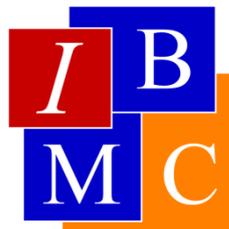


TRABAJO DE FIN DE GRADO



Implicación de los eritrocitos de trucha en la respuesta inmune frente a IPNV

4º Grado en Biotecnología - UMH

Área de conocimiento: Bioquímica y Biología Molecular

L. Aurora Carrión Pérez

01/06/2017

Tutor: Luis Pérez García-Estañ

Cotutora: M^a del Mar Ortega Villaizán-Romo

Cotutor: Iván Nombela Díaz

Facultad de Ciencias Experimentales

Instituto de Biología Molecular y Celular

Índice

1.	Introducción	5
2.	Antecedentes del estudio	11
2.1.	Reconocimiento de PAMPs y expresión de TLRs.....	11
2.2.	Secreción de factores semejantes a citoquinas por parte de RBCs nucleados.	12
2.3.	Fagocitosis.....	12
3.	Objetivos	13
4.	Materiales y métodos	14
4.1.	Animales	14
4.2.	Ética	14
4.3.	Líneas celulares.....	14
4.4.	Virus.....	14
4.5.	Purificación de RBCs.....	15
4.6.	Infecciones virales.....	15
4.7.	Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA	16
4.8.	qPCR y expresión de genes	18
4.9.	Tinción intracelular y citometría de flujo	19
4.10.	Anticuerpos	19
4.11.	Ensayos de inmunización	20
4.12.	Tinción intracelular de IPNV	20
4.13.	Software y estadísticas.....	20
5.	Resultados	22
5.1.	Ensayo de infectividad de IPNV en RBCs de trucha.	22
5.2.	Expresión de genes antivirales en RBCs de trucha infectados con IPNV.....	24
5.3.	Expresión de la proteína Mx en RBCs de trucha infectados con IPNV.	26
5.4.	Producción de interleucinas en RBCs infectados con IPNV.	28
5.5.	Ensayo de inmunización	30
6.	Discusión	31
7.	Conclusiones y proyección futura	33
7.1.	Perspectivas futuras.....	33
8.	Agradecimientos	33
9.	Bibliografía	34

Lista de abreviaturas

- RBCs: eritrocitos o glóbulos rojos de la sangre
- IPN: necrosis pancreática infecciosa
- IPNV: virus de la necrosis pancreática infecciosa
- PRRs: receptores celulares identificadores de patrones
- PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos
- TLR: receptor de tipo Toll
- IFN-1: interferón tipo I
- IFN- α : interferón alfa
- IFN- β : interferón beta
- MHC-I: complejo mayor de histocompatibilidad
- TLR3: receptor de tipo Toll 3
- ISRE: elementos de respuesta estimulada por interferón
- ISGs: genes estimulados por interferón
- PRV: ortoreovirus acuático
- ISAV: virus de la anemia infecciosa de salmónidos
- RPMI: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
- TCID: Tissue Culture Infective Dose
- FBS: suero bovino fetal
- CHSE: CHinook Salmo Embryo

Resumen

Las enfermedades de origen vírico amenazan a la acuicultura, causando grandes pérdidas económicas. Para combatirlas se pretenden encontrar estrategias antivirales que aminoren estos daños. En este trabajo los RBCs son objeto de estudio ya que se cree que su función podría ser una pieza clave en el sistema inmunitario. Por tanto, aquí se quiere evaluar la implicación de los eritrocitos o RBCs de trucha en la respuesta inmunitaria frente a la infección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), causante de una de las enfermedades más comunes en acuicultura, denominada necrosis pancreática infecciosa (IPN). Los RBCs fueron infectados con IPNV ex vivo con el objetivo de evaluar la infectividad y respuesta inmune inducida mediante qPCR, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Los resultados muestran la prácticamente ausencia de replicación de IPNV en los RBCs, sin embargo fue observada una respuesta inmune caracterizada por la expresión de genes de la ruta de IFN-1, inducción de Mx y producción de IL-1 β e IL-8 en los RBCs. Estos resultados sugieren que los RBCs podrían estar implicados en la respuesta frente a infecciones víricas.

Palabras clave

Eritrocitos, trucha, IPNV, respuesta inmune, Mx, interferón tipo 1.

Abstract

Viral diseases threaten aquaculture, causing major economic losses. In order to combat them, we intend to find antiviral strategies to reduce these damages. In this study RBCs are the subject of study and it is believed that their role could be a key element in the immune system. Therefore, here we want to evaluate the involvement of erythrocytes or trout RBCs in the immune response to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), which causes one of the most common diseases in aquaculture, called pancreatic necrosis Infectious (IPN). The RBCs were infected with IPNV ex vivo with the objective of evaluating the infectivity and immune response induced by qPCR, flow cytometry and fluorescence microscopy. The results show the virtually absence of IPNV replication in the RBCs, however they observed an immune response characterized by the expression of IFN-1 pathway genes, Mx induction and IL-1 β and IL-8 production in RBCs. The results suggest that RBCs are involved in the response to viral infections.

Keywords

Erythrocytes, trout, IPNV, immune response, Mx, IFN-1.



1. Introducción

En las últimas décadas ha habido un desarrollo creciente de la acuicultura, en todo este tiempo se han visto numerosas patologías que han creado la necesidad de desarrollar estrategias preventivas contra esas infecciones. La protección de las poblaciones de peces cultivados frente a las enfermedades causadas por bacterias y virus, principalmente, es uno de los aspectos más importantes que tiene por solventar la industria de la acuicultura pues son muchas las pérdidas ocasionadas, lo que hace que disminuyan la tasa de producción y rentabilidad (Crane and Hyatt 2011). Se han usado diferentes químicos y antibióticos para controlar los agentes infecciosos, pero estos productos presentan efectos colaterales como la acumulación del compuesto en el músculo del pez, desarrollo de resistencias microbianas y contaminación de los ambientes acuáticos.

Todos los avances conseguidos hasta el momento han ido ligados al conocimiento del sistema inmunitario de los peces. Los peces presentan una respuesta inmunológica desarrollada e integrada, y en el caso de los teleósteos, con algunas similitudes respecto a los vertebrados superiores. El sistema de defensa de los peces, puede ser dividido en dos: sistema de defensa innato, natural o inespecífico y sistema inmune adquirido o específico. El innato es el que poseen todos los seres vivos desde el nacimiento y el adquirido involucra la producción de anticuerpos a través de un reconocimiento específico del antígeno, e intervienen elementos celulares. En los peces existen dos factores que influyen la respuesta inmune y la producción de anticuerpos, que son los cambios estacionales y la temperatura, debido a su carácter poiquilotérmico (Levraud and Boudinot 2009).

La inmunidad adaptativa en peces no es tan efectiva como en mamíferos, por cuestiones evolutivas. Esta ineficiencia se hace presente por un repertorio limitado de anticuerpos (Bengtén, Clem et al. 2006), débil proliferación de células B y lenta maduración de los anticuerpos para dar afinidad a los antígenos (Magor 2015). Por todo esto el sistema inmune innato cobra más importancia, lo cual lleva a pensar que las células que intervienen en él pueden estar involucradas en la respuesta inmune y es aquí donde entran los eritrocitos (RBCs).

En cuanto a los RBCs, son las células más abundantes del torrente sanguíneo. La principal función de los RBCs es el transporte e intercambio de oxígeno y dióxido de carbono. El oxígeno es transportado desde los órganos respiratorios hacia los tejidos del organismo y el dióxido de carbono en sentido opuesto. La función de intercambio de gases es la más conocida, no obstante también se les han atribuido otras funciones relacionadas con procesos biológicos diferentes. En los vertebrados no mamíferos: peces, anfibios, reptiles y aves, los eritrocitos mantienen el núcleo a lo largo de su vida, sin embargo los mamíferos lo expulsan para llegar a su máxima maduración.

Ha sido demostrado con diversos estudios que los eritrocitos de vertebrados no mamíferos contienen en el núcleo cromatina condensada y descondensada, y en el citoplasma la maquinaria celular necesaria para poder traducir el mRNA a proteína lo que indicaría su capacidad para responder a diversos estímulos (Morera and MacKenzie 2011).

La trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) es, entre los peces teleósteos, una especie modelo en acuicultura para el desarrollo de estudios relacionados con enfermedades infecciosas que afectan a peces y por ello su sistema inmune es uno de los mejores caracterizados. Su sistema defensivo está compuesto de subpoblaciones de leucocitos que incluyen los linfocitos B y T, los granulocitos, los trombocitos, los macrófagos y las células citotóxicas inespecíficas (Secombes and Wang 2012).

Generalmente, en acuicultura entre las enfermedades víricas más frecuentes, ocasionadas por contagios directos o indirectos, se encuentra la necrosis pancreática infecciosa (IPN). IPN es una enfermedad viral en salmónidos y en los individuos afectados provoca oscurecimiento de la piel e hinchazón abdominal. Cuando se realiza una autopsia del individuo se observa daño interno en el páncreas y moco espeso en los intestinos. La coordinación motora disminuye, con movimientos lentos y aletargados, nadando lateralmente en espiral y hundiéndose con frecuencia. Esta sintomatología es un signo terminal (S.F. 1981).

El virus que causa esta enfermedad es el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV). Es un virus de la familia *Birnaviridae* que pertenece al género

Aquabirnavirus. IPNV fue el primer virus de peces aislado en cultivo celular y ha sido el virus más estudiado hasta la fecha.

Sus características son ausencia de envuelta, forma icosaédrica del virión y posee un genoma con RNA de doble cadena que consta de dos segmentos, denominados A y B. El segmento A codifica una poliproteína que se escinde post-traduccionalmente para dar tres proteínas virales VP2, VP3 y VP4. El segmento B codifica para la proteína VP1 (Hill 1995).

Funcionalmente, las proteínas del virus tienen las siguientes funciones:

- VP1 es una RNA polimerasa dependiente de RNA.
- VP2 es una proteína formadora de la cápside. Los epítomos VP2 son los responsables de la especificidad del serotipo y el blanco para anticuerpos.
- VP3 es una proteína interna que se cree que está implicada en el ensamblaje.
- VP4 es una proteasa.

El IPNV presenta algunas características de las que carecen otros virus de doble cadena de RNA:

- Su genoma consta de dos segmentos, siendo el segmento A estructural y bicistrónico.
- La proteína VP1 está unida al genoma VPg y de forma libre dentro de la partícula viral.
- Su mecanismo de transcripción es semiconservativo.

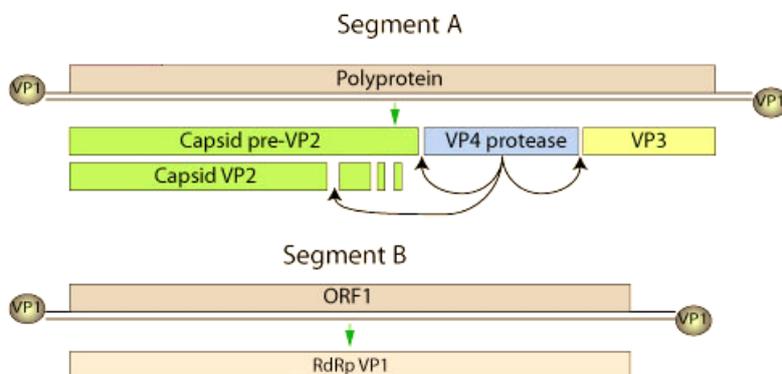


Figura 1. Esquema del genoma de IPNV y de la codificación de proteínas (familia Birnaviridae).

El reconocimiento de los virus como agentes infecciosos es llevado a cabo por un número creciente de receptores celulares que identifican patrones (PRRs), llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como los receptores de tipo Toll (TLRs). Los PRRs pueden encontrarse en la matriz extracelular, solubles en el citoplasma y en membranas celulares. A su vez, se ha visto que diversos tejidos de trucha contienen RNA_m capaz de codificar para distintos tipos de TLRs (Rodríguez, Wiens et al. 2005).

El conocimiento de los mecanismos de defensa del sistema inmune innato es clave para el desarrollo de estrategias frente a las infecciones víricas. Las proteínas Mx, dada su actividad antiviral directa, juegan un papel fundamental en el proceso antiviral desencadenado por el interferón tipo I (IFN-I) en respuesta a las infecciones virales (Robertsen 2006). Los interferones son proteínas secretadas por células infectadas por virus que protegen de la infección viral a otras células adyacentes, debido a que los interferones estimulan la producción de proteínas que inhiben la replicación de virus en las células que aún no han sido infectadas. Existen dos tipos principales de interferón: los tipo 1 están representados por el interferón alfa (IFN- α) y el interferón beta (IFN- β). El IFN- α es producido principalmente por los leucocitos infectados por virus, mientras que el IFN- β es producido por fibroblastos infectados por virus. El IFN- α también estimula la síntesis de proteínas clase 1 del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I), estas moléculas están en las membranas de todas las células con núcleo y presentan al antígeno para que sea reconocido por el sistema inmune.

Las células infectadas por virus reconocen el dsRNA viral por el receptor de tipo Toll 3 (TLR3). TLR3 tiene una señalización independiente de MyD88 y realiza la función a través de TRIF, que es un adaptador de la respuesta de activación de TLRs.

TRIF conlleva a la activación final de TBK1 mediante la fosforilación de IKK γ e IKK ϵ . Esta fosforilación produce la activación de TBK1 y a su vez activa a los factores de transcripción IRF3 e IRF7 mediante su fosforilación. Posteriormente, se produce la dimerización y translocación al núcleo donde se unen a sitios específicos de los promotores de interferón de tipo 1 (IFN-1).

Los IFN1 son secretados y se unen al receptor IFN- α/β , que está expresado en la mayoría de las células del sistema inmune. La unión activa las quinasas TYK2 y JAK1, que fosforilan los factores de transcripción STAT1 y STAT2.

Los factores de transcripción STAT activados forman un dímero. IRF9 puede unirse durante la translocación al núcleo. Una vez el dímero se ha translocado al núcleo, se unen a elementos de respuesta estimulada por interferón (ISRE) en los promotores de genes estimulados por interferón (ISGs). Finalmente, la transcripción de ISGs se induce y conduce a la producción de proteínas antivirales intracelulares tales como la proteína Mx.

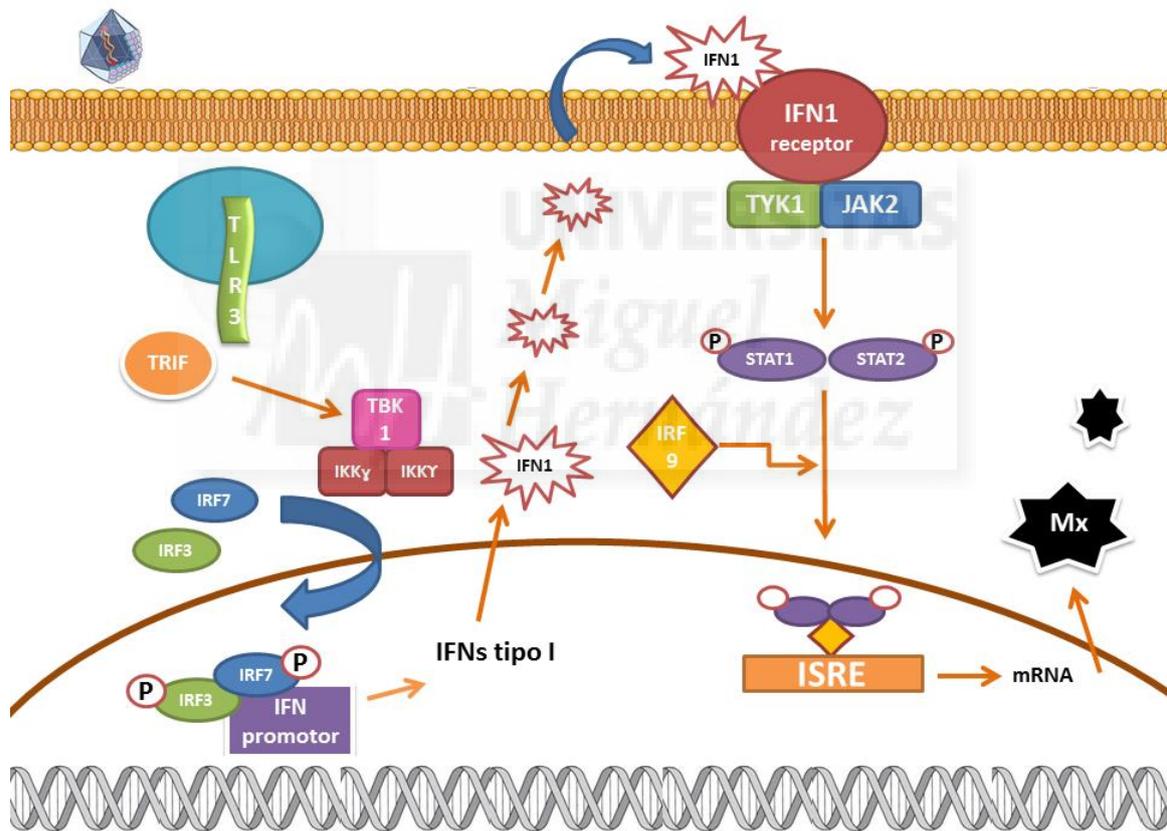


Figura 2. Ruta de la cascada del interferón hacia la producción de proteína antiviral Mx, ante estimulación de la célula por la presencia de partículas víricas.

Mx es una proteína de la familia de las dinaminas que presenta una actividad GTPasa. Dicha actividad es vital para realizar su actividad antiviral. Típicamente, Mx inhibe replicación de virus de RNA de polaridad negativa, aunque se ha visto que puede inhibir a virus de distintas familias. En salmón se ha visto que Mx puede inhibir a IPNV (Lockhart, McBeath et al. 2007).

Paralelamente a la proteína Mx, está la proteína antiviral PKR. PKR es una kinasa activada por el RNA bicatenario e inducida por interferón que se sabe que puede proteger frente a infecciones virales (Gamil, Xu et al. 2016).



2. Antecedentes del estudio

Existen virus capaces de infectar RBCs, lo cual ha sido demostrado con el ortoreovirus acuático (PRV) (Finstad, Dahle et al. 2014) (Wessel, Olsen et al. 2015) y el virus de la anemia infecciosa de salmónidos (ISAV) (Workenhe, Kibenge et al. 2008). En ambos se encontró que durante las primeras fases de infección las cargas víricas en sangre fueron mayores que en cualquier otro órgano, siendo los eritrocitos la fracción de la sangre donde más virus se encontró.

En cuanto a ISAV, estudios demuestran que la hemaglutinación inducida por ISAV da como resultado la absorción de virus y la infección productiva de eritrocitos acompañados de un aumento significativo de IFN-1 (Workenhe, Kibenge et al. 2008). Con esto, se constata que los RBCs de los peces responden inmunológicamente a la infección por ISAV. En el caso de PRV diversos estudios demuestran que los RBCs son las principales células diana para PRV (Finstad, Dahle et al. 2014). Los RBCs contenían altos niveles tanto de proteína como de RNA del virus, constatado por citometría de flujo y RT-qPCR, respectivamente. La proteína viral se localizó en inclusiones citoplasmáticas semejantes a fábricas virales observadas por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Otro estudio reciente, concluyó que la infección por PRV activa la inmunidad antiviral innata en eritrocitos de salmón, pues se vieron estimulados diversos genes regulados por interferón. (Dahle, Wessel et al. 2015)

Como antecedentes, cabe destacar que los RBCs se han visto implicados en muchos procesos celulares, tales como:

2.1. Reconocimiento de PAMPs y expresión de TLRs.

La estimulación de TLRs induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias y proteínas antivirales. En el caso de los virus y RBCs, se ha demostrado que los RBCs expresan TLRs, a nivel de transcritos de mRNA, concretamente TLR3 capaz de reconocer dsRNA viral (Morera, Roher et al. 2011).

2.2. Secreción de factores semejantes a citoquinas por parte de RBCs nucleados.

Las citoquinas regulan la respuesta inmune, induciendo o inhibiendo la producción de otras citoquinas y sus respectivos receptores y activando mecanismos de transducción de señales en células adyacentes o sobre ellas mismas. En eritrocitos nucleados de ave se ha visto que estas células son capaces de secretar sustancias análogas a las citoquinas y mediar en la respuesta inmune (Passantino, Massaro et al. 2007). Además, otro estudio muestra que RBCs de peces responden inmunológicamente a la infección por ISAV, puesto que la hemaglutinación inducida por ISAV da como resultado la absorción de virus y la infección productiva de RBCs de salmón acompañados por una inducción significativa de IFN-alfa (Workenhe, Kibenge et al. 2008).

2.3. Fagocitosis.

La fagocitosis es un mecanismo celular de ingestión y digestión de material antigénico particulado, y es la reacción de defensa más ampliamente distribuida tanto en vertebrados como en invertebrados. En teleósteos, han sido descritas diferentes células con capacidad fagocítica, además de granulocitos y macrófagos, como las células B. Los RBCs de peces tienen una capacidad no discriminatoria para identificar dianas. En estos estudios (Passantino, Altamura et al. 2002) (Passantino, Altamura et al. 2004) se usó como antígeno *Candida albicans*, para evaluar la capacidad fagocítica de los RBCs de trucha. Finalmente se observó que los RBCs sí tenían interacción con el hongo, ya que *C. albicans* se unía a las membranas de las células y era engullido. Además de esto, se observó la formación de rosetas alrededor del hongo lo que podría indicar que los RBCs ejercen una presentación de los antígenos.

3. Objetivos

Como se ha explicado el sistema inmune de los peces no está del todo descrito y es a partir de este hecho donde se plantean una serie de hipótesis.

¿Pueden los RBCs ser la pieza clave para completar el conocimiento del sistema inmune de los peces? ¿Pueden los RBCs de peces estar involucrados en la respuesta inmune frente a infecciones virales? Aunque se sabe que ciertos virus tienen los RBCs como diana, el papel de los RBCs en los procesos virales dirigidos a otros tipos celulares sigue siendo desconocido.

Los objetivos que se plantean en este trabajo son:

- Evaluar la capacidad de infección de IPNV en RBCs de trucha.
- Analizar la respuesta inmune de RBCs frente a IPNV mediante la expresión de genes y proteínas antivirales.
- Analizar los mecanismos de señalización implicados en esta respuesta inmune.
- Determinar la capacidad de los RBCs para inducir la protección de otras células frente a una infección de IPNV.

4. Materiales y métodos

4.1. Animales

Los individuos de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) empleados fueron de aproximadamente 10 gramos, fueron obtenidos por una granja comercial y mantenidos en la Universidad Miguel Hernández (UMH) a 14°C. Antes de realizar experimentos, los peces se aclimataron a las condiciones del animalario durante 2 semanas.

4.2. Ética

Todos los protocolos y métodos experimentales de los animales fueron revisados y aprobados por el Cuerpo de Bienestar Animal y el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Miguel Hernández. Todos los métodos se llevaron a cabo de conformidad con el Real Decreto RD 53/2013 y la Directiva UE 2010/63/UE por el personal cualificado para tales labores.

4.3. Líneas celulares

Se utilizó la línea celular CHSE (*Chinook Salmo Embryo*). Es una línea celular embrionaria de salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*) susceptible de ser infectada por IPNV (Marroqui, Estepa et al. 2008). Las células fueron crecidas en placas de 96 pocillos a 22° C.

4.4. Virus

Se trabajó con IPNV, el cual fue aislado previamente (Cepa Sp) (Hill 1995) y cuyas infecciones se desarrollaron a 14°C. El medio de cultivo utilizado fue el medio RPMI 2%.

4.5. Purificación de RBCs

Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal de la trucha arco iris utilizando jeringas de insulina (NIPRO). Anteriormente, la trucha arcoiris fue sacrificada por sobreexposición a triclaína (metanosulfonato de triclaína) (Sigma-Aldrich) a 0,2 g / L. Las muestras de sangre se colocaron en un eppendorf de 2 mL con medio RPMI-1640 (Dutch modification) (Thermo Fischer Scientific) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) gamma (Cultek), penicilina 100 U/mL y estreptomicina (Sigma-Aldrich). A continuación, los RBCs se purificaron mediante dos centrifugaciones consecutivas de gradiente de densidad (2000 rpm, 30 min.) con Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich). Para realizar el gradiente, 2 mL de sangre diluida en RPMI 10% se añadieron sobre 2 mL de Histopaque evitando que se mezclaran. Finalmente, los RBCs se lavaron dos veces con 4 mL de RPMI al 2%. Los RBCs purificados se cultivaron en el medio indicado anteriormente a una densidad de 10^7 células/mL en botes de cultivo celular a 14 °C con medio RPMI 10%.

4.6. Infecciones virales

Las infecciones de RBCs se realizaron incubando RBCs con IPNV a m.o.i 1 (multiplicidad de infección) con RPMI 2%. Después de tres horas de incubación, los RBCs se centrifugaron a 1600 rpm durante 5 minutos y luego se lavaron con medio RPMI para retirar completamente el virus. Finalmente, los RBCs se colocaron en placas de 24 pocillos con 500 µl de RPMI al 2% el tiempo indicado en los distintos experimentos. En los experimentos de time-course, el sobrenadante inicial con virus no se retiró. Para la recogida de las muestras a distintos tiempos, los RBCs se lavaron con medio frío RPMI 2% y las líneas celulares con PBS frío suplementado con calcio. El proceso completo se realizó a 14° C.

La composición del PBS utilizado es la siguiente:

- Cloruro de sodio: 40 gramos
- Cloruro de potasio: 1 gramo
- Fosfato de disodio: 7,2 gramos
- Fosfato monopotásico: 1,2 gramos
- 500 ml agua destilada

El título del virus presente en los sobrenadantes de los RBCs infectados con IPNV se determinó mediante un ensayo TCID₅₀. Brevemente, se añadieron diferentes diluciones de los sobrenadantes (de 10⁻¹ a 10⁻⁴) a monocapas de células CHSE durante 90 minutos a 14°C. A continuación, los medios de cultivo se retiraron y las monocapas de células infectadas se cubrieron con una solución de medio de cultivo de células RPMI-1640 con RPMI 2%. Las placas de células se incubaron a 14°C durante 7 días y luego se retiró el medio. Finalmente, una vez concluido el tiempo de infección, las monocapas de células se tiñeron y fijaron con violeta cristal-formalina. El título de virus, expresado como TCID₅₀/ml, se calculó como el inverso de la última dilución con efecto citopático en el 50 % de los replicados, según la fórmula:

$$\frac{1}{10^{-(\log \text{dilución} > 50\% - I)}} \cdot 10$$

donde I = (porcentaje pocillos infectados en la dilución con más del 50% de infección - 50%) / (porcentaje pocillos infectados en la primera dilución con más del 50% de infección - porcentaje de pocillos infectados en la primera dilución con menos del 50% de infección).

4.7. Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA

El kit usado para la extracción de RNA total fue E.Z.N.A.® Total RNA Kit (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA). El protocolo que se siguió para la extracción fue el siguiente:

- Se añaden 300 µL de buffer TRK en las muestras de células, (por cada mL de TRK se añaden 20 µL de β-mercaptoetanol).
- A continuación se añaden 580 µL de agua libre de RNAsa y 20 µL de proteinasa K. Se deja incubar en el termobloque durante 10 minutos a 55°C.
- Tras los 10 minutos, se añaden 450 µL de etanol absoluto.
- La mezcla se añade en la columna en dos tandas de 700 µL y se centrifuga a 10.000 g durante 30 segundos. En cada paso se descarta el correspondiente eluido del tubo colector.

- Seguidamente, se adicionan a la columna 700 μL de Wash Buffer I, se centrifuga a 10.000 g durante 30 segundos y se descarta el eluido. Previamente a la centrifugación se deja incubar el Wash Buffer I en la columna a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- A continuación, se adiciona el Wash Buffer II, en dos tandas de 500 μL . Las dos centrifugaciones son a 10.000 g durante 30 segundos. Se descarta el eluido y se centrifuga de nuevo sin adicionar nada a la columna para secar la membrana totalmente.
- El último paso es la elución del RNA donde se añaden 30 μL de agua libre de RNAsa y se traspasa la columna a un eppendorf nuevo. Tras centrifugar a 10.000 g durante 1 minuto, eluyen alrededor de 27 μL de RNA. El RNA aislado se almacena a -80°C hasta su próximo uso.

Posteriormente, se realizó un tratamiento con DNAsa con el fin de eliminar el ADN genómico residual usando TURBO™ DNase (Ambion, Thermo Fischer Scientific Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop® (Nanodrop Technologies).

Con el objetivo de convertir el RNA en cDNA se realiza una RT-PCR usando la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen & Thermo Fischer Scientific Inc.) como se explicó previamente (Chico 2006). La concentración cDNA final es de 6 ng/ μL . Brevemente, la reacción de RT-PCR se ha realizado en dos pasos, en el primer paso tiene lugar la desnaturalización del RNA que se deja incubar en presencia de dNTPs (concentración final 50nM) y Random hexamers (concentración final 1,25 μM). A continuación, se introduce en el termociclador (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems) en un ciclo de 5 minutos a 65°C . Tras esto, la muestra se deja en hielo durante un minuto antes de comenzar el segundo paso. En el segundo paso, se añaden a la muestra los siguiente reactivos a concentració final: First Strand Buffer RT 1x (Invitrogen), DTT 10 mM (Invitrogen), Rnase Inhibitor 0,5 U/ μL (Invitrogen) y MMLV-RT 5 U/ μL (Invitrogen). Finalmente, en el termociclador tienen lugar 3 ciclos con las siguientes condiciones: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 50 minutos y 70°C durante 15 minutos.

4.8. qPCR y expresión de genes

La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando el sistema ABI PRISM 7300 382 (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific Inc.). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 20 µl que comprendía 12 ng de cDNA, 900 nM de cada cebador, 10 µl de mezcla maestra universal de PCR TaqMan (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific Inc.) con 200 nM de sonda. Para la cuantificación del segmento A de IPNV se utilizó una concentración final 300 nM para la pareja de primers y 100 nM de sonda.

Las condiciones de los ciclos fueron 50 °C durante 2 min y 95 °C durante 10 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 min. La expresión génica viral se analizó mediante el método 2- $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen 2001) donde se usó el gen rRNA 18S (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific Inc.) como control endógeno. Brevemente, el $\Delta\Delta C_t$ se obtiene restando al ΔC_t el promedio de los C_t de las condiciones consideradas como control, en este experimento concretamente, el tiempo 0h.

Los cebadores y sondas utilizados se enumeran en la Tabla 1:

GEN	Cebador Forward (5' – 3')	Cebador Reverse (5' – 3')	Sonda (5' – 3')	Nº de acceso
IPNV SA	TCTCCCGGGCAGTT CAAGT	CGGTTTCACGATGGGT TGTT	CCAGAACCAGGTGACGAGTA TGAGGACTACAT	(Marroqui, Estepa et al. 2008)
<i>tlr3</i>	ACTCGGTGGTGCTG GTCTTC	GAGGAGGCAATTTGG ACGAA	CAAGTTGTCCCGCTGTCTGCT CCTG	NM_0011245 78.1
<i>irf7</i>	CCCAGGGTTCAGCT CCACTA	GGTCTGGCAACCCGTC AGT	TCGAGCCAAACACCAGCCCCT	FJ184370.1
<i>ifn1</i>	ACCAGATGGGAGG AGATATCACA	GTCCTCAAACCTCAGCA TCATCTATGT	AATGCCCCAGTCCTTTTCCCAA ATC	AM489418.1
<i>mx1-3</i>	TGAAGCCCAGGATG AAATGG	TGGCAGGTCGATGAGT GTGA	ACCTCATCAGCCTAGAGATTG GCTCCCC	(Ortega- Villaizan, Chico et al. 2011)

<i>pkc</i>	GACACCGCGTACCG ATGT	GGACGAACTGCTGCCT GAAT	CACCACCTCTGAGAGCGACAC CACTTC	NM_0011458 91.1
------------	------------------------	--------------------------	---------------------------------	--------------------

Tabla 1. Cebadores y sondas utilizadas para medir la expresión de genes en qPCR.

4.9. Tinción intracelular y citometría de flujo

Los RBCs se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) (Sigma-Aldrich) en medio RPMI durante 20 minutos. La permeabilización de los RBCs se realizó en un tampón de saponina al 0,05% (Sigma-Aldrich) en RPMI durante 15 minutos. Los anticuerpos primarios se diluyeron en el tampón de permeabilización a las diluciones recomendadas y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 30 minutos. Después de cada incubación, los RBCs se lavaron con el tampón de permeabilización. Finalmente, los RBCs se mantuvieron en PFA al 1% en PBS. Para la tinción nuclear, los RBCs se tiñeron con 1 µg/mL de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos. Los RBCs se analizaron mediante citometría de flujo en el citómetro de flujo BD FACSCanto™ (BD Biosciences). Las imágenes de inmunofluorescencia (IF) se realizaron en un sistema de imágenes en células IN Cell Analyzer 6000 (GE HealthCare).

4.10. Anticuerpos

Se produjeron anticuerpos policlonales de ratón contra IL-1β (Interleucina 1β) (Rojas, Camus-Guerra et al. 2015), IL-8 (Interleucina 8) (Santana P 2012), TNF-α (Factor de Necrosis Tumoral α) (Rojas V 2012) donados por el laboratorio del Dr. Luis Mercado. El anticuerpo NF-κβ p65 se obtuvo de AbCam. El anticuerpo policlonal de conejo contra Mx (Chico, Martinez-Lopez et al. 2010) fue donado por el laboratorio de la Dra. Amparo Estepa. El anticuerpo monoclonal anti-IPNV-VP2 2F12 fue donado por el laboratorio de Julio Coll (Dominguez 1990). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos IgG anti-conejo de cabra (H + L) CF™ 488 y anticuerpo IgG anti-ratón (H + L) CF 488 de cabra.

4.11. Ensayos de inmunización

Para realizar el ensayo de inmunización, se recogió el sobrenadante de RBCs controles y RBCs infectados con IPNV a m.o.i 1 tras 3 d.p.i, según el procedimiento explicado anteriormente. Tras esto, se realizaron diluciones de dichos sobrenadantes, siendo éstas: dilución 1/1, dilución 1/5, dilución 1/25 y dilución 1/125. Se trataron células CHSE con estas diluciones durante 1 día. Una vez finalizado, se retiraron las diluciones y se infectaron con IPNV m.o.i. 0,1 durante 1 hora, posteriormente se retiró el IPNV y se añadió RPMI 2% para dejar transcurrir la infección. Finalmente, se realizó una tinción de focos en las células CHSE.

4.12. Tinción intracelular de IPNV

Después de la infección, para la tinción de focos en CHSE, se retiró el medio y las células se fijaron con PFA diluido en PBS al 2% durante 15 minutos. Posteriormente, se realizó una segunda fijación con metanol frío. Buffer con tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,3% y suero de cabra al 5% se utilizó como bloqueante. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en un buffer de PBS con Tritón X-100 al 0,3% y BSA (Sigma-Aldrich) al 1%.

El anticuerpo 2F12 a una dilución 1/500 fue utilizado para marcar los focos. El anticuerpo secundario empleado fue IgG anti-ratón (H + L) CF 488 de cabra. Tras cada incubación del anticuerpo, las células fueron lavadas tres veces con PBS.

4.13. Software y estadísticas

Para el análisis estadístico se emplearon test ANOVA y t-Student no paramétricos. Los p-valores asociados con los gráficos se indican en cada ensayo según la siguiente leyenda (*, p-valor < 0.05; ** p-valor < 0.01). Graphpad Prism 6 se utilizó para la representación gráfica y el cálculo estadístico.

Los datos de citometría de flujo se procesaron y analizaron utilizando Flowing Software para los valores MFI (Intensidad Media de Fluorescencia) y MRFI (Intensidad Media Relativa de Fluorescencia) y WEASEL 3.0 para la representación de histogramas.

El análisis de los datos del experimento de inmunización se realiza con un two-way ANOVA ordinario. Los focos de IPNV fueron detectados mediante el software In Cell Developer (GE HealthCare) empleando un protocolo de segmentación optimizado para el conteo de focos.

Todas las figuras representan la media y la desviación estándar de las variables medidas.



5. Resultados

5.1. Ensayo de infectividad de IPNV en RBCs de trucha.

En este ensayo el objetivo era comprobar la infectividad de IPNV en los RBCs de trucha, obteniendo los títulos del virus tras la infección y comparándolos con el inicial. Para ello, se infectaron RBCs y como referencia de infección productiva, se determinó también el título en una línea celular susceptible de infección por IPNV, como es la línea celular CHSE, a distintos tiempos.

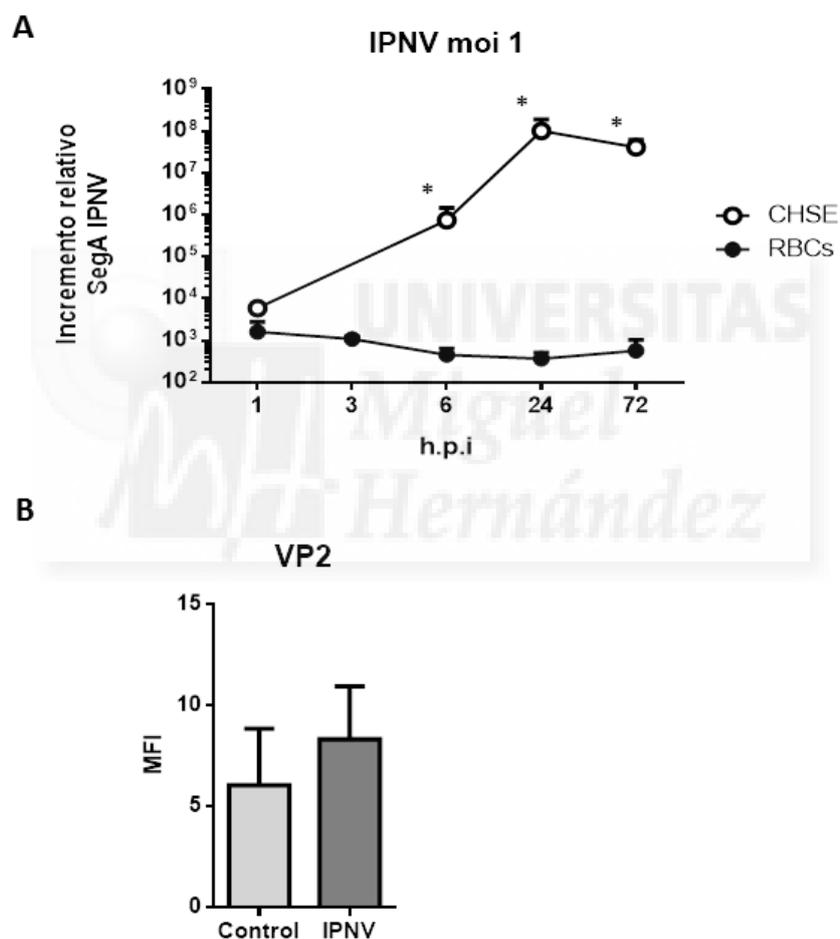


Figura 3. Infectividad de IPNV en RBCs. (A) Expresión del segmento A del RNA viral de IPNV relativo al endógeno 18S en RBCs, (●) ($n = 4$) y células CHSE (○) ($n = 2$) infectadas a m.o.i 1 a los tiempos indicados a 14°C y obtenida por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (B) Cuantificación por fluorescencia (MFI) de la proteína viral VP2 de IPNV en RBCs infectados con IPNV a m.o.i. 1 tras 3 días post-infección ($n = 4$).

El principal resultado de este ensayo es que los títulos de IPNV obtenidos en sobrenadantes y pellets de RBCs de trucha infectados fueron muy bajos.

- El título del virus obtenido en RBCs es menor de 10 TCID₅₀
- En la figura 3A, se observa que a 1 hora post-infección (h.p.i) el RNA de IPNV es semejante entre la línea celular CHSE y RBCs. A partir de las 6 h.p.i. se ve una diferencia significativa en la cantidad de RNA de IPNV detectado entre la línea celular CHSE y los RBCs.
- En la figura 3B no hay una detección significativa de la proteína VP2 de IPNV dentro de los RBCs a 3 d.p.i.



5.2. Expresión de genes antivirales en RBCs de trucha infectados con IPNV

Posteriormente, se quiso determinar si los RBCs podrían desarrollar una respuesta antiviral frente a una infección por IPNV aunque el virus no replique dentro de los RBCs. Para determinar la expresión de dichos genes antivirales, entre los cuales se seleccionaron los más característicos en la ruta del interferón y el gen *pkc*, y se realizaron sucesivos ensayos de qPCR y se observó lo siguiente:

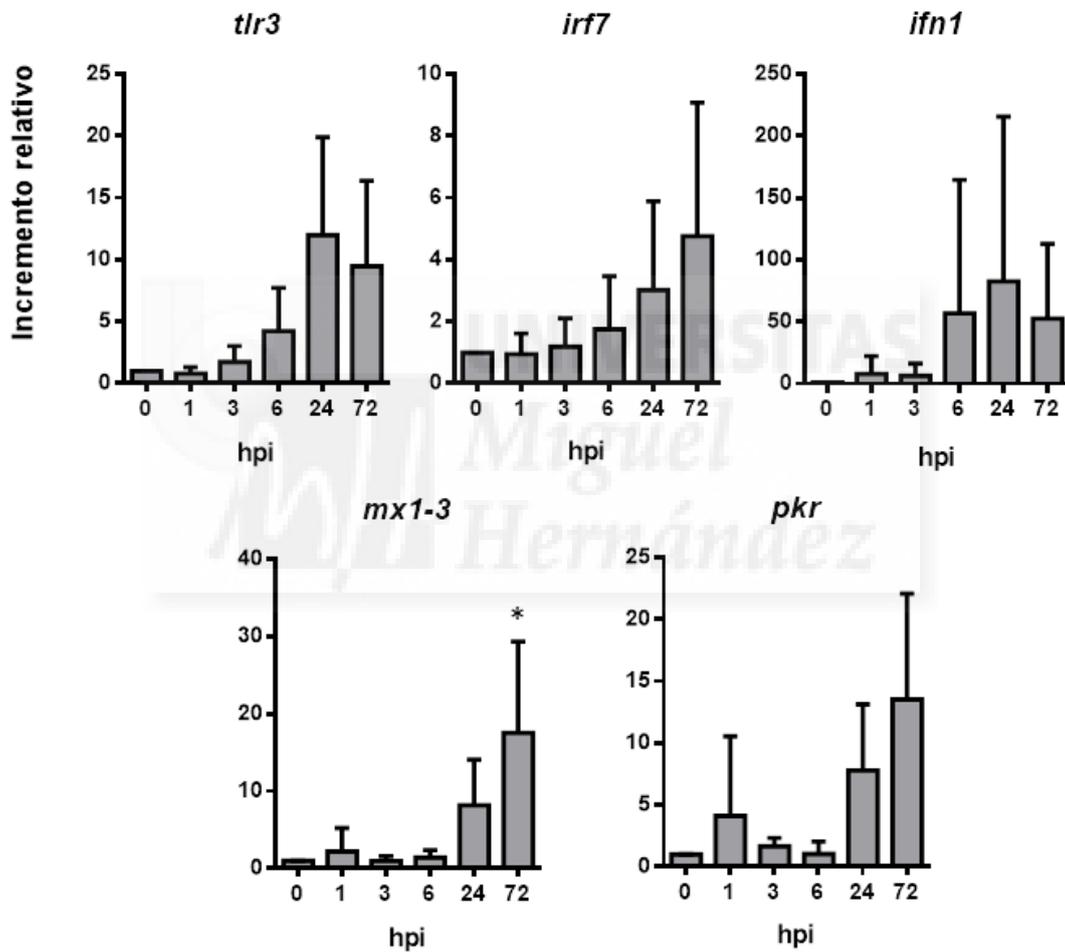


Figura 4. Incremento relativo en la expresión de los genes *tlr3*, *irf7*, *ifn1*, *mx1-3* y *pkc* en RBCs de trucha infectados con IPNV a m.o.i. 1 a 14°C (n=4). Los tiempos analizados son: 0, 1, 3, 6, 24, 72 horas post-infección. El incremento relativo se calcula con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando 18S como gen endógeno.

El principal resultado obtenido de este ensayo es que IPNV aumenta la expresión de genes antivirales en RBCs de trucha.

- En la figura 4, se observa un incremento en la expresión del gen *tlr3* a 24 horas post-infección, al igual que con el factor de transcripción *irf7* a 72 horas post-infección.
- En cuanto al *ifn1* y *mx 1-3*, genes de vital importancia en la señalización antiviral, se observa un incremento en la expresión de *ifn1* a 24 horas post-infección, mientras que el pico de expresión de *mx 1-3* se observa más tardíamente a 72 horas post-infección. (Figura 4).
- En cuanto a la expresión del gen *pkc* se observa el pico más alto de expresión a 3 d.p.i. (Figura 4).



5.3. Expresión de la proteína Mx en RBCs de trucha infectados con IPNV.

Para comprobar si la respuesta observada a nivel de expresión de RNA mensajero de genes de la cascada de interferón pudiera ser inducida a nivel de proteína, los RBCs fueron teñidos intracelularmente con un anticuerpo anti-Mx tras 3 y 6 días post-infección. La citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia fueron realizadas para analizar los resultados de la tinción.

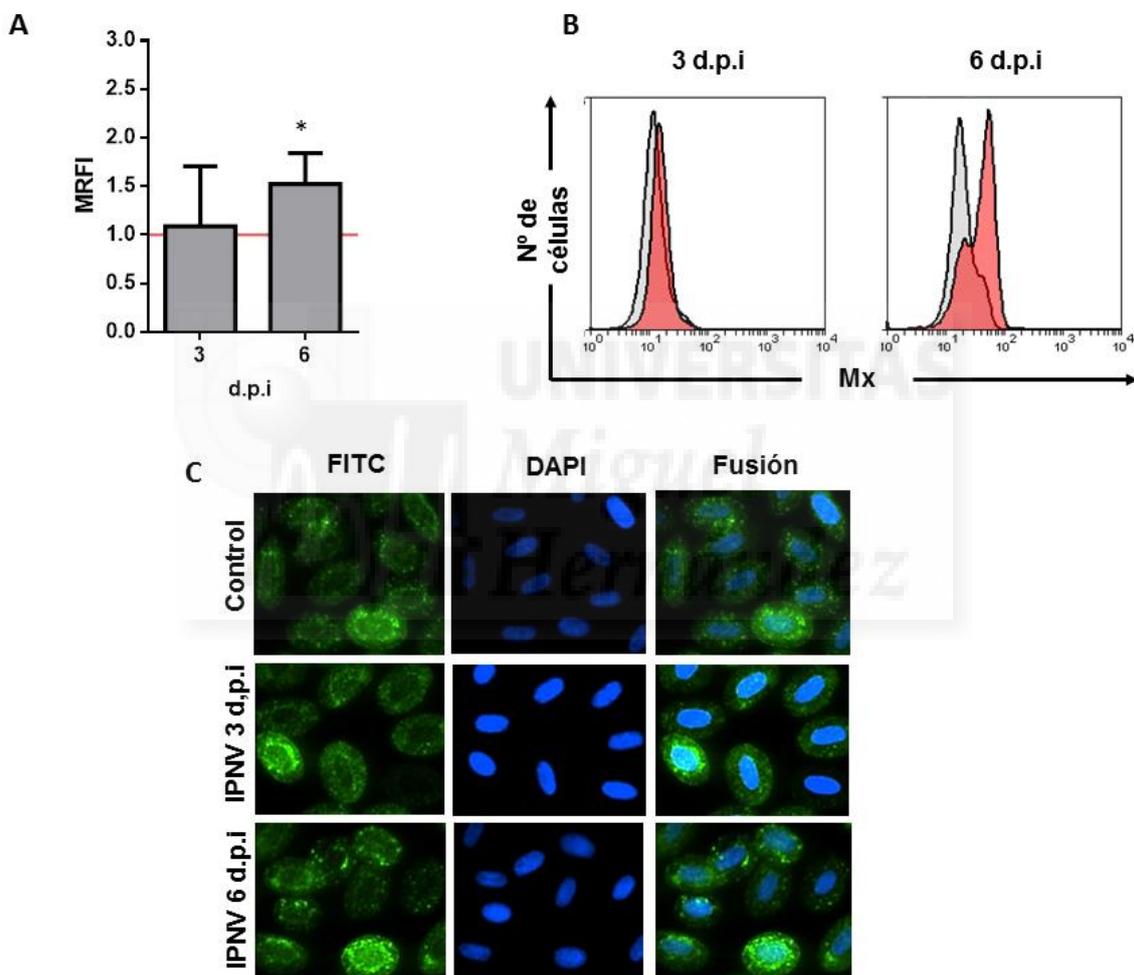


Figura 5. Expresión de Mx inducida por IPNV en RBCs de trucha. (A) Incremento relativo de la fluorescencia media (MRFI) en la expresión de Mx en RBCs tras 3 y 6 días post-infección a m.o.i. 1, a 14°C cuantificada por citometría de flujo. (B) Ejemplo representativo de la expresión de Mx en RBCs de trucha a los tiempos indicados. El color rojo corresponde a RBCs en presencia de IPNV y el color gris a los controles (C) Microscopía de fluorescencia de RBCs infectados con IPNV a los tiempos y condiciones mencionados. (Verde – FITC para proteína, Azul- DAPI para marcaje de núcleos).

El principal resultado de este experimento es que IPNV induce sobreexpresión de la proteína Mx tras la infección a 6 días en RBCs de trucha.

- En la figura 5A existe un incremento significativo en la expresión de Mx a 6 días post-infección, sin embargo no se determinaron cambios significativos a 3 días post-infección.
- La figura 5B muestra a 6 días post-infección un hombro en el número de células que sobreexpresan Mx.
- En la figura 5C, se observa mayor expresión de Mx a 6 días post-infección y se destaca que los niveles basales de expresión de Mx en RBCs son altos.



5.4. Producción de interleucinas en RBCs infectados con IPNV.

Se realizó una tinción intracelular usando anticuerpos anti-IL-8, anti-IL-1 β y anti-TNF- α que fue cuantificada por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia para saber si los RBCs podrían producir dichas citocinas en respuesta a una infección por IPNV.

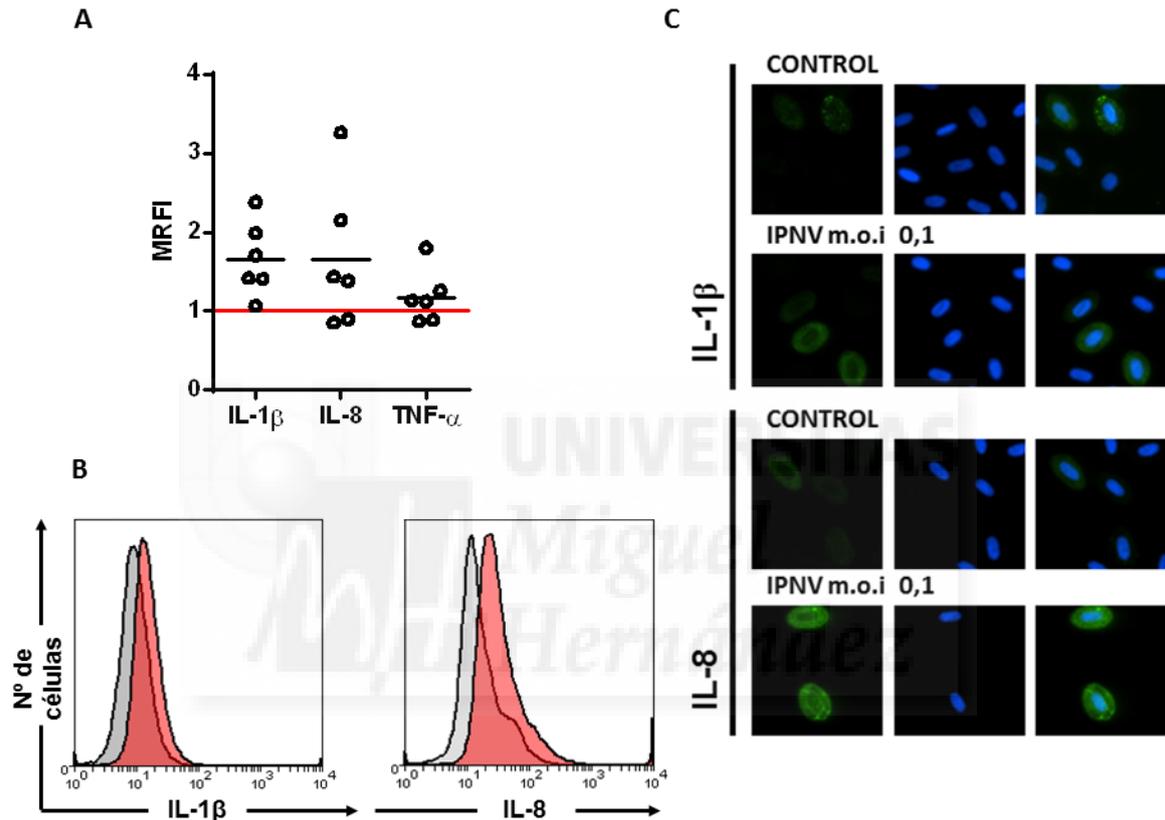
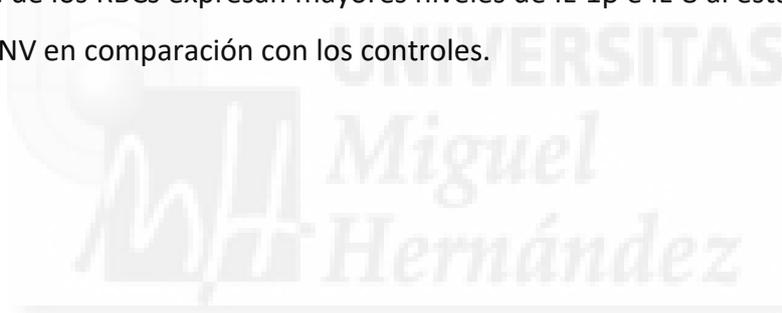


Figura 6. Expresión de IL-8, IL-1 β y TNF- α inducida por IPNV m.o.i. 0,1 en RBCs. (A) MRFI de las citocinas indicadas a 3 días post-infección a m.o.i. 1 a 14 $^{\circ}$ C (n=6). (B) Ejemplo representativo de la expresión de IL-8, IL-1 β y TNF- α inducida por IPNV en RBCs. El color rojo corresponde a RBCs en presencia de IPNV y el color gris a los controles. (C) Microscopía de fluorescencia de RBCs infectados con IPNV a los tiempos y condiciones mencionados. (Verde – FITC para proteína, Azul – DAPI, para marcaje de núcleos).

El principal resultado de este ensayo muestra que los RBCs de trucha expresan IL-1 β e IL-8 en respuesta a IPNV tras 3 días post-infección.

- En la figura 6A, se observa un incremento significativo en la expresión de la IL-1 β . Por otro lado, se observan cambios en la expresión de IL-8 y TNF- α aunque no estadísticamente significativos.
- En la figura 6B, se representa la fluorescencia de IL-1 β e IL-8 en RBCs. En esta figura se puede ver un desplazamiento de fluorescencia hacia la sobreexpresión de IL-1 β e IL-8.
- Por último en la figura 6C, tras la infección de los RBCs con IPNV se observa que parte de los RBCs expresan mayores niveles de IL-1 β e IL-8 al estar en presencia de IPNV en comparación con los controles.



5.5. Ensayo de inmunización

En este ensayo se quiso comprobar si las moléculas secretadas por los RBCs, tales como citocinas, interferón, etc. eran capaces de proteger a otra línea celular frente a la infección por IPNV. Para ello, los RBCs se infectaron con IPNV moi 1 y se recogieron los sobrenadantes tras 3 d.p.i a 14°C. Se realizaron una serie de diluciones y se trataron células CHSE con ellos durante 1 día. El siguiente paso fue añadir IPNV m.o.i. 0,1 durante 1 hora, retirarlo y añadir medio RPMI 2%. Tras 24 horas de infección a 14°C se retiró el medio y mediante tinción intracelular se observó que el medio condicionado de los RBCs infectados con IPNV a las distintas diluciones era capaz de inducir inmunización en la línea celular CHSE.

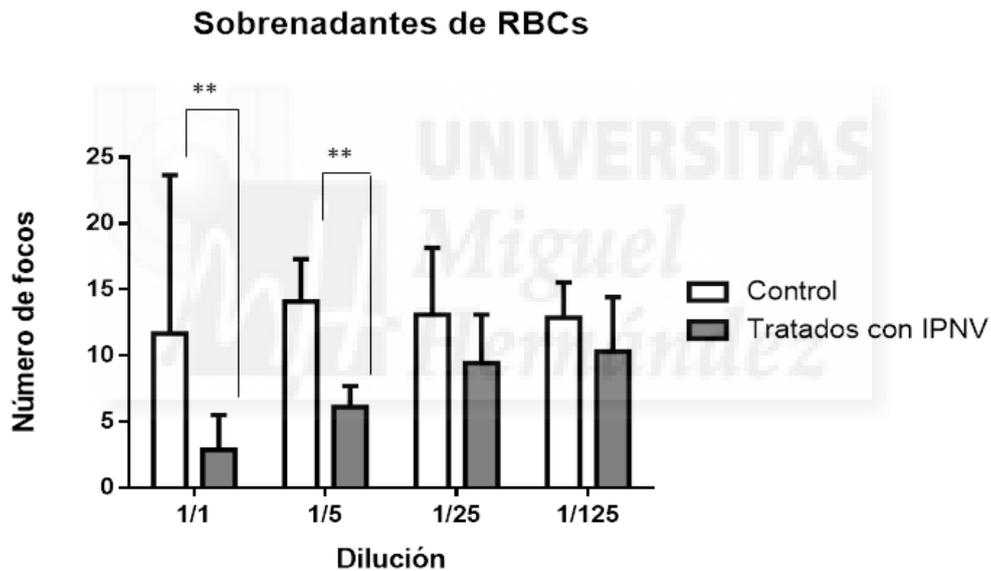


Figura 7. Número de focos fluorescentes obtenidos tras inmunización de la línea celular CHSE con sobrenadantes procedentes de RBCs control e infectados con IPNV a distintas diluciones y posterior infección con IPNV a moi 0,1 (n=9).

- En la figura 7 se observa que existe menor número de focos infectivos fluorescentes en las menores diluciones de los medios condicionados de los RBCs.

6. Discusión

Se sabe que la diana de IPNV son las células pancreáticas. Recientemente se ha demostrado que IPNV puede infectar otros tipos celulares durante su proceso infectivo, tales como los islotes de Langerhans del hígado (Ellis, Cavaco et al. 2010). Nuestros resultados muestran que IPNV no replica eficientemente en RBCs, aunque se han visto pequeñas cantidades de IPNV dentro de ellos. Siguiendo esto, se ha visto que IPNV es capaz de entrar en algunas células de mamíferos en las que no es capaz de replicar dentro de ellas (Orpetveit, Kuntziger et al. 2012). Esto sugiere que la entrada puede estar mediada por receptor, lo cual podría ocurrir de igual manera en RBCs.

A pesar de la falta de infectividad en RBCs, IPNV puede inducir una expresión de genes antivirales similar a la respuesta observada frente a ISAV (Workenhe, Kibenge et al. 2008) y PRV (Finstad, Dahle et al. 2014) (Wessel, Olsen et al. 2015), ambos virus infectivos en los RBCs. No obstante, sí se ha visto que IPNV tiene capacidad de inducir una respuesta antiviral en una situación de infección no lítica o no eficiente que ha sido descrita en células EPC (células de epiteloma papuloso de carpa) persistentemente infectadas (Garcia, Galiana et al. 2011). Los RBCs presentan expresión de TLR3, el cual se une a dsRNA (Morera, Roher et al. 2011) y, se cree que el RNA genómico de IPNV podría actuar como activador PAMP de este receptor. Uno de los resultados de esta activación es la mayor expresión de la proteína antiviral Mx producida a 6 días post-infección tras observarse un pico de expresión génica a 3 días post-infección.

Nuestros resultados muestran que los RBCs presentan una expresión de Mx a nivel basal, lo que indicaría que en una infección vírica existiría una mayor dificultad para ser infectadas. En respuesta a la infección por IPNV, los RBCs actúan expresando más proteína Mx de forma que Mx podría inhibir a IPNV, reduciendo su presencia en las células, como se ha demostrado en estudios anteriores donde el grado de inhibición viral se correlaciona con la cantidad de proteína Mx en células infectadas (Larsen, Rokenes et al. 2004).

El resultado de la activación de Mx apoya la idea de la posible funcionalidad de los RBCs en el sistema inmune, no obstante a este resultado se suma también la capacidad de producir IL-1 β e IL-8 de los RBCs en respuesta a la infección por IPNV. Se sabe que la IL-1 β presenta diversas funciones a nivel de respuesta inmune. Entre ellas, se ha visto que puede actuar como mitógeno de linfocitos (March, Mosley et al. 1985). Una posible producción de IL-1 β por RBCs conllevaría a un mayor número de linfocitos que se encargarían más fácilmente de realizar una respuesta inmune adaptativa frente a la infección vírica. Por otro lado, se conoce que la IL-8 muestra actividad quimiotáctica in vitro para células T, neutrófilos y basófilos.

Por otro lado, la realización del ensayo de inmunización de los sobrenadantes provenientes de RBCs infectados con IPNV nos indica que las citoquinas y otras moléculas secretadas por los RBCs son capaces de proteger frente a la infección. Un posible futuro ensayo sería chequear las moléculas que podrían estar siendo secretadas en esta inmunización.

En este trabajo hemos analizado la respuesta inmune de los RBCs frente a IPNV en condiciones ex vivo. Nuestros resultados sugieren que los RBCs podrían actuar como una célula antiviral implicada en la respuesta inmune desarrollada frente a infecciones víricas. Aun así, estudios adicionales son necesarios para analizar en detalle a nivel de fosforilación e interacciones entre proteínas los mecanismos de señalización mediante los cuales se produce esta respuesta, así como ensayos de expresión de genes de RBCs provenientes de una infección in vivo.

7. Conclusiones y proyección futura

- IPNV no es capaz de replicar en RBCs de trucha.
- Los RBCs de trucha presentan una respuesta inmune ex vivo caracterizada por la expresión de ruta de señalización de IFN-1 e inducción de la proteína Mx.
- IPNV es capaz de activar la producción de IL-1 β e IL-8.
- El medio condicionado de RBCs de trucha es capaz de proteger frente a la infección de IPNV.

7.1. Perspectivas futuras

Este resultado arroja luz al papel de los RBCs en las infecciones virales y complementa los resultados obtenidos en el laboratorio de la Dra. M^a del Mar Ortega-Villaizán sin publicar. Aún así sería necesario evaluar más en detalle el mecanismo molecular a nivel de señalización por el cual los RBCs presentan esta respuesta.

8. Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todos los miembros del laboratorio por recibirme como si fuera un miembro más de él, así como por haberme ayudado a llevar a cabo este trabajo y más concretamente a mis co-tutores M^a del Mar Ortega Villaizán-Romo e Iván Nombela Díaz por su dedicación.

Este trabajo está enmarcado dentro del proyecto ERC Starting Grant GA639249.

9. Bibliografía

- Bengtén, E., L. W. Clem, N. W. Miller, G. W. Warr and M. Wilson (2006). "Channel catfish immunoglobulins: repertoire and expression." Dev Comp Immunol **30**(1-2): 77-92.
- Chico, V., Gomez, N., Estepa, A., Perez, L. (2006). "Rapid detection and quantitation 579 of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow 580 trout by real-time RT-PCR." J Virol Methods **132**: 154-159.
- Chico, V., A. Martinez-Lopez, M. Ortega-Villaizan, A. Falco, L. Perez, J. M. Coll and A. Estepa (2010). "Pepscan mapping of viral hemorrhagic septicemia virus glycoprotein G major lineal determinants implicated in triggering host cell antiviral responses mediated by type I interferon." J Virol **84**(14): 7140-7150.
- Crane, M. and A. Hyatt (2011). "Viruses of fish: an overview of significant pathogens." Viruses **3**(11): 2025-2046.
- Dahle, M. K., O. Wessel, G. Timmerhaus, I. B. Nyman, S. M. Jorgensen, E. Rimstad and A. Krasnov (2015). "Transcriptome analyses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes infected with piscine orthoreovirus (PRV)." Fish Shellfish Immunol **45**(2): 780-790.
- Dominguez, J. H., R.P. & Sanchez-Vizcaino, J.M. (1990). "Use of monoclonal-antibodies for detection of infectious pancreatic necrosis virus by the enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)." Dis. Aquat. Organ. **8**: 157-163.
- Ellis, A. E., A. Cavaco, A. Petrie, K. Lockhart, M. Snow and B. Collet (2010). "Histology, immunocytochemistry and qRT-PCR analysis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts following infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)." J Fish Dis **33**(10): 803-818.
- Finstad, O. W., M. K. Dahle, T. H. Lindholm, I. B. Nyman, M. Lovoll, C. Wallace, C. M. Olsen, A. K. Storset and E. Rimstad (2014). "Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes." Vet Res **45**: 35.
- Gamil, A. A., C. Xu, S. Mutoloki and O. Evensen (2016). "PKR Activation Favors Infectious Pancreatic Necrosis Virus Replication in Infected Cells." Viruses **8**(6).
- Garcia, I., A. Galiana, A. Falco, A. Estepa and L. Perez (2011). "Characterization of an infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carrier cell culture with resistance to superinfection with heterologous viruses." Vet Microbiol **149**(1-2): 48-55.
- Hill, B. J., & Way, K. (1995). "Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses." Annual Review of Fish Diseases(5): 55-77.
- Larsen, R., T. P. Rokenes and B. Robertsen (2004). "Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein." J Virol **78**(15): 7938-7944.
- Levraud, J. P. and P. Boudinot (2009). "[The immune system of teleost fish]." Med Sci (Paris) **25**(4): 405-411.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lockhart, K., A. J. McBeath, B. Collet, M. Snow and A. E. Ellis (2007). "Expression of Mx mRNA following infection with IPNV is greater in IPN-susceptible Atlantic salmon post-smolts than in IPN-resistant Atlantic salmon parr." Fish Shellfish Immunol **22**(3): 151-156.

Magor, B. G. (2015). "Antibody Affinity Maturation in Fishes-Our Current Understanding." Biology (Basel) **4**(3): 512-524.

March, C. J., B. Mosley, A. Larsen, D. P. Cerretti, G. Braedt, V. Price, S. Gillis, C. S. Henney, S. R. Kronheim, K. Grabstein and et al. (1985). "Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs." Nature **315**(6021): 641-647.

Marroqui, L., A. Estepa and L. Perez (2008). "Inhibitory effect of mycophenolic acid on the replication of infectious pancreatic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus." Antiviral Res **80**(3): 332-338.

Morera, D. and S. A. MacKenzie (2011). "Is there a direct role for erythrocytes in the immune response?" Vet Res **42**: 89.

Morera, D., N. Roher, L. Ribas, J. C. Balasch, C. Donate, A. Callol, S. Boltana, S. Roberts, G. Goetz, F. W. Goetz and S. A. MacKenzie (2011). "RNA-Seq reveals an integrated immune response in nucleated erythrocytes." PLoS One **6**(10): e26998.

Orpetveit, I., T. Kuntziger, H. Sindre, E. Rimstad and B. H. Dannevig (2012). "Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from salmonid fish enters, but does not replicate in, mammalian cells." Virology **9**: 228.

Ortega-Villaizan, M., V. Chico, A. Martinez-Lopez, A. Falco, L. Perez, J. M. Coll and A. Estepa (2011). "In vitro analysis of the factors contributing to the antiviral state induced by a plasmid encoding the viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein G in transfected trout cells." Vaccine **29**(4): 737-743.

Passantino, L., M. Altamura, A. Cianciotta, F. Jirillo, M. R. Ribaud, E. Jirillo and G. F. Passantino (2004). "Maturation of fish erythrocytes coincides with changes in their morphology, enhanced ability to interact with *Candida albicans* and release of cytokine-like factors active upon autologous macrophages." Immunopharmacol Immunotoxicol **26**(4): 573-585.

Passantino, L., M. Altamura, A. Cianciotta, R. Patrino, A. Tafaro, E. Jirillo and G. F. Passantino (2002). "Fish immunology. I. Binding and engulfment of *Candida albicans* by erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson)." Immunopharmacol Immunotoxicol **24**(4): 665-678.

Passantino, L., M. A. Massaro, F. Jirillo, D. Di Modugno, M. R. Ribaud, G. D. Modugno, G. F. Passantino and E. Jirillo (2007). "Antigenically activated avian erythrocytes release cytokine-like factors: a conserved phylogenetic function discovered in fish." Immunopharmacol Immunotoxicol **29**(1): 141-152.

Robertsen, B. (2006). "The interferon system of teleost fish." Fish Shellfish Immunol **20**(2): 172-191.

Rodriguez, M. F., G. D. Wiens, M. K. Purcell and Y. Palti (2005). "Characterization of Toll-like receptor 3 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Immunogenetics **57**(7): 510-519.

Rojas, V., H. Camus-Guerra, F. Guzman and L. Mercado (2015). "Pro-inflammatory caspase-1 activation during the immune response in cells from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792) challenged with pathogen-associated molecular patterns." J Fish Dis **38**(11): 993-1003.

Rojas V, M.-L. B., Guzmán F, Gallardo JA, Mercado L. (2012). "Immunological strategy for detecting the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha 557 in salmonids." Electronic Journal of Biotechnology **15**.

S.F., S. (1981). "Your fishes' health: Diseases of fishes." Trop. Fish Hobbyist. **3**(78).

Santana P, P. C., Narváez E, Guzmán F, Gallardo JA, Mercado L. (2012). "Anti-peptide antibodies: A tool for detecting IL-8 in salmonids." Electronic Journal of Biotechnology **15**.

Secombes, C. J. and T. Wang (2012). "Infectious Disease in Aquaculture: Prevention and Control." Woodhead Publishing Limited **Chapter 1**: pp.3-68.

Wessel, O., C. M. Olsen, E. Rimstad and M. K. Dahle (2015). "Piscine orthoreovirus (PRV) replicates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes ex vivo." Vet Res **46**: 26.

Workenhe, S. T., M. J. Kibenge, G. M. Wright, D. W. Wadowska, D. B. Groman and F. S. Kibenge (2008). "Infectious salmon anaemia virus replication and induction of alpha interferon in Atlantic salmon erythrocytes." Virology **5**: 36.

