

Estrategias antivirales en acuicultura: cómo conseguir que un pez resista a la infección por virus.

M. Belló-Pérez¹, RM. Medina-Galí¹, L. Pérez¹, A. Estepa¹

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de la UMH, 03202 Elche, melissa.bello@goumh.umh.es

Introducción:

Actualmente, los virus que afectan a los vertebrados no mamíferos (peces, aves, anfibios y reptiles) han alcanzado gran transcendencia en el área de sanidad animal (1). Esto es debido a que son los patógenos que generan más enfermedades en los animales utilizados para abastecer el consumo humano. En el caso de los peces, el mayor desafío al que se enfrenta la industria de la acuicultura para suministrar la demanda de pescado para la dieta humana es la búsqueda de una solución para prevenir dichas infecciones (2). Dentro de los virus que amenazan a la acuicultura, los rhabdovirus tienen una importante posición. Entre los rhabdovirus, se encuentran: SVCV y VHSV. El SVCV es el agente causante de la Viremia primaveral de la Carpa y se ha considerado una amenaza a nivel mundial ya que se han identificado brotes de SVCV por todo el mundo, incluyendo Europa, Canadá, China o EEUU (3,4). Por otra parte, aunque el VHSV (virus de la septicemia hemorrágica vírica) afecta principalmente a la trucha arcoíris y al salmón, también infecta a otras especies de agua dulce y salada, alcanzando un total de 80 especies distribuidas en el hemisferio norte (EEUU, Canadá, Japón, Corea y Europa) (5,6). Dado que el aumento de las medidas de higiene (en la estabulación y manejo) son insuficientes y no existe ningún tratamiento para peces frente a las enfermedades causadas por virus, la inmunización a través de la vacunación es el método profiláctico más eficaz (7). No obstante, es fundamental una ampliación del conocimiento de los mecanismos inmunológicos que median la eficacia de las vacunas para el diseño de otras futuras. Esto es porque se sigue sin tener vacunas eficaces frente a un gran número de enfermedades infecciosas de gran importancia en sanidad, que todavía no se pueden controlar. Por ello, la búsqueda de estrategias alternativas para el desarrollo de las nuevas vacunas es de suma importancia. El objetivo de una vacuna es inducir una respuesta protectora a largo plazo frente a un patógeno específico (8). Dado que una característica distintiva del sistema inmune adaptativo es su capacidad para recordar un encuentro con un patógeno (9, 10), el desarrollo racional de vacunas se ha basado hasta ahora en primar la respuesta inmune adaptativa, promoviendo la citotoxicidad y la generación de anticuerpos específicos frente a un determinado patógeno. Las respuestas inmunes en los vertebrados han sido clasificadas clásicamente como innatas o adaptativas. Hasta la última década, la inmunidad innata se consideraba como una respuesta rápida frente a un primer encuentro con un patógeno, inespecífica, incapaz de generar memoria inmunológica y pobremente regulada. Por el contrario, la inmunidad adaptativa, mediada por los linfocitos T y B, es considerada como específica, capaz de elaborar una respuesta concreta y distinta para cada antígeno, de generar memoria inmunológica capaz de proteger frente a la reinfección y de estar “finamente” regulada (11). Sin embargo, durante los últimos años el dogma de la inmunidad ha cambiado drásticamente. Estudios recientes han demostrado que no sólo el sistema inmune adaptativo de vertebrados tiene memoria, sino también el sistema inmune innato. A esta memoria se le ha llamado Inmunidad Entrenada (*Trained Immunity*) (9,10). La capacidad de generar memoria, que se observa

en el sistema inmune innato de los vertebrados, se conoce desde hace tiempo en otros organismos que carecen de respuestas adaptativas. De hecho, existe un gran número de estudios que demuestran características adaptativas en la inmunidad innata de plantas e invertebrados, que sostienen la existencia de la memoria inmune innata (12). La inmunidad entrenada se induce tras infección o vacunación, protege frente a reinfecciones inespecíficas (infecciones con virus distintos) a corto plazo y es independiente de las células del sistema inmune adaptativo (9,10). Además, esta inmunidad también es diferente a la inmunidad innata típica y a la tolerancia. Tras un primer encuentro con un patógeno, aparece una respuesta inmune innata típica que retorna a su nivel basal una vez pasada la infección. No obstante, pueden ocurrir dos fenómenos contrarios: que esa respuesta quede inhibida, apareciendo el fenómeno de la tolerancia; o por el contrario, que quede aumentada apareciendo una respuesta más rápida de lo normal frente a un segundo encuentro con un antígeno. Este es el caso de la inmunidad entrenada (**Figura 1**) (10). La existencia de la inmunidad entrenada nos conduce a pensar que el ignorar la activación del sistema inmune innato supone renunciar a un componente que contribuye a la efectividad de las vacunas. Especialmente en el caso de los peces, que “confían” más en su sistema inmune innato que en el adaptativo puesto que éste último está poco evolucionado, lo cual es lógico puesto que los peces son el primer grupo de vertebrados que aparecen en la evolución (13). Por ello, son los primeros en los que se manifiesta la inmunidad adaptativa.

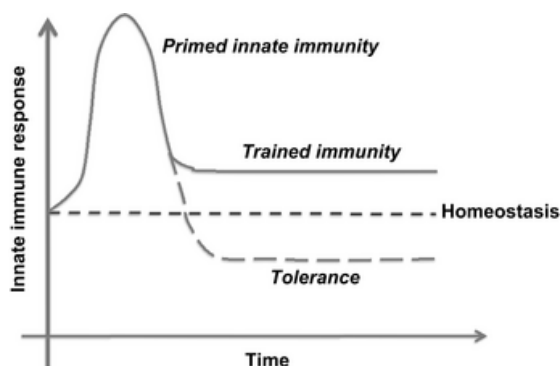


Figura 1. Representación gráfica de las diferencias existentes entre la inmunidad innata, la inmunidad entrenada y la tolerancia. Se observa que durante las infecciones, la respuesta de la inmunidad innata puede ser entrenada para responder más fuerte ante un segundo estímulo. Imagen tomada de Netea *et al.*, 2013.

Asimismo, existen muchos argumentos para considerar la inmunidad entrenada como un componente importante en la defensa del huésped: Entre otros,

- a) ciertos microorganismos comensales, como *Candida albicans* o el herpesvirus latente, benefician a sus huéspedes mamíferos porque inducen una protección inmune inespecífica (14,15).
- b) algunas vacunas, como la vacuna frente a la tuberculosis, protegen inespecíficamente frente a infecciones producidas por otros patógenos (16).

Por tanto, en vista de estos efectos protectores inespecíficos observados, se especula:

- a) Un mantenimiento de la importancia de la inmunidad entrenada en los mamíferos durante la evolución (10).
- b) Un papel significativo de la inmunidad entrenada en los efectos de las vacunas de uso actual (9).

Estas suposiciones destapan nuevas estrategias de vacunación mediante la promoción de la inmunidad entrenada, que permitirían: la mejora de las vacunas hasta ahora poco eficaces; la explotación de la inmunidad entrenada en situaciones donde no hay disponibles vacunas específicas; abordar la vacunación de ancianos y pacientes inmunodeprimidos (con VIH); y sobre todo el diseño de nuevas vacunas, que potencien la protección conferida por la inmunidad entrenada además de la memoria inmunológica adaptativa (17). La inmunidad entrenada se puede estudiar mediante cultivos celulares (sin respuesta inmune adaptativa) y utilizando mutantes de pez cebra (*rag 1-/-*), que carecen de sistema inmune adaptativo, por tanto, permiten la evaluación del sistema inmune innato sin interferencias con el adaptativo (18). Por otro lado, es de suponer que si la inmunidad entrenada existe en peces, ésta será aún más fuerte en el caso de los mutantes *rag* para compensar ese déficit de sistema inmune adaptativo. Los peces cebra son susceptibles a la infección por SVCV en condiciones similares a las que se han descrito para infectar a otras especies de ciprínidos (19). Además, se ha comprobado que se pueden conseguir porcentajes de mortalidad acumulada (CPM) del 90% tras una infección con SVCV por baño-inmersión a 20-22°C (20). En pez cebra los síntomas con los que cursa la infección son similares a los que se observan en otras especies, destacando las hemorragias internas y la exoftalmia (**Figura 2**).

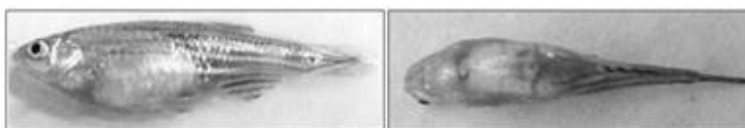


Figura 2. Pez cebra tras la infección por inmersión con SVCV.

Objetivo:

El **objetivo general** de este estudio es comprobar que el fenómeno de la inmunidad entrenada descrito en mamíferos también se manifiesta en peces y explorar su aplicabilidad en la mejora de vacunas. Para alcanzar dicho objetivo general, se fijaron los siguientes **objetivos específicos**:

Objetivo 1. Determinar protección heteróloga en células de pez.

Objetivo 2. Comprobar si los peces cebra mutantes *rag1-/-* (carentes de inmunidad adaptativa) son más resistentes que los *wild type* (*rag1+/+*) a una infección por un virus. Concretamente frente al rhabdovirus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV).

Objetivo 3. Determinar que la mayor resistencia a la infección de los peces cebra *rag1-/-* en comparación con los *wild type* está ligada a fenómenos de inmunidad entrenada.

Objetivo 4. Encontrar cambios en la expresión génica relacionados con la inmunidad entrenada.

Objetivo 5. Determinar si la inmunidad entrenada se relaciona con cambios epigenéticos en promotores de genes y/o polimorfismos en familias de genes de respuesta inmune.

Procedimiento experimental y resultados hasta la fecha:

Experimentos *in vitro*:

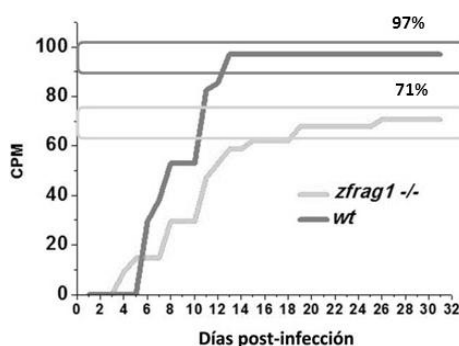
Para determinar la existencia de la protección heteróloga (protección adicional que ofrece una infección con un virus determinado frente a otros tipos de virus diferentes) en células de pez, se realizaron dos tipos de experimentos: El objetivo del primer experimento era demostrar el tratamiento con poly I:C (inmunoestimulante que simula las infecciones virales) genera protección frente a la infección con el virus SVCV en células de pez. Para ello, se trataron células EPC con poly I:C a diferentes tiempos y, posteriormente

estas células fueron infectadas con SVCV. Los resultados mostraron que las células tratadas previamente con poly I:C eran más resistentes a la infección del virus que aquellas que no estaban tratadas. Además, dicha resistencia se podía observar incluso en las células que habían sido tratadas con poly I:C una semana antes a la infección. El objetivo del segundo experimento era demostrar que la persistencia a IPNV (virus que causa la necrosis pancreática infecciosa en salmónidos) existente en la línea celular EPC^{IPNV} a 20°C genera protección frente a la infección con los virus SVCV y VHSV incluso a 25°C. Los resultados mostraron que las células EPC^{IPNV} eran resistentes a ambos virus incluso estando 4 días previos a la infección a 25°C.

Experimentos *in vivo*:

Con el objetivo de comprobar si los mutantes *rag1*^{-/-} eran más resistentes que los *wild type* a una infección por virus, se utilizaron peces cebrá adultos mutantes y *wild type* procedentes del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Murcia. Tras 2 semanas de aclimatación a las condiciones del laboratorio, 25 peces cebrá adultos de cada grupo se infectaron con una dosis letal de SVCV (10^4 PFU/ml) por baño-inmersión durante 90 min a 22°C tal y como se ha descrito anteriormente (21). La mortalidad se registró durante 30 días mostrando que los peces *wild type* eran significativamente más susceptibles a la infección con SVCV que los mutantes *rag1*^{-/-} (**Figura 3**).

Figura 3. Comparación de la mortalidad acumulada entre los peces *rag1*^{-/-} y los peces *wild type* infectados por baño-inmersión con SVCV. Los valores correspondientes a los *rag1*^{-/-} se muestran en gris claro y, los de los *wild type* en gris oscuro.



Asimismo, el título de virus en los órganos internos de los peces mutantes *rag1*^{-/-} fue 100 veces inferior que en los *wild type*. Este resultado indica que la menor mortalidad asociada a los mutantes *rag1*^{-/-} se correlaciona con una menor capacidad de replicación del virus en estos peces. Si la protección observada en los mutantes *rag 1*^{-/-} adultos se debe a la inmunidad entrenada, es lógico pensar que éstos partirán de un estado inmunológico superior con respecto a los peces *wild type* antes del desafío frente a SVCV, puesto que habrán ido entrenándose desde su nacimiento hasta llegar a la etapa adulta debido a la exposición a diferentes patógenos a través del agua. Para corroborar la hipótesis anterior, se analizó la expresión de genes del sistema inmune innato por RT-qPCR en ambos grupos de peces sin infectar. Para ello, se comenzó el análisis tomando muestras de células de la base de las aletas y piel adyacente de 3 peces por grupo (*rag* y *wild type*), ya que se ha demostrado que es el punto de entrada de los Norvirhabdovirus en peces y que a piel es una superficie mucosa, que constituye la primera barrera ante la infección que contiene diversos componentes de defensa. Los resultados demostraron que la expresión génica en los peces no infectados fue superior en el grupo *rag1*^{-/-} que en *wild type*. Los niveles de transcritos de péptidos antimicrobianos (proteínas de origen natural que presentan, entre otras, actividad antiviral) como la beta defensina 2 y la nk

lysina son mayores en los *rag1*^{-/-} que en los *wild type*, aunque la diferencia sólo es significativa en el caso de la beta defensina 2. También podemos ver que las citoquinas (conjunto de proteínas que regulan las interacciones entre las células del sistema inmune) y los genes implicados en la cascada del interferón (primera línea de defensa de los virus) se encuentran sobre-expresados en los mutantes *rag1*^{-/-}.

Conclusiones hasta la fecha:

1. Las células de pez presentan protección heteróloga que podría estar mediada por la inmunidad entrenada, ya que las células no poseen respuestas inmunes adaptativas y la respuesta inmune innata es inespecífica. Esta protección persiste hasta una semana tras recibir el primer estímulo.
2. Los mutantes de pez cebra *rag 1*^{-/-} adultos resisten más a la infección con SVCV que los *wild type* probablemente como consecuencia de un estado inmunológico sobre-estimulado previo a la infección. Esta sobre-estimulación podría deberse a un entrenamiento del sistema inmune innato desde su nacimiento hasta alcanzar la etapa adulta debido a la exposición a diferentes patógenos.

Perspectivas futuras:

1. Comprobar que tras la eclosión, en etapa de larvas, los *wild type* y los *rag1*^{-/-} son igual de susceptibles a la infección con SVCV.
2. Comprobar que la protección observada en los mutantes no se debe a una mejor transferencia materna del estatus inmunológico en los huevos de *rag1*^{-/-}.
3. Identificar genes implicados en la inmunidad entrenada.

Referencias:

- [1] Kibenge, F.S., et al., *Countermeasures against viral diseases of farmed fish*. Antiviral Res, 2012. **95**(3): p. 257-81.
- [2] Quesada, S.P., J.A. Paschoal, and F.G. Reyes, *Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones—a review*. J Food Sci, 2013. **78**(9): p. R1321-33.
- [3] Garver, K.A., et al., First detection and confirmation of spring viraemia of carp virus in common carp, *Cyprinus carpio* L., from Hamilton Harbour, Lake Ontario, Canada. J Fish Dis, 2007. **30**(11): p. 665-71.
- [4] Liu, H., Gao, L., Shi, X., Gu, T., Jiang, Y., Chen, H., Isolation of spring viraemia of carp virus (SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio* koi) and common carp *C. carpio carpio* in P.R. China. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. Vol. Volume 24, Issue 4, 2004, 2004, Wuhan Hubei, China.
- [5] M., et al., Evolution of the viral hemorrhagic septicemia virus: Divergence, selection and origin. Mol Phylogenet Evol, 2014. **77**C: p. 34-40.
- [6] Skall, H.F., N.J. Olesen, and S. Møllergaard, Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming—a review. J Fish Dis, 2005. **28**(9): p. 509-29.
- [7] Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. Nature Medicine. 2005;**11**(4):S5-S11.
- [8] Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: Implications for vaccine development. Nature Reviews Immunology. 2002;**2**(4):251-62.
- [9] Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. Cell Host Microbe. 2011;**9**(5):355-61.

- [10] Netea MG. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(8):881-4.
- [11] Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annual Review of Biochemistry.* 2002;71:101-32.
- [12] Durrant WE, Dong X. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology.* 2004;42:185-209.
- [13] Rauta PR, Nayak B, Das S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters.* 2012;148(1):23-33.
- [14] Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, et al. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature.* 2007;447(7142):326-U7.
- [15] Quintin J, Saeed S, Martens JHA, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host and Microbe.* 2012;12(2):223-32.
- [16] Benn CS, Netea MG, Selin LK, Aaby P. A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends in Immunology.* 2013;34(9):431-9.
- [17] Garly ML, Martins CL, Bale C, Balde MA, Hedegaard KL, Gustafson P, et al. BCG scar and positive tuberculin reaction associated with reduced child mortality in West Africa - A non-specific beneficial effect of BCG? Vaccine. 2003;21(21-22):2782-90.
- [18] Hohn C, Petrie-Hanson L. Rag1(-/-) Mutant Zebrafish Demonstrate Specific Protection following Bacterial Re-Exposure. *Plos One.* 2012;7(9).
- [19] Sanders, G.E., W.N. Batts, and J.R. Winton, Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus. *Comp Med*, 2003. 53(5):p. 514-21.
- [20] Boltana, S., et al., Behavioural fever is a synergic signal amplifying the innate immune response. *Proc Biol Sci*, 2013. 280(1766): p. 20131381.
- [21] Martinez-Lopez A, Garcia-Valtanen P, Ortega-Villaizan M, Chico V, Gomez-Casado E, Coll JM, et al. VHSV G glycoprotein major determinants implicated in triggering the host type I IFN antiviral response as DNA vaccine molecular adjuvants. *Vaccine.* 2014;32(45):6012-9.