



Genes implicados en la
respuesta de lubina
(*Dicentrarchus labrax* L.)
frente a nodavirus.

LAURA POISA BEIRO
2008

La lubina europea es una de las especies marinas de mayor relevancia económica, sin embargo, numerosos parásitos afectan a esta especie causando varias enfermedades infecciosas. Entre ellas se encuentra la necrosis nerviosa viral (VNN), enfermedad que se caracteriza por el desarrollo de encefalopatías y retinopatías vacuolizantes que están asociadas a nataciones erráticas y que desembocan en mortalidades muy elevadas.

En la presente tesis doctoral se propusieron tres objetivos principales, estudiar la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y de la proteína antiviral Mx en lubina (especie susceptible al nodavirus) y en dorada (especie resistente), estudiar los efectos de la hiperoxia en la expresión de los genes anteriores y detectar nuevos genes involucrados en la respuesta inmune de la lubina frente a la VNN. Para cumplir este último objetivo se realizó una hibridación sustractiva (SSH) en riñón 4 horas después de una infección intramuscular con nodavirus en la que se obtuvieron varios genes involucrados en respuesta inmune; entre estos genes nos centramos en el estudio de las lectinas, componentes del sistema inmune innato capaces de unirse y posiblemente opsonizar microorganismos y que, por tanto, actúan como primera línea de defensa contra los patógenos.

Se sintetizó la proteína recombinante de la galectina-1 de lubina mediante el sistema de expresión en células procariotas y se purificó por columna de cromatografía gracias a su capacidad de unión a los β -galactósidos. Se determinó su actividad galectina mediante hemaglutinación y se realizaron ensayos funcionales entre los que destacó la medida del estallido respiratorio, observándose una disminución dosis-dependiente del mismo con la presencia de galectina-1 recombinante, y de expresión de citoquinas y de Mx en cerebro después de una infección experimental de nodavirus de forma simultánea a galectina-1 recombinante o de nodavirus sólo. Se demostró la capacidad anti-inflamatoria de la galectina-1 y su posible papel como inhibidor de la replicación del nodavirus.



Genes implicados en la
respuesta de lubina
(*Dicentrarchus labrax* L.)
frente a nodavirus.

LAURA POISA BEIRO

D. ANTONIO FIGUERAS HUERTA, Doctor en Biología y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Dña. BEATRIZ NOVOA GARCÍA, Doctora en Biología e Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

INFORMAN: Que la presente tesis doctoral titulada “Genes implicados en la respuesta de lubina (*Dicentrarchus labrax*) frente a nodavirus” realizada por Dña. Laura Poisa Beiro para optar al grado de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo nuestra dirección y considerando que se halla concluida, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en Vigo, a 10 de Septiembre de 2008.

Fdo. Dr. Antonio Figueras Huerta

Fdo. Dra. Beatriz Novoa García

Fdo. Laura Poisa Beiro

El trabajo realizado ha sido posible gracias a la financiación del proyecto de investigación de la Comunidad Económica Europea “Welfare and health in sustainable aquaculture (WEALTH)” (Código: SSP8-CT-2003-501984) así como a una beca para la Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia (Código: AP2003-2798).

Foto de portada tomada de Internet en:
http://es.wikipedia.org/wiki/Imagen:Dicentrarchus_labrax.jpg

A mis padres.

Agradecimientos

En este apartado quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que en mayor o menor medida han colaborado para que esta tesis doctoral pueda estar en vuestras manos.

En primer lugar quería agradecer a la Dra. Beatriz Novoa García y al Dr. Antonio Figueras Huerta el haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en el laboratorio de “Patología de Organismos Marinos”; ha sido para mí un gran privilegio el haber podido realizar este trabajo bajo su dirección. Por otra parte, y ya a nivel personal, quería agradecerles la comprensión y paciencia que han tenido conmigo a lo largo de estos cerca de cinco años, sin su ayuda esta tesis no habría llegado al final.

Por supuesto agradecer a mis compañeros de laboratorio, los que continúan y los que ya se han ido, todo el apoyo prestado. A Sonia, quien me enseñó a trabajar en Biología molecular, la paciencia que siempre ha tenido conmigo. A Raquel, sus consejos con las líneas celulares y su apoyo en muchos momentos. A Camino, sus recomendaciones con el formato de la tesis y sus ánimos constantes cuando la experimental se ponía cuesta arriba. A Pep, todas las risas vividas en el laboratorio de Vigo así como su ayuda en Estados Unidos. A Alex, su “¿cómo va esa tesis?” de todos los días. A Iván, su buen humor constante. A Pablo, su ayuda con los programas informáticos y sus enseñanzas sobre Ferrol. A Marimar, su apoyo incondicional incluso en la aventura de ir a Cantabria por lubinas. A Jorge, todos los momentos vividos como compañero de despacho, su “hola majas” de todos los días, así como el apoyo mutuo a la hora de hacer las “pesadas” memorias anuales de la beca predoctoral. A María, su ayuda para poder tener agua caliente en acuarios así como todas las risas vividas tanto dentro como fuera del laboratorio. A Ariana, los buenos momentos que pasamos en el despachito y, sobre todo, lo que nos divertimos en el viaje a Francia. A Nacho y a Rubén, su gran ayuda con los experimentos realizados en acuarios. A Bego, su ayuda para todo así como el laborioso procesado de las muestras de microscopía. A Jose Ramón, sus ánimos como compañero de despacho en los inicios.

Además también quería agradecer a todas las estudiantes de prácticas que pasaron por el laboratorio su ayuda con la experimental, sobre todo quería agradecer a Miriam que procesó conmigo todas las muestras del experimento de Francia.

Agradecer a todo el personal del Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo, sobre todo a las bibliotecarias que siempre nos consiguen los artículos con la mayor rapidez posible y también a Juan Luis por su eficacia a la hora de ponernos a punto los ordenadores. Una mención especial se merece Carmen Piñeiro por su ayuda en todo lo referente a las proteínas.

Al grupo del laboratorio del Dr. Francisco Rodríguez del Centro Nacional de Biotecnología, fundamentalmente a Aitor que pasó parte de su tiempo enseñándome todos los detalles de la expresión de proteínas mediante el sistema de baculovirus. Y también a Paco por haberme aceptado de tan buen grado en su laboratorio y sus palabras de ánimo en los momentos en que no salían las cosas.

A todo el laboratorio del Dr. Gerardo Vasta del *Center of Marine Biotechnology* su ayuda en mi experiencia vivida en los Estados Unidos, fundamentalmente quería agradecer a Hafiz todo lo que me ha enseñado acerca de la purificación de proteínas así como su paciencia para poder comunicarse conmigo. También quiero agradecer a Gerardo el haberme aceptado y tratado tan bien en su laboratorio, allí he vivido muy buenos momentos.

Agradecer a mis amigas. A Patricia, por todo lo que hemos vivido a lo largo de tantos y tantos años, y ... lo que nos queda por vivir. A Mónica, quien me contagió la pasión por la investigación siendo mi primera profesora en un laboratorio y convirtiéndose después en una gran amiga. A Cuchi, por estar siempre disponible cuando la he necesitado. Muchas gracias chicas!!!

Y, por supuesto, a mi familia. Agradecer a Pipo, por la alegría que me da todos los días. A mi hermano, Eduardo, las palabras de ánimo en los momentos de bajón. A mis PADRES, María y Tonecho, por todo el amor, el apoyo, la comprensión y los ánimos que me han mostrado siempre. Esta tesis no hubiese sido posible sin vosotros.

Resumen

La lubina europea (*Dicentrarchus labrax* L.; Moronidae; Perciformes) es una de las especies marinas de mayor relevancia económica, fundamentalmente en la acuicultura del Mediterráneo. Sin embargo, numerosos virus, bacterias, hongos, etc. afectan a esta especie causando varias enfermedades infecciosas. Entre ellas se encuentra la necrosis nerviosa viral (VNN), enfermedad que se caracteriza por el desarrollo de encefalopatías y retinopatías vacuolizantes que son detectadas mediante histología y están asociadas a nataciones erráticas que desembocan en mortalidades muy elevadas (alcanzando el 100% en multitud de ocasiones), fundamentalmente en estadios larvarios y juveniles de las especies afectadas.

En la presente tesis doctoral se propusieron tres objetivos principales, estudiar la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y de la proteína antiviral Mx en lubina (especie susceptible al nodavirus) y en dorada (especie resistente), estudiar los efectos de la hiperoxia en la expresión de los genes anteriores y detectar nuevos genes involucrados en la respuesta inmune de la lubina frente a la VNN. Para cumplir este último objetivo se realizó una hibridación sustractiva (SSH) en riñón 4 horas después de una infección intramuscular con nodavirus en la que se obtuvieron varios genes involucrados en respuesta inmune (8.7%); entre estos genes nos centramos en el estudio de las lectinas, componentes del sistema inmune innato capaces de unir y posiblemente opsonizar microorganismos y que, por tanto, actúan como primera línea de defensa contra los patógenos. Como resultado de la SSH obtuvimos *expressed sequence tags* (ESTs) correspondientes a dos lectinas tipo C, una pentraxina y una galectina-1, se aplicó la técnica de RACE para obtener todo el ORF de estos genes permitiendo así su caracterización y comparación con los ya descritos en otras especies.

Se sintetizó la proteína recombinante de la galectina-1 de lubina mediante el sistema de expresión en células procariotas y se purificó por columna de cromatografía gracias a su capacidad de unión a los β -galactósidos. Se determinó su actividad galectina mediante hemaglutinación y se realizaron ensayos funcionales entre los que destacó la medida del estallido respiratorio, observándose una disminución dosis-dependiente del mismo con la presencia de galectina-1 recombinante, y de expresión de citoquinas y de Mx en cerebro después de una infección experimental de nodavirus de forma simultánea a galectina-1 recombinante o de nodavirus sólo. Se demostró la capacidad anti-inflamatoria de la galectina-1 y su posible papel como inhibidor de la replicación del nodavirus.

Índice

Objetivos generales	17
Introducción general	19
1. Generalidades	21
2. Sistema inmune de peces teleósteos	25
3. Nodavirus	42
Capítulo I: Modulación de la expresión de genes inmunes en peces.	53
a) Expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en dorada y lubina infectadas con nodavirus.	55
1. Introducción	57
2. Materiales y métodos	60
3. Resultados	63
4. Discusión	66
b) Expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en lubina sometida a estrés por hiperoxia.	69
1. Introducción	71
2. Materiales y métodos	73
3. Resultados	75
4. Discusión	83
Capítulo II: Identificación de genes implicados en la respuesta inmune de lubina. SSH.	87
1. Introducción	89
2. Materiales y métodos	92
3. Resultados	99
4. Discusión	103
Capítulo III: Caracterización de los genes seleccionados. Lectinas.	109
1. Introducción	111
2. Materiales y métodos	117
3. Resultados	121
4. Discusión	136

Capítulo IV: Estudios funcionales. Galectina-1 recombinante.	141
1. Introducción	143
2. Materiales y métodos	146
3. Resultados	154
4. Discusión	165
Conclusiones	169
Bibliografía	173
Publicaciones derivadas de la tesis	221
Otras publicaciones relacionadas con la tesis	223

Objetivos generales de la tesis doctoral

- 1-. Estudiar el patrón de expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y de la proteína antiviral Mx en el cerebro y en el riñón de doradas y lubinas infectadas intramuscularmente con nodavirus.
- 2-. Estudiar el patrón de expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y de la proteína antiviral Mx en el cerebro y en el riñón de lubinas infectadas intramuscularmente con nodavirus después de haber estado sometidas a un estrés por hiperoxia.
- 3-. Buscar, mediante la técnica de la hibridación sustractiva, genes potencialmente candidatos de estar implicados en la respuesta de la lubina frente a la infección con nodavirus.
- 4-. Analizar y caracterizar las lectinas (dos lectinas tipo C, una galectina y una pentraxina) que se habían obtenido previamente como parte de los resultados de la sustracción de librerías.
- 5-. Obtener la galectina-1 recombinante de lubina y realizar ensayos funcionales tanto *in vivo* como *in vitro* (mortalidad, expresión de citoquinas proinflamatorias y de la proteína antiviral Mx, producción de óxido nítrico, estallido respiratorio, ...).

Introducción general

1. GENERALIDADES.

La demanda mundial de productos pesqueros se ha triplicado entre los años 1961 y 2001 debido al incremento de la población y a un aumento en el consumo per cápita de pescado que ha pasado de 11 kg/persona/año en 1970 a 16.2 kg/persona/año en el 2002.

La acuicultura y la pesca extractiva son dos actividades complementarias que deben hacer frente a esta fuerte demanda de productos pesqueros. La cantidad de productos pesqueros procedentes de la pesca extractiva alcanzó sus máximos a finales de los años 80 (90-95 millones de toneladas) y desde entonces fluctúa en torno al mismo nivel, indicando que los océanos se están explotando cerca de su producción máxima. Sin embargo, la acuicultura crece con gran rapidez de forma que, según datos de la FAO, alrededor de un 35 % de los productos pesqueros que se consumen en el mundo proceden de la misma.

La producción de la acuicultura europea representa tan sólo el 3% de la producción mundial pero es líder en algunas especies como el salmón atlántico, la trucha, la lubina, la dorada, el rodaballo y el mejillón.

Esta tesis doctoral se centra fundamentalmente en el estudio de la defensa de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) frente al nodavirus, enfermedad que afecta al sistema nervioso central y que ha causado grandes mortalidades en granjas acuícolas de toda Europa. Los primeros informes sobre la existencia de síntomas de esta enfermedad datan de 1988 cuando Bellance y Gallet de Saint-Aurin describieron que la causa de grandes pérdidas en criaderos de lubina era debida a numerosas partículas virales de muy pequeño tamaño que detectaron en las neuronas de los peces afectados.

La lubina pertenece a la familia Serranidae, orden de los Perciformes. Se trata de un pez alargado, poco comprimido y más esbelto que la mayoría de los serránidos. Las dos aletas dorsales están separadas: la primera tiene todos los radios (8-10) duros y la segunda un sólo radio duro y de 11 a 14 radios blandos. La cola es moderadamente ahorquillada y la cabeza presenta una gran boca terminal con la parte superior del maxilar visible. El preopérculo está finamente serrado y el opérculo muestra dos únicas espinas planas. Las escamas no son excesivamente grandes y su número oscila entre 52 y 74 en la línea lateral. El color de la lubina es verdoso o grisáceo en el dorso y plateado en el vientre, los individuos jóvenes presentan a veces manchas negras que desaparecen con la edad. Pueden

alcanzar, e incluso superar, el metro de longitud y los 10 kg de peso. De distribución somera la lubina se puede encontrar sobre todo tipo de fondos, de joven es de carácter gregario y forma bancos, sin embargo los adultos se vuelven más solitarios aunque de vez en cuando se reúnen para atacar bancos de pequeños peces. Se trata de una especie eurihalina que soporta bien los cambios de salinidad y que es relativamente común en lagunas litorales o cerca de la desembocadura de los ríos (Corbera *et al.*, 2000).

La producción total de lubina en Europa y la cuenca del Mediterráneo durante el año 2005 ascendió a 84017 toneladas siendo Grecia, Turquía, Italia, España y Francia los principales países productores.

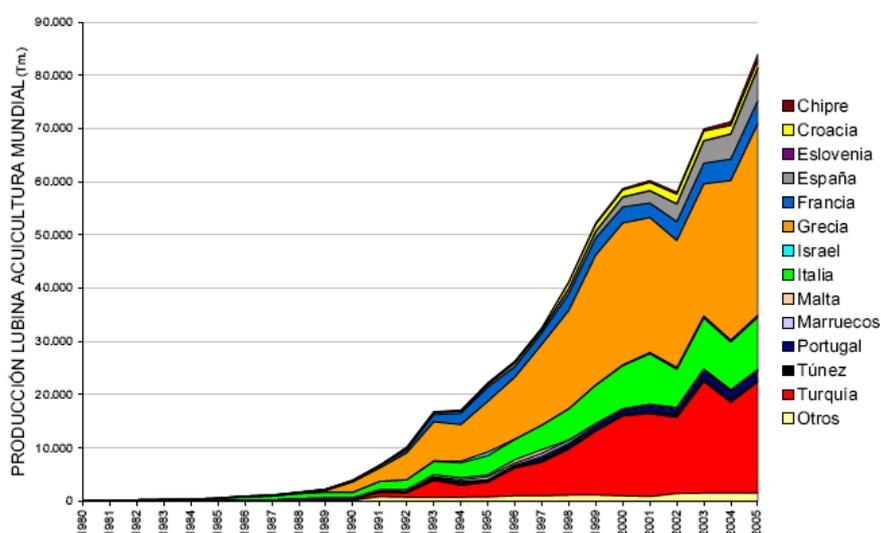


Figura 1: Evolución de la producción acuícola de lubina en el mundo para el período 1980-2005 (FAO+FEAP).

A pesar de que se continúa descargando en los puertos pesqueros lubina procedente de la pesca extractiva ésta tan sólo se corresponde con el 15% del volumen total obtenido en relación al 85% procedente de la lubina de crianza.

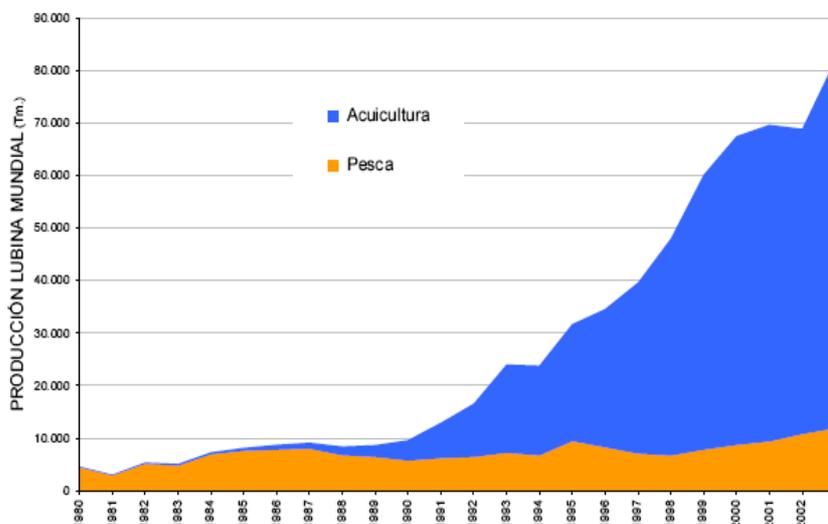
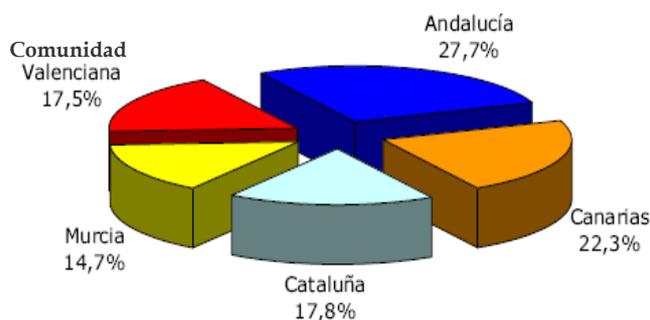


Figura 2: Evolución de las fuentes de obtención de lubina en el mundo para el período 1980-2003 (FAO).

España es el tercer país consumidor de pescado del mundo con 35 kg de pescado/persona/año por detrás tan sólo de Japón (45 kg/persona/año) y Noruega (40 kg/persona/año). A pesar de que España es un país que cuenta con casi 8000 Km de costa, la pesca extractiva se encuentra en su nivel máximo de explotación, como ya fue comentado anteriormente, de tal forma que la acuicultura cobra especial relevancia; así, la producción de pescados marinos de crianza en España ascendió en el año 2005 a 26250 toneladas.

En lo que referente a la lubina, sigue llegando a los puertos pesqueros españoles lubina procedente de la pesca extractiva pero la de crianza supone ya más del 91% del total. Andalucía es la principal comunidad autónoma productora con un 27.8% seguida por Canarias (22.3%), Cataluña (17.8%), Comunidad Valenciana (17.5%) y Murcia (14.7%).



Este gran desarrollo de la acuicultura ha incrementado la preocupación del sector productivo por las enfermedades infecciosas y la manera de combatirlas, sobre todo cuando éstas provocan pérdidas económicas importantes. Aunque, en el caso de los peces, existen vacunas que actualmente se están aplicando con éxito sobre todo en relación a patógenos bacterianos, todavía son muchas las enfermedades para las que no se cuenta con vacunas; esta limitación para tener vacunas eficaces se debe en gran medida a la falta de información sobre los mecanismos de defensa que se ponen en marcha en el hospedador para hacer frente a estas infecciones.

En este sentido, la acuicultura podría beneficiarse enormemente de los recientes avances en biología molecular y biotecnología, ya que las herramientas disponibles en estos sectores apuntan una interesante aplicación en la diagnosis de enfermedades, en el diseño de nuevas vacunas o en la resistencia a enfermedades de las especies cultivadas. Además, el conocimiento adquirido en los peces se puede emplear no sólo para mejorar la producción en la acuicultura, sino que también puede ser aplicable a otras disciplinas.

Es importante señalar que en los últimos años los recursos genómicos disponibles en peces han crecido espectacularmente pero, en el caso de especies con interés comercial, sólo se ha generado suficiente información en los salmónidos.

Las tecnologías de genómica funcional que se aplican en este momento se pueden clasificar en análisis de ESTs y análisis transcriptómico (microarrays), que normalmente se desarrollan en paralelo a estudios funcionales detallados de expresión génica y biología celular en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Hasta hace poco el análisis del perfil de expresión de múltiples genes se aplicaba casi en exclusiva a los seres humanos y a unos pocos organismos modelos. Actualmente, existen algunos microarrays de cDNA y de oligonucleótidos para diversas especies animales incluyendo algunos peces teleósteos. Considerando la variedad de especies en cultivo y la gran cantidad de modelos experimentales, sería interesante desarrollar proyectos de secuenciación de ESTs específicas y de genomas de especies de peces de interés comercial, favoreciendo así el desarrollo de nuevos microarrays.

La presente tesis doctoral se enmarcó dentro de un proyecto europeo (Welfare and health in sustainable aquaculture, WEALTH) que tenía como objetivo reducir las

condiciones de estrés de los peces con la finalidad de obtener un mejor rendimiento en el campo de la acuicultura. En este sentido, el principal objetivo que nos planteamos fue la realización de una hibridación sustractiva en lubina infectada con nodavirus, enfermedad que provoca grandes pérdidas económicas en la industria de la acuicultura, con el objetivo de analizar los genes que estaban potencialmente implicados en la defensa del organismo frente a esta enfermedad.

2. SISTEMA INMUNE DE PECES TELEÓSTEOS.

La respuesta inmunitaria implica el reconocimiento del patógeno o material extraño seguido del desarrollo de una respuesta para eliminarlo (Male y Roitt, 1996). Los peces teleósteos son, en términos evolutivos, el grupo animal más primitivo con un sistema inmune completo. Presentan mecanismos de defensa inespecíficos y específicos similares a los de mamíferos.

A pesar de que estos animales están en íntimo contacto con su ambiente, en el cual generalmente conviven elevadas cantidades de microorganismos, en condiciones normales el pez se mantiene en buen estado de salud, defendiéndose contra estos potenciales invasores mediante un complejo sistema de mecanismos de defensa.

Estos mecanismos de defensa pueden dividirse en dos tipos: inespecíficos o innatos y específicos o adaptativos. Aunque lo habitual a la hora de describir el sistema inmune es hacer esta “división” cada vez hay más evidencias, tanto en peces como en mamíferos, de que ambos mecanismos se complementan para mantener un máximo nivel de inmunocompetencia por parte del hospedador. Generalmente, la respuesta inmune innata precede a la adaptativa, activando y determinando la naturaleza de esta última y cooperando en el mantenimiento de la homeostasis (Fearon y Locksley, 1996; Fearon, 1997; Lo *et al.*, 1999; Medzhitov y Janeway, 2000; Dixon y Stet, 2001).

Los mecanismos de defensa **inespecíficos** engloban aquellos que se desencadenan sin necesidad de un contacto previo con el agente invasor, dando una respuesta rápida frente a una amplia variedad de estímulos (Bayne y Gerwick, 2001; Bayne *et al.*, 2001; Ellis, 2001; Rauch *et al.*, 2006). La inmunidad innata se caracteriza por presentar una serie de receptores de reconocimiento de patrones codificados en la línea germinal que reconocen dos tipos de

patrones moleculares (Magnadóttir, 2006): los asociados a patógenos (PAMPs) como las glicoproteínas y lipopolisacáridos (LPS) de bacterias y hongos, el ADN bacteriano, el ARN viral y otras moléculas que no se encuentran normalmente en la superficie de los organismos multicelulares (Janeway, 1989; Medzhitov y Janeway, 1998, 2002; Elward y Gasque, 2003) y, por otro lado, los patrones moleculares del propio hospedador, que son el resultado del daño tisular debido a la infección o trauma, cambios necróticos o muerte celular programada natural, pero que no se expresan normalmente en la superficie celular (Matzinger, 1998).

Los mecanismos de defensa **específicos** sólo se encuentran en los vertebrados y se desatan frente a un estímulo concreto con el que el hospedador ha tenido contacto anteriormente. Esta respuesta, que mejora con el encuentro sucesivo con el mismo patógeno, es altamente específica para cada patógeno particular, de tal manera que el reconocimiento de epítomos antigénicos es prácticamente ilimitado (Du Pasquier, 2001). Así, las dos características más importantes de la respuesta inmunitaria adaptativa son la especificidad y la memoria (Male y Roitt, 1996).

2.1. Mecanismos de defensa inespecíficos

Los mecanismos de defensa inespecíficos en los peces constituyen su primera línea de defensa y es la única que presentan los invertebrados, de ahí su importancia en la protección de estos organismos. Estos mecanismos están constituidos por **barreras físicas, factores humorales y células del sistema inmune innato**.

Las **barreras físicas** están integradas por las escamas, las superficies mucosas de piel, las branquias, el tracto gastrointestinal y la epidermis (Ingram, 1980; Shephard, 1994; Ellis, 2001). Estos mecanismos dificultan la entrada de los distintos agentes patógenos al interior del pez, constituyendo una barrera física y química importante entre el pez y el medio externo. El mucus de los peces, producido en función del grado de infección y estrés, posee gran diversidad de moléculas entre las que destacan la lisozima, enzimas proteolíticas, proteína C-reactiva, proteínas del complemento, péptidos antimicrobianos e incluso los conocidos como “anticuerpos naturales” (Hjelmeland *et al.*, 1983; Braun *et al.*, 1990; Alexander e Ingram, 1992; Rombout *et al.*, 1993; Aranishi y Nakane, 1997; Rombout y Joosten, 1998; Fast *et al.*, 2002; Grabowski *et al.*, 2004; Delamare-Deboutteville *et al.*, 2006).

Entre los **factores humorales** se encuentran las sustancias solubles presentes en los fluidos internos del pez, y las moléculas expresadas como receptores en la superficie de las células del sistema inmune. Según su actividad o los patrones moleculares que reconocen, los factores humorales inespecíficos pueden clasificarse en:

1. Inhibidores del crecimiento: actúan eliminando nutrientes esenciales para el microorganismo o interfiriendo en su metabolismo. El hierro, por ejemplo, es un elemento esencial para el metabolismo bacteriano sin embargo, su disponibilidad en los tejidos de los vertebrados es extremadamente baja, ya que es secuestrado por una proteína sanguínea de gran afinidad por este elemento denominada transferrina (Yano, 1996; Langston *et al.*, 1998, 2001; Bayne y Gerwick, 2001; Bayne *et al.*, 2001; Ellis, 2001), que es también un importante activador de macrófagos (Stafford *et al.*, 2001; Stafford y Belosevic, 2003). Además, se ha demostrado que fragmentos proteolíticos de la transferrina, aunque no la proteína completa, son capaces de inducir la producción de óxido nítrico (NO), que es también un potente agente bactericida, en cultivos de macrófagos de *goldfish* estimulados con LPS (Stafford *et al.*, 2001). También están involucradas en el secuestro del hierro proteínas como la hepcidina, la haptoglobina, la hemopexina y la intelectina. La hepcidina ha sido caracterizada recientemente en lubina (Rodrigues *et al.*, 2006). Su regulación positiva en un estudio reciente con truchas infectadas con *Vibrio anguillarum*, ha sugerido la importancia de las proteínas de la respuesta de fase aguda en la respuesta inmune de truchas frente a la bacterina de *V. anguillarum* (Gerwick *et al.*, 2007). Por otro lado, el interferón es también un inhibidor del crecimiento (viral en este caso) al inducir la expresión de proteínas antivirales.
2. Inhibidores de proteasas: muchas bacterias producen enzimas proteolíticas (proteasas) que digieren los tejidos del hospedador para ser aprovechados como fuente de aminoácidos. Por su parte, los peces generan inhibidores de estas enzimas o toxinas producidas por el agente patógeno, que restringen la capacidad de las bacterias para invadir y crecer en los tejidos del pez (Hjelmeland, 1983; Alexander e Ingram, 1992; Dabrowski y Cieroszko, 1994; Bowden *et al.*, 1997; Aranishi, 1999; Armstrong y Quigley, 1999; Ellis, 1999). Las más estudiadas son α 1-anti-proteasa, la α 2-anti-plasmina y la α 2-macroglobulina (Armstrong y Quigley, 1999; Bayne y Gerwick, 2001; Funkenstein *et al.*, 2005; Huttenhuis *et al.*, 2006). En carpa (*Cyprinus Carpio*) se ha purificado y caracterizado la α 1-anti-proteasa

(Aranishi, 1999) y en la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idellus*) se ha purificado y caracterizado la α 2-macroglobulina (Li y Lu, 2006).

3. Lectinas (aglutininas y precipitinas): las bacterias pueden adherirse al mucus y a las células epiteliales de su pez hospedador a través de unos carbohidratos de superficie llamados adhesinas (Wang y Leung, 2000). Las lectinas tienen capacidad de adherirse a estos carbohidratos, impidiendo así su unión a las células epiteliales del pez y favoreciendo la opsonización, fagocitosis y activación del complemento (Arason, 1996). Se han identificado lectinas en huevos, mucus y suero de muchas especies de peces y, en los últimos años, la investigación se ha centrado en dilucidar el papel que juegan en la defensa innata de diferentes especies de peces, sobre todo frente a bacterias (Ottinger *et al.*, 1999; Vasta *et al.*, 2004a; Endo *et al.*, 2006). En salmón Atlántico se han secuenciado y estudiado la expresión de tres receptores de lectinas de tipo C (Soanes *et al.*, 2004) y se ha identificado en suero una lectina de unión a patógenos (Ewart *et al.*, 1999). En dorada y en lubina estriada (*Morone saxatilis*) se han aislado y caracterizado lectinas tipo F (Cammarata *et al.*, 2007; Odom y Vasta, 2006). En carpa se han purificado y caracterizado dos homólogos de la lectina de unión a manosa (MBP) (Nakao *et al.*, 2006). En la cobia (*Rachycentron canadum*), el principal pez cultivado en Taiwan, se ha clonado y caracterizado una lectina específica de manosa, con actividad bactericida y mitogénica (Ngai y Ng, 2007) y, por último, también se ha caracterizado la estructura primaria de una lectina del mucus del epitelio de la anguila japonesa (Tasumi *et al.*, 2002). La proteína C-reactiva (CRP) y la proteína amiloide del suero (SAP) son pentraxinas que pertenecen también a este grupo de las lectinas. Participan en la activación de la vía del complemento (Jiang *et al.*, 1991; De Haas *et al.*, 2000) y en el reconocimiento y eliminación de células apoptóticas (Nauta *et al.*, 2003). Algunas especies de peces parecen tener la CRP, como el bacalao y el pez gato y otras la SAP, como el salmón, el fletán o el pez lobo, mientras que otras especies como la platija y la trucha, parecen presentar al igual que los mamíferos, ambas proteínas (White *et al.*, 1981; Lund y Olafsen, 1998).
4. Complemento: es un sistema que comprende unas 35 proteínas plasmáticas que sintetizadas como precursores y una vez activadas, participan en la destrucción de los patógenos, principalmente bacterias. Los productos resultantes de su activación

son capaces de provocar la lisis de los patógenos celulares o de atraer células del sistema fagocítico al lugar donde se encuentran dichos patógenos. En los peces, el complemento se encuentra principalmente en el suero, pudiendo estar presente también en las secreciones del mucus (Yano, 1996). El interés de los investigadores por su evolución, la regulación de los genes que codifican estas proteínas (sobre todo el C3), su activación por cualquiera de las tres vías (alternativa, clásica o de las lectinas) y su ontogenia, ha aumentado mucho en los últimos años (Sunyer y Lambris, 1998; Sunyer *et al.*, 1998; Sunyer *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Boshra *et al.*, 2006; Endo *et al.*, 2006; Løvoll *et al.*, 2006; Nonaka y Kimura, 2006; Overturf y LaPatra, 2006; Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2007). Así, en trucha arcoiris se han secuenciado y realizado estudios de expresión de los factores del complemento C4 y moléculas tipo C1 (Boshra *et al.*, 2004), de la anafilatoxinas C3a (Rotllant *et al.*, 2004) y del receptor de la misma (Boshra *et al.*, 2005).

5. Péptidos antimicrobianos: son péptidos de bajo peso molecular que tienen propiedades bactericidas frente a diferentes patógenos. Se considera que juegan un papel clave en la defensa del hospedador frente a la infección (Jia *et al.*, 2000; Silphaduang *et al.*, 2006). Actualmente se han aislado varios péptidos de diferentes especies, entre los cuales se encuentran las pleurocidinas (Mason *et al.*, 2006), las piscidinas (Noga y Silphaduang, 2003), las catelicidinas (Chang *et al.*, 2005, 2006), las moléculas tipo defensina (Zou *et al.*, 2007) y otros (Smith *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004a). En trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) se han secuenciado y realizado estudios de expresión de diversos genes de péptidos antimicrobianos (Zhang *et al.*, 2004a; Chang *et al.*, 2005, 2006; Zou *et al.*, 2007).
6. Enzimas líticas (lisinas): actúan sólo o en cascada y son importantes elementos de defensa, sobre todo contra bacterias. Dentro de este grupo se encuadran hidrolasas, como la lisozima y la quitinasa; catepsinas; la vía lítica del complemento y otras enzimas hemolíticas y bacteriolíticas (Alexander e Ingram, 1992). La cuantificación de la lisozima es un parámetro muy importante de defensa inmune tanto en vertebrados como en invertebrados. En los peces está presente en muchos tejidos y secreciones, especialmente en aquellos más expuestos a la entrada de patógenos, como las superficies mucosas de piel, las branquias y el tracto gastrointestinal (Fletcher y White, 1973, Fänge *et al.*, 1976; Grinde *et al.*, 1988; Grinde, 1989; Lie *et al.*, 1989). La lisozima lisa la capa de peptidoglucano presente

en la pared celular bacteriana, hidrolizando el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina. Murray y Fletcher (1976), mediante estudios histoquímicos, detectaron la lisozima en monocitos y neutrófilos de la platija, por lo cual se han propuesto como las células productoras de esta enzima. Aunque se asoció inicialmente con la defensa frente a bacterias Gram positivas, las Gram negativas pueden ser también lisadas por esta enzima.

7. “Anticuerpos naturales”: aunque los anticuerpos (inmunoglobulinas) son un parámetro de la inmunidad adquirida como se verá más adelante, los “anticuerpos naturales” son también componentes del sistema inmune innato (Magnadóttir, 2006). Se producen en la ausencia de reorganizaciones génicas y sin aparente estimulación específica de antígeno. En mamíferos, estos anticuerpos son polireactivos y muestran baja afinidad por varios epítomos propios, como los ácidos nucleicos, la miosina, la tiroglobulina y las proteínas de *heat shock*. Sin embargo, presentan afinidad por patrones moleculares no propios como el LPS y productos parasitarios y virales (Avrameas y Ternyck, 1995; Casali y Schettino, 1996; Lacroix-Desmazes *et al.*, 1998; Bohn, 1999; Pashov *et al.*, 2002). La función principal de estas sustancias es el mantenimiento de la homeostasis, la eliminación de células apoptóticas (no producidas en base a una respuesta inmune) y la defensa frente a tumores (Meyorach *et al.*, 1998; Chow *et al.*, 1999; Boes, 2000). Los anticuerpos naturales son un fenómeno bien conocido en peces y se ha demostrado que juegan un papel importante en la inmunidad innata y adquirida, así como en la defensa frente a bacterias y virus (Vilain *et al.*, 1984; Gonzalez *et al.*, 1988, 1989; Magnadóttir *et al.*, 1999, 2001, 2002; Sinyakov *et al.*, 2002).
8. Citoquinas: son moléculas que conforman una red que controla y coordina las respuestas de la inmunidad innata y adquirida. Su importancia es tal que le hemos dedicado un subapartado dentro de este apartado del sistema inmune.

Este listado incluye los parámetros humorales más representativos y está en cambio constante a medida que avanzan los estudios inmunológicos en peces. Además no se descarta que se añadan nuevas proteínas y péptidos a esta lista, no sólo debido a que se descubren nuevas moléculas implicadas (péptidos antibacterianos, antivirales o antifúngicos), sino también a que se describen cada vez más moléculas, cuyo funcionamiento está relacionado directa o indirectamente con la respuesta inmune (fosfolipasas y perforinas, por ejemplo)

(Bayne *et al.*, 2001).

Las **células del sistema inmune innato** realizan dos tipos de actividades de defensa de forma inespecífica: la fagocitosis y las reacciones de citotoxicidad. Las células responsables de la fagocitosis (internalización y destrucción de agentes patógenos o partículas extrañas) en los peces, son las células pertenecientes a la serie monocito-macrófago y los granulocitos (Frøystad *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2001), que se conocen como células fagocíticas “profesionales”. Además, estas células, desempeñan una función esencial como células accesorias en la iniciación y regulación de la respuesta inmunitaria específica (Suzuki y Lida, 1992; Lamas y Ellis, 1994). Se trata de células que son capaces de fagocitar agentes infecciosos sin necesidad de un contacto previo con los mismos, aunque se ha observado una mayor actividad fagocítica en macrófagos procedentes de peces inmunes, probablemente debido a la opsonización (Van Muiswinkel, 1995). Estudios recientes han sugerido por primera vez en peces teleósteos, que ambos tipos celulares juegan diferentes papeles en el reconocimiento y eliminación de patógenos y en la regulación de la respuesta adaptativa (Sepulcre *et al.*, 2007). Por otro lado, las células encargadas de la citotoxicidad son las células citotóxicas no específicas (NCC) (Evans *et al.*, 2001). También participan en la defensa innata las células epiteliales y las dendríticas (Press *et al.*, 1994; Dalmo *et al.*, 1996; Ganassin y Bols, 1996).

La fagocitosis se inicia con el contacto partícula-fagocito que puede darse por colisión al azar o activamente mediante quimiotaxis, a continuación, la partícula es interiorizada gracias a la emisión de pseudópodos por parte de la célula formándose las vesículas de endocitosis. Posteriormente, ocurre la formación de fagolisosomas por fusión de las vesículas de endocitosis con los lisosomas y por último, la muerte y digestión intracelular de la partícula interiorizada (Esteban y Meseguer, 1994). El proceso de fagocitosis lleva asociado la producción de radicales intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs) en un proceso caracterizado por el consumo rápido de oxígeno que se conoce como estallido respiratorio y la producción de óxido nítrico (NO) y otros intermediarios de nitrógeno reactivos (RNI) como los peroxinitritos, que constituyen un potente agente bactericida (Secombes, 1996). Durante el estallido respiratorio, el oxígeno es reducido a anión superóxido (O_2^-) mediante la acción de la NADPH oxidasa. Una parte del O_2^- se disocia en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), bien espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (SOD) (Abbas *et al.*, 1995), y en radical hidroxilo (OH^\cdot). La producción de los radicales libres de oxígeno ha sido considerada una importante vía bactericida dentro de los

fagocitos de mamíferos (Babior, 1988). En peces la importancia de estos mecanismos aerobios está ampliamente reconocida (Chung y Secombes, 1988; Roszell y Anderson, 1993; Sharp y Secombes, 1993; Leiro *et al.*, 2000; Ortuño *et al.*, 2000; Tafalla y Novoa, 2001; Srinivasa Rao *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2002).

La producción de NO suele iniciarse tras la activación de los macrófagos por LPS bacterianos o por citoquinas pro-inflamatorias como el interferón gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o las interleuquinas (IL) (Nathan, 1992). El NO se genera por oxidación de la arginina en una reacción catalizada por la forma inducible de la enzima sintasa de NO (iNOS) (Hibbs *et al.*, 1987). En algunos casos también se ha detectado producción de NO por parte de macrófagos no estimulados a través de la sintasa constitutiva de NO (cNOS) (Miles *et al.*, 1998). La producción de NO en peces se ha inducido a través del tratamiento de macrófagos con LPS sólo o en combinación con el factor activador de macrófagos (MAF), de acuerdo con los requerimientos de cada especie (Neumann *et al.*, 1995; Yin *et al.*, 1997; Mulero y Meseguer, 1998). En el caso del rodaballo (*Scophthalmus maximus* o *Psetta máxima*), estudios realizados por Tafalla y Novoa (2000) mostraron que una combinación de LPS con el TNF- α recombinante humano (hrTNF- α) da lugar a un aumento significativo en la producción de NO. Diversos estudios han demostrado que el NO es una molécula altamente tóxica capaz de causar la inhibición del crecimiento de virus (Tafalla *et al.*, 1999; Tafalla *et al.*, 2001a) y de bacterias patógenas para peces (Akaike *et al.*, 1998, Campos-Pérez *et al.*, 2000).

Otro mecanismo inespecífico de defensa celular es la citotoxicidad natural celular. En peces, los trabajos realizados por Evans *et al.* desde los años 80 han demostrado que los tipos celulares que participan fundamentalmente en la citotoxicidad celular, son las células citotóxicas no específicas (NCC), que comparten muchas propiedades con las células *natural killer* (NK) de mamíferos. En estos últimos, la citotoxicidad celular es llevada a cabo por linfocitos T activados, granulocitos, células de la serie monocito-macrófago y células NK (Herberman y Ortaldo, 1981; Evans y Jaso-Friedmann, 1992; Mulero *et al.*, 1994). En peces, de la misma forma que en mamíferos, diferentes tipos celulares parecen estar además implicados en la citotoxicidad innata. En carpa (*Cyprinus carpio*) y en dorada (*Sparus aurata*), se ha observado que células tipo linfocitos, monocito-macrófagos y granulocitos tienen actividad citotóxica inespecífica frente a líneas celulares tumorales (Meseguer *et al.*, 1994; Kurata *et al.*, 1995; Cuesta *et al.*, 1999). En tilapia (*Tilapia mossambica* y *Tilapia honorum*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y dorada se ha demostrado citotoxicidad celular

mediada por macrófagos (Faisal *et al.*, 1989). En rodaballo se comprobó también la capacidad citotóxica de leucocitos aislados de riñón anterior y sangre frente a células RTG-2 de trucha (Tafalla *et al.*, 2001b). Al igual que en mamíferos, en peces teleósteos se ha demostrado que las principales vías utilizadas por estas células son la exocitosis granular (Kaur *et al.*, 2004; Praveen *et al.*, 2004) y las mediadas por la superfamilia del TNF (Praveen *et al.*, 2006).

2.2. Mecanismos de defensa específicos

Los peces como los mamíferos, poseen mecanismos de defensa específicos tanto humorales como celulares. Dentro de los **mecanismos humorales de defensa específica**, el más destacado es la producción de anticuerpos. Al igual que otros parámetros humorales, los anticuerpos están presentes en los fluidos internos del pez y en todas las superficies mucosas, vía de entrada de la mayoría de los microorganismos y partículas no propias (Davidson *et al.*, 1993, 1997). Están capacitados para reaccionar con las adhesinas bacterianas, dificultando así su entrada en el hospedador y pueden neutralizar muchas toxinas producidas por los patógenos (Gudmundsdóttir y Magnadóttir, 1997). Tienen capacidad de bloquear la invasión de patógenos que han desarrollado mecanismos evasivos de los sistemas de defensa del hospedador, al ser capaces de invadir células no fagocíticas (Ellis, 1999). Además los anticuerpos adheridos a la pared bacteriana pueden activar la vía clásica del complemento (Ellis, 1999).

La producción de anticuerpos en peces ocurre de una forma análoga a la descrita en mamíferos (Kaatari, 1992). Sin embargo, en los peces el aumento del título de anticuerpos tras un segundo contacto con el antígeno, se debe estrictamente a la expansión del *pool* de linfocitos B precursores de memoria, pero no a un aumento de la capacidad de los linfocitos B para producir anticuerpos de alta afinidad (IgG), tal y como sucede en los mamíferos.

Estudios moleculares y bioquímicos indicaron inicialmente que los peces presentaban principalmente anticuerpos del isotipo IgM, con propiedades físico-químicas y de organización de gen semejantes a las IgM de mamíferos (Wilson y Warr, 1992). Sin embargo, en teleósteos, aparte de las IgM (Warr, 1995) se han descrito también las IgD y recientemente los nuevos isotipos IgZ de pez cebra, IgT de trucha y una quimera IgM-IgZ de carpa.

Los **mecanismos celulares de defensa específica**, al igual que en mamíferos, están representados por poblaciones de linfocitos denominados T y B. La exposición a un antígeno conlleva la estimulación de un pequeño grupo de estos linfocitos que reconocen dicho antígeno mediante receptores específicos. Este reconocimiento provoca un cambio en esta población linfocitaria, de tal manera que en los sucesivos encuentros con el antígeno la respuesta es mayor y más rápida. En los peces, los linfocitos constituyen la población mayoritaria de leucocitos siendo los principales órganos linfoides el timo, el órgano epigonal, el riñón anterior y el bazo (Fänge, 1982).

Los linfocitos B son los responsables de la secreción de anticuerpos y se localizan preferentemente en los tejidos linfoides de bazo y riñón, a pesar de que también están presentes en la sangre, el intestino y el corazón (Davidson *et al.*, 1993). Se definen, al igual que en mamíferos, como linfocitos que expresan Ig de superficie (Ig+) y secretan anticuerpos específicos en respuesta a un estímulo antigénico (Arkoosh y Kaatari, 1991). Los linfocitos B requieren, en respuesta a los antígenos timodependientes (TD), la interacción de los linfocitos T y de los macrófagos, mientras que en respuesta a los antígenos timoindependientes (TI) solamente requieren la cooperación de los macrófagos (Vallejo *et al.*, 1992). Si bien la función fagocitaria ha sido siempre atribuida a las células fagocíticas “profesionales”, monocito-macrófagos y granulocitos (neutrófilos), estudios recientes han demostrado que las células B de los peces teleósteos presentan actividad fagocítica tanto *in vivo* como *in vitro*, llevando a la formación de fagolisosomas y a la digestión de las partículas ingeridas. Estos resultados indican la participación de las células B en la inmunidad innata de estos animales primitivos y, apoyan la idea de la evolución a partir de un tipo celular fagocítico ancestral. Además, proporcionan un marco evolutivo para entender la estrecha relación entre los linfocitos B de peces y los macrófagos de mamíferos (Li *et al.*, 2006).

Los linfocitos T son los responsables de la muerte celular y de la regulación de la actividad de otras células inmunocompetentes mediante la secreción de citoquinas. Se ha demostrado que los linfocitos T de peces presentan características semejantes a las detectadas en mamíferos, tales como la proliferación en respuesta a la estimulación por mitógenos celulares T, como son la fitohemaglutinina (PHA) y la concavalina A (ConA) (Clem *et al.*, 1985).

2.3. Citoquinas

Existen evidencias de que en peces, al igual que en mamíferos, existe una red de citoquinas y quimioquinas que influyen en la respuesta inmune innata y adquirida. Pero además estas moléculas regulan muchos otros procesos biológicos importantes como son el crecimiento y la activación celular, la inflamación, la reparación tisular, la fibrosis y la morfogénesis.

Se trata de proteínas, generalmente glicoproteínas, de bajo peso molecular (15-25 kDa) secretadas por células del sistema inmune (macrófagos y linfocitos T, fundamentalmente) en respuesta a patógenos, a sus productos u otras señales relacionadas y que actúan a unas concentraciones muy bajas sobre células del propio sistema inmune, de forma autocrina (reconociendo un receptor en la membrana de la propia célula que la secretó) o paracrina (actuando sobre otra célula distinta a la secretora, pero sin necesidad de un transporte de largo recorrido) (Hamblin, 1993, Goldsby *et al.*, 2004). A pesar de ser un grupo de proteínas heterogéneo desde el punto de vista químico, las citoquinas comparten propiedades comunes. Tienen una vida media muy corta y muestran los atributos de pleiotropía (regulan distintas funciones), redundancia, sinergia, antagonismo e inducción en cascada (Goldsby *et al.*, 2004). La clonación molecular de varias citoquinas en diferentes grupos animales ha permitido su utilización directa como inmunoestimulantes y adyuvantes de vacunas en sanidad humana y animal (Lin *et al.*, 1995; Lowenthal *et al.*, 1999). Además, la caracterización de los genes que codifican dichas citoquinas, permite desarrollar tratamientos efectivos para mejorar la resistencia de las especies de uso agroalimentario, tanto frente a enfermedades infecciosas como a estrés abiótico.

La actividad de las citoquinas se reconoció por primera vez a mediados de la década de 1960, cuando se encontró que sobrenadantes derivados de cultivos *in vitro* de linfocitos tenían factores que podían regular la proliferación, diferenciación y maduración de células alogénicas del sistema inmunitario (Goldsby *et al.*, 2004).

En peces, la investigación sobre estas moléculas se ha centrado en las interleuquinas (ILs), los factores de necrosis tumoral (TNFs), los interferones (IFNs), los factores transformadores de crecimiento (TGFs), los factores inhibidores de la migración (MIFs), los factores estimuladores de colonias (CSFs) y las quimioquinas.

Las **interleuquinas (ILs)** engloban a un grupo de citoquinas con efectos sobre los leucocitos. La IL-1 fue una de las primeras citoquinas descritas (Dinarello, 1994a) y también una de las más estudiadas en peces (Bird *et al.*, 2002; Huising *et al.*, 2004; Kaiser *et al.*, 2004; Scapigliati *et al.*, 2004; Subramaniam *et al.*, 2004). Esta proteína inicia o aumenta la expresión de una gran cantidad de genes no estructurales, particularmente otras citoquinas, que se expresan de forma característica durante la inflamación (Dinarello, 1994a; Bird *et al.*, 2002) y además, participa en la proliferación y maduración de muchos tipos celulares inmunes (Dinarello, 1997). Este grupo de citoquinas ha sido ampliamente estudiado en peces, así, en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), se han secuenciado y realizado estudios de expresión de la IL-1 β , la IL-6, la IL-11 y la IL-18 (Koussounadis *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Benedetti *et al.*, 2006; Iliev *et al.*, 2007; Roca *et al.*, 2007). En dorada (*Sparus aurata*), se ha estudiado la IL-1 o sus receptores (Pelegri *et al.*, 2001; Lopez-Castejon *et al.*, 2007; Roca *et al.*, 2007) y se ha visto que sustancias como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) incrementan la expresión de esta proteína (Pelegri *et al.*, 2001). En lubina (*Dicentrarchus labrax*), se han caracterizado interleuquinas implicadas en la inflamación como la IL-1, IL-10 y la IL-12 (Benedetti *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2007), cabe destacar el trabajo realizado con la IL-1 ya que no sólo se ha clonado y caracterizado sino que se ha estudiado su actividad biológica, llegándose incluso a proponer como un posible inmunomodulador o adyuvante para ser aplicado en acuicultura (Buonocore *et al.*, 2004, 2005). En carpa (*Cyprinus carpio*) se han identificado dos formas parálogas de la IL-11 (Huising *et al.*, 2005). En la platija japonesa (*Paralichthys olivaceous*) se ha clonado y caracterizado la IL-6 (Nam *et al.*, 2007).

Los **factores de necrosis tumoral (TNFs)** tienen importantes efectos pleiotrópicos incluyendo inflamación, apoptosis, proliferación celular y estimulación del sistema inmune. Estas citoquinas tan sólo han sido aisladas en mamíferos y peces. Mientras que en mamíferos hay dos formas (TNF- α y TNF- β), en peces parece que sólo existe una forma, que es similar en estructura y organización genómica al TNF- α de mamíferos. Esta proteína es sintetizada por diferentes tipos celulares (incluyendo monocitos-macrófagos, linfocitos, células NK, astrocitos y células de la microglia) bajo estimulación con endotoxinas, mediadores de la inflamación o citoquinas como la IL-1 y, de manera autocrina, bajo estimulación con el propio TNF- α (Camussi *et al.*, 1991). El TNF- α desempeña varias actividades terapéuticas, que incluyen inmunoestimulación, resistencia a agentes infecciosos, resistencia a tumores (Aggarwal y Vilcek, 1991; Vilcek y Lee, 1991), regulación del sueño (Krueger *et al.*, 1998) y desarrollo embrionario (Wride y Sanders, 1995). Sin embargo, el principal papel del TNF-

α parece ser como mediador en la resistencia frente a infecciones parasitarias, bacterianas y virales (Czarniecki, 1993; Goldfeld y Tsai, 1996; Steinshamn *et al.*, 1996). Roca *et al.* (2007) han secuenciado y realizado estudios de expresión del TNF- α de trucha arcoiris y también se han llevado a cabo estudios funcionales en rodaballo con la proteína recombinante del TNF- α (Ordás *et al.*, 2007). En dorada se ha descrito que el TNF- α se expresa de forma constitutiva en distintos órganos del pez pero, a diferencia de mamíferos, su expresión no parece aumentar después de un tratamiento con sustancias como el LPS (García-Castillo *et al.*, 2002). Sin embargo, presenta funciones pro-inflamatorias y proliferativas cuando se administra *in vivo*, sugiriendo un papel similar al descrito en mamíferos (García-Castillo *et al.*, 2004). También existen evidencias de otros papeles de esta molécula no directamente inmunes, como son la regulación del tejido graso en esta especie (Saera-Vila *et al.*, 2007).

Tanto las ILs como los TNFs forman parte de una cascada en la que son liberadas otras muchas citoquinas, que sirven como potentes atrayentes para inducir la migración de neutrófilos y macrófagos al sitio de la infección (Secombes *et al.*, 2001).

Los **interferones (IFNs)** son citoquinas que inducen un estado antiviral en las células y juegan un papel fundamental en la defensa frente a infecciones virales en vertebrados (Robertsen, 2006). En la actualidad, no existen medidas terapéuticas eficaces para combatir las enfermedades virales de los peces de interés en acuicultura, por eso una gran cantidad de estudios han sido dirigidos a conocer el mecanismo de actuación de los IFNs en peces. La actividad del IFN es conocida en peces desde 1965 (Gravell y Malsberger, 1965) y, desde entonces, se ha detectado en células y órganos de numerosas especies, tras una infección viral o un tratamiento con ARN de doble cadena (dsARN); sin embargo, los primeros trabajos sobre genes de IFN clonados de peces no se publicaron hasta el año 2003 (Robertsen, 2006). Existen dos familias de IFNs (tipo I y tipo II) que se distinguen por su secuencia nucleotídica, su estructura proteica y sus propiedades funcionales (Kontsek *et al.*, 2003; Pestka *et al.*, 2004). Los IFNs de tipo I incluyen los IFNs α y β , que son inducidos por virus en la mayoría de las células, mientras que el IFN tipo II consta del IFN- γ y es producido por las células NK y los linfocitos T en respuesta a IL-12, IL-18, mitógenos o antígenos (Secombes *et al.*, 1996; Vilcek y Sen, 1996).

Los IFNs de tipo I: en peces se han encontrado al menos dos genes que codifican para el IFN tipo I. No se han clasificado como IFN α y β debido a que en mamíferos los IFNs α y

β parece que se han originado por duplicación a partir de un progenitor, después de la divergencia de las aves hace 250 millones de años (Roberts *et al.*, 1998). Los IFNs de tipo I son inducidos en las células en respuesta a los productos intermediarios (dsARN) de la replicación viral (Jacobs y Langland, 1996; Goodbourn *et al.*, 2000). Una vez en el torrente circulatorio se unen al receptor de IFN α/β presente en todas las células nucleadas (Biron y Sen, 2001) y desencadenan a través de la vía JAK-STAT la transcripción de cientos de genes, algunos de los cuales codifican proteínas antivirales. Tal es el caso de la proteína quinasa R dependiente de dsARN (PKR), la 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS), la adenosina deaminasa específica de ARN (ADAR) y la proteína Mx (Meurs *et al.*, 1990, Koromilas *et al.*, 1992; Zürcher *et al.*, 1992; Thimme *et al.*, 1995; Secombes *et al.*, 1996; Leong *et al.*, 1998; Boudinot *et al.*, 2001; Ellis, 2001). Además del dsARN, la transcripción de IFN puede ser inducida por otros ácidos nucleicos virales (ssARN y motivos CpG de ADN bacteriano y viral) y poly I:C, que son reconocidos por los *Toll Like receptors* (TLRs) (Alexopoulou *et al.*, 2001; Diebold *et al.*, 2004; Heil *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004; Tabeta *et al.*, 2004). Aunque se sabe todavía muy poco sobre el sistema de señal del IFN en peces, la identificación de varios factores reguladores de IFN (IRFs), receptores de IFN, TLRs, diferentes miembros de la vía JAK-STAT y proteínas inducidas por el IFN tipo I (sobre todo las proteínas Mx), sugiere que este mecanismo está muy bien conservado en peces y mamíferos. Dentro de las proteínas de este tipo estudiadas en peces son de destacar los trabajos realizados en trucha arco iris y salmón Atlántico; en trucha arcoiris se han caracterizado dos TLRs (Rebl *et al.*, 2007), factores reguladores de IFN (IRFs) (Collet *et al.*, 2003) y proteínas Mx (Trobridge y Leong, 1995; Trobridge *et al.*, 1997a; Collet *et al.*, 2007); en salmón Atlántico se ha clonado, secuenciado y estudiado la expresión y actividad biológica de genes de IFN tipo I y proteínas inducidas por éste (Robertsen *et al.*, 1997; Robertsen *et al.*, 2003; McBeath *et al.*, 2007). En dorada se han caracterizado genes inducidos por el interferón como son la proteína Mx o el factor regulador de interferón 1 (IRF-1) (Tafalla *et al.*, 2004; Ordás *et al.*, 2006) y se ha comprobado que las infecciones virales son capaces de inducir la expresión de estos factores, poniendo en evidencia su posible papel en la respuesta frente a las mismas. En rodaballo se han caracterizado al igual que en dorada, genes inducidos por interferón, como la proteína Mx y el IRF-1 (Abollo *et al.*, 2005; Ordás *et al.*, 2006). En lenguado se ha caracterizado el gen de la proteína Mx, posiblemente implicada en la respuesta frente a virus (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2006). Otras especies de peces donde se han caracterizado las proteínas Mx fueron el pez gato (Plant y Thune, 2004), la platija japonesa (Lee *et al.*, 2000), el fletán (Jensen y Robertsen, 2000), el pez cebra (Altmann *et al.*, 2004), el *goldfish* (Zhang *et al.*, 2004b), etc. Por último, en fugu

se han identificado IRFs (Richardson *et al.*, 2001) y en pez cebra y *goldfish* se caracterizaron algunos genes de la vía JAK-STAT (Oates *et al.*, 1999; Zhang y Gui, 2004).

Los IFNs de tipo II (IFN- γ): son producidos exclusivamente por células del sistema inmune, actúan en etapas más tardías de esta respuesta inmune (Schroder *et al.*, 2004) y juegan un papel fundamental en la inmunidad adaptativa mediada por células (Biron y Sen, 2001). El IFN- γ se une a un receptor distinto del que utilizan los IFNs de tipo I y también es diferente la vía de señales, aunque se solapa con la JAK-STAT (Boehm *et al.*, 1997; Boudinot *et al.*, 2001). De forma similar a los IFNs de tipo I, el IFN- γ puede proteger a las células de infecciones virales, al inducir la expresión de las proteínas antivirales PKR, 2-5A sintetasa y ADAR (Boehm *et al.*, 1997). Es además, a diferencia del IFN- α/β , un activador clave de macrófagos, al aumentar su capacidad microbicida frente a bacterias, protozoos y virus (Graham y Secombes 1990; MacMicking *et al.*, 1997; Biron y Sen, 2001; Shtrichman y Samuel, 2001; MacMicking, 2004; Schroder *et al.*, 2004). Además, promueve la presentación de antígenos al aumentar la expresión de los complejos MHC I y II (Boehm *et al.*, 1997). Tiene también un amplio rango de propiedades inmunomodulatorias, al incrementar la expresión de varios factores de transcripción y citoquinas (Farber, 1997). Finalmente, el IFN- γ dirige el crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares, así como potencia la actividad de las células NK y regula las funciones de las células B (Biron, 1994; Schroder *et al.*, 2004). En salmón Atlántico y pez gato se han identificado secuencias similares a las del IFN- γ (Robertsen, 2006; Milev-Milovanovic *et al.*, 2006) pero a pesar de ello existen muy pocos estudios funcionales con el IFN- γ en peces, trabajos previos han demostrado la producción de un factor activador de macrófagos (MAF) con actividad de IFN- γ en trucha capaz de estimular funciones de los macrófagos, pero este activador puede tener otras funciones reguladoras del sistema inmune (Secombes, 1992). La actividad MAF se caracteriza por causar un aumento significativo del estallido respiratorio, de la fagocitosis, de la actividad bactericida y de la emisión de pseudópodos por parte de los macrófagos. Esta actividad se ha conseguido en sobrenadantes de leucocitos estimulados con concanavalina A (ConA) y, principalmente, con una combinación de ConA con el éster de forbol (PMA) (Duchiron *et al.*, 2002a, 2002b; Sarmiento *et al.*, 2004). Además, se han clonado en peces teleósteos la proteína NOS2, subunidades de la oxidasa fagocítica, la proteína de unión a guanilato (principal efector antiviral del IFN- γ en mamíferos) (Robertsen *et al.*, 2006) y diversas quimioquinas inducidas por IFN- γ , entre las que destacan las identificadas en trucha, una CXC del tipo CXCL8 (Laing *et al.*, 2002a) y otra con homología

del subgrupo CXCL9, CXCL10, CXCL11, de la cual parecen existir dos formas y que es inducida en infecciones virales (Laing *et al.*, 2002b; O'Farrell *et al.*, 2002).

Los **factores transformadores del crecimiento (TGFs)** se subdividen en los TGF- β *sensu stricto*, las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) y las activinas, aunque todas ellas parecen compartir características comunes en sus mecanismos de transducción de señales (Heldin *et al.*, 1997). Los TGF- β s constituyen una subfamilia de moléculas relacionadas y codificadas por genes diferentes, a los que en vertebrados superiores se denomina TGF- β -1-5, con una alta homología en la secuencia de aminoácidos. Los miembros de esta subfamilia son proteínas multifuncionales y pleiotrópicas, que están implicadas en el desarrollo, reparación y remodelado de tejidos y hematopoyesis. Incrementan la producción y secreción de las proteínas de matriz extracelular (ECMs) e inhibidores de proteasas. Además, juegan numerosos papeles en la función y desarrollo del sistema inmune, mostrando generalmente actividades inmunosupresoras y antiinflamatorias (Williams *et al.*, 1996). El TGF- β -1 es una proteína producida tanto por las células T activadas por antígeno, como por los fagocitos mononucleares activados por LPS. Tiene un claro efecto regulador supresor como el resto de los miembros de la subfamilia, ya que su función inmunitaria principal es inhibir la proliferación de células T y la activación de macrófagos. A pesar de que hay muy pocos estudios en peces y otros vertebrados inferiores, los datos recogidos hasta la fecha apuntan a que los TGFs son las citoquinas más ancestrales caracterizadas a nivel molecular, que tienen actividad tanto en protóstomos como en deuteróstomos (Herpin *et al.*, 2004). Unas de las pocas especies de peces donde ha sido caracterizado este gen fue en trucha arcoiris (Hardie *et al.*, 1998) y más recientemente en dorada (Tafalla *et al.*, 2003).

Los **factores inhibidores de la migración (MIF)**. Mediante la estimulación de leucocitos de carpa con ConA se produjo un sobrenadante con un efecto supresor sobre la migración de leucocitos de riñón anterior (Secombes, 1992). Además, en la anguila (*Anguilla japonica*) se ha demostrado que sobrenadantes de leucocitos de bazo, riñón o sangre estimulados con mitógenos, inhiben la migración de células de peritoneo de cerdo (Song *et al.*, 1989).

Los **factores estimuladores de colonias (CSFs)** incluyen el CSF de macrófagos (M-CSF), el CSF de granulocitos (G-CSF), el CSF de granulocito-macrófagos (GM-CSF) y el CSF "multi", mejor conocido como IL-3 o multi-CSF. Se trata de factores pleiotrópicos con

una gran variedad de funciones biológicas en diferentes tejidos y células, que actúan en una red muy bien orquestada con otras citoquinas. Presentan además una gran redundancia, al ser capaces de ejercer funciones similares y solapantes en células específicas (Reddy *et al.*, 2000). En general, median la supervivencia, proliferación, diferenciación y modulación funcional (quimiotaxis, degranulación, activación, adhesión, citotoxicidad, cambios fenotípicos del ARNm), de varias poblaciones de células sanguíneas maduras y de sus precursores (Horiguchi *et al.*, 1987; Rappolee y Werb, 1992; Bociek y Armitage, 1996; Alexander, 1998). Su papel dentro del sistema inmune es vital, al mantener la competencia inmune a través de la conservación del número adecuado de células sanguíneas. En particular regulan el desarrollo de las células mieloides, desde sus progenitores hematopoyéticos hasta las células efectoras maduras del sistema inmune (Barreda *et al.*, 2004). En el pez cebra se han identificado secuencias del receptor del factor estimulador de colonias de macrófagos (Parichy *et al.*, 2000).

Las **quimioquinas** son una familia multifuncional de citoquinas que induce la migración celular al lugar de la infección o lesión. Las quimioquinas se dividen funcionalmente en dos categorías: por un lado, las que se secretan constitutivamente, son homeostáticas y están implicadas entre otras funciones en el tráfico de linfocitos (Fernandez y Lolis, 2002) y por otro lado, las que son producidas durante una infección o como consecuencia de un proceso inflamatorio, dirigiendo la migración de linfocitos al lugar de la infección o lesión. Estas últimas pueden además activar las células del sistema inmune y comenzar el proceso de reparación de heridas (Laing y Secombes, 2004). Las quimioquinas se dividen en 4 subfamilias en función de su estructura molecular: CXC (α), CC (β), C (γ) y CX₃C (δ) (Murphy *et al.*, 2000). Las quimioquinas CXC a su vez se subdividen en función de si poseen o no el dominio ELR. Las ELR⁺ promueven en términos generales la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales y la consiguiente migración al sitio de la inflamación, a través de un gradiente de quimioquinas asociadas a proteínas de superficie y matriz celular (Strieter *et al.*, 1995). Las ELR⁻ atraen linfocitos y monocitos y presentan escasa atracción por los neutrófilos (Oppenheim *et al.*, 2000). Aunque las actividades dentro de este grupo son muy variables, la mayoría son angiostáticas (inhiben el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos) y poseen propiedades anti-angiogénicas (impiden la formación de nuevos vasos sanguíneos). Las quimioquinas CC atraen fundamentalmente células mononucleadas, bien para mediar en procesos homeostáticos o en procesos pro-inflamatorios. Las quimioquinas C atraen a linfocitos, pero no a monocitos o a neutrófilos (Kelner *et al.*, 1994). Las quimioquinas CX₃C tienen, en su forma soluble, una actividad de

atracción muy potente hacia células T y monocitos y en su forma unida a membrana, promueve la adhesión a estos leucocitos (Bazan *et al.*, 1997). La mayor parte de la información disponible sobre quimioquinas procede de estudios en mamíferos (como la anteriormente descrita), aunque el interés por estas proteínas ha crecido también en peces en los últimos años. Como consecuencia se han descrito algunas secuencias con alta homología a las quimioquinas de mamíferos y/o aves, así, la primera quimioquina descrita en peces se corresponde con una CXC de lamprea, que codifica un péptido del tipo CXCL8 de mamíferos (Najakshin *et al.*, 1999), más adelante se caracterizaron quimioquinas en otras especies de peces. En carpa se ha clonado una quimioquina CXC similar al subgrupo CXCL9, CXCL10 y CXCL11 (Savan *et al.*, 2003) y otra de tipo CC similar a C4-CC y un receptor para quimioquinas CXC (Fujiki *et al.*, 1999). En platija japonesa se han secuenciado las quimioquinas CXC del tipo CXCL8 (Lee *et al.*, 2001) y dos quimioquinas CC, la C6-CC (Nam *et al.*, 2003) y C4-CC (Kono y Sakai, 2001) con una alta homología con la CCL11 de mamíferos. En pez cebra se han identificado dos quimioquinas, una CXC similar a la CXCL14 de mamíferos (Long *et al.*, 2000) y otra del tipo CXCL12 (David *et al.*, 2002). A pesar de todas estas caracterizaciones no existen todavía estudios funcionales.

3. NODAVIRUS.

Durante las últimas dos décadas se ha descrito con alarmante frecuencia una condición neuropatológica de carácter infeccioso en cultivos marinos de peces, que se ha ido extendiendo cada vez a mayor número de zonas geográficas, llegando a todos los continentes con la excepción de África, y que representa una seria amenaza económica para la industria de la acuicultura (Munday *et al.*, 2002). Recientemente, esta patología, ha aparecido también en peces de agua dulce, concretamente en *guppy*, *Poecilia reticulata*, (Hedge *et al.*, 2003) y en esturión, *Acipenser gueldestaedi*, (Athanasopoulou *et al.*, 2004).

Esta enfermedad, conocida como necrosis nerviosa viral (*viral nervous necrosis*, VNN) o encefalopatía y retinopatía viral (*viral encephalopathy and retinopathy*, VER), se caracteriza, como su segundo nombre indica, por el desarrollo de encefalopatías y retinopatías vacuolizantes detectadas mediante histología y asociadas a nataciones erráticas que desembocan en mortalidades muy elevadas (alcanzando el 100% en multitud de ocasiones), fundamentalmente en estadios larvarios y juveniles de las especies afectadas.

Los primeros informes sobre la existencia de síntomas de encefalopatía vacuolizante describen brotes que causaron cuantiosas pérdidas en criaderos de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) cultivada en Martinica (Caribe) (Bellance y Gallet de Saint-Aurin, 1988). Se detectaron numerosas partículas virales de muy pequeño tamaño en el citoplasma de las neuronas que se identificaron como los agentes causantes de las mortalidades y se denominaron “virus de la encefalopatía de la lubina”. Poco después se describió la “necrosis nerviosa viral” (*viral nervous necrosis*; VNN) en larvas y juveniles cultivados del pez loro japonés (*Oplegnathus fasciatus*) (Yoshikoshi e Inoue, 1990). Y, desde entonces, se han descrito condiciones clínicas similares en multitud de especies de peces marinos, tanto salvajes como cultivadas (bacalao del Atlántico, cherna de ley, corvinata blanca, cortinón ocelado, eglefino, falso halibut del Japón, fletán del Atlántico, jurel dentón, lenguado, mero amarillo, mero carcelario, mero de pintas naranjas, mero de pintas rojas, mero lutria, pardete, perca gigante, rodaballo, solla roja, ...) mostrando una amplia distribución geográfica, de manera que esta enfermedad fue apareciendo en Asia (Yoshikoshi e Inoue, 1990; Mori *et al.*, 1992; Chi *et al.*, 1997; Azad *et al.*, 2005), Europa (Comps *et al.*, 1994; Grotmol *et al.*, 1995; Le Breton *et al.*, 1997; Bovo *et al.*, 1999; Starkey *et al.*, 2000; 2001), Australia (Glazebrook *et al.*, 1990; Munday y Nakai, 1997) y Norteamérica (Curtis *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2002).

Muy recientemente los nodavirus fueron también detectados en invertebrados marinos aparentemente sanos de la península de Korea proponiéndose que esta infección subclínica podría constituir una fuente de inóculo para la infección por betanodavirus causando mortalidades en cultivos de peces en esta región (Gomez *et al.*, 2008).

3.1. Características.

Se trata de virus esféricos, no envueltos y de unos 25-30 nm de tamaño que se encuentran, fundamentalmente, en el citoplasma de las neuronas y en los espacios extracelulares adyacentes de los peces afectados por la enfermedad, distribuyéndose en disposición paracristalina o en forma de paquetes envueltos en estructuras membranosas.

El genoma de estos virus consta de dos fragmentos de ARN monocatenario con pesos moleculares y tamaños de 1.056×10^6 Da y 3 kb (ARN 1) y 0.495×10^6 Da y 1.4 kb (ARN 2). Ambos fragmentos carecen de estructura poly(A) en el extremo 3'. El ARN 1 codifica para una proteína no estructural de 100 kDa mientras que el ARN 2 codifica para un

polipéptido estructural de 42 kDa precursor de la proteína de la cápside (Nishizawa *et al.*, 1994, 1995). Durante la replicación del ARN a partir del ARN 1 se sintetiza un ARN 3 subgenómico, de 0.4 kb, que codifica pequeñas proteínas (Delsert *et al.*, 1997; Iwamoto *et al.*, 2001).

En base a su forma, tamaño y organización genómica, estos virus se clasificaron como pertenecientes a la familia Nodaviridae (Mori *et al.*, 1992). Hasta ese momento la familia Nodaviridae estaba compuesta por un solo género, *Nodavirus*, donde estaban incluidos el nodamura virus (NOV), black beetle virus (BBV), floch house virus (FHV) y boolarra virus (BOV), todos ellos aislados de insectos (Francki *et al.*, 1991). A pesar de la alta similitud entre los nodavirus aislados de peces y los aislados de insectos en sus propiedades físicas y en la organización de su genoma, la similitud en la secuencia del fragmento de ARN 2 es muy baja entre ambos grupos (Nishizawa *et al.*, 1995), ya que los nodavirus aislados de peces poseen una región altamente conservada de 134 aminoácidos que no se encuentra en la proteína de la cápside de los aislados de insectos (Kaesberg *et al.*, 1990); además el proceso de síntesis de la cápside difiere entre ambos grupos. Todo esto confiere a los nodavirus aislados de peces unas características especiales que obligaron a agruparlos dentro de un nuevo género, *Betanodavirus*, perteneciente a la familia Nodaviridae (Delsert *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2002). Recientemente se describió un nuevo miembro de esta familia de virus, el *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, que presenta características de la familia Nodaviridae (forma icosaédrica, tamaño de 27 nm de diámetro, genoma compuesto por dos fragmentos de ARN monocatenario de 2.9 y 1.3 kb y proteína de la cápside de 43 kDa) pero presenta diferencias con los miembros de los géneros *Alphanodavirus* y *Betanodavirus* (Bonami *et al.*, 2005) con lo que no se puede incluir en ninguno de los dos; este patógeno es el primer representante de la familia Nodaviridae aislado de invertebrados acuáticos.

En la secuencia de la proteína de la cápside se identificó una región altamente conservada (134 aa) y una región variable (81 aa) con una identidad de secuencia aminoacídica del 93 y 62%, respectivamente (Nishizawa *et al.*, 1995). Atendiendo a diferencias existentes en la región variable del gen que codifica la proteína de la cápside (ARN 2) entre las distintas cepas de nodavirus aisladas de peces, estos nodavirus fueron clasificados en cuatro genotipos (Nishizawa *et al.*, 1997): SJNNV (*striped jack nervous necrosis virus*), TPNNV (*tiger puffer nervous necrosis virus*), BFNNV (*barfin flounder nervous necrosis virus*) y RGNNV (*redspotted grouper nervous necrosis virus*). Se cree que la divergencia entre estos cuatro grandes grupos tuvo lugar hace unos 110-160 años mientras

que las pequeñas divergencias existentes entre las cepas de nodavirus pertenecientes a un mismo grupo habrían ocurrido durante los últimos 20 años (Nishizawa *et al.*, 1997). Además estos cuatro grupos difieren en el rango óptimo de temperatura para producir la infección al hospedador, como será comentado con más detalle. Recientemente, Johansen *et al.* (2004) han propuesto un quinto genotipo dentro de los Betanodavirus, el TNV (*turbot nodavirus*).

Mediante un análisis filogenético, basado en la secuencia nucleotídica de la proteína de la cápside de nodavirus aislados de peces cultivados procedentes de diversas áreas geográficas, se determinó que una misma línea evolutiva contenía aislados de distintas regiones y a su vez distintas líneas evolutivas de nodavirus se encontraban cohabitando en una misma región (Skiris *et al.*, 2001). En este estudio se vio que el genotipo RGNNV incluía cepas de nodavirus aisladas de peces afectados por la enfermedad en España, Portugal, Malta, Italia, Francia, Tailandia, Singapur y Japón. Este patrón evolutivo contrasta con el de otros patógenos virales de peces como pueden ser: el virus causante de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) (Benmansour *et al.*, 1997) o el virus causante de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) (Nichol *et al.*, 1995), en los que se observa una correlación entre la filogenia de los virus y el área geográfica donde éstos fueron aislados.

3.2. Sintomatología.

Las mortalidades causadas por esta infección viral aparecen tanto en el estadio larvario como en el juvenil y adulto aunque son más elevadas durante el estadio larvario pudiendo alcanzar, durante este período, el 100% del stock.

Los principales síntomas de esta enfermedad son el comportamiento anormal de los peces afectados manifestándose en forma de pérdida de equilibrio, desorientación al nadar e inapetencia y presentando, además, la vejiga natatoria extremadamente hinchada.

Tanto en el caso de los juveniles como en el de adultos, la enfermedad puede presentarse de forma subaguda con mortalidades variables, que van desde ligeras a pronunciadas; algunos individuos nadan con la cabeza fuera del agua con movimiento rápido rectilíneo o circular golpeándose contra la pared del tanque, otros se dejan transportar por la corriente presentando momentos de hiperactividad seguidos por otros de una inmovilidad absoluta y los restantes muestran movimientos veloces en espiral. En la tabla 1 se recogen

los síntomas clínicos más comunes en algunas de las especies en las que se ha detectado esta enfermedad viral.

Tabla 1: Síntomas clínicos más comunes (O.I.E, 1997).

Especie	Síntomas clínicos
<i>Lates calcarifer</i>	Natación rápida no coordinada Palidez Anorexia Extenuación
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Torneo Vejiga natatoria muy hinchada Anorexia
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Natación en espiral Color oscuro
<i>Epinephelus akaara</i>	Torneo
<i>Pseudocaranx dentex</i>	Natación anormal Vejiga natatoria muy hinchada
<i>Scophthalmus maximus</i>	Natación en espiral Descanso "panza arriba"

3.3. Origen y transmisión de la enfermedad.

El origen de esta enfermedad podrían ser las poblaciones de peces en estado natural de las que se obtienen los reproductores a partir de los que se inicia el cultivo ya que se ha detectado la enfermedad en peces procedentes de la pesca (Barker *et al.*, 2002). No se sabe si estas poblaciones naturales son susceptibles o si tan sólo actúan como portadores aparentemente sanos de estos virus.

Los riesgos de infección recíproca entre peces salvajes y cultivados dependen de los mecanismos de transmisión. Se ha demostrado experimentalmente la transmisión horizontal de la necrosis nerviosa viral en multitud de ocasiones en la bibliografía indicándose aquí algunos de los ejemplos más significativos. Glazebrook *et al.* (1990) demostraron la transmisión de la enfermedad por cohabitación entre larvas enfermas y sanas de perca gigante, Arimoto *et al.* (1993) demostraron lo mismo en el caso del jurel dentón. También se demostró la transmisión de la enfermedad a larvas y juveniles de mero de manchas rojas, jurel dentón y falso halibut del Japón, al exponerlos a un baño con filtrados de homogenados

de tejidos procedentes de peces enfermos (Mori *et al.*, 1991; Arimoto *et al.*, 1993; Nguyen, *et al.*, 1994) o en juveniles de lubina al ser inyectadas intramuscularmente con homogenados de cerebro de peces infectados (Thiery *et al.*, 1997). Además se ha descrito la transmisión horizontal de la nodaviriosis de lubinas infectadas a esturiones en una granja de Grecia (Athanassopoulou *et al.*, 2004) y de juveniles de fletán del Atlántico enfermos a salmones sanos inyectándoles un filtrado de homogenados de cerebro de los primeros a los segundos por vía intraperitoneal (Korsnes *et al.*, 2005). Nguyen *et al.* (1996) describieron la replicación del virus en las células epidérmicas de larvas de dentón sugiriendo que podrían actuar a favor de la transmisión horizontal, pero el papel que juega la piel como primera vía de entrada del virus permanece todavía demasiado confusa.

La transmisión vertical de la enfermedad también se ha demostrado tanto en el jurel dentón como en la lubina (Breuil *et al.*, 1991; Arimoto *et al.*, 1992; Mushiaki *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996). Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se detectó el virus en los tejidos de ovario y consecuentemente en las larvas obtenidas de dichos reproductores.

Además se ha descrito que algunas especies de peces como la dorada pueden ser portadores asintomáticos de esta enfermedad, es decir, que contienen el virus (y, por tanto, que la pueden transmitir) pero no sufren los síntomas producidos por el mismo (Castric *et al.*, 2001).

3.4. Diagnóstico.

El diagnóstico de la nodaviriosis o encefalopatía y retinopatía vírica se puede realizar mediante la replicación del nodavirus en cultivo celular, microscopía óptica y electrónica, técnicas inmunológicas o técnicas de biología molecular.

La replicación de un virus en cultivo celular es una técnica de diagnóstico fiable y que permite la obtención de una gran cantidad de virus, facilitando así su caracterización. Hasta el momento sólo se ha conseguido la replicación de los nodavirus en la línea celular SSN-1 derivada del *stripped snakehead*, *Channa striatus*, que está persistentemente infectada con un retrovirus (Frerichs *et al.*, 1996), en la línea GF-1 derivada de la aleta del mero *Epinephelus coioides* (Hamilton) (Chi *et al.*, 1999), en la línea GB establecida a partir de células de cerebro del mero *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel) (Lai *et al.*, 2001a),

en las líneas GF y GL establecidas a partir de aleta e hígado del mero *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel) (Lai *et al.*, 2003) y en la GS derivada de bazo del mero *Epinephelus coloides* (Qin *et al.*, 2006). De las líneas citadas, tan sólo la línea SSN-1 resultó ser susceptible a todas las cepas de nodavirus aisladas por el momento (Iwamoto *et al.*, 1999). Frerichs *et al.* (1996) caracterizaron por primera vez el efecto citopático (ECP) en la línea SSN-1, producido por una cepa de nodavirus aislada de lubina, como la transformación de las células en refráctiles, redondeadas y granulares 3 días después de la infección, llegando a una completa destrucción de la monocapa celular el décimo día después de la infección. El principal inconveniente en el uso de esta línea celular es el hecho, comentado anteriormente, de que esté persistentemente infectada con un retrovirus del tipo C (SnRV) (Frerichs *et al.*, 1991; Hart *et al.*, 1996). Se intentó obtener otra línea celular a partir de una célula de esta línea que estuviera libre del retrovirus y en la que replicasen todos los genotipos de nodavirus identificados hasta el momento, pero sin éxito (Iwamoto *et al.*, 2000). Todo ello hace suponer que el retrovirus de la línea SSN-1 juega un papel importante en la replicación de los nodavirus, hipótesis que fue corroborada con las investigaciones realizadas *in vitro* por Lee *et al.* (2002) donde se demostró la influencia del retrovirus en el ciclo de vida de los nodavirus de peces.

Mediante la replicación de los virus en la línea SSN-1 se observaron diferencias en dicha replicación y en el ECP producido por los distintos aislados de nodavirus dependiendo de la temperatura de incubación (Iwamoto *et al.*, 1999). Las cepas de nodavirus pertenecientes al genotipo RGNNV replicaban bien entre los 25 °C y 30 °C, mientras que las cepas pertenecientes al genotipo SJNNV replicaban bien tanto a 20 como a 25 °C. En el caso de los nodavirus incluidos en el genotipo TPNNV replicaban bien a 20 °C y las cepas de nodavirus pertenecientes al genotipo BFNNV sólo proliferaban entre 15 y 20 °C. Todas estas diferencias en la replicación de los virus *in vitro* ponen de manifiesto la importancia de la temperatura en las infecciones naturales de nodaviriosis. Los brotes de nodaviriosis causados por los genotipos SJNNV y RGNNV ocurren principalmente entre los 24 y los 28 °C respectivamente (Arimoto *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1998), lo que sugiere que estos dos genotipos están adaptados a temperaturas cálidas. Por el contrario, los nodavirus aislados de brotes de nodaviriosis en halibut cultivado a 6-7 °C (Dannevig *et al.*, 2000) pertenecen al genotipo BFNNV, que es el que replica a las más bajas temperaturas y que, por tanto, está adaptado a ellas. Infecciones experimentales realizadas *in vitro* corroboraron estas hipótesis (Iwamoto *et al.*, 1999), en estas infecciones se demostró que una cepa de nodavirus aislada de fletán del Atlántico y perteneciente al genotipo BFNNV era capaz de infectar a larvas de

fletán del Atlántico a 6 °C pero no a larvas del jurel dentón a 20 °C y viceversa, es decir que nodavirus del genotipo SJNNV eran capaces de infectar a larvas del jurel dentón pero no a larvas de fletán del Atlántico.

Durante el examen diagnóstico de la encefalopatía y retinopatía vírica, pueden existir pocas o ninguna lesión externa, pero a nivel histológico (microscopía óptica) se detecta en los animales infectados una amplia vacuolización en todo el sistema nervioso (cerebro, retina y cordón nervioso) asociada a grandes inclusiones intracitoplasmáticas (2 a 5 µm) en las células, siendo la zona anterior del cerebro y la retina las más afectadas. En general las larvas y juveniles de las especies afectadas por la enfermedad muestran lesiones más severas que los individuos adultos. En algunos casos se ha descrito vacuolización en el intestino como respuesta fisiológica a la infección viral, pero no parece ser producida por los nodavirus (O.I.E, 1995).

La microscopía electrónica de transmisión es una metodología que confirma los hallazgos previos realizados por microscopía óptica. Mediante esta técnica se detectan partículas virales icosaédricas de 22-30 nm de diámetro fundamentalmente en el citoplasma de las neuronas y en los espacios extracelulares adyacentes. Los viriones se distribuyen en disposición paracristalina o en forma de paquetes envueltos en estructuras membranosas.

Sin embargo, ninguno de estos métodos es suficiente para detectar la infección en animales portadores, que no muestran ningún signo patológico, e incluso para detectar los casos tempranos de la enfermedad en los que no se han desarrollado todavía las lesiones. Por lo tanto, ha sido necesario poner a punto nuevas técnicas de inmunodiagnóstico como las técnicas inmunohistoquímicas (Le Breton *et al.*, 1997) pudiéndose localizar pequeños focos antigénicos aún cuando no existen lesiones aparentes. En este sentido se utilizaron la técnica de inmunofluorescencia indirecta (FAT) (Nguyen *et al.*, 1997; OIE, 1997) o la técnica del inmunoensayo ligado a una enzima (ELISA) (Arimoto *et al.*, 1992; OIE, 1997; Breuil *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2001b; Huang *et al.*, 2001).

Por último, se han desarrollado técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de la secuencia del gen responsable de la síntesis de la proteína de la cápside de los nodavirus (ARN 2) basándose en la región conservada que presentan los nodavirus aislados de peces (Nishisawa *et al.*, 1994; Dalla Valle *et al.*, 2000; Grotmol *et al.*, 2000). Más recientemente, Starkey *et al.* (2004)

desarrollaron la *nucleid acid sequence based amplification* (NASBA), reacción continua de amplificación de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas más apropiada para el ARN, basada en el uso de oligos y sondas específicas y que precisa la acción coordinada de tres enzimas: la AMV reverso transcriptasa, la RNasa H y la T7 ARN polimerasa, para la detección de nodavirus en peces; esta técnica demostró ser 100 veces más sensible que la RT-PCR convencional.

Estos últimos métodos son más fiables ya que son capaces de detectar la presencia del virus en estadios de la enfermedad en los que los antígenos virales no son detectados por los otros métodos de diagnóstico descritos.

3.5. Control.

El control de esta enfermedad es complicado ya que, como se ha comentado anteriormente, tanto su transmisión horizontal como vertical han sido demostradas. La manera más simple de evitar la enfermedad en una piscifactoría es testar todos los stocks que puedan ser importados eliminando todos los que estén infectados, pero este procedimiento, aunque reduce mucho, no descarta por completo la posibilidad de que algún pez infectado puede no ser identificado. Así que, con el fin de poder controlar (o evitar), la enfermedad una vez presente en las piscifactorías se han realizado una serie de pruebas sobre los efectos de algunos tratamientos físicos y químicos (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000) con mayor o menor éxito.

Se consiguió una total inactivación del nodavirus de lubina con un tratamiento térmico a 60 °C durante 60 minutos y una reducción en el título viral del 99.9% mediante exposición, durante 8 minutos, a radiación ultravioleta a una intensidad de 440 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Frerichs *et al.*, 2000), sin embargo, a efectos prácticos en una piscifactoría, no es conveniente usar como único método de desinfección el tratamiento del agua con radiación ultravioleta ya que ese 0.1% del título viral no inactivado puede ser suficiente para producir una infección *in vivo*.

El formol, sin embargo, resultó ineficaz para cualquiera de las concentraciones testadas tanto para el nodavirus de lubina como para el de jurel dentón (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000), al contrario de lo que ocurrió con otros virus donde sí que se detectó una actividad antiviral producida por esta sustancia (Jørgensen, 1973; Frerichs, 1990).

Los nodavirus de lubina se inactivaron completamente con una concentración de cloro de 50 ppm durante 5 minutos o de 25 ppm durante 30 minutos en ausencia de materia orgánica. Cuando la materia orgánica está presente en el medio, esta efectividad en la inactivación de los virus se reduce considerablemente necesiéndose concentraciones de 100 ppm durante 5 minutos para conseguir una reducción de sólo 2 logaritmos en el título viral. El yodo también resultó ser eficaz en la inactivación del nodavirus, pero al igual que con el cloro, su efectividad se ve disminuída en presencia de materia orgánica (Frerichs *et al.*, 2000).

Estos virus son muy resistentes a las diferentes condiciones ambientales y resultan ser muy tolerantes a los cambios en el pH manteniendo su infectividad en un rango desde pH 3 hasta pH 9 durante un periodo de 42 días aunque los de lubina se inactivan completamente a un pH de 2 o de 11 (Frerichs *et al.*, 2000) y los de jurel dentón a un pH de 12 (Arimoto *et al.*, 1996).

El ozono resultó ser un buen desinfectante para la cepa SJNNV, inactivando completamente a los nodavirus en pocos minutos (Arimoto *et al.*, 1996). El uso del ozono como método de desinfección contra los nodavirus en una piscifactoría es una buena elección no sólo por su eficacia sino también por el menor impacto ambiental que supone su uso en comparación con otros desinfectantes ya que se disocia rápidamente y, actúa como un complemento oxidativo dentro del sistema de nitrificación biológica (Honn y Chavin, 1976).

Un episodio de infección por nodavirus en una granja resulta en la liberación de grandes cantidades de virus al medio marino, y el hecho de que estos virus sean muy resistentes a las diferentes condiciones ambientales (Frerichs *et al.*, 2000), les convierte en agentes potencialmente infecciosos de otras especies.

Ya en otro sentido, se intentaron desarrollar vacunas eficientes contra el nodavirus con resultados preliminarmente positivos. Así, Tanaka *et al.* (2001) inyectaron peces intramuscularmente con la proteína recombinante de la cápside del nodavirus y consiguieron una reducción significativa de la mortalidad en infecciones experimentales del mero *Epinephelus septemfasciatus* pero los propios autores indicaron que serían necesarios más estudios para ver si esta vacuna podría ser eficaz en otras especies ya que se había sugerido diferentes especificidades entre variantes genotípicas del nodavirus. Husgarð *et al.* (2001)

desarrollaron una vacuna con la proteína T2 recombinante y los resultados que obtuvieron fueron satisfactorios para rodaballo y halibut, además los niveles de anticuerpos aumentaron con el tiempo indicando un posible efecto a largo plazo de la vacuna. Sommerset *et al.* (2003) demostraron que una vacuna producida con ADN de una glicoproteína de un rabdovirus producía protección a corto plazo contra nodavirus en rodaballo. Más recientemente, Sommerset *et al.* (2005) probaron, en juveniles de rodaballo, dos nuevas vacunas: una consistente en una proteína recombinante de la cápside del nodavirus de halibut (AHNV) y otra del fragmento de ADN de la misma región que codifica para la proteína anterior; la eficacia de la vacunación fue demostrada en el caso de los peces vacunados con la proteína recombinante pero no en el caso de los vacunados con el ADN que codifica para dicha proteína.

*Capítulo I:
Modulación de la expresión
de genes inmunes en peces.*

*Parte A: Expresión de TNF α ,
IL-1 β y Mx en dorada y
lubina infectadas con
nodavirus.*

1. INTRODUCCIÓN.

Como se explicó con más detalle en el apartado de nodavirus de la introducción general, la encefalopatía y retinopatía viral (VER), también conocida como necrosis nerviosa viral (VNN), es una enfermedad emergente causada por los *Betanodavirus*, miembros de la familia Nodaviridae que provocan elevadas mortalidades en peces marinos infectados. La enfermedad causada por estos virus se identifica por un comportamiento natatorio anormal y lesiones neurológicas, caracterizadas por una vacuolización celular y una degeneración neuronal mayoritariamente encontradas en el cerebro, la retina, la médula espinal y los ganglios linfáticos de los peces afectados. Desde su primera aparición en larvas y juveniles de lubina (*Dicentrarchus labrax*) cultivados en Martinica (Bellance y Gallet de Saint-Aurin, 1988), la enfermedad se ha extendido a muchas otras especies marinas a lo largo de todo el mundo (Nakai *et al.*, 1994; Munday y Nakai, 1997; Curtis *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2002) y, recientemente, apareció en especies de aguas dulceacuícolas (Hegde *et al.*, 2003; Athanassopoulou *et al.*, 2004).

Tanto la lubina como la dorada son especies de elevado valor económico cultivadas en el mar Mediterráneo. Inicialmente, la dorada había sido catalogada como un portador asintomático de la encefalopatía y retinopatía viral (Castric *et al.*, 2001). Sin embargo, Aranguren *et al.* (2002) demostraron que la dorada podía ser experimentalmente susceptible al nodavirus, dependiendo de la temperatura y la ruta de infección. Además, la dorada es a menudo cultivada en el Mediterráneo junto con la lubina y otras especies susceptibles, lo que hace aumentar la posibilidad de infección cruzada.

Se conoce muy poco acerca de las interacciones entre el nodavirus y el sistema inmune de los peces. Se detectaron anticuerpos contra nodavirus mediante la técnica ELISA en el suero de adultos del jurel dentón (Mushiake *et al.*, 1992), lubina (Breuil *et al.*, 2000), *barfin flounder* (Watanabe *et al.*, 2000) y perca gigante (Huang *et al.*, 2001), independientemente del sexo de los mismos o de su origen (peces salvajes o cultivados). También se han probado vacunas de forma experimental obteniendo resultados preliminarmente positivos (Husgarð *et al.*, 2001; Sommerset *et al.*, 2003, 2005) y se ha descrito el efecto de los anticuerpos neutralizantes del virus sobre su supervivencia (Tanaka *et al.*, 2001).

En mamíferos, cualquier acción inflamatoria resulta en una cascada de citoquinas donde el factor de necrosis tumoral α (TNF α) es liberado seguido de la interleuquina-1 β (IL-

1 β) y posteriormente de la IL-6. Estas citoquinas provocan la liberación de otras que actúan como potentes quimioatrayentes que inducen la migración de neutrófilos y macrófagos al sitio de la infección (Secombes *et al.*, 2001).

El TNF α es un miembro de una familia de citoquinas conocida como β -*jellyroll*. Como ya se indicó en el apartado de citoquinas de la introducción general, se trata de una proteína que es sintetizada por diferentes tipos celulares, incluyendo monocitos-macrófagos, linfocitos, células *natural killer*, astrocitos y células de la microglía del cerebro bajo una estimulación con endotoxinas, mediadores de la inflamación o citoquinas como la IL-1 y, de forma autocrina, bajo la estimulación con el propio TNF α (Camussi *et al.*, 1991). Esta proteína juega un papel relevante en varios aspectos terapéuticos como la inmunoestimulación, la resistencia a agentes infecciosos, la resistencia a tumores (Aggarwal y Vilcek, 1991; Vilcek y Lee, 1991); también participa en la regulación del sueño (Krueger *et al.*, 1998) y en el desarrollo embrionario (Wride y Sanders, 1995). Sin embargo, el papel más importante del TNF α es el de actuar como un importante mediador en la resistencia contra infecciones (Czarniecki, 1993; Goldfeld y Tsai, 1996; Steinshamn *et al.*, 1996). En este sentido, la sobre-expresión de TNF α se ha descrito en varias especies después de una estimulación con distintos agentes tales como el lipopolisacárido bacteriano (Laing *et al.*, 2001), componentes del agente patógeno *Renibacterium salmonarum* (Grayson *et al.*, 2002), PMA y Con A (Hirono *et al.*, 2000) y el protozoo *Trypanoplasma borreli* (Saeij *et al.*, 2003). Recientemente, el ADNc del TNF α de dorada (*Sparus aurata* L.) ha sido clonado por García-Castillo *et al.* (2002).

La IL-1 β fue una de las primeras citoquinas descritas (Dinarello, 1994a). Se trata de un miembro de la familia de citoquinas conocida como β -*trefoil*. Esta proteína inicia y/o incrementa una amplia variedad de funciones no estructurales asociadas a genes que se expresan de forma característica durante la inflamación, en particular otras citoquinas (Dinarello, 1994a; Bird *et al.*, 2002), además participa en la maduración y proliferación de muchos tipos celulares (Dinarello, 1997). Experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado que la IL-1- α y la IL-1 β poseen múltiples efectos biológicos que han sido bien catalogados (Dinarello, 1991, 1994b, 1997), además la IL-1 β y no IL-1- α es un potente activador de la respuesta inmune humoral (Nakae *et al.*, 2001). Se ha clonado el ADNc de la IL-1 β de dorada (*Sparus aurata* L.) y además se demostró que se sobre-expresa por la adición de LPS sugiriendo su papel en la respuesta inmune (Pelegrín *et al.*, 2001).

El sistema del interferón es uno de los más importantes mecanismos de defensa antiviral. Las proteínas Mx pertenecen a una superfamilia de GTPasas de alto peso molecular (Staeheli *et al.*, 1993; Arnheiter *et al.*, 1996) y se encuentran en un diverso número de organismos incluyendo mamíferos, aves y peces (Leong *et al.*, 1998). El verdadero mecanismo de la naturaleza antiviral de estas proteínas no se conoce todavía, sin embargo, se ha hipotetizado que las proteínas Mx previenen la replicación viral impidiendo el tráfico intracelular de las nucleocápsides virales (Haller y Kochs, 2002). La actividad antiviral de las proteínas Mx ya ha sido demostrada en ratas, ratones, gallinas y humanos (Meier *et al.*, 1990; Arnheiter *et al.*, 1996; Ko *et al.*, 2002; Haller *et al.*, 1998) y, más recientemente en salmón Atlántico (Larsen *et al.*, 2004), en falso halibut del Japón (Caipang *et al.*, 2003) y en perca gigante (Wu y Chi, 2007). Tafalla *et al.* (2004) clonaron el ADNc de la proteína Mx de dorada (*Sparus aurata* L.) y además comprobaron que la expresión de dicha proteína era constitutiva en hígado, riñón anterior, cerebro y bazo; también demostraron que se producía una sobre-expresión por la adición de Poly I:C tanto *in vitro* como *in vivo* sugiriendo su relación con la respuesta inmune del organismo frente al virus.

Así, el principal objetivo que nos propusimos cuando diseñamos los experimentos que se exponen en esta parte del capítulo I de la tesis doctoral fue estudiar si la infección experimental de lubina y dorada con nodavirus podría afectar a la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la interleuquina-1 beta (IL-1 β) y a la proteína inducida por interferón Mx. Además, se realizó una comparación de la expresión génica entre las dos especies de peces con el objetivo de encontrar alguna posible explicación a la diferente susceptibilidad a la enfermedad que presentan ambos organismos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Peces.

Las lubinas y doradas adultas de aproximadamente 100 g de peso fueron obtenidas de una piscifactoría comercial. Estos peces fueron aclimatados a las condiciones de laboratorio durante dos semanas, manteniéndolos a 20 °C y alimentándolos diariamente con pienso comercial.

2.2. Virus.

La cepa de nodavirus utilizada en los experimentos realizados en esta tesis doctoral fue la 475-9/99, aislada de lubinas enfermas en el Institute Zooprofilattico delle Venize (Italia) y enviada a nuestro laboratorio por el Dr. Bovo. El virus se propagó en la línea celular SSN-1 (Frerichs *et al.*, 1996) y la titulación se llevó a cabo también en esta línea celular, en placas de 96 pocillos, haciéndose diluciones 1:10 (3 réplicas por dilución) y calculándose la TCID₅₀ ml⁻¹ (dosis infectiva citotóxica 50%) de acuerdo con el protocolo descrito por Reed y Muench (1938).

2.3. Aislamiento de ARN y paso a ADNc.

El aislamiento de ARN a partir de células o tejidos se realizó utilizando *Trizol* (Invitrogen) y siguiéndose las instrucciones indicadas por el fabricante. Brevemente, se homogenizaron las células o tejidos con la ayuda de un *potter* en un volumen final de 1 ml de *trizol* y se le añadieron 200 μ l de cloroformo, se agitaron de forma vigorosa durante 15 segundos y se incubaron en hielo durante 5 minutos, se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el ARN, presente en esta fase, con la ayuda de 500 μ l de isopropanol frío incubándose 10 minutos a temperatura ambiente para a continuación centrifugar las muestras a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C. Por último, se realizó un lavado con etanol al 75% frío y después de dejar secar los precipitados de ARN para evaporar completamente el etanol se resuspendieron en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.1% que contenía *RNAse OUT* (0.5 u/ μ l, Invitrogen). Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Los ARNs aislados fueron tratados con *DNAsa* utilizando para ello el *Turbo DNA-free* (Ambion), en el que a las muestras se les añade *DNAsa*, al mismo tiempo que un tampón para que las condiciones de reacción sean las óptimas, y se incuban a 37 °C durante 30 minutos. A continuación se les añade el *DNase Inactivation Reagent*, para inactivar la reacción, que se deja actuar durante 2 minutos a temperatura ambiente y mezclando las muestras ocasionalmente. Se centrifuga a 10000 g durante 1.5 minutos y se recupera el sobrenadante, ARN tratado con *DNAsa*.

El paso a ADNc se realizó usando la *Superscript II Reverse Transcriptase* y el *oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer* (Invitrogen) según las instrucciones indicadas por el fabricante. 10 μ l de cada ARN (0.5 μ g/ μ l) se mezclaron con 1 μ l de *oligo (dT)* y 1 μ l de *dNTPs* (10 mM), esta mezcla se calentó a 65 °C durante 5 minutos para a continuación añadirle 4 μ l de tampón 5x, 2 μ l de DTT y 1 μ l de *RNase OUT* y se incubó de nuevo a 42 °C durante 2 minutos. A continuación se añadió 1 μ l de *Superscript II Reverse Transcriptase* y se incubó a 42 °C durante 50 minutos, por último, se inactivó la reacción calentando a 70 °C durante 15 minutos. El ADNc se guardó a -20 °C hasta su uso.

2.4. Expresión de citoquinas después de una infección con nodavirus.

El nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx fue testado después de una infección *in vivo* mediante el uso de la PCR cuantitativa (qPCR).

La expresión *in vivo* de los genes antes indicados se estudió realizando un experimento de infección intramuscular tanto en dorada como en lubina. Dieciocho peces de cada una de las especies fueron infectados con 50 μ l de nodavirus (3×10^5 TCID₅₀ ml⁻¹) y otros 18 peces fueron inoculados con 50 μ l de medio de cultivo celular (grupo control). A los 1, 3 y 7 días seis peces de cada grupo fueron sacrificados por sobredosis de anestesia (MS-222), se tomaron el cerebro y el riñón cefálico y se aisló el ARN que fue tratado con *DNAsa* y se pasó a ADNc como ya se indicó anteriormente.

Los ensayos de PCR cuantitativa se llevaron a cabo usando el *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). La amplificación del ADNc se realizó utilizando cebadores específicos diseñados con la ayuda del *Primer 3 software* (Rozen y Skaletsky, 2000) y que están recogidos en la tabla 1. Para este ensayo se llevó a cabo la mezcla de los ADNc tomados en cada punto de muestreo, haciéndose un *pool* de 6 peces.

Tabla 1: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

	F / R	DORADA	LUBINA
β -actina	Forward	TCGGTCGCCCCAGGCATC	GTGCGTGACATCAAGGAGAA
β -actina	Reverse	CTCCTTAATGTCACGATTT	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG
Factor de necrosis tumoral α	Forward	CAAGCCGAAAATTCTGGTAA	CGAGGGCAAGACTTTCTTTG
Factor de necrosis tumoral α	Reverse	TTTCTCAGCGTGGTCCTTCT	GCACTGCCTGTTCAGCTACA
Interleukina-1 β	Forward	ATGCCCAGGGGCTGGGC	CAGGACTCCGGTTTGAACAT
Interleukina-1 β	Reverse	CAGTTGCTGAAGGGAACAGAC	GTCCATTCAAAAAGGGGACAA
Proteína Mx	Forward	CTCTGCTGAGGACCCAGTTC	GGGGTCAGAAGGAGATCACA
Protein Mx	Reverse	GTGCAGCATCAACTCCTTCA	ATGATGCACCAGCTCAAGTG

0.5 μ l de cada uno de los cebadores (10 μ M) fueron mezclados con 12.5 μ l de *SYBR green PCR master mix* (Applied Biosystems) en un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- 10 minutos a 95 °C
- 40 ciclos
 - 15 segundos a 95 °C
 - 1 minuto a 60 °C

Para determinar el nivel de expresión de los genes analizados se utilizó el método comparativo CT (*2- Δ ACT method*) (Livak y Schmittgen, 2001). La expresión de los genes candidatos fue normalizada usando la β -actina como gen control. El nivel de expresión de los peces infectados se calculó dividiéndose los valores normalizados de los peces infectados entre los valores normalizados de los peces controles de forma que si el nivel de expresión es mayor que 1 significa que hay un aumento de expresión en los infectados.

2.5. Estadística.

Los datos fueron analizados estadísticamente usando la prueba de la t de Student, de manera que los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar y las diferencias entre los peces controles e infectados fueron consideradas estadísticamente significativas en aquellos casos en los que $p < 0.05$.

3. RESULTADOS.

3.1. Análisis de expresión de citoquinas en dorada.

Es de destacar el aumento en la expresión de TNF α y de IL-1 β en cerebro de doradas a 3 días post-infección, este aumento es significativo pero transitorio ya que no se observa a 7 días post-infección, y es más importante en el caso de la IL-1 β que en el del TNF α (Figura 1).

Sin embargo, en este órgano lo más destacable es el incremento tan importante que se da en la expresión de Mx alcanzándose valores de 1300 veces por encima del control a 3 días post-infección. Este aumento también es transitorio ya que disminuye a 7 días post-infección, siendo en este momento el aumento de aproximadamente 280 unidades por encima del control (Figura 1).

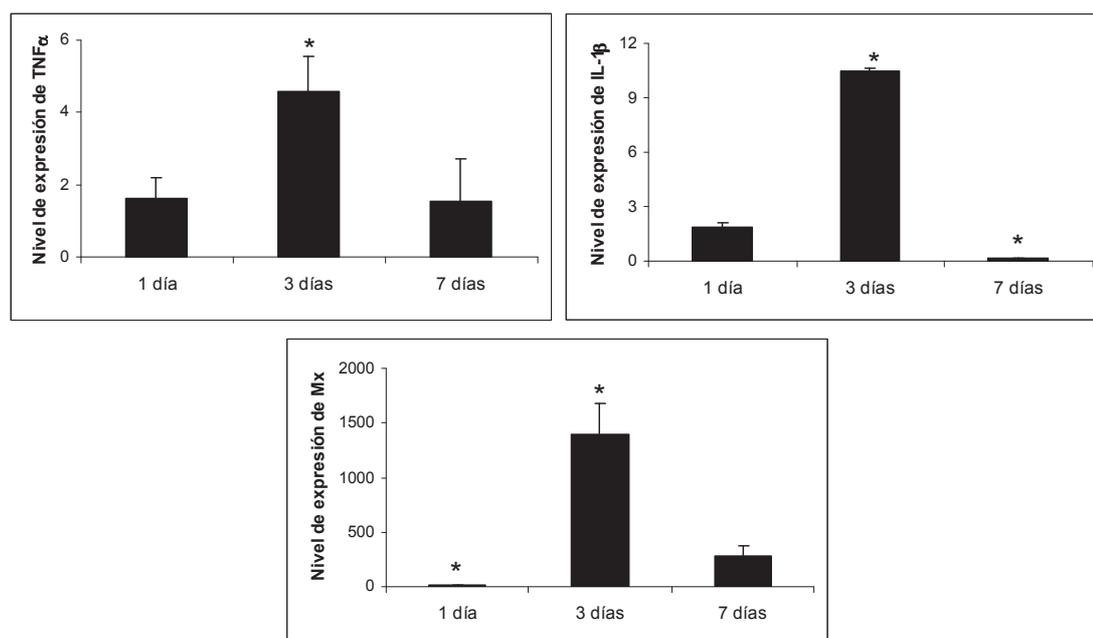


Figura 1: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en cerebros de doradas infectadas intramuscularmente con nodavirus respecto a los controles.

En lo que respecta al TNF α , se observa una sobre-expresión significativa en riñón cefálico tan sólo a 1 día post-infección, este aumento de expresión disminuye después con el tiempo observándose todavía un aumento no significativo a día 3 post-infección que ya no se observa a 7 días post-infección. En lo que respecta a la IL-1 β se observó un descenso significativo de su expresión a 3 días post-infección (Figura 2).

En el caso de este órgano también hubo un aumento en la expresión de Mx pero el pico más importante se da a 1 día post-infección y no es tan destacable como en el caso de cerebro ya que tan sólo se observa un ligero aumento con respecto al control y no de más de 1300 veces como ya se indicó en el caso del cerebro (Figura 2).

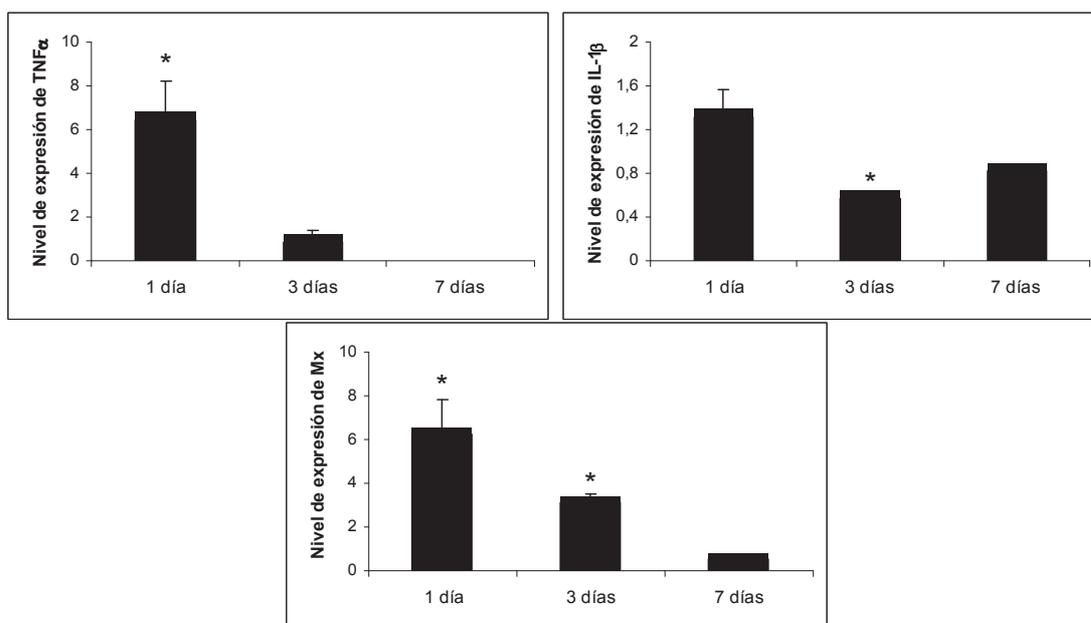
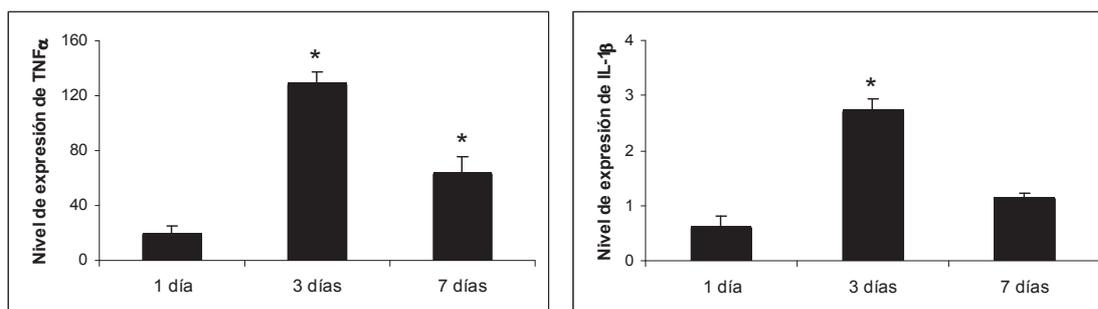


Figura 2: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en riñones de doradas infectadas intramuscularmente con nodavirus respecto a los controles.

3.2. Análisis de expresión de citoquinas en lubina.

El patrón de expresión descrito anteriormente para dorada fue muy similar al observado para cerebro y riñón cefálico infectados de lubina (Figuras 3 y 4, respectivamente). Sin embargo, la magnitud fue muy diferente principalmente en el caso de cerebro, el órgano diana de la infección, donde se observó una mayor expresión de TNF α y una menor expresión de Mx con respecto a los controles.



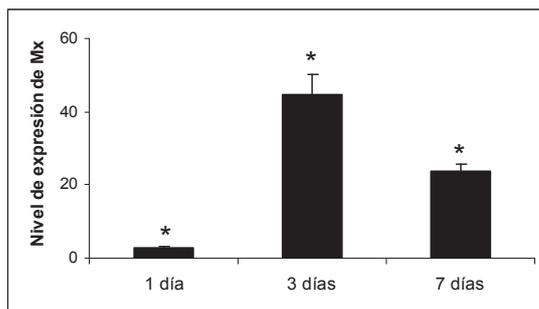


Figura 3: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en cerebros de lubinas infectadas intramuscularmente con nodavirus respecto a los controles.

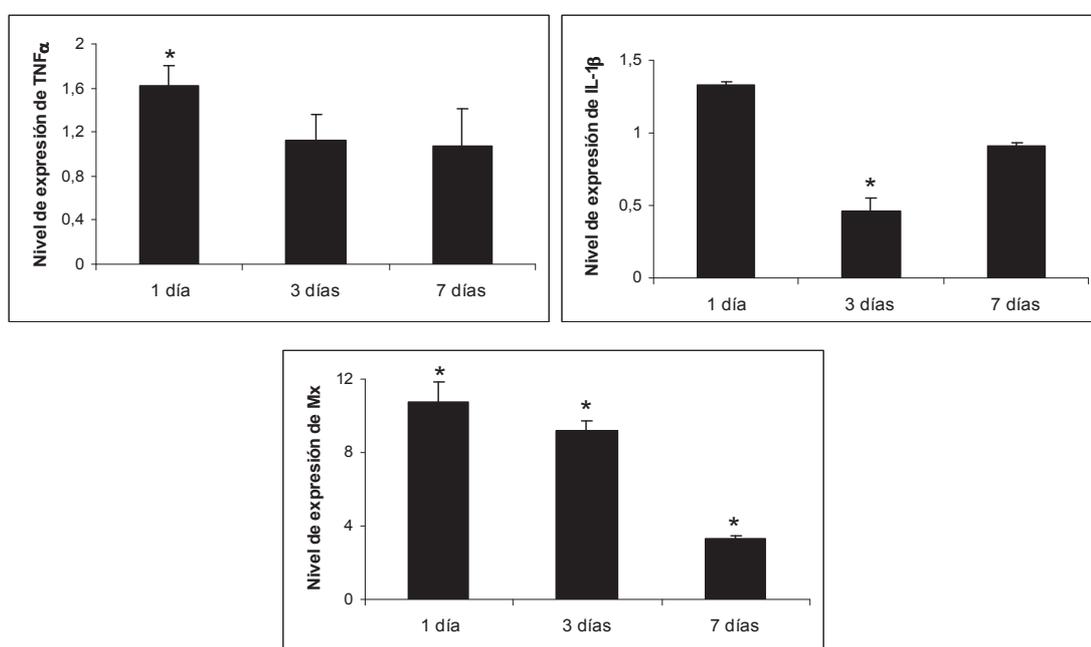


Figura 4: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en riñones de lubinas infectadas intramuscularmente con nodavirus respecto a los controles.

4. DISCUSIÓN.

El nodavirus es un importante patógeno para varias especies de peces marinos cuya incidencia ha aumentado en los últimos años, causando mortalidades fundamentalmente en larvas y juveniles debido a un proceso degenerativo en el cerebro, la retina y la médula espinal. A pesar de que muchas especies están siendo afectadas por esta enfermedad, incluyendo la dorada y la lubina (especies importantes en la acuicultura del Mediterráneo) la patogénesis y la respuesta inmune frente a la nodaviriosis no está bien caracterizada.

La inmunidad innata es la primera línea de defensa en la mayor parte de los invertebrados y también en los peces ya que, a pesar de que éstos poseen sistema inmune adaptativo, los peces son animales poiquiloterms y la respuesta inmunitaria adaptativa es dependiente de la temperatura, así que en condiciones de baja temperatura el sistema inmune innato cobra más relevancia (Cuchens y Clem, 1977; Avtalion, 1981; Clem *et al.*, 1984, 1991).

Las citoquinas proinflamatorias como las interleuquinas y los factores de necrosis tumoral que participan en la respuesta de fase aguda (APR) o los efectores moleculares involucrados en la vía antiviral del interferón como las proteínas Mx son unas de las proteínas más estudiadas.

El TNF α , entre otras funciones, es un importante mediador en la resistencia contra patógenos tanto bacterianos como virales (Aggarwal y Vilcek, 1991; Vilcek y Lee, 1991; Czarniecki, 1993; Wride y Sanders, 1995; Goldfeld y Tsai, 1996; Steinshamn *et al.*, 1996; Krueger *et al.*, 1998; Secombes *et al.*, 2001). Por otra parte, la IL-1 β juega un papel relevante en la respuesta inflamatoria como iniciador y/o incrementador de una amplia variedad funciones no estructurales asociadas a genes que se expresan durante la inflamación, particularmente otras citoquinas (Dinarello, 1994a; Bird *et al.*, 2002).

En este estudio se observó una fuerte sobre-expresión de TNF α en riñón cefálico 1 día post-infección tanto en doradas como en lubinas infectadas con nodavirus (Figuras 2 y 4, respectivamente), este aumento de la expresión no continúa a días 3 y 7 post-infección. Este resultado podría ser explicado como que el riñón cefálico es el principal órgano inmune en peces y, por lo tanto, responde haciendo frente a la infección por medio de las proteínas que participan en la respuesta de fase aguda (Dinarello, 1996; Bayne y Gerwick, 2001). En el caso de la IL-1 β , se detectó una reducción en la expresión a 3 días post-infección en las dos especies estudiadas que no se continuó observando a 7 días post-infección (Figuras 2 y 4). La regulación de estas dos citoquinas en riñón anterior en los primeros estadios de la enfermedad en ambas

especies puede ser considerado como una respuesta generalizada del organismo frente al nodavirus.

En lo que respecta al cerebro, órgano diana del virus, el nivel más elevado de expresión de TNF α e IL-1 β se observó a los 3 días post-infección tanto en dorada como en lubina (Figuras 1 y 3, respectivamente). El hecho de que el TNF α se modulara en cerebro 3 días después de producirse la infección y en riñón esto ocurriera a día 1 post-infección podría sugerir que el sistema inmune parece que se activa en cerebro cuando los nodavirus llegan a este órgano y empiezan allí la replicación, tal y como previamente ha sido descrito por Dios *et al.* (2007). Sin embargo, los valores de expresión del TNF α fueron mucho más elevados en lubina que en dorada (más de 30 veces). Es posible que la fuerte sobre-expresión de esta citoquina pro-inflamatoria en cerebro de una especie susceptible como la lubina puede ser la responsable de la vacuolización y el proceso neuroinflamatorio asociado con la enfermedad en cerebro, retina y médula espinal. En realidad, el proceso de inflamación ha sido descrito como un importante factor causante de producir un daño irreparable en cerebro en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas e infecciones microbianas que afectan al sistema nervioso (Brabers y Nottet, 2006; Kim y Joh, 2006; Lafon *et al.*, 2006; Sutton *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2006; Ghoshal *et al.*, 2007; Konsman *et al.*, 2007).

El sistema interferón es uno de los más importantes mecanismos de defensa antiviral y las proteínas Mx unos de sus efectores moleculares mejor conocidos (Meier *et al.*, 1990; Staeheli *et al.*, 1993; Arnheiter *et al.*, 1996; Robertsen *et al.*, 1997; Trobridge *et al.*, 1997b; Haller *et al.*, 1998; Jensen y Robertsen, 2000; Haller y Kochs, 2002; Ko *et al.*, 2002; Caipang *et al.*, 2003; Plant y Thune, 2004; Larsen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Wu y Chi, 2007). En el presente estudio se observó un incremento de la expresión de esta proteína tanto en cerebro como en riñón cefálico de dorada y lubina en todos los puntos de muestreo. Estos resultados corroboran la inequívoca participación de las proteínas Mx en la respuesta antiviral de lubina y dorada. Es de destacar, al igual que ocurría con el TNF α en cerebro, que, aunque los patrones de expresión son similares en ambas especies, la magnitud de dicha expresión es muy diferente; pero en este caso el mayor aumento de la expresión se da en dorada (más de 1300 veces). Esta fuerte sobre-expresión de la proteína Mx en cerebro de dorada con respecto al observado en lubina podría estar relacionado con la eficacia para hacer frente a la infección y, así, podría explicar por qué la dorada es un portador asintomático de la enfermedad.

Además, si tomamos juntos todos los resultados, éstos parecen apoyar descubrimientos recientes en los que se sugería que las neuronas humanas, aunque no están localizadas en un

órgano inmune, tienen una maquinaria intrínseca para organizar robustas respuestas inflamatorias, quimioatrayentes y antivirales (Lafon *et al.*, 2006).

Hasta lo que conocemos, es la primera vez que se describe esta respuesta en cerebro de peces frente a una infección viral. Son necesarios estudios adicionales que permitirán descubrir otros genes involucrados en la respuesta inmune de dorada y lubina frente a la infección por nodavirus.

En este apartado se estudió la expresión de una serie de genes después de una infección con nodavirus, en el siguiente apartado se analizará la expresión de estos mismos genes como consecuencia de someter a los peces a un estrés físico (el aumento en el nivel de saturación de oxígeno) y, posteriormente, a una infección con el mismo agente patógeno.

*Parte B: Expresión de TNF α ,
IL-1 β y Mx en lubina
sometida a estrés por
hiperoxia.*

1. INTRODUCCIÓN.

Como se indicó en la introducción general, esta tesis se enmarcó dentro de un proyecto europeo (*Welfare and health in sustainable aquaculture, WEALTH*) cuyo fin era mejorar el bienestar y la salud de los peces mediante la reducción del estrés para obtener buenos hábitos de trabajo en la industria de la acuicultura. Dentro de los factores a estudiar se encontró la regulación de la cantidad óptima de oxígeno disponible para los peces ya que éste es uno de los elementos más importantes a tener en cuenta para obtener un buen rendimiento en acuicultura.

En la acuicultura intensiva de muchas especies una práctica muy común es oxigenar el agua de los tanques para incrementar la producción y la biomasa. El oxígeno se añade al agua entrante dando lugar a niveles de saturación de oxígeno en los tanques de cría que muchas veces superan el 100%. Es difícil mantener un régimen estricto de oxigenación constante, lo que da lugar a grandes fluctuaciones en los niveles de saturación del agua de cría. Tanto la hipoxia (bajo nivel de saturación de oxígeno) como la hiperoxia (alto nivel de saturación de oxígeno) pueden ser dañinas para los organismos acuáticos produciendo un crecimiento menor del deseado y, por consiguiente, una menor producción de biomasa. Es, por lo tanto, muy importante establecer los límites de saturación de oxígeno para un crecimiento óptimo de las especies en acuicultura intensiva (Olsvik *et al.*, 2006).

La hiperoxia es uno de los típicos modelos de estrés oxidativo. El oxígeno es imprescindible para la vida pero un nivel elevado de oxígeno puede ser tóxico para el sistema nervioso central de los mamíferos debido a una excesiva producción y acumulación de radicales reactivos de oxígeno (ROS) (Dean *et al.*, 2004) como los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos, que pueden causar daños en los lípidos, proteínas y, sobre todo, en los ácidos nucleicos.

En peces, la exposición a altos niveles de saturación de oxígeno (hiperoxia) puede provocar una reducción en la ventilación branquial y un aumento de la presión parcial de CO₂ en la sangre dando lugar a acidosis respiratoria y cloremia (Heisler, 1993).

Otra forma de provocar estrés en los peces es sometiéndolos a una infección con un agente patógeno, como ya dijimos en la introducción general y en el apartado A de este capítulo, los betanodavirus son los agentes causantes de la encefalopatía y retinopatía viral,

enfermedad que causa elevadas mortalidades en peces marinos por lo que es muy importante para la industria de la acuicultura.

Brahimi-Horn y Pouysségur (2007) indicaron que la hiperoxia puede dar lugar a una enfermedad de la retina conocida como *retinopathy of prematurity*. Podemos relacionar esta enfermedad con la encefalopatía y retinopatía viral ya que igual que la hiperoxia produce esa enfermedad de la retina, también puede provocar que el efecto de los nodavirus sobre la retina sea mayor.

En los experimentos que se detallan en este apartado del capítulo I se sometió a los peces a un estrés producido por aumento del nivel de saturación de O₂ y posteriormente se llevó a cabo una infección con nodavirus de manera que se pudo estudiar la respuesta de los peces frente a un estrés físico y frente a un efecto doble: estrés físico y posterior infección con un agente patógeno. Los genes que se estudiaron fueron los mismos que en el primer apartado de este capítulo, el factor de necrosis tumoral α , la interleuquina-1 β y la proteína antiviral Mx. Se decidió estudiar estos genes para poder comparar los resultados con los obtenidos en el apartado A de este capítulo. Además se ha mostrado que el TNF α aumenta su expresión en condiciones de estrés oxidativo (Shea *et al.*, 1996), este incremento es mayor cuando el estrés oxidativo está asociado a una infección, así Tateda *et al.* (2003) mostraron que la infección con *Legionella pneumophila* incrementaba sustancialmente los niveles de expresión de TNF α , esto era particularmente evidente en los animales expuestos a hiperoxia donde los niveles de expresión de esta citoquina fueron 2.2 veces superiores a los observados en animales infectados pero mantenidos bajo condiciones normales.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Peces y virus.

Se utilizaron adultos de lubina que tenían alrededor de 80 g de peso al principio del experimento y la cepa de virus usada fue la 475-9/99, aislada de lubinas enfermas en el Institute Zooprofilattico delle Venize (Italia).

2.2. Diseño experimental.

Este experimento se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Lemarié en la estación experimental del IFREMER en Palavas les Flots (Francia). Se estudió la influencia de dos factores en los peces, por un lado la hiperoxia y por otro la infección con nodavirus. Las lubinas se mantuvieron durante 84 días a tres concentraciones distintas de saturación de O₂, con tres réplicas por cada una de las concentraciones, así, había tres grupos controles (100% de saturación de O₂), tres de nivel intermedio (150% de saturación de O₂) y tres de nivel alto (250% de saturación de O₂). Una vez pasados estos 84 días se tomaron diez lubinas de cada uno de los tanques, dos de ellas fueron sacrificadas y se les extrajo el cerebro y el riñón y las 8 restantes se pasaron a nuevos tanques, fueron infectadas intramuscularmente con 200 μ l de nodavirus (3×10^7 PFU ml⁻¹) y se muestrearon 2 lubinas de cada tanque a las 4, 24, 72 horas y 15 días post-infección; de manera que en cada uno de los tiempos de muestreo se tomaron 6 cerebros y 6 riñones de cada uno de los grupos. Los órganos se pusieron en trizol y se llevó a cabo la extracción del ARN, el tratamiento con *DNasa* y el paso a ADNc tal y como se describió anteriormente.

2.3. Expresión de citoquinas.

Se llevó a cabo el estudio del nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx por medio de la PCR cuantitativa (qPCR) con tres de los seis peces que se tomaron en cada punto de muestreo, tanto en cerebros como en riñones.

Los ensayos de PCR cuantitativa se llevaron a cabo usando el *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). La amplificación del ADNc se realizó utilizando los

cebadores específicos diseñados con la ayuda del *Primer 3 software* (Rozen y Skaletsky, 2000) y que están recogidos en la tabla 1.

Tabla 1: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

	F / R	LUBINA
β -actina	Forward	GTGCGTGACATCAAGGAGAA
β -actina	Reverse	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG
Factor de necrosis tumoral α	Forward	CGAGGGCAAGACTTTCTTTG
Factor de necrosis tumoral α	Reverse	GCACTGCCTGTTTCAGCTACA
Interleuquina-1 β	Forward	CAGGACTCCGGTTTGAACAT
Interleuquina-1 β	Reverse	GTCCATTCAAAAGGGGACAA
Proteína Mx	Forward	GGGGTCAGAAGGAGATCACA
Protein Mx	Reverse	ATGATGCACCAGCTCAAGTG

Se mezclaron 0.5 μ l de cada uno de los cebadores (10 μ M) con 12.5 μ l de *SYBR green PCR master mix* (Applied Biosystems) en un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- 10 minutos a 95 °C
- 40 ciclos
 - 15 segundos a 95 °C
 - 1 minuto a 60 °C

Se usó el método comparativo CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$ method) para determinar el nivel de expresión de los genes analizados (Livak y Schmittgen, 2001). La expresión de los genes candidatos fue normalizada usando la β -actina como gen control.

2.4. Estadística.

Los datos fueron analizados estadísticamente usando la prueba de la t de Student, de manera que los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar y las diferencias entre los peces controles e infectados fueron consideradas estadísticamente significativas en aquellos casos en los que $p < 0.05$.

3. RESULTADOS.

3.1. Expresión de citoquinas en cerebros de lubinas.

Antes de la infección con nodavirus no se observó ninguna diferencia en la expresión de las citoquinas ni de la proteína antiviral Mx como consecuencia del diferente nivel de saturación de O₂ a que estuvieron expuestos los peces (Figura 1).

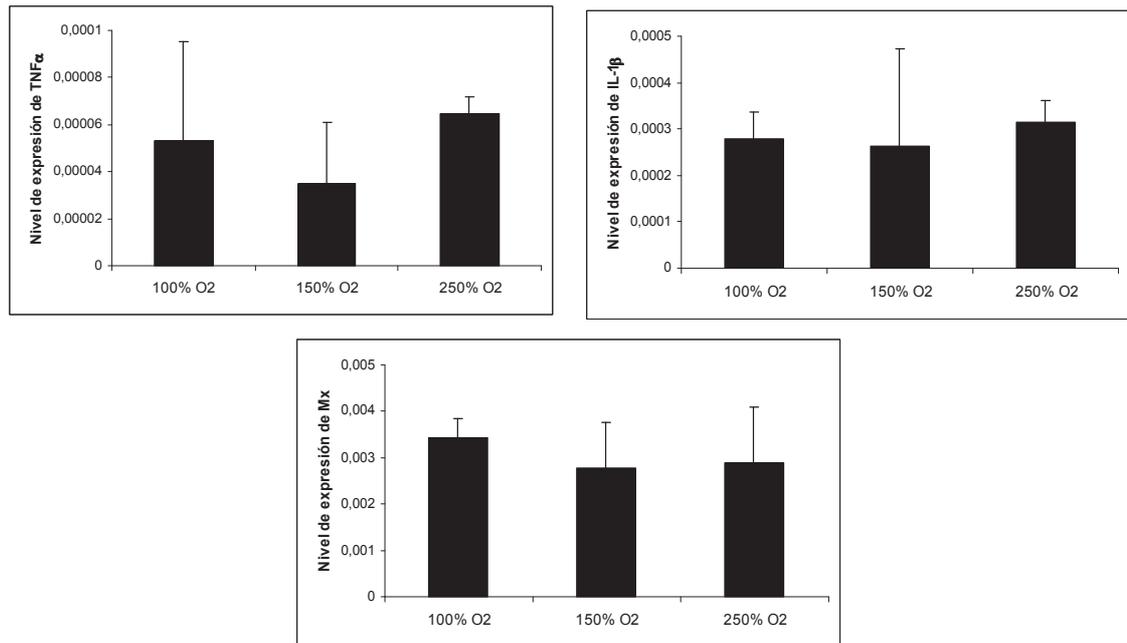
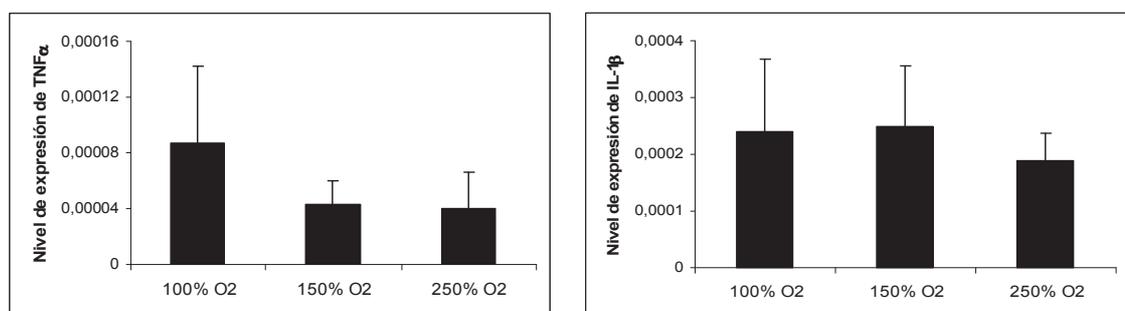


Figura 1: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en cerebros de lubinas antes de ser infectadas con nodavirus.

Cuatro horas después de producirse la infección con nodavirus seguimos sin observar ninguna diferencia en la expresión de las citoquinas ni de la proteína Mx como consecuencia de los diferentes niveles de saturación de O₂ a que, previamente, estuvieron expuestos los peces (Figura 2).



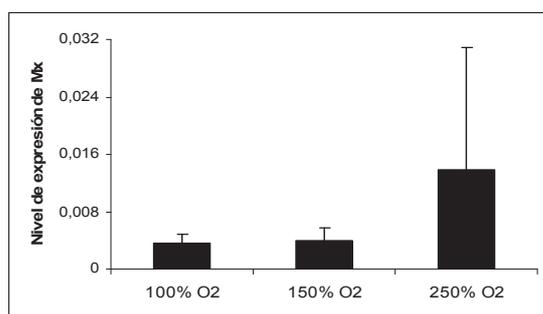


Figura 2: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en cerebros de lubinas 4 horas después de la infección con nodavirus.

Veinticuatro horas después de producirse la infección con nodavirus se observó un descenso significativo de la expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β en los peces que estuvieron expuestos al nivel intermedio de saturación de O₂ (Figura 3).

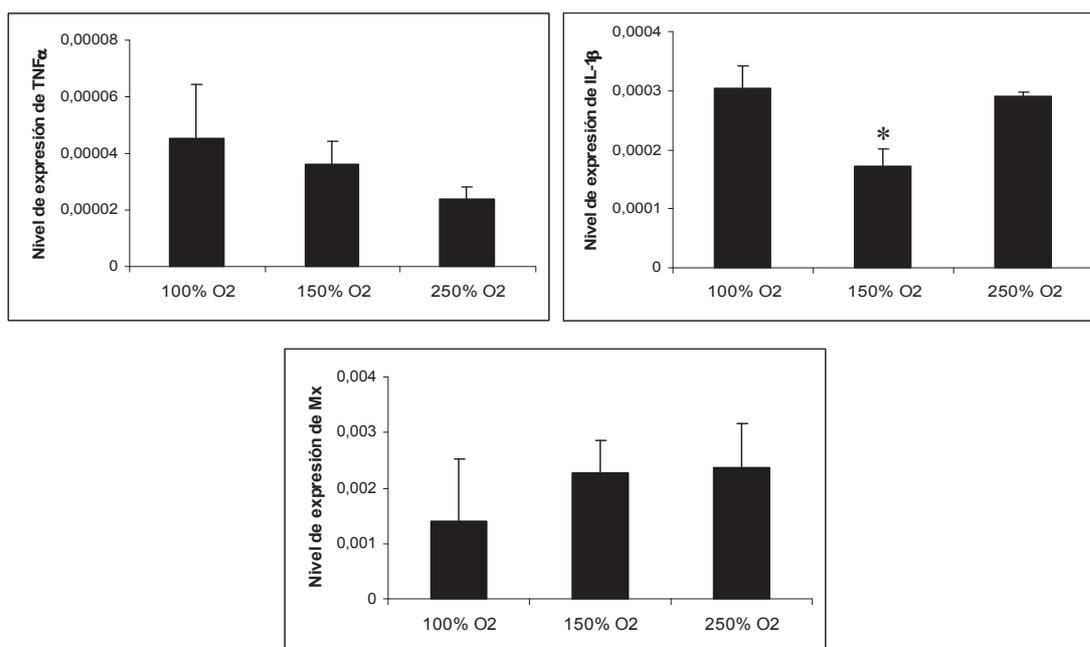


Figura 3: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en cerebros de lubinas 24 horas después de la infección con nodavirus.

Setenta y dos horas después de producirse la infección de los peces con nodavirus se observó un descenso de los tres genes candidatos en los peces que estuvieron expuestos al nivel intermedio de saturación de O₂, este descenso fue significativo en el caso de la proteína antiviral Mx y en el caso de la IL-1 β como se aprecia en la figura 4, aunque no fue significativo, en el caso de la citoquina pro-inflamatoria TNF α .

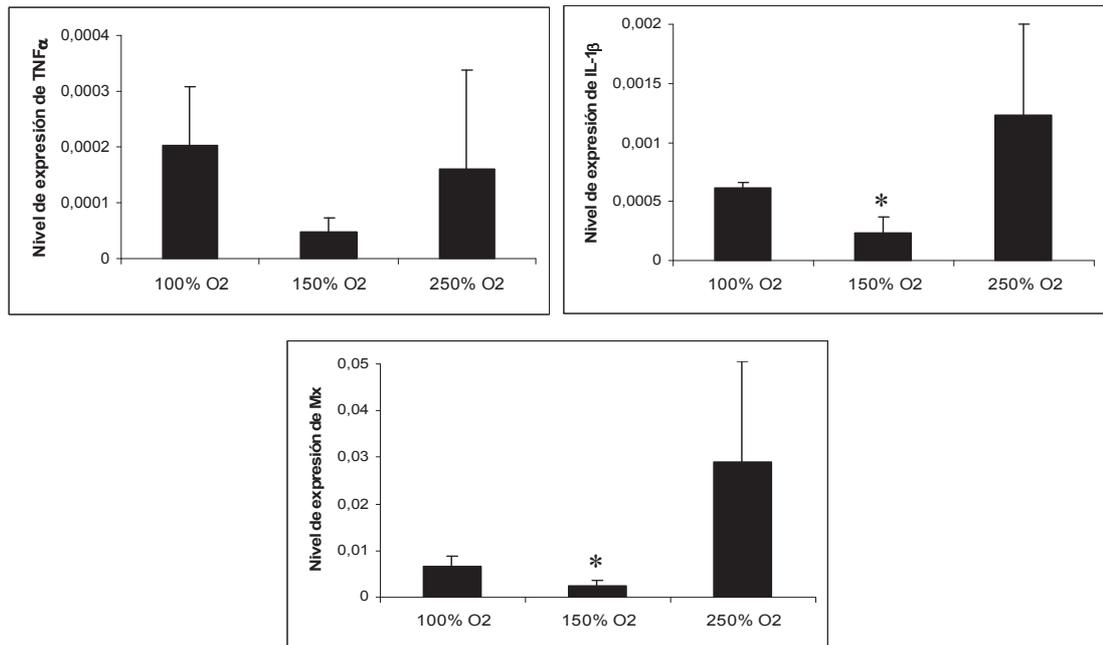
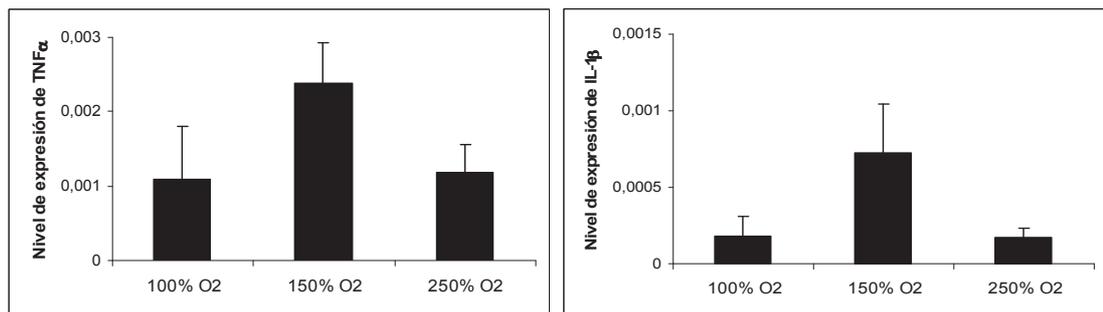


Figura 4: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en cerebros de lubinas 72 horas después de la infección con nodavirus.

Quince días después de la infección con nodavirus ya no se observó ninguna diferencia significativa en la expresión de las citoquinas ni de la proteína Mx como consecuencia del diferente nivel de saturación de O₂ a que estuvieron expuestos los peces. Se observó en los tres casos una tendencia a una mayor expresión en el caso de los peces que estuvieron expuestos al nivel intermedio de saturación de O₂ pero que no fue significativa (Figura 5).



3. Resultados

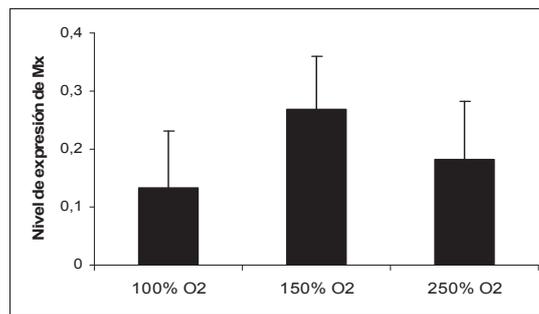
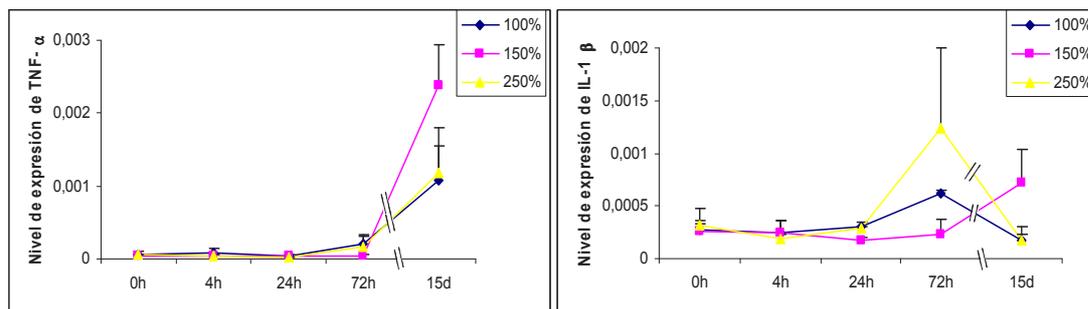


Figura 5: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en cerebros de lubinas 15 días después de la infección con nodavirus.

Ahora observamos la tendencia de lo que ocurre a lo largo de los tiempos de infección con nodavirus para cada uno de los niveles de saturación de O₂ a que, previamente, estuvieron expuestos los peces y vemos que en el caso del TNF α y de la proteína antiviral Mx hay un claro aumento de la expresión a los 15 días post-infección, siendo además el nivel de expresión mayor en el grupo de peces que estuvo expuesto a un 150% de saturación de O₂ (Figura 6). Este aumento es mucho más importante en el caso del Mx tal y como ocurría en los experimentos descritos en el apartado A de este capítulo, de manera que estos nuevos experimentos nos permiten corroborar los resultados obtenidos anteriormente.

En el caso de la IL-1 β el mayor pico de expresión se da a las 72 horas para el grupo control y para el grupo que estuvo expuesto al nivel de saturación de oxígeno más alto, para el grupo que estuvo expuesto al nivel de saturación de oxígeno intermedio el principal aumento se da a los 15 días de la infección (Figura 6).



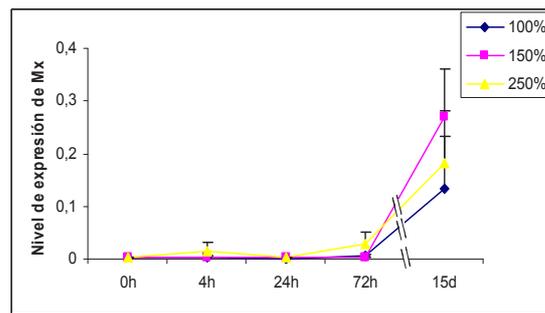


Figura 6: Evolución de la expresión de los genes candidatos a lo largo del tiempo post-infección con nodavirus.

3.2. Expresión de citoquinas en riñones de lubinas.

Antes de la infección con nodavirus se observó un descenso significativo de las dos citoquinas pro-inflamatorias y de la proteína antiviral Mx en el caso de los peces que estuvieron expuestos al nivel mayor de saturación de O₂ (Figura 7).

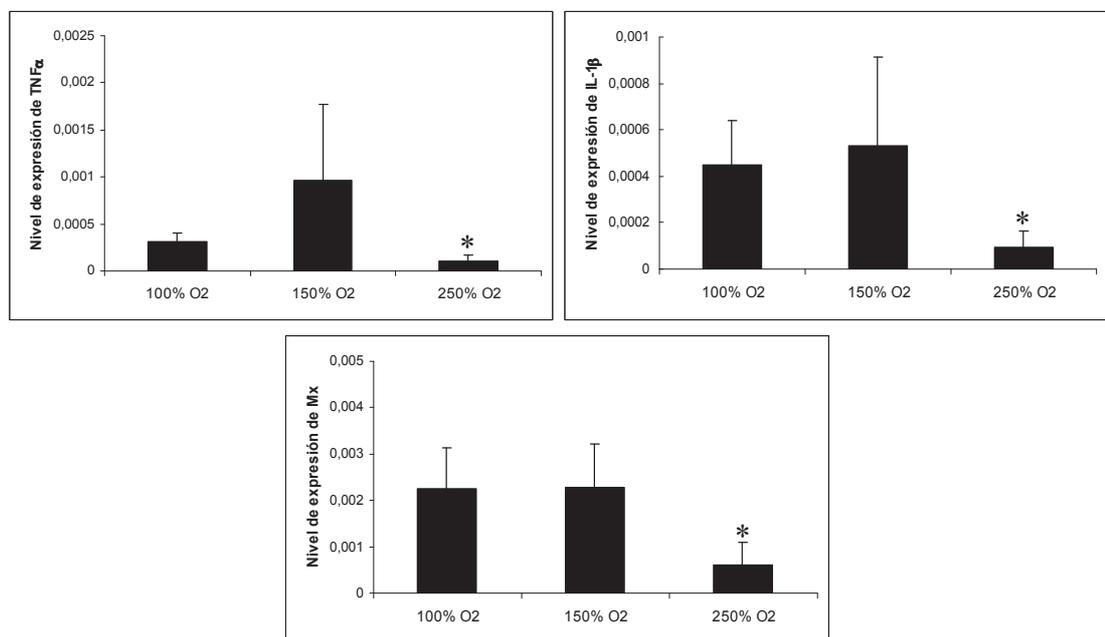


Figura 7: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en riñones de lubinas antes de ser infectadas con nodavirus.

Cuatro horas después de la infección con nodavirus ya no se observó ninguna diferencia significativa en la expresión de los genes estudiados y se observó un ligero

3. Resultados

descenso, no significativo, de la proteína antiviral Mx en los peces que estuvieron expuestos al nivel de 150% de saturación de oxígeno (Figura 8).

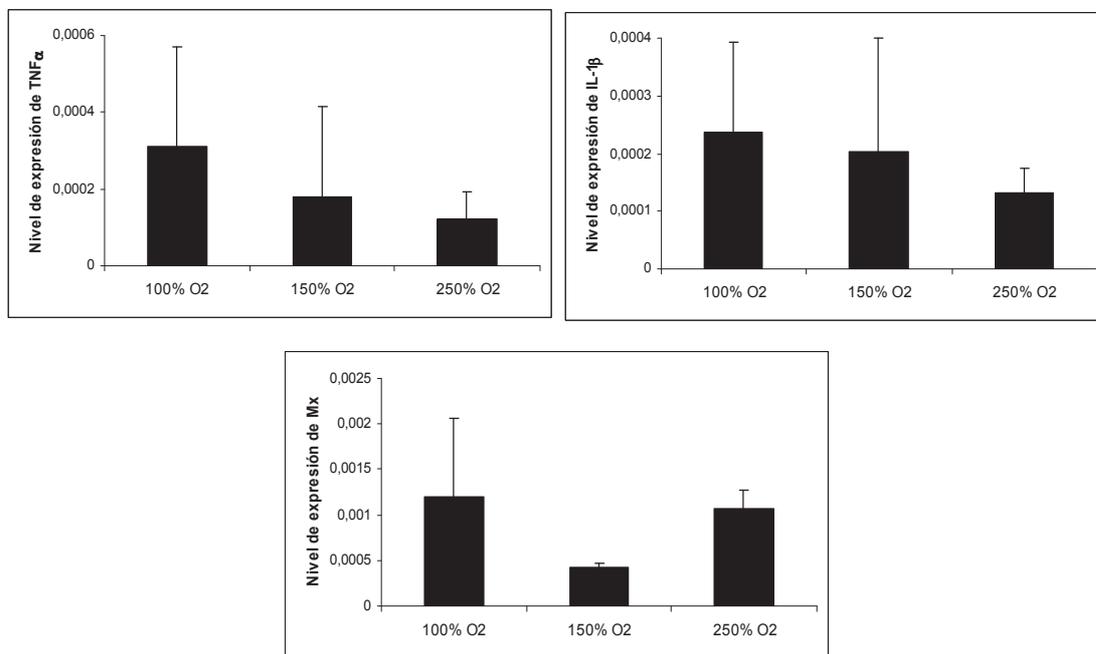
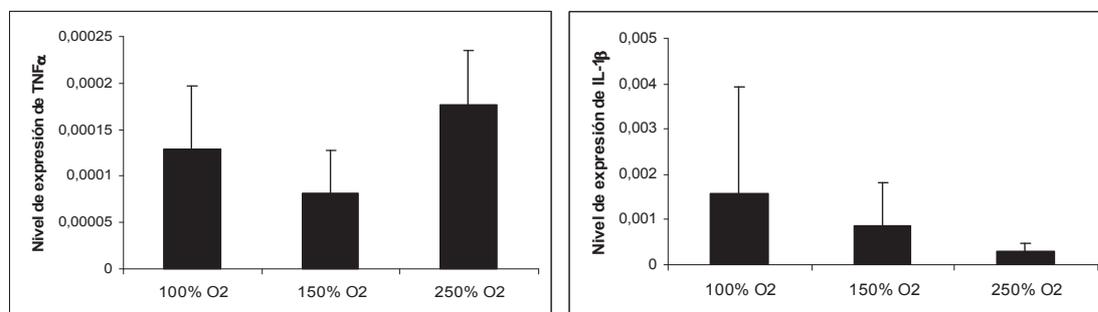


Figura 8: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en riñones de lubinas 4 horas después de la infección con nodavirus.

Veinticuatro horas después de producirse la infección con nodavirus no se observó ninguna variación significativa en la expresión de los genes estudiados, se observó un ligero descenso del TNF α y de la proteína antiviral Mx en los peces que estuvieron expuestos al 150% de saturación de O₂ (Figura 9). En cuanto a la IL-1 β vimos que tiene una tendencia al descenso conforme aumenta la concentración de oxígeno a la que estuvieron expuestos los peces pero que tampoco fue significativa (Figura 9).



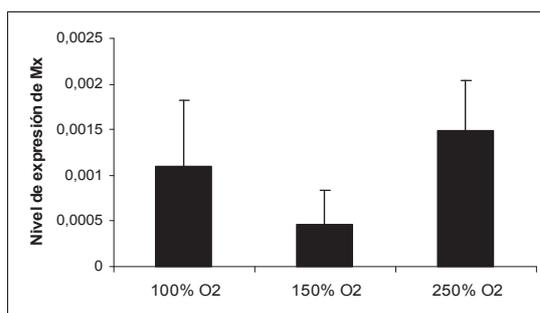


Figura 9: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ y Mx en riñones de lubinas 24 horas después de la infección con nodavirus.

Setenta y dos horas después de la infección con nodavirus observamos un descenso significativo de la $IL-1\beta$ en los grupos de peces expuestos a hiperoxia, este descenso también se observó, aunque no de forma tan clara en el caso del $TNF\alpha$ (Figura 10).

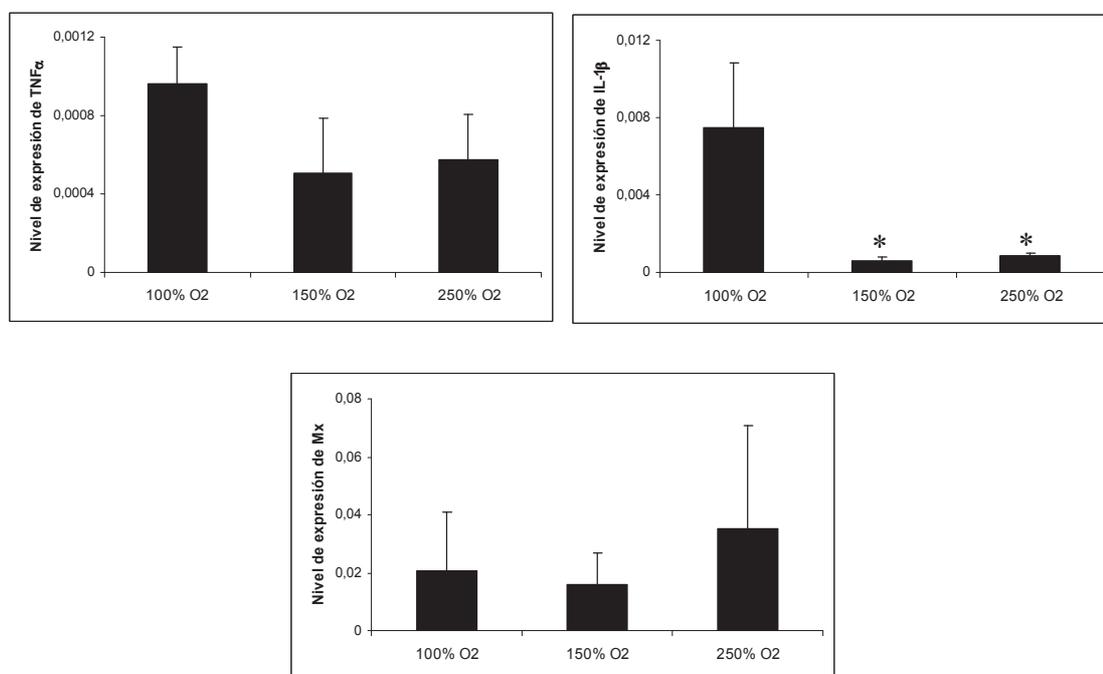


Figura 10: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ y Mx en riñones de lubinas 72 horas después de la infección con nodavirus.

Quince días después de llevarse a cabo la infección con nodavirus no se observó ninguna diferencia significativa en la expresión de las distintas citoquinas ni de la proteína antiviral Mx para ninguno de los grupos de peces expuestos a los distintos niveles de saturación de oxígeno estudiados. Sin embargo, se observó una tendencia al descenso de la expresión de la proteína Mx cuando los peces estuvieron expuestos a hiperoxia (Figura 11).

3. Resultados

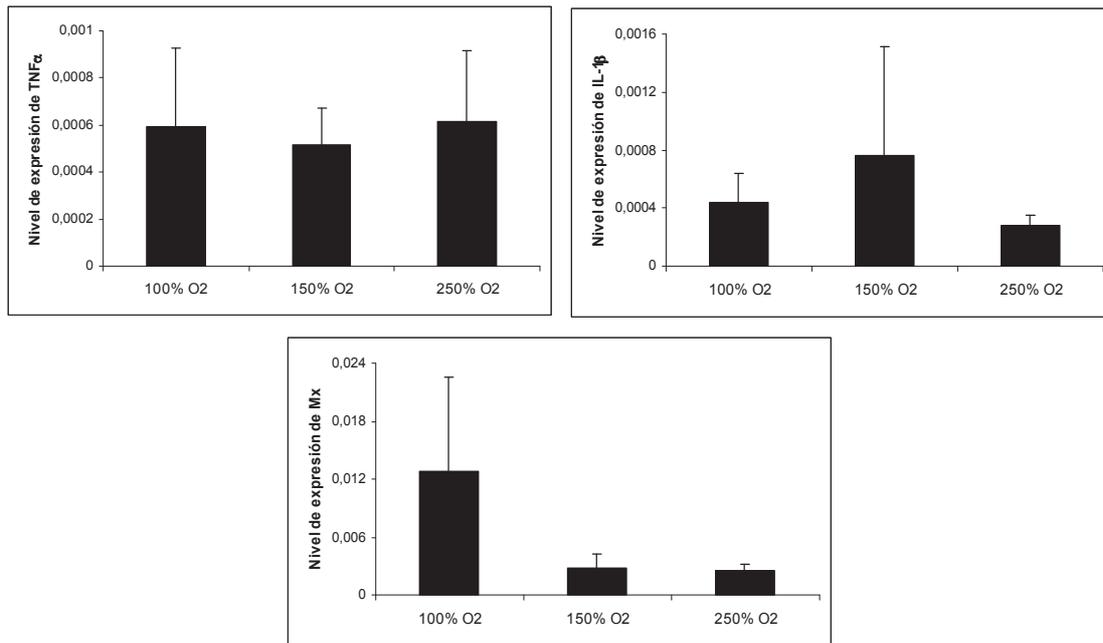


Figura 11: Resultados de qPCR para el nivel de expresión de TNF α , IL-1 β y Mx en riñones de lubinas 15 días después de la infección con nodavirus.

Como en el caso de cerebro, observamos la tendencia de lo que ocurre a lo largo de los tiempos de infección con nodavirus para cada uno de los niveles de saturación de O₂ a que estuvieron expuestos los peces y vemos que el mayor nivel de expresión se da a las 72 horas para todos los genes estudiados (Figura 12).

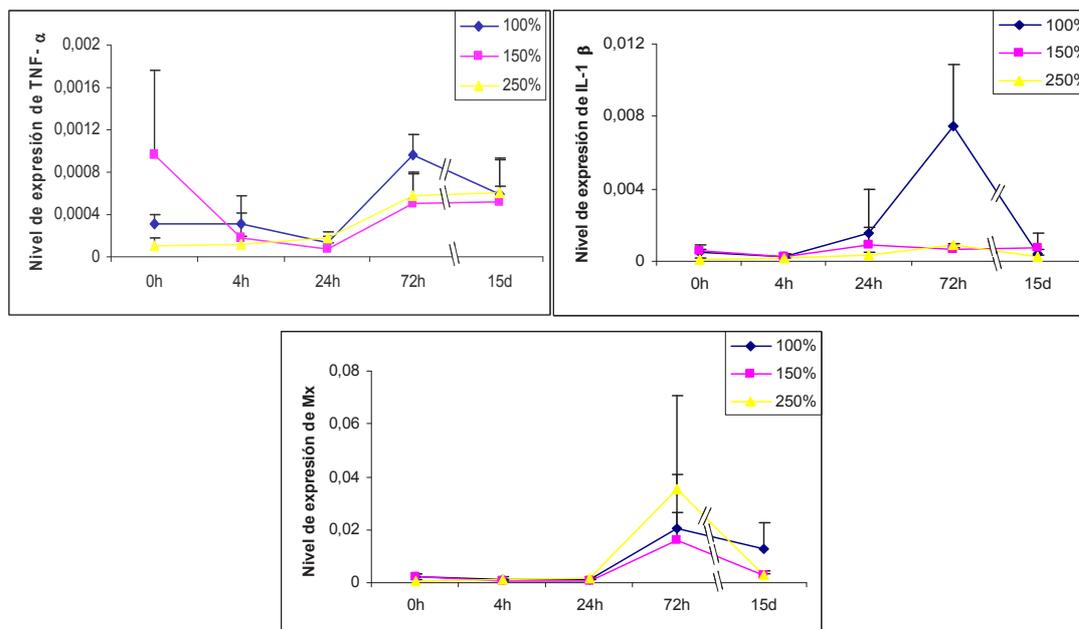


Figura 12: Evolución de la expresión de los genes candidatos a lo largo del tiempo post-infección con nodavirus.

4. DISCUSIÓN.

Se conoce como hiperoxia la presencia de una concentración de oxígeno en el ambiente que está por encima de la adecuada para los seres vivos. En acuicultura intensiva es muy común oxigenar el agua de los tanques para incrementar la biomasa y la producción, sin embargo, es muy difícil mantener un régimen estricto de aportación de oxígeno dando lugar a fluctuaciones en los niveles de saturación de oxígeno en los tanques de cría. Tanto la exposición a hipoxia como a hiperoxia pueden ser dañinas para los organismos acuáticos resultando en un crecimiento inferior al deseado y, por tanto, una disminución considerable en la producción. De esta manera, es muy importante establecer el nivel de saturación de oxígeno en unos límites óptimos para el crecimiento de los peces.

En mamíferos se sabe que la producción de reactivos de oxígeno asociada a hiperoxia incrementa la expresión pulmonar de citoquinas proinflamatorias (Shea *et al.*, 1996). En este sentido, Nara *et al.* (2004) demostraron que el factor de necrosis tumoral α exógeno reducía la supervivencia de los ratones infectados con *Legionella pneumophila* mantenidos bajo condiciones de hiperoxia. La hiperoxia incrementa las concentraciones de ión superóxido (O_2^-) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en los sistemas celulares, lo que produce un daño oxidativo en los tejidos (Shea *et al.*, 1996).

En los experimentos descritos en este capítulo se estudió la expresión de citoquinas proinflamatorias en cerebro y en riñón cefálico de peces en relación a un estrés posterior causado por una infección con nodavirus.

En primer lugar, en relación a las muestras de **cerebro**, hay que tener en cuenta que es muy difícil obtener una conclusión de lo que está ocurriendo ya que las desviaciones son bastante importantes debido a que los resultados son medias de los niveles de expresión de tres peces.

La exposición de los peces a los diferentes niveles de saturación de O_2 , antes de producirse la infección, no provoca un aumento o descenso de la inflamación en los cerebros de los peces estudiados.

Sin embargo, horas más tarde de producirse la infección (24 y 72 horas post-infección) sí que se observan descensos significativos con respecto al control en la expresión de algunos genes.

A los quince días post-infección se observa un aumento, no significativo, de la expresión de los tres genes candidatos al 150% de saturación de O₂ con respecto al control. Este aumento no continúa si el nivel de saturación de oxígeno se incrementa todavía más (Figura 5).

A la hora de analizar lo que ocurre en el transcurso de la infección con nodavirus se observa un aumento en la expresión de los tres genes a lo largo del tiempo (Figura 6). Este aumento es muy destacable en el caso de la citoquina proinflamatoria TNF α y sobre todo de la proteína antiviral Mx. Estos aumentos se dan aproximadamente por igual en los tres niveles de saturación de O₂ produciéndose en el caso del TNF α un aumento más importante para el 150% de saturación de O₂ y siendo el punto de muestreo de mayor nivel de expresión el de los quince días post-infección.

Al analizar los dos factores conjuntamente no se puede concluir que la virulencia del patógeno aumente si, previamente, los peces son expuestos a hiperoxia aunque se observa un aumento en la expresión de la proteína antiviral Mx en los niveles de 150 y 250% de saturación de oxígeno. Hay que tener en cuenta que los experimentos se realizaron con lubinas adultas donde la tasa de mortalidad debida a nodavirus es muy baja o nula (Castric *et al.*, 2001). A los quince días (máximo tiempo de infección a que estuvieron sometidos los peces) el nivel mayor de expresión de todos los genes es el correspondiente con el 150% de saturación de oxígeno (Figura 6).

En la bibliografía se encuentran resultados diferentes. Así, O'Reilly *et al.* (2008) encontraron que la respuesta inflamatoria era mayor en los ratones adultos infectados con el virus de la *influenza A* que habían sido sometidos a hiperoxia como neonatos. Otros ejemplos que podemos encontrar son que el tratamiento con hiperoxia aumenta de forma notable la mortalidad en ratones infectados con *Legionella pneumophila* (Tateda *et al.*, 2003), con este mismo agente patógeno se describió más recientemente que la hiperoxia reducía la supervivencia de ratones infectados y que esta reducción era dependiente de la concentración de oxígeno y del tiempo de exposición (Nara *et al.*, 2004). En lo que respecta a otro patógeno, las tasas de mortalidad asociadas con neumonía (*Klebsiella pneumoniae*) fueron

significativamente más elevadas en ratones expuestos a un período subletal de hiperoxia, así, a los seis días de la inoculación un 52% de los ratones infectados que se mantenían en la sala con aire normal había muerto mientras que de los ratones que se mantenían bajo condiciones de hiperoxia había muerto un 92% (Baleeiro *et al.*, 2003). Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Tateda *et al.* (2003) que mientras que observaron que la hiperoxia aumentaba la mortalidad en ratones infectados con *Legionella pneumophila* no ocurrió lo mismo en el caso de infección con *Klebsiella pneumoniae* donde no observaron ningún efecto perjudicial de la hiperoxia sobre la supervivencia de los animales infectados.

En lo que se refiere a los **riñones**, el resultado más relevante se observa antes de producirse la infección cuando un sorprendente descenso significativo de los tres genes estudiados en el nivel mayor de saturación de oxígeno (250%) (Figura 7).

Después de producirse la infección con nodavirus se produce un ligero descenso de la expresión de citoquinas proinflamatorias conforme aumenta el nivel de saturación de O₂ a que estuvieron expuestos los peces, en cuanto a la proteína Mx el menor nivel de expresión se da en el grupo de peces expuestos al 150% de saturación de oxígeno.

Al ver la tendencia de lo que ocurre en el transcurso de la infección con nodavirus vemos que mientras que en cerebro el pico máximo de expresión de la citoquina TNF α y de la proteína antiviral Mx se daba 15 días después de producirse la infección, en el caso del riñón este aumento importante se produce a las 72 horas de la infección (Figura 12). Este resultado también está de acuerdo con los resultados expuestos en los experimentos del apartado A de este capítulo donde también veíamos que, en riñón, la máxima expresión se producía con anterioridad a la de cerebro. Como comenté anteriormente, el hecho de que el TNF α se modulara en cerebro 15 días después de producirse la infección y en riñón esto ocurriera a día 3 post-infección podría sugerir que el sistema inmune parece activarse en cerebro cuando los nodavirus llegan a este órgano y empiezan allí la replicación, tal y como previamente ha sido descrito por Dios *et al.* (2007).

En general, podemos concluir que si infectamos peces con nodavirus después de estar sometidos a hiperoxia, la expresión de las citoquinas proinflamatorias es menor que si los peces no estuvieran sometidos a estos elevados niveles de saturación de oxígeno. Esto podría indicar un efecto inmunosupresor en los peces infectados con un agente patógeno, que disminuyera la capacidad del organismo para combatir la infección. En un estudio realizado

in vitro por Benson *et al.* (2003) determinaron que se veía un efecto inmunosupresor del oxígeno hiperbárico sólo si las células eran expuestas a estas concentraciones durante un tiempo inferior a 3 horas. Para que los resultados puedan ser comparados es necesario realizar más estudios ya que en mi caso la exposición de los peces tuvo lugar *in vivo* y durante 84 días.

Sin embargo, en lo que se refiere a la proteína antiviral Mx se observa que la expresión es mayor en el caso de que los peces estuvieran expuestos previamente a hiperoxia, lo que podría indicar que existe una respuesta antiviral mayor frente al nodavirus. Son necesarios más estudios para entender como afecta la hiperoxia al sistema inmune de los peces.

*Capítulo II:
Identificación de genes
implicados en la respuesta
inmune de lubina. SSH.*

1. INTRODUCCIÓN.

Una vez que se llevó a cabo el estudio de la expresión del TNF- α , la IL-1 β y la proteína antiviral Mx como respuesta de la lubina frente a la infección con nodavirus se pretendió estudiar cuáles podrían ser otros genes involucrados en la respuesta frente a dicha infección.

La respuesta del hospedador a una infección lleva implícita una compleja coordinación entre genes que activan o desactivan distintas vías para hacer frente a dicha infección. Un conocimiento de los componentes que participan en la primera línea de defensa sería de gran ayuda para comprender como los organismos son capaces de hacer frente a las infecciones, sin embargo, se conoce muy poco acerca de los genes que participan en la defensa de los organismos marinos frente a los patógenos. Para identificar qué genes están implicados en la respuesta de un hospedador frente a un determinado agente patógeno (bacteria, virus, protozoo, etc.) se emplean diversas aproximaciones como, por ejemplo, las librerías de ADNc, la hibridación sustractiva (SSH) y el *differential display* (Liang y Pardee, 1992). Entre éstas, la SSH es una herramienta muy interesante ya que esta técnica, a diferencia de las otras, permite detectar los genes que se expresan de forma diferencial en una población de ARNm con respecto a otra, independientemente de la abundancia de los mismos (Diatchenko *et al.*, 1996).

Dos ejemplos pioneros de aplicación de la tecnología sustractiva fueron la identificación de receptores de células T (Hedrick *et al.*, 1984) y la identificación de una serie de genes que se expresan durante el proceso de gastrulación de *Xenopus laevis* (Sargent y Dawid, 1983). Desde entonces se han descrito varias modificaciones de esta técnica (Duguid *et al.*, 1988; Rubenstein *et al.*, 1990; etc.) hasta que Diatchenko *et al.* (1996) describieron el método tal y como se utiliza hoy en día. A partir de entonces la hibridación sustractiva fue usada con éxito para comparar diferencias en la expresión de genes entre dos poblaciones de ARNm y así poder determinar qué genes son los potencialmente candidatos para hacer frente a una determinada infección en todo tipo de organismos.

En humanos, entre otros muchos ejemplos, se utilizó esta herramienta para estudiar los genes relacionados con la infección producida por el virus de la hepatitis C (Patzwahl *et al.*, 2001; Shackel *et al.*, 2003) y los activados por una proteína del virus de la hepatitis B

(Zhang *et al.*, 2007). También se utilizó este enfoque para ver qué genes se estaban expresando en células del carcinoma renal (Wang *et al.*, 2008).

En aves, en concreto en gallinas, se aplicó para determinar los genes que se expresan de forma diferencial en riñones de aves infectadas con el *avian influenza virus* (AIV) con respecto a riñones no infectados, y viceversa (Zhang *et al.*, 2008).

En el crustáceo *Penaeus japonicus* se usó este enfoque para analizar la respuesta de los hemocitos frente a la infección intramuscular con una suspensión de microorganismos (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pichia pastoris*) muertos por calor (He *et al.*, 2004). Y, en este mismo crustáceo se usó la SSH junto con la hibridación diferencial, para identificar el diferente patrón de expresión génica entre hemocitos de langostinos resistentes y sensibles al virus de la enfermedad de la mancha blanca (*white spot syndrome virus*, WSSV) (He *et al.*, 2005).

En moluscos destaca el trabajo realizado por Gestal *et al.* (2007) donde utilizaron la técnica de la hibridación sustractiva para identificar genes expresados diferencialmente en hemocitos de almejas estimuladas con una mezcla de bacterias muertas. Gracias a este enfoque (complementado con la técnica de RACE) se caracterizaron tres isoformas de miticinas y una de mitilinas nunca antes descritas en esta especie. También es relevante el trabajo de Pallavicini *et al.* (2008) que identificaron una nueva clase de miticina de mejillón (miticina C) mediante la aplicación de la sustracción de librerías.

En peces también hay bastantes trabajos publicados, así Bayne *et al.* (2001) usaron esta herramienta para identificar genes implicados en la respuesta inmune de la trucha arco iris frente a una infección con la bacterina de *Vibrio*, la librería resultante contenía unos 25 fragmentos de genes relacionados con el sistema inmune. Alonso y Leong (2002) utilizaron la SSH para crear librerías de genes diferencialmente expresados, en salmón Chinook y *staghorn sculpin*, después de la exposición a poly I:C, un potente inductor de interferón, obteniendo como resultado que los genes que se sobreexpresaban eran muy similares a los descritos como inducibles por interferón en mamíferos. O'Farrell *et al.* (2002) usaron este enfoque para determinar los genes implicados en la respuesta de la trucha arco iris frente a la septicemia hemorrágica viral, identificando 24 genes inducidos por el virus de los que seis se correspondían con genes asignados a la vía del interferón. Tsoi *et al.* (2004) emplearon la SSH para investigar la expresión diferencial de genes en salmón atlántico

frente a la bacteria *Aeromonas salmonicida* (agente causante de la forunculosis), construyeron un total de 12 librerías sustractivas, ya que realizaron las librerías directa y reversa para tres órganos diferentes (bazo, hígado y riñón) y en dos tiempos de muestreo (7 y 13 días), y secuenciaron aproximadamente 200 clones de cada una de ellas obteniendo un total de 1778 ESTs. Dios *et al.* (2007) emplearon esta técnica para estudiar el patrón de expresión génica en el cerebro de dorada en respuesta a una infección por nodavirus, que tiene como diana el sistema nervioso central. Lin *et al.* (2007) utilizaron este enfoque para identificar qué genes están implicados en la respuesta del pez cebra frente a dos tipos de bacterias muy diferentes: una Gram-negativa (*Aeromonas salmonicida*) y otra Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*). Como resultado de las librerías obtuvieron muchos genes que codifican para proteínas de fase aguda. Wang y Wu (2007) usaron la técnica de la SSH para estudiar los genes implicados en la respuesta del mero amarillo frente al lipopolisacárido, componente de la pared de las bacterias Gram-negativas.

En este capítulo se presenta la primera hibridación sustractiva realizada hasta ahora en lubina, ya que en la bibliografía sólo hay descritas una librería de BAC (Whitaker *et al.*, 2006) y una librería de ADNc realizada en hígado de lubinas adultas (Chini *et al.*, 2006). La sustracción de librerías que se presenta aquí se realizó para comparar el patrón de expresión de genes en riñones de peces infectados con nodavirus con respecto a peces no infectados.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Peces.

Las lubinas adultas (*Dicentrarchus labrax* L.) de aproximadamente 80 g de peso usadas en estos experimentos procedían del Centro Oceanográfico de Mazarrón (Murcia). Previamente a dichos experimentos los peces fueron aclimatados a las condiciones de laboratorio durante 3 semanas manteniéndolos a 20 °C y alimentándolos diariamente con pienso comercial.

2.2. Virus.

La cepa de nodavirus utilizada en los experimentos fue la 475-9/99, aislada de lubinas enfermas en el Institute Zooprofilattico delle Venize (Italia) y enviada a nuestro laboratorio por el Dr. Bovo. El virus se propagó en la línea celular SSN-1 (Frerichs *et al.*, 1996) y la titulación se llevó a cabo también en esta línea celular, en placas de 96 pocillos y calculándose la TCID₅₀ / ml (dosis infectiva citotóxica 50%) de acuerdo con el protocolo descrito por Reed y Muench (1938).

2.3. Diseño experimental.

Doce lubinas fueron infectadas intramuscularmente con 100 µl de nodavirus con un título viral de 10⁸ TCID₅₀ / ml y colocadas en tanques con circuito cerrado de agua a aproximadamente 25 °C, al mismo tiempo otras doce lubinas (grupo control) fueron inoculadas con medio de cultivo (*Minimum Essential Medium*, MEM) + penicilina/streptomina (P/S) + 2% de suero fetal bovino (FBS) y mantenidas en las mismas condiciones experimentales. A las 4, 24, 48 y 72 horas post infección tres lubinas de cada grupo fueron anestesiadas y el cerebro, hígado, riñón anterior, músculo y bazo de cada uno de los peces fueron muestreados y homogenizados en Trizol (Invitrogen) para llevar a cabo la extracción del ARN. A continuación las muestras de ARN fueron tratadas con *DNAsa* usando el *Turbo-DNA free* (Ambion) siguiendo los protocolos descritos en el capítulo 1.

2.4. Síntesis de ADNc y SSH.

Se utilizó la técnica de la *Suppression Subtractive Hybridization* (SSH) (Diatchenko *et al.*, 1996) para caracterizar nuevos genes involucrados en la respuesta inmune innata de la lubina frente al nodavirus. Dicha técnica se llevó a cabo en los riñones tomados 4 horas después de la infección con dicho virus.

Para realizar la sustracción de librerías el primer paso fue sintetizar el ADN complementario (ADNc) a partir de las muestras de ARN previamente obtenidas y, para ello, se utilizó el *SMART cDNA Synthesis Kit* (Clontech). Se partió de 1 µg de ARN de cada conjunto de riñones (infectados por un lado y controles por otro) y se siguieron las instrucciones de la síntesis de ADNc indicadas por el fabricante; este proceso de síntesis comienza con un oligo(dT) *primer* modificado (*3' BD SMART CDS Primer II A*) que se encarga de la primera reacción de síntesis (Figura 1). Cuando la reverso transcriptasa alcanza el extremo 5' del ARNm la actividad transferasa terminal de la enzima añade algunos nucleótidos adicionales, principalmente desoxicitidinas, al final 3' del ADNc que se está sintetizando. El *BD SMART II A Oligonucleotide*, que tiene una secuencia oligo(G) en su extremo 3', se empareja con la cola de desoxicitidinas creando un molde extendido de forma que la reverso transcriptasa utilizará este molde y continúa replicando hasta el final de la cadena nucleotídica.

Como consecuencia del proceso anterior se obtuvo un ADNc completo y de cadena sencilla que contiene el extremo 5' del ARNm entero y también las secuencias que son complementarias al *BD SMART II A Oligonucleotide* para cada uno de los tratamientos (control e infectado).

A partir de estos ADNc de cadena sencilla se consiguieron unos de doble cadena por amplificación mediante PCR usando el *5' PCR primer II A*. El número de ciclos de esta PCR fue optimizado para las muestras de ADNc de riñón, de manera que se probaron 15, 18, 21 y 24 ciclos y al final se decidió darles tan sólo 17 ciclos. Por lo tanto, el programa final al que fueron sometidas las muestras fue el siguiente:

- 1 minuto a 95 °C
- 17 ciclos
- 15 segundos a 95 °C

- 30 segundos a 65 °C
- 6 minutos a 68 °C

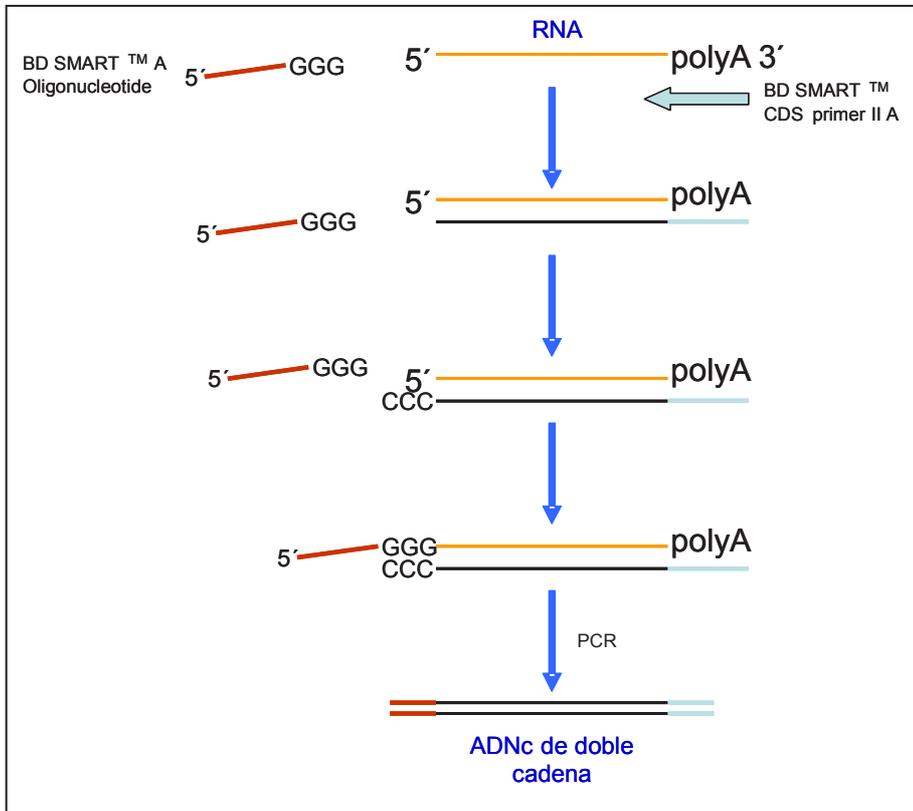


Figura 1: Reacción de síntesis del ADNc de doble cadena usando el *SMART cDNA Synthesis Kit*.

Por último, se lleva a cabo una purificación de los ADNc mediante columna de cromatografía usando las *BD CHROMA SPIN 1000 Columns*.

Para comparar las dos poblaciones de ADNc resultantes se llevó a cabo la técnica de la sustracción propiamente dicha usando el *PCR-select cDNA Subtraction Kit* (Clontech) (Diatchenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996).

Los ADNc considerados *tester* (infectados) y *driver* (controles) fueron digeridos con *Rsa I* para generar extremos romos que son necesarios para llevar a cabo la unión a los adaptadores y, por tanto, la sustracción. Los productos de la digestión fueron purificados usando el sistema de purificación de *Nucleotrap*.

A continuación el ADNc *tester* fue subdividido en dos siendo cada uno de ellos ligado con un adaptador diferente (adaptador 1 y adaptador 2R) (Figura 2). Posteriormente, se llevaron a cabo dos hibridaciones:

- primera hibridación: se añadió un exceso de *driver* a cada muestra de ADNc *tester*. Las muestras fueron luego desnaturalizadas y preparadas para el anillamiento generando los tipos de moléculas a, b, c y d en cada una de las muestras.

- segunda hibridación: las dos muestras resultantes de la primera hibridación fueron mezcladas sin desnaturalizar. Como resultado, tan sólo los ADNc *tester* de cadena sencilla con adaptador pudieron reasociarse formando híbridos con un adaptador diferente en cada extremo (e).

El ADNc *driver* desnaturalizado fue otra vez añadido a estas muestras híbridas con el fin de enriquecer la muestra con las secuencias diferencialmente expresadas (moléculas de tipo e). Después de completarse los extremos mediante la acción de la ADN polimerasa las moléculas de tipo e son las únicas que tienen sitios de unión a los *nested primers* en los extremos 5' y 3'.

Todas las moléculas (a, b, c, d y e) fueron sometidas a amplificación por PCR usando el siguiente ciclo:

- 5 minutos a 75 °C
- 25 segundos a 94 °C
- 30 ciclos
 - 10 segundos a 94 °C
 - 30 segundos a 66 °C
 - 1.5 minutos a 72 °C

Durante dicha PCR las moléculas de tipo a y d no tienen lugares de unión de los oligos y no pueden ser amplificadas; las de tipo b forman un bucle sobre sí mismas que impide la amplificación exponencial y las de tipo c sólo tienen el sitio de unión de uno de los oligos de manera que experimentan una amplificación lineal. Así que, tan sólo las moléculas de tipo e pueden ser amplificadas exponencialmente.

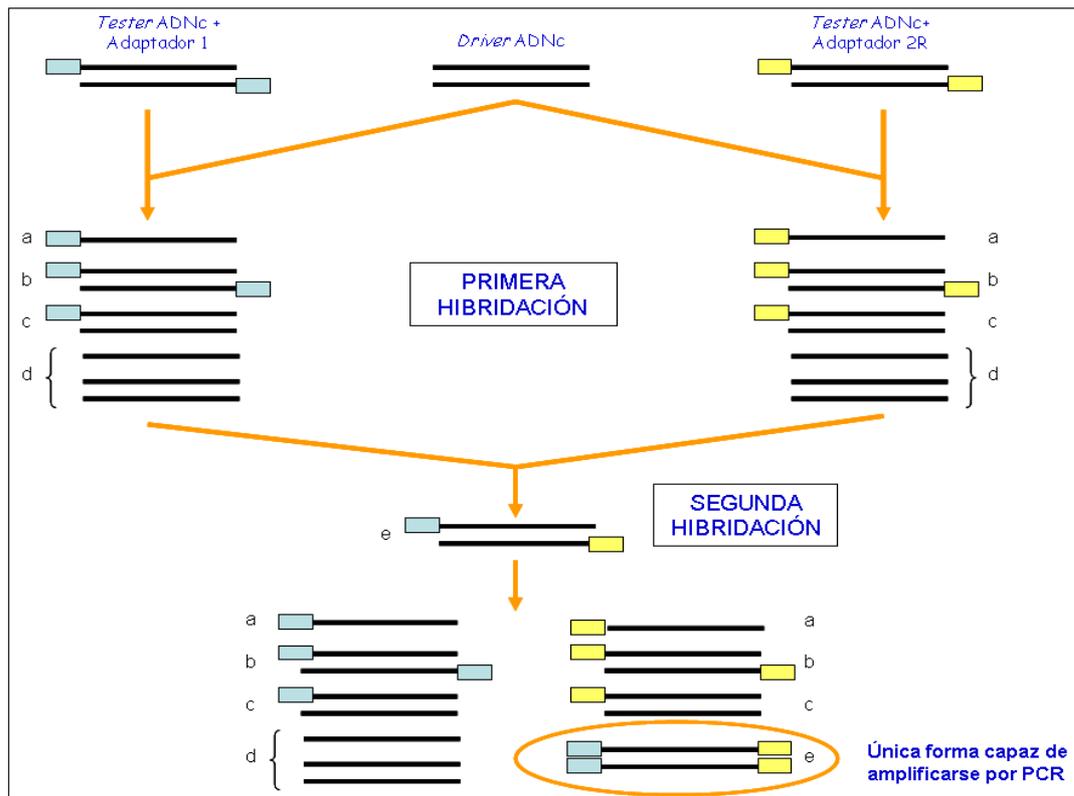


Figura 2: Esquema de las hibridaciones realizadas con el *PCR-select cDNA Subtraction Kit*.

A continuación se llevó a cabo una segunda amplificación por PCR utilizando *nested* oligos para reducir la variedad de productos de PCR y enriquecer el producto final en secuencias expresadas diferencialmente entre las dos poblaciones.

- 15 ciclos
 - 10 segundos a 94 °C
 - 30 segundos a 68 °C
 - 1.5 minutos a 72 °C

2.5. Construcción de la librería sustractiva de ADNc.

El producto de PCR procedente de la sustracción fue clonado usando el *TOPO T/A Cloning Kit* (Invitrogen) para crear la librería de ADNc sustractiva. Brevemente, 3 µl del producto de PCR fueron ligados dentro de un *pCR 2.1 vector* e incubados a 15 °C durante toda la noche, al día siguiente el producto de la ligación fue transformado en células competentes TOP 10F' de *Escherichia coli*. Las células de *E. coli* transformadas fueron

sembradas en placas de medio *Luria-Bertani* (LB) con agar que además contenían ampicilina (50 µg/ml), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactósido (X-gal) (40 µg/ml) e isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (238 µg/ml) e incubadas a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se picaron colonias blancas en placas de 96 pocillos con fondo en U que contenían 150 µl de LB-ampicilina por pocillo y fueron nuevamente incubadas toda la noche a 37 °C.

Por último, 100 µl de cada uno de los pocillos de las placas anteriores (una vez crecidas) fueron pasados a nuevas placas de 96 pocillos conteniendo, cada uno de ellos, 33 µl de glicerol y 17 µl de LB-ampicilina para ser congeladas a -80 °C. El resto se utilizó para el análisis por PCR de los clones.

2.6. Análisis de la librería de ADNc sustractiva.

La librería sustractiva fue analizada por PCR para confirmar la presencia de insertos en los clones. La reacción de PCR se llevó a cabo usando 1 µl de 10 mM dNTP mix, 0.125 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl), 2.5 µl de Taq 10x *buffer*, 1.25 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de cada uno de los cebadores (10 µM) y 1 µl del cultivo de las placas de 96 pocillos en un volumen final de 25 µl.

El ciclo de la PCR fue el siguiente: un paso de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C y 1 minuto y medio a 72 °C y, por último, 7 minutos de extensión final a 72 °C. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y como referencia se utilizó un marcador de 100 pb (Promega).

2.7. Secuenciación y análisis de secuencias.

El exceso de oligonucleótidos y de nucleótidos se eliminó por digestión enzimática utilizando 10 y 1 unidades de *ExoI* y de *SAP*, respectivamente (Amershan Biosciences) e incubándose a 37 °C durante 1 hora, a continuación las enzimas fueron inactivadas realizando una incubación durante 15 minutos a 80 °C.

Los productos de PCR fueron secuenciados en el “Centro de Investigaciones Biológicas” (CIB) utilizando un *3730 DNA Analyzer* de Applied Biosystems y las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa Chromas, para cada secuencia se eliminaron los extremos 5' y 3' enriquecidos en bases indeterminadas. Los programas Blastn y Blastx del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) fueron usados para encontrar las similitudes de las secuencias.

Para realizar la tabla de clasificación de las secuencias se tomaron como significativas aquellas secuencias cuyo *e-value* era menor a 10^{-3} . Se realizaron contigs utilizando un programa *on-line* (http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/cap_in.pl) y a continuación las secuencias fueron clasificadas, según la función de la proteína, en las siguientes categorías: genes ribosómicos (genes presentes en los ribosomas), genes estructurales (genes relacionados con la estructura de la célula), genes relacionados con el metabolismo celular, genes relacionados con el sistema inmune y otros.

3. RESULTADOS.

Como ya se indicó en material y métodos, se utilizó la técnica de la SSH para generar una librería substractiva enriquecida en transcritos diferencialmente expresados, después de 4 horas de infección, en riñones de lubinas infectadas con nodavirus.

Después de realizar las transformaciones y el clonaje se aislaron 479 clones bacterianos cuyos insertos fueron amplificados por PCR. De todos los productos amplificados se mandaron a secuenciar tan sólo 264 (ya que muchos de ellos no tenían ninguna banda o bien tenían varias) obteniéndose 206 secuencias de buena calidad (números de acceso al *GeneBank* del FF578829 al FF579034).

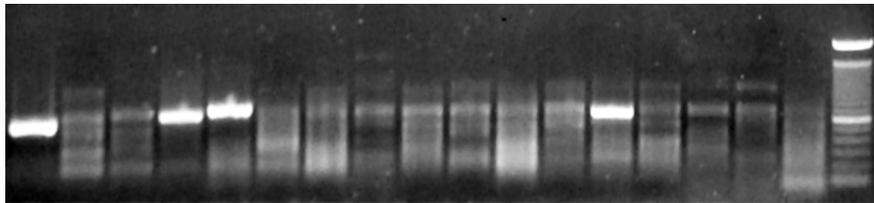


Figura 3: Ejemplo de gel de PCR de amplificación de los clones de la SSH.

Las secuencias obtenidas, una vez depuradas, fueron enviadas a los programas Blast (Blastn, Blastx y tBlastx) para ser clasificadas por homología con las secuencias ya depositadas en el *GeneBank* cogiendo para su clasificación las entradas correspondientes al Blastx.

De esta manera 14 de las 206 secuencias (6.8%) fueron similares ($e\text{-value} < 10^{-3}$) a genes estructurales de distintos organismos; 18 de 206 (8.7%) se clasificaron como genes del sistema inmune; 93 de 206 (45.1%) mostraron similitudes significativas con genes metabólicos; 18 de 206 (8.7%) se identificaron como genes ribosómicos y 9 de 206 (4.4%) fueron clasificados como otros. Además, 25 de 206 (12.1%) mostraron $e\text{-values}$ mayores o iguales que 10^{-3} y 29 de 206 (14.1%) no mostraron similitud con ninguna secuencia depositada en la base de datos.

En la figura 4 se muestra un gráfico con los porcentajes de las distintas agrupaciones de las secuencias expresadas (*expressed sequence tags*, ESTs) obtenidas en esta librería.

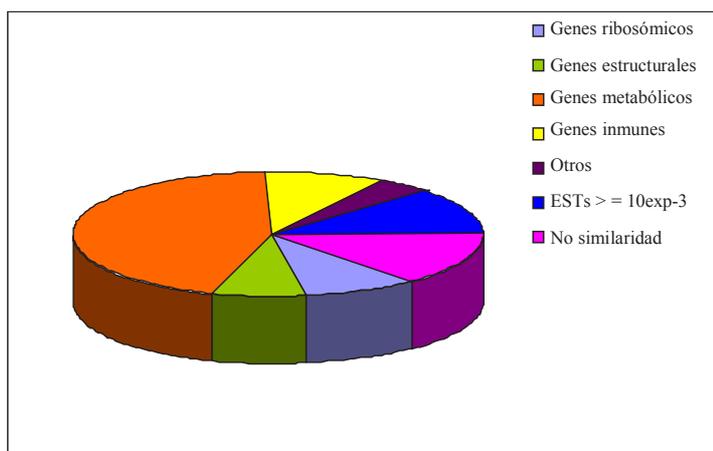


Figura 4: Clasificación de las secuencias obtenidas en la SSH.

Varias de las ESTs significativas representaron fragmentos del mismo gen. Así que, el número total de genes que fueron sobre-expresados en los riñones infectados fue de 70.

Los fragmentos similares a la hemoglobina fueron los más abundantes en la sustracción de librerías, presentando un total de 42 clones (20.4%), y la EST que tuvo un *e-value* más bajo, es decir, que se parecía más a una de las registradas en el *GeneBank* fue la *phosphogluconate hidrogenase* (Blastx, *expectation value* 2e-134).

La mayoría de las ESTs diferencialmente expresadas en los riñones infectados fueron clasificadas dentro de la categoría de genes metabólicos, es decir, genes que están implicados en alguna ruta metabólica.

Las identidades más importantes en el caso de una infección son las relacionadas con el estrés y con la respuesta inmune del organismo. Así dentro de la primera categoría son de destacar la *heat shock protein 90 beta* y la *beta-2 microglobulin* y dentro de la segunda la *apcs-prov protein*, la *beta-galactoside-binding lectin (galectin)*, la *mannose receptor C1*, la *Cd209e antigen* o la *serum lectin isoform 2*.

Una lista detallada de los genes obtenidos después de la búsqueda en el Blastx se muestra en la tabla 1.

TABLA 1

Identificación	Número de ESTs	Número de contigs	e-value (Blast X) más bajo	Longitud	Especie (* =teleosteo)
GENES ESTRUCTURALES					
Actin-related protein 2/3 complex (AAP20158)	1	1	8e-36	250	*Pagrus major
Apolipoprotein H (NP_001009626)	1	1	4e-20	643	Rattus norvegicus
Beta actin (AAR97600)	1	1	2e-81	466	*Epinephelus coioides
Beta-tubulin (BAB86853)	2	2	5e-57	351	Bombyx mori
Calcium binding protein (AAA91090)	1	1	7e-14	484	Meleagris gallopavo
Cytoplasmic actin type 5 (AAQ18433)	1	1	6e-29	472	Rana lessonae
Gelsolin, like 1 (NP_835232)	1	1	3e-43	766	*Danio rerio
Plasma retinol-binding protein II (P24775)	1	1	1e-34	461	*Oncorhynchus mykiss
PREDICTED: similar to myosin-VIIb (XP_574117)	1	1	3e-33	301	Rattus norvegicus
PREDICTED: similar to Rho-related GTP-binding protein (XP_696319)	2	1	6e-64	604	*Danio rerio
Tubulin beta-1 chain (Q9YHC3)	1	1	6e-60	352	*Gadus morhua
Type I collagen alpha 1 (BAD77968)	1	1	3e-19	665	*Paralichthys olivaceus
GENES INMUNES					
Apcs-prov protein (AAH82494)	1	1	2e-10	356	*Xenopus tropicalis
Beta-2 microglobulin precursor (O42197)	2	2	1e-23	572	*Ictalurus punctatus
Beta-galactoside-binding lectin (A28302)	1	1	5e-34	400	*Electrophorus electricus
Heat shock protein 90 beta (AAP20179)	1	1	9e-14	407	*Pagrus major
IgM heavy chain secretory form (AAL99929)	1	1	2e-69	589	*Chaenocephalus aceratus
Inmunoglobulin light chain L2 (AAB41310)	2	1	1e-24	582	*Oncorhynchus mykiss
Lymphocyte antigen 6 complex, locus D (NP_034872)	2	1	5e-05	375	Mus musculus
Major histocompatibility complex class Ib chain (BAD13366)	1	1	3e-44	538	*Paralichthys olivaceus
MHC class II protein (AAA49380)	1	1	9e-11	258	*Morone saxatilis
Mpx protein (AAH56287)	2	2	7e-10	440	*Danio rerio
PREDICTED: similar to Cd209e antigen (XP_687353)	1	1	2e-18	605	*Danio rerio
PREDICTED: similar to mannose receptor C1 (XP_686273)	1	1	7e-18	794	*Danio rerio
Serum lectin isoform 2 precursor (AAO43606)	1	1	3e-23	408	*Salmo salar
Tcp1 protein (AAH44397)	1	1	4e-37	403	*Danio rerio
GENES METABÓLICOS					
3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AAB31733)	3	1	8e-73	567	*Oncorhynchus mykiss
Acid phosphatase 1 isoform c variant (BAD93075)	1	1	7e-29	276	Homo sapiens
Acidic ribosomal phosphoprotein (AAP20211)	1	1	2e-50	368	*Pagrus major
Aldolase B (AAD11573)	1	1	3e-106	722	*Salmo salar
Copper/zinc superoxide dismutase (AAW29025)	2	1	3e-78	605	*Epinephelus coioides
Cystatin precursor (Q91195)	1	1	1e-20	281	*Oncorhynchus mykiss
Cytochrome c oxidase subunit I (NP_008805)	5	5	1e-71	550	*Mustelus manazo
Cytochrome c oxidase subunit III (NP_443365)	3	3	4e-32	392	*Crenimugil crenilabis
Ferritin heavy chain (AAP20171)	1	1	8e-04	411	*Pagrus major

3. Resultados

Ferritin heavy subunit (AAB34575)	3	1	3e-70	420	*Salmo salar
Ferritin middle subunit (AAB34576)	6	2	5e-82	518	*Salmo salar
GDP-mannose pyrophosphorylase A (NP_598469)	2	1	1e-61	805	Mus musculus
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (BAB62812)	1	1	8e-18	153	*Pagrus major
Glutathione peroxidase (AAO86703)	1	1	1e-80	717	*Danio rerio
Hemoglobin alpha-A subunit (Q9PVM4)	20	2	3e-63	612	*Seriola quinqueradiata
Hemoglobin beta chain (AAZ79648)	2	2	1e-33	498	*Nibea miichthioides
Hemoglobin beta-A subunit (Q9PVM2)	15	2	1e-64	510	*Seriola quinqueradiata
Hemoglobin beta-B subunit (Q9PVM1)	5	2	3e-60	496	*Seriola quinqueradiata
Nephrosin precursor (AAB62737)	4	3	1e-83	757	*Cyprinus carpio
Ornithine decarboxylase antizyme large isoform (AAP82035)	2	1	9e-53	398	*Paralichthys olivaceus
Phosphogluconate hydrogenase (AAH44196)	1	1	2e-134	840	*Danio rerio
Phosphogluconate isomerase (CAC83778)	1	1	2e-75	459	*Mugil cephalus
Predicted metal-dependent RNase (ZP_00323404)	1	1	2e-04	427	Pediococcus pentosaceus
PREDICTED: similar to probable endonuclease KIAA0830 precursor (XP_687673)	1	1	2e-07	625	*Danio rerio
RhAG-like protein (AAV28817)	1	1	1e-64	566	*Takifugu rubripes
Serine protease I-2 (BAD91575)	3	1	1e-46	730	*Paralichthys olivaceus
Spleen protein tyrosine kinase (AAK49117)	1	1	3e-64	441	*Cyprinus carpio
Steroidogenic acute regulatory protein (AAW62971)	1	1	3e-23	378	*Acanthopagrus schlegelii
Synaptophysin-like protein (AAQ94571)	2	1	7e-89	780	*Danio rerio
Thioredoxin (AAG00612)	1	1	8e-28	395	*Ictalurus punctatus
Ubiquitin-conjugating enzyme E2N-like (NP_956636)	1	1	3e-18	195	*Danio rerio

GENES RIBOSÓMICOS

40S ribosomal protein Sa (AAP20147)	1	1	4e-20	226	*Pagrus major
60S ribosomal protein L5 (CAH57700)	1	1	1e-36	260	*Platichthys flesus
60S ribosomal protein L6 (AAP20201)	2	1	2e-74	508	*Pagrus major
PREDICTED: similar to 60S ribosomal protein L29 (XP_517026)	2	1	5e-23	329	Pan troglodytes
PREDICTED: similar to ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor (XP_531829)	1	1	2e-67	573	Canis familiaris
Ribosomal protein L7 (AAZ23151)	1	1	1e-83	583	*Oryzias latipes
Ribosomal protein L9 (AAP20210)	2	1	1e-23	399	*Pagrus major
Ribosomal protein L27 (AAU50549)	2	1	5e-56	410	*Fundulus heteroclitus
Ribosomal protein L35 (NP_079868)	2	2	1e-20	264	Mus musculus
Ribosomal protein L37 (AAP20208)	3	1	3e-04	376	*Pagrus major
Ribosomal protein S7 (CAA64412)	1	1	1e-53	355	*Takifugu rubripes

OTROS

Differentially regulated trout protein 1 (AAG30030)	1	1	2e-07	419	*Oncorhynchus mykiss
Hypothetical 18K protein-goldfish mitochondrion (JC1348)	8	2	2e-26	701	*Carassius auratus

4. DISCUSIÓN.

La infección con nodavirus ha causado grandes mortalidades en cultivos de lubina en el mar Mediterráneo (Le Breton *et al.*, 1997) lo que ha llevado consigo unas pérdidas económicas bastante importantes. Tenemos muy poca información sobre cómo los organismos acuáticos son capaces de hacer frente a las infecciones virales así que es de interés estudiar cuáles son los genes implicados en la defensa de la lubina frente a este agente infeccioso.

Como se indicó en la introducción, la técnica de la sustracción de librerías es una herramienta muy poderosa para detectar cuáles son los genes que están implicados en la respuesta inmune de un organismo frente a un determinado patógeno. Así, en la presente tesis doctoral, se analizó la respuesta génica de la lubina infectada con nodavirus 4 horas después de haberse producido dicha infección y para ello se usó la técnica comentada anteriormente. El estudio se llevó a cabo en riñón por ser el órgano hematopoyético de peces teleosteos y, por tanto, uno de los más importantes en relación con la respuesta inmune; así, existen varios ejemplos de librerías realizadas en riñones de peces tras una infección con un agente patógeno o la inyección de un inmunoestimulante (Kono y Sakai, 2001; Alonso y Leong, 2002; Savan y Sakai, 2002; Tsoi *et al.*, 2004).

Los porcentajes de ESTs con identidad a genes conocidos fueron más elevados que los descritos previamente en otras librerías sustractivas o librerías de ADNc realizadas en peces como, por ejemplo, la librería de ADNc realizada en leucocitos del falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*) infectados con un rhabdovirus (Nam *et al.*, 2000), la librería de ADNc en riñones del falso halibut del Japón inyectados con peptidoglucono (Kono y Sakai, 2001), las librerías de ADNc realizadas en riñones de carpa estimulados con lipopolisacáridos y concanavalina-A (Savan y Sakai, 2002), las sustracciones de librerías realizadas en hígado, riñón y bazo de salmones infectados con la bacteria *Aeromonas salmonicida* (Tsoi *et al.*, 2004) y la sustracción de librerías realizada en cerebro de doradas infectadas con un nodavirus (Dios *et al.*, 2007).

Como era de esperar un gran porcentaje de secuencias se correspondieron con genes ribosómicos y del metabolismo celular pero además se obtuvo un porcentaje importante de genes relacionados con el sistema inmune, lo que cumple con el objetivo propuesto

demostrando nuevamente que la hibridación sustractiva se trata de una técnica muy eficaz para obtener información de la respuesta inmune de los peces frente a una infección viral.

Las categorías en que fueron englobadas las ESTs obtenidas fueron la de genes estructurales, genes relacionados con el sistema inmune, genes metabólicos, genes ribosómicos y otros (Tabla 1).

Dentro del primer apartado, el de genes estructurales, tenemos proteínas como la β -actina, la tubulina, la miosina, proteína de unión al calcio, etc. La presencia de proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto sugiere que podría estarse llevando a cabo una alta actividad de replicación celular. Además, la locomoción, fagocitosis y regulación de la forma celular son elementos cruciales en la función de los monocitos/macrófagos, células encargadas de modular la respuesta inflamatoria, así que las actinas del citoesqueleto y su reorganización se convierten en un punto importante de la regulación de la respuesta inmune (Goetz *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004).

Como se comentó en el apartado de resultados la mayor parte de las secuencias fueron englobadas dentro de la categoría de genes relacionados con el metabolismo (45.1%), algo que es común en la mayor parte de las librerías descritas (Goetz *et al.*, 2004) y que es indicativo de que existe una maquinaria que está actuando en la célula para hacer frente a la infección. Además aparecen gran cantidad de enzimas que podrían ser liberadas por las células inmunes para hacer frente a los patógenos como por ejemplo la serin-proteasa (Goetz *et al.*, 2004). En nuestra librería destaca sobre todo la presencia de la hemoglobina, ya que se trata del gen que presenta el mayor número de clones.

También es de destacar la categoría de genes ribosómicos, con un 8.7% del total, resultado bastante lógico ya que se está llevando a cabo la síntesis de multitud de proteínas. Estos genes aparecen, en mayor o menor cantidad, en casi todas las sustracciones de librerías que encontradas en la bibliografía (Bayne *et al.*, 2001; O'Farrell *et al.*, 2002; Tsoi *et al.*, 2004; Munir *et al.*, 2004; Wang y Wu, 2007; Gestal *et al.*, 2007).

El porcentaje de secuencias englobadas en la categoría de genes relacionados con la respuesta inmune del organismo fue del 8.7%, porcentaje muy similar a los descritos en otras librerías (Savan y Sakai, 2002; Goetz *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en este apartado están de acuerdo con los de librerías anteriores, así nos encontramos con genes que ya

aparecieron en la bibliografía como las lectinas tipo C (Bayne *et al.*, 2001; O'Farrell *et al.*, 2002; Savan y Sakai, 2002; Tsoi *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007), las galectinas (O'Farrell *et al.*, 2002; Goetz *et al.*, 2004), las pentraxinas (Alonso y Leong, 2002) y la proteína Cd209e (Goetz *et al.*, 2004); todas estas proteínas se incluyen dentro de la superfamilia de las lectinas, componentes del sistema inmune innato capaces de unir y posiblemente opsonizar microorganismos y que, por tanto, actúan como primera línea de defensa contra los patógenos; además la pentraxina pertenece al grupo de las proteínas de fase aguda, muy importantes como miembros del sistema inmune innato. A estas proteínas se dedicarán los capítulos 3 y 4 de la presente tesis doctoral.

Otras proteínas que encontramos en nuestra sustracción de librerías dentro del apartado de genes relacionados con el sistema inmune y que previamente habían aparecido en otras librerías de la bibliografía son: el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Nam *et al.*, 2000; Kono y Sakai, 2001; Goetz *et al.*, 2004; Tsoi *et al.*, 2004), la *heat shock protein 90 beta* (Kono y Sakai, 2001; Alonso y Leong, 2002; Goetz *et al.*, 2004; Tsoi *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005), la β -2 microglobulina (Nam *et al.*, 2000; Kono y Sakai, 2001; Tsoi *et al.*, 2004; Wang y Wu, 2007), el *lymphocyte antigen 6 complex* (Zhang *et al.*, 2008; Wang y Wu, 2007) las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina (Kono y Sakai, 2001; Savan y Sakai, 2002; Tsoi *et al.*, 2004) y la proteína del complejo T, *Tcp1 protein* (Tsoi *et al.*, 2004).

El complejo mayor de histocompatibilidad de clase II está formado por glucoproteínas unidas a la membrana que se encuentran en las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas y células B) donde presenta péptidos antigénicos procesados a células T_H. Las moléculas de MHC clase II contienen dos cadenas polipeptídicas diferentes, una cadena alfa de 33 kDa y una cadena beta de 28 kDa que se vinculan mediante interacciones no covalentes. Son glucoproteínas unidas a membrana que contienen dominios externos (dos dominios en cada una de las cadenas: alfa-1, alfa-2, beta-1 y beta-2), un segmento transmembrana y un segmento citoplásmico de fijación (Goldsby *et al.*, 2004).

Con el nombre de Hsp90 se define una familia de chaperonas moleculares altamente conservadas desde procariotas a eucariotas. A pesar de no ser esencial para el crecimiento normal de la mayoría de las bacterias, Hsp90 es expresada de forma abundante en eucariotas superiores donde se mostró que es necesaria para su viabilidad (Brown *et al.*, 2007). La expresión de las *heat shock proteins* es inducida en respuesta a una amplia variedad de agresiones fisiológicas y ambientales (Schmitt *et al.*, 2007). Estas proteínas tienen una doble

función dependiendo de su localización intracelular o extracelular, así las *heat shock proteins* intracelulares tienen una función protectora permitiendo que las células sobrevivan en condiciones letales y las extracelulares o las unidas a membrana median funciones inmunológicas pudiendo obtener una respuesta inmune modulada o bien por el sistema inmune innato o bien por el adaptativo (Schmitt *et al.*, 2007).

La β -2 microglobulina es un polipéptido de aproximadamente 12 kDa que está unido de forma no covalente a la cadena pesada del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, presente en la superficie de casi todas las células nucleadas, (Ploegh *et al.*, 1981) y que también puede estar libre en los fluidos corporales (Groves y Greenberg, 1982). La β -2 microglobulina es de especial interés porque está estructuralmente relacionada y muestra homología con las inmunoglobulinas y en relación con el sistema inmune interacciona con el C1, el primer componente del complemento. Parece que puede jugar un papel a nivel de activación de las células T y B (Groves y Greenberg, 1982).

Las moléculas de anticuerpo, o inmunoglobulinas, tienen una estructura común de cuatro cadenas peptídicas: dos cadenas ligeras (L) idénticas y polipeptídicas con un peso molecular aproximado de 25 kDa y dos cadenas pesadas (H) también idénticas y polipeptídicas con un peso molecular de 50 kDa o mayor. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro y por interacciones no covalentes (uniones de sal y enlaces de hidrógeno e hidrofóbicos) para formar un heterodímero. Las dos combinaciones idénticas de cadenas pesada y ligera están unidas entre sí por interacciones no covalentes similares y por puentes disulfuro para formar la estructura de anticuerpo básica de cuatro cadenas (Goldsby *et al.*, 2004).

La proteína del complejo T (*Tcp1 protein*) es un representante del grupo de las chaperoninas, complejos en forma de doble anillo compuestos por subunidades proteicas altamente conservadas de 60 kDa (Wagner *et al.*, 2004).

Estos resultados apoyan la idea de que varios genes inmunes están altamente conservados a lo largo de la evolución y son los principales actores de las respuestas de defensa innata y adaptativa tanto en mamíferos como en peces.

Además aparecen otras proteínas que no fueron clasificadas en ninguno de los grupos antes indicados como la *differentially regulated trout protein* cuya función es

desconocida hasta el momento aunque Bayne *et al.* (2001) proponen que la función de esta proteína podría ser proteger a las células del posible daño causado por la activación del complemento.

*Capítulo III: Caracterización
de los genes seleccionados.
Lectinas.*

1. INTRODUCCIÓN.

En el capítulo anterior se han descrito todos los resultados de la sustracción de librerías realizada en riñones de lubinas infectadas con nodavirus, en este capítulo se estudiarán con más detalle algunas de las secuencias obtenidas: las correspondientes a las lectinas.

Como se ha comentado en la introducción general el sistema inmune innato es la primera línea de defensa frente a patógenos. Así, en una infección viral, existe una compleja red de proteínas que es capaz de activar determinadas vías (e inactivar otras) para combatir de la mejor manera posible la infección.

Las lectinas son un grupo de proteínas que están presentes en la mayoría de los seres vivos (animales, plantas, hongos, protistas y bacterias) y que han sido estudiadas con gran detalle por sus implicaciones biológicas. Se trata de proteínas que unen carbohidratos de forma específica y, de esta manera, son capaces de reconocer determinados glicoconjugados (Barondes *et al.*, 1994; Arason, 1996; Weis y Drickamer, 1996). La interacción de los carbohidratos con las lectinas se produce a través de puentes de hidrógeno, enlaces que implican metales, puentes de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Weis y Drickamer, 1996; Elgavish y Shaanan, 1997).

Estas proteínas están involucradas en numerosos procesos celulares como son las interacciones célula-célula, las interacciones célula-matriz extracelular y la interacción con determinadas proteínas (Elgavish y Shaanan, 1997; Vasta *et al.*, 2004a; Vasta *et al.*, 2004b), y se considera que juegan papeles importantes en la defensa del hospedador junto con los factores de defensa humoral (Ingram, 1980; Alexander e Ingram, 1992; Cooper, 2002; Almkvist y Karlsson, 2004; Fujita *et al.*, 2004; Vasta *et al.*, 2004b). En este sentido, las lectinas están involucradas en el reconocimiento de patógenos y en las interacciones celulares que tienen como finalidad la neutralización de dicho patógeno (Weis *et al.*, 1998).

La mayoría de las lectinas animales pueden ser clasificadas en siete familias: lectinas tipo S (también conocidas como galectinas), lectinas tipo C (incluyendo selectinas, colectinas e hialectinas), pentraxinas, lectinas tipo I, lectinas tipo P, ficolinas y citoquinas (Kilpatrick, 2000).

1.1. Lectinas tipo S o galectinas.

Las galectinas o proteínas de unión a beta-galactósidos son pequeñas proteínas solubles que están ampliamente distribuidas dentro de los vertebrados pero también están presentes en invertebrados (lombrices e insectos) e incluso en hongos y protozoos (Hirabayashi *et al.*, 1992; Pfeifer *et al.*, 1993; Cooper *et al.*, 1997; Solís *et al.*, 2000; Pace *et al.*, 2002). Estas proteínas fueron descritas por primera vez en el órgano eléctrico de la anguila (Teichberg *et al.*, 1975) y se definen por dos propiedades: la presencia de un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y su afinidad, de forma independiente de Ca^{2+} , por los beta-galactósidos (Drickamer y Taylor, 1993; Hirabayashi y Kasai, 1993; Barondes *et al.*, 1994; Cooper y Barondes, 1999; Kilpatrick, 2000). El CRD está compuesto por 130 aminoácidos, de los cuales muchos están altamente conservados y tienen una estructura terciaria formada por dos láminas beta. Las galectinas de mamíferos se clasificaron en un principio en diez familias basándose en su secuencia de aminoácidos (números 1-10), aunque Vasta *et al.* (2004a) hablaron ya de 14 familias en vertebrados superiores y en una revisión realizada por Camby *et al.* (2006) describieron que, en mamíferos, se habían identificado 15 galectinas distintas.

Pero una clasificación desde el punto de vista estructural de sus subunidades las divide en tres tipos: proto, quimera y de repetición en tándem. Las galectinas de tipo proto contienen tan sólo el CRD. Las de tipo quimera tienen, además del CRD hacia el extremo C-terminal, una región N-terminal que contiene una zona de unión seguida de un importante dominio de secuencias repetitivas cortas ricas en prolina-glicina-tirosina. Por último, las galectinas de repetición en tándem contienen dos CRDs homólogos en cada uno de los extremos de la cadena polipeptídica unidos por una pequeña región rica en glicinas (Hirabayashi y Kasai, 1993; Kilpatrick, 2000).

Todas ellas tienen varias características en común: actividad independiente de Ca^{2+} , especificidad por los β -galactósidos, extremo N-terminal acetilado, carencia de péptido señal, falta de carbohidrato unido, carencia de glicosilación y localización predominantemente citoplasmática (Kilpatrick, 2000; Cooper, 2002). Además de las galectinas de mamíferos, esta familia ha sido descrita en nemátodos (Hirabayashi *et al.*, 1992; 1996), peces (Teichberg *et al.*, 1975; Parotaud *et al.*, 1987; Muramoto y Kamiya, 1992; Ogawa *et al.*, 1999; Inagawa *et al.*, 2001), ranas (Bols *et al.*, 1986; Ahmed *et al.*,

1996), lagartijas (Solís *et al.*, 2000) y pollos (Levi y Teichberg, 1985; Scheneller *et al.*, 1995), entre otros.

1.2. Lectinas tipo C.

La característica más importante de las lectinas tipo C es su dependencia del ión Ca^{2+} para su actividad, se trata de proteínas que están ampliamente distribuidas en el reino animal (Drickamer, 1988; Kilpatrick, 2000; Dodd y Drickamer, 2001). Muchas lectinas tipo C juegan papeles importantes en el sistema inmune, así, la lectina de unión a manosa es capaz de activar el sistema del complemento por unión a glicoproteínas de la superficie celular de los microorganismos (Lu *et al.*, 1990). Las lectinas tipo C se encuentran entre las primeras lectinas animales descubiertas, así a principios del siglo pasado se descubrió una colectina bovina (Bordet y Gay, 1906). Su capacidad de unión a los carbohidratos está mediada por una estructura compacta denominada dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) o dominio tipo c-lectina (CTLD), que está presente en todas las lectinas con dependencia de Ca^{2+} pero no en otros tipos de lectinas animales. Este dominio tiene una estructura de doble-bucle que contiene más de 130 residuos aminoacídicos y la comparación de la secuencia de esta estructura en lectinas tipo C procedentes de diferentes organismos revela que existen unos residuos conservados característicos de este dominio. De particular importancia son los residuos de cisteína, altamente conservados, que parecen estar envueltos en la formación de dos o tres puentes disulfuro y la, también altamente conservada, secuencia “WIGL” (Drickamer, 1988; Drickamer y Taylor, 1993; Kilpatrick, 2000; Zelensky y Gready, 2005). En este mismo sentido, estudios cristalográficos también confirmaron que los CRDs de las lectinas tipo C tienen una estructura globular compacta diferente a la de cualquier proteína conocida. Basándose en la estructura de los dominios de reconocimiento de carbohidratos las lectinas tipo C fueron clasificadas en siete grupos (Drickamer, 1993, 1999). Esta clasificación fue revisada en el 2002 por Drickamer y Fadden llevándose a cabo la adición de siete nuevos grupos y, posteriormente, Zelensky y Gready (2005) mostraron tres grupos nuevos. Así, las lectinas tipo C se clasifican en 17 grupos de la siguiente manera: (I) *lecticans*, (II) asialoglicoproteína y receptores DC, (III) colectinas, (IV) selectinas, (V) receptores de células NK, (VI) receptores endocíticos multi-CTLCD, (VII) grupo rojo, (VIII) condrolectina, *layilin*, (IX) tetranectina, (X) policistina I, (XI) atractina, (XII) proteína básica principal de los eosinófilos (EMBP), (XIII) DGCR2, (XIV) trombomodulina, (XV) *bimlec*, (XVI) SEEC y (XVII) CBCP/Frem1/QBRICK. Sin embargo, basándose en sus propiedades de unión al ligando se dividen en tan sólo dos grupos: las que unen manosa y las que unen

galactosa; estos dos grupos difieren en algunos residuos clave que intervienen en el sitio de unión al ligando (Weis *et al.*, 1998; Zelensky y Gready, 2005).

1.3. Pentraxinas.

La familia pentraxina es conocida por este nombre debido a la estructura pentamérica de sus miembros (Whitehead, 1989). Se trata de una pequeña familia de proteínas cuyos miembros pueden ser divididos en dos grupos en función de sus características estructurales: las clásicas pentraxinas “cortas” de aproximadamente 25 kDa y las nuevas pentraxinas “largas” de entre 40 y 50 kDa (Goodman *et al.*, 1996; Garlanda *et al.*, 2005). Estas proteínas llevan a cabo su función de unión a los ligandos de manera calcio-dependiente (Kilpatrick, 2000; Bayne y Gerwick, 2001).

Las clásicas pentraxinas “cortas” son la proteína C-reactiva (CRP) y la proteína amiloide del suero (SAP) que son producidas, fundamentalmente por hepatocitos, como parte de la respuesta de fase aguda a un trauma o una infección. La expresión de estos genes está regulada por citoquinas, especialmente por la IL-1, el TNF y la IL-6, y también por glucocorticoides. Las concentraciones en el suero de estas proteínas pueden incrementarse más de mil veces en unas pocas horas durante la respuesta de fase aguda (Goodman *et al.*, 1996). La CRP se identificó originalmente por su habilidad para precipitar el C-polisacárido de *Pneumococcus* en presencia de calcio (Goodman *et al.*, 1996; Bayne y Gerwick, 2001; Du Clos y Mold, 2004) y presenta afinidad por la fosfocolina (Szalai *et al.*, 1999; Szalai, 2002a, 2002b; Du Clos y Mold, 2004; Garlanda *et al.*, 2005); esta proteína es sintetizada principalmente en el hígado y los estímulos más importantes que provocan su síntesis son la IL-1 y la IL-6. Dicha síntesis tiene lugar en forma de monómeros y el ensamblaje de los mismos para formar el pentámero ocurre en el retículo endoplasmático (Du Clos y Mold, 2004). Una de las actividades más importantes de la CRP es su habilidad para interactuar con el C1q para activar la cascada clásica del complemento (Du Clos y Mold, 2004).

SAP es la glicoproteína precursora de la proteína amiloide P depositada en las lesiones de tejidos presentes en todas las formas conocidas de amiloidosis (Goodman *et al.*, 1996). Se caracteriza por su unión a la agarosa y, en particular, a un componente de la agarosa que es el *4,6-cyclin pyruvate acetal* de la β -D-galactosa (Garlanda *et al.*, 2005).

Las pentraxinas “largas” se descubrieron más recientemente y su tamaño es aproximadamente el doble del de CRP y SAP. Hasta la fecha se conocen cinco pentraxinas “largas” que son: apexin/p50, XL-PXN1, NPI, NPII y TSG-14/PTX3. Ésta última fue la primera en ser descrita y es la mejor caracterizada de este grupo de pentraxinas (Goodman *et al.*, 1996).

La homología entre las pentraxinas “cortas” y las “largas” está limitada a la mitad carboxi-terminal de las proteínas largas (Goodman *et al.*, 1996; Kilpatrick, 2000) sugiriendo que las pentraxinas “largas” surgieron como resultado de la fusión de nuevos dominios amino-terminales a un dominio ancestral de pentraxina (Goodman *et al.*, 1996). El dominio pentraxina está muy conservado en mamíferos, vertebrados inferiores y artrópodos (Garlanda *et al.*, 2005).

1.4. Lectinas tipo I.

Las lectinas tipo I son proteínas de unión a carbohidratos que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se trata de proteínas integrales de membrana con una región extracelular que posee un dominio inmunoglobulina con capacidad de reconocimiento de carbohidratos (Kilpatrick, 2000).

1.5. Lectinas tipo P.

Las lectinas tipo P son una familia de proteínas compuesta por dos miembros (*cation-dependent mannose 6-phosphate receptor* (CD-MPR) e *insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor* (IGF-II/MPR)) que se distinguen de las otras lectinas por su capacidad para reconocer residuos de manosa fosforilados. Estas proteínas juegan un papel esencial en la generación de lisosomas funcionales en las células de los eucariotas superiores (Dahms y Hancock, 2002).

1.6. Ficolinas.

Las ficolinas son una pequeña familia de lectinas caracterizadas por la posesión de un dominio fibrinógeno combinado con un dominio colágeno. No tienen un dominio de reconocimiento de carbohidratos propiamente dicho, en su lugar dependen del dominio fibrinógeno que es el que presenta la actividad lectina (Kilpatrick, 2000).

1.7. Citoquinas.

Algunas proteínas conocidas formalmente como citoquinas pueden tener actividad de reconocimiento de carbohidratos (Kilpatrick, 2000).

En este capítulo nos hemos centrado en el estudio y caracterización de dos lectinas tipo C, una galectina-1 y una pentraxina que habíamos obtenido como resultado de la sustracción de librerías descrita en el capítulo anterior.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Amplificación por RACE.

A partir de algunas de las ESTs obtenidas como resultado de la sustracción de librerías se realizó la técnica del RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*) para completar las secuencias tanto en sentido 5' como en 3' hasta obtener el ORF completo. Esta técnica se aplicó en el caso de dos c-lectinas, una galectina y una pentraxina.

Para realizarla se utilizó el *SMART RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech). Este *kit* contiene la *PowerScript Reverse Transcriptase*, enzima que tiene actividad transferasa terminal y que añade 3-5 residuos (predominantemente dC) al extremo 3' de la primera hebra de ADNc. El *SMART oligo*, también presente en el *kit*, contiene una extensión terminal de residuos de G que anilla con la cola del ADNc rica en dC y sirve como base para iniciar la retrotranscripción. El ADNc obtenido es utilizado directamente en las reacciones de PCR de RACE 5' y 3', sin necesidad de tener que llevar a cabo ninguna ligación de adaptadores, utilizando un cebador diseñado para el gen específico que se quiera amplificar y otro cebador universal (*Universal Primer Mix*, UPM).

Los productos de PCR obtenidos como consecuencia de la reacción de RACE fueron purificados de un gel de agarosa al 1.2% utilizando el *Ultrafree-DA DNA extraction from agarose gels* (Millipore), y clonados en un vector de ligación (pcR 2.1 vector) utilizando el *The Original TOPO T/A Cloning Kit* (Invitrogen).

Los cebadores utilizados para realizar los distintos RACEs están resumidos en la tabla 1.

Tabla 1: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Tipo de lectina	RACE	Nombre	Secuencia 5'-3'
SbCLA	5'	Lectina-1 RACE	CCCATTTCATTGCCCTTCCACTCC
SbCLA	5'	C-Lectina 1 RACE 5'	CATCGTTGCTGGTCTTTAACTCGC
SbCLA	3'	C-Lectina 1 RACE 3'	GCACTTTACTCAATGGCACACAGC
SbCLB	5'	Lectina-3 RACE	ATGGCACAGACGAGTAGAGACACAG
SbCLB	3'	Lectina-3 RACE	CTGTGTCTCTACTCGTCTGTGCCAT
SbCLB	3'	C-Lectina 3 RACE 3'	GGCCTTTCATTCTGGAGACTCAAC
Sbgalectin-1	3'	Galectina RACE 3'	GCAGGGGCAACCAACCATTGATAG
Sbpentraxin	5'	Pentraxina RACE 5'	CTTTCAGCATCACCACCAGCAGCAA
Sbpentraxin	3'	Pentraxina RACE 3'	GCCACACCCTCTAAAACCAATGC
Sbpentraxin	3'	Pentraxina RACE 3'b	CGAGGGCAGGACTACAAGCCGAAC

Sbpentraxin	3'	Pentraxina RACE 3'c	TGGGACTACATCCTTTTACCCTG
Sbpentraxin	5'	Pentraxina RACE 5'b	GCATTGGTTTTAGAGGGTGTGGC

2.2. Estudio de las secuencias de ADNc.

Los alineamientos de las secuencias proteicas fueron realizados usando el programa ClustalW (<http://align.genome.jp/>) y los dominios conservados se buscaron con varios programas: Blastp del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>) y SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). El punto isoeléctrico y el peso molecular teóricos fueron calculados con el compute pI/Mw (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html); se utilizó el Signal IP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) para la detección del péptido señal; TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) y SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) para la detección de los dominios transmembrana y, por último, el Disulfind (<http://disulfind.dsi.unifi.it>) para la detección de los posibles puentes disulfuro de la estructura cuaternaria de la proteína.

2.3. Construcción de árboles filogenéticos.

Las secuencias proteicas de las lectinas de lubina fueron alineadas junto con las de otros organismos, obtenidas del *GenBank*, mediante el uso del *ClustalX* (Thompson *et al.*, 1997). Una vez obtenidos los alineamientos fueron transferidos al programa *MacClade* (Maddison y Maddison, 2003) y filtrados mediante el *Gblocks software* (Castresana, 2000) que elimina las regiones divergentes y las pobremente alineadas. Los parámetros aplicados en el *Gblocks* fueron de 8 pares de bases como número máximo de posiciones continuas no conservadas y de 5 como longitud mínima. Una vez hecho esto se utilizaron el *PAUP*software* versión 4.0b10 (Swofford, 2000) y el *PHYML software* (Guidon y Gascuel, 2003) para construir los árboles filogenéticos. Se llevó a cabo un *bootstrapping* de 100 réplicas en cada uno de los árboles realizados y finalmente se utilizó el *TreeViewX* (Page, 1996) para editarlos.

2.4. Secuencia genómica de la Sbglectin-1.

Se extrajo ADN total de lubina mediante el método de fenol-cloroformo. Se diseñaron cebadores sobre la secuencia de ADNc y se fueron llevando a cabo las PCRs correspondientes, los productos de PCR fueron clonados y secuenciados usando un 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). La identificación de los intrones en la secuencia se realizó utilizando el programa Wise 2 disponible on-line (<http://www.ebi.ac.uk/Wise2/advanced.html>).

2.5. Estudios de expresión de las lectinas.

Se realizaron estudios de expresión de las lectinas seleccionadas mediante la técnica de la *Real-Time PCR* (qPCR) en riñón cefálico a 4 y 72 horas post-infección. Se aisló el ARN, se trató con *DNAsa* y se utilizaron 5 µg del mismo para obtener el ADNc tal y como se describió en el capítulo I de la presente tesis doctoral. Los ensayos de PCR cuantitativa se realizaron en un *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando para ello cebadores específicos diseñados con la ayuda del *Primer 3 software* (Rozen y Skaletsky, 2000) que están recogidos en la tabla 2.

Tabla 2: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Nombre	F / R	Secuencia 5'-3'
β-actin	Forward	GTGCGTGACATCAAGGAGAA
β-actin	Reverse	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG
SbCLA	Forward	ATGGGTAGATGGGACACCAA
SbCLA	Reverse	TAGCCAGAGCTAGCCAGAGG
SbCLB	Forward	CCGGTGAAGGGACAGAATTA
SbCLB	Reverse	TGAGTGGATACGCCTGAGTG
Sbglectin-1	Forward	CATGACCATTGTTGGAGTCG
Sbglectin-1	Reverse	AGGGGTGAATTCAATGGTGA

0.5 µl de cada uno de los cebadores (10µM) fueron mezclados con 12.5 µl de *SYBR green PCR master mix* (Applied Biosystems) en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

- 10 minutos a 95 °C
- 40 ciclos
 - 15 segundos a 95 °C
 - 1 minuto a 60 °C

Se usó el método comparativo CT (2- $\Delta\Delta$ CT method) para determinar el nivel de expresión de los genes analizados (Livak y Schmittgen, 2001). La expresión de los genes candidatos fue normalizada usando la β -actina como gen control. Se calculó el nivel de expresión los valores normalizados de los peces infectados entre los valores normalizados de los peces controles de forma que si el nivel de expresión es mayor que 1 significa que hay un aumento de expresión en los infectados.

2.5. Estadística.

Los datos se analizaron estadísticamente usando la prueba de la t de Student, de manera que los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar y las diferencias entre los peces controles e infectados fueron consideradas estadísticamente significativas en aquellos casos en los que $p < 0.05$.

3. RESULTADOS.

La EST resultado de la sustracción cuyo nombre en la tabla del capítulo II era “PREDICTED: similar to Cd209e antigen” de 605 pares de bases fue caracterizada como lectina tipo C (SbCLA) y la amplificación por RACE en sentido 5’ y 3’ permitió obtener una secuencia completa de 2266 pb (número de acceso al *GeneBank* EU660935) que presentó una pauta abierta de lectura (desde el nucleótido 187 al 1578) que codificaba para una proteína de 463 aminoácidos y con un tamaño teórico de 54 kDa (Figura 1). En esta figura podemos observar el codón de inicio y el de stop marcados de negrita, el dominio transmembrana de 23 aminoácidos presenta las letras de color naranja y el dominio característico de las lectinas tipo C, que es el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), está de azul. Por último, la señal de poliadenilación “AATAAA” está indicada de color rojo.

GGACCACCACACAAGGATTTAAAGTGAGTGTTCATGTATTGAAGCATATCTGCACTGTTTTTGCAG
GTTGAAGTGCTCGAAATCAGTAGGTTAGCATTACTCTCCGAGATTGCTCAAAACATCATTCCTCG
ATATTTCAAGACTCTACAGACAGAGACTACAGCTCATGAAGCAGATGCAAAG

ATG GCT GTT GAG TAC CAT GCC TCT ACA GTG ACA AAC ATG GAC ATT GAA AAC ACT AAA
M A V E Y H A S T V T N M D I E N T K
ATT GGA TAC AAG CAA CTC TTT ACG GAT GGC AGC AAG CTC CGG TAT TCA GTT TAT GCA TTG
I G Y K Q L F T D G S K L R Y S V Y A L
AGA AAC AGC CCT TTC CGG GTT GCT ACA CTC TGC CTT GGT CTG CTG TGT GTC ATC CTG TTG
R N S P F R V A T L C L G L L C V I L L
GCT GGG GTC ATA GGT CAG AGT GTC CAC TAC CAA AAA GCA GAG CAA GAC CGT GAG AGC
A G V I G Q S V H Y Q K A E Q D R E S
AAC CTA AAA GCC TTG AGT GAA GAG AAA GAG AAA CTA CAG GTG GAC CTG AAG ACA GTG
N L K A L S E E K E K L Q V D L K T V
CAA AAA GAC AAA AGG GAT CTT CAG GCC AAA AGT AAT CAG TTA CAG CAG CAA AAT GAT
Q K D K R D L Q A K S N Q L Q Q Q N D
TTA TTA ACT AAA AGG AAA GAA CAG ATA CAG ATC AAT AAC AAT TTA CTG ACT GAG CAA
L L T K R K E Q I Q I N N N L L T E Q
ACA AAC CAA CTT AAA AAT AGT CAA AGC GAG TTA AAG ACC AGC AAC GAT GCT TTG AAG
T N Q L K N S Q S E L K T S N D A L K
AAA GCG AAA GAA GAG CTA GAA GCA AGC AAA GAC CAA TTG AAG CTT AGC AAC AAT GCC
K A K E E L E A S K D Q L K L S N N A
TTG TCT ACA GCC AAA GAC CTG TTA CAA AAA AAT TAT GAT TTA GTG ATC CAA CGC AAA
L S T A K D L L Q K N Y D L V I Q R K
AGT GAG TTA CAG ACC AGA TAT GAC TCA GTG ACT AGA GAC AGA GAC AAT TTA CAG AAC
S E L Q T R Y D S V T R D R D N L Q N
AAA TAC AAT AAT GTA ACC AGA TCC AAA GAG CAG TTG CAA AAG GAT TAC AAT GCC CTG
K Y N N V T R S K E Q L Q K D Y N A L
ATC AAG GAT GTA GAG CAT TTG CAG GAC AGA TAC AAC TTC TCT TCC AGG GAG AAA GAC
I K D V E H L Q D R Y N F S S R E K D

3. Resultados

```
AAG CTA GAA AGC AGT CAC CAA AAC CTG ACG ATA ACA AAA GAG ACT CTG CAG GCC AAT
K L E S S H Q N L T I T K E T L Q A N
TTC AAC GTA CTT GTA AAG GCA ACA GAT GAG TTG CGG GCG TCT TAC TCG TCC TTG ATT CAG
F N V L V K A T D E L R A S Y S S L I Q
GAA AAA AAA GAG CTA GAA AAG AGT TGC AAA AAC GTA ACT GTG GAG AGA GAC TGG CTG
E K K E L E K S C K N V T V E R D W L
AAG ACA AAC AAT GAC AAC CTG ACT ACT GAG AGA GAC CAG CTT CAG ATG GAA GTG GAG
K T N N D N L T T E R D Q L Q M E V E
AGA CTG AAC GCA ACG ATT CAA GAT AAG AAA TGC CCC TCT GGT TGG AAG AAA TTC GAG
R L N A T I Q D K K C P S G W K K F E
TAC AGC TGT TAC TTC ACT TCT TCT AGC AAG AGG ACC TGG AAT CGG AGC AGA GAA TAC TGT
Y S C Y F T S S S K R T W N R S R E Y C
CAG ACC AAA GAA GCA GAC CTG GCA ATC ATA ACA AGC CAA GAA GAA ATG ACC TTC ATC
Q T K E A D L A I I T S Q E E M T F I
AAT GCC TTG TAT GGA AGT GAG AAA GAA GTC TGG ATT GGA TTA TCT GAT GAA GGA GTG
N A L Y G S E K E V W I G L S D E G V
GAA GGG CAA TGG AAA TGG GTA GAT GGG ACA CCA ATG ACC AAA GCG TTC TGG GGT AAA
E G Q W K W V D G T P M T K A F W G K
GAC CAG CCC AAC AGC CAC ATG GGG AGG AAC CAG GAC TGT GTG GAG TTC TGG CAC CGT
D Q P N S H M G R N Q D C V E F W H R
GCG TCA GGG ACT GGA GAC TGG AAT GAT GAG AAC TGT GCC ATA GAA CAA AAC TGG ATC
A S G T G D W N D E N C A I E Q N W I
TGT GAG AAG TAG
C E K Stop
TTTTCTCTGGCTAGCTCTGGCTACTGATGGCCATCATGTAATATCAGTGTATACAAAAAATAAAT
GCACATTAGGGACTGTGGTCAGTGGATTGGAAGTAACAGATAAATCAGTTTGCTTCAATCCATATTA
TGTGAGCACTTTACTCAATGGCACACAGCATTGCTAACAGCTAAAACCTGAAATGTATTGTTGTG
ATAAGTAATGCATTATGAAATCACTTTAGCAGATAGCCATTATGTGCTGGGGCAGGTACATTAAT
GTAGTTTGGCTGGAGCAAACCTCTGTATTATGGAACAGTTTGGCTCAAAGAGGACCAAGCTTTCCA
TAGCTATCTGTACATACTGTAGAAACAATTAAGATTTTCTAAAGAAAGACACTTGATGATTATGTT
AATTCATTTGCTACTGGGATTAATTAATTAAGCATTTCCCAAGAGTTGTACCTATTATTCAGTTCCTG
CTGAGCTAGTGAGCATCTGGGTTAAGGTTGAACTGGCTAACATTAATATACGTATTATGCATTATTC
ATTATGTATTAACAACCAATTCAATCAGTGCTTTAACTATTCAATTGACAAATTAATGATATTTATGTT
CTCATATACACCTTTATGTATTCATTCATGTAACACACATTTAATAAAAATCCCTTGCAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Figura 1: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de SbCLA.

Se realizó un alineamiento entre el dominio de reconocimiento de carbohidratos de esta secuencia y los de lectinas tipo C de otras especies tomadas del GenBank. Dicho alineamiento confirmó claramente que nuestra secuencia pertenecía a la familia de lectinas tipo C (Figura 2). Se observaron seis cisteínas en las regiones conservadas del dominio de lectinas tipo C (marcadas de amarillo en la figura 2), estas cisteínas son necesarias para la formación de tres puentes disulfuro intramoleculares, esenciales para la estabilidad de dicho

dominio (Soanes *et al.*, 2004), los puentes disulfuro los forman las cisteínas de las siguientes posiciones C³³⁷-C⁴⁶¹, C³⁴⁸-C³⁶⁵ y C⁴³⁵-C⁴⁵³.

La secuencia SbCLA presenta 3 de los 4 residuos esenciales del sitio 1 de unión al ión Ca²⁺ (marcados de rosa) y 3 de los 5 residuos del sitio 2 (marcados de verde) (Figura 2) (Soanes *et al.*, 2004; Zelensky y Gready, 2005). Además, podemos observar, marcada de azul, la secuencia altamente conservada “WIGL” (Zelensky y Gready, 2005) y resaltada en marrón y negrita la secuencia “QPN”, que es distinta de las secuencias típicas de las lectinas tipo C que son o bien EPN (característica de las proteínas que unen manosa) o bien QPD (característica de las proteínas que unen galactosa) (Zelensky y Gready, 2005).

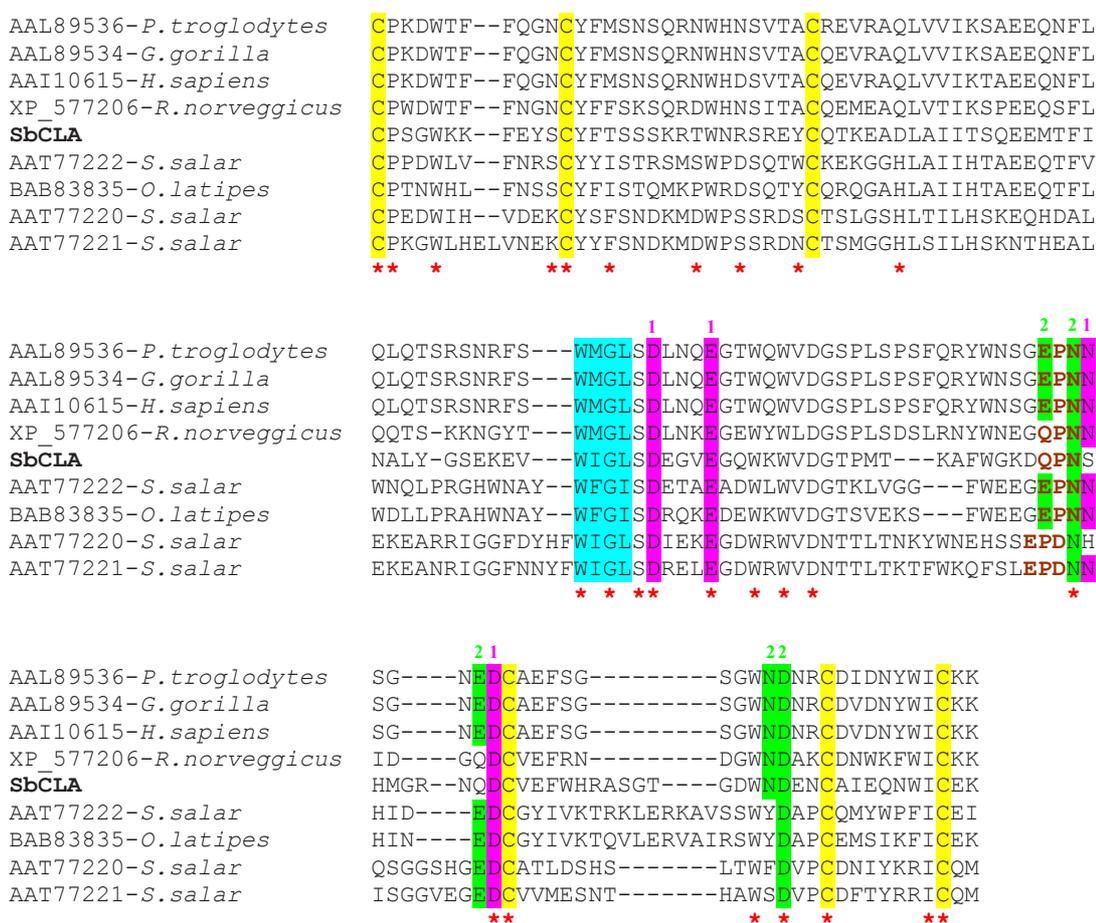


Figura 2: Alineamiento entre el dominio de reconocimiento de carbohidratos de la SbCLA y los de lectinas tipo C de otras secuencias tomadas del *GenBank*.

La EST resultado de la sustracción cuyo nombre en la tabla del capítulo II era “Serum lectin isoform 2 precursor” de 408 pares de bases fue caracterizada como lectina tipo C (SbCLB) y la amplificación por RACE en sentido 5’ y 3’ permitió obtener una secuencia completa de 719 pb (número de acceso al *GeneBank* EU660936) que presentó una pauta abierta de lectura (desde el nucleótido 61 al 579) que codificaba para una proteína de 172 aminoácidos y con un tamaño teórico de 19 kDa (Figura 3). En esta figura podemos observar el codón de inicio y el de stop marcados de negrita, el péptido señal presenta las letras de color naranja y el sitio de corte (entre los aminoácidos 20 y 21) está marcado con una flecha de color naranja y el dominio característico de las lectinas tipo C está de azul.

```

ACCTGAACACAAGAAGGTCGAAGCTACAAGCGGACAAAGAAGATAATCCAGCTGGAGATC
ATG AAG ATG CTG ACT GTG TCT CTA CTC GTC TGT GCC ATG ATG GCT TGG ACC ACA GCT GCT
M K M L T V S L L V C A M M A W T T A A▼
GCT GTT CCA GAA GCA GAG ACC GGT GAA GGG ACA GAA TTA TCC ATC CAA GGA GGG AAT
A V P E A E T G E G T E L S I Q G G N
AGT CCC ATC GCT TGT CCC ACT GGT TGG ACT GGT TAC AAC GAT CGC TGT TTC ATC TAT ATT
S P I A C P T G W T G Y N D R C F I Y I
CCA ACA GAA ATG ACT TGG GCA GAT GCT GAG AAA AAC TGT CAG GAT CGG GGT GGA AAC
P T E M T W A D A E K N C Q D R G G N
GTG GCA TCG GTG CAC AGC TTT GAG GAG CAT CAA GCA ATT CAG GGT ATG ATC CTG ATT CTC
L A S V H S F E E H Q A I Q G M I L I L
ACA CAG GCG TAT CCA CTC ACA TGG CTT GGA GGC TAC GAT GCG GCA CAG GAG GGT GCC
T Q A Y P L T W L G G Y D A A Q E G A
TGG TTC TGG AGT GAT GGT ACA CGT TTC CAG TTT AAC TTC TGG GAT GAA GGA CAG CCT GAT
W F W S D G T R F Q F N F W D E G Q P D
AAT CGT GCA AAT GCA CAC TGT ATG TTG ATG AAC TTT GGA GAT CAG AAG AAA TAT GAC
N R A N A H C M L M N F G D Q K K Y D
GAC CAG CCT TGC TCT TTC ACA AAG CCG TTT GTC TGT GCC AGA AAG CTA TGA
D Q P C S F T K P F V C A R K L Stop
TATCGCTTTGGACAACAGAGAAACATGCTGTACTCTAGGATTTTAGGCCTTTCATTCTGGAGACT
CAACTGTTTTTTTTCTTGCTTGTACACAATTTAAAGGCTTGAGCATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

```

Figura 3: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de SbCLB.

Se realizó un alineamiento entre el dominio de reconocimiento de carbohidratos de esta secuencia y los de lectinas tipo C de otras especies tomadas del GenBank. Dicho alineamiento confirmó claramente que nuestra secuencia pertenecía a la familia de lectinas tipo C (Figura 4). Se observaron seis cisteínas en las regiones conservadas del dominio de lectinas tipo C (marcadas de amarillo en la figura), estas cisteínas son necesarias para la formación de tres puentes disulfuro intramoleculares, esenciales para la estabilidad de dicho

Se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético considerando los dominios C-lectinas de SbCLA y SbCLB, así como los de otros organismos cuyas secuencias fueron tomadas del GenBank. SbCLB se mostró cercano a otros peces tanto salmónidos como no salmónidos con un valor de *bootstrap* de 53. Sin embargo, SbCLA fue más cercano a primates y roedores con un valor de *bootstrap* de 100 (Figura 5).

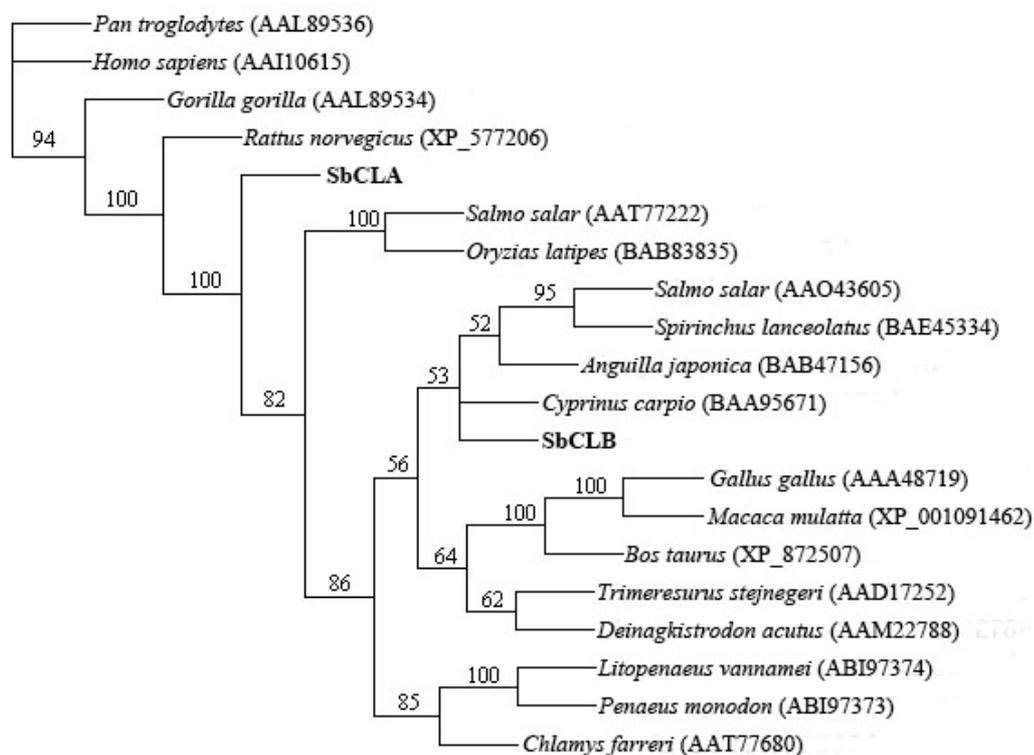


Figura 5: Árbol filogenético realizado con los dominios de lectinas tipo C de SbCLA, SbCLB y de otras secuencias sacadas del GenBank.

La EST resultado de la sustracción cuyo nombre en la tabla del capítulo II era “Beta-galactoside-binding lectin” de 400 pares de bases fue caracterizada como galectina-1 (Sbgalectin-1) y la amplificación por RACE en sentido 3’ permitió obtener una secuencia completa de 785 pb (número de acceso al *GeneBank* EU660937) que presentó una pauta abierta de lectura (desde el nucleótido 60 al 467) que codificaba para una proteína de 135 aminoácidos y con un tamaño teórico de 15 kDa (Figura 6). En esta figura podemos observar el codón de inicio y el de stop marcados de negrita y la señal de poliadenilación “AATAAA” en rojo y en negrita.

CCGGGGCCGCAGCATACTCACTTCTCCTCAGCTCTACTTGACTGACTACATCTGCAATC

ATG TTT AAT GGT TTG ATC ATA AAA AAC ATG TCC TTC AAG GTT GGG CAG ACC ATG ACC ATT
M F N G L I I K N M S F K V G Q T M T I

GTT GGA GTC GCC AAG CCG GAT GCA TCA AAT TTT GCA GTG AAT GTT GGC CCA GAT GAG
V G V A K P D A S N F A V N V G P D E

AAG GAG ATT ACT ATG CAT ATC AAC CCT CGT TTT AAC GCC CAT GGA GAT GAG AAT GTG
K E I T M H I N P R F N A H G D E N V

GTG GTC TGC AAC TCT TAC CAG GGA GGC AAC TGG TGT GAG GAG CAC CGT GAG GGA GGC
V V C N S Y Q G G N W C E E H R E G G

TTT CCT TTC CAA CAG GGC GAG GAA TTC AAG ATC ACC ATT GAA TTC ACC CCT ACA GAG TTC
F P F Q Q G E E F K I T I E F T P T E F

CTC GTG ACC TTA TCA GAT GGC TCT ACA ATC CAT TTC CCC AAC CGC ATG GGT GAG GAG AAG
L V T L S D G S T I H F P N R M G E E K

TAC TCC TTC ATC AAC TTT GAT GGG GAT GTT CGC ATC AAA AGC TTT GAG ATA AAA **TAA**
Y S F I N F D G D V R I K S F E I K Stop

ACCTCCACCTTCCCAGGAATATTCGGATTGAAATTCAGTTTTTGT TTT TTTTTCAGCATTGTCTAGCAT
AAAGTCAACTAGCCATAGCTTTTATGCTCTTGAATGCATGTGCTATCAGTAGTGCCTTACATGCATT
GCATCACACAATGTATTATGCAAGAATTTTGCTTGTTAGCATGTGCAGGGGCAACCAACCATTGATA
GAAAGATGCATAGATGCAATATATGTCATAATAGTCTGACACACAGAAAAATACAGTGTATAC**AAT**
AAATTGACTATTGACTGAAAAGCACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 6: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de Sbglectin-1.

El tamaño molecular teórico de esta galectina (15244 Da) indica que debe de pertenecer a las de tipo proto-, ya que éstas suelen tener un tamaño típico de entre 14 y 18 kDa. Además se realizó un alineamiento de galectinas de otras especies tomadas del GenBank (Figura 7) y la presencia de los residuos importantes de unión al carbohidrato (marcados de azul) en la secuencia de Sbglectin-1 (Liao *et al.*, 1994) claramente confirmaron que se trataba de un miembro de la familia galectina. Además no encontramos ningún péptido señal en nuestra secuencia, que es otra de las características de la familia de las galectinas (Barondes *et al.*, 1994).

Sbglectin-1	-MFNGLIIKNMSFKVQQTMTIVGVAKPDASNFVNVGPDEKEITMHIINPR
ABJ80692- <i>H. hippoglossus</i>	--MKDMMVKNMSFKVQQTTLVGVAKPDATNFALNIGSSDQDIVMHIINPR
AAR84190- <i>D. rerio</i>	--MAGVLIQNMSFKVQQTTLITGVKPKDSTNFAINIGHSPEDIALHMNPR
P08520- <i>E. electricus</i>	-SMNGVVDERMSFKAGQNLTVKGVPSIDSTNFAINVGNESAEDLALHINPR
AAT37622- <i>S. scrofa</i>	-MACGLVASNLNLKPGECCLKVRGEVAPDAKSFVNLNGKDSNNLCLHFNPR
NP_001009287- <i>O. aries</i>	MACQGLVASNLNLKPGECCLRVRGEVAADAKSFSLNLGKDDNNLCLHFNPR
NP_996788- <i>G. gallus</i>	-MEQGLVVTQLDVPGEVCKVKGKILSDAKGFSVNVGKDSSTLMLHFNPR
AAK11514- <i>X. laevis</i>	-MAAGMVMNNSFLKQGHCLKGFIPKDAKSFAINLNGKDSSTNYVHFNPR
CF261531- <i>I. punctatus</i>	---MVFTVKDMTFKAGQELTISGPPKSGCSLFSINIGHDADNIALHFNPR
P26788- <i>C. myriaster</i>	--SGGLQVKNFDFTVGKFLTVGGFINNSPQRFSVNVGESMNSLSLHLDHR
Q9YIC2- <i>C. myriaster</i>	-MSDRAEVRNIPFKLGMVLTVGGVNSNATRFSINVGESTDSIAMHMDHR
BAC67210- <i>A. japonica</i>	--MDFVEVKNLIMKSGMELKVNGVFANANPERFSINVGHSTEEIIVHVDVR
	* * * * *

3. Resultados



Figura 7: Alineamiento entre la secuencia proteica de Sbgalactin-1 y otras secuencias de galectinas tomadas del *GenBank*.

Entre las proteínas conocidas depositadas en el GenBank nuestra galectina presenta, a nivel de proteína, la más alta homología con la *beta-galactoside-binding lectin* de *Hippoglossus hippoglossus*.

El análisis filogenético realizado resaltó la normal taxonomía de todas las especies incluidas y la Sbgalactin-1 apareció en el mismo cluster con la galectina-1 de *Danio rerio* y con un valor de *bootstrap* de 84 (Figura 8).

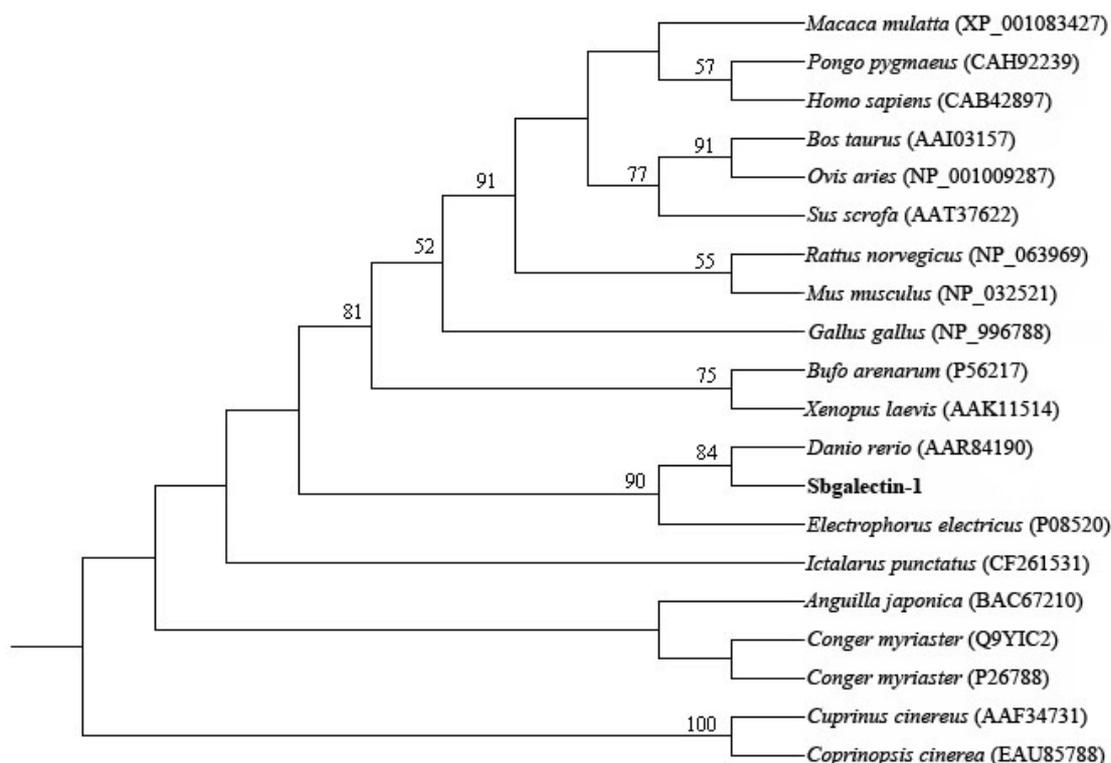


Figura 8: Árbol filogenético realizado con la Sbglectin-1 y otras secuencias de galectina obtenidas del GenBank.

Se obtuvo la secuencia genómica de la Sbglectin-1 (número de acceso al *GeneBank* EU660934) revelando la presencia de 3 intrones en las siguientes posiciones del ORF: 10 pb (2144 bp de longitud), 90 pb (879 bp de longitud) y 262 pb (966 bp de longitud) (Figuras 9 y 10).

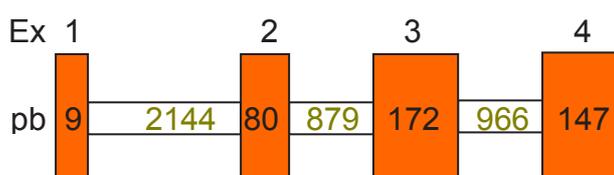


Figura 9: Estructura de la secuencia genómica de la Sbglectin-1.

ATGTTTAATGTAAGTACAATTTTATATGACAATAATATTTTGCTCCTGCATTGCTTTTACT
 CTCTGTATGTTATGACTCAGATGGACGAGTAGTGTTAGGTCATATTTTAAAAGTGGAAC
 GATAGCTGGTTGACATGTGCCAGCTCACTCTACTGTGTGACATGCAGATGAAACTGAACC
 AGCTTAACTATGCTTTAACTAAACCACTTTAGCTGTGTTTTTGTAACATGTGCTTCTGAG
 TGTTCTGGACTTCTCAGATTTCTTTGATTGCCTTTTATGGTCAAACATTCCTACAGACC
 ACACATACATGGGCATCCAATGCATGAACAAGAAGTCAGCTGTTTAGGTTGTTACATTCT
 TCCTGAAATAACTGACTTATACTAAAACAGAAAGGCTTGCTGTAACATTTGTCCATTTCA

TTCATCTCTCATTATCTAGAGCTGGGCACAGCCAGCAATGCATTCTGGTCTCTATGAACTC
ATAAACGAGTAGATTACAATAAAGACCTTGTATCACTCTGGGTTTTTCTTGGCTACAGGG
AGAAACGTGGTTAGAAAGGGCACAGCAAGGGGGGGCAGCAGGTTTAAATCCCATTATAG
GAGAAAATGAAATAAAGTCATCATGTGGAGGTAAACATAGATGCTACTCTTAGAGCGTT
CAGCAGCAGATTGCGGAAGCTCTTTGTGATGCCGTTCTATCAGGGAATGTCCCTTGCACT
CTAAAATGCCTATTTTGCATTCATATCAGATTCCAGCAAGATATTAGAGTCAAATAATTC
ATTTAAAAGAATTTTCCTTGTGGTAGATGTGTTTAAAATGTACATCGTGTGGCCAGTC
AGTCAGGGAGAGGTGTAATGCATTAGTATCCCTTATCCAGCACAGTATGCGGATTCCCTT
AGACAGCAGTGTCTGCAAGTCAGAGAGGTCCAACCTCGGCCAGCCCCAGGCATGCAGT
CTTCAGGCATGTAGTCTGTCCCATGGCTCTTTCTGTTTCTGTGACCTCAGCCCAGCCCCAC
ACAGCTCAAGCCCCAGTGCTACGTGTTATACACGCACTTTACAGTGTAACCTAACATGG
AAAGAATTTTCGTACCCCATGTCATTCTTTCCCTTTACCTTCCCTTTCATTTTCATGGTTTGGT
TGATCTTCCAGATGCAATAATTTGGTTTTACTCCAGATTATTGCGATAATAATATTCGCAA
GGATTTCAACAGCTGCAGAACACAAAACCTCACACAGGTCATTAAAATTCTTGCTCCTGTC
CCCTGAAAGACATTGATGAAATGCAATTTGCTATCAAGTAAAAATAAAAATTGCAAAAATT
CTTAAACTTTTTGCACATAAGGAATGTTTTCCCTAAATGTAGGTGTGAATGATAAAACACA
TGATTTACAAAAACAAGACATTA AACAGCTACATTAATATCAAATCATTCTCTGCTCA
CTTGCTACTGTGTTTCTGGCAAGAATATAAATGACTGCAAAGTGCTGGGAGCTTGTAATT
CAGGCTGCTTCTACTGTGTCCGCTCAAATATCTCATCACCTAATGTCTAACTATATTATTA
AAAAAATGCAAATTCTCTAAGGGGCTGCTATTTATGTATTAGTTGCCCTGGTGACAGTTA
ACAGTACCCACATACATCCTTTGACATAGTGACAACATGTTAAACAGTGGTGATCTGTG
TTTTCGCTTTCAAATAATGGATTGCCCAAGTGTAATTTCCAAACAGGAAATGGCACAGCTC
AGTATCCCCCGCCACATGTACACCAACCAAGTTGAGGATTTCTGCTGTGTTCCAGCCTTTT
TGTCCACTGTGGACTGTGGACCAGTATTGCACTTAGGAAAATATTACTCAATTTAACAAC
GGCAAAAAATTTAGCCTCTGCCAAAATCTGGAGGAAAAGGGCCATGGCAACAGTAGAG
CAGGAAAGCGCTGGAATCTTTGACCAGTCTGCCAATGGGAGTATAATTGAAAACACATG
TTTTGTAATTTCTAAGGATGAAGTGAGGATTGGAGAGTTGGCTGTGGCTACTGCTGGTGA
TGTTTCTTGCCCTGAAGCCGCAATAATAATGAGCTCTAGTAAAATCCAGTATTATTTCCAC
ACAATAACGTA CTGTGCTTCCCCCTCCCCCTCTTTTTCTGCACAGGGTTTGATCATAAAA
AAACATGTCCTTCAAGGTTGGGCAGACCATGACCATTGTTGGAGTCGCCAAGCCGGATGC
ATCAAAGTAAATACTTATGTAAAACACTATCTACATATCTGAAATAAGTTCATCACAATA
AAATTGAAAATCTCTTGTGGTTCTTTTCAGTGTTCCAGGAGTTTACACCTGGTTCCACAAA
CAATCTTTCATGCATGTTATATAGAATACTATAATAATATTTGGATTACTGTTGTTGTAC
TTTTGTCTCCCATTACATGTAGCATTACCTTGTACATACTGACTGCATATAACAGTATAT
ATATATATTTATATACACCATTCCCACATACTTGTTTAGAGTCATTCTGTCTATTATTTAC
CTGTATTTGTTCCCTTGTCTTGTCTCAAGTGAATTGAGTCAAATGTCTTGTGTGTGTACA
CATGCTTGGCCAATAAAAATGTATTCTTCTGAAAATTTTATCATTTAGCAAGGTAAAACAT
AAGACCTTGTTCCTCAAAAAGGTTTTCTTGAAAATTAAGTTAAATTCTTTTTTCAGTCTTG
TTTTCTTCTTTAGTTACATCCCAGAAGGTGGCTGAGGCTTCAAGAGTCTAACTGATGAA

ACATGTA
ACTTCCA
ATTATCC
CTATTCT
TTTCGCT
ACTTTCT
GTGTTT
ACTCCAT
TTTTCC
CTGT
GGAATGC
AGACTG
AACTCA
ACATGT
GGACC
ATTCTTT
ATACACA
CACTAAC
ACACAG
ATTGAG
GTTGAAT
CTATAAT
CTATCT
ATAATC
AGTTGCT
GTCAGG
GACTACC
CATTAA
CTCCC
CCTCAG
TAATGT
GGGGT
GATGA
AGATG
ATGGTT
AGCAG
ATGAA
AACTGG
TTAAG
GTTGT
TCTCA
ATAGCT
TGTGCA
CTTGG
CATCCT
CTTAT
CCATG
TTGAAT
ATAAG
GAGCT
ACATTA
AATAG
TGTAA
AATCT
TTTGT
GTTAC
ATTGTT
CCCGA
GTTTGC
CAGTGA
ATGTT
GGCC
CAGAT
GAGA
AGGAG
ATTACT
ATGCAT
ATCAAC
CCTCG
TTTTA
ACGCC
CATGG
AGATG
AGAAT
GTG
GTGCT
GCAACT
CTTACC
AGGG
AGGCA
ACTGG
TGTG
AGGAG
CACCG
TGAGG
GAGG
CTTTC
CTTT
CCAAC
AGGG
CGAG
GAATT
CAAG
GTGAG
AGGTC
CTGT
GTGT
GTACT
TATT
CCATC
CCTGC
ATGT
GTCT
GCGGG
CATGG
AGTCT
GCCCC
ATGG
TTCT
GTCT
GTCT
GTTA
GTGACC
TCTGT
TGGAA
GATGT
GTGT
CACT
GTAC
CTCT
GATA
AATT
CACC
ATCAT
GATTT
GAGC
AGCA
AATTT
ATGG
ACTCG
CAGAG
ATAT
GTGAA
AACT
ATATA
TATGA
ATGTT
TCAT
ATTT
CAGAT
AATGT
ATTT
TAAG
GTGTT
TTAAT
GATGG
TACT
AATTT
AATT
AAAT
CACC
ATGT
TAAAA
ATACA
TAGAA
CTGG
AAAG
AGGT
GTTT
GGTT
TGACA
TATTC
ACC
ATTA
AAACT
TTTGT
CCAAGA
ATGG
AGCAG
AGGTT
CAAT
ATGTA
ACCT
GTCT
GCAT
ATTCT
TCCC
TTTT
CTCC
TGAT
CTTGC
ACAC
ATCCT
ACAAT
CAAG
ATCACC
ATTGA
ATTC
ACCC
CTAC
AGAG
TTCCT
CGTG
ACCT
TATC
AGAT
GGCT
CTACA
ATCC
ATTT
CCCC
AACCG
CATGG
GTGAG
GAGA
AGTA
CTCCT
CATCA
AATTT
GATGG
GGAT
GTTTC
GCAT
CAAA
AGCT
TTGAG
ATAAA
ATAA

Figura 10: Secuencia genómica de la Sbglectin-1. Los intones están marcados de color verde.

La EST resultado de la sustracción cuyo nombre en la tabla del capítulo II era “Aps-prov protein” de 356 pares de bases fue caracterizada como pentraxina (Sbpentrxin) y la amplificación por RACE en sentido 5’ y 3’ permitió obtener una secuencia completa de 1563 pb (número de acceso al *GeneBank* EU660933) que presentó una pauta abierta de lectura (desde el nucleótido 29 al 706) que codifica para una proteína de 225 aminoácidos con un tamaño teórico de 26 kDa (Figura 11). En esta figura podemos observar el codón de inicio y

3. Resultados

el de stop marcados de negrita y la señal de poliadenilación “AATAAA” en rojo y en negrita.

```
GACACAAAATCCAGACACAGATCTCAAG
ATG AAG TTT TTG CTG CTG GTG GTG ATG CTG AAA GCA TGT GCT GCA AGT CCT CAA GAT CTG
  M  K  F  L  L  L  V  V  M  L  K  A  C  A  A  S  P  Q  D  L
TCA GGT AAA ATG TTC ACC TTC CCA CAA GAA ACC AAC AGA GCT CAT GTG AGG ATG AAT
  S  G  K  M  F  T  F  P  Q  E  T  N  R  A  H  V  R  M  N
ATA TCG AAT CGG GAT TTG GCT GCT GCA ACT GTC TGT CAC AGA TCC TTT ACA GAC CTC AAA
  I  S  N  R  D  L  A  A  A  T  V  C  H  R  S  F  T  D  L  K
AGA GAC CAC GTC CTT TTC TCT TTG GCC ACA CCC TCT AAA ACC AAT GCT TTT CTG CTT TTC
  R  D  H  V  L  F  S  L  A  T  P  S  K  T  N  A  F  L  L  F
TGG GAT GAA ACA AAT AAA GAA ATG GAG CCA CAT ATC CTG GAT AGA AAG TCA GAA TAT
  W  D  E  T  N  K  E  M  E  P  H  I  L  D  R  K  S  E  Y
CGA GGG CAG GAC TAC AAG CCG AAC ATG TGG CAC TCT GTT TGT ACC ACA TGG GAC TCT
  R  G  Q  D  Y  K  P  N  M  W  H  S  V  C  T  T  W  D  S
ACG ACT GGA CTG GTG CAG CTG TGG TTT GAT GGA CAA CCT TCA ATT AGG AAA TTC ATC AGC
  T  T  G  L  V  Q  L  W  F  D  G  Q  P  S  I  R  K  F  I  S
TCT GGA ACA AAC ATC AGA TCG TCC AAT ATG ATA ACT ATA TTA GGA CAG GAG CAG GAT
  S  G  T  N  I  R  S  S  N  M  I  T  I  L  G  Q  E  Q  D
GCA CAT GGT GCG GGG TTT GAC CTT AAA CAG TCT TTT GTT GGC ATG ATG TCT GAT GTC CAC
  A  H  G  A  G  F  D  L  K  Q  S  F  V  G  M  M  S  D  V  H
ATG TGG GAC TAC ATC CTT TCA CCC TGT GAG ATC CAC AAC TAC ATG GAT GAT CTA CAG TTC
  M  W  D  Y  I  L  S  P  C  E  I  H  N  Y  M  D  D  L  Q  F
ACT CCA GGG AAT GTG CTC AAC TGG AGG GCG CTG GAG TTC CAG ATT GTA GAC AGA GTG
  T  P  G  N  V  L  N  W  R  A  L  E  F  Q  I  V  D  R  V
CTG ATA GAA GAT AAA CTA CAT ATC TGT AAC TAA
  L  I  E  D  K  L  H  I  C  N  Stop
ACATTTACACAATACCATATATACTTTAGAAAGTACAAAATCATACTTTCTGTGCTTTTATGTATATA
AGTTACCAATGACAGCCATTTATGTTAAATCATCATTTAGGATAGGTTTTGATTTTTTTAATACAG
TAATGACATGATAGAGTTATTTTGGTCACTCTGATCATTTTACCTGTCCATACCATGAAATGAATCCT
CCCTAACATGACTCTGGTGTAGAAAAGGGGTACAAAATCCATAGTCCTCCTCCTGTTCAAAGTTCA
GCTAAAGGTAATAGTGAGTTACCCAAATCAGGTTTGTTTTAAACACCATAATTTTCAATAAAGTCATT
CTATGGTGGTACTTCACAGCCAGTATGGAGAGGAGGAATGATTATGGTGACCCATGACTCTCTCAA
TGTACATGTATACATTGTAATGGCTCAATGTGTTGTGTGTACAGCATGCATGCAGTAAAAATAGAGT
GAATATTAAGTTTACTGTGTTGTTGAACAGCCACAGACAGGCAGTCAAACATGCCATGACAACATG
ATACAAATTCAGTTGGCAAGGTAGTAGACCTACCACATGGTCTTGGTTTTCTGCATGGTCCAATC
CTACTGTCTAGATTGTTTTTAAATGTTAGTCATAACGACTGTATGGGGCAATAATTATTATTAATTCG
GGCTGTCAATCTGTAAGGTTGTTTTCAAGGTCATCTGCCCTACTGGGCAAAAATGATAAATGCCG
CTTTAACTGGGTTTTGATTTTCTATCAATTGTACTCATCTGGCACTGTTCTATTTGTTTTTGAAATA
ACAATATCTTCACTCAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Figura 11: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de Sbpentraxin.

Sbpentraxin tiene una region 3' no codificante (*3'-untranslated region*, 3'-UTR) de 857 pares de bases, este resultado sugiere que nuestra proteína debe de ser una proteína C reactiva porque la existencia de regiones 3' no codificantes bastante largas (858-1500 pb) es una de las características de las proteínas C reactivas de mamíferos (Whitehead, 1989; Rubio *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1997). A nivel de proteína, esta pentraxina presenta la mayor homología con la pentraxina de *Salmo salar*, entre otras proteínas conocidas depositadas en el GenBank.

Un alineamiento con pentraxinas de otras especies confirmó claramente que la proteína Sbpentraxin es un miembro de la superfamilia de pentraxinas, puesto que nuestra secuencia tiene las dos cisteínas, altamente conservadas, que están involucradas en puentes disulfuro intramoleculares (marcadas de amarillo). Además, también podemos observar la firma de las pentraxinas TWxS (marcada de azul), donde x puede ser cualquier aminoácido (Garlanda *et al.*, 2005) (Figura 12).

```

NP_001008175-X.tropicalis -----MVRVYVLWFVFFFTGCLAQEDLGGKVFVLFPKATDTAHVILKPVII
NP_999009-S.scrofa -----MEKLSLCLLVIIISLSNAFAQTDMIGKAFVFPKESENSYVSLTARL
CAA67765-S.salar MESALNLMAKLVFLLPLIYGICYGEHQDLSGKVFVIMPATSTSHVKLHANV
CAA67764-O.mykiss MESALNLTGKLVFLLVLIYGICYGDLQDLSGKVFVIMPATSTSHVKLHANV
Sbpentraxin -----MKFLLLVMMLKACAASPDLSGKMFVFPQETNRAHVRMNIISN
BAB69039-C.carpio ---MMLVPPVLFVCLLLSLTAAATEVGLVGKVLFPPTKTNTSFVALTPEK
XP_001331789-D.rerio -MRRLASVYVIFVCCGLALSQQPERKCLREKVI VFPPELSTNTVVKLHPNE
                                                                * * *

NP_001008175-X.tropicalis KKPVESFTVCLCSESYTELTREH-SLFSLAVPGKDNALLIFPMPPT-TCRFI
NP_999009-S.scrofa TKPLTAFTVCLRVYTDLNRDY-SLFSYATKTQYNEIILFRGKTA-VYSIS
CAA67765-S.salar SEPICSSAMTMCQRFNSEQERGQ-SLFSLATQSHDNDLLLYKRSMG-VYRVH
CAA67764-O.mykiss SKPICSSAMTMCQRFNSEQERGQ-SLFSLATQSHDNDLLLYKRSMG-VYRVH
Sbpentraxin -RDCSLAAATVCHRCSSFTDLKRDH-VLFSLATPSKTNCSAFLFWDETCSNKEMEPH
BAB69039-C.carpio PLSLSAFTLCSCMRVATELQGER-ETILFACSYRTQDYDELNVWREKDGRLSFY
XP_001331789-D.rerio SMTQTEFTVCSCMRFYTDQESSNPCLFSLATPSNPQDISLSWSAETKKYQLL
                                                                * * *

NP_001008175-X.tropicalis LNQEPVDPKVQP-EVFDWKHTCVAWESGSGVVQLWINGKLYPRTVLKKGK
NP_999009-S.scrofa VGGADVVFCSKPH--QSSEPMHFCMTWESTSGITELWVDGKPMVRRSLKRGY
CAA67765-S.salar IKGASLDFISLPDSKNEWISICCSWTWDSKSGLTQLWVNGKRSARRILKPDT
CAA67764-O.mykiss IRGDVLDFFSLPDSKNEWISICCSWTWDSSTGLTQLWVNGKRSARRILKPDT
Sbpentraxin ILDRKSEYRGQDYKPNMCSWHSVCTTWDSSTGLVQLWFDGQPSIRKFISSGT
BAB69039-C.carpio LSGSG-AFFNLPALSTFGTHLCSCLTWDSCSETGLSAFWMNGHRSTFQLYRKGH
XP_001331789-D.rerio IHNSPVQFKGLPFNCSLNQWNTICCSVTWCSDVKNALAQMFVNEVASIKKVVGPQ
                                                                * *

NP_001008175-X.tropicalis LIDA-KASIIIGQEQDSYGGGFDISQSFMGEISNVHMWDYVLTQVDIQKV
NP_999009-S.scrofa SLGT-QASIIIGQEQDAFAGGFCSEKNQCLVGDIGDVMWWDYVLSPEEINTV
CAA67765-S.salar SVTG-TPSCSIMLVQEQDSYGGGFCSDVSQSFVGEVTDVHFWDCSSVISPEIQLY
CAA67764-O.mykiss SVTG-TPSCSIMLVQEQDSYGGGFCSDSSQSFVGEVTDVHFWDCSSVISPEIQMY
Sbpentraxin NIRSSNMITIIGQEQDAHGAGFDLCSKQSFVGMMSDVHMWDYICSLSPEIHNY
BAB69039-C.carpio SIRP-GGTVLLGQDPDNYLGACSFVEQSFVGEITDVHMWDHCSVLCSSGSQIMAV
XP_001331789-D.rerio AFGK-APVISLCSGQCQTQIGGSFPQSKTFTGFISDVHMHNQVLTCSTNCSQIKTY
                                                                * * * * *
    
```

3. Resultados

```

NP_001008175-X.tropicalis LAGKK--DVNGNIINWRSIQYEIKGDVTVQPKLQCRS
NP_999009-S.scrofa      YAGG---TFSPNVLNWRALRYEMSGEVYVKPQLWP--
CAA67765-S.salar       MQLNR--FTPGNILNWKALEFTVEGKVFIERSEFRSE
CAA67764-O.mykiss      MELNK--FTAGNILNWKDLQFSIEGKVFIEKSEFRNE
Sbpentraxin           MDDLQ--FTPGNVLNWRALEFQIVDRVLIEDKLHICN
BAB69039-C.carpio     YSNQEPYVPGKGNVFDWNTIKYEINGSVLVVQES----
XP_001331789-D.rerio  MEAKS-KYKLGDIISWHNLMYTI FGSAEINEKHHVTF
    
```

*

Figura 12: Alineamiento entre la secuencia proteica de Sbpentraxin y otras secuencias de pentraxinas tomadas del *GenBank*.

Se construyó un árbol filogenético con secuencias de pentraxinas de otros organismos y se puede observar que la Sbpentraxin está muy cercana a las pentraxinas de salmón y de trucha arcoiris con un valor de bootstrap de 53 (Figura 13).

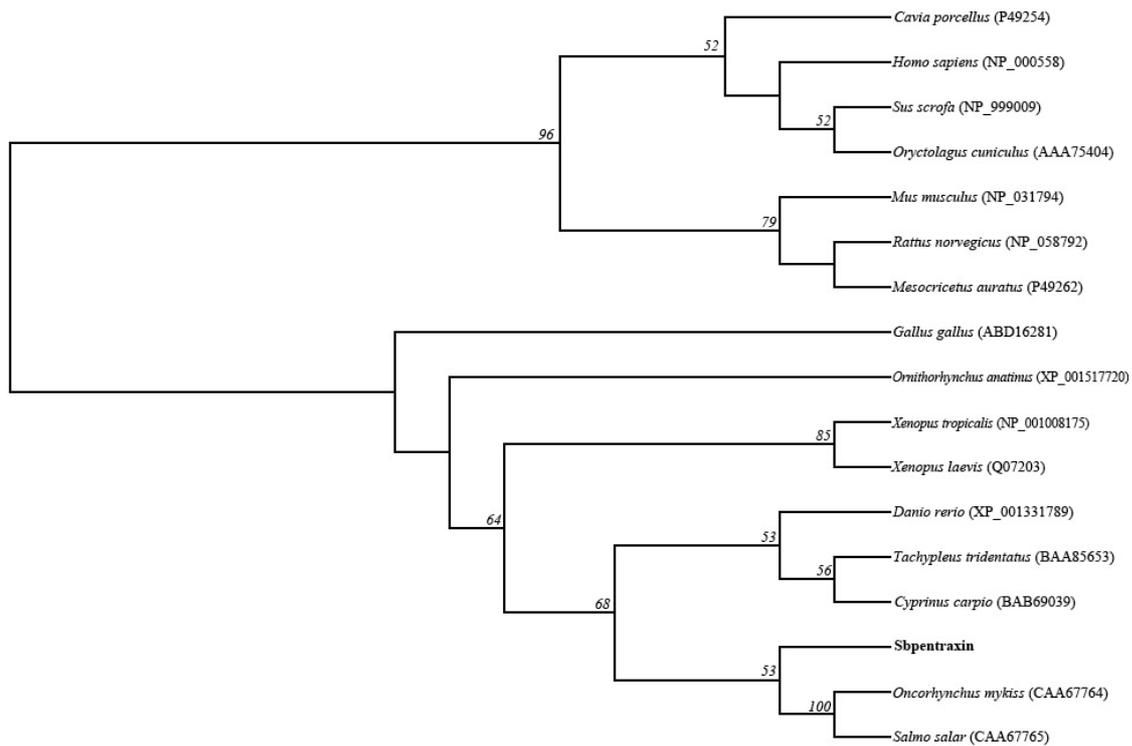


Figura 13: Árbol filogenético realizado con la Sbpentraxin y otras secuencias de pentraxina obtenidas del *GenBank*.

SbCLA, SbCLB y Sbglectin-1 fueron también elegidos para estudios de expresión *in vivo* a las 4 y a las 72 horas post-infección. En las gráficas de la qPCR se puede observar una clara diferencia entre las muestras infectadas y las controles para los tres genes candidatos, así se observó un aumento significativo de la expresión a las 4 horas post-infección en el caso de las tres lectinas y de la SbCLB a las 72 horas post-infección. Sin embargo, la expresión de SbCLA y Sbglectin-1 descendió a las 72 horas después de la infección (Figura 14).

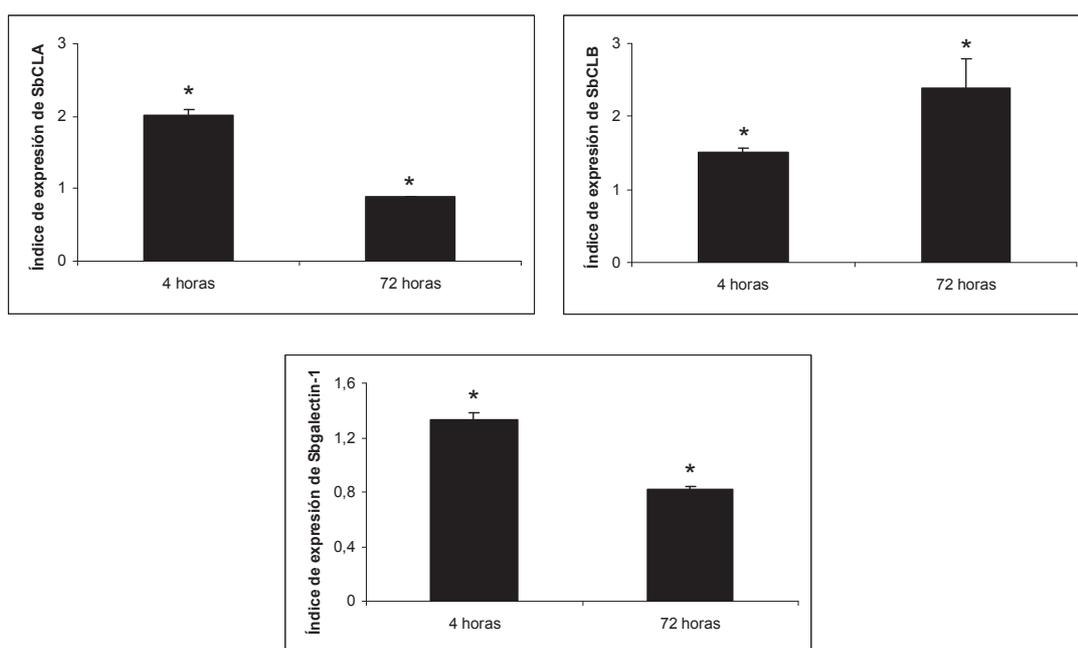


Figura 14: Índices de expresión de *Real-Time PCR* para SbCLA, SbCLB y Sbglectin-1 en riñones cefálicos de lubina infectada intramuscularmente con nodavirus. Las unidades de expresión se calcularon dividiendo los valores de los infectados entre los valores de los controles, una vez normalizados con respecto a la expresión de la β -actina.

4. DISCUSIÓN.

La inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a patógenos y juega un papel fundamental en la activación y orientación de la inmunidad adaptativa así como en el mantenimiento de la integridad de los tejidos y en su reparación (Garlanda *et al.*, 2005).

Entre los genes inmunes diferencialmente expresados que se obtuvieron como resultado de la sustracción de librerías realizada en riñón anterior 4 horas después de una infección con nodavirus, nos centramos en el estudio de cuatro lectinas ya que este grupo de proteínas juega un papel relevante en la defensa del hospedador junto con otros factores humorales como las inmunoglobulinas, los componentes del complemento, la lisozima o las hemolisinas (Ingram, 1980; Sanford y Harris-Hooker, 1990; Alexander e Ingram, 1992; Cooper, 2002; Almkvist y Karlsson, 2004; Fujita *et al.*, 2004; Vasta *et al.*, 2004a; Vasta *et al.*, 2004b). Además estas proteínas están involucradas en numerosos procesos celulares como la unión a otras proteínas, incluyendo las células y los procesos de adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular (Cooper *et al.*, 1991; Puche y Key, 1995; Elgavish y Shaanan, 1997; Vasta *et al.*, 2004b).

En el presente capítulo de la tesis doctoral caracterizamos la secuencia completa de ADNc de dos lectinas tipo C (SbCLA y SbCLB), una galectina (Sbgalectin-1) y una pentraxina (Sbpentraxin), nunca antes caracterizadas en lubina.

Las lectinas de tipo C son lectinas dependientes de ión Ca^{2+} ampliamente distribuidas por el reino animal (Drickamer, 1988; Kilpatrick, 2000; Dodd y Drickamer, 2001). La mayoría de las proteínas que contienen dominio de lectina tipo C (*C-type lectin domain*, CTLD) han sido descritas en mamíferos, pero existen algunas ya identificadas en peces teleósteos incluyendo alguna especie modelo como *fugu* (Vitved *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Bayne *et al.*, 2001; Mistry *et al.*, 2001; Tasumi *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 2003; Soanes *et al.*, 2004; Zelensky y Gready, 2004; Panagos *et al.*, 2006).

La comparación de SbCLA y SbCLB con otras secuencias de lectinas tipo C previamente publicadas demostró que estas proteínas pertenecían a la familia de las lectinas tipo C (Figuras 2 y 4). De los 17 grupos en que se clasifican las lectinas de tipo C nuestra

secuencia SbCLA pudo ser clasificada como perteneciente al grupo II debido a que se trata de una proteína de membrana con un dominio transmembrana en el extremo N-terminal y un CTLD en el extremo C-terminal (Drickamer y Taylor, 1993; Zelensky y Gready, 2005). Además, nuestra secuencia tiene la misma estructura que las previamente publicadas en salmón por Soanes *et al.* (2004) que fueron clasificadas como pertenecientes al grupo II. Sin embargo, la secuencia SbCLB se clasificó como perteneciente al grupo VII, que consiste en un solo CTLD sin ningún otro dominio N- o C-terminal asociados (Drickamer and Taylor, 1993) y contiene a mayores un péptido señal para su secreción extracelular. Esta secuencia es muy similar a la descrita en salmón por Richards *et al.* (2003).

Ambas secuencias contienen las seis cisteínas necesarias para la formación de tres puentes disulfuro que mantienen la estructura de la molécula pero difieren en la secuencia WIGL (característica de las lectinas de tipo C), así mientras que SbCLA contiene la auténtica “WIGL” (Figura 2) SbCLB contiene “WLGG” donde aparece una leucina en la segunda posición (como en la secuencia de *Cyprinus carpio*) y una glicina en la última (al igual que en las secuencias de *Salmo salar*) (Figura 4).

Las lectinas de tipo C pueden ser divididas en dos grandes grupos en función del carbohidrato que reconozcan. Así las que contienen la secuencia EPN reconocen carbohidratos de tipo manosa y las que tienen la secuencia QPD reconocen carbohidratos de tipo galactosa (Weis *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001; Zelensky y Gready, 2005). SbCLB tiene la secuencia “QPD” que nos indica que se trata de una lectinas tipo C que reconoce ligandos como galactosa o similares (Figura 4). Sin embargo, SbCLA presenta la secuencia “QPN” (presenta asparragina en lugar de ácido aspártico en la tercera posición) que no se corresponde con ninguna de las secuencias típicas de reconocimiento de ligandos de las lectinas tipo C. Podría tratarse de un híbrido entre ambas secuencias y que habría que hacer pruebas de unión a ligandos para ver a qué tipo reconocería. Este reemplazamiento probablemente no afectaría al sitio 2 de unión al ión Ca^{2+} pero sí podría influir en la especificidad por el carbohidrato (Soanes *et al.*, 2004)

También se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético considerando los CTLD de ambas secuencias junto con otros dominios de lectinas tipo C de diferentes organismos tomados del *GeneBank*. SbCLB se mostró cercana a otros dominios de peces

salmónidos y no salmónidos con un valor de *bootstrap* de 53 (el *Bootstrap* es uno de los métodos más utilizados para evaluar la precisión de una filogenia, así cuanto más alto sea este valor más precisa es la ramificación del árbol), sin embargo, SbCLA se mostró más cercana a primates y roedores (100 de valor de *bootstrap*) (Figura 5); esto puede ser indicativo de que los dominios de unión al carbohidrato de las lectinas tipo C son secuencias proteicas altamente conservadas a lo largo de la evolución.

Las galectinas o proteínas de unión a beta-galactósidos son pequeñas proteínas solubles independientes de Ca^{2+} , que están ampliamente distribuidas en los tejidos de los vertebrados (Teichberg *et al.*, 1975; Levi y Teichberg, 1985; Bols *et al.*, 1986; Parotaud *et al.*, 1987; Muramoto y Kamiya, 1992; Scheneller *et al.*, 1995; Ahmed *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 1999; Solís *et al.*, 2000; Inagawa *et al.*, 2001) pero que también se encuentran presentes en invertebrados como gusanos, insectos y moluscos (Hirabayashi *et al.*, 1992, 1996; Pace *et al.*, 2002; Tasumi y Vasta, 2007) e incluso en esponjas y hongos (Pfeifer *et al.*, 1993; Cooper *et al.*, 1997). En el presente estudio caracterizamos un nuevo miembro de la familia de las galectinas, una galectina de tipo proto- de lubina, como muestra el alineamiento de ésta con otras secuencias de galectinas de otros organismos (Figura 7). Las galectinas se pueden clasificar en tres grandes grupos según su estructura: proto-, quimera- y de repetición en tándem. Como acabo de indicar anteriormente, clasificamos la Sbglectin-1 como una galectina de tipo proto- (el tipo más abundante) ya que presenta un único dominio de reconocimiento de carbohidratos (*carbohydrate recognition domain*, CRD). Además esta proteína, encontrada en nuestra librería, no presenta péptido señal de secreción, característica peculiar de las galectinas que, a pesar de ser proteínas solubles, no presentan péptido señal (Barondes *et al.*, 1994). En el alineamiento también están resaltados los aminoácidos críticos, los que están involucrados en la interacción con el carbohidrato y en su especificidad (Liao *et al.*, 1994). El análisis filogenético agrupó a la Sbglectin-1 en el mismo *cluster* con la galectina-1 de *Danio rerio* con un valor de *bootstrap* de 84 (Figura 8), sugiriendo, al igual que en el caso anterior, que se trata de proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución. También se obtuvo la secuencia genómica de la Sbglectin-1 que presenta tres intrones (Figuras 9 y 10), al igual que todas las galectinas-1 descritas hasta la fecha (Hafiz Ahmed, comunicación personal), lo que nuevamente nos indica que esta proteína está muy conservada a lo largo de la evolución.

Las pentraxinas son una superfamilia de proteínas del plasma caracterizadas por su ensamblaje pentamérico y su unión al carbohidrato dependiente de calcio, además están altamente conservadas en la evolución desde arácnidos hasta insectos y humanos (Garlanda *et al.*, 2005; Mantovani *et al.*, 2008). Existen dos grandes grupos de pentraxinas: las cortas, con un tamaño típico de alrededor de 25 kDa, y las largas. Son proteínas del suero producidas como parte de la respuesta de fase aguda a un trauma o a una infección (Steel and Whitehead, 1994; Gewurd *et al.*, 1995). Los dos tipos de pentraxinas cortas, la proteína amiloide del suero (*serum amyloid protein*, SAP) y la proteína C reactiva (*C-reactive protein*, CRP) pueden activar la cascada clásica del complemento (Cook *et al.*, 2003; Du Clos y Mold, 2004; Garlanda *et al.*, 2005). Sbpentraxin pertenece al grupo de las pentraxinas cortas y debido al tamaño de la región 3'UTR probablemente se trate de una proteína C reactiva (Whitehead, 1989; Rubio *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1997) (Figura 11).

Se realizaron estudios de expresión de SbCLA, SbCLB y Sbglectin-1 a las 4 y a las 72 horas de una infección experimental con nodavirus. Los resultados obtenidos muestran una clara diferencia entre las muestras infectadas y las controles con un incremento significativo de los tres genes 4 horas después de la infección, sin embargo, a las 72 horas la expresión de SbCLA y Sbglectin-1 descendió con respecto a los controles mientras que la de SbCLB continuó aumentando (Figura 14). Resultados similares fueron descritos en galectinas de mamíferos por Zuñiga *et al.* (2001) quien describió que la expresión de la galectina-1 fue mayor en macrófagos de ratón infectados con *Trypanosoma cruzi* que en los controles no infectados. Soanes *et al.* (2004) detectaron un aumento en la expresión de tres receptores de lectinas tipo C en salmón Atlántico en respuesta a una infección con *Aeromonas salmonicida* con respecto a los controles.

En mamíferos, las lectinas actúan como mediadoras en el reconocimiento de gran cantidad de patógenos incluyendo bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, levaduras, parásitos y virus. Los mecanismos por los cuales actúan incluyen la activación del complemento, el incremento de la opsonización, la fagocitosis y la apoptosis que permiten la destrucción del agente infeccioso (Fraser *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1990; Perillo *et al.*, 1995; Reading *et al.*, 1995). Las lectinas pueden tener funciones reguladoras del sistema inmune adaptativo, permitiendo la apoptosis de células T activadas o aumentando la producción de citoquinas en células T activadas y no activadas (Novelli *et al.*, 1999; Rabinovich *et al.*, 2002; van der Leij *et al.* 2004). Teniendo todos estos papeles en cuenta, la identificación de

la galectina y de las lectinas tipo C en la librería sustractiva es indicativo de que estas moléculas pueden tener papeles de defensa importantes en la inmunidad de los peces. Además, la respuesta el incremento en la expresión génica en los estadios tempranos de la infección *in vivo* con nodavirus valida los resultados de la SSH previamente descrita.

En este capítulo se caracterizaron cuatro lectinas: dos lectinas tipo C, una galectina y una pentraxina. En el siguiente capítulo continuaremos con el estudio de la galectina, obteniendo la proteína recombinante y realizando con ella una serie de ensayos funcionales.

*Capítulo IV: Estudios
funcionales. Galectina-1
recombinante.*

1. INTRODUCCIÓN.

En el capítulo anterior de la presente tesis doctoral se caracterizaron dos lectinas tipo C, una galectina y una pentraxina. En este capítulo me centraré más en el estudio de una de estas lectinas: la galectina.

Nuestra galectina fue clasificada como galectina-1. Las galectinas son una familia, altamente conservada, de proteínas que se caracterizan por tener un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) responsable de su unión, independiente de Ca^{2+} , a los β -galactósidos. Este dominio está compuesto por 130 aminoácidos, de los cuales muchos están altamente conservados y tienen una estructura terciaria formada por dos láminas beta. Están ampliamente distribuidas en vertebrados pero también están presentes en invertebrados e incluso en hongos y protistas (Hirabayashi *et al.*, 1992; Pfeifer *et al.*, 1993; Cooper *et al.*, 1997; Solís *et al.*, 2000; Pace *et al.*, 2002). En un principio, Kilpatrick (2000) en un tratado sobre lectinas clasificó las galectinas de mamíferos en 10 familias. Posteriormente, Vasta *et al.* (2004a) ampliaron la clasificación a 14 familias de galectinas en vertebrados superiores y en una revisión realizada por Camby *et al.* (2006) describieron que, en mamíferos, se habían identificado 15 galectinas distintas. Mientras que algunas de estas galectinas contienen un sólo CRD y son biológicamente activas como monómeros (5, 7 y 10), como homodímeros (1, 2, 11, 13, 14 y 15) o como oligómeros, que se agregan gracias a un dominio no-lectina, (3) otras contienen dos CRDs conectados por un corto péptido de unión (4, 6, 8, 9 y 12). Todas ellas tienen varias características en común: actividad independiente de Ca^{2+} , especificidad por los β -galactósidos, extremo N-terminal acetilado, carencia de péptido señal, falta de carbohidrato unido, carencia de glicosilación y localización predominantemente citoplasmática (Kilpatrick, 2000; Cooper, 2002).

Gracias a la caracterización de la galectina y de su secuencia nucleotídica completa se pudo obtener la proteína recombinante para llevar a cabo los ensayos funcionales que se detallan en este capítulo. La galectina-1 es una proteína no glicosilada, de tal forma que se puede obtener su proteína recombinante utilizando el sistema de expresión en organismos procariotas, lo cual es una ventaja frente a otras proteínas que necesitan del sistema de expresión en organismos eucariotas.

La obtención de proteínas recombinantes tiene aspectos ventajosos frente a la purificación de la proteína nativa ya que se puede disponer de la proteína en mayor cantidad

y en el momento que se requiera y es válida para realizar todo tipo de ensayos funcionales. Así, el estudio de la función de gran cantidad de proteínas se ha realizado utilizando proteínas recombinantes. Además, se han obtenido muchas proteínas recombinantes humanas que se están aplicando con fines terapéuticos, de esta manera la insulina fue la primera proteína recombinante aprobada para su uso en humanos en 1982. Hasta la fecha, más de 60 proteínas recombinantes se están usando terapéuticamente (Tabla 1) y más de 200 se encuentran en avanzado estado de estudio. Puede anticiparse que en un futuro próximo, se encontrarán disponibles para uso médico un mínimo de 100 productos farmacéuticos derivados de la tecnología génica (Smith, 2006).

Tabla 1: Productos biofarmacéuticos aprobados para su comercialización (Smith, 2006).

Producto	Uso médico ampliamente aprobado	Año de introducción en el mercado
Insulina	Diabetes	1982
Hormona de crecimiento humano	Déficit de crecimiento	1985
Interferón α	Cáncer, infecciones víricas	1985
Anti-células-T	Transplantes de órganos	1986
Vacuna de la hepatitis B	Prevención de la hepatitis B	1987
Activador tisular del plasminógeno	Enfermedades cardiovasculares	1987
Eritropoyetina	Anemia	1989
Interleucina-2	Cáncer	1992
Factor de coagulación VIII	Hemofilia A	1992
Interleucina-10	Prevención de la trombocitopenia	1997

Tomado de Bienz-Tadmor [1993] *Bio/Technology*, 168-71

A escala industrial, la producción de proteínas recombinantes involucra las siguientes etapas:

- fermentación: las bacterias son cultivadas en tanques sellados (fermentadores) que contienen un medio de cultivo nutritivo.
- extracción: las células son centrifugadas para recuperar las proteínas de su interior.
- purificación: se separa la proteína recombinante de las otras proteínas bacterianas.
- formulación: la proteína recombinante es modificada para conseguir una forma estable y estéril que puede administrarse terapéuticamente.

En el caso en concreto de la galectina-1 se han publicado bastantes trabajos para clarificar las funciones de esta proteína en los que se utilizaba para ello la proteína recombinante. Así, Perillo *et al.* (1997) describieron que la galectina-1 inducía apoptosis de los timocitos humanos utilizando la galectina-1 recombinante humana. Rabinovich *et al.*

(1999) estudiaron la capacidad de adhesión de las células T a componentes de la matriz extracelular en presencia de galectina-1 recombinante. Levroney *et al.* (2005) demostraron la capacidad antiviral de la galectina utilizando galectina-1 recombinante en el caso del virus Nipah.

Además, en el caso en concreto de una enfermedad que afecta al sistema nervioso como es la causada por los nodavirus puede que la galectina-1 recombinante actúe como agente terapéutico ya que se describió que esta proteína, en su forma oxidada, juega una serie de papeles importantes en la regeneración del sistema nervioso central después de un daño tisular (Camby *et al.*, 2006).

En este capítulo detallo cómo se llevó a cabo la expresión y purificación de la galectina-1 recombinante de lubina (rSbgalectin-1), la comprobación de su actividad mediante un ensayo de hemaglutinación, así como los resultados de algunos ensayos funcionales que se realizaron con ella tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre los ensayos realizados se encontraron la medida del estallido respiratorio y de producción de NO, dos procesos que, como se comentó en la introducción general, van asociados a la fagocitosis. También se realizaron experimentos de mortalidad y de expresión de citoquinas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

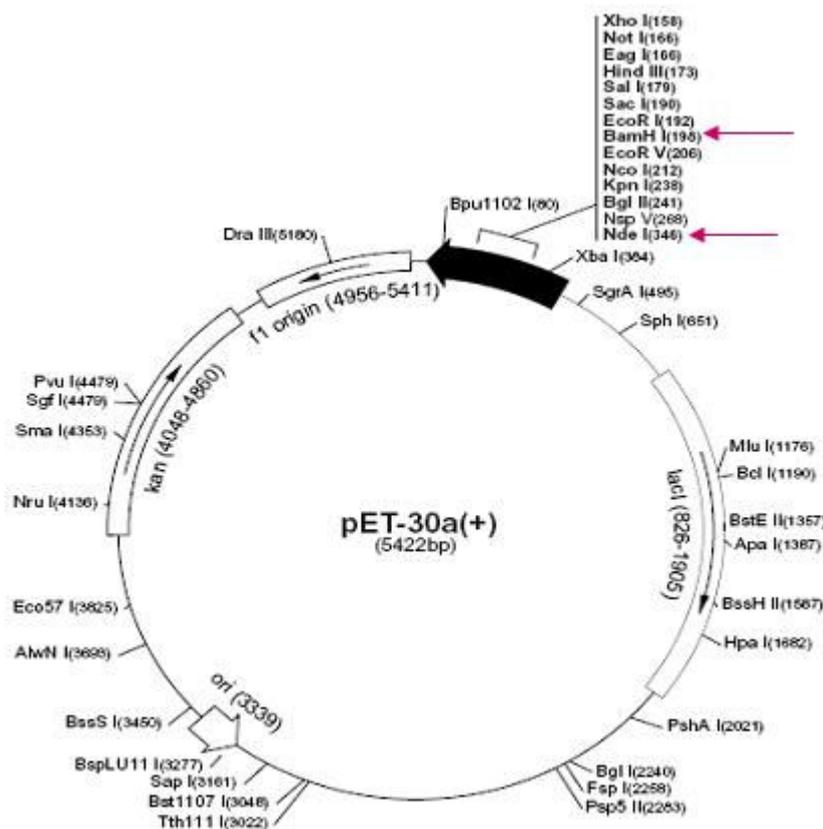
2.1. Expresión y purificación de la rSbgalectin-1.

Como la galectina-1 es una proteína soluble y no glicosilada se pudo llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante utilizando el sistema de expresión procariótico, en concreto se utilizó el vector de expresión pET-30a(+) en células de *Escherichia coli* (en concreto se usó la cepa BL21 de esta bacteria).

El marco abierto de lectura completo de la galectina-1 de lubina se amplificó por PCR usando cebadores que contenían un sitio de corte para *Nde* I (en el caso del cebador directo) o para *Bam*HI (en el caso del cebador reverso):

D: 5'-GGGGGGGGGATTCCATATGTTTAATGGTTTG-3'

R: 5'-GGCGCGGTACCCTATTTTATCTCAAAGC-3'



Después de la amplificación, el producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T (Promega) y el plásmido con la secuencia correcta fue digerido y ligado dentro del pET30a(+) (Novagen) previamente cortado con estas mismas enzimas de restricción. Con el nuevo plásmido de expresión obtenido se llevó a cabo la transformación de las células competentes de *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen), se realizó una PCR de confirmación de los clones positivos utilizando cebadores del vector y cuatro de estos clones positivos se pusieron a crecer toda la noche en 3 ml de LB con 50 µg/ml de kanamicina (Sigma) a 37 °C y a 200 rpm. Al día siguiente, se utilizó 1 ml para preparar glicerolos y así poder conservar los clones positivos congelados a -80 °C mientras que los otros 2 ml se utilizaron para inocular 200 ml de LB con kanamicina que se dejaron creciendo a 37 °C y 200 rpm durante 2.5 horas más; después se tomó una alícuota de 1 ml (controles de expresión no inducidos) y al resto se le añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG, Invitrogen) a una concentración final de 1 mM para que se produjera la expresión de la proteína. Tanto los controles no inducidos como el matraz con los 200 ml se dejaron a 37 °C y 200 rpm durante 3 horas, después de las cuales se tomó 1 ml de cada matraz (muestras inducidas). Tanto los matraces como los tubos se centrifugaron a 5000 g durante 10 minutos a 4 °C, los sobrenadantes obtenidos fueron transferidos a tubos nuevos que se guardaron a 4 °C y a los precipitados se les añadió fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF, Sigma) para evitar la acción de proteasas y se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Para obtener las proteínas solubles se realizó un tratamiento de ruptura de las paredes celulares, de manera que se añadió a los pellets una mezcla de lisozima (100 µg/ml), PMSF (1 mM) and β-mercaptoethanol (10 mM) (Sigma) y se mantuvieron en agitación durante 30 minutos a 4 °C para luego centrifugarse a 16000g durante 10 minutos a 4 °C y recoger el sobrenadante. En principio este tratamiento se realizó con los precipitados para ver cuál de los clones tenía una mayor expresión de la proteína. Estos sobrenadantes se cargaron en un SDS-PAGE al 15% de concentración de acrilamida:bisacrilamida para ver la presencia de la proteína esperada.

Una vez que se eligió el mejor clon se llevó a cabo la purificación de la rSbglectin-1 mediante cromatografía de afinidad en una columna de lactosa-Sepharosa 6B y todo el proceso se llevó a cabo a 4 °C. Se lavó la columna con 1 volumen de 7 M de hidrocloreuro de guanidina para eliminar todas las posibles proteínas que pudieran estar unidas a ella y a continuación se pasaron 20 volúmenes de tampón de equilibrio (PBS-ME). A continuación se llevó a cabo el procesamiento de la muestra (precipitado procedente de la centrifugación

del cultivo líquido del matraz correspondiente al clon elegido) de la misma manera que se explicó anteriormente y la fracción soluble fue cargada en la columna de cromatografía. Las proteínas no unidas a la matriz se lavaron con 20 volúmenes de un buffer con alta concentración de sales (PBS/ME/0.5M NaCl) y a continuación se pasaron 10 volúmenes de un tampón con baja concentración de sales (PBS(1:10)/ME) para preparar la proteína para su unión a la columna de intercambio iónico, donde será guardada hasta su uso. Finalmente, las proteínas unidas fueron eluidas con 3 volúmenes de PBS(1:10)/ME/0.1M lactosa.

La presencia de la rSbgalectin-1 fue verificada en un gel SDS-PAGE al 15% de acrilamida:bisacrilamida usando un *Mini-PROTEAN electrophoresis system* (Bio-Rad).

Para mantener la proteína en la mejores condiciones para ser usada posteriormente se llevó a cabo una adsorción de la misma en columnas de DEAE-Sepharose (1 ml de matriz por columna), saturándola con un 50% de glicerol en tampón de elución y se guardaron a -20 °C hasta su uso.

Para eliminar el glicerol la columna fue lavada con PBS(1:10)/ME y la proteína unida fue eluida con PBS(1:10)/ME/0.5M NaCl.

2.2. Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de proteína se determinó en una placa de 96 pocillos de fondo plano utilizando el *Bio-Rad protein assay* y empleando BSA como patrón. Se utilizaron unas soluciones de concentraciones conocidas de proteína para hacer la recta patrón (0-40 µg/ml) añadiendo por triplicado 100 µl de cada una de estas soluciones en un pocillo y 100 µl de *Coomassie Blue dye reagent* previamente diluido 2.5 veces con agua. Se esperó 30 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (iEMS reader, Labsystems) a 620 nm. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa Excell, la concentración de las muestras fue calculada mediante la recta patrón.

2.3. Ensayo de hemaglutinación.

La actividad hemaglutinadora de la rSbgalectin-1 se comprobó siguiendo el protocolo previamente descrito por Nowak *et al.* (1976). Se observó primero la hemaglutinación en portaobjetos y posteriormente se calculó la cantidad mínima de rSbgalectin-1 que produce

hemaglutinación haciendo diluciones 1:2 de la muestra en placas de 96 pocillos con fondo en U y utilizando eritrocitos de conejo tratados con tripsina y fijados con glutaraldehído. Para analizar el efecto inhibitorio producido por los β -galactósidos sobre la actividad hemaglutinadora de la rSbgalectin-1 la solución salina fue reemplazada por una solución que contenía lactosa a una concentración 100 mM. Se determinó la concentración de rSbgalectin-1 cuya dilución más alta mostraba una aglutinación visible.

2.4. Medidas del estallido respiratorio y de la producción de NO producidos por leucocitos de riñón.

Se aislaron leucocitos de riñón de lubina siguiendo el método previamente descrito por Chung y Secombes (1988).

2.4.1. Medida del estallido respiratorio usando luminol.

En un experimento, las monocapas de leucocitos fueron incubadas con diferentes dosis de rSbgalectin-1 (0, 1.7, 3.3, 6.7 y 13.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y en otro con una única dosis de rSbgalectin-1 (6.7 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y una dosis de lipopolisacáridos de *Escherichia coli* 0111:B4 (LPS, Sigma) (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en placas de 96 pocillos, poniendo 100 μl por pocillo, durante 24 horas a 20 °C. Después de este tiempo, la emisión de unidades de luminiscencia relativa (RLU) fue determinada estimulando las células con forbol miristato acetato (PMA, Sigma) y amplificada por la adición de 5-amino-2-3-dihidro-1,4-phthalazinediona (luminol, Sigma). Se preparó, justo antes de su uso, una solución *stock* de luminol 0.1 M en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) que se diluyó en HBSS (Gibco) (solución de trabajo) para obtener una concentración final de 0.15 mM. El PMA se diluyó en la solución de trabajo de luminol para obtener una concentración final de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Se determinó el estallido respiratorio en un luminómetro (Fluoroskan Ascent, Labsystems) siete veces a intervalos de 5 minutos, justo después de añadir las soluciones de luminol sólo o de luminol con PMA (100 μl por pocillo).

2.4.2. Medida de la producción de NO.

Las monocapas de leucocitos se incubaron en las condiciones descritas anteriormente. Después de las 24 horas de incubación, la producción de NO se determinó mediante la reacción de Griess (Green *et al.*, 1982) que determina el contenido de nitrito de los sobrenadantes. Así que, después de la incubación, 50 μl de los sobrenadantes se pasaron a

nuevas placas de 96 pocillos. Una alícuota de 100 µl de 1% sulfanilamida (Sigma) en ácido fosfórico al 2.5% se añadió a cada pocillo seguidos por otros 100 µl de 0.1% N-naftil-etilendiamina (Sigma) en 2.5% ácido fosfórico. La densidad óptica (OD) se determinó midiendo a 540 nm en un espectrofotómetro (iEMS reader, Labsystems). La concentración de nitritos en las muestras se determinó utilizando una curva patrón con concentraciones conocidas de nitrito sódico.

2.5. Estudios de mortalidad.

Se realizaron tres infecciones experimentales con el objetivo de ver la posible resistencia de la lubina frente al nodavirus con la ayuda de la rSbgalectin-1.

Se dispusieron cuatro tratamientos y dos réplicas de 12 peces para cada uno de ellos: control, galectina, galectina+nodavirus y nodavirus. Cada uno de los peces del grupo control se inocularon con 150 µl de MEM+P/S+2% de FBS, los peces del grupo de la galectina se inocularon con 100 µl de rSbgalectin-1 a una concentración de 20 µg ml⁻¹ (2 µg de rSbgalectin-1 por pez), los peces del grupo de galectina+nodavirus fueron inoculados con 150 µl de una mezcla de 100 µl de rSbgalectin-1 a una concentración de 20 µg ml⁻¹ y 50 µl de nodavirus con un título de 3.7 x 10⁵ TCID₅₀ ml⁻¹ y los peces del grupo de nodavirus fueron inoculados con 100 µl de una mezcla de 50 µl de MEM+P/S+2% de FBS y 50 µl de nodavirus con un título viral de 3.7 x 10⁵ TCID₅₀ ml⁻¹. Todos los peces fueron inoculados intramuscularmente, se pusieron en tanques a aproximadamente 25 °C y se fueron retirando los peces muertos todos los días a lo largo de 44 días. El experimento se realizó tres veces obteniendo resultados similares.

2.6. Estudio de expresión de citoquinas.

Los niveles de expresión del factor de necrosis tumoral alfa, la interleuquina-1beta y la proteína antiviral Mx fueron determinados después de una infección intramuscular con nodavirus y rSbgalectin-1 utilizando la técnica de la PCR cuantitativa (qPCR).

Se trataron cuatro grupos de tres peces cada uno: los peces del primer grupo fueron infectados con 100 µl de nodavirus (8.5 x 10⁶ TCID₅₀ ml⁻¹/pez), los del segundo grupo fueron inoculados con 100 µl de rSbgalectin-1 (6.7 µg/ml), los del tercer grupo fueron infectados con 150 µl de una mezcla de nodavirus y rSbgalectin-1 (50 µl de nodavirus (1.7 x

10^7 TCID₅₀ ml⁻¹/fish) y 100 µl de rSbgalectin-1 (6.7 µg/ml)) y, finalmente, a los del cuarto grupo se les inyectaron 150 µl medio de cultivo como control. Los peces fueron sacrificados por sobredosis de anestésico (MS-222) 72 horas después de la infección y se tomaron de cada uno de ellos el cerebro, el hígado y el riñón. Se llevó a cabo el aislamiento de ARN utilizando Trizol (Invitrogen), este ARN fue tratado con DNAsas usando *Turbo DNase free* (Ambion) y después se obtuvo el ADN complementario (cDNA) mediante el *Superscript Preamplification System* (Invitrogen), que fue guardado a -20 °C hasta su uso, siguiendo los protocolos previamente descritos en el capítulo I de la tesis.

Los ensayos de PCR cuantitativa fueron llevados a cabo utilizando el *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). La amplificación de este cDNA se realizó usando cebadores específicos diseñados por el *Primer 3 software* (Rozen and Skaletsky, 2000), la secuencia de estos cebadores se muestra en la tabla 2. 0.5 µl de cada oligonucleótido (10 µM) fueron mezclados con 12.5 µl de *SYBR green PCR master mix* (Applied Biosystems) para un volumen final de 25µl. Las condiciones del ciclo fueron 10 minutos de desnaturalización a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. El método comparativo CT (2-ΔΔCT method) se usó para determinar el nivel de expresión de los genes analizados (Livak y Schmittgen, 2001). Por otra parte, la expresión de los genes candidatos fue normalizada usando la β-actina como gen control.

Tabla 2: Secuencias de los cebadores utilizados.

NOMBRE	F / R	SECUENCIA
β-actina	Forward	GTGCGTGACATCAAGGAGAA
β-actina	Reverse	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG
Factor de necrosis tumoral α	Forward	CGAGGGCAAGACTTCTTTG
Factor de necrosis tumoral α	Reverse	GCACTGCCTGTTTCAGCTACA
Interleukina-1β	Forward	CAGGACTCCGGTTGAACAT
Interleukina-1β	Reverse	GTCCATTCAAAAAGGGGACAA
Proteína Mx	Forward	GGGGTCAGAAGGAGATCACA
Protein Mx	Reverse	ATGATGCACCAGCTCAAGTG

2.7. Estudio de expresión de otras lectinas.

Se determinaron los niveles de expresión de la SbCLA, SbCLB y Sbpentraxina en cerebros de lubina infectados intramuscularmente con nodavirus y galectina-1 recombinante utilizando la técnica de la PCR cuantitativa (qPCR).

Las muestras utilizadas fueron los cerebros que se obtuvieron a partir del experimento que se detalló en el apartado anterior y la qPCR se hizo siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

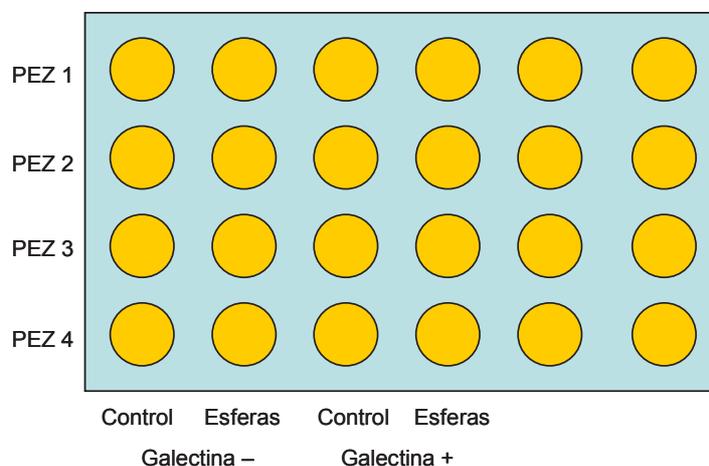
Tabla 3: Secuencias de los cebadores utilizados.

NOMBRE	F / R	SECUENCIA
β -actina	Forward	GTGCGTGACATCAAGGAGAA
β -actina	Reverse	GCTGGAAGGTGGACAGAGAG
SbCLA	Forward	ATGGGTAGATGGGACACCAA
SbCLA	Reverse	TAGCCAGAGCTAGCCAGAGG
SbCLB	Forward	CCGGTGAAGGGACAGAATTA
SbCLB	Reverse	TGAGTGGATACGCCTGAGTG
Sbpentraxin	Forward	TGAAGTTTTGCTGCTGGTG
Sbpentraxin	Reverse	GCCAAAGAGAAAAGGACGTG

2.8. Estudio de la fagocitosis por citometría de flujo.

Se realizó un estudio de la fagocitosis en leucocitos totales de riñón que se aislaron de cuatro lubinas siguiendo el método previamente descrito por Chung y Secombes (1988).

Se dispensaron los leucocitos en una placa de 24 pocillos con fondo plano poniendo del orden de 500 μ l por pocillo, la distribución de la placa fue la siguiente:



A los pocillos sin galectina se les añadieron 500 μl de L-15+P/S+5%FBS y a los pocillos con galectina se les añadió la rSbgalectin-1 disuelta en el medio anterior a una concentración final de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Se dejó la placa incubando toda la noche a 20 °C.

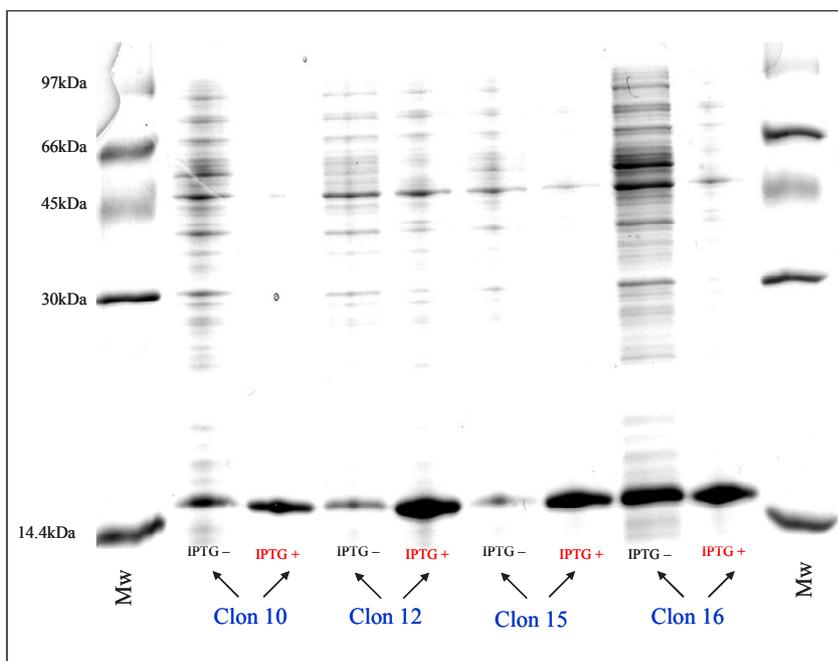
Al día siguiente se preparó la solución de trabajo de fluoresferas (1.2 μm de diámetro) previamente sonicadas y a una concentración de 2.7×10^8 partículas ml^{-1} . A cada pocillo se añadió un ratio de 10 partículas por leucocito en 500 μl de PBS, a los controles se les añadió únicamente PBS.

Las células se incubaron junto con las fluoresferas durante 2 horas a 20 °C. Después de ese tiempo se procedió a realizar dos lavados con PBS para eliminar las partículas no internalizadas y, por último, las células fueron resuspendidas en PBS y se pasaron a tubos para medir en el citómetro. Se añadió a cada tubo 50 μl de azul de Tripán al 0.8 % en PBS para eliminar la fluorescencia de las bolas adheridas a la pared pero no fagocitadas y se procedió a medir en un citómetro modelo *FACScalibur* (Becton Dickinson).

3. RESULTADOS.

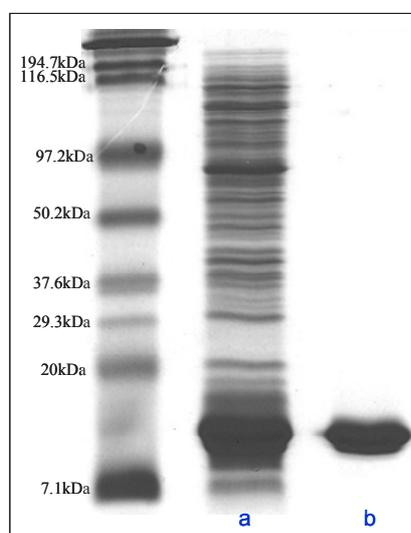
3.1 Expresión y purificación de la rSbgalectin-1.

Se llevó a cabo la expresión de la rSbgalectin-1 tal y como se indicó en materiales y métodos y una vez se indujo la expresión de la proteína con IPTG se realizó un gel de proteínas para ver si se obtenía la banda del tamaño adecuado.



Se obtuvo, como se esperaba una banda de aproximadamente 15kDa, más intensa en los tratados con IPTG que en los otros, en todos los clones analizados; pero como en el clon que hubo más diferencia fue en el clon 12 se decidió continuar con éste para llevar a cabo la purificación de la proteína recombinante.

Una vez se llevó a cabo la purificación por cromatografía tal y como se indica anteriormente se obtuvo un eluido que se cargó en un gel de proteínas para comprobar la presencia de la proteína y que la banda obtenida fuera nuevamente del tamaño adecuado. En la imagen de la derecha se muestra este gel donde (a) es la muestra inicial y (b) la muestra eluida.



3.2 Ensayo de hemaglutinación.

Se comprobó que la rSbgalectin-1 obtenida tenía actividad hemaglutinadora en eritrocitos de conejo. De manera que al poner en un portaobjetos:

- a: tampón de elución con eritrocitos de conejo se observa que todos los eritrocitos están separados.
- b: rSbgalectin-1 disuelta en tampón de elución con la misma cantidad de eritrocitos de conejo se observa que los eritrocitos forman agrupaciones.
- c: a la mezcla anterior se le añadió 100 mM de lactosa y se observa que los eritrocitos se vuelven a separar por la preferencia de la rSbgalectin-1 por la lactosa.

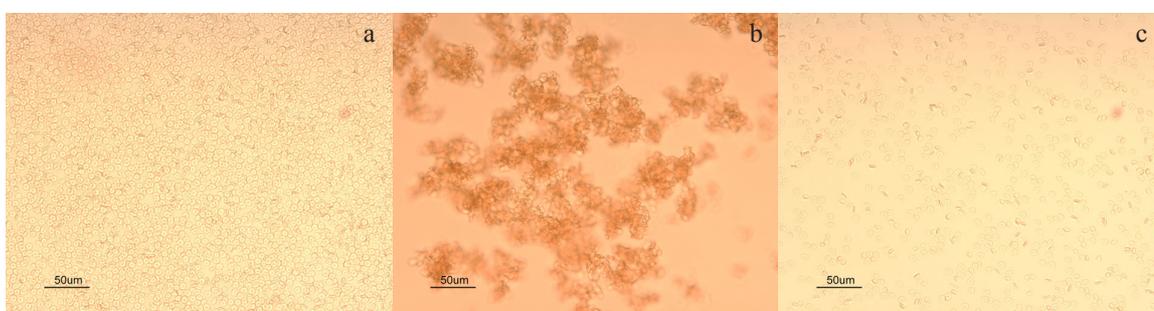


Figura 1: Preparaciones a microscopio óptico (20x).

Cuando se hizo el ensayo de hemaglutinación en placa siguiendo el protocolo indicado por Nowak *et al.* (1976) se calculó la última dilución que hemaglutinó siendo ésta la dilución

1:20, que tenía 0.5 µg de rSbgalectin-1 por pocillo, es decir, una concentración de 0.325 µM. Como está descrito en la bibliografía, se demostró que esta actividad hemaglutinadora es dependiente de la capacidad de la galectina-1 de unirse a carbohidratos porque una vez que se añadió lactosa al medio se perdió dicha capacidad. Tal y como vemos en la figura los tratamientos y diluciones fueron hechos por duplicado.

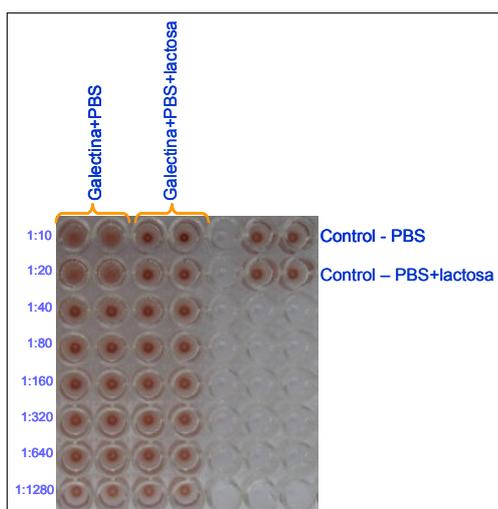


Figura 2: Ensayo de hemaglutinación.

3.3. Medidas del estallido respiratorio y de la producción de NO producidos por leucocitos de riñón.

3.3.1. Medida del estallido respiratorio usando luminol.

En un primer experimento, como se comentó anteriormente, se determinó el estallido respiratorio después de incubar los leucocitos de riñón durante 24 horas con distintas dosis de rSbgalectin-1. Como se observa en las figuras mostradas a continuación se obtuvo una clara reducción del estallido respiratorio, de forma dosis-dependiente, en todas las medidas realizadas en dos peces distintos haciendo, además, dos réplicas diferentes de cada uno de ellos. Este ensayo también se llevó a cabo en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) obteniéndose los mismos resultados (datos no mostrados).

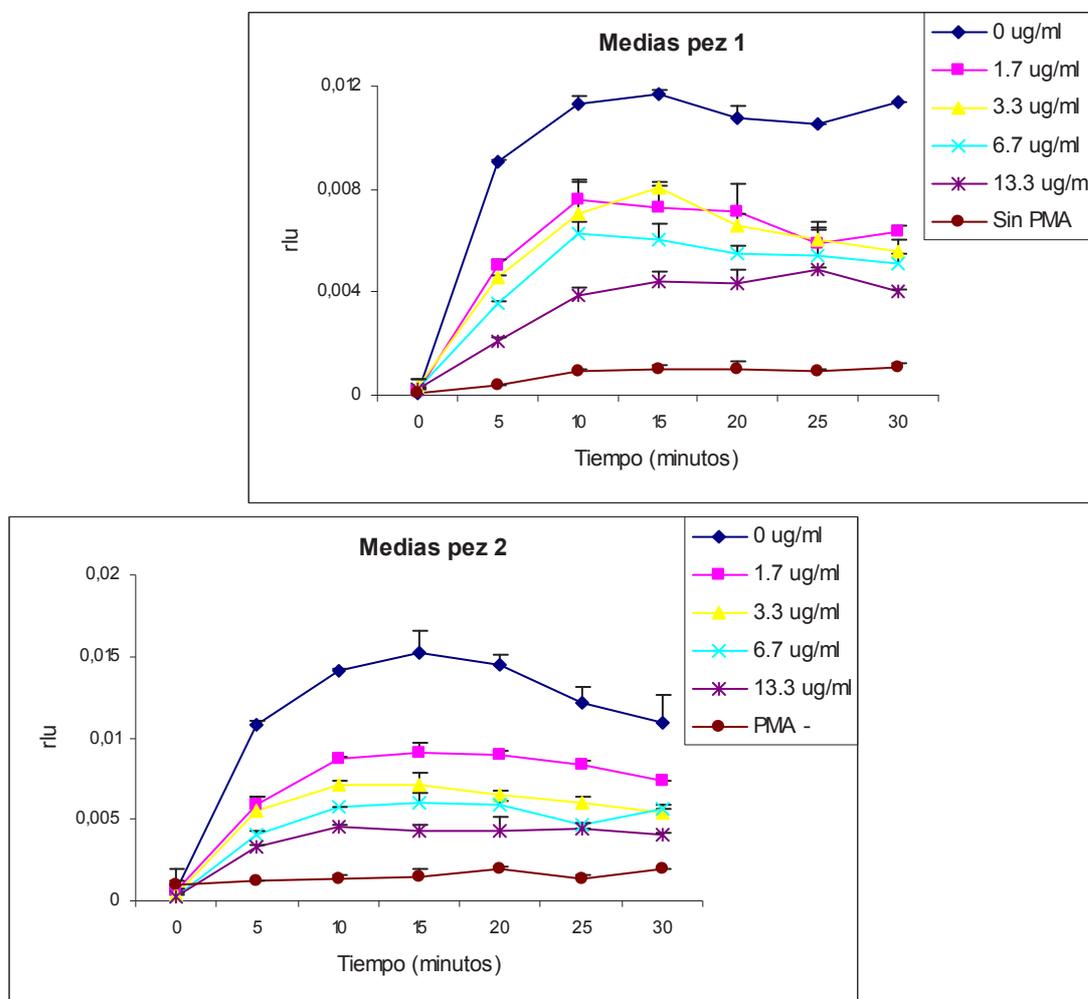


Figura 3: Evolución del estallido respiratorio a lo largo del tiempo (media de las réplicas).

Si se toma el valor máximo para cada pocillo (*maximum well*) y se hace la media para los dos peces también se obtiene un descenso significativo del estallido respiratorio de forma dosis-dependiente.

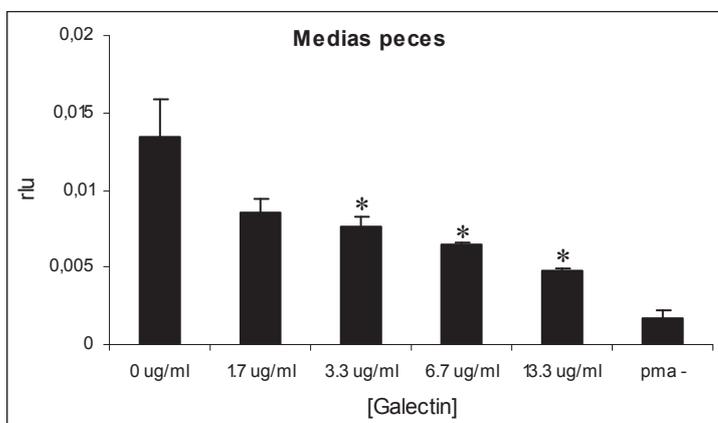
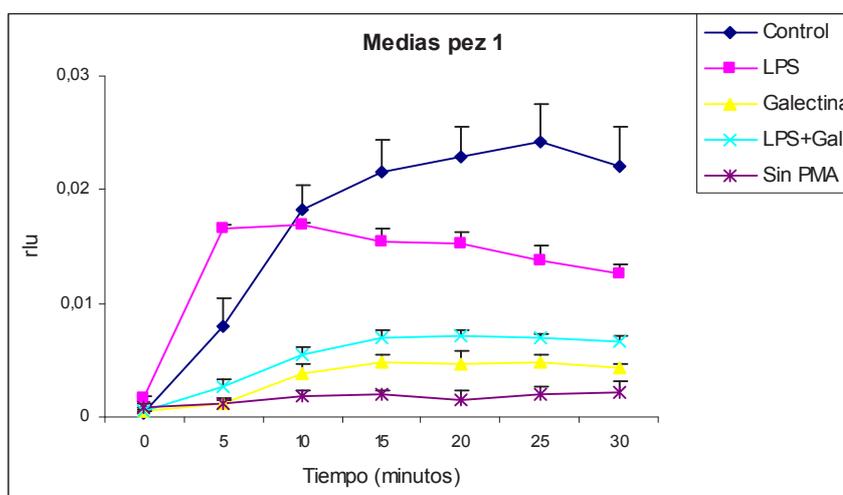


Figura 4: Medida del estallido respiratorio en el momento máximo para cada pocillo (media de los peces).

En un segundo experimento se determinó el estallido respiratorio para una dosis única de rSbgalectin-1 ($6.7 \mu\text{g ml}^{-1}$) y una dosis de lipopolisacáridos bacterianos ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$). En este caso se vio nuevamente que la galectina disminuye el estallido respiratorio producido por los leucocitos de riñón (como ocurría anteriormente) pero además se observa que, a los cinco minutos, el LPS incrementa el estallido respiratorio por encima del control y sin embargo si a este lipopolisacárido le añadimos rSbgalectin-1 ésta anula el efecto provocado por el LPS. Este efecto se comprobó en cada uno de los tres peces estudiados.



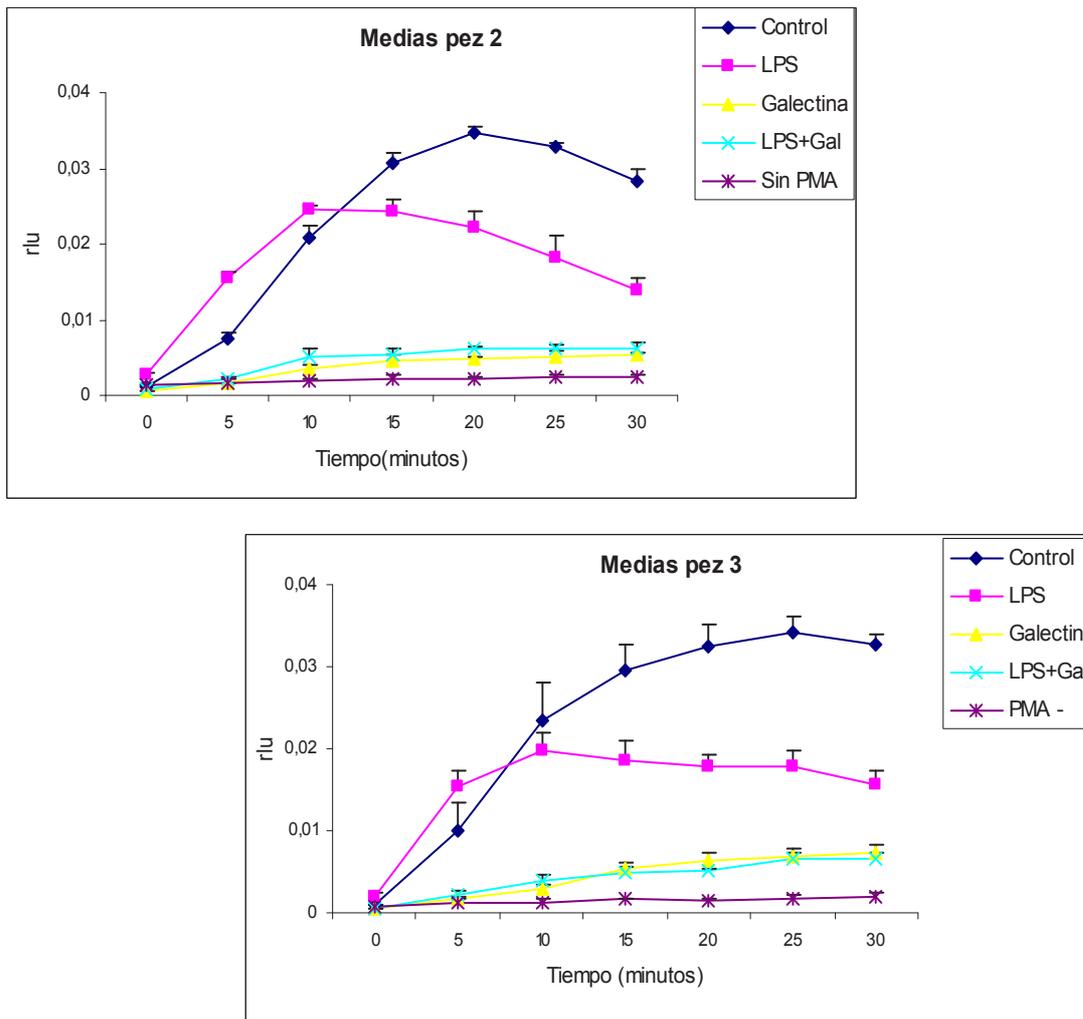


Figura 5: Evolución del estallido respiratorio a lo largo del tiempo (media de las réplicas).

En la siguiente figura se observa mucho mejor el incremento significativo del estallido respiratorio al añadir LPS que se anula con la adición de la rSbgalectin-1.

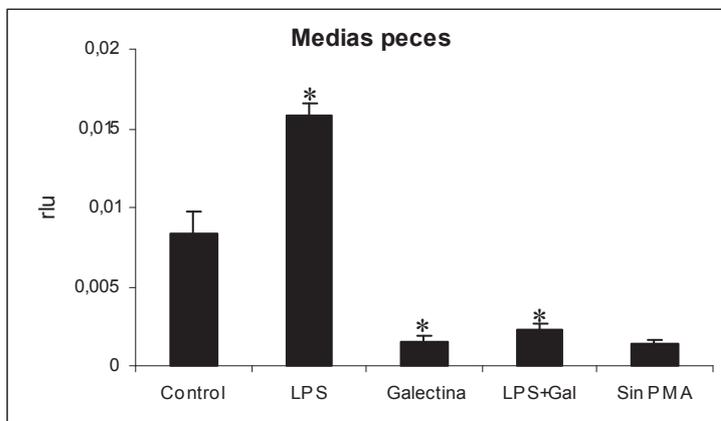


Figura 6: Medida del estallido respiratorio a los cinco minutos (media de los peces).

3.3.2. Medida de la producción de NO.

En cuanto a las medidas de producción de NO no se observaron diferencias significativas ni en el caso del experimento llevado a cabo con distintas concentraciones de rSbgalectin-1 ni en el del que se hizo con una única dosis de rSbgalectin-1 y una dosis de lipopolisacáridos bacterianos (datos no mostrados). El primer ensayo también se llevó a cabo en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) obteniéndose los mismos resultados (datos no mostrados).

3.4. Estudios de mortalidad.

En los tres experimentos de mortalidad observamos aproximadamente este tipo de figura, no se observan diferencias entre los peces inoculados con nodavirus sólo y los inoculados con nodavirus+rSbgalectin-1.

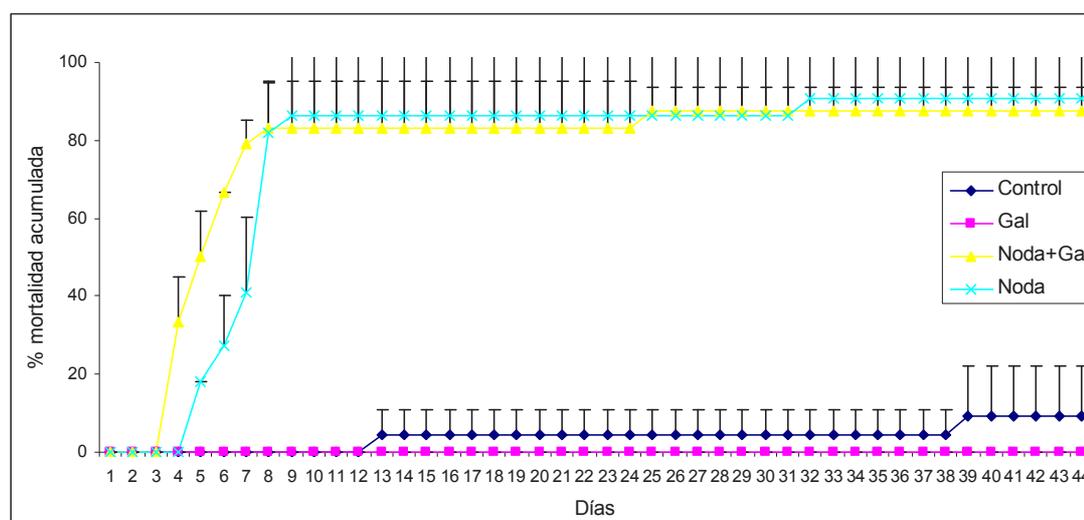


Figura 7: Evolución de la mortalidad acumulada a lo largo del tiempo.

3.5. Estudio de expresión de citoquinas.

Como se indicó en material y métodos se llevó a cabo un estudio de la expresión del factor de necrosis tumoral alfa, la interleuquina-1beta y la proteína antiviral Mx después de una infección intramuscular con nodavirus y rSbgalectin-1 utilizando la técnica de la PCR cuantitativa (qPCR) tanto en cerebro como en riñones e hígados.

3. Resultados

Como vimos en el primer capítulo de esta tesis doctoral tanto en lubina como en dorada se producía un incremento significativo de las dos citoquinas relacionadas con procesos inflamatorios y de la proteína antiviral Mx en cerebros de peces que sufrieron durante tres días una infección con nodavirus. En este experimento se observa lo mismo, aunque en el caso del TNF- α el aumento no es significativo para los peces inoculados con rSbgalectin-1 y nodavirus pero sí para todos los demás casos (tanto inoculados con rSbgalectin-1 y nodavirus como con nodavirus solamente). Pero, además, en este experimento se observa que en el caso de peces inoculados con rSbgalectin-1 y con nodavirus este incremento es menor que en el caso de peces inyectados únicamente con nodavirus, aunque la diferencia entre los dos, en este caso, no es significativa debido a la desviación tan importante que se da entre los peces.

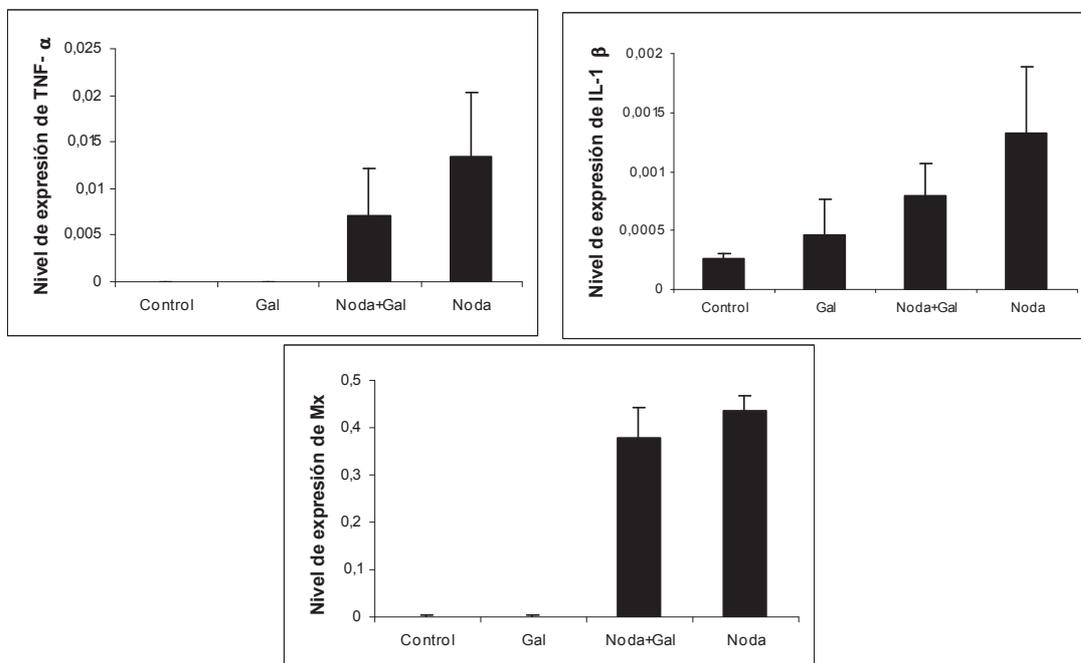


Figura 8: Expresión de citoquinas en cerebros de peces.

Cuando se hacen pools de los tres peces la diferencia entre los inoculados con nodavirus y rSbgalectin-1 con respecto a los infectados tan sólo con nodavirus sí que fue significativa.

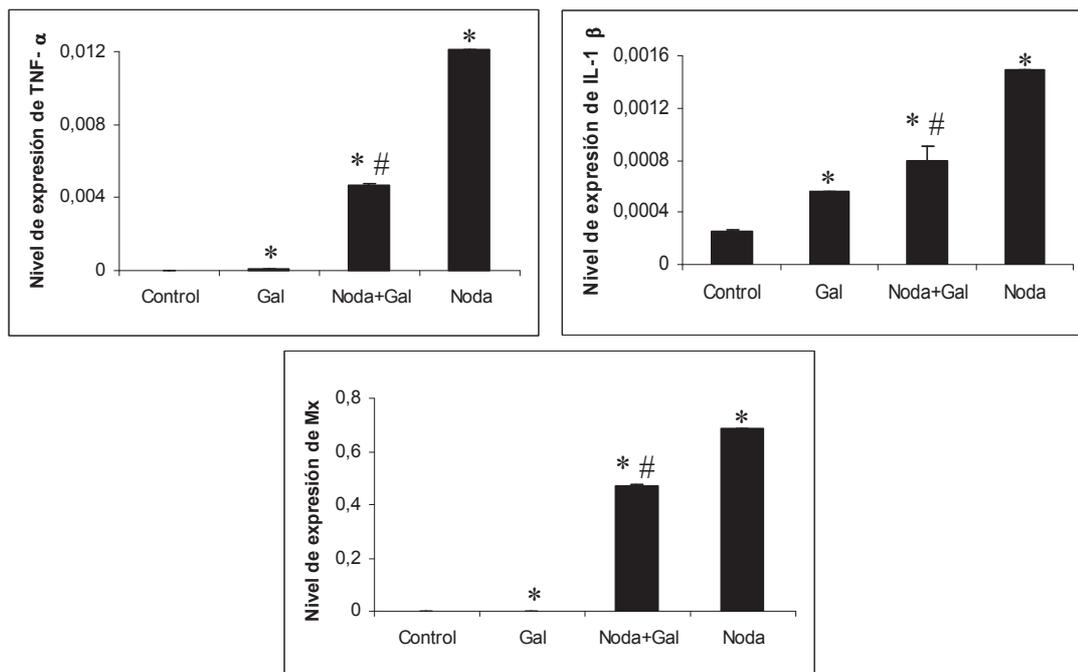
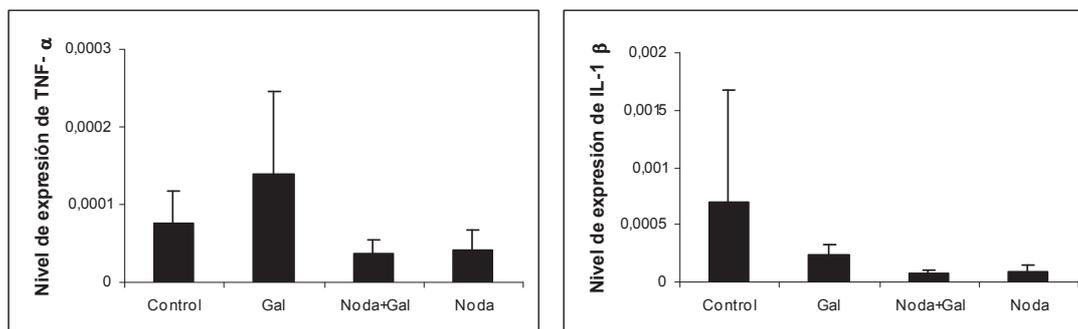


Figura 9: Expresión de citoquinas en cerebros de peces (pooles).

* Significativo con respecto al control.

Significativo con respecto a nodavirus.

En el caso de los riñones se observa el incremento, aunque no significativo, de la proteína antiviral Mx en los peces que fueron infectados con nodavirus pero sin haber diferencias entre los peces infectados tan sólo con nodavirus y los inoculados también con rSbgalectin-1. Sin embargo, en la expresión del factor de necrosis tumoral alfa y la interleuquina-1 beta no se observan diferencias significativas con respecto a los controles.



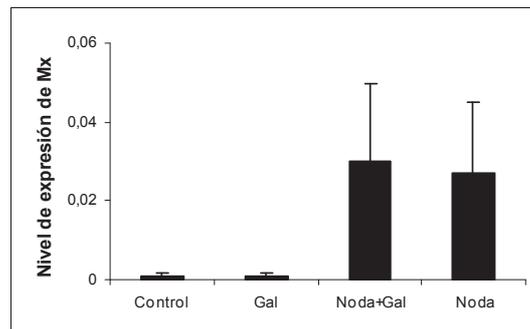


Figura 10: Expresión de citoquinas en riñones de peces.

En el caso de los hígados se observa también el incremento, no significativo, de la proteína antiviral Mx en los peces que fueron infectados con nodavirus pero sin haber diferencias entre los peces infectados tan sólo con nodavirus y los inoculados también con rSbgalectin-1. Sin embargo, al igual que ocurría con los riñones, en la expresión del factor de necrosis tumoral alfa y la interleuquina-1 beta no se observan diferencias con respecto a los controles.

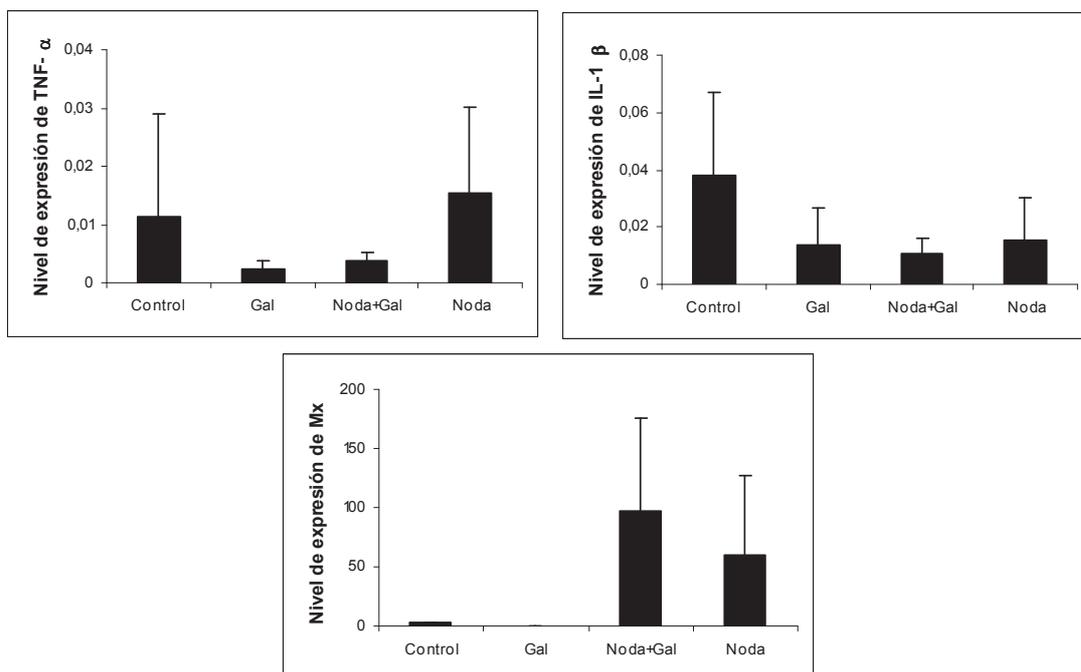


Figura 11: Expresión de citoquinas en hígados de peces.

3.6. Estudio de expresión de otras lectinas.

En el caso de la expresión de las lectinas se observa que en todas ellas hay un menor nivel de expresión, no significativo, en los peces que fueron inoculados con rSbgalectin-1 y nodavirus con respecto a los que fueron inoculados tan sólo con nodavirus. Además estas muestras fueron tomadas a las 72 horas de producirse la infección y, al igual que ocurría en los resultados descritos en el capítulo III de la tesis, la expresión de SbCLA en los peces infectados con nodavirus disminuye con respecto a los controles y sin embargo la expresión de SbCLB aumenta.

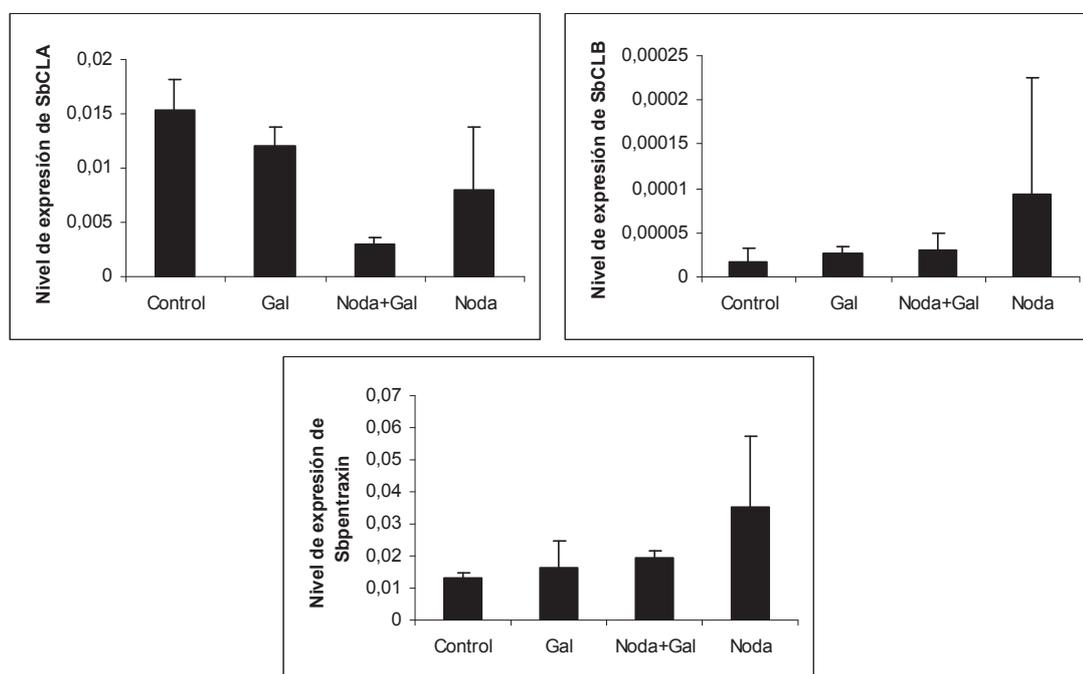


Figura 12: Expresión de lectinas en cerebros de peces.

3.7. Estudio de la fagocitosis por citometría de flujo.

Se realizó un estudio de medida de fagocitosis de leucocitos totales de riñón anterior mediante el uso del citómetro de flujo y se observó que la rSbgalectin-1 disminuía de forma no significativa la fagocitosis.

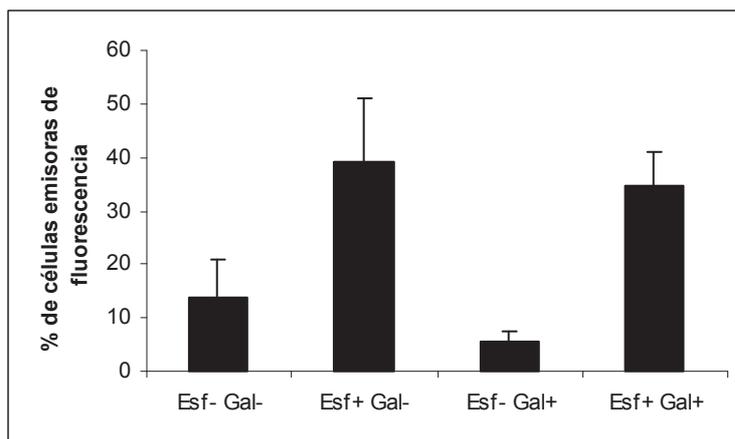


Figura 13: Porcentaje de células que emiten fluorescencia para cada uno de los tratamientos.

4. DISCUSIÓN.

Como indiqué en la introducción de este capítulo, las galectinas son una familia de proteínas que se caracterizan por tener un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) responsable de su unión, independiente de Ca^{2+} , a los β -galactósidos.

La obtención de proteínas recombinantes tiene aspectos ventajosos frente a la purificación de la proteína nativa ya que se puede disponer de la proteína en mayor cantidad en el momento que se requiera y es válida para realizar todo tipo de ensayos funcionales. Así, el estudio de la función de gran cantidad de proteínas se ha realizado utilizando proteínas recombinantes.

La rSbgalectin-1 se obtuvo mediante el sistema de expresión en células procariotas. La expresión de esta proteína se puede realizar en procariotas ya que se trata de una proteína no glicosilada (en el caso de que fuera glicosilada la expresión sería más compleja ya que debería realizarse en organismos eucariotas) y se comprobó la actividad galectina de la misma mediante un ensayo de hemaglutinación usando eritrocitos de conejo. Se demostró también que la capacidad de hemaglutinar eritrocitos era dependiente de su dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) ya que cuando se añadió lactosa a la solución de trabajo no tuvo lugar el proceso de hemaglutinación (Figuras 1 y 2). Esta misma manera de corroborar la actividad lectina de una galectina la usaron otros autores como Powell (1980) cuando purificó y estudió las propiedades de la galectina de pulmón de rata, Rabinovich *et al.* (1998) cuando purificó la galectina-1 de los macrófagos activados de rata, etc.

Se realizaron estudios funcionales tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando la rSbgalectin-1 con el fin de corroborar su posible actividad anti-inflamatoria y su efecto sobre la patogenicidad del nodavirus. Estudios previos de O'Farrel *et al.* (2002) en trucha demostraron una sobre-expresión de la galectina-9 en leucocitos después de una infección con rhabdovirus.

Las galectinas juegan un papel importante en las fases de inicio, activación y resolución de las respuestas inmunes innata y adaptativa por promoción del estallido respiratorio (Karlsson *et al.*, 1998), inhibición de la producción de óxido nítrico (Correa *et al.*, 2003), efectos anti- o pro-inflamatorios (Rabinovich *et al.*, 2007) y producción de citoquinas (Stowell *et al.*, 2008).

Se observó un descenso dosis-dependiente del estallido respiratorio en leucocitos totales de riñón de lubina después de una incubación con diferentes concentraciones de rSbgalectin-1 (Figuras 3 y 4). Este estudio se realizó también en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) obteniéndose resultados similares. Sin embargo, también se llevó a cabo la determinación de la producción de NO, tanto en lubina como en rodaballo, después de una incubación con diferentes concentraciones de rSbgalectin-1 y no se observó ninguna variación. Este descenso del estallido respiratorio está en relación con el descenso que se observa de la fagocitosis (Figura 12) ya que el proceso de fagocitosis lleva asociado la producción de radicales intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs) en un proceso caracterizado por el consumo rápido de oxígeno que se conoce como estallido respiratorio y la producción de óxido nítrico (NO) y otros intermediarios de nitrógeno reactivos (RNI) como los peroxinitritos, que constituyen un potente agente bactericida y han sido descritos en peces (Secombes, 1996).

Por otra parte, si realizamos un tratamiento con lipopolisacárido bacteriano y tomamos la medida del estallido respiratorio a los cinco minutos de añadir el PMA se observa que el LPS hace aumentar el estallido respiratorio mientras que si además de LPS añadimos rSbgalectin-1, el estallido respiratorio desciende con respecto al control (Figura 6). Este hecho demuestra la capacidad de la rSbgalectin-1 para disminuir la capacidad de producir radicales de oxígeno incluso cuando el LPS está mediando esta actividad. Es probable que esta disminución tenga relación con otra de las actividades descritas para la galectina 1 que es su papel proapoptótico, ya que produce apoptosis de las células T activadas. Además esta proteína media la inmunosupresión que protege el lisosoma del ataque inmune (Gandhi *et al.*, 2007).

No se apreciaron diferencias significativas en la mortalidad de los peces que fueron inoculados con rSbgalectin-1 y nodavirus con respecto a los peces que fueron infectados tan sólo con nodavirus (Figura 7). Se esperaba que la galectina hiciera descender la mortalidad de los peces por su posible papel anti-inflamatorio; sin embargo, es posible que no se observaran diferencias debido a que la concentración de galectina fuera demasiado baja para la concentración de nodavirus inoculada o bien porque las proteínas tienen un tiempo de vida muy corto y fueran necesarias posteriores inoculaciones.

Se observó un descenso de la expresión de citoquinas proinflamatorias, IL-1 β y TNF- α , en cerebro (órgano diana de la infección) de lubinas infectadas simultáneamente con

nodavirus y rSbgalectin-1 respecto a las lubinas inoculadas tan sólo con nodavirus (Figuras 8 y 9). En una revisión sobre el papel de las galectinas en la respuesta inflamatoria Rubinstein *et al.* (2004) indicaron que la galectina-1 producía una reducción en la expresión de citoquinas proinflamatorias. Nuestros resultados sugieren un posible papel anti-inflamatorio de la galectina-1 recombinante de lubina similar al descrito previamente en mamíferos (Camby *et al.*, 2006). Además, se observó una reducción de la expresión de la proteína antiviral Mx en peces inoculados simultáneamente con nodavirus y rSbgalectin-1 con respecto a los infectados tan sólo con nodavirus. El nodavirus causa vacuolización del sistema nervioso central y ha sido descrito que, en mamíferos, la forma oxidada de la galectina-1 produce regeneración axonal en el sistema nervioso periférico y central, incluso a concentraciones relativamente bajas (Camby *et al.*, 2006).

Además de las múltiples actividades inmunoreguladoras, las galectinas pueden unirse a glicoproteínas e inhibir la fusión de los virus a la membrana celular del hospedador, ejerciendo de esta manera un claro efecto antiviral. Así, se han descrito las propiedades antivirales de la galectina-1 contra el virus Nipah, probablemente por interacción con los N-glucanos de la envuelta viral (Levroney *et al.*, 2005; Lee, 2007). Nuestros resultados sugieren que la rSbgalectin-1 podría inhibir la replicación del nodavirus por un mecanismo similar y así explicar la diferencia observada en la proteína antiviral Mx. Mercier *et al.* (2008) obtuvieron un resultado contrario al del virus Nipah, ya que demostraron que la galectina 1 facilita la entrada del HIV aumentando así su infectividad.

Tanto en el caso de los riñones como de los hígados se observa el incremento, aunque no significativo, de la proteína antiviral Mx en los peces que fueron infectados con nodavirus pero sin haber diferencias entre los peces infectados tan sólo con nodavirus y los inoculados también con galectina-1 recombinante. Sin embargo, en la expresión del factor de necrosis tumoral alfa y la interleuquina-1 beta no se observan diferencias significativas con respecto a los controles (Figuras 9 y 10). Hay que tener en cuenta que estas muestras fueron tomadas 72 horas después de producirse la infección y es lógico que la mayor regulación se produzca en cerebro, órgano diana del virus, y no en hígado o riñón.

También nos parecía interesante relacionar la presencia de rSbgalectin-1 con la expresión de otras lectinas y, así, utilizando las muestras de cerebro del experimento de inoculación simultáneo de galectina-1 recombinante y nodavirus por un lado y nodavirus sólo por otro se estudió la expresión de las otras lectinas que describimos en esta tesis

doctoral (SbCLA, SbCLB y Sbpentraxin). Se observa que en todas ellas hay un menor nivel de expresión, no significativo, en los peces que fueron inoculados con rSbgalectin-1 y nodavirus con respecto a los que fueron inoculados tan sólo con nodavirus (Figura 11). Esto podría explicarse porque al introducirse artificialmente una proteína que une carbohidratos no es necesario que se produzca el aumento de expresión tan importante de las otras lectinas.

Además los resultados obtenidos con respecto a la expresión de las lectinas tipo C y de la pentraxina coinciden con los descritos en el capítulo III de la tesis en el sentido de que la expresión de SbCLA en los peces infectados con nodavirus disminuye con respecto a los controles y sin embargo la expresión de SbCLB aumenta (Figura 12).

En este último capítulo se describió la obtención de la proteína recombinante y se llevaron a cabo unos pocos ensayos funcionales, sin embargo, una vez obtenida la proteína (uno de los pasos más costosos) es importante continuar realizando un mayor número de ensayos funcionales para dilucidar los mecanismos por los que la Sbgalectin-1 influye en la inmunidad y en la protección contra la patogénesis viral.

Conclusiones

- 1-. La infección por nodavirus provocó que el TNF α aumentara en cerebro de lubinas y doradas 3 días después de producirse la infección. En riñón este aumento tuvo lugar a las 24 horas de producirse la infección, tanto en dorada como en lubina. Esto sugeriría que el sistema inmune podría activarse en cerebro cuando los nodavirus llegan a este órgano.
- 2-. Los valores de expresión del TNF α fueron mucho más elevados en lubina que en dorada. La fuerte sobre-expresión de esta citoquina pro-inflamatoria en cerebro de una especie susceptible como la lubina podría ser la responsable de la vacuolización y el proceso neuroinflamatorio asociado con la enfermedad.
- 3-. La fuerte sobre-expresión de la proteína Mx en cerebro de dorada con respecto a lo observado en lubina podría explicar por qué la dorada es un portador asintomático de la enfermedad.
- 4-. Se observa un mayor aumento en la expresión de la proteína antiviral Mx cuando los peces fueron infectados con nodavirus y estuvieron expuestos previamente a hiperoxia.
- 5-. Se comprobó que la técnica de la sustracción de librerías es un buen método para obtener genes inmunes que se están expresando bajo unas condiciones determinadas.
- 6-. Se caracterizaron, por primera vez en lubina, cuatro proteínas de la superfamilia de las lectinas: dos lectinas tipo C, una galectina y una pentraxina. Las dos lectinas tipo C, SbCLA y SbCLB, fueron clasificadas como pertenecientes a los grupo II y VII, respectivamente. La galectina fue clasificada como perteneciente al grupo de las proto-galectinas. Por último, la pentraxina fue clasificada como perteneciente al grupo de las pentraxinas cortas y, probablemente, se trate de una proteína C reactiva.
- 7-. Se obtuvo la Sbglectin-1 recombinante mediante el sistema de expresión en células procariotas y la actividad galectina fue comprobada mediante un ensayo de hemaglutinación de eritrocitos.
- 8-. La Sbglectin-1 induce un descenso del estallido respiratorio de manera dosis-dependiente.

9-. La galectina-1 podría tener un papel anti-inflamatorio, ya que en los peces que fueron inoculados con nodavirus y galectina-1 recombinante se observó un descenso de citoquinas inflamatorias con respecto a los peces que fueron inoculados solamente con nodavirus.

Bibliografía

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1995) *Inmunología Celular y Molecular*. McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid.
- Abollo E, Ordás C, Dios S, Figueras A, Novoa B (2005) Molecular characterisation of a turbot Mx cDNA. *Fish & Shellfish Immunology*, 19: 185-190.
- Aggarwal B y Vilcek J (1991) *Tumor necrosis factors: structure, function and mechanism*. Marcel Dekker Publishers, New York.
- Ahmed H (comunicación personal). Center of Marine Biotechnology. Baltimore (USA).
- Ahmed H, Pohl J, Fink NE, Strobel F, Vasta GR (1996) The primary structure and carbohydrate specificity of a β -galactosyl-binding lectin from toad (*Bufo arenarum* Hensel) ovary reveal closer similarities to the mammalian galectin-1 than to the galectin from the clawed frog *Xenopus laevis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(51): 33083-33094.
- Akaike T, Suga M, Maeda H (1998) Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 217(1): 64-73.
- Alexander JB e Ingram GA (1992) Non cellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 249-279.
- Alexander WS (1998) Cytokines in hematopoiesis. *International Reviews of Immunology*, 16(5-6): 651-682.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857): 732-738.
- Almkvist J y Karlsson A (2004) Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconjugate Journal*, 19: 575-581.
- Alonso M y Leong J-A (2002) Suppressive subtraction libraries to identify interferon-inducible genes in fish. *Marine Biotechnology*, 4: 74-80.
- Altmann SM, Mellon MT, Johnson MC, Paw BH, Trede NS, Zon LI, Kim CH (2004) Cloning and characterization of an Mx gene and its corresponding promoter from the zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 295-306.
- Aranguren R, Tafalla C, Novoa B, Figueras A (2002) Experimental transmission of encephalopathy and retinopathy induced by nodavirus to sea bream (*Sparus aurata* L.) using different infection models. *Journal of Fish Diseases*, 25: 317-324.
- Aranishi F y Nakane M (1997) Epidermal proteases of the Japanese eel. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16(6): 471-478.

- Aranishi F (1999) Purification and characterization of alpha1-proteinase inhibitor from carp (*Cyprinus carpio*) serum. *Marine Biotechnology*, 1(1): 33-43.
- Arason GJ (1996) Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology*, 6: 277-289.
- Arimoto M, Mushiake K, Mizuta Y, Nakai T, Muroga K, Furusawa I (1992) Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Gyobyo Kenkyu*, 27(4): 191-195.
- Arimoto M, Mori K, Nakai T, Muroga K, Furusawa I (1993) Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *Journal of Fish Diseases*, 16: 461-469.
- Arimoto M, Maruyama K, Furusawa I (1994) Epizootiology of viral nervous necrosis (VNN) in striped jack. *Gyobyo Kenkyu*, 29: 19-24.
- Arimoto M, Sato J, Maruyama K, Mimura G, Furusawa I (1996) Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, 143: 15-22.
- Arkoosh MR y Kaattari SL (1991) Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Developmental and Comparative Immunology*, 15: 279-293.
- Armstrong PB y Quigley JP (1999) Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, 23(4-5): 375-390.
- Arnheiter H, Frese M, Kambadur R, Meier E, Haller O (1996) Mx transgenic mice-animal models of health. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 206: 119-147.
- Athanassopoulou F, Billinis C, Prapas Th (2004) Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60: 247-252.
- Avrameas S y Ternynck T (1995) Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Research in Immunology*, 146(4-5): 235-248.
- Avtalion RR (1981) Environmental control of the immune response in fish. *Critical Reviews in Environmental Control*, 11: 163-187.
- Azad IS, Shekhar MS, Thirunavukkarasu AR, Poornima M, Kailasam M, Rajan JJS, Ali SA, Abraham M, Ravichandran P (2005) Nodavirus infection causes mortalities in hatchery produced larvae of *Lates calcarifer*: first report from India. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63: 113-118.

- Babior BM (1988) Microbicidal oxidant production by phagocytes, pp. 39-51. En: *Oxy-radicals in molecular biology and pathology*. Editado por Cerutti PA, Fridovich E, Alan R. Liss RA, New York.
- Baleeiro CEO, Wilcoxon SE, Morris SB, Standiford TJ, Paine III R (2003) Sublethal hyperoxia impairs pulmonary innate immunity. *The Journal of Immunology*, 171: 955-963.
- Barker DE, MacKinnon A-M, Boston L, Burt MDB, Cone DK, Speare DJ, Griffiths S, Cook M, Ritchie R, Olivier G (2002) First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49: 99-105.
- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H (1994) Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(33): 20807-20810.
- Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M (2004) Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(5): 509-554.
- Bayne CJ y Gerwick L (2001) The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 725-743.
- Bayne CJ, Gerwick L, Fujiki K, Nakao M, Yano T (2001) Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 205-217.
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385(6617): 640-644.
- Bellance R y Gallet de Saint-Aurin D (1988) L'encéphalite virale du loup de mer. *Caraibes Médical*, 2: 105-114.
- Benedetti S, Randelli E, Buonocore F, Zou J, Secombes CJ, Scapigliati G (2006) Evolution of cytokine responses: IL-1beta directly affects intracellular Ca²⁺ concentration of teleost fish leukocytes through a receptor-mediated mechanism. *Cytokine*, 34(1-2): 9-16.
- Benmansour A, Basurco B, Monnier AF, Vende P, Winton JR, de Kinkelin P (1997) Sequence variation of the glycoprotein genes identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *The Journal*

- General Virology, 78: 2837-2846.
- Benson RM, Minter LM, Osborne BA, Granowitz EV (2003) Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, 134: 57-62.
- Bird S, Zou J, Wang T, Munday B, Cunningham C, Secombes CJ (2002) Evolution of interleukin-1 β . *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13: 483-502.
- Biron CA (1994) Cytokines in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection. *Current Opinion in Immunology*, 6(4): 530-538.
- Biron CA y Sen GC (2001) Interferons and other cytokines, pp. 321-351. En: *Fields virology*. Editado por Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Bociek RG y Armitage JO (1996) Hematopoietic growth factors. *CA: a Cancer Journal of Clinicians*, 46(3): 165-184.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annual Review of Immunology*, 15: 749-795.
- Boes M (2000) Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology*, 37(18): 1141-1149.
- Bohn J (1999) Are natural antibodies involved in tumour defence? *Immunology Letters*, 69(3): 317-320.
- Bols NC, Roberson MM, Haywood-Reid PL, Cerra RF, Barondes SH (1986) Secretion of a cytoplasmic lectin from *Xenopus laevis* skin. *The Journal of Cell Biology*, 102: 492-499.
- Bonami J-R, Shi Z, Qian D, Sri Widada J (2005) White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *Journal of Fish Diseases*, 28: 23-31.
- Bordet J y Gay FP (1906) Sur les relations des sensibilisatrices avec l'alexine. *Annals Institut Pasteur*, 20: 467-498.
- Boshra H, Gelman AE, Sunyer JO (2004) Structural and functional characterization of complement C4 and C1s-like molecules in teleost fish: insights into the evolution of classical and alternative pathways. *The Journal of Immunology*, 173: 349-359.
- Boshra H, Wang T, Hove-Madsen L, Hansen J, Li J, Matlapudi A, Secombes CJ, Tort L, Sunyer JO (2005) Characterization of a C3a receptor in rainbow trout and *Xenopus*: the first identification of C3a receptors in nonmammalian species. *The Journal of Immunology*, 175: 2427-2437.

- Boshra H, Li J, Sunyer JO (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2): 239-262.
- Boudinot P, Salhi S, Blanco M, Benmansour A (2001) Viral haemorrhagic septicaemia virus induces vig-2, a new interferon-responsive gene in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 11(5): 383-397.
- Bovo G, Nishizawa T, Maltese C, Borghesan F, Mutinelli F, Montesi F, De Mas S (1999) Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Research*, 63: 143-146.
- Bowden TJ, Butler R, Bricknell IR, Ellis AE (1997) Serum trypsin-inhibitory activity in five species of farmed fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 7(6): 377-385.
- Brabers NA y Nottet HS (2006) Role of the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta in HIV-associated dementia. *European Journal of Clinical Investigation*, 36(7): 47-458.
- Brahimi-Horn MC y Pouysségur J (2007) Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Letters*, 581: 3582-3591.
- Braun R, Arnesen JA, Rinne A, Hjelmeland K (1990) Immunohistological localisation of trypsin in mucus-secreting cell layers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 13(3): 233-238.
- Breuil G, Bonami JR, Pepin JF, Pichot Y (1991) Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 97: 109-116.
- Breuil G, Pepin JF, Castric J, Fauvel C, Thiery R (2000) Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult seas bass: application to the screening of broodstock in sea bass hatcheries. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 20(3): 95-100.
- Brown MA, Zhu L, Schmidt C, Tucker PW (2007) Hsp90--from signal transduction to cell transformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363: 241-246.
- Buonocore F, Mazzini M, Forlenza M, Randelli E, Secombes CJ, Zou J, Scapigliati G (2004) Expression in *Escherichia coli* and purification of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) interleukin 1beta, a possible immunoadjuvant in aquaculture. *Marine Biotechnology*, 6(1): 53-59.
- Buonocore F, Forlenza M, Randelli E, Benedetti S, Bossu P, Meloni S, Secombes CJ, Mazzini M, Scapigliati G (2005) Biological activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) recombinant interleukin-1beta. *Marine Biotechnology*, 7: 609-617.

- Caipang CMA, Hirono I, Aoki T (2003) *In vitro* inhibition of fish rhabdovirus by Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* Mx. *Virology*, 317: 373-382.
- Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R (2006) Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, 16(11): 137R-157R.
- Cammarata M, Benenati G, Odom EW, Salerno G, Vizzini A, Vasta GR, Parrinello N (2007) Isolation and characterization of a fish F-type lectin from gilt head bream (*Sparus aurata*) serum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770: 150-155.
- Campos-Pérez JJ, Ellis AE, Secombes CJ (2000) Toxicity of nitric oxide and peroxyntirite to bacterial pathogens of fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43(2): 109-115.
- Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F (1991) The molecular action of tumor necrosis factor- α . *European Journal of Biochemistry*, 202: 3-14.
- Casali P y Schettino EW (1996) Structure and function of natural antibodies. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 210: 167-179.
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 540-552.
- Castric J, Thiery R, Jeffroy J, de Kinkelin P, Raymond JC (2001) Sea bream, *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47: 33-38.
- Chang CI, Pleguezuelos O, Zhang YA, Zou J, Secombes CJ (2005) Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infection and Immunity*, 73(8): 5053-5064.
- Chang CI, Zhang YA, Zou J, Nie P, Secombes CJ (2006) Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 185-195.
- Chen Y, Su Y, Lin JH, Yang H, Chen T (2006) Cloning of an orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) Mx cDNA and characterisation of its expression in response to nodavirus. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 58-71.
- Chi SC, Lo CF, Kou GH, Chang PS, Peng SE, Chen SN (1997) Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 20: 185-193.
- Chi SC, Hu WW, Lo BJ (1999) Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases*, 22: 173-182.

- Chini V, Rimoldi S, Terova G, Saroglia M, Rossi F, Bernardini G, Gornati R (2006) EST-based identification of genes expressed in the liver of adult seabass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene*, 376: 102-106.
- Chow DA, Wang H, Zhang Z (1999) Natural antibody surveillance of neoplastic and activated cells. *Biotechnologia Aplicada*, 16(1): 18-19.
- Chung S y Secombes CJ (1988) Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry*, 89(3): 539-544.
- Clem LW, Faulmann E, Miller NW, Ellsaesser C, Lobb CJ, Cuchens MA (1984) Temperature-mediated processes in teleost immunity: Differential effects of *in vitro* and *in vivo* temperatures on mitogenic responses of channel catfish lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 8: 313-322.
- Clem LW, Sizemore RC, Ellsaesser CF, Miller NW (1985) Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Developmental and Comparative Immunology*, 9(4): 803-809.
- Clem LW, Miller NW, Bly JE (1991) Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions and temperature sensitivities, pp. 191-213. En: *Phylogenesis of immune functions*. Editado por War GW, Cohen N. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Collet B, Hovens GC, Mazzoni D, Hirono I, Aoki T, Secombes CJ (2003) Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interferon regulatory factor 1 and 2 (IRF-1 and IRF-2). *Developmental and Comparative Immunology*, 27(2): 111-126.
- Collet B, Munro ES, Gahlawat S, Acosta F, Garcia J, Roemelt C, Zou J, Secombes CJ, Ellis AE (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.
- Comps M, Pepin JF, Bonami JR (1994) Purification and characterisation of the two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 123: 1-10.
- Cook MT, Hayball PJ, Birdseye L, Bagley C, Nowak BF, Hayball JD (2003) Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complement-fixing activity from snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) serum. *Developmental and Comparative Immunology*, 27: 579-588.
- Cooper DNW, Massa SM, Barondes SH (1991) Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *The Journal of Cell Biology*, 115: 1437-1448.

- Cooper DNW, Boulianne RP, Charlton S, Farrell EM, Sucher A, Lu BC (1997) Fungal galectins, sequence and specificity of two isolectins from *Coprinus cinereus*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3): 1514-1521.
- Cooper DNW y Barondes SH (1999) God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*, 9(10): 979-984.
- Cooper DNW (2002) Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572: 209-231.
- Corbera J, Sabatés A, García-Rubies A (2000) Peces de mar de la Península Ibérica. Planeta. Barcelona (España).
- Correa SG, Sotomayor CE, Aoki MP, Maldonado CA, Rabinovich GA (2003) Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology* 13: 119-28.
- Cuchens MA y Clem LW (1977) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells. *Cellular Immunology*, 34(2): 219-230.
- Cuesta A, Esteban MA, Meseguer J (1999) Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. Assessment by flow cytometry and microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71(3-4): 161-171.
- Curtis PA, Drawbridge M, Iwamoto T, Nakai T, Hedrick RP, Gendron AP (2001) Nodavirus infection of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*, cultured in southern California: first record of viral nervous necrosis (VNN) in North America. *Journal of Fish Diseases*, 24: 263-271.
- Czarniecki CW (1993) The role of tumor necrosis factor in viral disease. *Antiviral Research*, 22(4): 223-258.
- Dabrowski K y Cieroszko A (1994) Proteinase inhibitor(s) in seminal plasma of teleost fish. *Journal of Fish Biology*, 45(5): 801-809.
- Dahms NM y Hancock MK (2002) P-type lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572(2-3): 317-340.
- Dalla Valle L, Zanella L, Patarnello P, Paolucci L, Belvedere P, Colombo L (2000) Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *Journal of Fish Diseases*, 23: 321-327.
- Dalmo RA, Ingebrigsten K, Sveinbjornsson B, Seljelid R (1996) Accumulation of immunomodulatory laminaran (beta (1,3)-D-glucan) in the heart, spleen and kidney of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Journal of Fish Diseases*, 19: 129-136.
- Dannevig BH, Nilsen R, Modahl I, Jankowska M, Taksdal T, Press C Mcl (2000) Isolation

- in cell culture of nodavirus from farmed Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43(3): 183-189.
- David NB, Sapède D, Saint-Etienne L, Thisse C, Thisse B, Dambly-Chaudière C, Rosa FM, Ghysen A (2002) Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 16297-16302.
- Davidson GA, Ellis AE, Secombes CJ (1993) Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology*, 17(4): 373-376.
- Davidson GA, Lin SH, Secombes CJ, Ellis AE (1997) Detection of specific and “constitutive” antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leukocytes of dab (*Limanda limanda*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58(3-4): 363-374.
- Dean JB, Mulkey DK, Henderson III RA, Potter SJ, Putnam RW (2004) Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. *Journal of Applied Physiology*, 96: 784-791.
- De Haas CJC, van Leeuwen EMM, van Bommel T, Verhoef J, van Kessel KPM, van Strijp JAG (2000) Serum amyloid P component bound to Gram-negative bacteria prevents lipopolysaccharide-mediated classical pathway complement activation. *Infection and Immunity*, 68(4): 1753-1759.
- Delamare-Deboutteville J, Wood D, Barnes AC (2006) Response and function of cutaneous mucosal and serum antibodies in barramundi (*Lates calcarifer*) acclimated in seawater and freshwater. *Fish & Shellfish Immunology*, 21(1): 92-101.
- Delsert C, Morin N, Comps M (1997) A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing. *Archives of Virology*, 142: 2359-2371.
- Diatchenko L, Chris Lau Y-F, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 93: 6025-6030.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis E, Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303(5663): 1529-1531.
- Dinarello CA (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 77(8): 1627-1652.

- Dinarello CA (1994a) The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *The FASEB Journal*, 8: 1314-1325.
- Dinarello CA (1994b) The biological properties of interleukin-1. *European Cytokine Network*, 5(6): 517-531.
- Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87: 2095-2147.
- Dinarello CA (1997) Interleukin-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 8(4): 253-265.
- Dios S, Poisa-Beiro L, Figueras A, Novoa B (2007) Suppression subtraction hybridization (SSH) and microarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus. *Molecular Immunology*, 44(9): 2195-2204.
- Dixon B y Stet RJM (2001) The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(8-9): 683-699.
- Dodd RB y Drickamer K (2001) Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*, 11(5): 71R-79R.
- Drickamer K (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(20): 9557-9560.
- Drickamer K (1993) Evolution of Ca²⁺-dependent animal lectins. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 45: 207-232.
- Drickamer K y Taylor ME (1993) Biology of animal lectins. *Annual Reviews of Cell Biology*, 9: 237-264.
- Drickamer K (1999) C-type-lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 585-590.
- Drickamer K y Fadden AJ (2002) Genomic analysis of C-type lectins. *Biochemical Society Symposia*, 69: 59-72.
- Du Clos TW y Mold C (2004) C-reactive protein. *Immunologic Research*, 30(3): 261-277.
- Du Pasquier L (2001) The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry*, 129(1): 1-15.
- Duchiron C, Betoulle S, Reynaud S, Deschaux P (2002a) Lindane increases macrophage-activating factor production and intracellular calcium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(3): 388-396.
- Duchiron C, Reynaud S, Deschaux P (2002b) Lindane-induced macrophage activating factor (MAF) production by peripheral blood leukocytes (PBLs) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): involvement of intracellular cAMP mobilization. *Aquatic Toxicology*, 56(2): 81-91.

- Duguid JR, Rohwer RG, Seed B (1998) Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(15): 5738-5742.
- Elgavish S y Shaanan B (1997) Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends in Biochemical Sciences*, 22: 462-467.
- Ellis AE (1999) Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 9: 291-308.
- Ellis AE (2001) Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(8-9): 827-839.
- Elward K y Gasque P (2003) "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Molecular Immunology*, 40(2-4): 85-94.
- Endo Y, Takahashi M, Fujita T (2006) Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*, 211(4): 283-293.
- Esteban MA y Meseguer J (1994) Phagocytic defense mechanism in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. *The Anatomical Record*, 240(4): 589-597.
- Evans DL y Jaso-Friedmann L (1992) Nonspecific cytotoxic cells as effectors in immunity in fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 109-121.
- Evans DL, Leary JH, Jaso-Friedmann L (2001) Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(8-9): 791-805.
- Ewart KV, Johnson SC, Ross NW (1999) Identification of a pathogen-binding lectin in salmon serum. *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology and Toxicology*, 123: 9-15.
- Faisal M, Ahmed II, Peters G, Cooper EL (1989) Natural cytotoxicity of tilapia leucocytes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 7: 17-22.
- Fänge R, Lundblad G, Lind J (1976) Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid tissues of marine fish. *Marine Biology*, 36(3): 277-282.
- Fänge R (1982) A comparative study of lymphomyeloid tissue in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 6: 23-33.
- Farber JM (1997) Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 61(3): 246-257.
- Fast MD, Sims DE, Burka JF, Mustafa A, Ross NW (2002) Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and

- Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology. A: Comparative Physiology*, 132(3): 645-657.
- Fearon DT y Locksley RM (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272(5258): 50-53.
- Fearon DT (1997) Seeking wisdom in innate immunity. *Nature*, 388(6640): 323-324.
- Fernandez EJ y Lolis E (2002) Structure, function and inhibition of chemokines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42: 469-499.
- Fernandez-Gonzalez S, Buchmann K, Nielsen ME (2007) Complement expression in common carp (*Cyprinus carpio* L.) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 31(6): 576-586.
- Fernandez-Trujillo MA, Porta J, Borrego JJ, Alonso MC, Alvarez MC, Béjar J (2006) Cloning and expression analysis of Mx cDNA from Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 21: 577-582.
- Fletcher TC y White A (1973) Lysozyme activity in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 29(10): 1283-1285.
- Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F (1991) Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 2: 372-374.
- Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA (1998) The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology*, 10: 363-372.
- Frerichs GN (1990) Efficacy of chemical disinfectants against snakehead rhabdovirus. *Journal of Applied Ichthyology*, 6: 117-123.
- Frerichs GN, Morgan D, Hart D, Skerrow C, Roberts RJ, Onions DE (1991) Spontaneously productive C-type retrovirus infection of fish cell lines. *Journal of General Virology*, 72(Pt10): 2537-2539.
- Frerichs GN, Rodger HD, Peric Z (1996) Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of General Virology*, 77: 2067-2071.
- Frerichs GN, Tweedie A, Starkey WG, Richards RH (2000) Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, 185: 13-24.
- Frøystad MK, Rode M, Berg T, Gjøen T (1998) A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, 22(5-6): 533-549.

- Fujiki K, Shin DH, Nakao M, Yano T (1999) Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) CC chemokine, CXC chemokine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization. *Immunogenetics*, 49: 909-914.
- Fujita T, Matsushita M, Endo Y (2004) The lectin-complement pathway: its role in innate immunity and evolution. *Immunological Reviews*, 198: 185-202.
- Funkenstein B, Rebhan Y, Dyman A, Radaelli G (2005) Alpha2-Macroglobulin in the marine fish *Sparus aurata*. *Comparative Biochemistry and Physiology. A: Comparative Physiology*, 141(4): 440-449.
- Ganassin R y Bols N (1996) Development of long-term rainbow trout spleen cultures that are haemopoietic and produce dendritic cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 6(1): 17-34.
- Gandhi MK, Moll G, Smith C, Dua U, Lambley E, Ramuz O, Gill D, Marlton P, Seymour JF, Khanna R (2007) Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, 110(4): 1326-1329.
- García-Castillo J, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J (2002) Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics*, 54(3): 200-207.
- García-Castillo J, Chaves-Pozo E, Olivares P, Pelegrin P, Meseguer J, Mulero V (2004) The tumor necrosis factor alpha of the bony fish seabream exhibits the *in vivo* proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(11): 1331-1340.
- Garlanda C, Botazzi B, Bastone A, Mantovani A (2005) Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annual Review of Immunology*, 23: 337-366.
- Gerwick L, Corley-Smith G, Bayne CJ (2007) Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(3): 157-171.
- Gestal C, Costa MM, Figueras A, Novoa B (2007) Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: Identification of new antimicrobial peptides. *Gene*, 406: 134-143.
- Gewurd H, Zhang X-H, Lint TF (1995) Structure and function of the pentraxins. *Current Opinion in Immunology*, 7: 54-64.

- Ghoshal A, Das S, Ghosh S, Mishra MK, Sharma V, Koli P, Sen E, Basu A (2007) Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. *Glia*, 55(5): 483-496.
- Glazebrook JS, Heasman MP, de Beer SW (1990) Picorna-like virus particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases*, 13: 245-249.
- Goetz FW, Iliev DB, McCauley LAR, Liarte CQ, Tort LB, Planas JV, MacKenzie S (2004) Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages. *Molecular Immunology*, 41: 1199-1210.
- Goldfeld AE y Tsai EY (1996) TNF-alpha and genetic susceptibility to parasitic disease. *Experimental Parasitology*, 84(2): 300-303.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J (2004) *Inmunología*. McGraw-Hill Interamericana. Mexico.
- Gomez DK, Baeck GW, Kim JH, Choresca CH, Park SC (2008) Molecular detection of betanodavirus from apparently healthy wild marine invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(3): 197-202.
- Gonzalez R, Charlemagne J, Mahana W, Avrameas S (1988) Specificity of natural serum antibodies present in phylogenetically distinct fish species. *Immunology*, 63(1): 31-36.
- Gonzalez R, Matsiota P, Torchy C, De Kinkelin P, Avrameas S (1989) Natural anti-TNP antibodies from rainbow trout interfere with viral infection in vitro. *Research in Immunology*, 140(7): 675-684.
- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE (2000) Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, 81(Pt10): 2341-2364.
- Goodman AR, Cardozo T, Abagyan R, Altmeyer A, Wisniewski H-G, Vilcek J (1996) Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 7(2): 191-202.
- Grabowski LD, LaPatra SE, Cain KD (2004) Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. *Journal of Fish Diseases*, 27(10): 573-581.
- Graham S y Secombes CJ (1990) Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma? *Journal of Fish Biology*, 36(4): 563-573.
- Gravell M y Malsberger RG (1965) A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Annals of the New York Academy of Science*, 126(1): 555-565.

- Grayson TH, Cooper LF, Wrathmell AB, Roper J, Evenden AJ, Gilpin ML (2002) Host responses to *Renibacterium salmoninarum* and specific components of the pathogen reveal the mechanisms of immune suppression and activation. *Immunology*, 106(2): 273-283.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1): 131-138.
- Grinde B, Lie Ø, Poppe T, Salte R (1988) Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture*, 68(4): 299-304.
- Grinde B (1989) Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *Journal of Fish Diseases*, 12(2): 95-104.
- Grotmol S, Totland GK, Kvellestad A, Fjell K, Olsen AB (1995) Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous system and retina. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 15(5): 176-180.
- Grotmol S, Nerland AH, Biering E, Totland GK, Nishizawa T (2000) Characterization of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39(2): 79-88.
- Groves ML y Greenberg R (1982) β_2 -microglobulin and its relationship to the immune system. *Journal of Dairy Science*, 65: 317-325.
- Gudmundsdóttir BK y Magnadóttir B (1997) Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against an experimental infection of *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes*. *Fish & Shellfish Immunology*, 7(1): 55-69.
- Guidon S y Gascuel O (2003) PHYML-A single, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.
- Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of jurkat cell transcripts induced by photohemagglutinin and phorbol 12-Myristate 13-Acetate. *Analytical Biochemistry*, 240: 90-97.
- Haller O, Frese M., Kochs G (1998) Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Revue Scientifique et Technique de L'office International des Epizooties*, 17 : 220-230.

- Haller O y Kochs G (2002) Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, 3(10): 710-717.
- Hamblin AS (1993) *Cytoquines and cytoquine receptors*. IRL Press, Oxford.
- Hardie LJ, Laing KJ, Daniels GD, Grabowski PS, Cunningham C, Secombes CJ (1998) Isolation of the first piscine transforming growth factor beta gene: analysis reveals tissue specific expression and a potential regulatory sequence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytokine*, 10: 555-563.
- Hart D, Frerichs GN, Rambaut A, Onions DE (1996) Complete nucleotide sequence and transcriptional analysis of the snakehead fish retrovirus. *Journal of Virology*, 70(6): 3606-3616.
- He N, Liu H, Xu X (2004) Identification of genes involved in the response of haemocytes of *Penaeus japonicus* by suppression subtractive hybridization (SSH) following microbial challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 17: 121-128.
- He N, Qin Q, Xu X (2005) Differential profile of genes expressed in hemocytes of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Research*, 66: 39-45.
- Hedge A, Teh HC, Lam TJ, Sin YM (2003) Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata*, comparative characterization and pathogenicity studies. *Archives of Virology*, 148: 575-586.
- Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM (1984) Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature*, 308(5955): 149-153.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663): 1526-1529.
- Heisler N (1993) Acid-base regulation in response to changes of the environment: characteristics and capacity, pp. 207-230. En: *Fish Ecophysiology*. Editado por Rankin JC y Jensen FB. Chapman and Hall. New York.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390: 465-471.
- Herberman R y Ortaldo B (1981) Natural killer cells: their role in defences against disease. *Science*, 214: 24-30.
- Herpin A, Lelong C, Favrel P (2004) Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 461-485.

- Hibbs Jr JB, Taintor RR, Vavrin Z (1987) Macrophage cytotoxicity: role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235(4787): 473-476.
- Hirabayashi J, Satoh M, Ohyama Y, Kasai K (1992) Purification and characterization of beta-galactoside-binding proteins from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biochemistry*, 111(5): 553-555.
- Hirabayashi J y Kasai K (1993) The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*, 3(4): 297-304.
- Hirabayashi J, Ubukata T, Kasai K (1996) Purification and molecular characterization of a novel 16-kDa galectin from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(5): 2497-2505.
- Hirono I, Nam B-H, Kurobe T, Aoki T (2000) Molecular cloning, characterization and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *The Journal of Immunology*, 165: 4423-4427.
- Hjelmeland K (1983) Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua*). Isolation and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry*, 76(2): 365-372.
- Hjelmeland K, Christie M, Raa J (1983) Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *Journal of Fish Biology*, 23(1): 13-22.
- Honn KV y Chavin W (1976) Utility of ozone treatment in the maintenance of water quality in a closed marine system. *Marine Biology*, 34(3): 201-209.
- Horiguchi J, Warren MK, Kufe D (1987) Expression of the macrophage-specific colony-stimulating factor in human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 69(4): 1259-1261.
- Huang B, Tan C, Chang SF, Munday B, Mathew JA, Ngho GH, Kwang J (2001) Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases*, 24: 135-141.
- Huisling MO, Stet RJ, Savelkoul HF, Verburg-van Kemenade BM (2004) The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(5): 395-413.
- Huisling MO, Kruiswijk CP, van Schijndel JE, Savelkoul HF, Flik G, Verburg-van Kemenade BML (2005) Multiple and highly divergent IL-11 genes in teleost fish. *Immunogenetics*, 57(6): 432-443.

- Husgarð S, Grotmol S, Hjeltnes BK, Rodseth OM, Biering E (2001) Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, an evaluation of a vaccine against SJNNV. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45: 33-44.
- Huttenhuis HB, Taverne-Thiele AJ, Grou CP, Bergsma J, Saeij JP, Nakayasu C, Rombout JH (2006) Ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(6): 557-574.
- Iliev DB, Castellana B, Mackenzie S, Planas JV, Goetz FW (2007) Cloning and expression analysis of an IL-6 homolog in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Immunology*, 44: 1803-1807.
- Inagawa H, Kuroda A, Nishizawa T, Honda T, Ototake M, Yokomizo Y, Nakanishi T, Soma G-I (2001) Cloning and characterisation of tandem-repeat type galectin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 11: 217-231.
- Ingram GA (1980) Substances involved in the natural resistance of fish to infection--A review. *Journal of Fish Biology*, 16(1): 23-60.
- Iwamoto T, Mori K, Arimoto M, Nakai T (1999) High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39: 37-47.
- Iwamoto T, Nakai T, Mori K, Arimoto M, Furusawa I (2000) Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43: 81-89.
- Iwamoto T, Mise K, Mori K, Arimoto M, Nakai T, Okuno T (2001) Establishment of an infectious RNA transcription system for striped jack nervous necrosis virus, the type species of the betanodavirus. *Journal of General Virology*, 82: 2653-2662.
- Jacobs BL y Langland JO (1996) When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*, 219(2): 339-349.
- Janeway C (1989) Immunogenicity signals 1, 2, 3 ... and 0. *Immunology Today*, 10(9): 283-286.
- Jensen LE, Hiney MP, Shields DC, Uhlar CM, Lindsay AJ, Whitehead AS (1997) Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response. *The Journal of Immunology*, 158: 384-392.
- Jensen V y Robertsen B (2000) Cloning of an Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression in response to double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 20(8): 701-710.

- Jia X, Patrzykat A, Devlin RH, Ackerman PA, Iwama GK, Hancock RE (2000) Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5): 1928-1932.
- Jiang HX, Siegel JN, Gewurz H (1991) Binding and complement activation by C-reactive protein via the collagen-like region of C1q and inhibition of these reactions by monoclonal antibodies to C-reactive protein and C1q. *Journal of Immunology*, 146(7): 2324-2330.
- Johansen R, Sommerset I, TØrud B, Korsnes K, Hjortaas MJ, Nilsen F, Nerland AH, Dannevig DH (2004) Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 27: 591-601.
- JØrgensen PEV (1973) Inactivation of IPN and Egtved virus. *Revista Italiana di Piscicoltura e Ittioppawhgia*, 8: 107-108.
- Kaattari SL (1992) Fish B lymphocytes: defending their form and function. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 161-180.
- Kaesberg P, Dasgupta R, Sgro J-Y, Wery J-P, Selling BH, Hosur MV, Johnson JE (1990) Structural homology among four nodaviruses as deduced by sequencing and X-ray cristallography. *Journal of Molecular Biology*, 214: 423-435.
- Kaiser P, Rothwell L, Avery S, Balu S (2004) Evolution of the interleukins. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(5): 375-394.
- Karlsson A, Follin P, Leffler H, Dahlgren C (1998) Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood*, 91: 3430-3438.
- Kaur H, Jaso-Friedmann L, Evans DL (2004) Single base oligodeoxyguanosine upregulates Fas ligand release by nonspecific cytotoxic cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(6): 571-579.
- Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, Zlotnik A (1994) Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, 266(5189): 1395-1399.
- Kilpatrick DC (2000) *Handbook of animal lectins: properties and biomedical applications*. Willey. USA.
- Kim YS y Joh TH (2006) Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental and Molecular Medicine*, 38(4): 333-347.

- Ko JH, Jin HK, Asano A, Takada A, Ninomiya A, Kida H, Hokiyaama H, Ohara M, Tsuzuki M, Nishibori M, Mizutani M, Watanabe T (2002) Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *Genome Research*, 12: 595-601.
- Kono T y Sakai M (2001) The analysis of expressed genes in the kidney of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceous*, injected with the immunostimulant peptidoglycan. *Fish & Shellfish Immunology*, 11: 357-366.
- Konsman JP, Drukarch B, Van Dam AM (2007) (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clinical Science*, 112(1) : 1-25.
- Kontsek P, Karayianni-Vasconcelos G, Kontseková E (2003) The human interferon system: characterization and classification after discovery of novel members. *Acta Virologica*, 47(4): 201-215.
- Koromilas AE, Roy S, Barber GN, Katze MG, Sonenberg N (1992) Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science*, 257: 1685-1689.
- Korsnes K, Devold M, Nerland AH, Nylund A (2005) Viral encephalopathy and retinopathy (VER) in Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal challenge with a nodavirus from Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68: 7-15.
- Koussounadis AI, Ritchie DW, Kemp GJ, Secombes CJ (2004) Analysis of fish IL-1beta and derived peptide sequences indicates conserved structures with species-specific IL-1 receptor binding: implications for pharmacological design. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 3857-3871.
- Krueger JM, Fang J, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi J (1998) Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856: 148-159.
- Kurata O, Okamoto N, Ikeda Y (1995) Neutrophilic granulocytes in carp, *Cyprinus carpio*, possess a spontaneous cytotoxic activity. *Developmental and Comparative Immunology*, 19: 315-325.
- Kwon SR, Kim CS, Chung JK, Lee HH, Kim KH (2002) Inhibition of chemiluminescent response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* phagocytes by the scuticociliate parasite *Uronema marinum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 52(2): 119-122.
- Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchere E, Coutinho A, Kazatchkine MD (1998) Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *Journal of Immunological Methods*, 216(1): 117-137.

- Lafon M, Megret F, Lafage M, Prehaud C (2006) The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA. *Journal of Molecular Neuroscience*, 29(3): 185-194.
- Lai Y-S, Murali S, Chiu H-C, Ju H-Y, Lin Y-S, Chen S-C, Guo I-C, Fang K, Chang C-Y (2001a) Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), brain tissue. *Journal of Fish Diseases*, 24: 299-309.
- Lai Y-S, Chiu H-C, Murali S, Guo I-C, Chen S-C, Fang K, Chang C-Y (2001b) *In vitro* neutralization by monoclonal antibodies against yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) and immunolocalization of virus infection in yellow grouper *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 24: 237-244.
- Lai Y-S, John JAC, Lin C-H, Guo I-C, Chen S-C, Fang K, Lin C-H, Chang C-Y (2003) Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), and their susceptibility to grouper irido- and nodaviruses. *Journal of Fish Diseases*, 26: 31-42.
- Laing KL, Wang T, Zou J, Holland J, Hong S, Bols N, Hirono I, Aoki T, Secombes CJ (2001) Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- α . *European Journal and Biochemistry*, 268: 1315-1322.
- Laing KJ, Zou JJ, Wang T, Bols N, Hirono I, Aoki T, Secombes CJ (2002a) Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology*, 26: 433-444.
- Laing KJ, Bols N, Secombes CJ (2002b) A CXC chemokine sequence isolated from the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* resembles the closely related interferon-g inducible chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11. *European Cytokine Network*, 13: 462-473.
- Laing KJ y Secombes CJ (2004) Chemokines. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 443-460.
- Lamas J y Ellis AE (1994) Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 4: 201-219.
- Langston AL, Bricknell IR, Ellis AE (1998) Iron binding capacity of peripheral blood leucocyte lysates from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), pp: 111-116. En: *Methodology in fish diseases research*. Editado por Barnes AC, Davidson GA, Hiney MP, McIntosh D. Fisheries Research Services, Aberdeen.
- Langston AL, Johnstone R, Ellis AE (2001) The kinetics of the hypoferraemic response and changes in levels of alternative complement activity in diploid and triploid Atlantic

- salmon, following injection of lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 11(4): 333-345.
- Larsen R, RØkenes TP, Robertsen B (2004) Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein. *Journal of Virology*, 78(15):7938-7944.
- Le Breton A, Grisez L, Sweetman J, Ollevier F (1997) Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Diseases*, 20: 145-151.
- Lee JY, Hirono I, Aoki T (2000) Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 24: 407-415.
- Lee E-Y, Park H-H, Kim Y-T, Chung J-K, Choi T-J (2001) Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gene*, 274: 237-243.
- Lee KW, Chi SC, Cheng TM (2002) Interference of the life cycle of fish nodavirus with fish retrovirus. *Journal of General Virology*, 83: 2469-2474.
- Lee B (2007) Envelope-receptor interactions in Nipah virus pathobiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1102: 51-65.
- Leiro J, Ortega M, Sanmartín ML, Ubeira FM (2000) Non-specific responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) adherent cells to microsporidian spores. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 75(1-2): 81-95.
- Leong JC, Trobridge GD, Kim CHY, Johnson M, Simon B (1998) Interferon-inducible Mx proteins in fish. *Immunological Reviews*, 166: 349-363.
- Levi G y Teichberg VI (1985) Isolation and characterization of chicken thymic electrolectin. *The Biochemical Journal*, 226: 379-384.
- Levroney EL, Aguilar HC, Fulcher JA, Kohatsu L, Pace KE, Pang M, Gurney KB, Baum LG, Lee B (2005) Novel innate immune functions for galectin-1: galectin-1 inhibits cell fusion by Nipah virus envelope glycoproteins and augments dendritic cell secretion of proinflammatory cytokines. *The Journal of Immunology*, 175: 413-420.
- Li J, Peters R., Lapatra S, Vazzana M, Sunyer JO (2004) Anaphylatoxin-like molecules generated during complement activation induce a dramatic enhancement of particle uptake in rainbow trout phagocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(10): 1005-1021.
- Li J, Barreda DR, Zhang YA, Boshra H, Gelman AE, Lapatra S, Tort L, Sunyer JO (2006) B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology*, 7(10): 1116-1124.

- Li FL y Lu CP (2006) Purification and characterization of alpha2-macroglobulin from grass carp *Ctenopharyngodon idellus*: cloning a segment of the corresponding gene. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(4): 474-481.
- Liang P y Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257: 967-971.
- Liao D-I, Kapadia G, Ahmed H, Vasta GR, Herzberg O (1994) Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate β -galactoside-binding protein. *Proceedings of the National Academic of Sciences of United States of America*, 91: 1428-1432.
- Lie Ø, Evensen Ø, Sørensen A, Frøysadal E (1989) Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 6: 1-5.
- Lin R, Tarr PE, Jones TC (1995) Present status of the use of cytokines as adjuvants with vaccines to protect against infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 21(6): 1439-1449.
- Lin B, Chen S, Cao Z, Lin Y, Mo D, Zhang H, Gu J, Dong M, Liu Z, Xu A (2007) Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with mammals. *Molecular Immunology*, 44: 295-301.
- Livak KJ y Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Lo D, Feng L, Carson MJ, Crowley M, Pauza M, Nguyen A, Reilly CR (1999) Integrating innate and adaptive immunity in the whole animal. *Immunological Reviews*, 169: 225-239.
- Long Q, Quint E, Lin S, Ekker M (2000) The zebrafish *scyba* gene encodes a novel CXC-type chemokine with distinctive expression patterns in the vestibulo-acoustic system during embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 97: 183-186.
- Lopez-Castejon G, Sepulcre MP, Roca FJ, Castellana B, Planas JV, Meseguer J, Mulero V (2007) The type II interleukin-1 receptor (IL-1RII) of the bony fish gilthead seabream *Sparus aurata* is strongly induced after infection and tightly regulated at transcriptional and post-transcriptional levels. *Molecular Immunology*, 44(10): 2772-2780.
- Løvoll M, Kilvik T, Boshra H, Bøgwald J, Sunyer JO, Dalmo RA (2006) Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics*, 58(2-3): 168-179.

- Lowenthal JW, O'Neil TE, David A, Strom G, Andrew ME (1999) Cytokine therapy: a natural alternative for disease control. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(1-2): 183-188.
- Lu JH, Thiel S, Wiedemann H, Timpl R, Reid KB (1990) Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *Journal of Immunology*, 144(6): 2287-2294.
- Lund V y Olafsen JA (1998) A comparative study of pentraxin-like proteins in different fish species. *Developmental and Comparative Immunology*, 22(2): 185-194.
- Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academic of Sciences of United States of America*, 101(18): 6835-6836.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, 15: 323-350.
- MacMicking JD (2004) IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends in Immunology*, 25(11): 601-609.
- Maddison DR y Maddison WP (2003) MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Versión 4.06.
- Magnadóttir B, Jónsdóttir H, Helgason S, Björnsson B, Jørgensen TO, Pilström L (1999) Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I. The effects of environmental temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry*, 122(2): 173-180.
- Magnadóttir B, Jónsdóttir H, Helgason S, Björnsson B, Solem ST, Pilström L (2001) Immune parameters of immunised cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 11(1): 75-89.
- Magnadóttir B, Bambir SH, Gudmundsdóttir BK, Pilström L, Helgason S (2002) Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in naturally and experimentally infected cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases*, 25: 583-597.
- Magnadóttir B (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2): 137-151.
- Male D y Roitt I (1996) Introduction to the immune system, pp. 1-12. En: *Immunology*. Editado por Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Mosby, Londres.

- Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B (2008) Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *Journal of Clinical Immunology*, 28(1): 1-13.
- Mason AJ, Chotimah IN, Bertani P, Bechinger B (2006) A spectroscopic study of the membrane interaction of the antimicrobial peptide Pleurocidin. *Molecular Membrane Biology*, 23(2): 185-194.
- Matzinger P (1998) An innate sense of danger. *Immunology*, 10: 399-415.
- McBeath AJ, Snow M, Secombes CJ, Ellis AE, 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.
- Medzhitov R y Janeway CA (1998) An ancient system of host defence. *Current Opinion in Immunology*, 10: 12-15.
- Medzhitov R y Janeway CA (2000) How does the immune system distinguish self from nonself? *Seminars in Immunology*, 12: 185-188.
- Medzhitov R y Janeway CA (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, 296(5566): 298-300.
- Meier E, Kunz G, Haller O, Arnheiter H (1990) Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *Journal of Virology*, 64: 6263-6269.
- Mercier S, St-Pierre C, Pelletier I, Ouellet M, Tremblay MJ, Sato S (2008) Galectin-1 promotes HIV-1 infectivity in macrophages through stabilization of viral adsorption. *Virology*, 371(1): 121-129.
- Meseguer J, Esteban MA, Lopez-Ruiz A, Bielek E (1994) Ultraestructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L., and carp: *Cyprinus carpio* L.). *The Anatomical Record*, 239(4): 468-474.
- Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, Hovanessian AG (1990) Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*, 62(2): 379-390.
- Meyorach D, Zhou JL, Song X, Elkon KB (1998) Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(2): 387-392.
- Miles PR, Bowman L, Rengasamy A, Huffman L (1998) Constitutive nitric oxide production by rat alveolar macrophages. *The American Journal of Physiology*, 274(3Pt1): L360-368.

- Milev-Milovanovic I, Long S, Wilson M, Bengten E, Miller NW, Chinchar VG (2006) Identification and expression analysis of interferon gamma genes in channel catfish. *Immunogenetics*, 58: 70-80.
- Mistry AC, Honda S, Hirose S (2001) Structure, properties and enhanced expression of galactose-binding C-type lectins in mucous cells of gills from freshwater Japanese eels (*Anguilla japonica*). *Biochemical Journal*, 360: 107-115.
- Mori K, Nakai T, Nagahara M, Muroga K, Mekuchi T, Kanno T (1991) A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Gyobyo Kenkyu*, 26: 209-210.
- Mori K, Nakai T, Muroga K, Arimoto M, Mushiake K, Furusawa I (1992) Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187: 368-371.
- Mulero V, Esteban MA, Muñoz J, Meseguer J (1994) Non-specific cytotoxic response against tumour target cells mediated by leucocytes from seawater teleosts, *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural study. *Archives of Histology and Cytology*, 57(4): 351-358.
- Mulero V y Meseguer J (1998) Functional characterisation of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 8: 143-156.
- Munday BL y Nakai T (1997) Special topic review: nodaviruses as pathogens in larval and juvenile finfish. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13: 375-381.
- Munday BL, Kwang J, Moody N (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 25: 127-142.
- Munir S, Singh S, Kaur K, Kapur V (2004) Suppression subtractive hybridization coupled with microarray analysis to examine differential expression of genes in virus infected cells. *Biological Procedures Online*, 6(1): 94-104.
- Muramoto K y Kamiya H (1992) The amino-acid sequence of a lectin from conger eel, *Conger myriaster*, skin mucus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1116: 129-136.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological Reviews*, 52(1): 145-176.
- Murray CK y Fletcher TC (1976) The immunohistochemical localisation of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *Journal of Fish Biology*, 9: 329-334.

- Mushiake K, Arimoto M, Furusawa T, Furusawa I, Nakai T, Muroga K (1992) Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 2351-2356.
- Mushiake K, Nishizawa T, Nakai T, Furusawa I, Muroga K (1994) Control of VNN in striped jack: selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathology*, 29: 177-182.
- Najakshin AM, Mechetina LV, Alabyev BY, Taranin AV (1999) Identification of an IL-8 homolog in lamprey (*Lampetra fluviatilis*): early evolutionary divergence of chemokines. *European Journal of Immunology*, 29: 375-382.
- Nakae S, Asano M, Horai R, Iwakura Y (2001) Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology*, 104(4): 402-409.
- Nakai T, Nguyen HD, Nishizawa T, Muroga K, Arimoto M, Ootsuki K (1994) Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer. *Fish Pathology*, 29: 211-212.
- Nakao M, Kajiya T, Sato Y, Somamoto T, Kato-Unoki Y, Matsushita M, Nakata M, Fujita T, Yano T (2006) Lectin pathway of bony fish complement: identification of two homologs of the mannose-binding lectin associated with MASP2 in the common carp (*Cyprinus carpio*). *The Journal of Immunology*, 177: 5471-5479.
- Nam B-H, Yamamoto E, Hirono I, Aoki T (2000) A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with Hirame rhabdovirus. *Developmental and Comparative Immunology*, 24: 13-24.
- Nam B-H, Hirono I, Aoki T (2003) Bulk isolation of immune response related genes by expressed sequenced tags of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leucocytes stimulated with ConA/PMA. *Fish & Shellfish Immunology*, 14: 467-476.
- Nam B-H, Byon JY, Kim YO, Park EM, Cho YC, Cheong J (2007) Molecular cloning and characterisation of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) interleukin-6 gene. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 231-236.
- Nara C, Tateda K, Matsumoto T, Ohara A, Miyazaki S, Standiford TJ, Yamaguchi K (2004) Legionella-induced acute lung injury in the setting of hyperoxia: protective role of tumour necrosis factor- α . *Journal of Medical Microbiology*, 53: 727-733.
- Nascimento DS, Pereira PJB, Reis MIR, do Vale A, Zou J, Silva MT, Secombes CJ, dos Santos NMS (2007) Molecular cloning and expression analysis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) tumor necrosis factor- α (TNF- α). *Fish & Shellfish Immunology*, 23(3): 701-710.

- Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal*, 6(12): 3051-3064.
- Nauta AJ, Daha MR, van Kooten C, Roos A (2003) Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends in Immunology*, 24(3): 148-154.
- Neumann NF, Fagan D, Belosevic M (1995) Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leucocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, 19(6): 473-482.
- Neumann NF, Stafford JL, Barreda D, Ainsworth AJ, Belosevic M (2001) Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 807-825.
- Ngai PH y Ng TB (2007) A mannose-specific tetrameric lectin with mitogenic and antibacterial activities from the ovary of a teleost, the cobia (*Rachycentron canadum*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 433-438.
- Nguyen HD, Mekuchi T, Imura K, Nakai T, Nishisawa T, Muroga K (1994) Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 60(5): 551-554.
- Nguyen HD, Nakai T, Muroga K (1996) Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24: 99-105.
- Nguyen HD, Mushiake K, Nakai T, Muroga K (1997) Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Diseases of Aquatic Organisms*, 28: 87-91.
- Nichol ST, Rowe JE, Winton JR (1995) Molecular epizootiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Virus Research*, 38(2-3): 159-173.
- Nishizawa T, Mori K, Nakai T, Furusawa I, Muroga K (1994) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 18: 103-107.
- Nishizawa T, Mori K, Furuhashi M, Nakai T, Furusawa I, Muroga K (1995) Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *The Journal of General Virology*, 76: 1563-1569.
- Nishizawa T, Muroga K, Arimoto M (1996) Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack, *Pseudocaranx dentex*, selected as spawners. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8:

332-334.

- Nishizawa T, Furuhashi M, Nagai T, Nakai T, Muroga K (1997) Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4): 1633-1636.
- Noga EJ y Silphaduang U (2003) Piscidins: a novel family of peptide antibiotics from fish. *Drug News & Perspectives*, 16(2): 87-92.
- Nonaka M y Kimura A (2006) Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics*, 58(9): 701-713.
- Novelli F, Allione A, Wells V, Fomi G, Mallucci L (1999) Negative cell cycle control of human T cells by beta-galactoside-binding protein (beta GBP): induction of programmed cell death in leukaemia cells. *The Journal of Cell Biology*, 178: 102-108.
- Nowak TP, Haywood PL, Barondes SH (1976) Developmentally regulated lectin in embryonic chick muscle and a myogenic cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 68(3): 650-657.
- O'Farrell C, Vaghefi N, Cantonnet M, Buteau B, Boudinot P, Benmansour A (2002) Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection. *Journal of Virology*, 76: 8040-8049.
- O'Reilly MA, Marr SH, Yee M, McGrath-Morrow SA, Lawrence BP (2008) Neonatal hyperoxia enhances the inflammatory response in adult mice infected with influenza A virus. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177: 1103-1110.
- Oates AC, Wollberg P, Pratt SJ, Paw BH, Johnson SL, Ho RK, Postlethwait JH, Zon LI, Wilks AF (1999) Zebrafish *stat3* is expressed in restricted tissues during embryogenesis and *stat1* rescues cytokine signaling in a STAT1-deficient human cell line. *Developmental Dynamics*, 215: 352-370.
- Odom EW y Vasta GR (2006) Characterization of a binary tandem domain F-type lectin from striped bass (*Morone saxatilis*). *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 1698-1713.
- O'Farrell C, Vaghefi N, Cantonnet M, Buteau B, Boudinot P, Benmansour A (2002) Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon-responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection. *The Journal of Virology*, 76: 8040-8049.
- Office International des Epizooties (1995) Viral encephalopathy and retinopathy, pp: 85-90. En: OIE. Diagnostic manual for aquatic animal diseases. Paris.
- Office International des Epizooties (1997) Viral encephalopathy and retinopathy or viral

- nervous necrosis, pp: 99-107. En: OIE. Diagnostic manual for aquatic animal diseases. Paris.
- Ogawa T, Ishii C, Kagawa D, Muramoto K, Kamiya H (1999) Accelerated evolution in the protein-coding region of galectin cDNAs, congerin I and congerin II, from skin mucus of conger eel (*Conger myriaster*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63(7): 1203-1208.
- Olsvik PA, Kristensen T, Waagbø R, Tollefsen K-E, Rosseland BO, Toften H (2006) Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 2893-2901.
- Oppenheim JJ, Howard OMZ, Goetzl E (2000) Chemotactic factors, neuropeptides, and other ligands for seven transmembrane receptors, pp. 985-1021. En: *Cytokine reference: a compendium of cytokines and other mediators of host defence*. Editado por Academic Press, London.
- Ordás MC, Abollo E, Costa MM, Figueras A, Novoa B (2006) Molecular cloning and expression analysis of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) of turbot and sea bream. *Molecular Immunology*, 43(7): 882-890.
- Ordás MC, Costa MM, Roca FJ, López-Castejón G, Mulero V, Meseguer J, Figueras A, Novoa B (2007) Turbot TNFalpha gene: molecular characterization and biological activity of the recombinant protein. *Molecular Immunology*, 44(4): 389-400.
- Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J (2000) Kinetics of hydrogen peroxide production during *in vitro* respiratory burst of seabream (*Sparus aurata* L.) head-kidney leucocytes, as measured by a flow cytometric method. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(8): 725-729.
- Ottinger CA, Johnson SC, Ewart KV, Brown LL, Ross NW (1999) Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by mannose-binding lectin. *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology and Toxicology*, 123: 53-59.
- Overturf K y LaPatra S (2006) Quantitative expression (Walbaum) of immunological factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after infection with either *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida*, or infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal of Fish Diseases*, 29(4): 215-224.
- Pace KE, Lebestky T, Hummel T, Arnoux P, Kwan K, Baum LG (2002) Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* galectin. Expression in developing immune, neural and muscle tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(15): 13091-13098.

- Page R (1996) Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- Pallavicini A, Costa MM, Gestal C, Dreos R, Figueras A, Venier P, Novoa B (2008) High sequence variability of myticin transcripts in haemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host-pathogen interactions. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 213-226.
- Panagos PG, Dobrinski KP, Chen X, Grant AW, Traver D, Djeu JY, Wei S, Yoder JA (2006) Immune-related, lectin-like receptors are differentially expressed in the myeloid and lymphoid lineages of zebrafish. *Immunogenetics*, 58: 31-40.
- Parichy DM, Ransom DG, Paw B, Zon LI, Johnson SL (2000) An orthologue of the kit-related gene *fms* is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 127: 3031-3044.
- Parotaud P, Levi G, Teichberg VI, Strosberg AD (1987) Extensive amino acid sequence homologies between animal lectins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 6345-6348.
- Pashov A, Kenderov A, Kyurkchiev S, Kehayov I, Hristova S, Lacroix-Desmazes S, Giltiay N, Varamballi S, Kazatchkine MD, Kaveri SV (2002) Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire. *International Immunology*, 14(5): 453-461.
- Patzwahl R, Meier V, Ramadori G, Mihm S (2001) Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization. *Journal of Virology*, 75(3): 1332-1338.
- Pelegrín P, García-Castillo J, Mulero V, Meseguer J (2001) Interleukin-1 β isolated from a marine fish reveals up-regulated expression in macrophages following activation with lipopolysaccharide and lymphokines. *Cytokine*, 16(2): 67-72.
- Perillo NL, Pace K, Seihamer JJ, Baum LG (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, 378: 736-739.
- Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG (1997) Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(10): 1851-1858.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, 202: 8-32.

- Pfeifer K, Haasemann M, Gamulin V, Bretting H, Fahrenholz F, Müller WE (1993) S-type lectins occur also in invertebrates: high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiology*, 3(2): 179-184.
- Pinto RD, Nascimento DS, Reis MI, do Vale A, Dos Santos NM (2007) Molecular characterization, 3D modelling and expression analysis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-10. *Molecular Immunology*, 44: 2066-2075.
- Plant KP y Thune RL (2004) Cloning and characterisation of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Mx gene. *Fish & Shellfish Immunology*, 16: 391-405.
- Ploegh HL, Orr HT, Strominger JL (1981) Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell*, 24: 287-299.
- Powell JT (1980) Purification and properties of lung lectin. *Biochemical Journal*, 187: 123-129.
- Praveen K, Evans DL, Jaso-Friedmann L (2004) Evidence for the existence of granzyme-like serine proteases in teleost cytotoxic cells. *Journal of Molecular Evolution*, 58(4): 449-459.
- Praveen K, Evans DL, Jaso-Friedmann L (2006) Constitutive expression of tumor necrosis factor-alpha in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 43(3): 279-291.
- Press McL, Dannevig BH, Landsverk T (1994) Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 4: 79-93.
- Puche AC y Key B (1995) Identification of cells expressing galectin-1, a galactose-binding receptor, in the rat olfactory system. *The Journal of Comparative Neurology*, 357: 513-523.
- Quin QW, Wu TH, Jia TL, Hedge A, Zhang RQ (2006) Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus. *Journal of Virological Methods*, 131: 58-64.
- Rabinovich GA, Iglesias MM, Modesti NM, Castagna LF, Wolfenstein-Todel C, Riera CM, Sotomayor CE (1998) Activated rat macrophages produce a galectin-1 like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *The Journal of Immunology*, 160: 4831-4840.
- Rabinovich GA, Ariel A, Hershkovich R, Hirabayashi J, Kasai KI, Lider O (1999) Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology*, 97: 100-106.

- Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano MA (2002) Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572: 274-284.
- Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A (2007) An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66: 143-158.
- Rappolee DA y Werb Z (1992) Macrophage-derived growth factors, pp. 87-140. En: *Current topics in microbiology and immunology* 181, macrophage biology and activation. Editado por Russell SW y Gordon S. Springer, Berlin.
- Rauch G, Kalbe M, Reusch TB (2006) One day is enough: rapid and specific host-parasite interactions in a stickleback-trematode system. *Biology Letters*, 2(3): 382-384.
- Reading PC, Hartley CA, Ezekowitz RAB, Anders EM (1995) A serum mannose-binding lectin mediates complement-dependent lysis of influenza virus-infected cells. *Biochemistry et Biophysica Research Community*, 217: 1128-1136.
- Rebl A, Siegl E, Kollner B, Fischer U, Seyfert HM (2007) Characterization of twin toll-like receptors from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evolutionary relationship and induced expression by *Aeromonas salmonicida salmonicida*. *Developmental and Comparative Immunology*, 31: 499-510.
- Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S (2000) IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene*, 19(21): 2532-2547.
- Reed LJ y Muench H (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27: 493-497.
- Richards RC, Hudson DM, Thibault P, Ewart KV (2003) Cloning and characterization of the Atlantic salmon serum lectin, a long-form C-type lectin expressed in kidney. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1621: 110-115.
- Richardson MP, Tay BH, Goh BY, Venkatesh B, Brenner S (2001) Molecular cloning and genomic structure of a gene encoding interferon regulatory factor in the pufferfish (*Fugu rubripes*). *Marine Biotechnology*, 3: 145-151.
- Roberts RM, Liu L, Guo Q, Leaman D, Bixby J (1998) The evolution of the type I interferons. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 18(10): 805-816.
- Robertsen B, Trobridge G, Leong J-A (1997) Molecular cloning of double-stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Developmental and Comparative Immunology*, 21(5): 397-412.
- Robertsen B, Bergan V, Rokenes T, Larsen R, Albuquerque A (2003) Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *Journal Interferon and Cytokine Research*, 23: 601-612.

- Robertsen B (2006) The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 172-191.
- Robertsen B, Zou J, Secombes CJ, Leong JA (2006) Molecular and expression analysis of an interferon-gamma-inducible guanylate-binding protein from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 1023-1033.
- Roca FJ, Cayuela ML, Secombes CJ, Meseguer J, Mulero V (2007) Post-transcriptional regulation of cytokine genes in fish: A role for conserved AU-rich elements located in the 3'-untranslated region of their mRNAs. *Molecular Immunology*, 44: 472-478.
- Rodrigues PN, Vazquez-Dorado S, Neves JV, Wilson JM (2006) Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 1156-1167.
- Rombout JH, Taverne N, van de Kamp M, Taverne-Thiele AJ (1993) Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology*, 17(4): 309-317.
- Rombout JHWM y Joosten EPHM (1998) Mucosal immunity, pp. 39-40. En: *Handbook of vertebrate immunology*. Editado por Pastoret P-P, Griebel P, Bazin H, Govaerts A. Academic Press, New York.
- Roszell LE y Anderson RS (1993) *In vitro* immunomodulation by pentachlorophenol in phagocytes from an estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*, as measured by chemiluminescence activity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25(4): 492-496.
- Rotllant J, Parra D, Peters R, Boshra H, Sunyer JO (2004) Generation, purification and functional characterization of three C3a anaphylatoxins in rainbow trout: role in leukocyte chemotaxis and respiratory burst. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 815-828.
- Rozen S y Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, pp. 365-386. En: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Editado por Krawetz S, Misener S. Humana Press, Totawa, NJ.
- Rubenstein JL, Brice AE, Ciaranello RD, Denney D, Porteus MH, Usdin TB (1990) Subtractive hybridization system using single-stranded phagemids with directional inserts. *Nucleic Acid Research*, 18(16): 4833-4842.

- Rubinstein N, Illarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA (2004) The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue antigens*, 64: 1-12.
- Rubio N, Sharp PM, Rits M, Zahedi K, Whitehead AS (1993) Structure, expression, and evolution of guinea pig serum amyloid P component and C-reactive protein. *The Journal of Biochemistry*, 113: 277-284.
- Saeij JP, Verburg-van Kemenade LB, van Muiswinkel WB, Wiegertjes GF (2003) Daily handling stress reduces resistance of carp to *Trypanoplasma borreli*: *in vitro* modulatory effects of cortisol on leukocyte function and apoptosis. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(3): 233-245.
- Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Navarro I, Perez-Sanchez J (2007) Tumour necrosis factor (TNF)alpha as a regulator of fat tissue mass in the Mediterranean gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry*, 146: 338-345.
- Sanford GL y Harris-Hooker S (1990) Stimulation of vascular cell proliferation by beta-galactoside specific lectins. *FASEB Journal*, 4: 2912-2918.
- Sargent TD y Dawid IB (1983) Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science*, 222(4620): 135-139.
- Sarmiento A, Marques F, Ellis AE, Afonso A (2004) Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 16(2): 79-92.
- Savan R y Sakai M (2002) Analysis of expressed sequence tags (EST) obtained from common carp, *Cyprinus carpio* L., head kidney cells after stimulation by two mitogens, lipopolysaccharide and concanavalin-A. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry*, 131:71-82.
- Savan R, Kono T, Aman A, Sakai M (2003) Isolation and characterization of a novel CXC chemokine in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Molecular Immunology*, 39: 829-834.
- Scapigliati G, Costantini S, Colonna G, Facchiano A, Buonocore F, Bossù P, Cunningham C, Holland JW, Secombes CJ (2004) Modelling of fish interleukin-1 and its receptor. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 429-441.
- Scheneller M, Andre S, Cihak J, Kaltner H, Merkle H, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE, Löscher U, Gabius HJ (1995) Differential binding of two chicken β -galactoside-specific lectins to homologous lymphocyte subpopulations and evidence

- for inhibitor activity of the dimeric lectin on stimulated T cells. *Cellular Immunology*, 166(1): 35-43.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2): 163-189.
- Secombes CJ (1992) The phylogeny of cytokines. En: *The Cytokine Handbook*. Editado por Thomson AW. Academic Press, London.
- Secombes CJ (1996) The non-specific immune system: cellular defences, pp. 63-103. En: *The fish immune system: Organisms, pathogen & environment*. Editado por Iwama G y Nakanishi T. Academic Press Inc, San Diego.
- Secombes CJ, Hardie LJ, Daniels G (1996) Cytokines in fish: an update. *Fish & Shellfish Immunology*, 6: 291-304.
- Secombes CJ, Wang T, Hong S, Peddie S, Crampe M, Laing KJ, Cunningham C, Zou J (2001) Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 713-723.
- Sepulcre MP, López-Castejón G, Meseguer J, Mulero V (2007) The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Molecular Immunology*, 44(8): 2009-2016.
- Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD, McCaughan GW (2003) Novel differential gene expression in human cirrhosis detected by suppression subtractive hybridization. *Hepatology*, 38: 577-588.
- Sharp GJE y Secombes CJ (1993) The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 3(2): 119-129.
- Shea LM, Beehler C, Schwartz M, Shenkar R, Tuder R, Abraham E (1996) Hyperoxia activates NF- κ B and increases TNF- α and IFN- γ gene expression in mouse pulmonary lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 157(9): 3902-3908.
- Shephard KL (1994) Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4(4): 401-429.
- Shtreichman R y Samuel CE (2001) The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Current Opinion in Microbiology*, 4(3): 251-259.
- Silphaduang U, Colorni A, Noga EJ (2006) Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72(3): 241-252.

- Sinyakov MS, Dror M, Zhevelev HM, Margel S, Avtalion RR (2002) Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. *Vaccine*, 20(31-32): 3668-3674.
- Skliris GP, Krondiris JV, Sideris DC, Shinn AP, Starkey WG, Richards RH (2001) Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Research*, 75: 59-67.
- Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C (2007) Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 81: 15-27.
- Smith VJ, Fernandes JM, Jones SJ, Kemp GD, Tatner MF (2000) Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(3): 243-260.
- Smith JE (2006) *Biología. Editorial Acribia. Zaragoza (España)*.
- Soanes KH, Figueredo K, Richards RC, Mattatall NR, Ewart KV (2004) Sequence and expression of C-type lectin receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics*, 56: 572-584.
- Solís D, López-Lucendo MIF, León S, Varela J, Díaz-Mauriño T (2000) Description of a monomeric prototype galectin from the lizard *Podarcis hispanica*. *Glycobiology*, 10(12): 1325-1331.
- Sommerset I, Lorenzen E, Lorenzen N, Bleie H, Nerland AH (2003) A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine*, 21: 4661-4667.
- Sommerset I, Skern R, Biering E, Bleie H, Fiksdal IU, Grove S, Nerland AH (2005) Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 13-29.
- Song Y-L, Lin T, Kou G-H (1989) Cell-mediated immunity of the eel, *Anguilla japonica* (Temminck & Schlegel), as measured by the migration inhibition test. *Journal of Fish Diseases*, 12(2): 117-123.
- Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY (2001) Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates. *Infection and Immunity*, 69: 5689-5697.
- Staheli P, Pitossi F, Pavlovic J (1993) Mx proteins: GTPases with antiviral activity. *Trends in Cell Biology* 3(8): 268-272.

- Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M (2001) Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(2): 101-115.
- Stafford JL y Belosevic M (2003) Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(6-7): 539-554.
- Starkey WG, Ireland JH, Muir KF, Shinn AP, Richards RH, Ferguson HW (2000) Isolation of nodavirus from Scottish farmed halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 23: 419-422.
- Starkey WG, Ireland JH, Muir KF, Jenkins ME, Roy WJ, Richards RH, Ferguson HW (2001) Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. *Veterinary Record*, 149: 179-181.
- Starkey WG, Millar RM, Jenkins ME, Ireland JH, Muir KF, Richards RH (2004) Detection of piscine nodaviruses by real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA). *Diseases of Aquatic Organisms*, 59: 93-100.
- Steel DM y Whitehead AS (1994) The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today*, 15(2): 81-88.
- Steinshamn S, Bemelmans MH, van Tits LJ, Bergh K, Buurman WA, Waage A (1996) TNF receptors in murine *Candida albicans* infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in antifungal defense. *The Journal of Immunology*, 157(5): 2155-2159.
- Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, McEver RP, Cummings RD (2008) Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *The Journal of Immunology*, 180: 3091-3102.
- Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan S-Y, Rocniak S, Shanafelt AB (1995) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45): 27348-27357.
- Subramaniam S, Stansberg C, Cunningham C (2004) The interleukin 1 receptor family. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 415-428.
- Sunyer JO y Lambris JD (1998) Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunological Reviews*, 166: 39-57.
- Sunyer JO, Zarkadis IK, Lambris JD (1998) Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunology Today*, 19: 519-523.

- Sunyer JO, Boshra H, Lorenzo G, Parra D, Freedman B, Bosch N (2003) Evolution of complement as an effector system in innate and adaptive immunity. *Immunologic Research*, 27(2-3): 549-564.
- Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KHG, Lavelle EC (2006) A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 203: 1685-1691.
- Suzuki Y y Lida T (1992) Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 149-160.
- Swofford DL (2000) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.
- Szalai AJ, Agrawal A, Greenhough TJ, Volanakis JE (1999) C-reactive protein: structural biology and host defense function. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 37(3): 265-270.
- Szalai AJ (2002a) The biological functions of C-reactive protein. *Vascular Pharmacology*, 39: 105-107.
- Szalai AJ (2002b) The antimicrobial activity of C-reactive protein. *Microbes and Infection*, 4: 201-205.
- Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozak K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexoupoulou L, Flavell RA, Beutler B (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academic of Science of the Unites States of America*, 101(10): 3516-3521.
- Tafalla C, Figueras A, Novoa B (1999) Role of nitric oxide on the replication of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(3-4): 249-256.
- Tafalla C y Novoa B (2000) Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, 24(6-7): 623-631.
- Tafalla C y Novoa B (2001) Respiratory burst of turbot (*Scophthalmus maximus*) macrophages in response to experimental infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Fish & Shellfish Immunology*, 11(8): 727-734.
- Tafalla C, Figueras A, Novoa B (2001a) Viral hemorrhagic septicemia virus alters turbot *Scophthalmus maximus* macrophage nitric oxide production. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47(2): 101-107.

- Tafalla C, Figueras A, Novoa B (2001b) Cytotoxic activity against prelabelled RTG-2 cells in the turbot *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 24: 169-175.
- Tafalla C, Aranguren R, Secombes CJ, Castillo JL, Novoa B, Figueras A (2003) Molecular characterisation of sea bream (*Sparus aurata*) transforming growth factor beta1. *Fish & Shellfish Immunology*, 14(5): 405-421.
- Tafalla C, Aranguren R, Secombes CJ, Figueras A, Novoa B (2004) Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA. *Fish & Shellfish Immunology*, 16: 11-24.
- Tanaka S, Aoki H, Nakai T (1998) Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathology*, 33(1): 31-36.
- Tanaka S, Mori K, Arimoto M, Iwamoto T, Nakai T (2001) Protective immunity of sevenhand grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *Journal of Fish Diseases*, 24: 15-22.
- Tang L, Lin C-S, Krishna NK, Yeager M, Schneemann A, Johnson JE (2002) Virus-like particles of a fish nodavirus display a capsid subunit domain organization different from that of insect nodaviruses. *Journal of Virology*, 76(12): 6370-6375.
- Tasumi S, Ohira T, Kawazoe I, Suetake H, Suzuki Y, Aida K (2002) Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 27305-27311.
- Tasumi S y Vasta GR (2007) A galectin of unique domain organization from hemocytes of the eastern oyster (*Cassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. *The Journal of Immunology*, 179: 3086-3098.
- Tateda K, Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Paine III R, Kobayashi N, Yamaguchi K, Standiford TJ (2003) Hyperoxia mediates acute lung injury and increased lethality in murine *Legionella* pneumonia: the role of apoptosis. *The Journal of Immunology*, 170: 4209-4216.
- Teichberg VI, Silman I, Beitsch DD, Resheff G (1975) A β -D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(4): 1383-1387.
- Thiery R, Peducasse S, Castric J, Le Ven A, Jeffroy J, Laurencin FB (1997) Experimental transmission of viral encephalopathy and retinopathy to juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 17(3-4): 118-122.
- Thimme R, Frese M, Kochs G, Haller O (1995) Mx1 but not MxA confers resistance against tick-borne Dhori virus in mice. *Virology*, 211(1): 296-301.

- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-82.
- Trobridge GD y Leong JAC (1995) Characterization of a rainbow trout Mx gene. *Journal Interferon and Cytokine Research*, 15: 691-702.
- Trobridge GD, Chiou PP, Leong JAC (1997a) Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *Journal of Virology*, 71(7): 5304-5311.
- Trobridge GD, Chiou PP, Kim CH, Leong JAC (1997b) Induction of the Mx protein of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* *in vitro* and *in vivo* with poly I:C dsRNA and infectious hematopoietic necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 30: 91-98.
- Tsoi SCM, Ewart KV, Penny S, Melville K, Liebscher RS, Brown LL, Douglas SE (2004) Identification of immune-relevant genes from Atlantic salmon using suppression subtractive hybridization. *Marine Biotechnology*, 6: 199-214.
- Vallejo AN, Miller NW, Clem LW (1992) Antigen processing and presentation in teleost immune responses. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 73-89.
- Van der Leij J, van der Berg A, Blokzijl T, Harms G, van Goor H, Zwiers P, van Weeghel R, Poppema S, Visser L (2004) Dimeric galectin-1 induces IL-10 production in T-lymphocytes: an important tool in the regulation of the immune response. *Journal of Pathology*, 204: 511-518.
- Van Muiswinkel WB (1995) The piscine immune system: Innate and acquired immunity. En: *Fish Diseases and Disorders: vol. 1. Protozoan and metazoan infections*. Editado por Woo PTK. CAB International. Oxford, UK.
- Vasta GR, Ahmed H, Du S-J, Henrikson D (2004a) Galectins in teleost fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity. *Glycoconjugate Journal*, 21: 503-521.
- Vasta GR, Ahmed H, Odom EW (2004b) Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates. *Current Opinion in Structural Biology*, 14: 617-630.
- Vilain C, Wetzel MC, Du Pasquier L, Charlemagne J (1984) Structural and functional analysis of spontaneous anti-nitrophenyl antibodies in three cyprinid fish species: carp (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) and tench (*Tinca tinca*). *Developmental and Comparative Immunology*, 8(3): 611-622.

- Vilcek J y Lee TH (1991) Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(12): 7313-7316.
- Vilcek J y Sen GC (1996) Interferons and other cytokines, pp. 375-399. En: *Fields Virology*. Editado por Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia.
- Vitved L, Holmskov U, Koch C, Teisner B, Hansen S, SkjØdt K (2000) The homologue of mannose-binding lectin in the carp family Cyprinidae is expressed at high level in spleen, and the deduced primary structure predicts affinity for galactose. *Immunogenetics*, 51: 955-964.
- Wagner CT, Lu IY, Hoffman MH, Sun WQ, Trent JD, Connor J (2004) T-complex polypeptide-1 interacts with the erythrocyte cytoskeleton in response to elevated temperatures. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(16): 16223-16228.
- Wang XH y Leung KY (2000) Biochemical characterization of different types of adherence of *Vibrio* species to fish epithelial cells. *Microbiology*, 146(Pt 4): 989-998.
- Wang T, Holland JW, Bols N, Secombes CJ (2005) Cloning and expression of the first nonmammalian interleukin-11 gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *FEBS Journal*, 272: 1136-1147.
- Wang L y Wu X (2007) Identification of differentially expressed genes in lipopolysaccharide-stimulated yellow grouper *Epinephelus awoara* spleen. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 354-363.
- Wang Y, Chen W, Li X (2008) Screening of differentially expressed in human renal cell carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 28(1): 89-93
- Warr GW (1995) The immunoglobulin genes of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 19: 1-12.
- Watanabe KI, Nishizawa T, Yoshimizu M (2000) Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 41: 219-223.
- Wei G, Zhang M, Mei Y, Dong J (2006) Expression of cytokines IL-2, IL-10 and TNF-alpha in mice with herpes simplex viral encephalitis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences*, 26(3): 308-310.
- Weis WI y Drickamer K (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 441-473.

- Weis WI, Taylor ME, Drickamer K (1998) The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological Reviews*, 163: 19-34.
- Whitaker HA, McAndrew BJ, Taggart JB (2006) Construction and characterization of a BAC library for the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Animal Genetics*, 37(5): 526.
- White A, Fletcher TC, Pepys MB, Baldo BA (1981) The effect of inflammatory agents on C-reactive protein and serum amyloid P-Component levels in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) serum. *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology and Toxicology*, 69(2): 325-329.
- Whitehead AS (1989) Organization, structure and expression of pentraxin genes, pp.: 47-57. En: *Acute phase proteins in acute phase response*. Editado por Pepys MB. Springer-Verlag. London (UK).
- Williams DM, Grubbs BG, Park-Snyder S, Rank RG, Bonewald LF (1996) Activation of latent transforming growth factor beta during *Chlamydia trachomatis*-induced murine pneumonia. *Research in Microbiology*, 147(4): 251-262.
- Wilson MR y Warr GW (1992) Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 201-221.
- Wride MA y Sanders EJ (1995) Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anatomy and Embriology*, 191(1): 1-10.
- Wu YC y Chi SC (2007) Cloning and analysis of antiviral activity of a barramundi (*Lates calcarifer*) Mx gene. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(1): 97-108.
- Yano T (1996) The non-specific immune system: Humoral defense, pp. 105-157. En: *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Editado por Iwama G and Nakanishi T. Academic Press, San Diego.
- Yin Z, Lam TJ, Sin YM (1997) Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 7(2): 93-104.
- Yoshikoshi K y Inoue K (1990) Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnatus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 13: 69-77.
- Zelensky AN y Gready JE (2004) C-type lectin-like domains in *Fugu rubripes*. *BMC Genomics*, 5: 51.
- Zelensky AN y Gready JE (2005) The C-type lectin domain superfamily. *FEBS Journal*, 272: 6179-6217.

- Zhang H, Robison B, Thorgaard GH, Ristow SS (2000) Cloning, mapping and genomic organization of a fish C-type-lectin gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1494: 14-22.
- Zhang H, Nichols K, Thorgaard GH, Ristow SS (2001) Identification, mapping and genomic structural analysis of an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing C-type lectin from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics*, 53: 751-759.
- Zhang Y y Gui J (2004) Molecular characterization and IFN signal pathway analysis of *Carassius auratus* CaSTAT1 identified from the cultured cells in response to virus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 211-227.
- Zhang YA, Zou J, Chang CI, Secombes CJ (2004a) Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 101(3-4): 259-269.
- Zhang YB, Li Q, Gui JF (2004b) Differential expression of two *Carassius auratus* Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and interferon. *Immunogenetics*, 56(1): 68-75.
- Zhang JK, Zhao LF, Cheng J, Guo J, Wang DQ, Hong Y, Mao Y (2007) Screening and cloning for proteins transactivated by the PS1TP5 protein of hepatitis B virus: a suppression subtractive hybridization study. *World Journal of Gastroenterology*, 13(10): 1602-1607.
- Zhang W, Li H, Cheng G, Hu S, Li Z, Bi D (2008) Avian influenza virus infection induces differential expression of genes in chicken kidney. *Research in Veterinary Science*, 84(3): 374-381.
- Zou J, Bird S, Truckle J, Bols N, Horne M, Secombes CJ (2004) Identification and expression analysis of an IL-18 homologue and its alternatively spliced form in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEBS Journal*, 271(10): 1913-1923.
- Zou J, Mercier C, Koussounadis A, Secombes C (2007) Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. *Molecular Immunology*, 44(4): 638-647.
- Zürcher T, Pavlovic J, Staeheli P (1992) Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. *Virology*, 187(2): 796-800.
- Zuñiga E, Gruppi A, Hirabayashi J, Kasai KE, Rabinovich GA (2001) Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi* infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival. *Infection and Immunity*, 69(11): 6804-6812.

Publicaciones derivadas de la tesis

Poisa-Beiro L, Dios S, Montes A, Aranguren R, Figueras A, Novoa B (2008) Nodavirus increases the expression of Mx and inflammatory cytokines in fish brain. *Molecular Immunology*, 45: 218-225. Índice de impacto (2007): 3,742.

Poisa-Beiro L, Dios S, Ahmed H, Vasta GR, Alonso-Gutierrez J, Figueras A, Novoa B (2008) Nodavirus infection of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) induces upregulation of galectin-1 expression in head kidney, with potential anti-inflammatory activity. En revisión.

Otras publicaciones relacionadas con la tesis

Dios S, **Poisa-Beiro L**, Figueras A, Novoa B (2007) Supression subtraction hybridization (SSH) and macroarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus. *Molecular Immunology*, 44: 2195-2204. Índice de impacto (2007): 3,742.

Sarropoulou E, Sepulcre P, **Poisa-Beiro L**, Mulero V, Meseguer J, Figueras A, Novoa B, Terzoglou V, Reinhardt R, Kotoulas G (2008) Profiling of immune specific mRNA transcripts of the european seabass *Dicentrarchus labrax*. En revisión.

