

## El papel de los eritrocitos de peces en la inmunización con vacunas DNA frente a rhabdovirus.

S. Puente<sup>1</sup>, I. Nombela<sup>1</sup>, V. Chico<sup>1</sup>, B. Bonmatí<sup>1</sup>, L. Pérez<sup>1</sup>, L. Mercado<sup>2</sup>, J. Coll<sup>3</sup>, M. Ortega-Villaizán<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular. Universidad Miguel Hernández (Elche). [spuente@umh.es](mailto:spuente@umh.es)

<sup>2</sup> Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Valparaíso) Chile.

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

### INTRODUCCIÓN

Los peces pertenecen al grupo de los vertebrados más primitivos. Poseen un sistema inmune con claras similitudes al de los mamíferos pero también difieren en muchos aspectos del mismo. El sistema inmune de los peces se caracteriza por una inmunidad innata más desarrollada, diversa y activa que la de los mamíferos y es de vital importancia a la hora de combatir infecciones. Una de las diferencias de los peces respecto a los mamíferos, y que es objeto de este estudio, son los eritrocitos. A diferencia de los eritrocitos de mamíferos, los eritrocitos de peces son nucleados, lo que les permite tener actividad a nivel transcripcional. La participación de los eritrocitos de peces en la respuesta inmune ha sido demostrada actuando como fagocitos [1], células presentadoras de antígenos (Ortega-Villaizán M. comunicación personal) y liberando citoquinas [2] [3]. Sin embargo el papel de estas células en el sistema inmune está todavía por descubrir.

Actualmente la prevención de las enfermedades virales en peces es sólo posible mediante la vacunación. Sin embargo aún quedan muchas preguntas por resolver acerca de los mecanismos involucrados en esta protección, que nos permitan desarrollar vacunas eficaces en acuicultura. Es por ello que los eritrocitos de peces, apenas estudiados en el sistema inmune de peces, podrían abrir nuevas perspectivas en la vacunación de peces frente a virus.

Hasta el momento, las vacunas DNA constituyen la mejor opción a la hora de controlar las enfermedades virales en acuicultura [4]. Por ello, el objetivo global de este trabajo es dilucidar el papel que juegan los eritrocitos de peces en la profilaxis con vacunas DNA. Para llevar a cabo este objetivo, utilizaremos la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*, como modelo animal y el virus de la septicemia hemorrágica vírica, VHSV, como modelo de rhabdovirus. La vacuna DNA que utilizaremos codifica la glicoproteína G del VHSV, ya que la glicoproteína G de los rhabdovirus es la única proteína hasta la fecha que ha conseguido estimular el sistema inmune de peces frente a la infección por esta familia de virus.

## METODOLOGÍA Y RESULTADOS

### Purificación de eritrocitos

Los eritrocitos son obtenidos de la sangre periférica de la trucha arcoíris y purificados del resto de células de la sangre mediante gradiente de densidad (Ficoll 1.007)

### Transfección

Una vez purificados, los eritrocitos son transfectados *in vitro* mediante electroporación utilizando el sistema Neon™ Transfection System (Life Technologies) con un plásmido que codifica la secuencia de la glicoproteína G de VHSV y la proteína fluorescente TFP1 (pmTFP1-G<sub>VHSV</sub>) [5] y el plásmido pMCV-G<sub>VHSV</sub> [6]. El proceso de electroporación de los eritrocitos se optimizó para la cantidad de plásmido utilizado y número de células y para las condiciones de voltaje y exposición del electroporador.

### Monitorización de los eritrocitos transfectados

La expresión de la glicoproteína G<sub>VHSV</sub> por los eritrocitos se monitorizó durante 7 días mediante microscopia de fluorescencia con el equipo IN Cell 6000 (Figura 1), utilizando el plásmido fluorescente pmTFP1-G<sub>VHSV</sub>, resultando la transfección más óptima a 6 días post-transfección.

Por otro lado, la expresión de la glicoproteína G<sub>VHSV</sub>, es evaluada en el cultivo *in vitro* de eritrocitos transfectados con el plásmido pMCV-G<sub>VHSV</sub>, a 6 días post-transfección mediante RT-qPCR (Figura 2a).

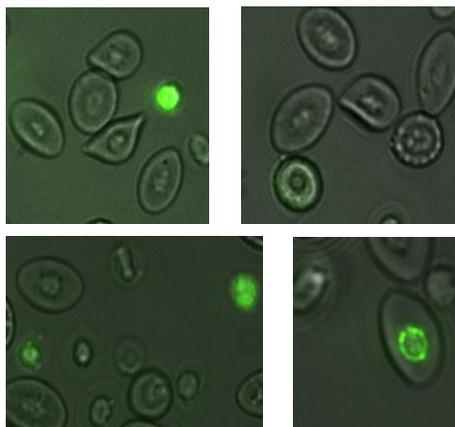


Figura 1: Transfección de eritrocitos con pmTFP1-G<sub>VHSV</sub> al microscopio de fluorescencia IN Cell 6000.

### Expresión de genes del sistema inmune

La expresión de genes se analizó mediante RT-qPCR de los cultivos *in vitro* de células transfectadas con el plásmido pMCV-G<sub>VHSV</sub> para cuantificar la expresión de los genes Mx (proteína inducida por interferón) y IL1 $\beta$  (interleuquina 1 beta, citoquina relacionada con el proceso de inflamación) (Figura 2b), implicados en la respuesta inmune.

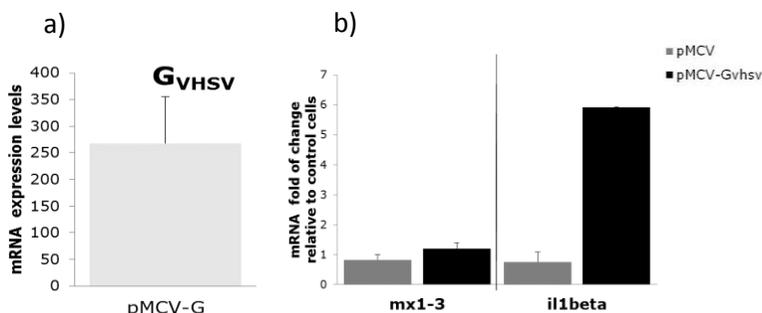


Figura2: Cuantificación por qPCR de la expresión de mRNA de eritrocitos transfectados con pMVCV-G<sub>VHSV</sub> y el plásmido vacío pMVCV a) expresión del transgén G<sub>VHSV</sub> b) expresión de Mx1-3 y IL1 $\beta$ .

### Expresión de proteínas del sistema inmune

Después analizamos diversas proteínas (Mx, BD1 (beta defensina 1), IL1 $\beta$  (Interleuquina 1 beta), TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alpha), IL8 (interleuquina 8), iNOS (óxido nítrico sintasa inducible), NF $\kappa$ B (factor nuclear kappa beta) implicadas en la respuesta inmune de estos eritrocitos de peces portadores de la vacuna DNA con la glicoproteína G<sub>VHSV</sub> mediante ensayos de inmunofluorescencia analizados mediante citometría de flujo (FACS Canto II) y visualizados mediante microscopia de fluorescencia (IN Cell 6000). Los resultados mostraron un aumento de algunas de estas proteínas en los eritrocitos transfectados con la el plásmido pmTFP1-G<sub>VHSV</sub> con respecto del control.

### Selección de célula única para single cell (sc) RT-qPCR

Aunque la población de eritrocitos está previamente purificada, para demostrar que realmente estos datos corresponden sólo a la acción de los eritrocitos de peces y que no tenemos otros tipos celulares de la sangre presentes en nuestros ensayos, hemos obtenido muestras "single-cell" de eritrocitos transfectados con el plásmido pmTFP1-G<sub>VHSV</sub> mediante sorting celular, utilizando el sorter FACS Jazz (BD). Estas muestras de single-cell obtenidas (entre 1-10 células) han sido analizadas mediante single-cell (sc) qPCR para evaluar la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune del eritrocito a la profilaxis con la vacuna DNA con la glicoproteína G<sub>VHSV</sub> (Figura 3).

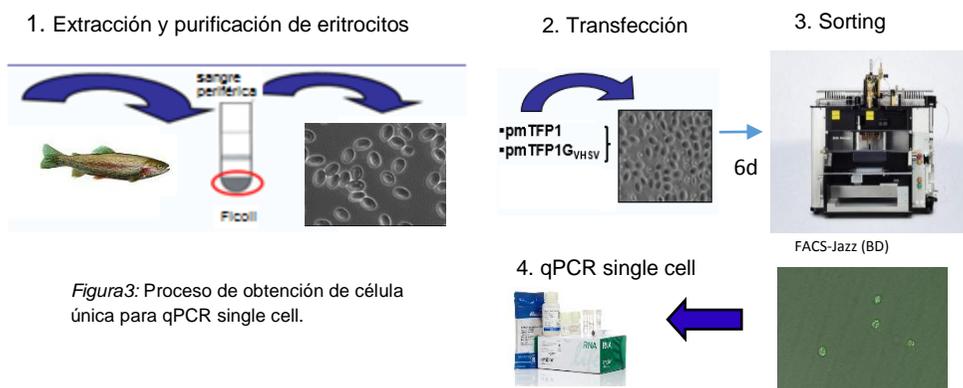


Figura3: Proceso de obtención de célula única para qPCR single cell.

El primer paso es verificar la presencia del transgén  $G_{VHSV}$  en las muestras transfectadas que confirme que el proceso de sorting es correcto. Después analizamos genes del sistema inmune como Mx, BD1, IL8, IL1 $\beta$ , INF $\gamma$  (interferón gamma), TNF $\alpha$ , iNOS, MHC I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I) y MHC II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II) (Figura 4). Los resultados mostraron un aumento de la expresión de IL1 $\beta$ , INF $\gamma$  y IL8, genes asociados con la respuesta inmune y el proceso de respuesta inflamatoria, al ser transfectados con la vacuna DNA respecto al control

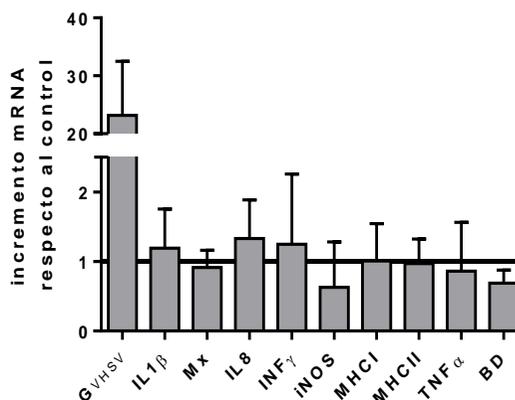


Figura4: Incremento de la expresión de mRNA de genes del sistema inmune en eritrocitos transfectados con el plásmido pmTFP1- $G_{VHSV}$  respecto al control de eritrocitos electroporados sin el plásmido (línea negra horizontal). n=3 para todos los genes.  $G_{VHSV}$  corresponde a la expresión del transgén en lo eritrocitos transfectados con el plásmido pmTFP1- $G_{VHSV}$

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Una vez el proceso de sorting de single cell está optimizado, y la single cell qPCR confirma la presencia del transgén  $G_{VHSV}$ , y una respuesta inmune del eritrocito frente a la vacuna DNA, nuestro objetivo principal es secuenciar el transcriptoma de los eritrocitos de peces transfectados con la vacuna DNA para evaluar la expresión global de los genes involucrados en esta profilaxis.

Todo esto nos lleva a nuestro objetivo final, dilucidar el papel de los eritrocitos en la inmunización con vacunas DNA y buscar nuevas estrategias y coadyuvantes para el diseño y desarrollo de vacunas DNA eficaces frente a rhabdovirus.

## REFERENCIAS

[1] Passantino, L., Tafaro, A., Altamura, M., Arena, R., Passantino, G. F., y Jirillo, E. (2002). Fish immunology. II. Morphological and cytochemical characterization and phagocytic activities of head kidney macrophages from rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 24(4), 679-691.

- [2] Passantino, L., Massaro, M. A., Jirillo, F., Di Modugno, D., Ribaud, M. R., Di Modugno, G., y Jirillo, E. (2007). Antigenically activated avian erythrocytes release cytokine-like factors: a conserved phylogenetic function discovered in fish. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 29(1), 141-152.
- [3] Morera, D., Roher, N., Ribas, L., Balasch, J. C., Doñate, C., Callol, A., y MacKenzie, S. A. (2011). RNA-Seq reveals an integrated immune response in nucleated erythrocytes. *PloS one*, 6(10), e26998.
- [4] Evensen, Ø., y Leong, J. A. C. (2013). DNA vaccines against viral diseases of farmed fish. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1751-1758.
- [5] García-Valtanen, P., Ortega-Villaizan, M. D. M., Martínez-López, A., Medina-Gali, R., Pérez, L., Mackenzie, S., y Estepa, A. (2014). Autophagy-inducing peptides from mammalian VSV and fish VHSV rhabdoviral G glycoproteins (G) as models for the development of new therapeutic molecules. *Autophagy*, 10(9), 1666-1680.
- [6] Chico, V., Ortega-Villaizan, M., Falco, A., Tafalla, C., Perez, L., Coll, J. M., y Estepa, A. (2009). The immunogenicity of viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV) DNA vaccines can depend on plasmid regulatory sequences. *Vaccine*, 27(13), 1938-1948.