogeninas y GIG2l en peces infectados con SVCV.

Para corroborar los resultados obtenidos por proteómica respecto al aumento de la expresión, tanto de vitelogeninas como de la proteína GIG2l, evaluamos la expresión de sus transcritos mediante PCR cuantitativa. En un experimento de infección con SVCV bajo las mismas condiciones experimentales que el ensayo de proteómica y se tomaron muestras de órganos internos de 3 peces de cada grupo de estudio (control, SVCV-1d, SVCV-2d y SVCV-5d) y se evaluó el perfil de expresión para los genes que codifican para las siguientes proteínas: N del virus SVCV (N-SVCV), para verificar la carga viral durante el transcurso de la infección; GIG2l y de vitelogeninas (VTG1 y VTG2). El análisis de la carga viral muestra un aumento con el transcurso del tiempo en el experimento realizado (Figura 2.9).

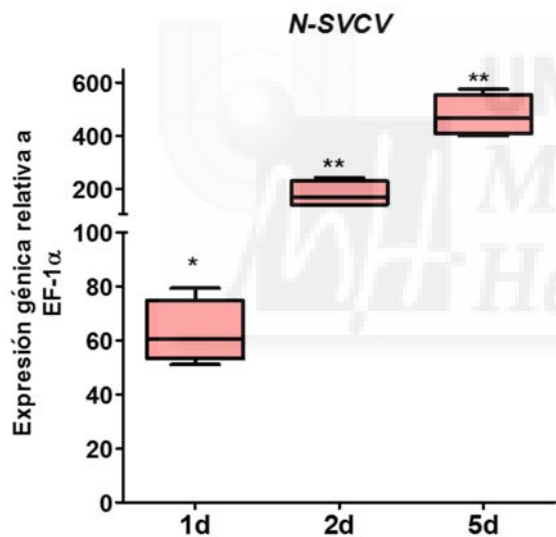


Figura 2.9: Expresión relativa de transcritos del gen de la proteína N SVCV en peces infectados con SVCV. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control sin infectar y se utiliza como gen endógeno de referencia EF-1α (\*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ ).

Como podemos ver en la Figura 2.10, el seguimiento de la expresión de transcritos para el gen de la proteína GIG2l durante el transcurso de la infección nos muestra un aumento significativo con respecto al control no infectado. Esto coincide con lo descrito por Zhang y cols. *gig2l* en células de carpa infectadas con reovirus [198].

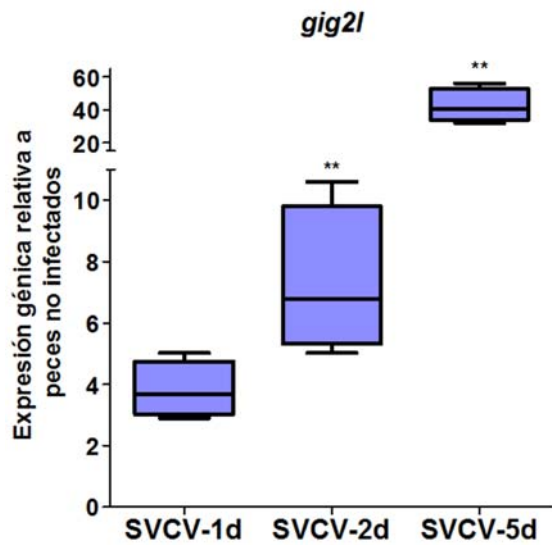


Figura 2.10: Expresión relativa de transcritos del gen de la proteína GIG2I en peces infectados con SVCV. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control sin infectar y se utiliza como gen endógeno de referencia EF-1 $\alpha$  (\*\* p<0,01).

En la Figura 2.11 se muestra la evolución temporal de la expresión de transcritos de los genes que codifican para las vitelogeninas 1 y 2, los cuales se incrementan de forma significativa. Otros autores también han descrito el aumento de la expresión de transcritos de vitelogeninas en respuesta a contaminaciones acuáticas pero no en respuesta a virus [276, 287, 290]. En salmon infectado con el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) se ha descrito la capacidad neutralizante de la vitelogenina frente a estas infecciones [292].

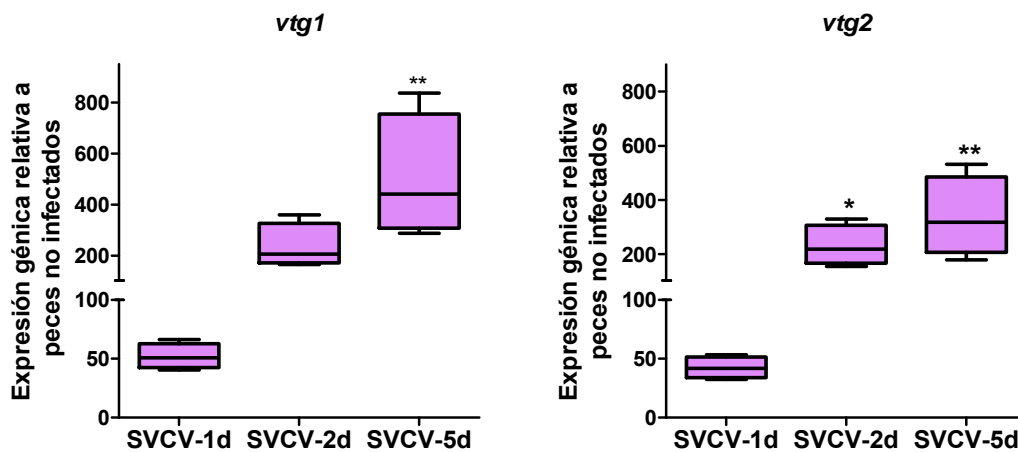


Figura 2.11: Expresión relativa de transcritos de los genes de las proteínas vitelogenina 1 y 2 en peces infectados con SVCV. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control sin infectar y se utiliza como gen endógeno de referencia EF-1 $\alpha$ .



### Estimación de los niveles de vitelogeninas por Western blot.

En la Figura 2.12 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en un experimento de Western blot para muestras procedentes de suero de peces control e infectados después de 24 y 48 horas. Como anticuerpo primario usamos uno diseñado específicamente para la vitelogenina 2 de pez cebra. En el suero de los peces infectados se observa la presencia de la proteína vitelogenina, en concentración dependiente del tiempo tras la infección. Se utiliza como referencia interna la proteína actina, cuya intensidad es idéntica tanto en suero de peces control como infectados.

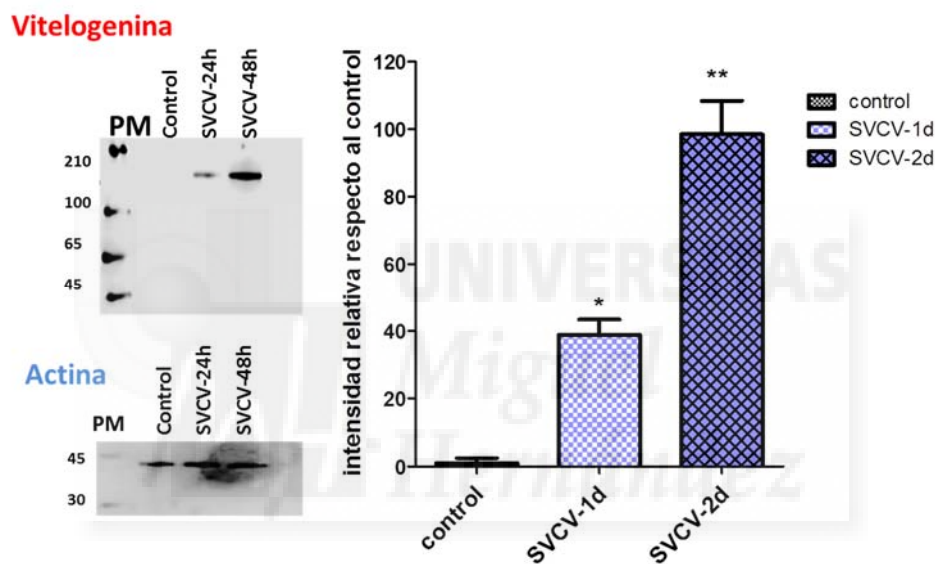


Figura 2.12. Determinación por Western blot de los niveles de vitelogeninas en muestras de plasma infectados y no infectados (control) con SVCV. La imagen superior izquierda se corresponde con un western blot para vitelogenina y la inferior izquierda es el correspondiente blot para la proteína actina, tomada como referencia interna. El gráfico de la derecha representa el análisis densitométrico de las bandas correspondientes a la vitelogenina. Se realizaron 2 experimentos y se muestran valores medios  $\pm$  desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control: \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ .

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por aproximaciones de proteómica como hemos mostrado con anterioridad. Estos datos sugieren que el aumento de la concentración de vitelogenina en los peces infectados sea parte de la respuesta antiviral. Esta observación es coincidente con los datos mostrados por Garcia y cols. encontrados en carpa infectada con IPNV [292].



## **CONCLUSIONES.**

1. Se ha utilizado el pez cebra como modelo de estudio para seguir el curso de la infección por el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) realizando un análisis del perfil proteómico de su plasma sanguíneo.
2. Se ha detectado en el plasma de los peces infectados diferencias fundamentalmente en cuatro proteínas: vitelogeninas, GIG2I, MHC1 y el factor de coagulación XIII.
3. Es la primera vez se detecta en plasma sanguíneo la presencia de la proteína GIG2I asociada a una respuesta antiviral.
4. Los cambios más drásticos en respuesta a la infección vírica se observaron en los niveles de las vitelogeninas y podrían estar asociados a la respuesta de defensa innata frente al virus.





**Capítulo III: SEGUIMIENTO DEL EFECTO DEL  
BETAGLUCANO ANTE LA INFECCIÓN POR  
VIRUS SVCV DEL PEZ CEBRA: IMPLICACIONES  
EN LA “INMUNIDAD ENTRENADA”.**

*Miguel  
Hernández*



## INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO.

En los capítulos anteriores hemos descrito como el pez cebra responde a la infección por SVCV mediante cambios en la cromatina asociada a genes de respuesta a patógenos, así como la liberación en sangre de una serie de proteínas de acción antiviral. Estos cambios en la cromatina podrían entenderse como parte de un fenómeno conocido como "inmunidad entrenada". Tradicionalmente se ha entendido que la defensa del huésped se ejerce tanto por mecanismos de inmunidad innata como adaptativa. La inmunidad innata reacciona instantáneamente al encuentro del organismo con un patógeno y se ha considerado como inespecífica e incapaz de construir una respuesta elaborada de memoria. Por el contrario, las respuestas inmunitarias adaptativas pueden reconocer específicamente patógenos y construir memoria capaz de proteger al organismo contra la reinfección [297]. Durante la última década, el dogma de que la inmunidad innata es inespecífica ha cambiado ligeramente. En especial, a partir del descubrimiento de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), tal es el caso de los receptores tipo Toll (TLR), los receptores de lectina tipo C, los receptores tipo NOD o los receptores tipo Rig I, entre otros [298]. Para ciertos autores la inmunidad innata puede ser capaz de mostrar características adaptativas y ofrecer mecanismos de protección frente a la reinfección, de forma independiente a la generada por la inmunidad adaptativa. Siendo a esto a lo que denominan "inmunidad entrenada" [74]. La inmunidad entrenada se manifiesta como protección contra la reinfección por patógenos iguales o diferentes. Sería inespecífica, proporcionando un estado de alerta frente a cualquier patógeno, pero durante un tiempo más corto que la inmunidad adaptativa [80]. Estaría mediada por macrófagos y células *natural killer* y se postula que representa un mecanismo de reprogramación epigenética que activa los niveles de una serie de genes implicados en la inmunidad innata [299].

Existen evidencias en invertebrados (que no poseen inmunidad adaptativa) que indican que su respuesta celular ante patógenos puede ser más efectiva si han sido preestimulados con el mismo patógeno u otro diferente [73, 78, 80, 82, 300-304].

En teleósteos la administración de betaglucanos, ya sea en la dieta o por inyección suplementaria, se ha observado que puede potenciar la resiliencia de las células inmunitarias [305-307] y proteger frente a desafíos posteriores *in vivo* [307]. A nivel molecular, la mediación del efecto de los betaglucanos se ejerce aumentando liberación de citoquinas inflamatorias a infecciones posteriores con patógenos iguales o diferentes [74, 308, 309]. Se ha descrito la capacidad protectora de los betaglucanos frente a infecciones tanto bacterianas [95, 306, 310-312] como virales [87, 313-315]. El Zymosán es un betaglucano frecuentemente empleado en estudios inmunológicos, procedente la superficie celular de *Saccharomyces cerevisiae* [316]. Induce inflamación de forma experimental a través de la activación de la cascada de citoquinas pro-inflamatorias, al ser reconocido por el receptor TLR2 [317]. También se ha visto que puede elevar los niveles de la quinasa ciclina D2, que, a su vez, media la activación de macrófagos [318].

Por todo lo dicho, el objetivo que pretendemos satisfacer con el desarrollo de este capítulo es analizar el efecto inmunomodulador del betaglucano en pez cebra infectado con SVCV, así como su posible implicación en el desarrollo del concepto de *inmunidad entrenada*.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudio del efecto *in vitro* de la aplicación de betaglucanos frente a la infección por el virus SVCV.

#### *Análisis de la respuesta inmune tras la aplicación de betaglucano.*

A tal efecto, desarrollamos los experimentos que se detallan en la Figura 3.1, en los que se utiliza la línea celular de pez cebra ZF4. En este esquema experimental se proporciona un primer estímulo con betaglucano (Zym-Bgc) a tiempo 0 y pasado 1 día de tratamiento se determina la variación de la expresión de algunos genes (interleuquinas inflamatorias: *il-1b*, *il-6*, *il-8*, *tnf- $\alpha$* ) y del receptor *nod2*. A los 7 días del inicio del tratamiento se aplica como segundo estímulo una infección con SVCV, y nuevamente se determina la expresión de estos mismos genes.



Figura 3.1: Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto *in vitro* del inmunoestimulante betaglucano.

La línea celular ZF4 es de origen embrionario pero su validez como modelo de estudio de respuesta inmune está bien establecido en el campo [118, 319, 320] y es susceptible a infecciones con rhabdovirus [184, 197]. En las células tratadas con Zym-Bgc existe un incremento significativo de la expresión de transcritos de todos los genes analizados (Figura 3.2) con respecto al control no infectado. De igual forma, la posterior infección con SVCV también supone un aumento en la expresión de transcritos de todos los genes, en especial de *il-8*. Para todos los demás genes analizados, la sola presencia del betaglucano ejerce un papel inmunoestimulante de similar intensidad que la propia presencia del virus. Rieger y cols. utilizando cultivos primarios de macrófagos extraídos de riñón de la especie *Carassius auratus* también

observaron un aumento de transcritos de *il-1b*, *il-8* y *tnf-α* tras el tratamiento con betaglucano [321, 322].

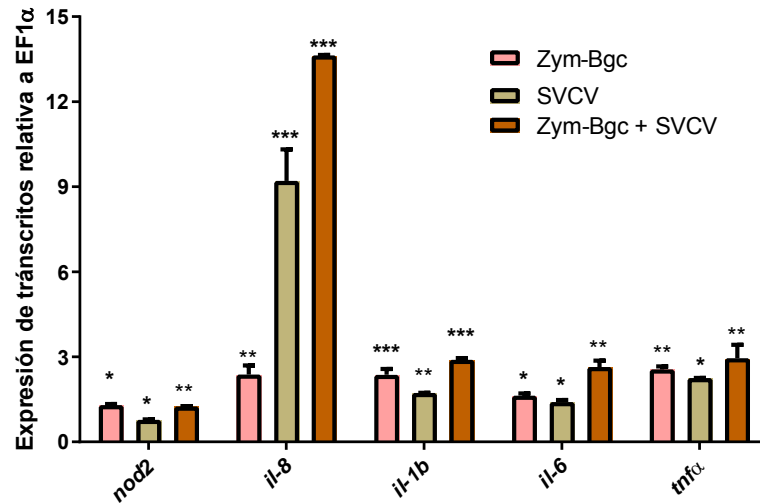


Figura 3.2: Expresión de transcritos de citoquinas en células ZF4 tratadas con Zym-Bgc (primer estímulo) y tras un segundo estímulo de infección con SVCV. Se realizaron 2 experimentos con duplicados de cada uno de ellos. Los resultados se expresaron con respecto al control (células sin tratar) y los asteriscos indican diferencias significativas con \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

Después de determinar el aumento de los niveles de transcritos de varias interleuquinas asociados a la presencia de uno u otro estímulo, quisimos verificar el aumento de la proteína que debe generarse a partir de dichos transcritos. Para ello usamos técnicas de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-IL-1B en células ZF4 tratadas con betaglucano. En la Figura 3.3 podemos observar un incremento de los niveles de IL-1B con posterioridad al tratamiento.

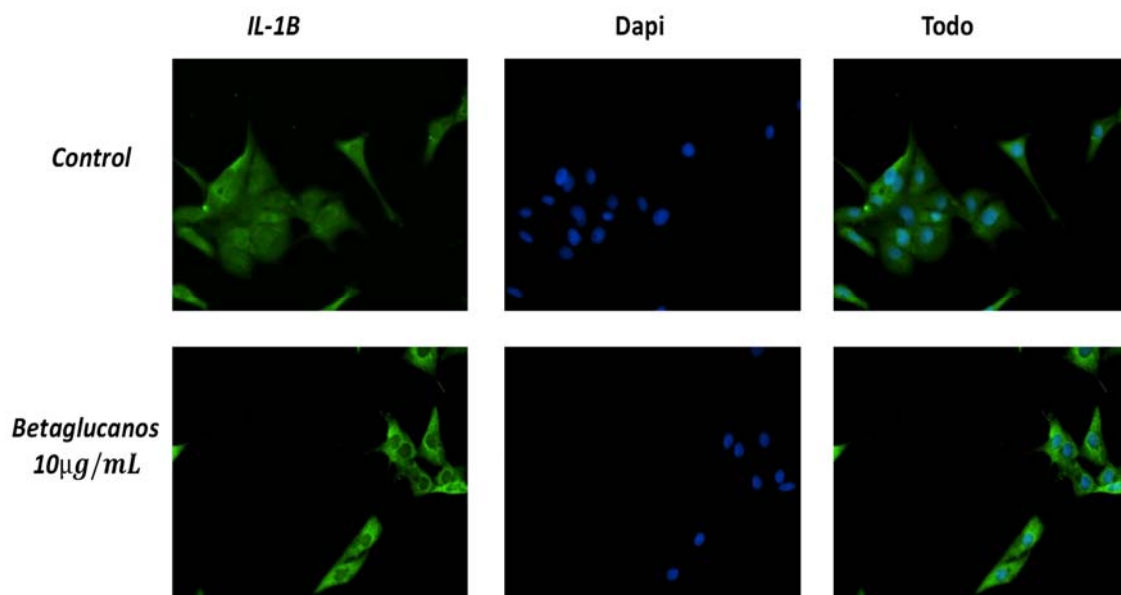


Figura 3.3: Fotos de inmunofluorescencia de células ZF4 tratadas con betaglucano. Se utiliza un anticuerpo policlonal anti-IL-1B.

Datos similares han sido observados tanto in vitro como in vivo en pez cebra, determinado tanto transcritos como proteína IL-1B [93, 323, 324].

### Supervivencia en células ZF4 inmunoestimuladas con betaglucano y posteriormente infectadas con SVCV.

Para comprobar la posible protección del betaglucano como inmunoestimulante en células ZF4 infectadas con SVCV llevamos a cabo un ensayo viabilidad celular (MTT). En Figura 3.4 se muestran los resultados de este ensayo: en el panel A se muestra que el betaglucano no presenta toxicidad hasta la dosis máxima ensayada (20 µg/mL). La infección con SVCV en células sin tratar con betaglucano provoca una disminución de aproximadamente un 30% de la supervivencia celular. Sin embargo, las células tratadas con betaglucano recuperan la viabilidad de forma significativa con respecto a las no tratadas. Esto sugiere que el betaglucano podría ser usado profilácticamente frente a infecciones virales. Existen estudios en peces que ponen de manifiesto su efecto protector frente a diversas infecciones bacterianas [325-328].

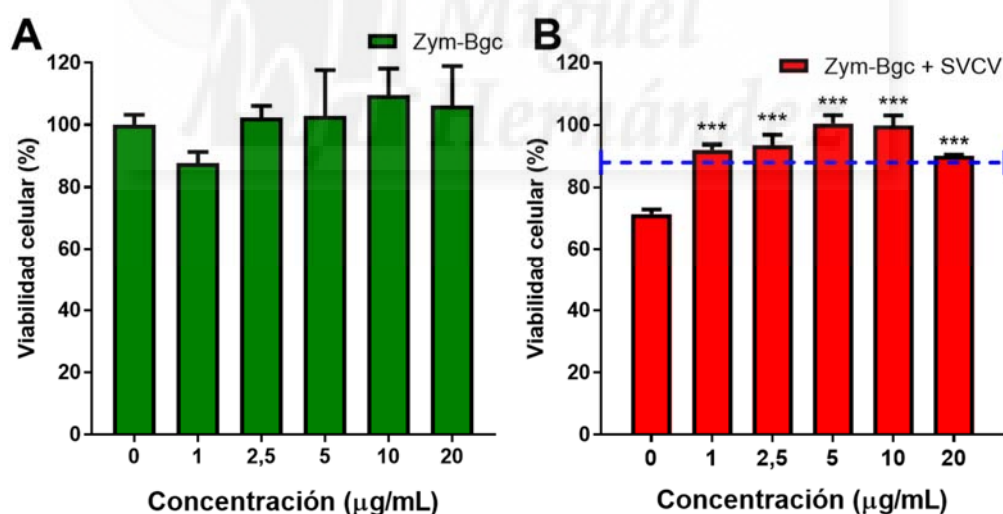


Figura 3.4: Viabilidad celular en células ZF4 estimuladas con betaglucano (A) y en células infectadas con SVCV durante 24 horas que han sido previamente inmunoestimuladas con betaglucano. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a células infectadas con SVCV sin betaglucano: \*\*\*  $p < 0,001$ .

### Seguimiento del efecto protector del betaglucano en peces infectados con SVCV.

En la Figura 3.5 se muestra cómo cambian los niveles de expresión de transcritos de varios genes vinculados al sistema inmune innato, en respuesta a la inyección intraperitoneal de betaglucano. Se puede observar que para todos los genes

estudiados el nivel de transcritos aumenta justo inmediatamente después de la inyección del betaglucano, pero no se mantiene a lo largo de las dos semanas posteriores a la aplicación del estímulo. En el caso de *tnf-a* su máximo de expresión se alcanza a los 14 días post tratamiento. El aumento de la expresión de transcritos de citoquinas inflamatorias (*il-1b*, *il-6*, *tnf- $\alpha$* ) en peces tratados con betagluanos ha sido descrito tanto en pez cebra como en trucha, en condiciones y dosis similares a las empleadas en este trabajo [101, 281, 315, 324].

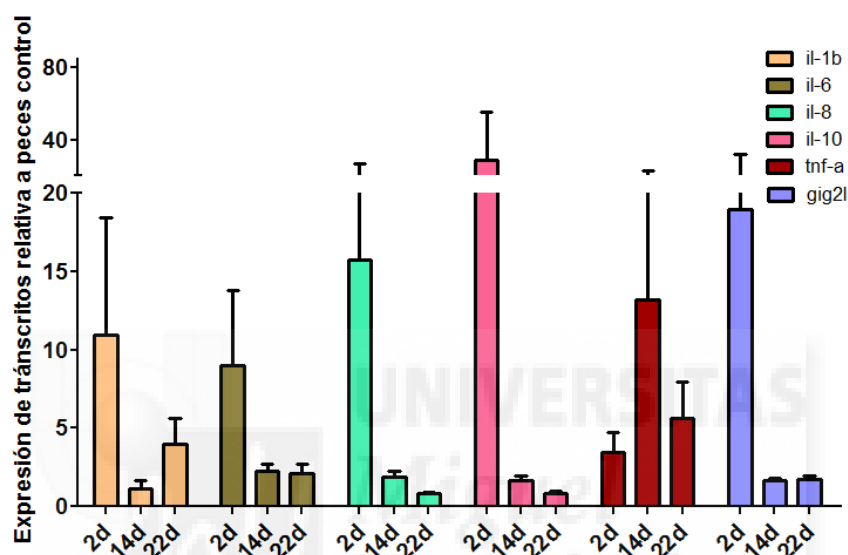


Figura 3.5: Expresión de transcritos de genes de citoquinas inflamatorias y estimuladores de la respuesta de interferón en muestras de órganos de peces tratados con betaglucano a diferentes tiempos.

El comportamiento de la expresión de transcritos de los genes *tlr2* y *nod2* en respuesta al betaglucano fue similar al de las citoquinas (Figura 3.6). Existen estudios que hacen referencia a la relación existente entre *nod2*, *tlr2* y la entrada de betagluanos y muestran un aumento de la expresión de transcritos de estas dos moléculas similar a lo aquí descrito; del mismo modo también observan un aumento de las citoquinas inflamatorias [329].

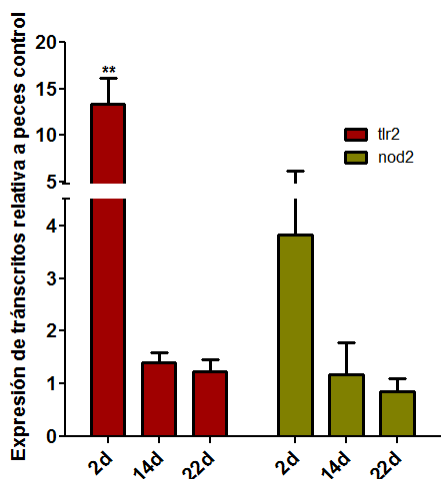


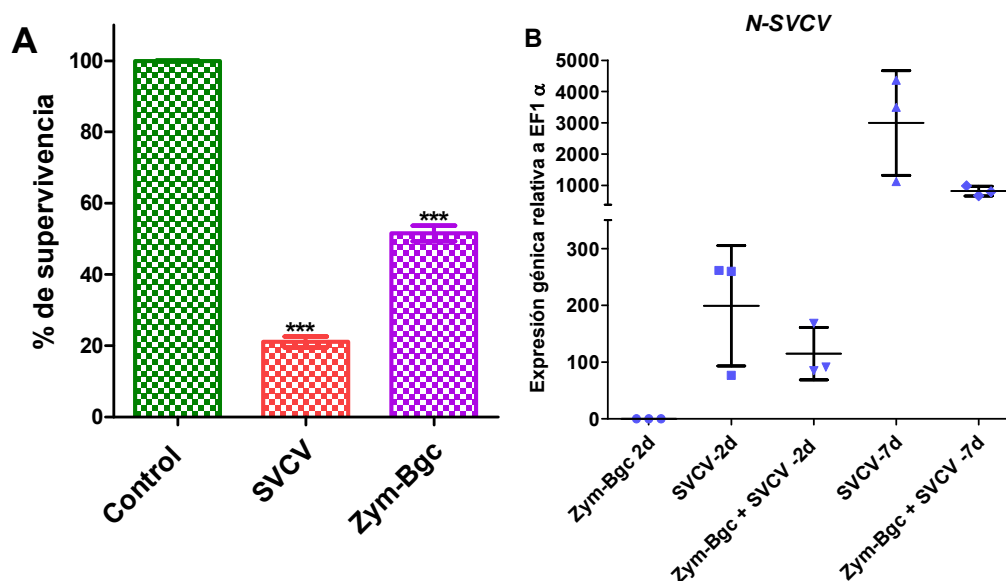
Figura 3.6: Expresión de transcritos de genes de *tlr2* y *nod2* en muestras de órganos de peces tratados con betaglucano a diferentes tiempos.

### **Comportamiento de la supervivencia y/o protección del betaglucano frente a SVCV**

Posteriormente se evaluó la mortalidad en cada uno de los grupos experimentales. El resultado se muestra en la Figura 3.7 en la cual se observan diferencias en los valores de supervivencia al cabo de 8 días post infección. Con respecto al grupo control, todos los grupos mostraron un aumento significativo de la supervivencia. Mientras que el grupo infectado con SVCV obtuvo un 20% de supervivencia, en el grupo tratado con betaglucano obtuvo un 50 % de supervivencia. Los resultados indican que los peces tratados con betaglucano son más resistentes a la infección con SVCV. Siendo una de las pocas evidencias de actividad antiviral por un tratamiento previo de betaglucanos en peces. Igualmente, al determinar la carga viral de todos los grupos se evidenció que los peces que pertenecían al grupo de betaglucano, tenían una menor carga viral que el grupo infectado con SVCV y sin tratar.

Es cierto que al analizar los resultados cabría pensar que quizás varias aplicaciones de inmunoestimulantes o una dosis mayor, hubiesen logrado una mayor protección frente a la infección viral, pero en nuestro caso solo queríamos establecer si un compuesto, en principio de origen fúngico, puede establecer en el organismo un estado de protección frente a un patógeno no relacionado, como es el virus, poniendo de manifiesto el efecto de la inmunidad entrenada. Hay trabajos realizados con peces alimentados con betaglucanos durante días sucesivos, en los cuales se alcanza altos niveles de protección frente a infecciones bacterianas. En nuestro caso una sola administración inyectada de betaglucano a una dosis de 5 microgramos ofrece un 50% de supervivencia frente a SVCV.

La protección de los betaglucanos frente a infecciones bacterianas, ha sido identificada por varios autores, mostrando que mejora la supervivencia de los peces frente a patógenos bacterianos [315, 330-333]. Nuestros experimentos han demostrado que la tasa de supervivencia de peces cebra infectados con SVCV después del tratamiento con betaglucano fue mayor que la del grupo no pretratado con betaglucano. Esto sugiere que el betaglucano tendría la capacidad de activar la respuesta antiviral en los peces infectados.



**Figura 3.7: Determinación del porcentaje de supervivencia y la carga viral en cada grupo utilizado en el estudio.** A) % de supervivencia en cada grupo de estudio a 8 días post infección en peces inyectados con betaglucano. B) Seguimiento de la carga viral en todos los grupos de estudio mediante qPCR con la determinación del gen N de SVCV. Los asteriscos indican diferencias significativas de supervivencia con respecto al grupo de peces sin tratar \*\*\*  $p < 0.01$ .

### *Expresión génica en peces inyectados con betaglucano.*

Paralelamente a este estudio, un grupo de peces previamente inyectados con betaglucano fue sometido a una infección con SVCV y se determinó la expresión de transcritos de varios genes en estos peces a diferentes tiempos, el resultado se observa en la Figura 3.8a y b. En general, el doble estímulo hace que aumente la expresión génica. Con lo cual el aumento de esta expresión génica podría estar dado por la respuesta previa presentada a la presencia del betaglucano y podríamos estar ante un ejemplo de inmunidad entrenada. Tras la administración del betaglucano, los primeros genes implicados son precisamente los de los receptores tipo Toll y NOD, ambos vinculados al reconocimiento de patógenos. Tras determinar la expresión de transcritos de *tlr2* y *nod2* desencadenantes de la respuesta inmune innata, observamos su aumento ya a los 2 días post administración, pero en el caso *tlr2* se mantuvo incrementada a lo largo de todo el estudio; y para el gen *nod2* también se incrementa su expresión, pero no de forma tan contundente como el *tlr2* (Figura 3.8a). Hay trabajos que muestran un aumento de ambas moléculas tras infecciones con betagluconos coincidiendo con lo aquí descrito [184, 329].

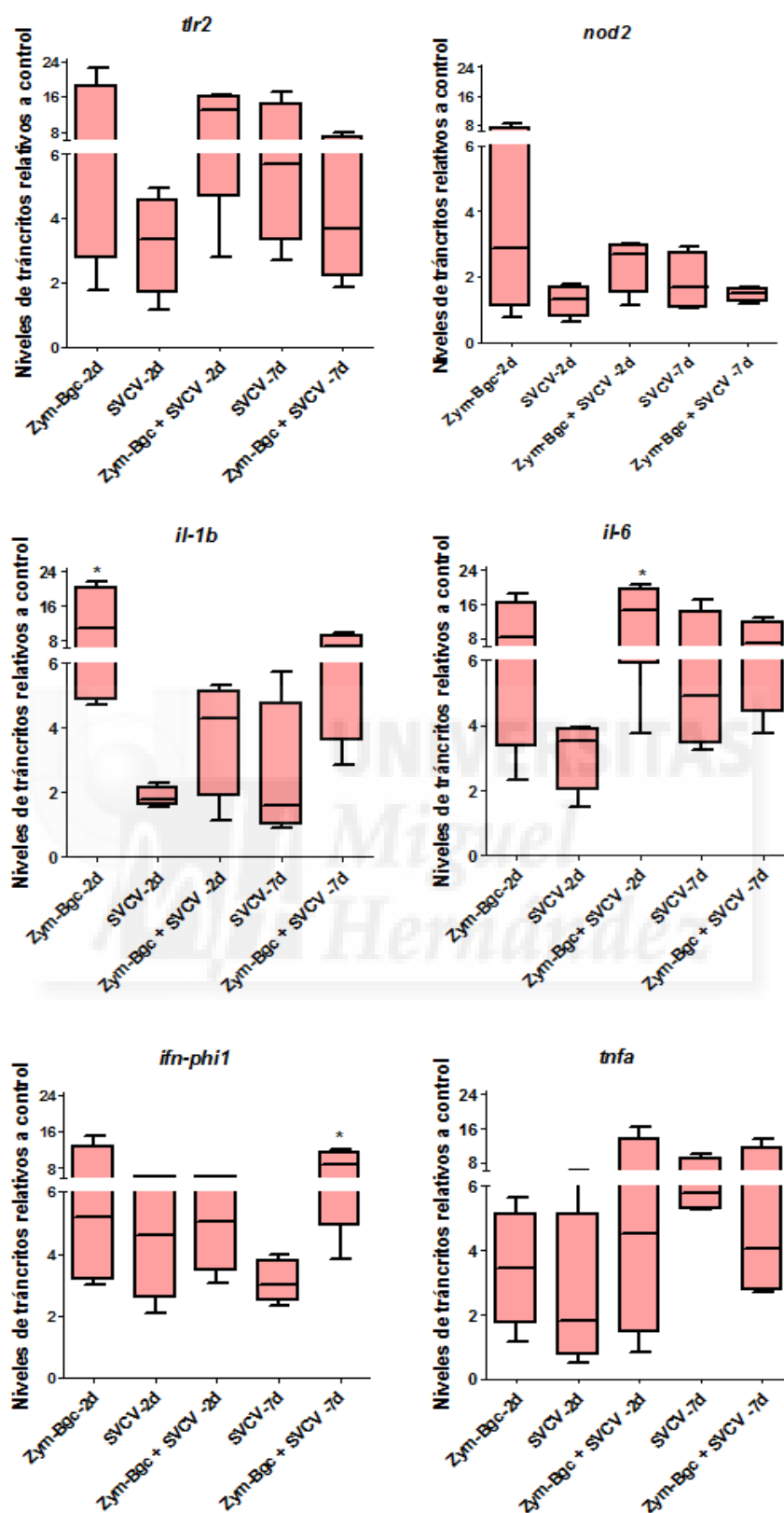


Figura 3.8a: Expresión de transcritos de genes vinculados a inmunidad innata en peces inyectados con betaglucano (Zym-Bgc = 5µg/pez) y posterior infección con SVCV. Se determinó la expresión relativa mediante qPCR con respecto al control de peces sin tratar y utilizando un gen endógeno (*Ef-1a*). Se realizó un análisis estadístico empleando un test de Tukey, y no en todos los genes se observaron diferencias significativas. Los asteriscos indican \* p<0,05.

La *il-1b*, *il-6* y el *tnf- $\alpha$*  son consideradas citoquinas inflamatorias que aparecen en una respuesta temprana y que son capaces de estimular la producción de muchas citoquinas [165]. En truchas por ejemplo se ha observado un aumento de estas citoquinas durante infecciones bacterianas [334], virales [335] y de parásitos [336]. Otras citoquinas inflamatorias como es el caso de *il-8* e *il-10* mostraron niveles incrementados de expresión tras la infección con SVCV, algo lógico si tenemos en el establecimiento de una respuesta inflamatoria, coincidiendo con otros trabajos publicados de infecciones con virus [315]. Otro resultado interesante que podemos observar es el aumento de la expresión de los genes antivirales *ifn- $\phi$ 1* (Figura 3.8a) y *gig2l* (Figura 3.8b), lo que podría explicar la mayor supervivencia de los peces tratados con betaglucanos. Sugiriendo que estos peces serían capaces de orquestar una respuesta inmune mucho mayor al ser inyectados con betaglucano.

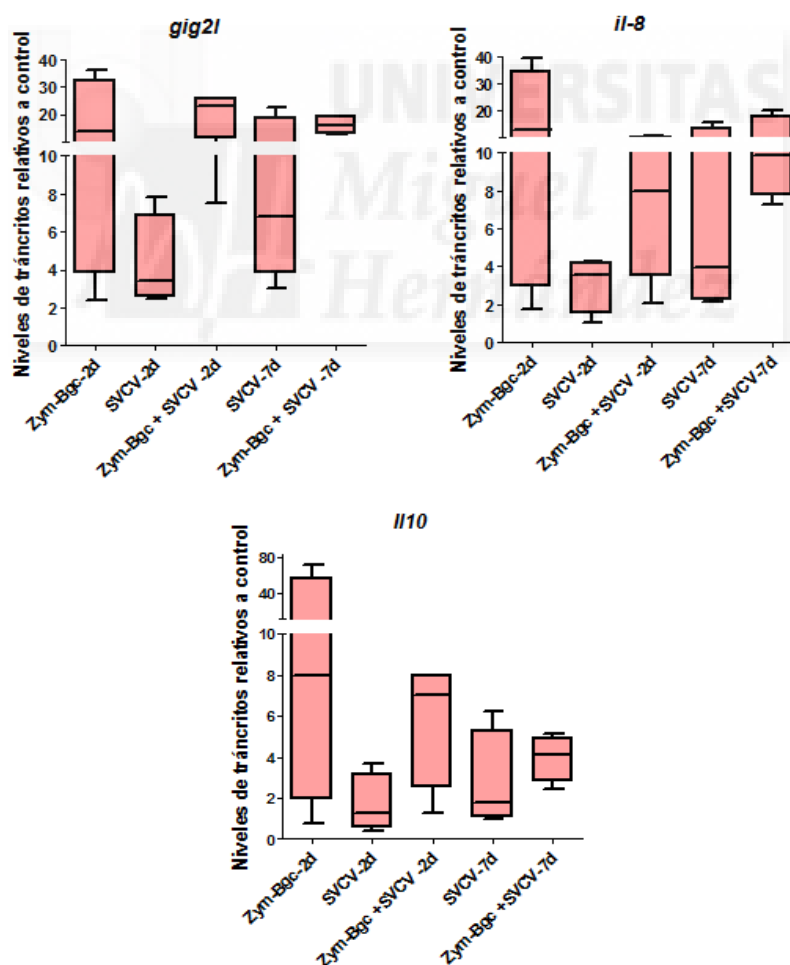


Figura 3.8b: Expresión de transcritos de genes vinculados a inmunidad innata en peces inyectados con betaglucano (Zym-Bgc = 10 $\mu$ g/pez) y posterior infección con SVCV. Continuación de la Figura 3.8a.



Los resultados obtenidos en este trabajo acerca del comportamiento de algunos genes vinculados al sistema inmune innato, nos ayudarían en la comprensión de una nueva estrategia para el control de enfermedades víricas. Estudios realizados en peces previamente tratados con betaglucanos y posteriormente sometidos a infecciones bacterianas, refieren una protección alta precisamente por el efecto de la aplicación del betaglucano [315, 332, 337, 338]. Hasta la fecha no existe descripción en literatura del efecto en pez cebra de un tratamiento previo con betaglucanos y posteriormente infección con virus SVCV.

Precisamente al recordar los resultados obtenidos en el capítulo de epigenética, comprobamos que los genes analizados en este apartado, resultaban activados tras una infección con SVCV. Sin embargo, en esta parte del trabajo, tras revisar la expresión génica posterior a un estímulo previo con betaglucano, y un desafío posterior con el virus SVCV, evidencian el establecimiento de una respuesta inmune mucho mayor. Nuestros resultados sugieren que un primer desafío con un agente de naturaleza microbiana es capaz de desencadenar una respuesta inmune entrenada aún mayor tras un segundo estímulo, en este caso diferente (infección con SVCV). Hasta la fecha la mayoría de los estudios realizados de inmunidad entrenada hacen referencia al uso de betaglucanos como profilácticos, que luego son capaces de desencadenar una respuesta inmune frente infecciones bacterianas y micóticas [82, 339], aunque existe un estudio en humanos donde se indica la inducción de cambios epigenéticos por la presencia de betaglucanos [340]. Una probable explicación sería la creación de una especie de memoria entrenada por parte del sistema inmune ante la invasión de patógenos y las células que lo componen [74, 297, 303, 341] .



## CONCLUSIONES.

1. El estudio *in vitro*, realizado en células ZF4 tratadas previamente con betaglucano, evidenció el aumento de la expresión de transcritos de genes asociados con el sistema inmune innato.
2. El estudio *in vivo* con peces cebra tratados previamente con betaglucano y posteriormente infectados con SVCV, evidenció que son más resistentes a la infección que los peces infectados sin tratar con betaglucano. Siendo la primera vez que se muestra el uso de betaglucanos en la protección de infecciones posteriores con otros patógenos.
3. El aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias y de genes relacionados con la detección de patógenos en los peces tratados previamente con betaglucano y posteriormente infectados con SVCV, sugiere que podría estar mediado por la respuesta previa presentada a la presencia del betaglucano y, de ser así, estamos ante un ejemplo de inmunidad entrenada.





**DISCUSIÓN GENERAL**



Los resultados obtenidos en cada uno de los apartados de esta memoria se han discutido en los capítulos correspondientes, pero consideramos pertinente realizar una discusión general, que correlacione unos con otros y aporte una visión más integradora del contenido de esta Memoria de Tesis.

En los últimos años se han incrementado el número de estudios que buscaban un mejor entendimiento del desarrollo de una infección viral con SVCV. Las modificaciones epigenéticas pueden ser provocadas por patógenos y conducen a un cambio en el patrón de la transcripción general del organismo. En el primer capítulo exploramos la posibilidad de que la infección con SVCV en el modelo del pez cebra provocara la inducción de cambios epigenéticos en las histonas asociadas al ADN. En nuestro caso dirigimos el estudio al análisis de las metilaciones de la histona H3 sobre el cuarto residuo del aminoácido lisina del extremo N terminal, que está estrechamente asociada con los promotores de los genes activos transcripcionalmente [109, 153]. Se conoce que las regiones promotoras están situadas próximas a los sitios de inicio de la transcripción génica, promoviendo la transcripción del gen en cuestión [157].

Además, la trimetilación de la histona 3 se ha visto implicada en la promoción de un aumento de la transformación de monocitos en macrófagos, estos últimos vinculados al desarrollo de una respuesta inmune innata [158, 159]. Entre los estímulos que provoca la trimetilación de la histona H3 destacan: una señal inflamatoria a través de la vía del *tlr4*, la activación del factor *nf-kβ* y activación de los factores reguladores del interferón, entre otros [160].

Precisamente nuestro interés fundamental radicó en la identificación, a diferentes tiempos post infección con SVCV (1, 2 y 5 días), de los genes que resultaron activados de forma persistente, con atención especial a aquellos que estuviesen asociados a la respuesta inmune innata. Un análisis de los genes más activos permitió identificar los conjuntos de genes mayormente activados en cada uno de los tiempos post infección evaluados, lo que nos proporcionó indicios acerca de los procesos celulares que se disparan tras la aparición de una infección y la consecuente elaboración de una respuesta antiviral. Se identificaron activados los siguientes conjuntos de genes: i) degradación por el proteosoma; ii) genes relacionados con los

receptores *tlrs*; iii) genes relacionados con la cascada de citoquinas inflamatorias incluyendo el *tnf- $\alpha$* ; iv) el conjunto de genes del interferón; v) el conjunto de genes de las *crp*, y vi) el conjunto de genes de la apoptosis. La implicación de todos ellos ha sido descrita en el desarrollo de una respuesta del sistema inmune innato frente a infecciones virales [25, 27, 177, 179]. El reconocimiento de los elementos virales por los PRR del huésped es esencial para la iniciación de una respuesta inmune antiviral innata apropiada [342-344] y la posterior activación de la inmunidad adaptativa. Este proceso conduce finalmente a la producción de *ifn* tipo 1 por el organismo y de otras moléculas inducidas por IFN y citoquinas inflamatorias, intentado así restringir la replicación viral [345]. La Figura 13 muestra un esquema final que representa cómo interactúan los genes que aparecen a lo largo de esta Memoria en el contexto de las distintas rutas de señalización celular que se modulan tras la infección por SVCV.

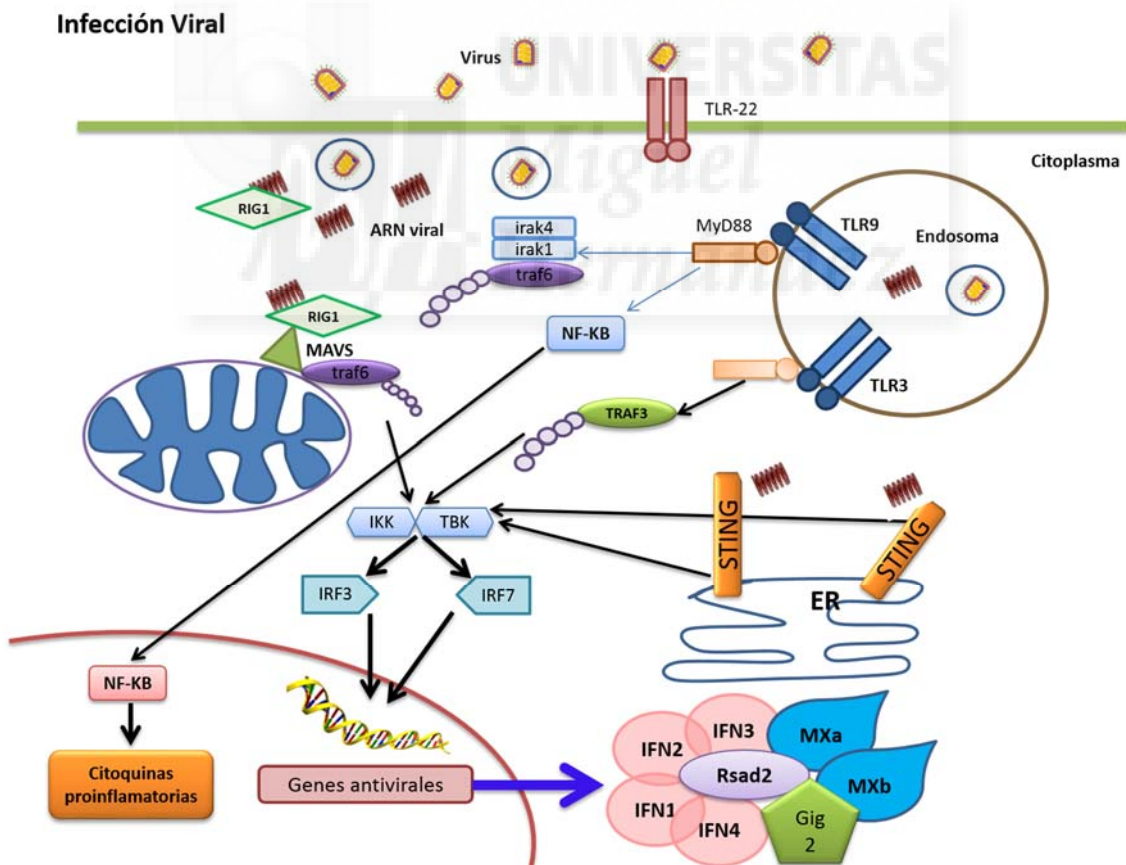


Figura 13: Esquema de las rutas de señalización celular asociadas a la generación de una respuesta antiviral en los peces cebra infectados con SVCV. Todas las moléculas representadas aparecen en algún apartado de la memoria.



Otros genes que resultaron activados por la infección con SVCV, y no se encuentran en los conjuntos de genes descritos anteriormente, fueron *mavs*, el factor 3 asociado al receptor de *tnf* (*traf3*) y *tbk1*, todos ellos vinculados a la activación del interferón a través de la fosforilación de los factores reguladores del interferón *irf3* e *irf7* [346, 347]. Todos estos genes promueven el aumento de la expresión génica de otros genes tales como *ifnphi-1*, *ifnphi-2*, *ifnphi-4*, las isoformas de *mx* y de la proteína 2 (*rsad2*), todos ellos activados en nuestro estudio durante los primeros cinco días post infección, y que son los responsables de conferir un estado antiviral contra SVCV [348]. Si ello se traduce en protección o supervivencia del pez es difícil de evaluar ya que los peces son sacrificados para obtener la cromatina, sin saber cuales serán supervivientes. Sin embargo, podemos inferirlo de nuestros propios resultados con betaglucano o de otros estudios en los que un estado de activación de estos genes supone una mayor supervivencia a la infección [81-83] (Figura 13).

En consecuencia, podemos afirmar que, tras una infección con SVCV, se desencadena una reprogramación epigenética de células del sistema inmune innato que conduce a una activación de la respuesta génica, y tiene como propósito generar una respuesta antiviral a través de la vía de señalización de los receptores tipo Toll, interconectándose con la cascada de inflamación y posteriormente, con la activación de la cascada del interferón, como molécula efectora antiviral. En general, nuestros resultados apuntan a que se trata de una respuesta rápida en la que muchos genes alcanzan su máximo de activación a las 24 horas post infección.

Como complemento al análisis del estudio de epigenética realizamos un estudio de proteómica de plasma de peces cebra infectados con SVCV, a los mismos días post infección que en el estudio de epigenética (1, 2 y 5 días). Un primer análisis numérico de las proteínas sobreexpresadas en cada tiempo nos mostró que el número total de proteínas disminuía con el tiempo, lo cual podría estar relacionado con una respuesta rápida que luego no se mantiene, bien por ser una activación transitoria de la expresión, o bien por el deterioro del pez conforme progresa la infección. En el listado de las proteínas identificadas, además de las normales circulantes en plasma como hemoglobina, apolipoproteínas, o serotransferrinas entre otras, identificamos dos proteínas predominantes en el plasma de individuos infectados: GIG21, una proteína relacionada con la respuesta del organismo frente a

una infección, y las vitelogeninas, proteínas relacionadas con la reproducción e inmunidad materna, ambas. Otras proteínas detectadas a lo largo del estudio están relacionadas con procesos de apoptosis (anexinas y caspasas) [270, 280], así como con la cascada del complemento [280].

El caso de la proteína GIG2l está considerada como una de las proteínas inducidas por interferón y que participan en el desarrollo de una respuesta antiviral [230, 294, 295]. Esta es la primera vez que se identifica mediante proteómica en muestras de plasma en peces cebra infectados con SVCV. Por otro lado, las vitelogeninas son proteínas que en un principio se había planteado que estaban relacionadas con la inmunidad materna de transferencia, pero han salido a luz estudios que describen su detección en animales machos que están sometidos a estrés y que habitan en aguas contaminadas con productos químicos [276, 290]. Resulta interesante además, el hecho de que las vitelogeninas sean capaces de neutralizar el IPNV [292].

Como modelo de una respuesta inespecífica mediada por el sistema inmune innato, intentamos revisar el posible efecto de la administración de betaglucano sobre la inmunidad de peces cebra que serían posteriormente desafiados con SVCV. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que un tratamiento previo promueve el aumento de la supervivencia a una posterior infección con SVCV, lo que está asociado a un incremento de la expresión de genes relacionados con el sistema inmune innato. Los resultados más interesantes de esta parte del estudio estriban en que se obtienen expresiones incrementadas de los genes evaluados como son las citoquinas inflamatorias (*il-1b*, *il-6* y *tnf- $\alpha$* ) [101, 315, 324] y las moléculas de reconocimiento de patógenos (*tlr2* y *nod2*) [48, 329] y los genes *ifnphi1* y *gig2l*, en los individuos pre-tratados con betaglucanos e infectados con SVCV, en comparación a los no tratados con betaglucanos. En general, el betaglucano provoca una estimulación por sí solo y tras un segundo estímulo con SVCV se consigue mantener incrementada la estimulación provocada. Los altos niveles de expresión tras la administración del betaglucano de los genes analizados en esta parte del estudio han sido descritos en otros trabajos realizados [87]. En conjunto, estos resultados nos sugieren que podríamos estar ante un fenómeno de “inmunidad entrenada”, dado que hay un incremento de la respuesta inmune tras la infección con el segundo patógeno, en este caso SVCV. Por tanto, podríamos considerar que la administración

de betaglucanos como potenciador del sistema inmune de cara a incrementar la supervivencia ante infecciones con SVCV tengan una utilidad práctica en acuicultura.

Como continuación lógica de esta línea de trabajo, nuestros pasos irían dirigidos a evaluar si las células del torrente sanguíneo (macrófagos y monocitos) son capaces de generar una respuesta de inmunidad entrenada. Igualmente nos planteamos desarrollar la determinación de la expresión génica de *gig2* en células del torrente sanguíneo, y corroborar si la respuesta de las vitelogeninas viene dada por la presencia del virus SVCV, así como examinar en mayor profundidad su actividad antiviral.





## **BIBLIOGRAFÍA**





1. FAO, *El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Rome, 2016: p. 224.
2. OIE. *Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2017*. 2017 [25/01/2017].
3. (ICTV), I.C.o.T.o.V. *Virus Taxonomy: 2015 Release*. July 2015 [25/01/2017].
4. Kuzmin, I.V., et al., *The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetics, and evolution*. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 2009. **9**(4): p. 541-53.
5. Ivanov, I., et al., *Structural insights into the rhabdovirus transcription/replication complex*. Virus research, 2011. **162**(1-2): p. 126-37.
6. Howley, P.M., ed. *Rhabdoviridae*. Fields virology, ed. I.K. DM. 2006, Lyles, D. y Rupprecht, C.E.: Philadelphia, PA. 1363–1408.
7. Masson, P., et al., *ViralZone: recent updates to the virus knowledge resource*. Nucleic acids research, 2013. **41**(Database issue): p. D579-83.
8. Morzunov, S.P., J.R. Winton, and S.T. Nichol, *The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus*. Virus research, 1995. **38**(2-3): p. 175-92.
9. Walker, P.J.D., R. G.; Joubert, D. A.; Blasdel, K. R., *Rhabdovirus accessory genes*. Virus research, 2011. **162**(1-2): p. 110-25.
10. Li, J., Zhang, Y., *Messenger RNA Cap Methylation in Vesicular Stomatitis Virus, a Prototype of Non-Segmented Negative-Sense RNA Virus*, in *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, A. Dricu, Editor. 2012: United States of America , Ohio State University.
11. Fijan, N.P., Z.; Sulimanovic, D.; Zwillemborg, L.O., *Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp*. Veterinary immunology and immunopathology, 1971. **41**: p. 125-148.
12. Padhi, A. and B. Verghese, *Molecular evolutionary and epidemiological dynamics of a highly pathogenic fish rhabdovirus, the spring viremia of carp virus (SVCV)*. Veterinary microbiology, 2012. **156**(1-2): p. 54-63.
13. Stone, D.M., et al., *Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups*. Diseases of aquatic organisms, 2003. **53**(3): p. 203-10.
14. Hoffmann, B., H. Schutze, and T.C. Mettenleiter, *Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of Spring Viremia of Carp, a fish rhabdovirus*. Virus research, 2002. **84**(1-2): p. 89-100.
15. Teng, Y., et al., *Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (Cyprinus carpio) in China*. Archives of virology, 2007. **152**(8): p. 1457-65.
16. Ahne, W., et al., *Spring viremia of carp (SVC)*. Diseases of aquatic organisms, 2002. **52**(3): p. 261-72.
17. Svetlana, J.I., V.; Radosavljevic, V. , *Rhabdovirus carpio as a causative agent of disease in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss-Walbaum)*. Acta Veterinaria (Beograd), 2006: p. 553–558.
18. Sanders, G.E., W.N. Batts, and J.R. Winton, *Susceptibility of zebrafish (Danio rerio) to a model pathogen, spring viremia of carp virus*. Comparative medicine, 2003. **53**(5): p. 514-21.
19. Roy, P. and J.P. Clewley, *Spring viremia of carp virus RNA and virion-associated transcriptase activity*. Journal of virology, 1978. **25**(3): p. 912-6.
20. Howe, K., et al., *The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 498-503.
21. Kong, E.Y., Cheng, S.H., Yu, K.N., *Zebrafish as an In Vivo Model to Assess Epigenetic Effects of Ionizing Radiation*. Int J Mol Sci., 2016. **17**((12)): p. 1-21.

22. Engeszer, R.E., et al., *Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field*. *Zebrafish*, 2007. **4**(1): p. 21-40.
23. Lawrence, C., *The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review*. *Aquaculture*, 2007. **269**: p. 1-20.
24. Amsterdam, A. and T.S. Becker, *Transgenes as screening tools to probe and manipulate the zebrafish genome*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 2005. **234**(2): p. 255-68.
25. Encinas, P., et al., *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*, 2013. **8**(9): p. e73553.
26. Encinas, P., et al., *Zebrafish fin immune responses during high mortality infections with viral haemorrhagic septicemia rhabdovirus. A proteomic and transcriptomic approach*. *BMC genomics*, 2010. **11**: p. 518.
27. Estepa, A. and J. Coll, *Innate Multigene Family Memories Are Implicated in the Viral-Survivor Zebrafish Phenotype*. *PloS one*, 2015. **10**(8): p. e0135483.
28. Garcia-Valtanen, P., et al., *Zebra Fish Lacking Adaptive Immunity Acquire an Antiviral Alert State Characterized by Upregulated Gene Expression of Apoptosis, Multigene Families, and Interferon-Related Genes*. *Frontiers in immunology*, 2017. **8**: p. 121.
29. Garcia-Valtanen, P., et al., *In addition to its antiviral and immunomodulatory properties, the zebrafish beta-defensin 2 (zfBD2) is a potent viral DNA vaccine molecular adjuvant*. *Antiviral research*, 2014. **101**: p. 136-47.
30. Gellert, M., *V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation*. *Annual review of biochemistry*, 2002. **71**: p. 101-32.
31. Murphy, K.P., ed. *Janeway's Immunobiology*. 8th ed. 2011, Garland Sciences, Taylor and Francis Group, LLC: New York, NY 1 0017. (342–351)-9.
32. Cummings, K. *The activation of innate immunity will allow antigen-specific immune responses by lymphocytes – adaptive immunity*. 2017 [cited 2017 May, 2th.]; Available from: <https://research.tamhsc.edu/cummings/kobayashi-lab-research/>.
33. Abbas, A.K.m.L.A.H.H., Pillai, S. , ed. *Cellular and Molecular Immunology 8th Edition*. 8th ed., ed. S.a.u.n.d.e.r.s. Vol. Chapter 2. 2015. 537.
34. Zhang, J., et al., *Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: ligand specificity and signal pathways*. *Fish & shellfish immunology*, 2014. **41**(2): p. 380-8.
35. Novoa, B. and A. Figueras, *Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases*. *Advances in experimental medicine and biology*, 2012. **946**: p. 253-75.
36. Santoriello, C. and L.I. Zon, *Hooked! Modeling human disease in zebrafish*. *The Journal of clinical investigation*, 2012. **122**(7): p. 2337-43.
37. Goody, M.F., C. Sullivan, and C.H. Kim, *Studying the immune response to human viral infections using zebrafish*. *Developmental and comparative immunology*, 2014. **46**(1): p. 84-95.
38. Rauta, P.R., B. Nayak, and S. Das, *Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms*. *Immunology letters*, 2012. **148**(1): p. 23-33.
39. Bennett, C.M., et al., *Myelopoiesis in the zebrafish, Danio rerio*. *Blood*, 2001. **98**(3): p. 643-51.
40. Moss, L.D., et al., *Identification of phagocytic cells, NK-like cytotoxic cell activity and the production of cellular exudates in the coelomic cavity of adult zebrafish*. *Developmental and comparative immunology*, 2009. **33**(10): p. 1077-87.
41. Traver, D., et al., *The zebrafish as a model organism to study development of the immune system*. *Advances in immunology*, 2003. **81**: p. 253-330.



42. Lam, S.H., et al., *Development and maturation of the immune system in zebrafish, Danio rerio: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study*. Developmental and comparative immunology, 2004. **28**(1): p. 9-28.
43. Boltana, S., et al., *PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish*. Developmental and comparative immunology, 2011. **35**(12): p. 1195-203.
44. Broz, P. and D.M. Monack, *Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens*. Nature reviews. Immunology, 2013. **13**(8): p. 551-65.
45. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clinical microbiology reviews, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
46. Sullivan, C. and C.H. Kim, *Zebrafish as a model for infectious disease and immune function*. Fish & shellfish immunology, 2008. **25**(4): p. 341-50.
47. Pietretti, D. and G.F. Wiegertjes, *Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies*. Developmental and comparative immunology, 2014. **43**(2): p. 205-22.
48. Wu, J. and Z.J. Chen, *Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids*. Annual review of immunology, 2014. **32**: p. 461-88.
49. Pang, I.K. and A. Iwasaki, *Control of antiviral immunity by pattern recognition and the microbiome*. Immunological reviews, 2012. **245**(1): p. 209-26.
50. Salinas, I., Y.A. Zhang, and J.O. Sunyer, *Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish*. Developmental and comparative immunology, 2011. **35**(12): p. 1346-65.
51. Varela, M., A. Figueras, and B. Novoa, *Modelling viral infections using zebrafish: Innate immune response and antiviral research*. Antiviral research, 2017. **139**: p. 59-68.
52. Lopez-Munoz, A., et al., *New insights into the evolution of IFNs: zebrafish group II IFNs induce a rapid and transient expression of IFN-dependent genes and display powerful antiviral activities*. Journal of immunology, 2009. **182**(6): p. 3440-9.
53. Zou, J. and C.J. Secombes, *Teleost fish interferons and their role in immunity*. Developmental and comparative immunology, 2011. **35**(12): p. 1376-87.
54. Varela, M., et al., *Interferon-induced genes of the expanded IFIT family show conserved antiviral activities in non-mammalian species*. PloS one, 2014. **9**(6): p. e100015.
55. Briolat, V., et al., *Contrasted innate responses to two viruses in zebrafish: insights into the ancestral repertoire of vertebrate IFN-stimulated genes*. Journal of immunology, 2014. **192**(9): p. 4328-41.
56. Holland, M.C. and J.D. Lambris, *The complement system in teleosts*. Fish & shellfish immunology, 2002. **12**(5): p. 399-420.
57. Nonaka, M. and S.L. Smith, *Complement system of bony and cartilaginous fish*. Fish & shellfish immunology, 2000. **10**(3): p. 215-28.
58. Zarkadis, I.K., et al., *Cloning and structure of three rainbow trout C3 molecules: a plausible explanation for their functional diversity*. Developmental and comparative immunology, 2001. **25**(1): p. 11-24.
59. Katzenback, B.A., *Antimicrobial Peptides as Mediators of Innate Immunity in Teleosts*. Biology, 2015. **4**(4): p. 607-39.
60. Bowdish, D.M., D.J. Davidson, and R.E. Hancock, *Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins*. Current topics in microbiology and immunology, 2006. **306**: p. 27-66.
61. Mookherjee, N. and R.E. Hancock, *Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2007. **64**(7-8): p. 922-33.
62. Mookherjee, N., L.M. Rehaume, and R.E. Hancock, *Cathelicidins and functional analogues as antiseptics molecules*. Expert opinion on therapeutic targets, 2007. **11**(8): p. 993-1004.

63. Falco, A., et al., *Antimicrobial peptides as model molecules for the development of novel antiviral agents in aquaculture*. Mini reviews in medicinal chemistry, 2009. **9**(10): p. 1159-64.
64. Zheng, Z., et al., *Study on the immune enhancement of different immunoadjuvants used in the pentavalent vaccine for turbot*. Fish & shellfish immunology, 2012. **32**(3): p. 391-5.
65. Scapigliati, G., *Functional aspects of fish lymphocytes*. Developmental and comparative immunology, 2013. **41**(2): p. 200-8.
66. Yamasaki, M., et al., *Role of CD4(+) and CD8alpha(+) T cells in protective immunity against Edwardsiella tarda infection of gibel carp, Carassius auratus langsdorfii*. Fish & shellfish immunology, 2014. **36**(1): p. 299-304.
67. Ye, J., et al., *The teleost humoral immune response*. Fish & shellfish immunology, 2013. **35**(6): p. 1719-28.
68. Raida, M.K. and K. Buchmann, *Development of adaptive immunity in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum) surviving an infection with Yersinia ruckeri*. Fish & shellfish immunology, 2008. **25**(5): p. 533-41.
69. Gao, Y., et al., *Molecular cloning and characterization of secretory and membrane-bound IgM of turbot*. Fish & shellfish immunology, 2014. **40**(2): p. 354-61.
70. Chettri, J.K., et al., *Differential immune response of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) at early developmental stages (larvae and fry) against the bacterial pathogen Yersinia ruckeri*. Developmental and comparative immunology, 2012. **36**(2): p. 463-74.
71. Zhang, Y.A., et al., *IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity*. Nature immunology, 2010. **11**(9): p. 827-35.
72. Flajnik, M.F., *All GOD's creatures got dedicated mucosal immunity*. Nature immunology, 2010. **11**(9): p. 777-9.
73. Kurtz, J., *Specific memory within innate immune systems*. Trends in immunology, 2005. **26**(4): p. 186-92.
74. Netea, M.G., J. Quintin, and J.W. van der Meer, *Trained immunity: a memory for innate host defense*. Cell host & microbe, 2011. **9**(5): p. 355-61.
75. Pulendram, B. and B. Ahmed, *Immunological mechanisms of vaccination*. Nature Immunology, 2011. **12**: p. 510-517.
76. Benn, C.S., et al., *A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines*. Trends Immunol, 2013. **34**(9): p. 431-9.
77. Netea, M.G., *Immunological memory in innate immunity*. Journal of innate immunity, 2014. **6**(2): p. 117-8.
78. Sun, J.C., J.N. Beilke, and L.L. Lanier, *Adaptive immune features of natural killer cells*. Nature, 2009. **457**(7229): p. 557-61.
79. Quintin, J., et al., *Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms*. Current opinion in immunology, 2014. **29**: p. 1-7.
80. Quintin, J., et al., *Candida albicans infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes*. Cell host & microbe, 2012. **12**(2): p. 223-32.
81. Garcia-Valtanen, P., et al., *Evaluation of trained immunity by beta-1, 3 (D)-glucan on murine monocytes in vitro and duration of response in vivo*. Immunology and cell biology, 2017.
82. Kleinnijenhuis, J., et al., *Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(43): p. 17537-42.
83. Kleinnijenhuis, J., et al., *BCG-induced trained immunity in NK cells: Role for non-specific protection to infection*. Clinical immunology, 2014. **155**(2): p. 213-9.

84. Marakalala, M.J., et al., *Dectin-1 plays a redundant role in the immunomodulatory activities of beta-glucan-rich ligands in vivo*. *Microbes and infection*, 2013. **15**(6-7): p. 511-5.
85. Novakovic, B., et al., *beta-Glucan Reverses the Epigenetic State of LPS-Induced Immunological Tolerance*. *Cell*, 2016. **167**(5): p. 1354-1368 e14.
86. Dalmo, R.A. and J. Bogwald, *Beta-glucans as conductors of immune symphonies*. *Fish & shellfish immunology*, 2008. **25**(4): p. 384-96.
87. Petit, J. and G.F. Wiegertjes, *Long-lived effects of administering beta-glucans: Indications for trained immunity in fish*. *Developmental and comparative immunology*, 2016. **64**: p. 93-102.
88. Vallejos-Vidal, E., et al., *The response of fish to immunostimulant diets*. *Fish & shellfish immunology*, 2016. **56**: p. 34-69.
89. Sahoo, P., *Role of immunostimulants in disease resistance of fish*. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources.*, 2007. **2**: p. 45.
90. Magnadottir, B., *Innate immunity of fish (overview)*. *Fish & shellfish immunology*, 2006. **20**(2): p. 137-51.
91. Flerova, E.A. and L.V. Balabanova, *[Ultrastructure of granulocytes of bony fishes (orders Salmoniformes, Cypriniformes, Perciformes)]*. *Zhurnal evoliutsionnoi biokhimii i fiziologii*, 2013. **49**(2): p. 162-71.
92. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. *Nature reviews. Microbiology*, 2004. **2**(10): p. 820-32.
93. Vásquez - Piñeros, M.A.R.-B., Iang S.; Eslava- Mocha, Pedro R., *Inmunoestimulantes en teleosteos: Probióticos, b-glucanos y LPS*. *Orinoquia*, 2012. **16**, núm. **1**: p. 46-62.
94. Mantovani, M.S., et al., *beta-Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer*. *Mutation research*, 2008. **658**(3): p. 154-61.
95. Selvaraj, V., K. Sampath, and V. Sekar, *Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (Cyprinus carpio) infected with Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 2005. **19**(4): p. 293-306.
96. Tada, R., et al., *Barley-derived beta-D-glucan induces immunostimulation via a dectin-1-mediated pathway*. *Immunology letters*, 2009. **123**(2): p. 144-8.
97. Rothfuchs, A.G., et al., *Dectin-1 interaction with Mycobacterium tuberculosis leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells*. *Journal of immunology*, 2007. **179**(6): p. 3463-71.
98. Palm, N.W. and R. Medzhitov, *Antifungal defense turns 17*. *Nature immunology*, 2007. **8**(6): p. 549-51.
99. Gunimaladevi, I., R. Savan, and M. Sakai, *Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish*. *Fish & shellfish immunology*, 2006. **21**(4): p. 393-403.
100. Falco, A., et al., *Reduced inflammatory response to Aeromonas salmonicida infection in common carp (Cyprinus carpio L.) fed with beta-glucan supplements*. *Fish & shellfish immunology*, 2012. **32**(6): p. 1051-7.
101. Zhang, Z., et al., *Bath immunostimulation of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes*. *Fish & shellfish immunology*, 2009. **26**(5): p. 677-84.
102. Obata, Y., Y. Furusawa, and K. Hase, *Epigenetic modifications of the immune system in health and disease*. *Immunology and cell biology*, 2015. **93**(3): p. 226-32.
103. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: a landscape takes shape*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 635-8.
104. Bird, A., *Perceptions of epigenetics*. *Nature*, 2007. **447**(7143): p. 396-8.
105. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. *The New England journal of medicine*, 2008. **358**(11): p. 1148-59.

106. Hensel, K.O., et al., *Virus-host-interplay in hepatitis B virus infection and epigenetic treatment strategies*. The FEBS journal, 2017.
107. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
108. Lee, D.Y., et al., *A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA*. Cell, 1993. **72**(1): p. 73-84.
109. Schafer, A. and R.S. Baric, *Epigenetic Landscape during Coronavirus Infection*. Pathogens, 2017. **6**(1).
110. Takeuchi, O. and S. Akira, *Epigenetic control of macrophage polarization*. Eur J Immunol, 2011. **41**(9): p. 2490-3.
111. Nicodeme, E., et al., *Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1119-23.
112. Leng, J., et al., *Toxoplasma gondii prevents chromatin remodeling initiated by TLR-triggered macrophage activation*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 489-97.
113. Belkina, A.C. and G.V. Denis, *BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(7): p. 465-77.
114. Khan, Y.M., et al., *Brd4 is essential for IL-1beta-induced inflammation in human airway epithelial cells*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95051.
115. Villagra, A., E.M. Sotomayor, and E. Seto, *Histone deacetylases and the immunological network: implications in cancer and inflammation*. Oncogene, 2010. **29**(2): p. 157-73.
116. Xia, M., et al., *Histone methyltransferase Ash1l suppresses interleukin-6 production and inflammatory autoimmune diseases by inducing the ubiquitin-editing enzyme A20*. Immunity, 2013. **39**(3): p. 470-81.
117. Ernst, P. and C.R. Vakoc, *WRAD: enabler of the SET1-family of H3K4 methyltransferases*. Brief Funct Genomics, 2012. **11**(3): p. 217-26.
118. Driever, W. and Z. Rangini, *Characterization of a cell line derived from zebrafish (Brachydanio rerio) embryos*. In vitro cellular & developmental biology. Animal, 1993. **29A**(9): p. 749-54.
119. SIGMA, A., *Imprint Chromatin Immunoprecipitation Kit*. 2011: Missouri, EEUU. p. 1-8.
120. New England Biolabs, *Manual of NEBNext® Ultra™ II, DNA Library Prep Kit for Illumina*, New England Biolabs, Editor. 2016.
121. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel, *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. Bioinformatics, 2014. **30**(15): p. 2114-20.
122. Langmead, B. and S.L. Salzberg, *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. Nature methods, 2012. **9**(4): p. 357-9.
123. Feng, J., et al., *Identifying ChIP-seq enrichment using MACS*. Nature protocols, 2012. **7**(9): p. 1728-40.
124. Pundir, S., et al., *Searching and Navigating UniProt Databases*. Current protocols in bioinformatics, 2015. **50**: p. 1 27 1-10.
125. Pundir, S., M.J. Martin, and C. O'Donovan, *UniProt Tools*. Current protocols in bioinformatics, 2016. **53**: p. 1 29 1-15.
126. Zang, C., et al., *A clustering approach for identification of enriched domains from histone modification ChIP-Seq data*. Bioinformatics, 2009. **25**(15): p. 1952-8.
127. Thorvaldsdottir, H., J.T. Robinson, and J.P. Mesirov, *Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration*. Brief Bioinform, 2013. **14**(2): p. 178-92.
128. Wang, J., et al., *WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit (WebGestalt): update 2013*. Nucleic acids research, 2013. **41**(Web Server issue): p. W77-83.
129. Kanehisa, M., et al., *KEGG as a reference resource for gene and protein annotation*. Nucleic acids research, 2016. **44**(D1): p. D457-62.
130. Fabregat, A., et al., *The Reactome pathway Knowledgebase*. Nucleic acids research, 2016. **44**(D1): p. D481-7.



131. Kelder, T., et al., *WikiPathways: building research communities on biological pathways*. Nucleic acids research, 2012. **40**(Database issue): p. D1301-7.
132. Subramanian, A., et al., *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(43): p. 15545-50.
133. Wang, J., et al., *WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013*. Nucleic acids research, 2013. **41**(Web Server issue: W77–W83).
134. Fortunel, N.O., et al., *Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature"*. Science, 2003. **302**(5644): p. 393; author reply 393.
135. Tay, A.P., et al., *PTMOracle: A Cytoscape App for Covisualizing and Coanalyzing Post-Translational Modifications in Protein Interaction Networks*. Journal of proteome research, 2017.
136. Szklarczyk, D., et al., *The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible*. Nucleic acids research, 2017. **45**(D1): p. D362-D368.
137. Babaei, F., et al., *Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish*. Journal of proteome research, 2013. **12**(4): p. 1580-90.
138. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
139. Ishihama, Y., et al., *Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein*. Molecular & cellular proteomics : MCP, 2005. **4**(9): p. 1265-72.
140. Arike, L. and L. Peil, *Spectral counting label-free proteomics*. Methods in molecular biology, 2014. **1156**: p. 213-22.
141. Laemmli, U., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
142. Felsenfeld, G. and M. Groudine, *Controlling the double helix*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 448-53.
143. Relton, C.L. and G. Davey Smith, *Epigenetic epidemiology of common complex disease: prospects for prediction, prevention, and treatment*. PLoS medicine, 2010. **7**(10): p. e1000356.
144. Choi, J.K., *Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome*. Genome biology, 2010. **11**(7): p. R70.
145. Elango, N. and S.V. Yi, *Functional relevance of CpG island length for regulation of gene expression*. Genetics, 2011. **187**(4): p. 1077-83.
146. Palini, S., et al., *Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation embryo development*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011. **1221**: p. 54-60.
147. Inbar-Feigenberg, M., et al., *Basic concepts of epigenetics*. Fertility and sterility, 2013. **99**(3): p. 607-15.
148. Ramakrishnan, V., *Histone structure and the organization of the nucleosome*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 1997. **26**: p. 83-112.
149. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
150. Zakhari, S., *Alcohol metabolism and epigenetics changes*. Alcohol research : current reviews, 2013. **35**(1): p. 6-16.
151. Espin-Palazon, R., et al., *TNFalpha Impairs Rhabdoviral Clearance by Inhibiting the Host Autophagic Antiviral Response*. PLoS pathogens, 2016. **12**(6): p. e1005699.
152. Martinez-Lopez, A., et al., *VHSV G glycoprotein major determinants implicated in triggering the host type I IFN antiviral response as DNA vaccine molecular adjuvants*. Vaccine, 2014. **32**(45): p. 6012-9.

153. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell, 2007. **129**(4): p. 823-37.
154. Santos-Rosa, H., et al., *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 407-11.
155. Murata, T., et al., *Epigenetic histone modification of Epstein-Barr virus BZLF1 promoter during latency and reactivation in Raji cells*. Journal of virology, 2012. **86**(9): p. 4752-61.
156. Jong, J.E., et al., *Alteration of histone H3 lysine 4 trimethylation on putative lytic gene promoters by human Set1 complex during reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. Intervirology, 2013. **56**(2): p. 91-103.
157. Neele, A.E., et al., *Epigenetic pathways in macrophages emerge as novel targets in atherosclerosis*. Eur J Pharmacol, 2015. **763**(Pt A): p. 79-89.
158. Hoeksema, M.A. and M.P. de Winther, *Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Function*. Antioxid Redox Signal, 2016. **25**(14): p. 758-774.
159. Ostuni, R., et al., *Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells*. Cell, 2013. **152**(1-2): p. 157-71.
160. Heinz, S., et al., *Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities*. Mol Cell, 2010. **38**(4): p. 576-89.
161. Wen, Z., et al., *Discovery of molecular mechanisms of traditional Chinese medicinal formula Si-Wu-Tang using gene expression microarray and connectivity map*. PloS one, 2011. **6**(3): p. e18278.
162. Garcia-Valtanen, P., et al., *Autophagy-inducing peptides from mammalian VSV and fish VHSV rhabdoviral G glycoproteins (G) as models for the development of new therapeutic molecules*. Autophagy, 2014. **10**(9): p. 1666-80.
163. Liu, L., et al., *Spring viraemia of carp virus induces autophagy for necessary viral replication*. Cellular microbiology, 2015. **17**(4): p. 595-605.
164. Ashraf, U., et al., *Spring viraemia of carp virus: recent advances*. The Journal of general virology, 2016. **97**(5): p. 1037-51.
165. Zou, J. and C.J. Secombes, *The Function of Fish Cytokines*. Biology, 2016. **5**(2).
166. Jiang, Z., et al., *Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(10): p. 3533-8.
167. Abos, B., et al., *Early activation of teleost B cells in response to rhabdovirus infection*. Journal of virology, 2015. **89**(3): p. 1768-80.
168. Tong, C., et al., *Transcriptome profiling analysis of naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) provides insights into the immune-related genes in highland fish*. Fish & shellfish immunology, 2015. **46**(2): p. 366-77.
169. Wallin, R.P., et al., *Heat-shock proteins as activators of the innate immune system*. Trends in immunology, 2002. **23**(3): p. 130-5.
170. Neumann, N.F., et al., *Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense*. Developmental and comparative immunology, 2001. **25**(8-9): p. 807-25.
171. Morgan, E.T., *Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how?* Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2001. **29**(3): p. 207-12.
172. Renton, K.W., *Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation*. Pharmacology & therapeutics, 2001. **92**(2-3): p. 147-63.
173. Reynaud, S., et al., *The effects of 3-methylcholanthrene on macrophage respiratory burst and biotransformation activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.)*. Fish & shellfish immunology, 2002. **12**(1): p. 17-34.

174. Marionnet, D., P. Deschaux, and S. Reynaud, *Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (Cyprinus carpio)*. Fish & shellfish immunology, 2006. **21**(1): p. 80-91.
175. Reynaud, S., et al., *Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor alpha modulate cytochrome P450 activities in carp (Cyprinus carpio)*. Ecotoxicology and environmental safety, 2005. **62**(3): p. 355-62.
176. Wang, J. and M.A. Maldonado, *The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases*. Cellular & molecular immunology, 2006. **3**(4): p. 255-61.
177. Hu, H. and S.C. Sun, *Ubiquitin signaling in immune responses*. Cell research, 2016. **26**(4): p. 457-83.
178. Schache, P., et al., *VSV virotherapy improves chemotherapy by triggering apoptosis due to proteasomal degradation of Mcl-1*. Gene Ther, 2009. **16**(7): p. 849-61.
179. Franco-Cortés, M.A., *Papel del TGF-β en la inmunidad contra los rotavirus*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat, 2016. **40**(154): p. 18-26.
180. Travis, M.A. and D. Sheppard, *TGF-beta activation and function in immunity*. Annual review of immunology, 2014. **32**: p. 51-82.
181. McWhirter, S.M., et al., *IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(1): p. 233-8.
182. Netea, M.G. and L.A. Joosten, *A NOD for autophagy*. Nature medicine, 2010. **16**(1): p. 28-30.
183. Sorrentino, A., et al., *The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner*. Nature cell biology, 2008. **10**(10): p. 1199-207.
184. Zou, P.F., et al., *NOD2 in zebrafish functions in antibacterial and also antiviral responses via NF-kappaB, and also MDA5, RIG-I and MAVS*. Fish & shellfish immunology, 2016. **55**: p. 173-85.
185. Liu, S., et al., *Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation*. Science, 2015. **347**(6227): p. aaa2630.
186. Nikolettou, V., et al., *Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy*. Biochimica et biophysica acta, 2013. **1833**(12): p. 3448-59.
187. Fulda, S., *Caspase-8 in cancer biology and therapy*. Cancer letters, 2009. **281**(2): p. 128-33.
188. Yuan, J., et al., *Transcriptome analysis of epithelioma papulosum cyprini cells after SVCV infection*. BMC genomics, 2014. **15**: p. 935.
189. Bjorklund, H.V., T.R. Johansson, and A. Rinne, *Rhabdovirus-induced apoptosis in a fish cell line is inhibited by a human endogenous acid cysteine proteinase inhibitor*. Journal of virology, 1997. **71**(7): p. 5658-62.
190. Zou, J., et al., *Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout Oncorhynchus mykiss: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish*. Journal of immunology, 2005. **175**(4): p. 2484-94.
191. Bello-Perez, M., et al., *Structure and functionalities of the human c-reactive protein compared to the zebrafish multigene family of c-reactive-like proteins*. Developmental and comparative immunology, 2017. **69**: p. 33-40.
192. Jia, R., et al., *Grass carp reovirus induces apoptosis and oxidative stress in grass carp (Ctenopharyngodon idellus) kidney cell line*. Virus research, 2014. **185**: p. 77-81.
193. Netea, M.G., et al., *Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors*. Current pharmaceutical design, 2006. **12**(32): p. 4195-201.
194. Ortega-Villaizan, M., et al., *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, 2009. **46**(8-9): p. 1710-7.

195. Ortega-Villaizan, M., et al., *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*, 2011. **29**(4): p. 737-43.
196. Su, J., et al., *Toll-like receptor 3 regulates Mx expression in rare minnow *Gobiocypris rarus* after viral infection*. *Immunogenetics*, 2008. **60**(3-4): p. 195-205.
197. Zhang, L., et al., *TBK1-like transcript negatively regulates the production of IFN and IFN-stimulated genes through RLRs-MAVS-TBK1 pathway*. *Fish & shellfish immunology*, 2016. **54**: p. 135-43.
198. Zhang, Y.B., et al., *The innate immune response to grass carp hemorrhagic virus (GCHV) in cultured *Carassius auratus blastulae* (CAB) cells*. *Developmental and comparative immunology*, 2007. **31**(3): p. 232-43.
199. Wei, X., et al., *Toll-like receptors and interferon associated immune factors responses to spring viraemia of carp virus infection in common carp (*Cyprinus carpio*)*. *Fish & shellfish immunology*, 2016. **55**: p. 568-76.
200. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
201. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. *Nature immunology*, 2007. **8**(9): p. 942-9.
202. McGeachy, M.J., et al., *The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo*. *Nature immunology*, 2009. **10**(3): p. 314-24.
203. Reyes-Cerpa, S., et al., *Induction of anti-inflammatory cytokine expression by IPNV in persistent infection*. *Fish & shellfish immunology*, 2014. **41**(2): p. 172-82.
204. Black, S., I. Kushner, and D. Samols, *C-reactive Protein*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 48487-90.
205. Bols, N.C., et al., *Ecotoxicology and innate immunity in fish*. *Dev Comp Immunol*, 2001. **25**(8-9): p. 853-73.
206. Qi, X.Z., et al., *Preliminary study on the relationship between dexamethasone and pathogen susceptibility on crucian carp (*Carassius auratus*)*. *Fish Shellfish Immunol*, 2016. **59**: p. 18-24.
207. Devaraj, S., et al., *C-reactive protein induces M-CSF release and macrophage proliferation*. *J Leukoc Biol*, 2009. **85**(2): p. 262-7.
208. Aggad, D., et al., *The two groups of zebrafish virus-induced interferons signal via distinct receptors with specific and shared chains*. *Journal of immunology*, 2009. **183**(6): p. 3924-31.
209. Grayfer, L., E.G. Garcia, and M. Belosevic, *Comparison of macrophage antimicrobial responses induced by type II interferons of the goldfish (*Carassius auratus* L.)*. *The Journal of biological chemistry*, 2010. **285**(31): p. 23537-47.
210. Pijanowski, L., et al., *Production of inflammatory mediators and extracellular traps by carp macrophages and neutrophils in response to lipopolysaccharide and/or interferon-gamma2*. *Fish & shellfish immunology*, 2015. **42**(2): p. 473-82.
211. Yang, K., et al., *IFN-gamma-activated lymphocytes boost nitric oxide production in grass carp monocytes/macrophages*. *Fish & shellfish immunology*, 2013. **35**(5): p. 1635-41.
212. Zhang, Y.B. and J.F. Gui, *Molecular regulation of interferon antiviral response in fish*. *Developmental and comparative immunology*, 2012. **38**(2): p. 193-202.
213. Sun, F., et al., *Characterization of fish IRF3 as an IFN-inducible protein reveals evolving regulation of IFN response in vertebrates*. *Journal of immunology*, 2010. **185**(12): p. 7573-82.
214. Au, W.C., W.S. Yeow, and P.M. Pitha, *Analysis of functional domains of interferon regulatory factor 7 and its association with IRF-3*. *Virology*, 2001. **280**(2): p. 273-82.



215. Altmann, S.M., et al., *Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, Danio rerio*. Journal of virology, 2003. **77**(3): p. 1992-2002.
216. Zou, J., et al., *Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates*. Journal of immunology, 2007. **179**(6): p. 3859-71.
217. Chen, Y.M., et al., *Functional analysis of an orange-spotted grouper (Epinephelus coioides) interferon gene and characterisation of its expression in response to nodavirus infection*. Developmental and comparative immunology, 2014. **46**(2): p. 117-28.
218. Robertsen, B., et al., *Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity*. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 2003. **23**(10): p. 601-12.
219. Maekawa, S., et al., *Expression and biological activity of two types of interferon genes in medaka (Oryzias latipes)*. Fish & shellfish immunology, 2016. **48**: p. 20-9.
220. Zhang, Y.B., Q. Li, and J.F. Gui, *Differential expression of two Carassius auratus Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and interferon*. Immunogenetics, 2004. **56**(1): p. 68-75.
221. Svingerud, T., et al., *Atlantic salmon type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFNb/IFNc-producing cells in fish lymphoid tissues*. Journal of immunology, 2012. **189**(12): p. 5912-23.
222. Tafalla, C., et al., *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, 2007. **23**(1): p. 210-21.
223. Langevin, C., et al., *Zebrafish ISG15 exerts a strong antiviral activity against RNA and DNA viruses and regulates the interferon response*. Journal of virology, 2013. **87**(18): p. 10025-36.
224. Chang, C.J., et al., *Protection of Atlantic salmon against virus infection by intramuscular injection of IFNc expression plasmid*. Vaccine, 2014. **32**(36): p. 4695-702.
225. Hee, J.S. and P. Cresswell, *Viperin interaction with mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) limits viperin-mediated inhibition of the interferon response in macrophages*. PloS one, 2017. **12**(2): p. e0172236.
226. Krasnov, A., et al., *Genomic survey of early responses to viruses in Atlantic salmon, Salmo salar L*. Molecular immunology, 2011. **49**(1-2): p. 163-74.
227. Ludwig, M., et al., *Whole-body analysis of a viral infection: vascular endothelium is a primary target of infectious hematopoietic necrosis virus in zebrafish larvae*. PLoS pathogens, 2011. **7**(2): p. e1001269.
228. Sun, C., et al., *Gig1 and Gig2 homologs (CiGig1 and CiGig2) from grass carp (Ctenopharyngodon idella) display good antiviral activities in an IFN-independent pathway*. Developmental and comparative immunology, 2013. **41**(4): p. 477-83.
229. Sun, F., et al., *Gig1, a novel antiviral effector involved in fish interferon response*. Virology, 2014. **448**: p. 322-32.
230. Zhang, Y.B., et al., *Identification of a novel Gig2 gene family specific to non-amniote vertebrates*. PloS one, 2013. **8**(4): p. e60588.
231. Li, S., et al., *Identification of Drel as an antiviral factor regulated by RLR signaling pathway*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32427.
232. Costa, M.M., et al., *Bioactivity studies of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) interleukin-6: effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression*. Molecular immunology, 2011. **48**(15-16): p. 1903-16.
233. Neves, J.V., et al., *Molecular mechanisms of hepcidin regulation in sea bass (Dicentrarchus labrax)*. Fish & shellfish immunology, 2011. **31**(6): p. 1154-61.
234. Shi, J. and A.C. Camus, *Hepcidins in amphibians and fishes: Antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones?* Developmental and comparative immunology, 2006. **30**(9): p. 746-55.

235. Lin, B., et al., *Acute phase response in zebrafish upon Aeromonas salmonicida and Staphylococcus aureus infection: striking similarities and obvious differences with mammals*. *Molecular immunology*, 2007. **44**(4): p. 295-301.
236. Gerwick, L., G. Corley-Smith, and C.J. Bayne, *Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus*. *Fish & shellfish immunology*, 2007. **22**(3): p. 157-71.
237. Ryzhakov, G., et al., *IL-17 receptor adaptor protein Act1/CIKS plays an evolutionarily conserved role in antiviral signaling*. *Journal of immunology*, 2012. **189**(10): p. 4852-8.
238. Su, J., et al., *Genomic organization and expression analysis of Toll-like receptor 3 in grass carp (Ctenopharyngodon idella)*. *Fish & shellfish immunology*, 2009. **27**(3): p. 433-9.
239. Yang, C. and J. Su, *Molecular identification and expression analysis of Toll-like receptor 3 in common carp Cyprinus carpio*. *Journal of fish biology*, 2010. **76**(8): p. 1926-39.
240. Huang, Y.K., et al., *The antitumor effect of the toll-like receptor 3 ligand polyinosinic-cytidylic acid as an adjuvant*. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 2013. **62**(2): p. 237-44.
241. Hwang, S.D., et al., *Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 3 in Japanese flounder, Paralichthys olivaceus*. *Developmental and comparative immunology*, 2012. **37**(1): p. 87-96.
242. Lu, L.F., et al., *Spring Viremia of Carp Virus N Protein Suppresses Fish IFN $\alpha$ 1 Production by Targeting the Mitochondrial Antiviral Signaling Protein*. *Journal of immunology*, 2016. **196**(9): p. 3744-53.
243. Majumdar, T., et al., *Induction of interferon-stimulated genes by IRF3 promotes replication of Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens*, 2015. **11**(3): p. e1004779.
244. Ran, Y., H.B. Shu, and Y.Y. Wang, *MITA/STING: a central and multifaceted mediator in innate immune response*. *Cytokine & growth factor reviews*, 2014. **25**(6): p. 631-9.
245. Watson, R.O., et al., *The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy*. *Cell host & microbe*, 2015. **17**(6): p. 811-9.
246. Biacchesi, S., et al., *Both STING and MAVS fish orthologs contribute to the induction of interferon mediated by RIG-I*. *PloS one*, 2012. **7**(10): p. e47737.
247. Ishikawa, H. and G.N. Barber, *STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling*. *Nature*, 2008. **455**(7213): p. 674-8.
248. Hansen, J.D. and S. La Patra, *Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection*. *Immunogenetics*, 2002. **54**(9): p. 654-61.
249. Benedetti, S., et al., *Evolution of cytokine responses: IL-1 $\beta$  directly affects intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of teleost fish leukocytes through a receptor-mediated mechanism*. *Cytokine*, 2006. **34**(1-2): p. 9-16.
250. Peddie, S., et al., *Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) recombinant IL-1 $\beta$  and derived peptides induce migration of head-kidney leucocytes in vitro*. *Fish & shellfish immunology*, 2001. **11**(8): p. 697-709.
251. Zou, J., et al., *Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish (Ictalurus punctatus)*. *Developmental and comparative immunology*, 2003. **27**(10): p. 845-58.
252. Garcia-Castillo, J., et al., *The tumor necrosis factor alpha of the bony fish seabream exhibits the in vivo proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2004. **61**(11): p. 1331-40.
253. Zhang, A., et al., *Functional characterization of TNF- $\alpha$  in grass carp head kidney leukocytes: induction and involvement in the regulation of NF- $\kappa$ B signaling*. *Fish & shellfish immunology*, 2012. **33**(5): p. 1123-32.

254. Cuesta, A., J. Meseguer, and M.A. Esteban, *Molecular and functional characterization of the gilthead seabream beta-defensin demonstrate its chemotactic and antimicrobial activity*. *Molecular immunology*, 2011. **48**(12-13): p. 1432-8.
255. Ruangsri, J., et al., *A novel beta-defensin antimicrobial peptide in Atlantic cod with stimulatory effect on phagocytic activity*. *PLoS one*, 2013. **8**(4): p. e62302.
256. Guo, M., et al., *Antiviral effects of beta-defensin derived from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)*. *Fish & shellfish immunology*, 2012. **32**(5): p. 828-38.
257. Casadei, E., et al., *Characterization of three novel beta-defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. *Molecular immunology*, 2009. **46**(16): p. 3358-66.
258. Zhang, J., et al., *Turbot (*Scophthalmus maximus*) hepcidin-1 and hepcidin-2 possess antimicrobial activity and promote resistance against bacterial and viral infection*. *Fish & shellfish immunology*, 2014. **38**(1): p. 127-34.
259. Rajanbabu, V. and J.Y. Chen, *The antimicrobial peptide, tilapia hepcidin 2-3, and PMA differentially regulate the protein kinase C isoforms, TNF-alpha and COX-2, in mouse RAW264.7 macrophages*. *Peptides*, 2011. **32**(2): p. 333-41.
260. Rajanbabu, V. and J.Y. Chen, *Antiviral function of tilapia hepcidin 1-5 and its modulation of immune-related gene expressions against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Chinook salmon embryo (CHSE)-214 cells*. *Fish & shellfish immunology*, 2011. **30**(1): p. 39-44.
261. Bao, B., et al., *Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection*. *Developmental and comparative immunology*, 2005. **29**(11): p. 939-50.
262. Cuesta, A., J. Meseguer, and M.A. Esteban, *The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream*. *Molecular immunology*, 2008. **45**(8): p. 2333-42.
263. Blackstock, W.P. and M.P. Weir, *Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins*. *Trends in biotechnology*, 1999. **17**(3): p. 121-7.
264. Martyniuk, C.J. and N.D. Denslow, *Exploring androgen-regulated pathways in teleost fish using transcriptomics and proteomics*. *Integrative and comparative biology*, 2012. **52**(5): p. 695-704.
265. Lucitt, M.B., et al., *Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development*. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2008. **7**(5): p. 981-94.
266. Lossner, C., et al., *Expanding the zebrafish embryo proteome using multiple fractionation approaches and tandem mass spectrometry*. *Proteomics*, 2012. **12**(11): p. 1879-82.
267. Link, V., et al., *Identification of regulators of germ layer morphogenesis using proteomics in zebrafish*. *Journal of cell science*, 2006. **119**(Pt 10): p. 2073-83.
268. Tay, T.L., et al., *Proteomic analysis of protein profiles during early development of the zebrafish, *Danio rerio**. *Proteomics*, 2006. **6**(10): p. 3176-88.
269. Wang, N., et al., *Proteome profile of cytosolic component of zebrafish liver generated by LC-ESI MS/MS combined with trypsin digestion and microwave-assisted acid hydrolysis*. *Journal of proteome research*, 2007. **6**(1): p. 263-72.
270. Li, C., et al., *Comprehensive and quantitative proteomic analyses of zebrafish plasma reveals conserved protein profiles between genders and between zebrafish and human*. *Scientific reports*, 2016. **6**: p. 24329.
271. Nordlie, F.G., *Environmental influences on regulation of blood plasma/serum components in teleost fishes: a review*. *Rev. Fish Biol.*, 2009. **19** (4): p. 481-564.
272. Eames, S.C., et al., *Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis*. *Zebrafish*, 2010. **7**(2): p. 205-13.
273. Corbin, R.W., et al., *Toward a protein profile of *Escherichia coli*: comparison to its transcription profile*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. **100**(16): p. 9232-7.

274. Kisrieva lu, S., et al., [Study of proteomic profile of *Danio rerio* embryos using one-dimensional electrophoresis and mass spectrometry]. *Biomeditsinskaia khimiia*, 2011. **57**(6): p. 593-603.
275. Chen, H., et al., *Promoter analysis and transcriptional regulation of a Gig2 gene in grass carp (Ctenopharyngodon idella)*. *Fish & shellfish immunology*, 2015. **42**(2): p. 249-55.
276. Zhong, L., et al., *Distribution of vitellogenin in zebrafish (Danio rerio) tissues for biomarker analysis*. *Aquatic toxicology*, 2014. **149**: p. 1-7.
277. Choi, K.M., et al., *Coagulation factor II from rock bream (Oplegnathus fasciatus): First report on the molecular biological function and expression analysis in the teleost*. *Fish & shellfish immunology*, 2016. **48**: p. 145-53.
278. Randow, F. and B. Seed, *Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability*. *Nature cell biology*, 2001. **3**(10): p. 891-6.
279. Yang, Y., et al., *Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages*. *Immunity*, 2007. **26**(2): p. 215-26.
280. Liu, L., et al., *Proteomic analysis of epithelioma papulosum cyprini cells infected with spring viremia of carp virus*. *Fish & shellfish immunology*, 2013. **35**(1): p. 26-35.
281. Lovoll, M., et al., *The C3 subtypes are differentially regulated after immunostimulation in rainbow trout, but head kidney macrophages do not contribute to C3 transcription*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2007. **117**(3-4): p. 284-95.
282. Arukwe, A. and A. Goksoyr, *Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption*. *Comparative hepatology*, 2003. **2**(1): p. 4.
283. Finn, R.N., Fyhn, H.J., *Requirement for amino acids in ontogeny of fish*. *Aquaculture Research*, 2010. **41**: p. 684-716.
284. Yin, N., et al., *Effects of adrenergic agents on the expression of zebrafish (Danio rerio) vitellogenin Ao1*. *Toxicology and applied pharmacology*, 2009. **238**(1): p. 20-6.
285. Tufail, M. and M. Takeda, *Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms*. *Journal of insect physiology*, 2009. **55**(2): p. 87-103.
286. Zhang, S., Y. Dong, and P. Cui, *Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish*. *Fish & shellfish immunology*, 2015. **46**(2): p. 710-5.
287. Matozzo, V., et al., *Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review*. *Environment international*, 2008. **34**(4): p. 531-45.
288. Shi, X., S. Zhang, and Q. Pang, *Vitellogenin is a novel player in defense reactions*. *Fish & shellfish immunology*, 2006. **20**(5): p. 769-72.
289. Zhang, S., et al., *Hemagglutinating and antibacterial activities of vitellogenin*. *Fish & shellfish immunology*, 2005. **19**(1): p. 93-5.
290. Zhang, S., et al., *Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2011. **43**(3): p. 303-5.
291. Tong, Z., et al., *Vitellogenin is an acute phase protein with bacterial-binding and inhibiting activities*. *Immunobiology*, 2010. **215**(11): p. 898-902.
292. Garcia, J., et al., *Atlantic salmon (Salmo salar L.) serum vitellogenin neutralises infectivity of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)*. *Fish & shellfish immunology*, 2010. **29**(2): p. 293-7.
293. Zhang, S., Z. Wang, and H. Wang, *Maternal immunity in fish*. *Developmental and comparative immunology*, 2013. **39**(1-2): p. 72-8.
294. Zhang, Y.B. and J.F. Gui, *Identification of two novel interferon-stimulated genes from cultured CAB cells induced by UV-inactivated grass carp hemorrhage virus*. *Diseases of aquatic organisms*, 2004. **60**(1): p. 1-9.
295. Zhang, Y.B. and J.F. Gui, *Identification and expression analysis of two IFN-inducible genes in crucian carp (Carassius auratus L.)*. *Gene*, 2004. **325**: p. 43-51.



296. Zhang, Y.B., Y.L. Wang, and J.F. Gui, *Identification and characterization of two homologues of interferon-stimulated gene ISG15 in crucian carp*. Fish & shellfish immunology, 2007. **23**(1): p. 52-61.
297. Netea, M.G., *Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence*. European journal of clinical investigation, 2013. **43**(8): p. 881-4.
298. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
299. Maitra, U., et al., *Molecular mechanisms responsible for the selective and low-grade induction of proinflammatory mediators in murine macrophages by lipopolysaccharide*. Journal of immunology, 2012. **189**(2): p. 1014-23.
300. Durrant, W.E. and X. Dong, *Systemic acquired resistance*. Annual review of phytopathology, 2004. **42**: p. 185-209.
301. Pham, L.N., et al., *A specific primed immune response in Drosophila is dependent on phagocytes*. PLoS pathogens, 2007. **3**(3): p. e26.
302. Paust, S., B. Senman, and U.H. von Andrian, *Adaptive immune responses mediated by natural killer cells*. Immunological reviews, 2010. **235**(1): p. 286-96.
303. Bowdish, D.M., et al., *Macrophage receptors implicated in the "adaptive" form of innate immunity*. Microbes and infection, 2007. **9**(14-15): p. 1680-7.
304. Vivier, E. and S. Ugolini, *Natural killer cells: from basic research to treatments*. Frontiers in immunology, 2011. **2**: p. 18.
305. Chen, D. and A.J. Ainsworth, *Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, Ictalurus punctatus Rafinesque*. Journal of fish diseases, 1992. **15**(4): p. 295-304.
306. Jorgensen, J.B. and B. Robertsen, *Yeast beta-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (Salmo salar L.) macrophages*. Developmental and comparative immunology, 1995. **19**(1): p. 43-57.
307. Siwicki, A.K., D.P. Anderson, and G.L. Rumsey, *Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis*. Veterinary immunology and immunopathology, 1994. **41**(1-2): p. 125-39.
308. Cheng, S.C., et al., *mTOR- and HIF-1alpha-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity*. Science, 2014. **345**(6204): p. 1250684.
309. Saeed, S., et al., *Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity*. Science, 2014. **345**(6204): p. 1251086.
310. Meena, D.K., et al., *Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review)*. Fish Physiol Biochem, 2013. **39**(3): p. 431-57.
311. Djordjevic, B., et al., *Modulation of splenic immune responses to bacterial lipopolysaccharide in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed lentinan, a beta-glucan from mushroom Lentinula edodes*. Fish Shellfish Immunol, 2009. **26**(2): p. 201-9.
312. Bagni, M., et al., *Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (Dicentrarchus labrax)*. Fish Shellfish Immunol, 2005. **18**(4): p. 311-25.
313. Beaulaurier, J., et al., *Susceptibility of Pacific herring to viral hemorrhagic septicemia is influenced by diet*. J Aquat Anim Health, 2012. **24**(1): p. 43-8.
314. Paredes, M., et al., *Immunomodulatory effect of prolactin on Atlantic salmon (Salmo salar) macrophage function*. Fish physiology and biochemistry, 2013. **39**(5): p. 1215-21.
315. Rodriguez, I., et al., *beta-Glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (Danio rerio)*. Fish & shellfish immunology, 2009. **27**(2): p. 369-73.
316. Sato, M., et al., *Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A*. Journal of immunology, 2003. **171**(1): p. 417-25.

317. Pinke, K.H., et al., *Mast cells phagocyte Candida albicans and produce nitric oxide by mechanisms involving TLR2 and Dectin-1*. Immunobiology, 2016. **221**(2): p. 220-7.
318. Vadiveloo, P.K., *Macrophages--proliferation, activation, and cell cycle proteins*. Journal of leukocyte biology, 1999. **66**(4): p. 579-82.
319. Ai, K., et al., *Expression pattern analysis of IRF4 and its related genes revealed the functional differentiation of IRF4 paralogues in teleost*. Fish & shellfish immunology, 2017. **60**: p. 59-64.
320. van der Sar, A.M., et al., *MyD88 innate immune function in a zebrafish embryo infection model*. Infection and immunity, 2006. **74**(4): p. 2436-41.
321. Havixbeck, J.J., et al., *Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish*. Journal of leukocyte biology, 2016. **99**(2): p. 241-52.
322. Rieger, A.M., et al., *Teleost soluble CSF-1R modulates cytokine profiles at an inflammatory site, and inhibits neutrophil chemotaxis, phagocytosis, and bacterial killing*. Developmental and comparative immunology, 2015. **49**(2): p. 259-66.
323. Varela, M., et al., *Cellular visualization of macrophage pyroptosis and interleukin-1beta release in a viral hemorrhagic infection in zebrafish larvae*. Journal of virology, 2014. **88**(20): p. 12026-40.
324. Udayangani, R.M., et al., *Feeding of nano scale oats beta-glucan enhances the host resistance against Edwardsiella tarda and protective immune modulation in zebrafish larvae*. Fish & shellfish immunology, 2017. **60**: p. 72-77.
325. El-Boshy, M.E., et al., *Immunomodulatory effect of dietary Saccharomyces cerevisiae, beta-glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (Oreochromis niloticus) and experimentally infected with Aeromonas hydrophila*. Fish & shellfish immunology, 2010. **28**(5-6): p. 802-8.
326. Falco, A., et al., *beta-Glucan-supplemented diets increase poly(I:C)-induced gene expression of Mx, possibly via Tlr3-mediated recognition mechanism in common carp (Cyprinus carpio)*. Fish & shellfish immunology, 2014. **36**(2): p. 494-502.
327. Pionnier, N., et al., *Dietary beta-glucan stimulate complement and C-reactive protein acute phase responses in common carp (Cyprinus carpio) during an Aeromonas salmonicida infection*. Fish & shellfish immunology, 2013. **34**(3): p. 819-31.
328. Chang, C.S., et al., *Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, Epinephelus coioides, aquaculture*. Fish & shellfish immunology, 2013. **35**(1): p. 115-25.
329. Wu, J.W.Y.Z.Z.X.X., *The crosstalk between TLR2 and NOD2 in Aspergillus fumigatus keratitis*. Molecular Immunology, 2015. **64**(2): p. 235-43.
330. Figueras, A., M.M. Santarem, and B. Novoa, *Influence of the sequence of administration of beta-glucans and a Vibrio damsela vaccine on the immune response of turbot (Scophthalmus maximus L.)*. Veterinary immunology and immunopathology, 1998. **64**(1): p. 59-68.
331. Misra, C.K., et al., *Effect of multiple injections of beta-glucan on non-specific immune response and disease resistance in Labeo rohita fingerlings*. Fish & shellfish immunology, 2006. **20**(3): p. 305-19.
332. Guselle, N.J., R.J. Markham, and D.J. Speare, *Intraperitoneal administration of beta-1,3/1,6-glucan to rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), protects against Loma salmonae*. Journal of fish diseases, 2006. **29**(6): p. 375-81.
333. Selvaraj, V., K. Sampath, and V. Sekar, *Adjuvant and immunostimulatory effects of beta-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with Aeromonas hydrophila*. Veterinary immunology and immunopathology, 2006. **114**(1-2): p. 15-24.

334. Mulder, I.E., S. Wadsworth, and C.J. Secombes, *Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during infection with Aeromonas salmonicida*. Fish & shellfish immunology, 2007. **23**(4): p. 747-59.
335. Tafalla, C., J. Coll, and C.J. Secombes, *Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) after viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection*. Developmental and comparative immunology, 2005. **29**(7): p. 615-26.
336. Lindenstrom, T., C.J. Secombes, and K. Buchmann, *Expression of immune response genes in rainbow trout skin induced by Gyrodactylus derjavini infections*. Veterinary immunology and immunopathology, 2004. **97**(3-4): p. 137-48.
337. Bridle, A.R., et al., *The effect of beta-glucan administration on macrophage respiratory burst activity and Atlantic salmon, Salmo salar L., challenged with amoebic gill disease-evidence of inherent resistance*. Journal of fish diseases, 2005. **28**(6): p. 347-56.
338. Ortuno, J., et al., *Oral administration of yeast, Saccharomyces cerevisiae, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (Sparus aurata L.)*. Veterinary immunology and immunopathology, 2002. **85**(1-2): p. 41-50.
339. van der Meer, J.W., et al., *Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence*. Molecular immunology, 2015. **68**(1): p. 40-4.
340. Derrick, S.C., *Trained Immunity and Susceptibility to HIV*. Clin Vaccine Immunol, 2017. **24**(1).
341. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nature immunology, 2010. **11**(10): p. 889-96.
342. Roberts, T.L., et al., *HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA*. Science, 2009. **323**(5917): p. 1057-60.
343. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie, *Sensing and signaling in antiviral innate immunity*. Current biology : CB, 2010. **20**(7): p. R328-33.
344. Unterholzner, L., *The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors?* Immunobiology, 2013. **218**(11): p. 1312-21.
345. Melchjorsen, J., et al., *Early innate recognition of herpes simplex virus in human primary macrophages is mediated via the MDA5/MAVS-dependent and MDA5/MAVS/RNA polymerase III-independent pathways*. Journal of virology, 2010. **84**(21): p. 11350-8.
346. Zou, P.F., et al., *Higher antiviral response of RIG-I through enhancing RIG-I/MAVS-mediated signaling by its long insertion variant in zebrafish*. Fish & shellfish immunology, 2015. **43**(1): p. 13-24.
347. Feng, H., et al., *Expression profiles of carp IRF-3/-7 correlate with the up-regulation of RIG-I/MAVS/TRAF3/TBK1, four pivotal molecules in RIG-I signaling pathway*. Fish & shellfish immunology, 2011. **30**(4-5): p. 1159-69.
348. Chen, W.Q., et al., *MAVS splicing variants contribute to the induction of interferon and interferon-stimulated genes mediated by RIG-I-like receptors*. Developmental and comparative immunology, 2015. **49**(1): p. 19-30.