

Respuesta inmune de eritrocitos nucleados de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) frente a infecciones víricas.

I. Nombela¹, S. Puente¹, V. Chico¹, B. Bonmatí¹, L. Pérez¹, L. Mercado², J. Coll³ y M. M. Ortega-Villaizán¹.

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC), Universidad Miguel Hernández (Elche), inombela@umh.es

² Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso.

³ Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-SGIT), Madrid

Introducción

Los peces son los vertebrados más primitivos que poseen muchas de las células y moléculas encontradas en los mamíferos. Aun así, el sistema inmune de los peces es distinto al de los mamíferos y es ampliamente desconocido en muchas especies de peces, limitando de esta manera el desarrollo de estrategias control contra enfermedades infecciosas [1]. Por ejemplo, los peces poseen linfocitos B fagocíticos y no tienen a la vez el mismo repertorio de inmunoglobulinas que los mamíferos poseen [2]. La principal causa de esto es su estatus evolutivo primitivo y naturaleza poiquilotérmica que resulta en un repertorio de anticuerpos limitado, proliferación linfocitaria lenta y menor afinidad en comparación con los mamíferos [3, 4]. En peces teleósteos, un amplio rango de tipos celulares claves han sido descritos de estar implicados en las defensas innatas, incluyendo monocitos, macrófagos, células citotóxicas no específicas, células parecidas a NK y granulocitos, que pueden completar la ineficiencia de la respuesta inmune adquirida en peces [1].

La implicación de los eritrocitos nucleados de pez como mediadores de las respuestas celulares es un tema de investigación novedoso. El papel típico asociado a los eritrocitos (RBCs) es el transporte de oxígeno a los distintos tejidos. Muchos patógenos, incluidos virus, tienen como diana a estas células que se encuentran nucleadas en el caso de peces, anfibios y reptiles. El hecho de que estas células se encuentren nucleadas indica que son capaces de participar y regular distintos procesos. Se ha demostrado que estos RBCs pueden desarrollar respuestas específicas a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y producir factores que modulan la actividad de leucocitos [5]. Además, también se ha visto que estos eritrocitos están implicados en la formación de diferentes complejos que participan en la respuesta inmune.

Materiales y métodos

Animales

Se trabajó con individuos adultos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de aproximadamente 10 – 20 g, obtenidos de la una granja comercial libre de VHSV, y serán mantenidos en las instalaciones del animalario de la Universidad Miguel Hernández (UMH) a 14° C.

Cultivos celulares

Los RBCs de trucha fueron obtenidos de sangre periférica de peces sacrificados a sobreexposición de triclaína (triclaína metanosulfonato) a 0,2 g/L. La sangre periférica fue recogida de la vena caudal usando jeringas y depositándola rápidamente en medio RPMI-1640 (Dutch modification) (Gibco, Invitrogen Corp.) suplementado con 10% FBS irradiado con rayos gamma (Cultek), 100 U ml⁻¹ penicilina, 100 µg ml⁻¹ estreptomina (PAA Laboratories). Los RBCs de trucha fueron purificados mediante dos centrifugaciones consecutivas en gradiente de densidad (7206 g, Ficoll 1.007; Lymphoprep, Reactiva). Las células fueron cultivadas después en medio RPMI 1640 suplementado con FBS irradiado con rayos gamma al 10% más 100 U ml⁻¹ penicilina y 100 µg ml⁻¹ estreptomina.

Infección

La infección in-vitro de los RBCs se realizó utilizando VHSV (virus de la septicemia hemorrágica viral) e IPNV (virus de la necrosis pancreática infecciosa) concentrado y previamente titulado. Los RBCs fueron incubados durante 90 minutos con el virus a la multiplicidad de infección (moi) deseada en medio RPMI 2%. Después, se retiró el virus y se realizó un lavado con medio RPMI 2%. Finalmente, los RBCs se cultivaron a una densidad de 10⁶ cél./ml. en placas de 24 pocillos con RPMI 2% durante varios días para dejar transcurrir la infección.

Tinción intracelular

Los RBCs se fijaron con PFA al 4% en medio RPMI 1640 durante 20 minutos. La permeabilización de las células se realizó en un buffer de PBS con saponina al 0.05% durante 15 minutos. Los anticuerpos primarios Mx (proteína inducida por interferón-γ), β-defensina (péptido antiviral), IL-1β (interleucina 1β) , IL-8 (interleucina-8), NF-κβ (factor nuclear κβ), TNF-α (factor necrosante de tumores) e iNOS (óxido nítrico sintasa inducida) fueron añadidos al buffer de permeabilización a las diluciones recomendadas por el suministrador y se incubaron durante 60 minutos. Los anticuerpos secundarios, GAR-FITC o GAM-FITC, se incubaron durante 30 minutos. Después de cada incubación de anticuerpo primario o secundario se realizó un lavado con buffer de permeabilización. Finalmente las células se depositaron en PBS-PFA 1% y se analizarán por citometría de flujo en un citómetro FACSCanto II. Las imágenes de fluorescencia fueron realizadas en el sistema de imagen InCell Analyzer 6000.

Microscopía electrónica

Las fotografías de microscopía electrónica de barrido se realizaron con un microscopio electrónico Jeol JEM-1011. La preparación de las muestras se llevó a cabo por el personal del servicio de microscopía de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Edificio Vinalopó).

Software y estadística

Todas las gráficas muestran el promedio de la variable junto con el error estándar de la media (SEM). El software utilizado para la representación gráfica fue *Graphpad Prism 6*. Para la citometría de flujo, se procesaron los datos con el software *WEASEL 3.0*.

Resultados

1. VHSV infecta RBCs a altas moi de infección.

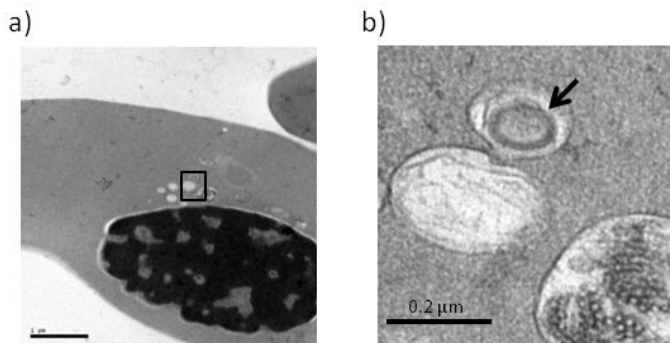


Figura 1. a) Fotografía de TEM de un eritrocito infectado por VHSV a moi 100. b) Aumento de la zona señalada en la imagen a). La flecha señala una partícula semejante a VHSV.

En la Figura 1A se puede observar el alto tránsito vesicular que existe en la periferia nuclear de eritrocitos infectados. Estas vesículas contienen principalmente microtúbulos del citoesqueleto, como se muestra en la Figura 1B. Esta figura además muestra una partícula semejante a VHSV dentro de una vesícula.

2. La expresión basal de Mx en RBCs no se ve alterada por una infección de VHSV.

Para analizar la implicación de la proteína antiviral Mx en la respuesta inmune, los RBCs se infectaron con VHSV a distintas moi.

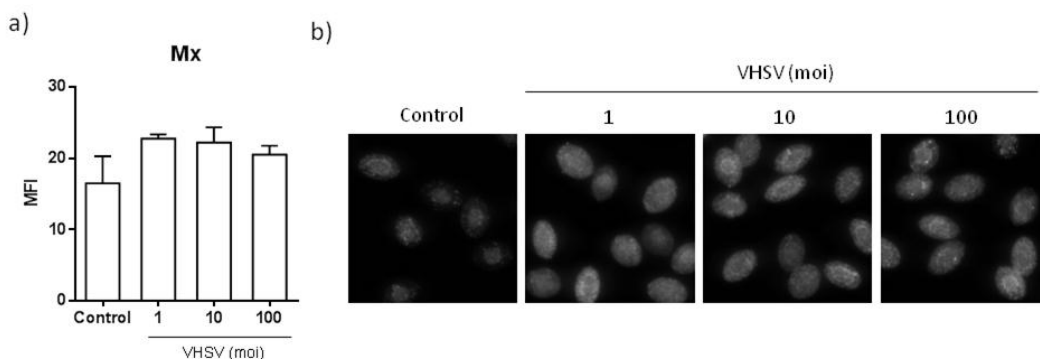


Figura 2. a) Expresión de Mx en RBCs cuantificada por citometría de flujo, en células control e infectadas, tras 3 días de infección con VHSV a moi 1, 10 y 100. (n =3) b) Inmunofluorescencia de la expresión de Mx en RBC control e infectados con VHSV a moi 1, 10 y 100.

Como se observa en la Figura 2A, los RBCs infectados con VHSV presentan un ligero incremento de la expresión de la proteína Mx a las distintas moi ensayadas en la infección con VHSV. Este incremento alcanza su máximo de expresión a moi 10, aunque se trata de un incremento no significativo estadísticamente. Dicha expresión ocurre también a nivel basal como muestra la Figura 2B.

3. Poli I:C y VHSV producen un incremento de los niveles de NF- κ B, TNF- α e iNOS en RBCs.

Se utilizaron anticuerpos frente IL-1 β , IL-8, NF- κ B, TNF- α e iNOS para analizar por una parte la respuesta inmune del eritrocito frente a una infección vírica por VHSV; y por otra poli I:C (RNA bicatenario) para simular un proceso de infección.

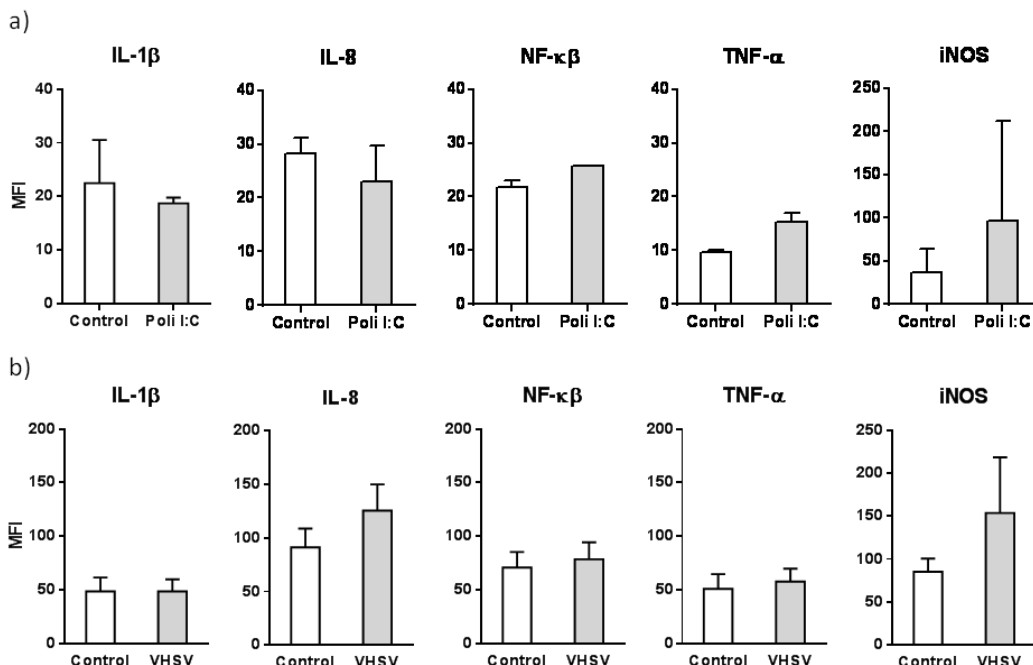


Figura 3. a) Expresión de IL-1 β , IL-8, NF- κ B, TNF- α e iNOS en RBCs cuantificada por citometría de flujo tras 24 horas de incubación con poli I:C a 50 μ g/ml (n = 2). b) Expresión de IL-1 β , IL-8, NF- κ B, TNF- α en RBCs cuantificada por citometría de flujo tras 3 días de infección con VHSV a moi 1 (n = 6).

En la Figura 3A se puede observar como poli I:C es capaz de producir un incremento de los niveles de NF- κ B, TNF- α e iNOS. Sin embargo, no existe un incremento en la producción de interleucina-1 beta e interleucina-8. Del mismo modo, la infección por VHSV es capaz de incrementar la expresión de NF- κ B, TNF- α e iNOS (Figura 3B). VHSV además produce un incremento de interleucina-8.

4. La infección de RBCs por IPNV aumenta de la proteína antiviral Mx.

A los 3 días post-infección por IPNV, los RBCs presentan un incremento de hasta 3 veces su nivel basal de Mx, mientras que a 6 días post-infección no existe un incremento de Mx (Figura 4A). En la Figura 4B se muestra una imagen donde tras 3 días de infección se observa mayor cantidad de Mx expresada en citoplasma, presentando un granulado en la zona perinuclear. La Figura 4C no muestra cambios llamativos en la expresión de β -defensina.

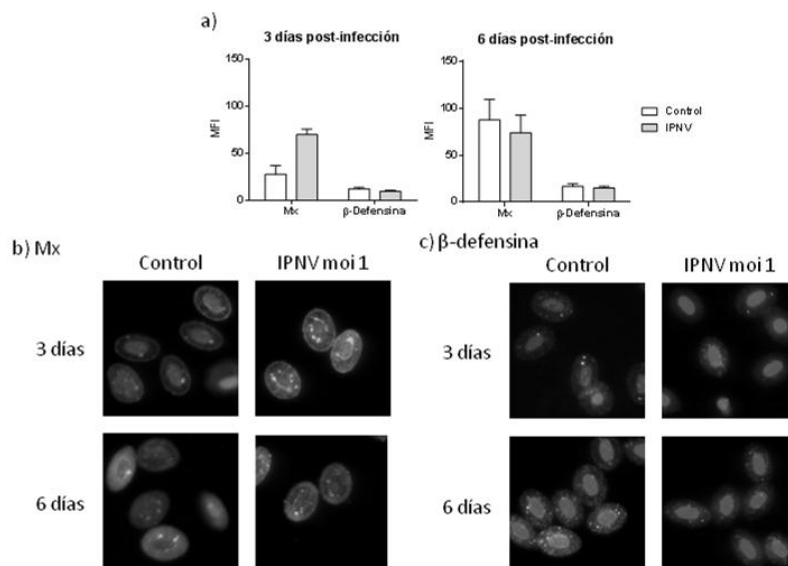


Figura 4. a) Expresión de las proteínas Mx y β -defensina en RBCs cuantificada por citometría de flujo tras 3 y 6 días de infección por IPNV a moi 1 ($n = 3$). Imágenes de la expresión de Mx (b) y β -defensina (c) en RBCs tras 3 y 6 días de infección por IPNV a moi 1.

5. Discusión

Recientemente, se ha demostrado que RBCs infectados con orthoreovirus, cuya diana son RBCs, son capaces de participar en la respuesta inmune frente a virus produciendo proteínas antivirales como Mx [6]. En el presente estudio se demuestra que un virus dirigido a infectar distintos tipos celulares hace que los RBCs sean capaces de expresar proteínas antivirales e implicadas en vías de señalización inflamatorias. Por tanto, los datos mostrados sugieren una participación activa de los RBCs en la respuesta antiviral.

6. Referencias

- [1] Secombes, C. y T. Wang (2012). The innate and adaptive immune system of fish, in *Infectious disease in aquaculture*. B. Austin. *Woodhead Publishing Limited*. p. 3-68.
- [2] Bengten, E., et al. (2006) Channel catfish immunoglobulins: repertoire and expression. *Dev Comp Immunol*. 30(1-2): p. 77-92
- [3] Du Pasquier, L. (1982) Antibody diversity in lower vertebrates--why is it so restricted? *Nature*. 296(5855): p. 311-3.
- [4] Ramírez, J.L., et al. (2014) The role of Hemocytes in *Anopheles gambiae* Antiplasma Immunity. *J Innate Immun*. 6(2): p.119-28.
- [5] Passantino, L., et al. (2007). Antigenically activated avian erythrocytes release cytokine-like factors: a conserved phylogenetic function discovered in fish. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 29(1), 141-152.
- [6] Wessel, Ø., Olsen, C. M., Rimstad, E., & Dahle, M. K. (2015). Piscine orthoreovirus (PRV) replicates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) erythrocytes ex vivo. *Vet Res*, 46, 26.