



Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Licenciatura en Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Víctor Olavarría C.
Instituto de Bioquímica y
Microbiología
Facultad de Ciencias

Profesor Co-Patrocinante
Dr. Alejandro J. Yañez C.
Instituto de Bioquímica y
Microbiología
Facultad de Ciencias

**EFEECTO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DE NECROSIS PANCREÁTICA
INFECCIOSA (IPNV) EN LA EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS ANTIVIRALES, EN
*SALMO SALAR***

Seminario de Graduación presentada
como parte de los requisitos para optar
al **Grado de Licenciado en Ciencias
Biológicas.**

LAURA CAROLA ANDREA HERRERA CONTRERAS

VALDIVIA – CHILE

2013

At Camila y mis padres.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mi profesor patrocinante Dr. Víctor Olavarría C. por haberme recibido como tesista, por la paciencia y el apoyo en todos los aspectos de esta tesis, al Dr. Alejandro Yañez C. por el tiempo que estuve en su laboratorio y a la buena disposición brindada. A ambos muchas gracias por su apoyo y comprensión durante el desarrollo de esta tesis. Agradecer al Dr. Juan G. Cárcamo M. por aceptar ser mi profesor informante.

Quiero agradecer también a Sharin Valdivia por sus consejos, su apoyo y ayuda incondicional, por la disposición diaria a siempre colaborar en esta tesis. Además agradecer a Melina Villalba, por el apoyo y disposición que siempre me otorgo. Agradecer a mis compañeros de laboratorio, Diego, Gabriel, Boris y Valeria, por los buenos momentos que pasamos juntos, por su ayuda, las risas y el apoyo moral en los momentos difíciles. A mis amigos Bianca, Vanessa, Lesli y Javier, entre otros, por siempre estar ahí.

Agradezco a mis padres, Luis y Soledad, mi hermano Claudio y la razón de todo este esfuerzo, mi hija Camila. Gracias a todos de corazón, y a cada persona que aportó en esta tesis ya sea directa o indirectamente.

Este trabajo fue financiado por el proyecto Fondecyt 3120027 y realizado en el Laboratorio de Virología del Instituto de Bioquímica y Microbiología, de la Universidad Austral de Chile.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

1 RESUMEN	1
1.1 SUMMARY	2
2 INTRODUCCIÓN	3
2.1 Acuicultura en el mundo	3
2.2 Virus de la necrosis pancreática infecciosa en el Mundo	4
2.3 Virus de la necrosis pancreática infecciosa en Chile.....	5
2.4 Características del virus	6
2.4.1 Genoma Viral	9
2.4.2 Mecanismo de infección	11
2.5 Mecanismos de defensa innata.....	11
2.5.1 Interferón.....	13
2.5.2 Proteína Mx.....	14
2.5.3 Factor regulador del Interferón.....	15
2.5.4 Transductor de señal y activador de transcripción.....	16
2.6 Hipótesis	18
2.7 Objetivo general.....	18
2.7.1 Objetivos específicos.....	18
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 MATERIALES.....	19
3.1.1 Material Biológico	19
3.1.2 Virus IPN.....	19
3.1.3 Reactivos.....	19
3.1.4 Kits	20
3.1.5 Soluciones.....	20
3.1.6 Instrumentos utilizados.....	20

3.2MÉTODOS	22
3.2.1 Diseño de partidores	22
3.2.2 Propagación de virus IPN, en línea celular SHK-1.....	24
3.2.3 Tratamiento celular	24
3.2.4 TCID50	25
3.2.5 Cinética de infección.....	28
3.2.6 Extracción de RNA	28
3.2.7 Cuantificación de RNA.	29
3.2.8 Reacción la polimerasa en cadena acoplada a transcripción reversa (RT-PCR)	29
3.2.9 Reacción de la polimerasa en cadena en gradiente para partidores.	30
3.2.10 Análisis electroforético de productos de PCR en gel de agarosa.	31
3.2.11Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Título viral.....	32
4.2 Estandarización de partidores para qPCR.....	34
4.3 Cinética de expresión de IFN, IRF, STAT y Mx, en presencia de virus IPN.	36
4.3.1 Expresión de IPNV en células SHK-1.....	36
4.3.2 Expresión relativa de IFNs, mediante cinética de infección en línea celular SHK-1	40
4.3.3 Expresión relativa de IRFs, mediante cinética de infección en línea celular SHK-1.....	45
4.3.4 Expresión relativa de STATs, mediante cinética de infección en línea celular SHK-1.....	54
4.3.5 Expresión relativa de Mx, mediante cinética de infección en línea celular SHK-1	56
5 DISCUSIÓN	58
6 REFERENCIAS.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Estructura de virus de la necrosis pancreática infecciosa.....	7
Figura 2:	Genoma virus de la necrosis pancreática infecciosa.....	10
Figura 3:	PCR en gradiente de temperatura para los genes IFN α 1, IFN α 2, IFN γ , IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF7, IRF9, STAT4 y Mx1.....	35
Figura 4:	Expresión de IPNv, en células SHK-1.....	37
Figura 5:	Curvas de disociación y amplificación de los productos amplificados mediante PCR en tiempo real, visualizados por medio de fluorescencia emitida por <i>SYBR green</i>	38
Figura 6:	Curvas de disociación y amplificación de los productos amplificados mediante PCR en tiempo real, visualizados por medio de fluorescencia emitida por <i>SYBRgreen</i>	39
Figura 7:	Expresión de IFN α 1 en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	42
Figura 8:	Expresión de IFN α 2 en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	43
Figura 9:	Expresión de IFN γ en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	44
Figura 10:	Expresión de IRF 1 en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	47
Figura 11:	Expresión de IRF 2 en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	48
Figura 12:	Expresión de IRF 3 en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	49
Figura 13:	Expresión de IRF 4 en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	50
Figura 14:	Expresión de IRF 5 en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	51

Figura 15:	Expresión de IRF 7 en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	52
Figura 16:	Expresión de IRF 9 en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	53
Figura 17:	Expresión de STAT 4 en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	55
Figura 18:	Expresión de Mx en células SHK-1 infectadas con virus IPN.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Partidores diseñados para <i>S.salar</i>	23
Tabla 2:	Modelo de placa sembrada.....	27
Tabla 3:	Resultados TCID ₅₀	33

Abreviaturas

μg	: Microgramos
μL	: Microlitros
μM	: Micromolar
cDNA	: DNA complementario
DNA	: Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	: Desoxinucleotidos 5'-trifosfato
ECP	: Efecto Citopático
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	: Food and agricultura organization
$\text{H}_2\text{O}_{\text{depc}}$: Agua Destilada tratada con dietilpirocarbonato
Hpi	: Horas post infección
IFN	: Interferón
IPN	: Necrosis pancreática infecciosa
IRF	: Factor regulador de interferón
mL	: Mililitros
mM	: Milimolar
MOI	: Multiplicidad de infección
Mx	: Proteína Mx
Ng	: Nanogramos
Pb	: Pares de bases
PBS	: Tampón fosfato salino

PCR	: Reacción en cadena de polimerasa
Pfu	: Unidad formadora de placas
Pi	: Post infección
qPCR	: Cuantificación de cDNA mediante PCR tiempo real
RNA	: Ácido ribonucleico
RNA _m	: Ácido ribonucleico mensajero
RPM	: Revoluciones por minuto
RT-PCR	: PCR acoplada con reacción de transcripción reversa (Del inglés reverse transcription – Polymerasechainreaction)
SBF	: Suero bovino fetal
SHK-1	: Salmon head kidney -1
STAT	: Transductor de señal y activador de transcripción
TAE	: Buffer tris acetato-EDTA
T _m	: Tonelada métrica
V	: Volt(s)

1 RESUMEN

El Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es un patógeno que afecta principalmente al Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) causando mortalidades significativas a nivel mundial. El virus se clasifica dentro de la familia Birnaviridae y pertenece al género Aguabirnaviridae. Su genoma está compuesto por dos segmentos de ARN de doble cadena y codifica para 5 poliproteínas.

Infecciones causadas por este virus desencadenan un complejo mecanismo de respuesta inmune, propio de las células donde en primera instancia se secreta Interferón para de este modo, “alertar” a las células vecinas de la infección por patógeno en forma casi inmediata, activándose de esta manera los IRFs y STATs, de igual modo que proteínas Mx, todo esto como mecanismo para evitar la infección por IPNV.

Debido a lo anterior, se investigó si el virus IPN modifica la expresión de transcritos virales y factores de transcripción de expresión temprana, a lo largo de la infección. Esto mediante técnicas como PCR, cinética de infección y TCID₅₀.

Se logró concluir que el virus IPN no interfiere con la producción de IFN α 1 e IFN α 2, sin embargo IFN γ , si se ve afectado por este virus. No obstante, factores receptores de Interferón 2, 3, 4 y 9, no se ven afectados por virus IPN, en tanto IRF 1 y 5 mostraron una expresión tardía, sin obstante, IRF 7 mostró poca expresión ante el virus IPN. STAT 1 y 2 no mostraron expresión ante el virus, sin embargo, STAT 4 muestra una expresión temprana, al contrario de la proteína Mx la cual no se expresó en presencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa. En conclusión, la célula logra evadir la presencia del virus a horas tempranas postinfección, sin embargo aun así el virus es más poderoso que el mecanismo de defensa inmune de la célula.

1.1 SUMMARY

The virus infectious pancreatic necrosis (IPNV) is a pathogen that primarily affects Atlantic salmon (*Salmo salar*) causing significant mortality worldwide. The virus is classified in family Birnaviridae and the genus Aquabirnaviridae. Its genome consists of two segments of double-stranded RNA encoding 5 polyprotein.

Infections caused by this virus trigger a complex mechanism of immune response, characteristic of the cells in the first instance where secreted interferon to there by notify neighboring cells of pathogen infection almost immediately IRFs and STATs are activated, similarly Mx protein so that all this like a water fall to avoid IPNV infection.

Because of this it was investigated whether the IPN virus modifies the expression of viral transcripts and transcription factors expression early during infection. It is using techniques such as PCR, infection kinetics and TCID₅₀.

It was possible to conclude that IPN virus does not interfere with the production of IFN α 1 and IFN α 2, however IFN γ , if you are affected by this virus. However, interferon receptors factors 2, 3, 4 and 9, are not affected by virus IPN and IRF1 and 5 showed late expressions, however, showed little expression IRF7 before the IPN virus. STAT 1 and 2 showed no expression to the virus, however, STAT4 shows an early expression, in contrast to which Mx protein is not expressed in the presence of virus IPN. In conclusion the cell manages to evade the virus in the early hours after infection; however the virus is still more powerful than the immune defense mechanism of the cell.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Acuicultura en el mundo

En las últimas décadas la acuicultura ha mostrado un continuo crecimiento a nivel mundial, siendo más rápido que el logrado en cualquier otro sector productivo de alimentos de origen animal. Este crecimiento se ha visto favorecido por un conjunto de ventajas atribuidas a condiciones naturales, tanto geográficas como climáticas, adecuadas para el cultivo de especies salmónidas (Borja, 2002). La producción acuícola moderna está asociada a sistemas productivos en donde los peces deben ser criados en condiciones de alta densidad poblacional y manejo intensivo, debido a lo cual las enfermedades infectocontagiosas se han convertido en una amenaza para la piscicultura nacional (Schäfer *et al*, 1990). A esto se le suma, la internación de ovas desde el extranjero lo que coloca a la actividad en constante vulnerabilidad sanitaria (Cerna, 2000). Gracias a la longitud de nuestro territorio continental, Chile ha logrado posicionarse como el segundo exportador de salmónidos a nivel mundial detrás de Noruega, teniendo como principales mercados a Estados Unidos y Japón, además de Europa, Latinoamérica y Asia (FAO, 2006). De acuerdo con datos de la Organización Mundial para la Alimentación y Agricultura (FAO), durante el año 2007, la producción de salmón en Chile y Noruega (1.152.388 Tm) representó más del 80% de la producción total de salmón (1.378.874 Tm) (Burrige *et al.*, 2010). La producción mundial acuícola ha mostrado un fuerte incremento, con una tasa de crecimiento anual promedio del 6,2%, lo cual se ha reflejado en una producción de 38,9 millones de toneladas en el año 2003 a 52,5 millones de toneladas en el año 2008, con un valor de producción acuícola estimado en 98.400 millones de USD para el año 2008 (Anuario de estadística de pesca y

acuicultura de la FAO, 2008). En 2003 se declaró que las pérdidas anuales provocadas por la enfermedad rickettsial SRS fueron del orden de los US\$ 100 millones; esta patología, junto con la enfermedad viral IPN, generaron gastos correspondientes al 12% de los ingresos anuales generados por este sector productivo (Bravo *et al.*, 2005). Dentro de las patologías que afectan a la salmonicultura, se encuentran las de origen viral, las que son consideradas de mayor importancia, debido a la dificultad del diagnóstico y control, y donde la mayoría de las epidemias son agudas o subagudas, sumándose además la inexistencia de un tratamiento quimioterápico para ellas (Post, 1983). Pese a esto la industria chilena del salmón ha comenzado a recuperarse gracias a medidas sanitarias que evitaron la propagación de la infección (InfosurHoy, 2010).

2.2 Virus de la necrosis pancreática infecciosa en el Mundo

La Necrosis Pancreática Infecciosa es la enfermedad de etiología viral de peces de mayor distribución mundial (OIE 2005); Siendo aislado por primera vez en el año 1957 desde trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) en Norteamérica (Wolf, 1988) y reconocida como la de mayor impacto en el cultivo de salmónidos en la Unión Europea y Noruega, y otros países importantes en el cultivo de salmónidos (Roberts y Pearson, 2005). Muchos piscicultores consideran a la Necrosis Pancreática Infecciosa, poco grave, ya que no afecta clínicamente más que a los alevines de algunos *Salmonidos*. Esta actitud deberá cambiar pronto pues la elevación de los gastos de producción (alimento y mano de obra) hará que cualquier causa de pérdidas en otro tiempo considerado poco importante, se vuelva intolerable (De Kinkelin *et al.*, 1991). Desde esta perspectiva las enfermedades virales tienen particular importancia, debido principalmente a que la mayoría son agudas o subagudas y a la inexistencia de tratamiento (Sano 1995).

2.3 Virus de la necrosis pancreática infecciosa en Chile

El primer aislamiento, en Chile, del virus IPN fue de una piscicultura de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), y constituye el primer reporte de ovas importadas desde Norte América (Mac Allister y Reyes, 1984. Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), fue descrito en Chile en el año 1998 (Fernández, 2005). En Chile el virus está ampliamente distribuido en las diferentes zonas donde se realiza cultivo de salmónes. El primer registro de IPNV pertenece a un cultivo del lago Llanquihue, décima región. Posteriormente al aislamiento, se registraron numerosos diagnósticos llevados a cabo por diferentes laboratorios y que comprometían a distintas empresas; sin embargo, fue sólo hasta noviembre de 1998 en que se publica y “oficializó” la presencia de IPNV en Chile por parte del SERNAP (Fernández 2005). Este virus afecta a diversas especies de salmónidos y otros, incluso moluscos, produciendo una mortalidad que bordea el 90% en alevines de salmón, y los que sobreviven se convierten en portadores asintomáticos, actuando como reservorios y fuente directa de propagación de la enfermedad (Bootlandet *al.*, 1991). Dos de las principales víctimas de esta infección en nuestro país son las especies de Salmón del atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), las que al ser contaminadas causan importantes pérdidas en la industria chilena de la salmonicultura, (Chamorro *et al.*, 2006). La mayor prevalencia de IPNV entre salmónidos la presenta *Salmo salar*, con un 64,9% de diagnósticos positivo. Tanto el desarrollo de la infección como el resultado final dependerán del medio ambiente, (Rodríguez *et al.*, 2003) el que influye directamente en los factores, tanto del hospedero como del virus; por lo que los mecanismos que facilitan el establecimiento y evolución de la infección dependen de las propiedades que

mediarán la interacción inicial entre virus y célula y que determinarán que una infección sea o no, productiva en estas especies susceptibles (Ortega y Enríquez., 2007).

2.4 Características del virus

Virus de la Necrosis pancreática infecciosa (IPNV), el agente etiológico de la enfermedad de la necrosis pancreática infecciosa (IPN), es un importante patógeno viral de salmónidos silvestres y de cultivo. En el cultivo de salmónidos, la enfermedad puede causar una elevada mortalidad, tanto en alevines y juveniles de agua dulce como en *smolts* durante el primer mes después de la transferencia hacia agua de mar (Bowers *et al.*, 2008).

IPNV es un miembro bien caracterizado de la familia *Birnaviridae* perteneciente al género *Aquabirnavirus*. El virus se encuentra sin envoltura, presenta estructura icosaédrica y un genoma que consta de dos segmentos ARN de doble cadena (dsRNA) (Figura 1) (Jensen y Robertsen, 2002). La familia contiene tres géneros: *Aquabirnavirus* de peces (tipo especie, IPNV y “*yellowtailascites virus*”), género *Avibirnavirus* de aves (tipo especie, virus de la enfermedad infecciosa de la Bursa, IBDV), y género *Entombirnavirus* de insectos (tipo especie, virus X de *Drosophila*, DXV). Hasta ahora, no se han reconocido agentes patógenos del mismo género en humanos y mamíferos (Rodríguez *et al.*, 2003).

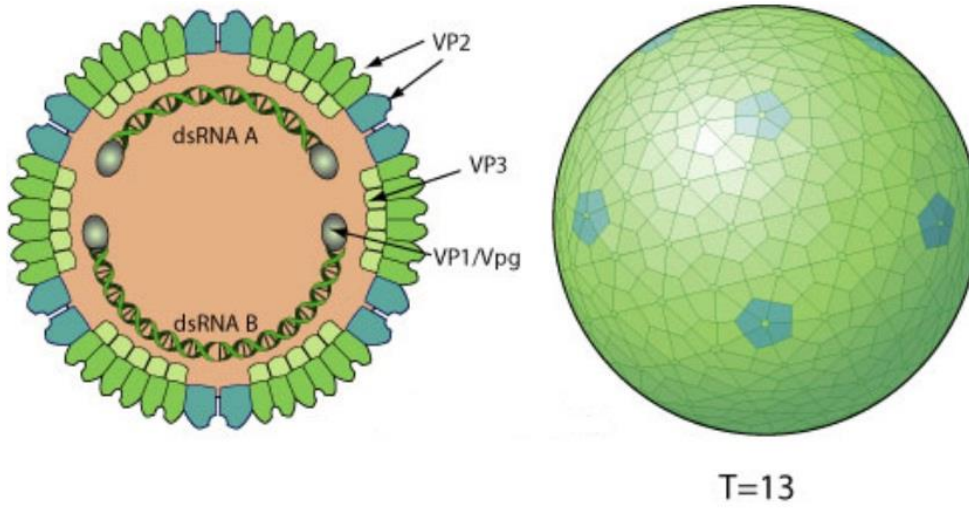


Figura 1: Estructura de virus de la necrosis pancreática infecciosa

El género *Aquabirnavirus*, de los cuales IPNV es la especie tipo, comprende *birnaviruses* acuáticos aislados a partir de un gran número de especies de peces que viven a diferentes temperaturas entre 4° C a 28°C. El rango de huéspedes de *birnaviruses* acuáticos no se limita solo a los peces, los virus de este género también han ido aislados de camarones, crustáceos y moluscos (Ørpetveit *et al.*, 2012).

Sintomatología

Los signos clínicos observados en los peces enfermos son distensión abdominal, natación aberrante, pigmentación oscura, y lesiones necróticas focales en el tejido pancreático exocrino son detectados mediante exámenes histopatológicos. Los sobrevivientes usualmente siguen infectados. La mortalidad en un brote varía considerablemente y se ha atribuido a diferencias en la susceptibilidad genética del huésped y diferente nivel de estrés ambiental (Santi *et al.*, 2004).

Métodos de identificación del virus IPN

Actualmente, la detección de IPNV se basa en el aislamiento de virus a partir de peces sospechosos usando líneas celulares establecidas de peces, para confirmar la presencia del virus se utilizan una de ensayos inmunológicos, tales como neutralización de suero, citometría de flujo, inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, inmunodot secante, immunostaphylococcus-proteína A, y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). El aislamiento del virus en cultivo celular sigue siendo el estándar para la detección de IPNV. El principal inconveniente de este enfoque es el tiempo necesario para aislar y confirmar el agente de replicación como IPNV, que puede ser de hasta 10 a

14 días después de la inoculación del virus. La reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa inversa (RT-PCR) y la hibridación *in situ* (ISH) se han desarrollado para la detección de IPNV, ambos son rápidos y más sensibles con el ensayo de cultivo de células (Bowser *et al.*, 2008).

2.4.1 Genoma Viral

El virus debe su nombre al ARN de doble cadena (bi-ARN-virus) compuesto por dos segmentos (Figura 2). El segmento A se compone de dos marcos de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés), con el ORF mayor que codifica una poliproteína de 106 kDa (NH₂-pV2-VP4-VP3-COOH) (Munang'anduet *et al.*, 2013). El segmento A codifica la poliproteína que se escinde cotraduccionalmente por la codificada serina- proteasa lisina (VP4) viral, la cual libera las proteínas pVP2 y VP3. pVP2 se procesa adicionalmente por proteasas de la célula huésped para formar la proteína madura VP2 de la cápside externa, que es la proteína más abundante del virus y contiene las regiones antigénicas responsables de la inducción de anticuerpos neutralizantes en el huésped (Skjesolet *et al.*, 2002). La poliproteína del segmento A codificada, contiene también una proteína de 15-kDa, la proteína estructural VP5, que se encuentra sólo en las células infectadas. El segmento B del genoma del IPNV es de 2,8kb y se presume que codifica la polimerasa de ARN dependiente de ARN, designada VP1. La proteína VP1 existe como un polipéptido libre y como un genoma de proteína ligada al virión (Bowers *et al.*, 2008).

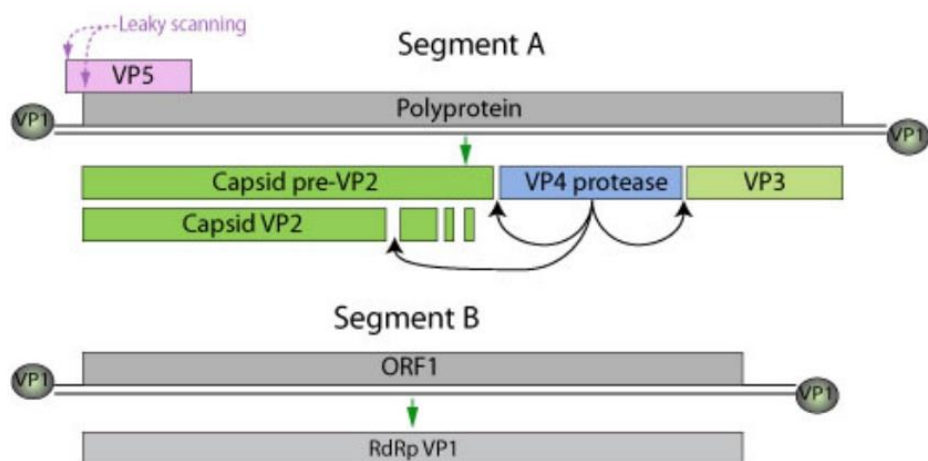


Figura 2: Genoma virus de necrosis pancreática infecciosa

2.4.2 Mecanismo de infección

La patogénesis de la infección viral no es bien conocida, se ha propuesto que la patogenicidad y virulencia se relaciona con la propiedad del virus para modificar las vías normales de señalización, a través de las proteínas virales capaces de desarrollar actividad proteína quinasa, que manipulan la maquinaria celular para favorecer la transcripción, traducción y multiplicación viral. Luego de la unión virus-célula, se desencadena una serie de señales a través de cascadas de fosforilación y defosforilación, para inhibir la expresión de genes que participan en el mecanismo de defensa celular (Lyles, 2000) y reprimir el mecanismo de muerte celular por apoptosis que permita realizar la multiplicación viral, hasta que finalmente la célula huésped muere, con la consecuente liberación de las partículas virales infecciosas. (Hong y Wu, 2002)

El virus presenta diferentes niveles de virulencia, atribuidos a su variación genética (Dobos, 1995) y a su capacidad de manipular la maquinaria celular para facilitar la síntesis viral y evadir la respuesta de defensa (Larsenet *al.*, 2004).

2.5 Mecanismos de defensa innata

Las infecciones causadas por los virus intra celulares inician complejos mecanismos de respuesta inmune. Varios leucocitos tienen un papel central, que interactúan a través de un patrón complejo que involucra moléculas de señalización y receptores (Rønneseth *al.*, 2006). Para establecer infecciones *in vivo*, los virus no sólo debe entrar en las células anfitrionas, replicar su genoma, sintetizar proteínas virales y montar nuevas partículas infecciosas, sino que también

debe enfrentarse a poderosos mecanismos de defensa inmune de las células huésped. Con el fin de replicar eficazmente es probable que IPNV, como muchos otros virus han desarrollado estrategias para evitarlos elementos de las respuestas inmunitarias del huésped (Skjesolet *al.*, 2002).

La presencia de virus dentro de las células inmunes podría tener un impacto importante en las funciones celulares implicadas en la inmunidad necesaria para controlar o evadir virus durante las infecciones agudas, crónicas o virus latentes (Rønneseth *al.*, 2006). Peces teleósteos están armados con un mecanismo de defensa antiviral innata basada en la producción de interferón (IFN) acompañado de otros mecanismos, lo que representa la primera línea de defensa contra agentes infecciosos; siendo las moléculas de IFN típicamente secretadas por células nucleadas de vertebrados en respuesta a una infección viral. (McBeath *al.*, 2007).

Dentro de estos mecanismos de defensa innata en *S.salar*, se encuentran:

1. Interferón (IFN)
2. Proteína Mx
3. Factor regulador de Interferón (IRF)
4. Transductor de señal y activador de la transcripción (STAT)

2.5.1 Interferón

Peces teleósteos están armados con un mecanismo de defensa innata antiviral basada en la producción de interferón (IFN), lo que representa la primera línea de defensa contra agentes infecciosos tales como IPNV. Moléculas de IFN son típicamente secretadas por células nucleadas de vertebrados en respuesta a una infección viral. Existen dos clases de IFNs; de tipo I (IFN α – IFN β) producidos por todos los tipos de células, y de tipo II (IFN γ) que es producido por las células inmunes más especializados. En los vertebrados superiores, IFN de tipo II es generalmente aceptado por ser parte de la inmunidad adaptativa, mientras que IFN de tipo I es un importante mediador de la respuesta innata (McBeath *et al.*, 2007). El sistema de IFN Tipo I es activado por inducción viral, estas citoquinas modifican las células en un estado antiviral induciendo la expresión de proteínas con actividad antivírica incluyendo 2', 5'-Oligoadenilato sintetasa, proteína quinasa R (PKR y un grupo de GTP-asas llamadas proteínas Mx. Los virus patógenos han desarrollado varias formas de evitar el sistema de IFN Tipo I, ya sea evitando o previniéndola inducción de IFN o proteínas antivirales, o bien mediante la inhibición de la acción de las proteínas antivirales (Jensen & Roberts *et al.*, 2002). La inducción de IFN por el sistema de IPNV, es probable que implique una compleja interacción virus/huésped y esto puede jugar un rol en la determinación del estado resistencia/susceptibilidad. Un efecto antiviral inducido por interferón contra IPNV se ha demostrado *in vitro*, aunque los mecanismos aún no se han elucidado (McBeath *et al.*, 2007).

Peces poseen secuencias con similitud significativa de IFNs de tipo I con los mamíferos (Purcellet *et al.*, 2009), *S. salar* posee cuatro subunidades de IFN, donde se cree que IFN $\alpha 1$ e IFN $\alpha 2$, son los más importantes en la fase temprana a la infección (Berget *et al.*, 2009). IFN $\alpha 1$ e IFN

$\alpha 2$, están codificados por genes diferentes pero muestran un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos (Berganet *al.*, 2006).

2.5.2 Proteína Mx

Un blanco potencial para la manipulación de los mecanismos antivirales de peces, son las proteínas Mx. Las proteínas Mx se descubrieron originalmente en ratones de laboratorio influenza-resistentes, y desde entonces se han identificado en muchas especies de vertebrados, incluyendo peces. Estas son proteínas-dinaminas relacionadas con los miembros de la gran súper familia GTPasa (DeWitte-Orretal., 2007). Las proteínas Mx muestran actividad antiviral contra una amplia gama de virus RNA y tras la acumulación de estímulos de IFN en la célula, estas interfieren con el transporte de proteínas virales y de este modo perturban la producción de partículas virales (Colletetal., 2007).

La actividad antiviral de la proteína Mx está bien documentada en los mamíferos, y recientemente también se han manifestado en contra de IPNV en *S. salar* (Kilenget *al.*, 2009).

Moléculas de IFN son típicamente secretadas por vertebrados, por células nucleadas en respuesta a una infección viral. Una vía de señalización rápida induce la expresión de un número de proteínas, incluyendo Mx, con propiedades antivirales directas e indirectas (Mcbeathet *al.*, 2007). Una variedad de agentes se han explorado tanto *in vivo* como *in vitro* por su capacidad para mejorar la expresión Mx, un estimulante común es la síntesis de RNA bicatenario (dsRNA), poli inosínico: poliácido citídico (poliI:C) (DeWitte-Orret *al.*, 2007).

Con respecto a la respuesta de IFN-regulado anti-viral, los virus pueden suprimir el sistema en cualquiera de los puntos siguientes: la transcripción de IFN de tipo I, la traducción de los genes de la proteína IFN, señalización de las vías de transcripción de IFN-regulados, la transcripción de genes antivirales como Mx, o la traducción de las transcripciones Mx (Collet *et al.*, 2007).

2.5.3 Factor regulador del Interferón

El Factor regulador de interferón (IRF) constituyen una familia de factores de transcripción que tienen papeles importantes en la regulación de la respuesta inmune celular en las infecciones por virus y otros factores de estrés celular (Tamura *et al.*, 2008). Nueve IRF distintos han sido caracterizados en mamíferos de los cuales cinco (IRF-1, IRF-3, IRF-5, IRF-7 y IRF-8) han sido implicados como reguladores positivos de la inducción de IFN tipo I, mientras que IRF-2 es un regulador negativo (Kileng *et al.*, 2009).

La historia evolutiva revela que los vertebrados miembros de la familia IRF se puede subdividir en cuatro grupos: IRF1-G (IRF1, IRF2), IRF3-G (IRF3, IRF7), IRF4G-(IRF4, IRF8, IRF9, IRF10) y IRF5-G (IRF5, IRF6) (Bergan *et al.*, 2008). Dentro de estos IRFs, se sabe que IRF 7 es esencial para la respuesta antiviral sistémica de IFN, del mismo modo se tiene conocimiento que IRF 3 se encuentra constitutivamente expresado en todos los tejidos, lo que permite la aparición muy precoz de la transcripción de IFN β en el sitio de la infección (Honda *et al.*, 2005). IRF 1 e IRF 2 son importantes en la regulación de la fase temprana de diversos tipos de respuesta al estrés (Takaoka *et al.*, 2008); Sin embargo, IRF 1, fue descubierto primero en mamíferos al unirse y activar promotores IFN β ; Este IRF es importante en la activación de la respuesta inmune adaptativa frente a patógenos (Paund y Pitha, 2007). IRF 2, por el contrario, ha

sido considerado como un inhibidor de la transcripción de IFN α/β , ya que normalmente se expresa constitutivamente para enmascarar el IRF-E (elemento de unión a IRF) sitio de unión de los promotores de IFN, impidiendo la producción de IFN en las células que crecen normalmente (Harada *et al.*, 1989).

Las infecciones por virus se detectan principalmente por los receptores para los ácidos nucleicos en el citoplasma o en endosomas (Receptor de Tolllike 3, 7, 8 y 9) (Wang *et al.*, 2008). Este evento activa una cascada de señalización que conduce a la activación de NF κ B, IRF 3 y IRF 7 (Fitzgerald *et al.*, 2003). En los mamíferos, activado por NF κ B y IRF3 y/o IRF7 translocan al núcleo, donde se unen al promotor IFN β , para iniciar la producción de este. La secreción de IFN β , protege las células vecinas de infección viral mediante la inducción de proteínas virales tales como Mx, ISG 15 y la proteína quinasa R (PKR) (Bergan *et al.*, 2008).

La mayoría de los informes de peces han sido en IRF1 e IRF 2, pero recientemente IRF3, IRF 5 e IRF 7 se han clonado y caracterizado con respecto a los perfiles de expresión en tejidos y células. En general, los estudios funcionales sobre IRF en peces han sido muy escasos (Bergan *et al.*, 2008).

2.5.4 Transductor de señal y activador de transcripción

Transductor de señales y activador de la transcripción (STAT) es una familia de moléculas citosólicas que consisten de 6 miembros que participan en la señalización de citoquinas como interferones de tipo I y II (IFN) (Collet *et al.*, 2008). Es seguido por el acoplamiento y la fosforilación de STAT1 o STAT2 de moléculas de una sola tirosina. Los residuos fosfotirosil interactúan con el dominio homólogo Src2 (SH2) y promueve la formación de STAT1:STAT2.

Heterodímeros, que se asocian con el factor citosólico regulador de interferón (IRF) -9 para formar el complejo ISGF3 que luego migra hacia el núcleo (Collet *et al.*, 2009).

Señales de IFNs a través de la vía Jak-STAT donde el transductor de señal de fosforilación, y activador de transcripción 1 (STAT1) asociados con STAT2 e IRF-9, forman el complejo ISGF3, que es responsable de la activación transcripcional de ISGs (Kileng *et al.*, 2009).

STAT1 homodímero entra en el núcleo y se unen al sitio de activación-IFN γ (GAS), que están presente en el promotor de determinados ISGs. Sin embargo, además de las interacciones de dominio SH2 de fosfotirosina de las formas activas de STAT, STAT no fosforilados pueden formar dímeros de una conformación diferente a través de su dominio N-terminal. De igual modo, STAT1 se puede encontrar tanto en el citoplasma y el núcleo sin la estimulación de citoquinas de las células (Skjesolet *et al.*, 2010).

En general, las enfermedades virales de peces son difíciles de controlar debido a la alta susceptibilidad de los peces a una edad temprana, y al conocimiento insuficiente de la patogénesis de las infecciones virales. En este contexto, se planteó en este trabajo evaluar el efecto de la infección por IPNV en la expresión de transcritos antivirales contra el virus.

2.6 Hipótesis

El virus IPN modifica la expresión de una amplia gama de transcriptos antivirales y factores de transcripción de expresión temprana implicados en mecanismos antivirales de la célula infectada a lo largo del curso de la infección.

2.7 Objetivo general

Determinar cómo afecta el virus IPN en el transcurso del tiempo, la expresión de transcritos antivirales y factores de transcripción de expresión temprana.

2.7.1 Objetivos específicos

- 1.** Determinar y cuantificar el grado de virulencia del aislado viral a estudiar mediante cálculo de TCID₅₀ y qPCR en tiempo real.
- 2.** Diseño de sondas oligonucleotídicas para la detección de marcadores antivirales y factores de transcripción de expresión temprana en leucocitos de *S. salar* mediante qPCR en tiempo real.
- 3.** Detección y cuantificación en una cinética de infección por IPNv de marcadores antivirales y de factores de transcripción de expresión temprana en leucocitos de *S. salar*

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES.

3.1.1 Material Biológico

Cultivo celular

Para el estudio se utilizó la línea celular derivada de riñón anterior SHK-1 (*Salmon Head Kidney-1*). El crecimiento celular se realizó usando medio de cultivo Leibovitz L-15 suplementado con 10% de SBF, 4 mM de L-Glutamina, 50 µg/ml de Gentamicina y 40 µM de 2-mercaptoetanol (Jensen y Robertson, 2002).

3.1.2 Virus IPN

El aislado viral empleado en este estudio fue facilitado por laboratorio BIOVAC S.A y propagado en línea celular CHSE-214 de nuestro laboratorio. Se le asignó el código IPNV-40989.

3.1.3 Reactivos.

Ambion RNA: TRIzol Reagent.

BioLabs: *Gel loading dye blue 6X, 50 bp DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder, 1 kb DNA Ladder.*

Gibco: 0,5% Tripsina-EDTA (10x) (para medio de cultivo)

HYCLONE: Solución de penicilina-estreptomicina (para medio de cultivo).

Invitrogen: SYBR safe DNA gel stain.

Lonza: agarosa (Sea Kem Le Agarose para electroforesis en gel).

Omega Bio-Tek: Desoxinucleótidostrifosfato.

Thermo Scientific: 6X DNA Loading Dye

Winkler: Bicarbonato de sodio para análisis.

3.1.4 Kits

Axygen: AxyprepMultisources Total RNA Miniprep kit (para extracción de RNA).

Agilent: 2 X Brilliant II SYBR Green QPCR master mixes.

3.1.5 Soluciones.

Alcohol 95° TCL.

Cloroformo: EMSURE ACS, ISO, Reag. PhEur Chloroform for analysis.

HorseSerum 16050.

HyClone: L-15 Leibovitz Media + 2,05mM L-Glutamate.

PBS: NaCl (1,37 M), KCl (26,8mM), Na₂HPO₄ (78,1mM), KH₂PO₄ (14,7mM).

TAE X: 0,968g Tris-base, 0,204 ml ácido acético glacial, 0,4ml EDTA 0,5M Ph 8,0 en 1L de aguaultraura).

3.1.6 Instrumentos utilizados.

Agitador :MERK HeidolphPolymax 1040

Agitadormagnético: BARNSTEAD THERMOLYNE NuovaStirrer.

Autoclave: MARKET FORGE STERILMATIC

Balanza: RADWAG WTB 200.

Botellas de medio de cultivo: NUNC tm

Cámara de electroforeis, Bio-Rad wide mini sub cell GT, Bio –Rad mini-sub cell GT.

Cámara de flujo laminar: LABCARD Class II Biological Safety Cabinet.

Cámara de PCR: BIOAIR Aura PCR, Escoclass II BSC Airstream.

Centrífuga: Eppendorf centrifuge 5810 R.

Destilador de agua: THERMO SCIENTIFIC BARNSTEAD MEGA-PURE STILL MP-11.

Filtros: Orange Scientific Membrane CA, porosity 0,2um, inlet luer lock, outlet luer slip.

Fuente de poder: Bio-Rad PowerPac Basic.

Incubadora: ARQUIMED Autotwing FTC 90E.

Jeringas: NIPRO jeringa de plástico desechable

Microcentrífuga: Heahrow scientific sprout, Hettich, Heraeus BIOFUGE Fresco, Sigma.

Microondas: Somela fancy WT 1700.

Micropipetas: Labnet.

Microscopio: Olympus CKX41 ARQUIMED.

NanoDrop 2000 SPECTROPHOTOMETER: Thermo SCIENTIFIC.

Parafilm: Laboratory Film 4 IN. X 125 FT. ROLL.

Placa de micropocillos para cultivo de Tejidos: Orange Scientific

PlacaNeubauer: BOECO Germany Bright Line deep 1/10mm.

Placas de vidrio: BIO-RAD Mini PROTEAN SystemGlassPlates

pHmetro: WTW inolab pH720.

Pipetas: Disposable serological pipettes 10 y 5ml.

Selladora manual: P&C

Termociclador PCR tiempo real: STRATAGENE Mx 3000P.

Termociclador: AxygeneMaxygene.

Tubos falcon: AXYGEN Scientific screw cap tubes, SCT-50ml-25-S

Vórtex: mcr VM-2000.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Diseño de partidores

Se utilizó la base de datos de *NationalCenter forBiotechnologyInformation* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mediante el cual se buscaron las secuencias nucleotídicas dianas correspondientes a IFN, IRF, STAT y Proteína Mx; Se diseñaron partidores (Tabla I), según los datos entregados en INVITROGEN (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>), seleccionándose aquellos partidores que otorguen productos entre 100 y 200 pares de bases, y los cuales estén en los primeros del ranking.

Tabla 1.Partidores diseñados para *S. salar*

Nombre partidor	Secuencia nucleotídica 5'-3'	Longitud de producto
	Forward/Reverse	
STAT 1	G T T C A G G A T G C A G A G C A T G A T A A C T G T G C C A T C C C A T T C A	117
STAT 2	T C A A C A T G C T T T G C C T T G A G G T T T G T G T G C G A T C A T G T C C	156
STAT 4	C A A C T G C A T C A T G G G T T T T G C G A G A T G A A C T T G G C C T C T C	160
IFN α 1	C A G T G C A G A G T T G G A C G T G T G G T C C A G C A G G G A A A G G T A T	123
IFN α 2	G C G A G G T T G A G G A C A A A G T C C A T G G C A G G T G A T A C A C A G G	170
IFN γ	C A A C C A G A T G C T G A A C C A G A T T C T G C A G G T G T G T C C T C A G	132
IRF 1	G C A A T G A A G T A G G C A C A G C A C G C A G C T C T A T T T C C G T T T C	100
IRF 2	A G G T G A C C A C G G A G A A T G A G G A G C A C G A G G G A A C T C T C A G	193
IRF 3	G G C C A A A C T G A C C C A A G A T A G C C T C C T G C T C T T G T C A A A C	140
IRF 4	G C A G C T A C G A C A T C C C T C T C G T C C T G C A G G G T G T T G C T A T	110
IRF 5	C A C C A C A C C C C T A T G T A C C C T G T T C C A A C T T C A C C A C C A A	140
IRF 7	A T C C A C A T G T G C T T T G G T G A T C T G C A G G C T G A T G T C A T T C	154
IRF 9	T G C C T T G T A C C G A T G A A T G A C A C C T C C T C C T C G C T A T C T G	111
Mx 1	A T G C C A C C C T A C A G G A G A T G A G C T G C T C G A T G T T G T C C T T	175

3.2.2 Propagación de virus IPN, en línea celular SHK-1

Se cultivan células SHK-1 en medio L-15 al 10% de suero bovino fetal, una vez que estas estuvieron al 100% de confluencia se infectó con una alícuota de virus (1 ml), se descartó el sobrenadante, se agregó el inoculo; Esto se mantuvo en adsorción durante una hora con agitación cada 10 minutos. Luego, se le restituyó el medio L-15 al 2% de suero bovino fetal y se mantuvo esta infección hasta la visualización del efecto citopático. Una vez obtenido este efecto citopático las células fueron congeladas a -80°C por 20 minutos, descongeladas, vueltas a congelar, vueltas a descongelar con el fin de reventar todas las células que pueden haber quedado en monocapa. Posteriormente, se recolecta todo el sobrenadante y se centrifuga a 3500g, durante 5 minutos, para descartar el debris celular, luego de ese sobrenadante se recuperan alícuotas de 1 ml, en eppendorf de 1,6 ml y se congela a -80°C hasta su uso.

3.2.3 Tratamiento celular

Células SHK-1 son tratadas con 2 mL de PBS, y luego se agrega 1 mL de tripsina; Posteriormente las células son trasvasiadas a un falcón para luego ser centrifugadas a 1600 RPM por 10 minutos a 4°C . De estas células se realiza una dilución de 50, tomando 10 μL de suspensión celular y agregado a 490 μL de medio (conteniendo suero bovino fetal al 10%, antibiótico a 100X y medio mínimo esencial). A continuación, se cuantifico el número de células en Cámara Neubauer, para luego saber la cantidad justa de células por 1 mL, multiplicando el número de células por el factor de dilución y esto por 10.000. Esto para obtener 75.000 células por pocillo, en una placa Elisa de 96 pocillos. Estas células se dejaron con 100 μL de medio durante 24 horas a 15°C , para su posterior infección.

3.2.4 TCID₅₀

Para titular el virus, se prepararon diluciones en base 10 de la alícuota. Para ello se adicionaron 50µL de dilución de virus a 450µl de L-15 al 2% SBF (dilución 1), luego se tomaran 50µL de esta dilución y se adicionarán en un nuevo tubo con 450 µL de L-15 al 2% SBF (dilución 10⁻¹), lo mismo se debe repetir, hasta obtener una dilución de 10⁻⁸. Posteriormente, se inocularon con 50 µL de cada dilución, células SHK-1 crecidas en confluencia sobre placas de 96 pocillos (1 x 10⁵ células por pocillo), previa extracción del medio, dejando dos filas de pocillos como control, adicionando a estos sólo medio de cultivo.

La placa se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente, con agitación cada 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se adicionó a cada pocillo, 4,5 ml de medio L-15, 2% SFB, junto con antibiótico. La placa se dejó incubar durante 7 días a una temperatura de 15° C.

Luego de esto se realizó el cálculo para TCID₅₀, el cual corresponde a la inoculación de un agente patógeno en la cual el 50% de las células en experimentación se mueren y el otro 50% no. Para la realización del cálculo de TCID₅₀ se utilizó la fórmula de Reed y Muench.

$TCID_{50} = (\text{Log dilución con más de 50\% mortalidad}) + (\text{distancia proporcional} \times \text{Log dilución})$

$$\text{Distancia proporcional (DP)} = \frac{\% \text{Mortalidad} > 50\% - 50\%}{\% \text{Mortalidad} > 50\% - \% \text{Mortalidad} < 50\%} \times \text{Log DF}$$

Factor de dilución = 20

Logaritmo (Log) dilución = 2

Posteriormente, se procedió al cálculo de la concentración viral, en unidades formadoras de placa (pfu) por ml según la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{N}^\circ \text{placas delisis}}{\text{V. inóculo (ml)} \times \text{dilución}}$$

Luego se determinó el volumen necesario para infectar placas del tamaño requerido, con una multiplicidad de infección (MOI) específica. Por ejemplo, para infectar placas de 50 mm (aprox. $1,2 \times 10^6$ de células por placa), con un MOI de 5 (5 pfu por célula):

$$\begin{array}{lcl} 5 \text{ pfu} & \longrightarrow & 1 \text{ célula} \\ X & \longrightarrow & 3 \times 10^6 \text{ células} \end{array} \quad X = 1,5 \times 10^7 \text{ pfu}$$

Tabla 2. Modelo de placa sembrada

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}						B	B
B	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}						B	B
C	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}						B	B
D	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}						B	B
E	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}						B	B
F	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}						B	B
G	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}						B	B
H	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}						B	B

3.2.5 Cinética de infección

Para el análisis de las alteraciones inducidas por IPNV, se realizó una cinética de infección, donde las células crecidas en placas de 6 pocillos ($1,2 \times 10^6$ células), en confluencia, fueron sometidas a la inoculación del virus a diferentes tiempos, los cuales son desde las 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 24; 48; 72; 96; 120 hasta las 144 horas. Al momento de infectar las células, se realizó a un MOI 5, para esto se agregó un volumen de 116,79 μL de alícuota de virus, se esperó 45 minutos, que es el tiempo estimado de adsorción del virus, y durante este tiempo las placas fueron agitadas en intervalos de 10 minutos, a temperatura ambiente.

3.2.6 Extracción de RNA

Para la obtención de RNA se utiliza el método de extracción de RNA total basado en el uso de fenol en mezcla con tiocianato de guanidino (Chomczynski y Sacchi, 1987) con algunas modificaciones.

Las células en monocapa se homogenizan directamente con 500 μL Reactivo, y se transfiere a un eppendorf sobre hielo, luego se agregan 100 μL de cloroformo, agitando la suspensión vigorosamente, se centrifuga a 12.000 g durante 10 minutos a 10°C . Posteriormente, la fase acuosa (300 μL) se transfiere a un nuevo tubo y se precipita el RNA con 300 μL de etanol a -20°C , agitando vigorosamente por 5 segundos y luego 5 segundos en Vortex, y se centrifuga a 6.000 g por 1 minutos a 4°C . Posteriormente el pellet se lava con 500 μL de Buffer 1 y se centrifuga a 1.200g por 1 minuto, descartándose el líquido sobrenadante y agregando 700 μL de Buffer 2, y centrifugando a 1.200g por 1 minuto, este proceso se realizó 2 veces. Luego, se centrifuga en seco a 1.200g por 1 minuto a 4°C . A continuación, se agregan 70 μL de DEPC (a

50° C) dejándose reposar durante 1 – 2 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifuga a 12.000g por 1 minuto. El RNA se puede utilizar de inmediato o almacenar a -80° C.

3.2.7 Cuantificación de RNA.

La cuantificación de ARN obtenido como se describió en la sección 3.1.6 se realizó mediante el registro de la absorbancia a 280 nm de 1,5 µL de la preparación de ARN, utilizando el equipo NanoDrop. Se consideró que una unidad de absorbancia equivale a 50 ng/µl de ARN. El cálculo final lo realiza el software NanoDrop2000 incorporado al equipo (Sambrook *et al.*, 2001).

3.2.8 Reacción la polimerasa en cadena acoplada a transcripción reversa (RT-PCR)

Para la transcripción reversa, se utilizó 1µg de RNA total, 1 µL de OligodT, 1 µL de dNTP mix 10 mM y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 12 µL. La mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo por 2 minutos. Luego se agregó 4 µL de 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂, pH 8.3), 2 µL DTT 0,1 M, 1 µL de RNaseOut 40 U/ µL, y se incubó a 37°C por 2 minutos. Finalmente se adicionó 1 µL (200 U) de la enzima SuperScript™ II RT, se mezcló bien, y se incubó a 25°C por 10 minutos y luego 37° C por 50 minutos. La reacción se inactivó a 70°C por 15 minutos.

La amplificación fue desarrollada en un termociclador Mastercycler® personal Eppendorf de la siguiente manera: 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos para la denaturación a 94°C, 30 segundos a 55°C para la temperatura de alineamiento y 30 segundos a 72°C para la extensión. 10 minutos a 72°C para la extensión del producto final.

Cada reacción contiene: 200 μM dATP, 200 μM dGTP, 200 μM dCTP, 200 μM dTTP, 2,5 mM MgCl_2 , y 0,5 μM de cada partidor. Se agregó al mix 1 μL de cDNA, y agua de biología molecular para un volumen final de 15 μL .

Los productos de amplificación obtenidos se resuelven en un gel de agarosa al 1 % y son visualizados por tinción con Sybr safe. Como control de carga se realizó la amplificación usando los partidores para beta-actina.

3.2.9 Reacción de la polimerasa en cadena en gradiente para partidores.

Se amplificaron fragmentos de las secuencias de INF, IRF, STAT y Proteína Mx, los cuales fueron reconstituidos y alicuotados para obtener una concentración de 10 mM para cada partidor, señalado en la tabla 1. Para las reacciones de PCR se utilizaron 1 μL de partidor forward y 1 μL de partidor reverse, 12,5 μL de *GoTaqFlexi DNA polimerase* (5U/ μl), 9,5 μl de agua grado biología molecular y 1 μL de ADN, lo cual es todo homogeneizado. El programa de amplificación consistió de una primera etapa de denaturación a 95°C por 5 minutos, una segunda fase de 35 ciclos de: 50 segundos de denaturación a 95°C, 50 minutos de alineamiento a 50°C y 50 segundos de extensión a 72°C además de un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72°C (Sambrook *et al.*, 2001). Para observar las temperaturas de alineamiento de los partidores se utilizaron los pocillos 6, que se encontraba a 55,3° C, el pocillo 8, el cual se encontraba a 57,3° C, y finalmente el pocillo 12, el cual se encontraba a 60° C. Esto se realizó en un termociclador Mastercycler® personal Eppendorf.

3.2.10 Análisis electroforético de productos de PCR en gel de agarosa.

Los geles se prepararon pesando la cantidad necesaria de agarosa en polvo, se agregó el volumen necesario de buffer TAE 1X, se fundió en microondas, se agregó el volumen necesario de SYBR SAFE 10000X para obtener concentración 1X, y la mezcla resultante se enfrió y gelificó. Se cargaron 5-10 μ l de producto de PCR y 7 μ L de marcador de tamaño molecular de ADN, de 100 pb. La corrida electroforética se llevó a cabo en el mismo tampón en que se preparó el gel de agarosa, aplicando una corriente de 100 V durante 30-50 minutos o 70 V por 45 min. Finalmente, las bandas se visualizaron en un transiluminador y las imágenes fueron capturadas utilizando un sistema de documentación de geles (Sambrook *et al.*, 2001).

3.2.11 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Se amplificó fragmentos de las secuencias de los genes IFN α 1, IFN α 2, IFN γ , IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, STAT4 y Mx1 de *S. salar*, utilizando diferentes cantidades de partidores, 7,5 μ l de *2X Brilliant II SYBR Green QPCR master mix*, 2 μ l de ADN genómico o agua grado biología molecular (como control negativo) y un volumen de agua grado biología molecular suficiente para completar 15 μ l. Se utilizó el termociclador MX Pro 3000P para realizar las reacciones de PCR en tiempo real, utilizando un programa de amplificación compuesto por una primera etapa de denaturación a 95°C por 10 minutos, una segunda fase de 35-45 ciclos de: 15 segundos de denaturación a 95°C, 15 segundos de alineamiento a 57°C y 15 segundos de extensión a 72°C o 40 segundos de alineamiento-extensión a 60°C, además de una curva de disociación compuesta por 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 25°C, 1 segundo a 70°C y 1 segundo a 95°C. Los resultados de las reacciones se evaluaron utilizando el programa MXPRO y electroforesis en gel.

4 RESULTADOS

4.1 Título viral

Con el objetivo de determinar cuál era el título viral se infectaron células SHK-1 provenientes de cabeza de riñón de *S. salar*, las cuales exhiben propiedades similares a macrófagos, para de este modo establecer el MOI, mediante la presencia de efecto citopático (ECP). Una vez visto este, se calculó las unidades formadoras de lisis por mililitro (PFU/mL). Este valor permite calcular el título viral (Tabla 3); Con el título viral y considerando una multiplicidad de infección (moi) de 5 partículas virales por cada célula, se calculó el volumen de inóculo para cada experimento.

Tabla 3: Resultados TCID₅₀

Serie de dilución calculada	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷	10⁻⁸
Pocillos totales	5	5	5	5	5	5	5	5
Pocillos positivos	5	5	5	5	5	5	3	0
Pocillos negativos	0	0	0	0	0	0	2	5
% Infectadas	100	100	100	100	100	100	60	0
Distancia proporcional	0	0	0	0	0	0	0,17	0
TCID₅₀							6,81x10⁻⁸	
TCID₅₀/mL							7,34x10⁷	

4.2 Estandarización de partidores para qPCR

Para realizar el análisis de la expresión de genes asociados a la respuesta inmune temprana, se evaluó la expresión de los genes IFN α 1, IFN α 2, IFN γ , IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, STAT4 y Mx1. Para esto se utilizaron partidores diseñados a través del centro nacional de información sobre biotecnología (NCBI). Para determinar las condiciones óptimas de amplificación, se realizó un PCR en gradiente, el cual se realizó a temperaturas desde los 55°C hasta 60°C. Los resultados obtenidos muestran que los partidores fueron eficaces en detectar la expresión de los genes anteriormente mencionados a las distintas temperaturas evaluadas. Finalmente se seleccionó una temperatura de alineamiento de 60°C, para el qPCR (Figura 3).

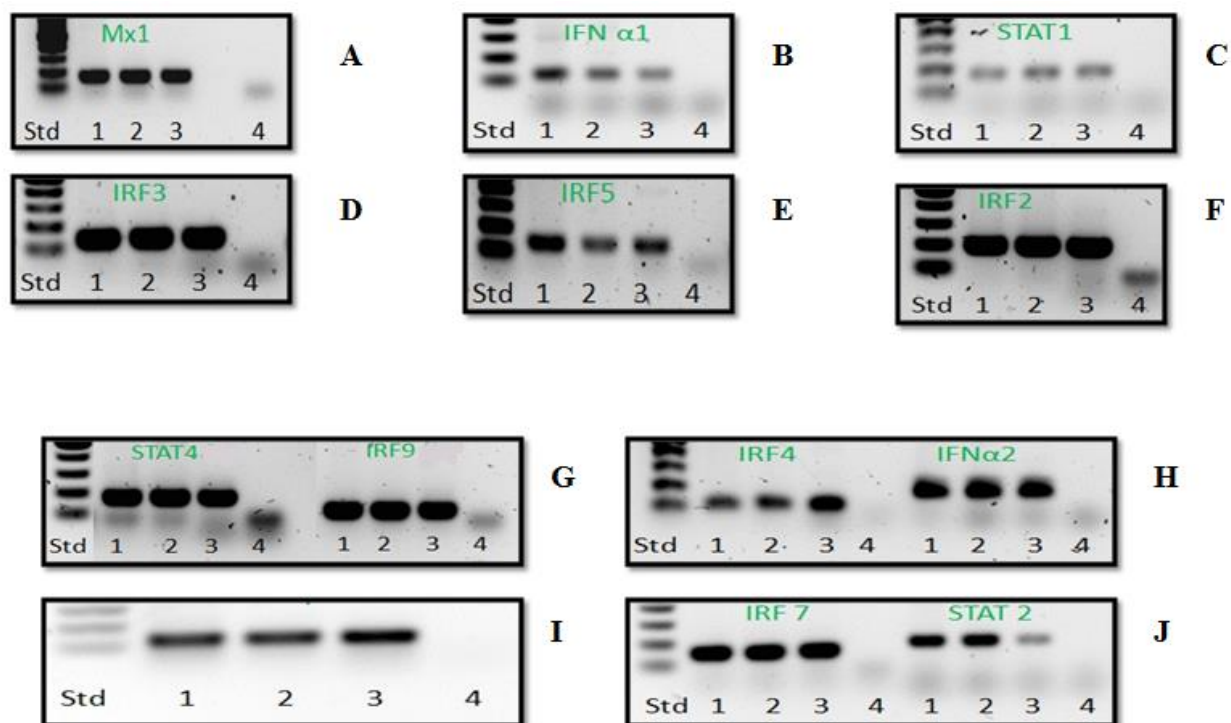


Figura 3: PCR en gradiente de temperatura para los genes IFN α 1, IFN α 2, IFN γ , IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF7, IRF9, STAT4 y Mx1. Estandarización de los partidores específicos para cada uno de los genes **A:** Mx 1. **B:** IFN α 1. **C:** STAT 1. **D:** IRF 3. **E,** IRF 5. **F:** IRF 2. **G:** STAT 4, IRF 9. **H:** IRF 4, IFN α 1. **I:** IFN γ . **J:** IRF 7, STAT 2. Para cada una de estas electroforesis de productos de PCR se incluyó una reacción sin templado (control negativo) y un marcador de tamaño de 100 pb. El número en la parte inferior de cada electroforesis muestra la temperatura de alineamiento para cada reacción de PCR, siendo **Std:** Estándar, **1:** 55,3 °C, **2:** 57,3°C, **3:** 60 °C y **4:** Control negativo.

4.3 Cinética de expresión de IFN, IRF, STAT y Mx, en presencia de virus IPN.

4.3.1 Expresión de IPNv en células SHK-1

La presencia de virus se determinó mediante lisado de IPNv en células SHK-1, dónde se puede apreciar, que desde que se infectó el cultivo con virus este se hizo presente y a medida que aumentaban las horas post infección con virus, la expresión aumento hasta 15 veces respecto al control, a las 144 horas pos infección (hpi) (Figura 4). Además, se presentan las curvas de amplificación y disociación del lisado y sobrenadante del virus (Figura 5); Junto a esto se presentan las curvas de disociación y amplificación del gen constitutivo β -actina, el cual se empleó para normalizar todos los qPCR (Figura 6).

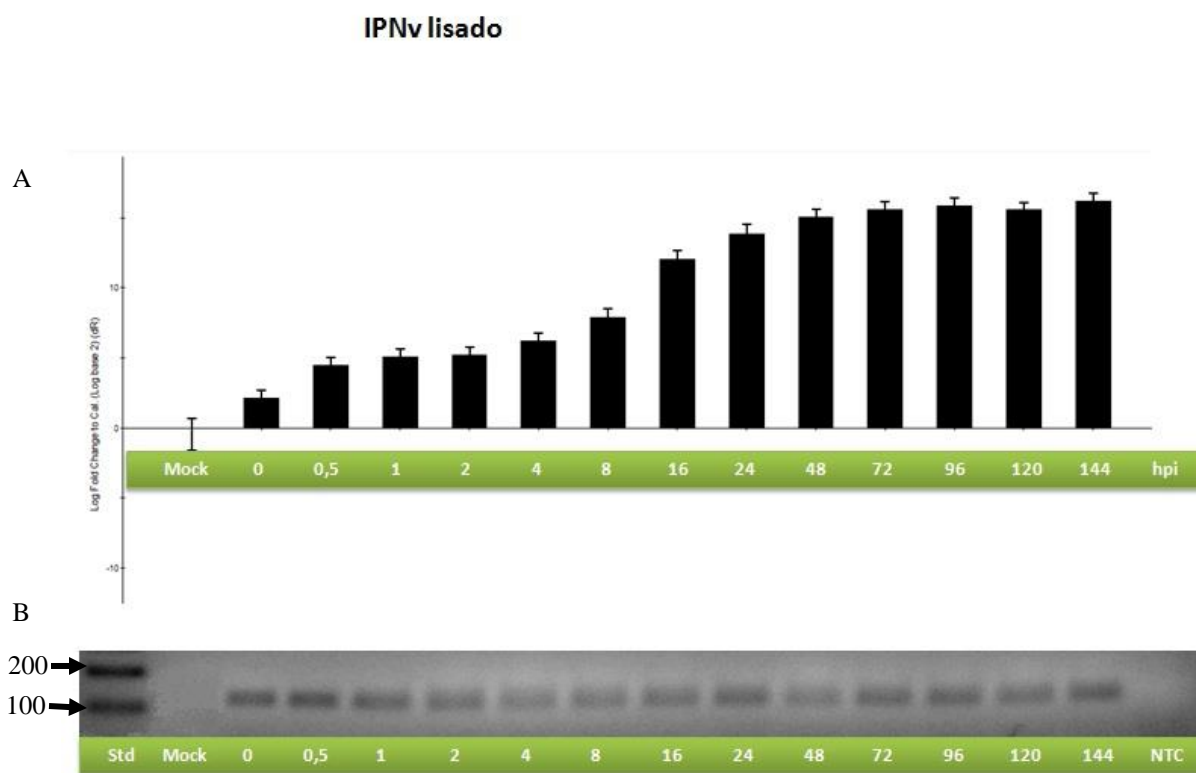


Figura 4: Expresión de IPNv lisado, células SHK-1. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de IPNv. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de IPNv.

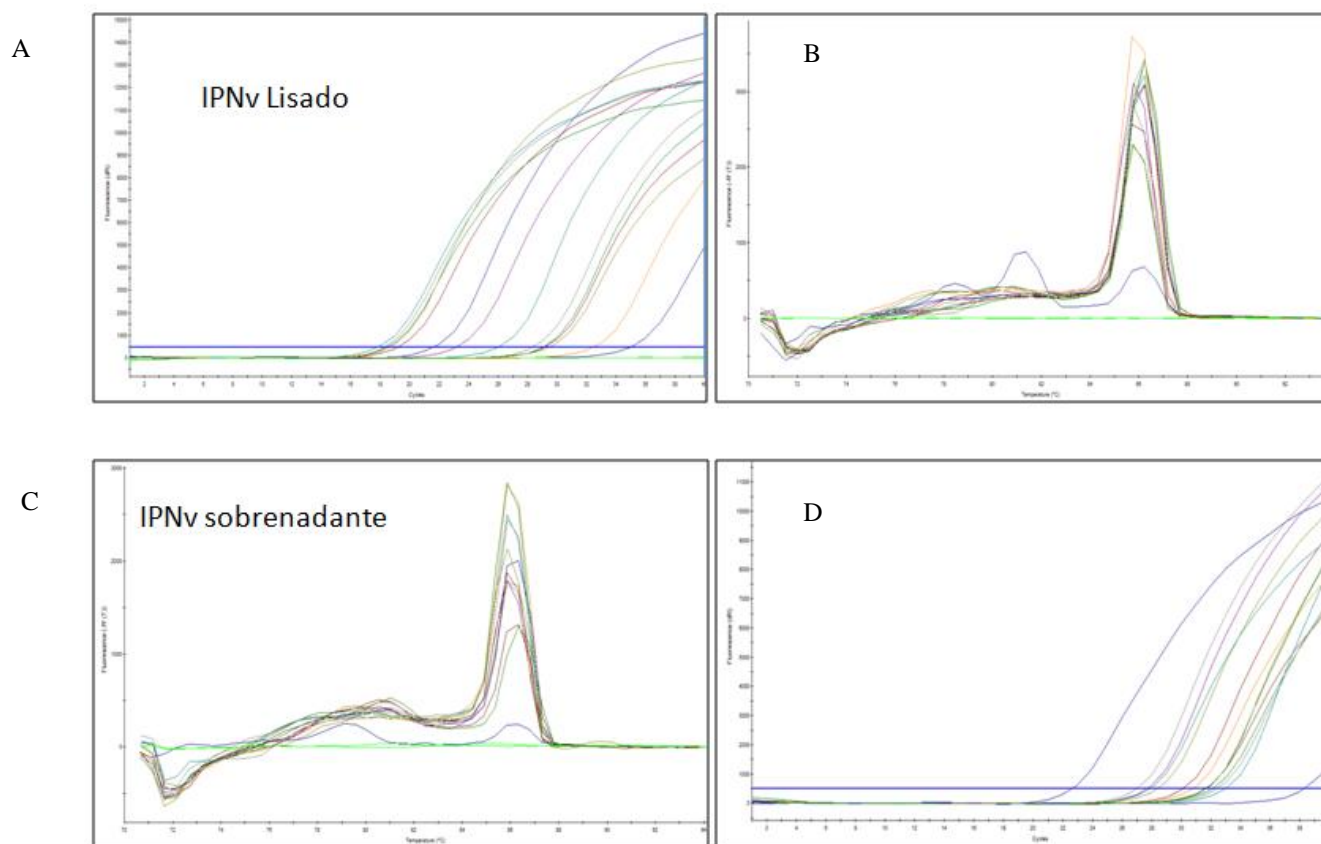


Figura 5: Curvas de disociación y amplificación de los productos amplificados mediante PCR en tiempo real, visualizados por medio de la fluorescencia emitida por *SYBR Green*: A: Curva de amplificación lisado IPNV. B: Curva de disociación lisado IPNV. C: Curva de disociación sobrenadante IPNV. D: Curva de amplificación sobrenadante IPNV.

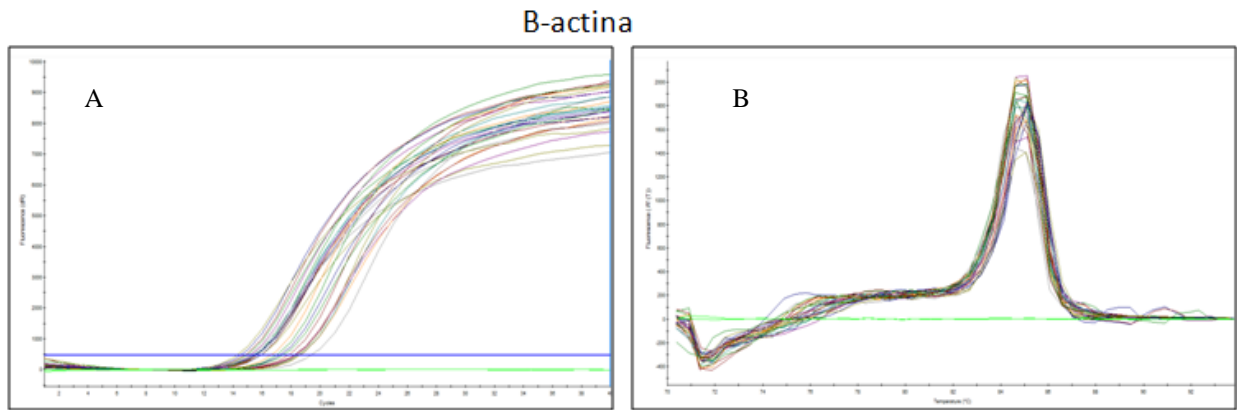


Figura 6: Curvas de disociación y amplificación de los productos amplificados mediante PCR en tiempo real, visualizados por medio de la fluorescencia emitida por SYBR Green: A: Curva de amplificación β - actina. B: Curva de disociación β - actina.

4.3.2 Expresión relativa de IFNs, mediante cinética de infección en línea celular SHK-1

Existen dos clases de IFNs, de tipo I (IFN α ; IFN β) producidos por todos los tipos de células, y de tipo II (IFN γ) que es producido por las células inmunes más especializadas. En los vertebrados superiores, IFN de tipo II es generalmente aceptado como parte de la inmunidad adaptativa, mientras que IFN de tipo I es un importante mediador de la respuesta innata (McBeathet *al.*; 2007). Por lo tanto, parece difícil que un virus solo utilice un mecanismo para inhibir la respuesta antiviral de IFN, y una variedad de mecanismos han evolucionado en los virus para evadir la defensa del huésped. Los virus en general, utilizan gran parte de su genoma para codificar productos génicos capaces de contrarrestar componentes de las vías de IFN. Las estrategias podrían ser de: i) Antagonizar la inducción de IFN, ii) Antagonizar la señalización de IFN e iii) Intervenir en la expresión o acción de ISGs (Skesolet *al.*, 2010).

En respuesta a esto, se realizó en línea celular SHK-1 proveniente de cabeza de riñón de *S. salar*, una cinética de infección a MOI 5, durante 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 24; 48; 72; 96; 120 y 144 horas post-infección (hpi) con virus IPN, para de este modo determinar que IFN presenta una mejor respuesta a la infección. Dentro de los IFN evaluados, se encuentran IFN α 1, IFN α 2 e IFN γ . Es importante considerar, que IFN α 1 y IFN α 2, se consideran los más importantes en la fase temprana de una infección.

Como se observa mediante las figuras 7, 8 y 9, correspondientes a IFN α 1, IFN α 2 e IFN γ , respectivamente, IFN α 1 e IFN α 2 se expresan desde la hora 0 manteniéndose en el tiempo, IFN α 1, muestra un pick entre las 16 y 72 hpi, sin embargo a las 144 hpi, la expresión de este disminuye considerablemente. No obstante, IFN α 2 muestra un pick entre las 4 y 24 hpi, y nuevamente un pick a las 144 hpi. Lo anterior concuerda con la literatura, la que señala que IFN

de tipo I, correspondiente a los IFN α 1 e IFN α 2, es la primera línea de defensa de las células ante una infección. El IFN γ , muestra una expresión entre las 0 y 2 hpi y las 48 y 120 hpi, teniendo un pick entre las 48 y 72 hpi, sin embargo, su expresión no es constante en el tiempo, ya que entre las 4 y 24 hpi, al igual que a las 144 hpi, no se observa este, lo que es atribuible a que IFN de tipo II, correspondiente a IFN γ , se expresa como respuesta inmune adaptativa, lo que señala que el virus en estos tiempos puede haber creado más viriones, interfiriendo en la expresión de IFN γ .

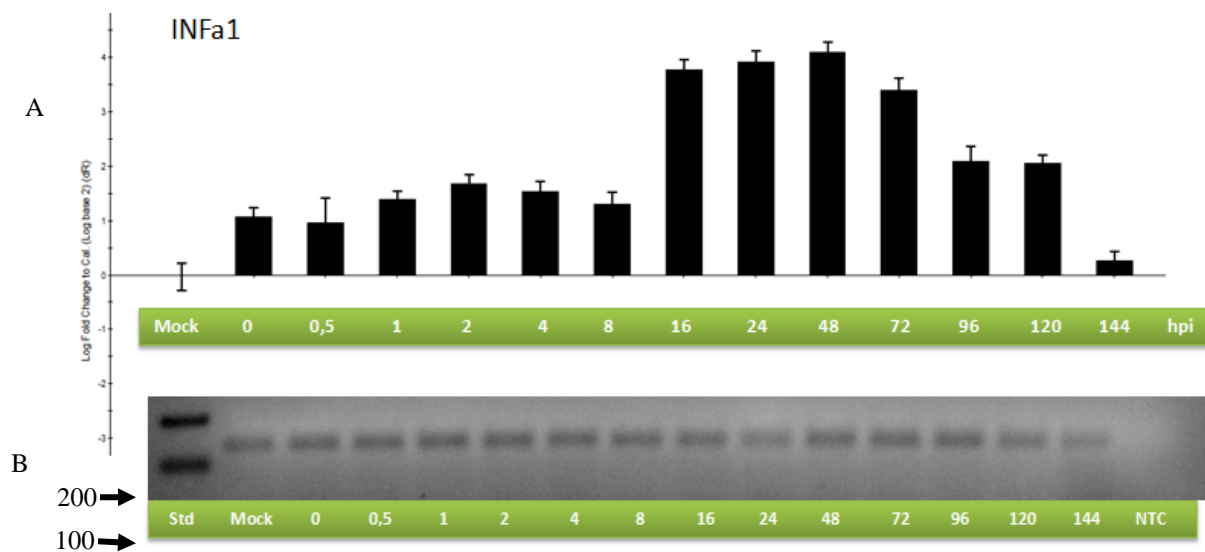


Figura 7: Expresión de IFN α 1 en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR de la expresión de IFN α 1 en presencia de IPNV. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de IFN α 1

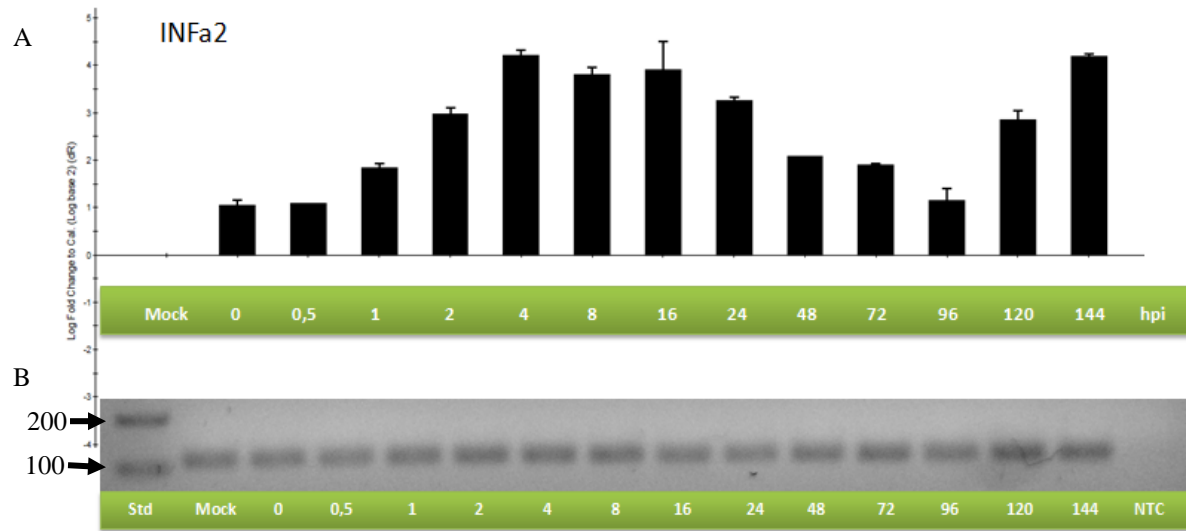


Figura 8: Expresión de IFN α 2 en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de IFN α 2 en presencia de IPNv. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de IFN α 2

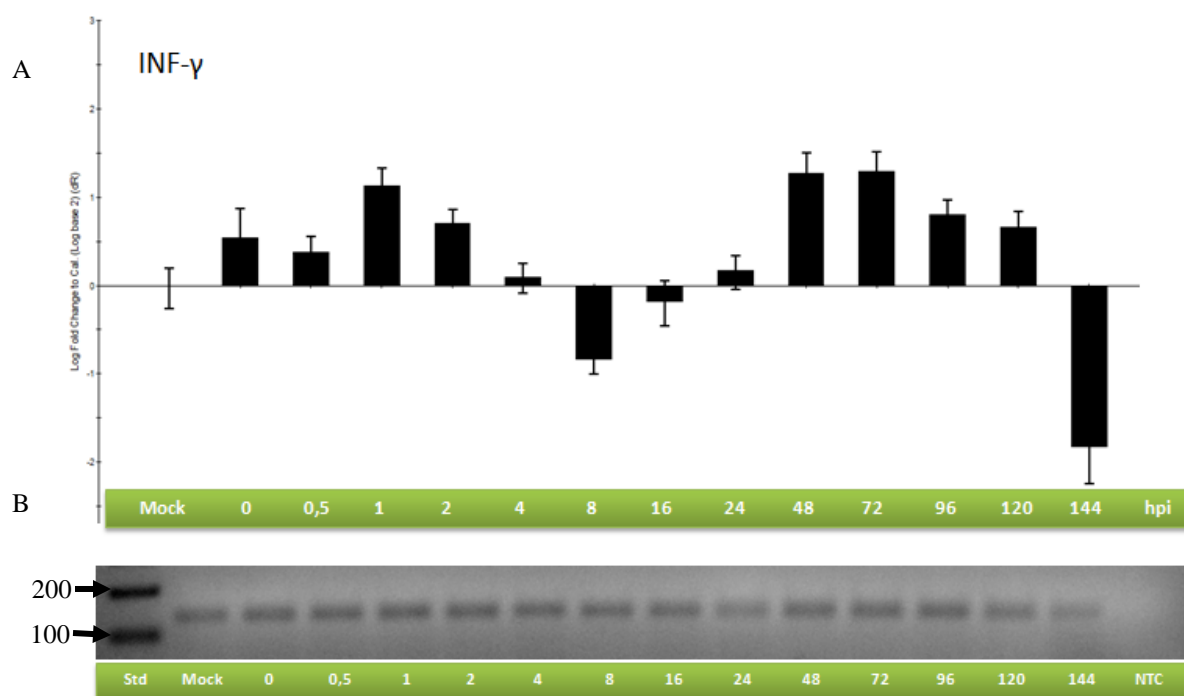


Figura 9: Expresión de IFN γ en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de IFN γ en presencia de IPNv. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de IFN γ .

4.3.3 Expresión relativa de IRFs, mediante cinética de infección en línea celular SHK-1

Factores receptores de interferón, se consideran factores de transcripción temprana, esto quiere decir que funcionan como moléculas mediadoras para la expresión de otros genes. Es por esto que en el presente trabajo se evaluaron una serie de IRFs, dentro de los cuales están los IRF 1, IRF 2, IRF 3, IRF 4, IRF 5, IRF 7 e IRF 9, los cuales tienen diversas funciones en la cascada que desatan los interferones.

En IRF 1 (Figura 10), se observa que la expresión relativa comienza a las 2 hpi y se mantiene hasta las 144 hpi, mostrando un peak a las 8 hpi, lo que señalaría que IRF 1, es importante en la activación de la respuesta inmune frente a algún patógeno. IRF 2 (Figura 11), por el contrario se expresa desde las 0 hasta las 144 hpi, manteniéndose durante casi todo el tiempo una expresión 3 veces mayor al control, sin embargo es importante considerar que IRF 2, es un regulador negativo de la expresión de IFN, lo que a nivel celular no favorece a la defensa de las células contra la infección. IRF 2, por el contrario se expresa desde las 0 hasta las 144 hpi, manteniéndose durante casi todo el tiempo una expresión 3 veces mayor al control. Sin embargo es importante considerar que IRF 2, es un regulador negativo de la expresión de IFN, lo que a nivel celular no favorece a la defensa de las células contra la infección.

Factor de transcripción, IRF 3 (Figura 12) muestra una leve expresión a la hora 0, no obstante en el transcurso del tiempo esta expresión aumenta hasta las 144 hpi, y presenta un peak entre las 2 y 4 hpi, lo que favorecería a la defensa de la célula, pues IRF 3 está implicado en la transcripción de IFN β . En IRF 4 (Figura 13), se observa una expresión relativa muy alta desde las 0 a las 144 hpi, solo observándose un descenso a las 48 hpi y 144 hpi. IRF 5 (Figura 14)

presenta una expresión desde las 2 hpi hasta las 144 hpi, presentando un pick a las 72 hpi lo que estaría relacionado con el rol que estaría jugando los IRF en la transcripción de los IFN.

IRF 7 (Figura 15), solo se expresa entre las 4 y 8 hpi, siendo nula su expresión durante el resto del tiempo, lo que es atribuible a que en estas condiciones los niveles de IFN pueden haber alcanzado un nivel más alto, ya que este IRF es esencial para la respuesta antiviral sistemática de IFN. Factor de transcripción, IRF 9 (Figura 16), se expresa durante todo el transcurso de la infección, manteniendo sus niveles más altos entre las 2 y 16 hpi, lo que está asociado a que efectivamente en la célula se está expresando el complejo ISGF3, el cual luego migra hacia el núcleo para de este modo transcribir IFN citosólico.

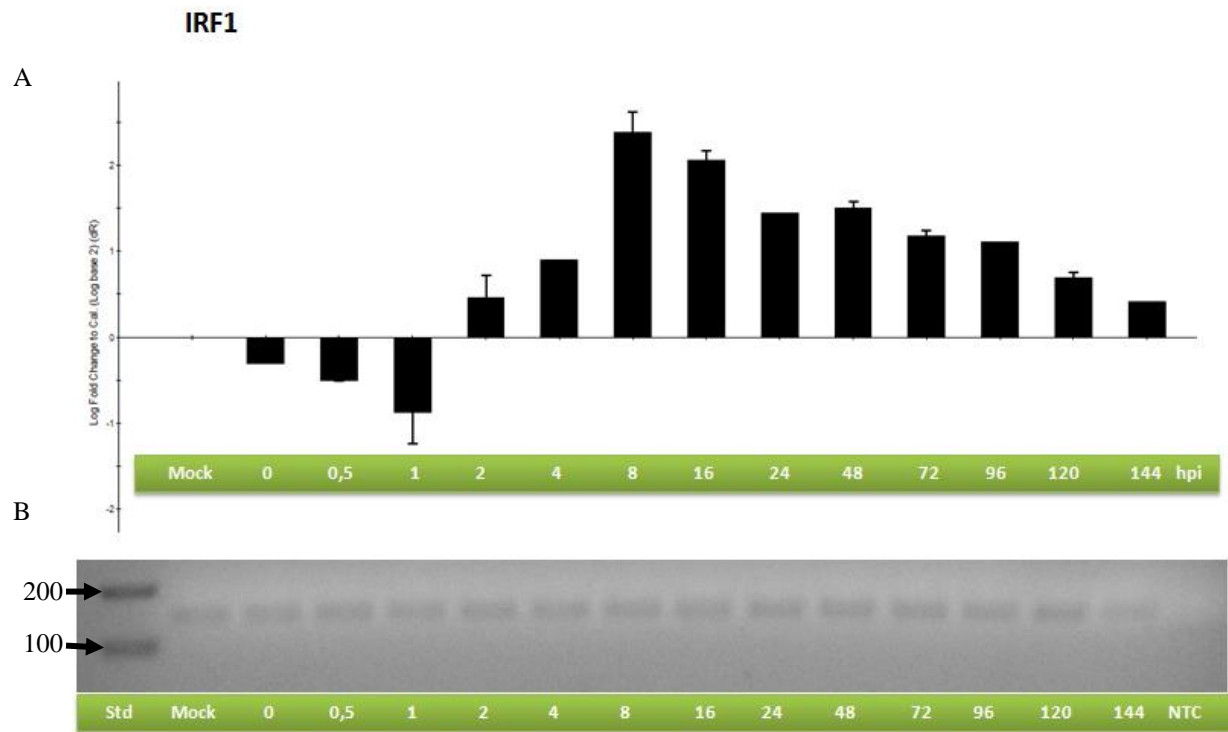


Figura 10: Expresión de IRF 1 en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de IRF 1 en presencia de IPNv. **(B)** Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de IRF 1.

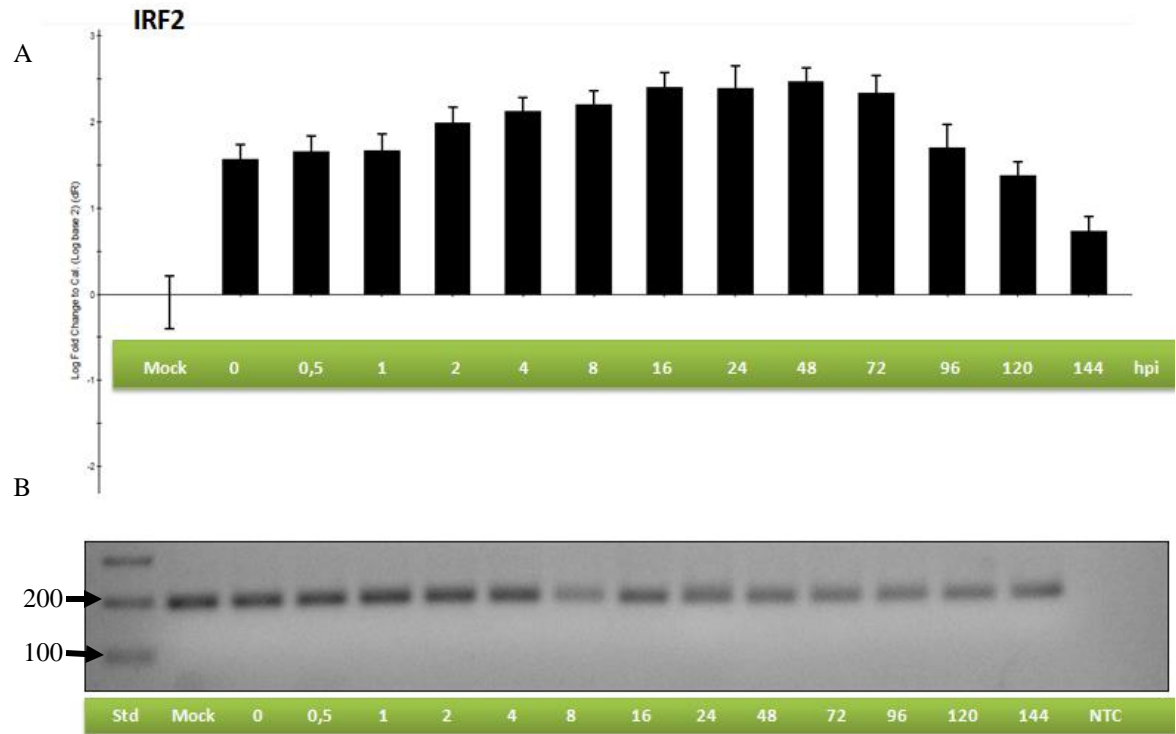


Figura 11: Expresión de IRF 2 en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de IRF 2 en presencia de IPNV. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de IRF 2.

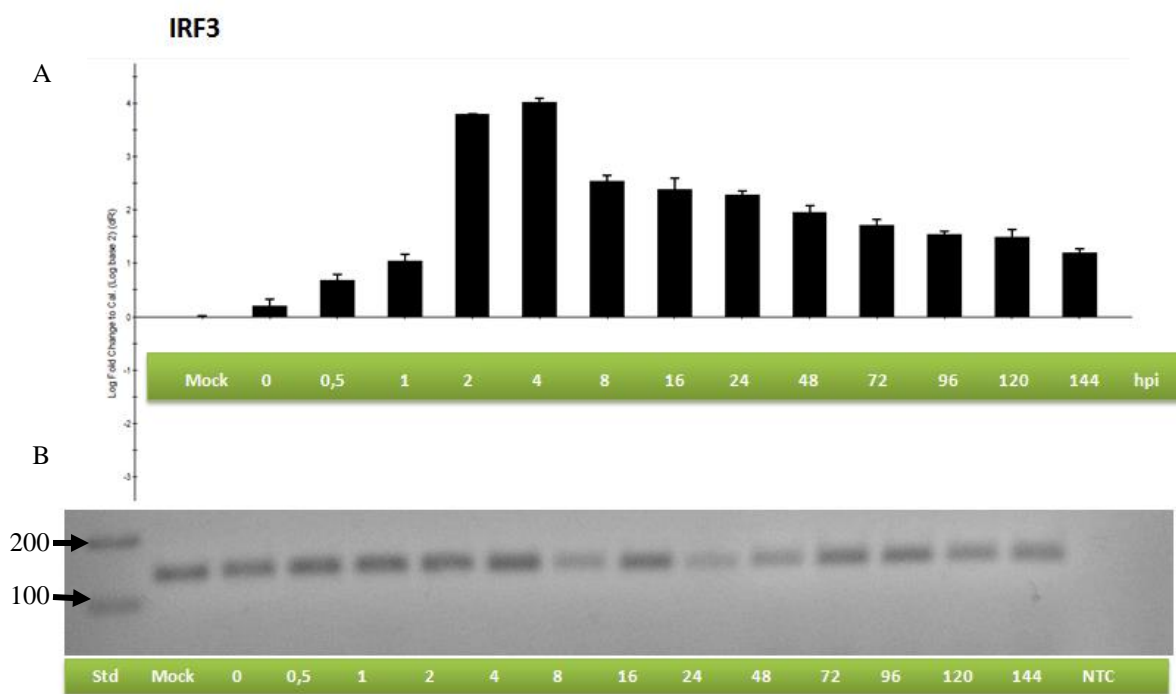


Figura 12: Expresión de IRF 3 en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de IRF 3 en presencia de IPNV. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de IRF 3.

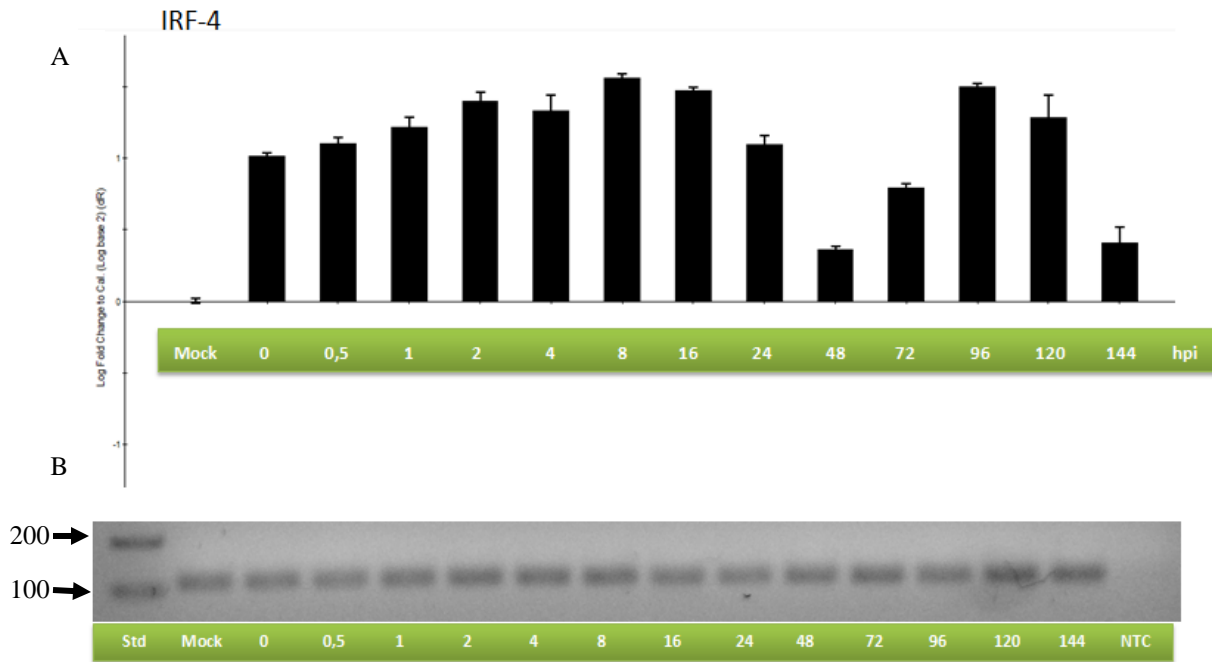


Figura 13: Expresión de IRF 4 en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de IRF 4 en presencia de IPNv. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de IRF 4.

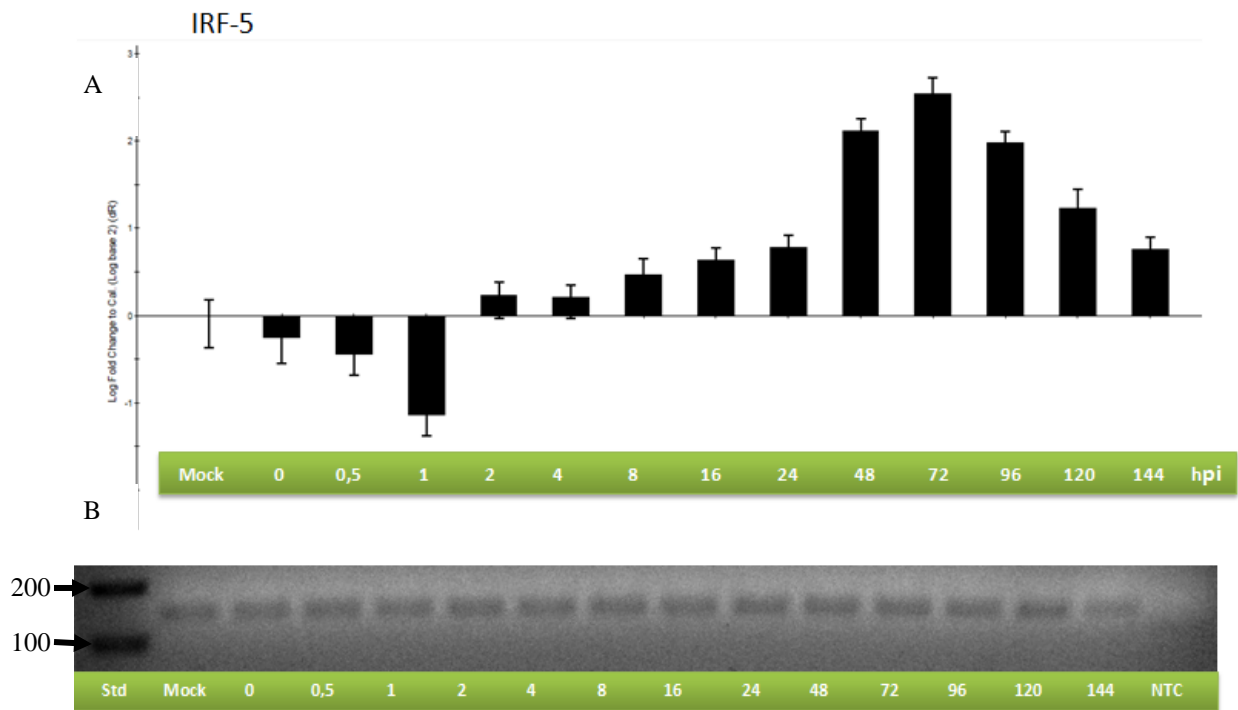


Figura 14: Expresión de IRF 5 en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de IRF 5 en presencia de IPNv. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de IRF 5.

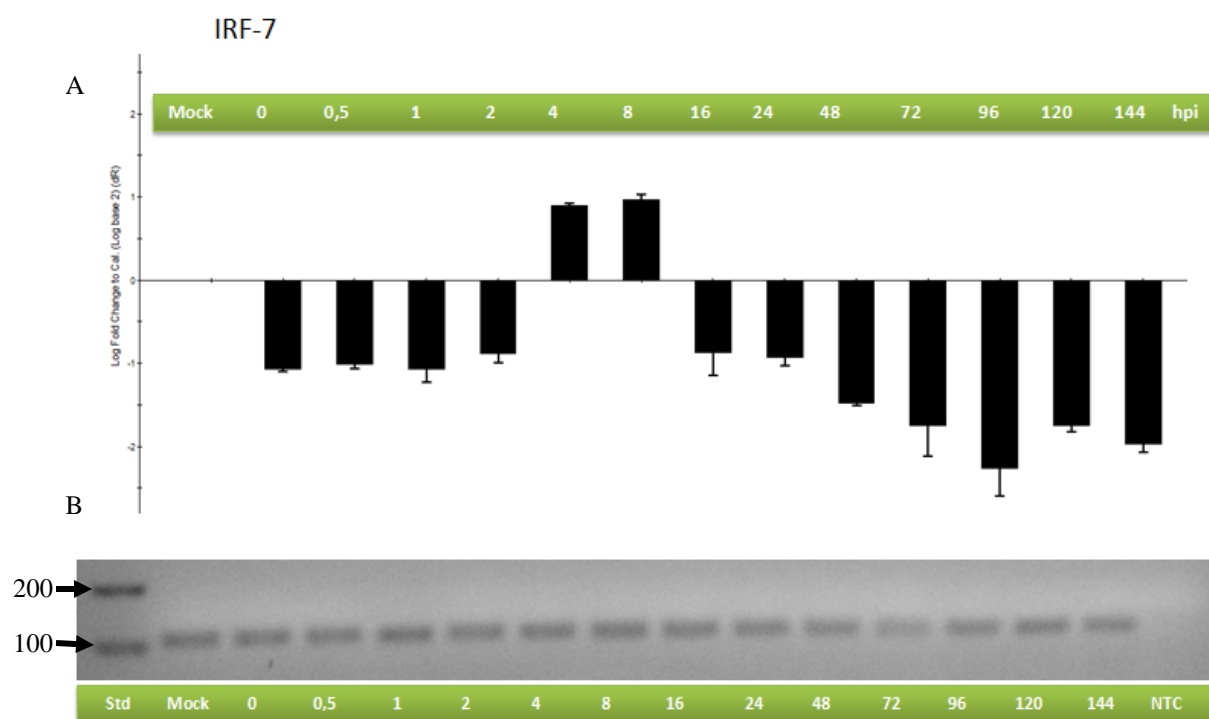


Figura 15: Expresión de IRF 7 en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de IRF 7 en presencia de IPNv. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de IRF 7.

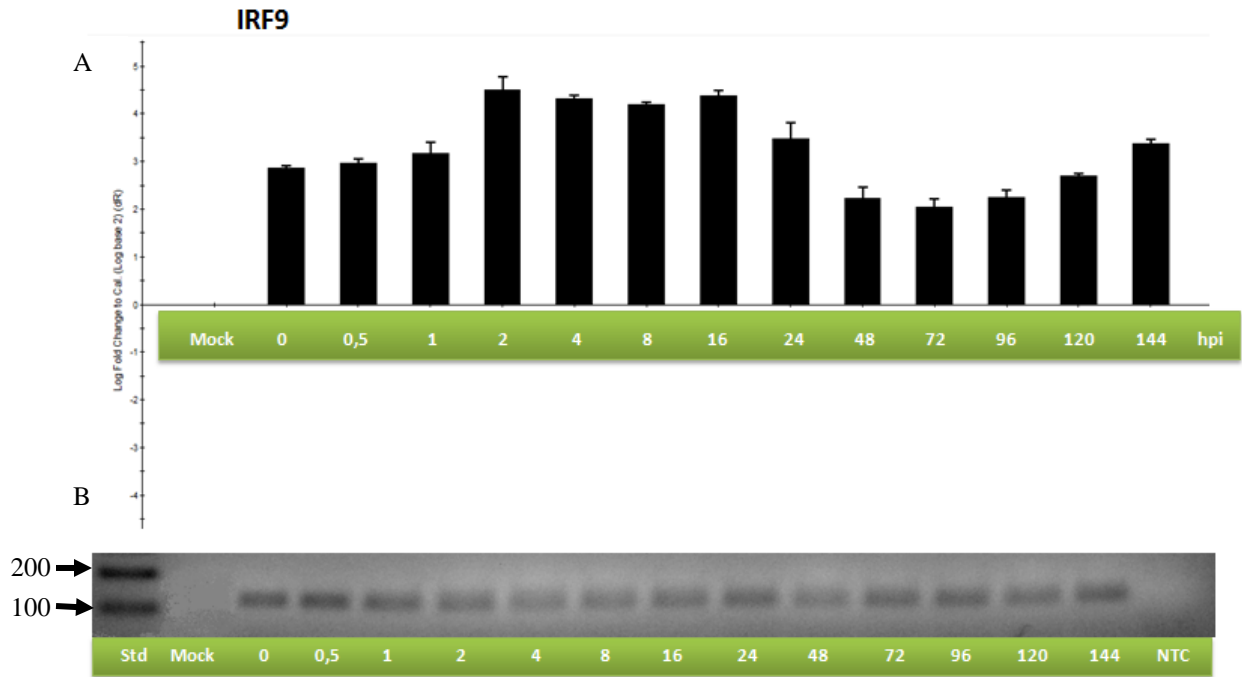


Figura 16: Expresión de IRF 9 en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de IRF 9 en presencia de IPNv. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de IRF 9.

4.3.4 Expresión relativa de STATs, mediante cinética de infección en línea celular SHK-1

Mediante cinética de infección se estudiaron los STAT 1, 2 y 4, los cuales son componentes de la cascada de señalización para los IFN de tipo I y II, respectivamente IFN α/β y IFN γ . STAT son moléculas reguladoras de IRFs, las cuales al unirse a estos translocan al núcleo para de este modo continuar con la expresión de diversos genes. Por el contrario STAT 4 (Figura 17), se expresa desde las 0 a las 48 hpi, presentando un pick entre las 4 y 8 hpi, esto debido a que STAT 4 es activada por IL-12 y fosforilada por Tyk 2, que se encuentran presente comúnmente en la célula, además de esto la presencia de este STAT, induce la expresión de IFN γ , en respuesta a IL-12.

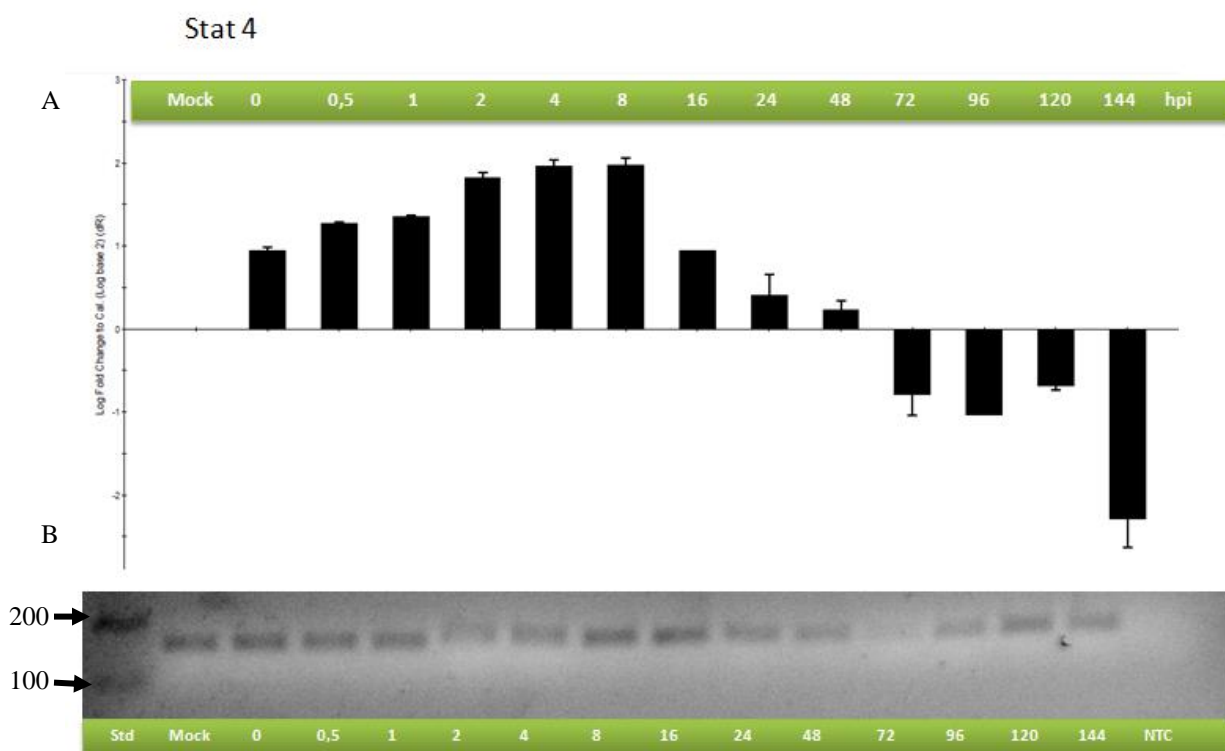


Figura 17: Expresión de STAT 4 en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de STAT 4 en presencia de IPNV. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de STAT 4.

4.3.5 Expresión relativa de Mx, mediante cinética de infección en línea celular SHK-1

Mx (Figura 18), es una proteína perteneciente a la familia de las GTPasas, la cual es secretada por estimulación de IFNs, en el presente estudio no se demostró expresividad de esta proteína, sin embargo mediante el gel de agarosa se logró determinar que a punto final, si se ve expresión de esta, lo que demostraría que Mx, se expresó pero en niveles muy bajos para ser cuantificados mediante RT-PCR.

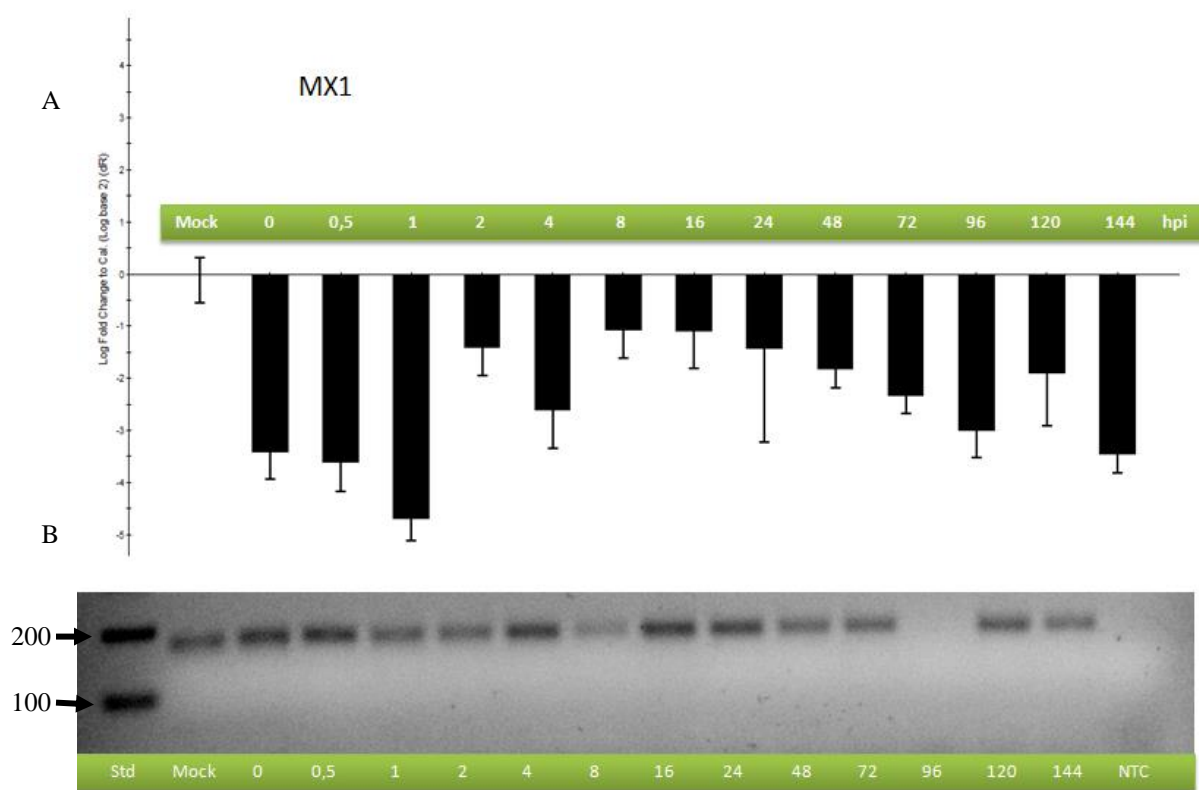


Figura 18: Expresión de Mx en células SHK-1 infectadas con virus IPN. (A) Determinación mediante qPCR en tiempo real de la expresión de Mx1 en presencia de IPNV. (B) Determinación mediante gel de agarosa al 2% de la expresión relativa de Mx1.

5 DISCUSIÓN

Necrosis pancreática infecciosa (IPN) es una enfermedad altamente contagiosa que causa una alta mortalidad en los salmónidos juveniles y en etapas *postsmolt* de salmón del atlántico, después de la transferencia ha agua de mar, presentando esta enfermedad una distribución mundial (Munang'anduet *al.*, 2013). La transferencia de salmón joven al agua salada es una etapa particularmente estresante en el ciclo de producción, ya que la esmoltificación implica un cambio complejo en la fisiología, morfología, bioquímica y comportamiento de los salmónidos (Gadan *et al.*, 2013). Sin embargo, las células poseen varios mecanismos de defensa contra la infección viral. El más importante de ellos es el establecimiento de un estado antiviral (Collet *et al.*, 2009).

El presente seminario de graduación tuvo como principal objetivo determinar como el virus IPN afecta en el transcurso del tiempo, la expresión de transcritos antivirales y factores de transcripción de expresión temprana. Para esto se estudiaron diferentes moléculas tales como, interferones, factores receptores de interferón, transductores de señal y activadores de transcripción, y proteínas Mx, esto con el fin de dilucidar la respuesta de las células de salmónidos ante la presencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa. Para esto, se determinó el título viral el cual corresponde a $7,34 \times 10^7$ partículas de virus en un mL, este título viral hace referencia a cuanto virus vivo hay, y fue determinado mediante efecto citopático, esto para posteriormente calcular la multiplicidad de infección (MOI), la cual en este estudio corresponde a 5, es decir que cinco viriones infectaron una célula, esto fue de vital relevancia al momento de efectuar la cinética de infección.

En el presente estudio, se presenta una visión de los transcritos antivirales, de los factores de transcripción temprana y de moléculas reguladores de factores receptores de interferón, incluyendo un análisis detallado de sus niveles de expresión. Tomando información de la base de datos *ncbi*, correspondiente al genoma de *S. salar*, se diseñaron varios pares oligonucleotídicos para transcritos virales y factores de transcripción temprana, los cuales fueron analizados primero por PCR en gradiente, para de este modo determinar la temperatura de alineamiento, la cual se determinó en 60 °C, la que posteriormente se utilizó en todos los qPCR.

Se analizaron transcritos antivirales tales como, los interferones, que son citoquinas que actúan como una línea de defensa durante una infección viral en los vertebrados (Fourrier et al., 2009). Estas citoquinas secretadas por distintos tipos de células de manera transitoria, en respuesta a un estímulo externo, tal como, es una infección viral. Estos interferones, presentan propiedades inmunomoduladoras y antiproliferativas, siendo los virus los más potentes inductores de la expresión de los genes IFN, el estímulo principal para su producción parece ser la formación de RNA viral de doble cadena durante la replicación viral dentro de la célula. Se logró determinar que los IFN $\alpha 1$ e IFN $\alpha 2$, presentan un 95 % de homología, que se activan desde las 0 hpi, hasta las 144 hpi, lo que concuerda con la literatura, la cual hace referencia a que durante una infección viral, la respuesta inicial del sistema inmunitario es la inducción de interferones de tipo I, además se ha demostrado que IFN $\alpha 1$, al igual que IFN $\alpha 2$, proporcionan una protección contra IPNV en las células de salmónidos (Skesejolet *al.*, 2009). Además se estudió el IFN γ , el cual coordina una serie de respuestas celulares a través de la regulación transcripcional de genes inmunológicamente relevantes, especialmente los relacionados con la respuesta de macrófagos a la infección. Además aumenta la expresión de genes relacionados con reconocimiento de

patógenos, procesamiento y presentación de antígenos y respuesta antiviral entre otros; Los resultados obtenidos muestran que este IFN de tipo II, tiene una expresión relativa en las primeras horas post infección, para luego disminuir entre las 4 y 24 hpi, luego de esto nuevamente este gen se enciende en la célula, no obstante, muestra una expresión no mayor del orden uno, con respecto al control; Lo cual señalaría que en este caso el virus IPN, estaría afectando la expresión de este transcrito viral.

Factores reguladores de Interferón son proteínas que regulan la transcripción de Interferón, y son utilizadas en las vías de señalización de Jak-STAT; IRFs contienen una región conservada N-terminal de alrededor de 120 aminoácidos, que se pliega en una estructura que se une específicamente a la secuencia de consenso de Interferón (ICS), la cual se encuentra arriba en el gen de Interferón. La presencia de los diferentes tipos de IRFs va a interferir de diferente manera, según el tipo de Interferón que se les une. IRF 1 en este estudio se expresa desde las 2 hpi en adelante, lo cual señala que este factor de transcripción el cual actúa como un activador transcripcional para los genes de Interferón tipo I, no se ve afectado por la presencia del virus IPN. Del mismo modo, en IRF 2 se observó un aumento 3 veces la expresión con respecto al control, lo que determinaría que este factor de transcripción tampoco se ve afectado por la presencia del virus IPN; lo mismo ocurre para los factores de receptores de Interferón 3 y 4. Por el contrario IRF 5, solo se expresa después de las 2 hpi, observándose un aumento de 3 veces la expresión con respecto al control, lo que demuestra que virus IPN, solo afecta en el primer instante de infección, pues después el IRF 5 se ve activado para de este modo transcribir moléculas que proporcionan defensas a la célula. IRF 7, solo muestra una expresión entre las 4 y 8 hpi, por lo que se demuestra que en este caso, el virus afectó este factor transcripcional. En IRF

9, se observó una expresión desde las 0 a las 144 hpi, lo que demuestra que este factor no se ve afectado por el virus. A pesar de que genes miembros de las familias IRF, no se ven mayormente afectados por la presencia del virus IPN, hasta ahora poco se sabe sobre qué elementos IRF activan los promotores de los interferones de peces, aunque todos los miembros de esta familia han sido reportados en peces (Steinet *et al.*, 2007), lo que permitiría seguir investigando en esta área, pues aun la información es muy escasa.

Transductores de señal y activadores de la transcripción, son una súper familia de receptores de citoquinas, la unión de estos con su receptor producen una rápida fosforilación de tirosina en proteínas celulares incluido el propio receptor, en esta investigación se evaluaron los STAT 1, 2 y 4. STAT 1 y 2, no fueron expresados, lo que indica que virus de la necrosis pancreática infecciosa, si afecto estos genes y por ende no se activó la vía de señalización Jak-STAT (Skesejol *et al.*, 2011). Por el contrario, STAT 4 solo muestra una expresión entre las 0 y 48 hpi, lo que demuestra que es correctamente fosforilada por Tyk 2, y por ende, induce la expresión de IFN de tipo II.

La proteína Mx, que es una de las proteínas antivirales más estudiadas, es inducida por interferón de tipo I (Bergan *et al.*, 2004). Reportes previos, señalan que Mx se expresa en presencia de infección por *Orthomixovirus*, el cual es un virus que afecta a salmónidos, al igual que IPNv, en este trabajo, no obtuvimos expresión de este gen, lo que permite inferir que virus IPN, afecta la expresión de este transcrito viral.

Para corroborar el estudio, se realizó una cinética del virus con el lisado obtenido de las células, y de este modo se determinó que el virus estaba presente en todos los tiempos de

infección, además se amplificó el gen de β -actina como control interno. La expresión del virus durante las 144 horas post infección no afectó la expresión de los genes IRF 2, 3, 4 y 9, y los IFN α 1 y α 2, en ningún tiempo, por lo que se puede concluir que estos genes actúan correctamente como responsables de la respuesta inmune temprana.

Futuros estudios son necesarios, para analizar el modo de activación de factores receptores de interferón, así como establecer porque las moléculas STAT 1 y 2, no fueron expresados en presencia del virus IPN, siendo estas moléculas catalogadas, por diversos investigadores, como importantes en la vía de señalización Jak-Stat.

6 REFERENCIAS

- Anuario de estadística de pesca y acuicultura de la FAO (2008).
- Berg, K., Svingerud, T., Sun, B., Robertsen, B., 2009. An antiserum against Atlantic salmon IFN α 1 detects IFN and neutralizes antiviral activity produced by poly I:C-stimulated cells. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 638–645.
- Bergan, V., Kileng, Ø., Sun, B. & Robertsen, B., 2008. Regulation and function of interferon regulatory factors of Atlantic salmon. *Molecular Immunology.* 47, 2005-2014
- Bergan, V., Steinsvik, S., Xu, H., Kileng, O., Robertsen, B., 2006. Promoters of type I interferon genes from Atlantic salmon contain two main regulatory regions. *FEBS J.* 273, 3893–3906.
- Borja, A., 2002. The environmental impact of aquaculture, and its sustainability. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 41-49.
- Bowers, R., Lapatra, S., Dhar, A., 2008. Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *Journal of Virological Methods.* 147, 226–234.
- Bravo, S., Dölz, H., Silva, M.T., Lagos, C., Millanao, A. y Urbina, M., 2005. Informe Final. Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Pesquerías y Oceanografía, Instituto de Acuicultura. Casilla 1327. Puerto Montt, Chile. Proyecto No. 2003-28.

- BurrIDGE, L., Weis, J., Cabello, F., Pizarro, J., Bostick, K., 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306, 7–23.
- Cerna S., 2000. Estudio de la presencia del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en reproductores salmonídeos. *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162, 156–159.
- Collet, B., Bain, N., Prevost, S., Besinque, G., McBeath, A., Snow, M., Collins C., 2008. Isolation of an Atlantic salmon (*Salmo salar*) signal transducer and activator of transcription STAT1 gene: Kinetics of expression upon ISAV or IPNV infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 25, 861- 867.
- Collet, B., Ganne, G., Bird, S & Collins, C., 2009. Isolation and expression profile of a gene encoding for the Signal Transducer and Activator of Transcription STAT2 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental and Comparative Immunology*. 33, 821-829
- Collet, B., Munro, E., Gahlawat, S., Acosta, F., Garcia, J., Roemelt, C., Zou, J., Secombes, C & Ellis, A., 2007. Infectious pancreatic necrosis virus suppresses type I interferon signalling in rainbow trout gonad cell line but not in Atlantic salmon macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*. 22, 44-56.
- De Kinkelin P, CH Michel, P Ghittino., 1991. *Tratado de las enfermedades de los peces*, ed. Arcibia S.A., Zaragoza.

- DeWitte-Orr, S., Leong, J&Bols, N., 2007 Induction of antiviral genes, Mx and vig-1, by dsRNA and Chum salmon reovirus in rainbow trout monocyte/ macrophage and fibroblast cell lines. *Fish & Shellfish Immunology*. 23, 670-682.

Disponible en:

<http://www.infosurhoy.com/cocoon/saii/xhtml/es/features/saii/features/economy/2010/11/15/feature-03>

Disponible en; <http://www.fao.org/docrep/013/i1890t/i1890t.pdf>

- Dobos P. 1995. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Ann Rev Fish Dis*. 5, 24-54.
- FAO., 2006. Prospective analysis of future aquaculture development and the role of COFI Sub-Committee on Aquaculture. Documento de trabajo preparado para el tercer período de sesiones del Subcomité del COFI sobre Acuicultura.
- Fernández M B., 2005. Estudio epidemiológico del virus de la necrosis pancreática infecciosa en salmones. Tipificación molecular de los distintos serotipos existentes en Chile. *Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M., Maniatis, T., 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol*. 4, 491–496.
- Fourrier, M., Arnold, M., Collet, B., Munro, E., 2009. The effect of sub-culturing on the basal level of type I interferon (IFN) gene expression in the Salmon Head Kidney (SHK-1) cell line. *Fish & Shellfish Immunology*. 27, 535–538.

- Gadan, K., Sandtrø, A., Marjara, I., Santi, N., Munang'andu, H., Evensen, Ø. 2013. Stress-induced Reversion to Virulence of Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Naïve Fry of Atlantic Salmon (*Salmosalar L.*).
- Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T., Taniguchi, T., 1989. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58, 729–739.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., Taniguchi, T., 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772–777.
- Hong JR, JL Wu., 2002. Induction of apoptotic death in cells via Bad gene expression by Infectious pancreatic necrosis virus infection. *Cell Death Differ* 9, 113-124.
- Hong JR, TL Lin, YL Hsu, JY Yang, JL Wu. 1999. Dynamics of nontypical apoptotic morphological changes visualized by green fluorescent protein in living cells with infectious pancreatic necrosis virus infection. *J Virol* 73, 5056-5063.
- Infosurhoy., 2010. Después del virus ISA, la industria salmonera de Chile ve un futuro alentador.
- Jensen I, Robertsen B., 2002. Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anaemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol.*, 13:221e4.
- Kileng, O., Bergan, V., Workenhe, S.T., Robertsen, B., 2009. Structural and functional studies of an IRF-7-like gene from Atlantic salmon. *Dev. Comp. Immunol.* 33,18–27.

- Larsen, R., Røkenes, T., Robertsen, B., 2004. Inhibition of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Replication by Atlantic Salmon Mx1 Protein. *Journal of virology*. Vol. 78.
- Lyles D. 2000. Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. *Microbiol and MolBiol Rev* 64, 709-724.
- Mac ALLISTER, P.E., X. REYES.,1984. Infectious pancreatic necrosis virus: isolation from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, imported into Chile. *J. Fish Dis.* 7: 319-322.
- McBeath, A., Snow, M., Secombes, C., Ellis, A., Collet B. 2007. Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish & Shellfish Immunology*. 22, 230 – 241.
- Munang'andu, H., Fredriksen, B., Mutoloki, S., Dalmo, R., Evensen, Ø. 2013. Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Veterinary Research*. 44:7.
- OIE, Oficina Internacional de Epizootias.,2005. *Aquatic Animal Health Code* (8th ed). Paris, Francia.
- Ørpetveit, I., Küntziger, T., Sindre1,H., Rimstad, E., Dannevig, B. 2012. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from salmonid fish enters, but does not replicate in, mammalian cells. *Virology Journal*, 9:228
- Ortega C, R Enríquez. 2007. Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). *ArchMedVet*39, 7-18.
- Paun, A., Pitha, P.M., 2007. The IRF family, revisited. *Biochimie* 89, 744–753.

- Post, G., 1983. Textbook of the fish health. Ed. TFH, USA. 86-106.
- Purcell, M.K., Laing, K.J., Woodson, J.C., Thorgaard, G.H., Hansen, J.D., 2009. Characterization of the interferon genes in homozygous rainbow trout reveals two novel genes, alternate splicing and differential regulation of duplicated genes. *FishShellfishImmunol.* 26, 293–304.
- Roberts R J, M D Pearson., 2005. Infectious Pancreatic Necrosis in Atlantic salmon, *Salmosalar L. J Fish Dis* 28, 383-389.
- Rodríguez S, J J Borrego, S I Pérez-Prieto. 2003. Infectious Pancreatic Necrosis Virus: Biology, Pathogenesis, and Diagnostic Methods. *Advances in Virus Research* 62, 113–165.
- Rønneseth, A., Pettersen, E.F., Wergeland, H.I., 2006. Neutrophils and B-cells in blood and head kidney of Atlantic salmon (*Salmosalar L.*) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish ShellfishImmunol.* 20, 610–620.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3^a Edición. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.*
- SANO, T.1995. Viruses and viral diseases of salmonids. *Aquaculture*, 132: 43-52.
- Santi, N., Vakharia, V.N., Evensen, Ø., 2004. Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 322, 31–40.
- Schäfer M, V Alvarado, R Enríquez, M Monrás. 1990. The Coho Salmon Syndrome (CSS): a new disease in Chilean salmon reared in sea water. *Bull Eur Ass Fish Pathol*10: 130.

- Skjesol, A., Aamo, T., Hegseth, M., Robertsen, B., Jørgensen, B., 2009. The interplay between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and the IFN system: IFN signaling is inhibited by IPNV infection. *Virus Research*. 143, 53–60.
- Skjesol, A., Skjæveland, I., Elnæs, M., Timmerhaus, G., Fredriksen, B., Jørgensen, S., Krasnov, A., Jørgensen, J., 2011. IPNV with high and low virulence: host immuneresponses and viral mutations during infection. *Virology Journal*. 8:396.
- Stein C, Caccamo M, Laird G, Leptin M. 2007. Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biol*. 8, 251.
- Takaoka, A., Tamura, T., Taniguchi, T., 2008. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci*. 99, 467–478.
- Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., Taniguchi, T., 2008. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol*. 26, 535–584.
- Wang, Z., Choi, M.K., Ban, T., Yanai, H., Negishi, H., Lu, Y., Tamura, T., Takaoka, A., Nishikura, K., Taniguchi, T., 2008. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5477–5482.
- Wolf K. 1988. Infectious pancreatic necrosis. In: *Fish Viruses and Fish Diseases*. Cornell Univ Press, Ithaca, NY, Pp. 115–157.