



AquaTIC

ISSN: 1578-4541

igjaugar@upv.es

Universidad de Zaragoza

España

Pereiro González, Patricia

**Avances en el conocimiento de la respuesta inmune antiviral y resistencia al Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (HSV) en rodaballo (*Scophthalmus maximus*)**

AquaTIC, núm. 52, Esp., 2018, pp. 1-4

Universidad de Zaragoza

Zaragoza, España

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49460633001>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

**PREMIO MEJOR TESIS DOCTORAL 2017**  
**Otorgado por la Sociedad Española de Acuicultura (SEA)**

**Avances en el conocimiento de la respuesta inmune antiviral y  
resistencia al Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHSV) en  
rodaballo (*Scophthalmus maximus*)**

**Patricia Pereiro González**

Directores:

Dra. Beatriz Novoa García

Dr. Antonio Figueras Huerta

Defendida el 28 de julio de 2017 en la Universidade de Santiago de Compostela

Realizada en el Instituto de Investigaciones Marinas (IIM-CSIC)

Mención internacional y *cum laude*

## Resumen

El rodaballo (*Scophthalmus maximus*) es un pez con un alto valor comercial, especialmente en Europa y China. El principal productor europeo es España (75% de la producción de Europa), concretamente la comunidad autónoma de Galicia, con una producción que en el pasado año superó las 8000 toneladas. Aunque el cultivo de esta especie se encuentra bien establecido desde hace años, diversos patógenos (incluyendo numerosas bacterias, virus y parásitos) pueden afectar a su estado sanitario, ocasionando importantes pérdidas económicas en el sector. Las enfermedades víricas son especialmente problemáticas en la acuicultura piscícola debido a la ausencia de tratamientos antivirales y a las dificultades en el desarrollo de vacunas efectivas. Por este motivo, los brotes de enfermedades víricas han ocasionado importantes pérdidas económicas en todo el mundo. No sorprende, por lo tanto, que ocho de las diez enfermedades de declaración obligatoria que afectan a peces (*Aquatic Animal Health Code - World Organization for Animal Health*; <http://www.oie.int>) sean ocasionadas por virus. Entre estas enfermedades de declaración obligatoria se encuentra la producida por el VHSV (Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral), el cual ocasiona una importante enfermedad que afecta principalmente a la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y otros salmonídos, aunque también se han detectado brotes de VHSV en otras especies de peces cultivados, como el rodaballo. Los rodaballlos infectados desarrollan los signos característicos de la enfermedad y, aunque la tasa de mortalidad debida a infecciones naturales en granjas de rodaballo es relativamente baja, esta enfermedad es de declaración obligatoria, lo que implica tomar medidas especiales en el manejo de la enfermedad (incluso la destrucción del stock) que pueden agravar el impacto económico.

El conocimiento del sistema inmune del rodaballo, y en concreto frente a esta enfermedad, es de vital importancia para tratar de reducir la prevalencia de este virus en las plantas de cultivo. Desafortunadamente, hasta estos últimos años la información

genómica y transcriptómica disponible en las bases de datos públicas para esta especie era muy escasa. Ello dificultó enormemente la lucha frente a gran cantidad de enfermedades que afectan a la producción de este pez plano. Por ello, el primer objetivo de la presente tesis doctoral fue el incrementar la información disponible en las bases de datos en lo que respecta a secuencias de transcritos (ARN mensajeros) de rodaballo relacionadas con la respuesta inmune antiviral. Se llevó a cabo una secuenciación masiva (*454-pyrosequencing-Roche*) del transcriptoma del rodaballo tras diversos estímulos virales utilizando diferentes tejidos del animal. Esto nos permitió descifrar casi por completo las principales cascadas de señalización inmunes. Gracias a la enorme cantidad de secuencias obtenidas (que en el campo de la genómica se conocen como *contigs*) se pudo diseñar un *microarray* (chip de ADN) altamente enriquecido en estas secuencias inmunes, lo que abrió las puestas a la posibilidad de llevar a cabo amplios análisis transcriptómicos.

Debido a la ausencia de tratamientos antivirales efectivos, la prevención es el punto crítico en la erradicación del VHSV. No obstante, no existen vacunas comerciales disponibles frente a este virus. Durante las últimas décadas se ha tratado de producir una vacuna eficaz frente a este virus usando proteínas virales, así como virus muertos o atenuados y, aunque en algunos casos esas vacunas han resultado ser efectivas en condiciones experimentales, pueden no ser seguras para su uso industrial, su producción puede ser excesivamente cara o se requieren dosis muy altas. Los avances biotecnológicos han permitido el diseño de lo que se conoce como vacunas de ADN. Estas se basan en la administración de un vector plasmídico (cromosoma circular de ADN) que contiene un gen que codifica para un antígeno específico (proteína viral). Estas vacunas de nueva generación han demostrado ser una herramienta altamente efectiva para erradicar los virus que afectan a peces. Hasta el año 2016 este tipo de vacunas no estaban autorizadas por la Unión Europea para su uso en acuicultura, pero en ese año se aprobó el uso de una vacuna de ADN en salmón atlántico (*Salmo salar*) frente al virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). Las vacunas de ADN que codifican para la glicoproteína viral (G) han demostrado ser las más eficaces a la hora de inducir protección frente a *Rhabdovirus* (género que incluye al VHSV). Con el fin de evaluar la posibilidad de controlar los brotes de VHSV por medio de una vacuna de ADN, la glicoproteína G de una cepa de VHSV aislada de una granja de rodaballo (UK-860/94) fue clonada en un plásmido de expresión. Bajo nuestras condiciones experimentales, los rodaballos a los que se les administró intramuscularmente la vacuna mostraron una protección superior al 85% frente a una infección altamente letal con VHSV. Además, se observó que los individuos que habían sido vacunados mostraban en su suero altos niveles de anticuerpos neutralizantes específicos frente a VHSV. Este trabajo supuso la primera publicación que mostraba la eficacia de la inmunización genética frente a VHSV en rodaballo.

Para profundizar de una forma más minuciosa en el mecanismo de inmunización, se realizó un análisis transcriptómico de la respuesta a una infección con VHSV, así como también de la actividad de la vacuna de ADN frente a VHSV diseñada durante la presente tesis doctoral, utilizando los *microarrays* diseñados con la información transcriptómica obtenida tras la secuenciación masiva. Gracias a este amplio análisis, pudimos descifrar aquellos mecanismos inmunes que están detrás de la protección inducida por la vacuna, así como también de la respuesta frente a la propia infección. La gran cantidad de información que proporciona el estudio simultáneo de miles de genes nos permitió ir un poco más allá y centrar nuestra atención en ciertas moléculas o procesos que estaban siendo afectados por la vacunación/infección. Este fue el caso de dos Interferones (IFNs) de tipo I, que fueron caracterizados y estudiados por primera vez en rodaballo. Los IFNs de tipo I son las principales moléculas antivirales en vertebrados ya que inducen la

expresión de numerosos genes que codifican para proteínas capaces de bloquear de forma directa la proliferación del virus. Se identificaron dos de estas moléculas en rodaballo, y se llevaron a cabo diversos estudios sobre su funcionalidad. Mientras que uno de ellos (*ifn1*) presentaba una clara actividad antiviral (protección frente a infección con VHSV e inducción de genes antivirales), el otro (*ifn2*) presentó un papel antiviral menos directo y parece estar implicado principalmente en la modulación de la inflamación. Así pues, ambos IFNs de rodaballo podrían actuar de forma complementaria y diferencial durante las infecciones virales. Ninguno de los dos IFNs presentó actividad frente a una infección con la bacteria *Aeromonas salmonicida*. Otro punto a destacar es que, por primera vez, se ha observado que estos IFNs son capaces de llevar a cabo algunas funciones opuestas a las observadas en mamíferos, como es la inducción de la producción de ciertas proteínas mediadoras del proceso inflamatorio (interleuquina-1 e interleuquina-8), que son inhibidas por IFNs en mamíferos.

Para ampliar el conocimiento sobre este tipo de genes también quisimos indagar en la función del IFN de tipo II (o IFN-gamma), el cual interviene también en la defensa frente a virus pero con un papel más inmunomodulador. El IFN-gamma ha sido típicamente descrito como una citoquina proinflamatoria que juega un importante papel en la resolución tanto de infecciones virales como bacterianas. No obstante, algunas funciones anti-inflamatorias han sido también atribuidas a esta molécula. Con el fin de completar el repertorio de IFNs de rodaballo, se caracterizó por primera vez el gen del IFN-gamma (*ifng*) en este pez plano, cuya secuencia fue obtenida gracias a la reciente publicación de su genoma. El análisis funcional de esta proteína reveló que por sí misma no es capaz de reducir la mortalidad ocasionada por VHSV o *A. salmonicida*. Además, su inyección en individuos no afectó a la expresión de multitud de genes relacionados con la actividad de IFN-gamma en mamíferos. Curiosamente, a las 24 horas post-infección, aquellos individuos tratados con IFN-gamma e infectados con VHSV mostraron un incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias e IFNs de tipo I en comparación con aquellos peces que no recibieron tratamiento de IFN-gamma, indicando un efecto sinérgico de IFN-gamma y VHSV en la inducción de estos genes. Por otra parte, algunos marcadores de la actividad de macrófagos (células del sistema inmune innato) fueron inhibidos por IFN-gamma durante la infección viral. El IFN-gamma tuvo un efecto totalmente opuesto en aquellos rodaballlos infectados con bacteria, en los cuales ocasionó una reducción de la transcripción de genes proinflamatorios y de IFNs de tipo I, pero indujo la sobreexpresión de genes relacionados con la actividad de los macrófagos. Así pues, la actividad de esta molécula de rodaballo parece ser dependiente del tipo de patógeno que causa la infección, reflejándose un claro y marcado papel dual que ha sido descrito de forma tan evidente por primera vez en vertebrados.

*Palabras clave:* rodaballo, VHSV, respuesta inmune, interferones de tipo I, interferón-gamma.

## Publicaciones de la Tesis

---

Enlace al documento completo: <http://hdl.handle.net/10261/153756>

- Pereiro P., Balseiro P., Romero A., Dios S., Forn-Cuni G., Fuste B., Planas J. V., Beltran S., Novoa B., Figueras A. (2012). High-Throughput Sequence Analysis of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Transcriptome Using 454-Pyrosequencing for the Discovery of Antiviral Immune Genes. *PLoS ONE*, 7: e35369.
- Pereiro P., Martinez-Lopez A., Falco A., Dios S., Figueras A., Coll J. M., Novoa B., Estepa A. (2012). Protection and antibody response induced by intramuscular DNA vaccine encoding for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G glycoprotein in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 32: 1088-1094.
- Pereiro P., Dios S., Boltaña S., Coll J. M., Estepa A., MacKenzie S., Novoa B., Figueras A. (2014). Transcriptome Profiles Associated to VHSV Infection or DNA Vaccination in Turbot (*Scophthalmus maximus*). *PLoS ONE*, 9: e104509.
- Pereiro P., Costa M. M., Díaz-Rosales P., Dios S., Figueras A., Novoa B. (2014). The first characterization of two type I interferons in turbot (*Scophthalmus maximus*) reveals their differential role, expression pattern and gene induction. *Developmental and Comparative Immunology*, 45: 233-244.
- Pereiro P., Forn-Cuni G., Figueras A., Novoa B. (2016). Pathogen-dependent role of turbot (*Scophthalmus maximus*) interferon-gamma. *Fish and Shellfish Immunology*, 59: 25-35.
- Pereiro P., Figueras A., Novoa B. (2016). Turbot (*Scophthalmus maximus*) vs VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus): a review. *Frontiers in Physiology*, 7: 192.