

RESUMEN DE TESIS DOCTORAL

Los eritrocitos nucleados de peces en la respuesta inmune frente a infecciones víricas

Iván Nombela Díaz

Directores:

Dra. María del Mar Ortega-Villaizán Romo

Dr. Julio Coll Morales

Defendida el 24 de julio de 2019 en la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH)

Realizada en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE – UMH)

Mención *cum laude*

Resumen

El sistema inmune de los teleósteos no es tan conocido como el sistema inmune que poseen los mamíferos. Los teleósteos presentan, en comparación con mamíferos, un menor repertorio de inmunoglobulinas, menor afinidad de maduración de los anticuerpos y una proliferación más lenta de linfocitos. En el mismo sentido, los eritrocitos o células rojas de la sangre (en inglés, red blood cells, RBCs) de los teleósteos también se diferencian respecto a los de mamíferos en que poseen núcleo. Este hecho otorga a los RBCs de teleósteos la capacidad de crear respuestas celulares frente a una variedad de estímulos de diversa naturaleza. Por ello, el objetivo de esta tesis consistió en el estudio de la respuesta inmune de RBCs frente al virus de septicemia hemorrágica vírica (VHSV) y el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV): dos patógenos víricos de alta prevalencia en teleósteos y que son capaces de generar pérdidas económicas en la acuicultura. Teniendo en cuenta que el papel de los RBCs en las infecciones víricas es desconocido, la hipótesis de esta tesis fue determinar si los RBCs tienen un papel importante como mediadores en la respuesta inmune durante una infección vírica. En esta tesis se utilizó una metodología basada en la combinación de técnicas de biología molecular básicas junto a ómicas, con el objetivo de analizar la respuesta inmune a nivel de expresión génica (mediante transcriptómica y PCR cuantitativa) y a nivel de proteína (mediante proteómica, western blot e inmunofluorescencia) de RBCs de trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*) expuestos a VHSV o IPNV en condiciones *ex vivo* e *in vivo*.

Los resultados mostrados en el primer artículo de esta tesis muestran diversos mecanismos celulares implicados en la respuesta de RBCs frente a VHSV. Principalmente, se muestra que VHSV no es capaz de replicar en RBCs, pero a pesar de esto, se induce respuesta celular está caracterizada por un apagado celular debido a la fosforilación del factor de traducción eucariótico eIF2 α a tiempos largos post-infección (3 días). Dicho apagado celular queda corroborado mediante un análisis mediante iTRAQ donde la mayoría de las proteínas identificadas presentan una regulación negativa de su

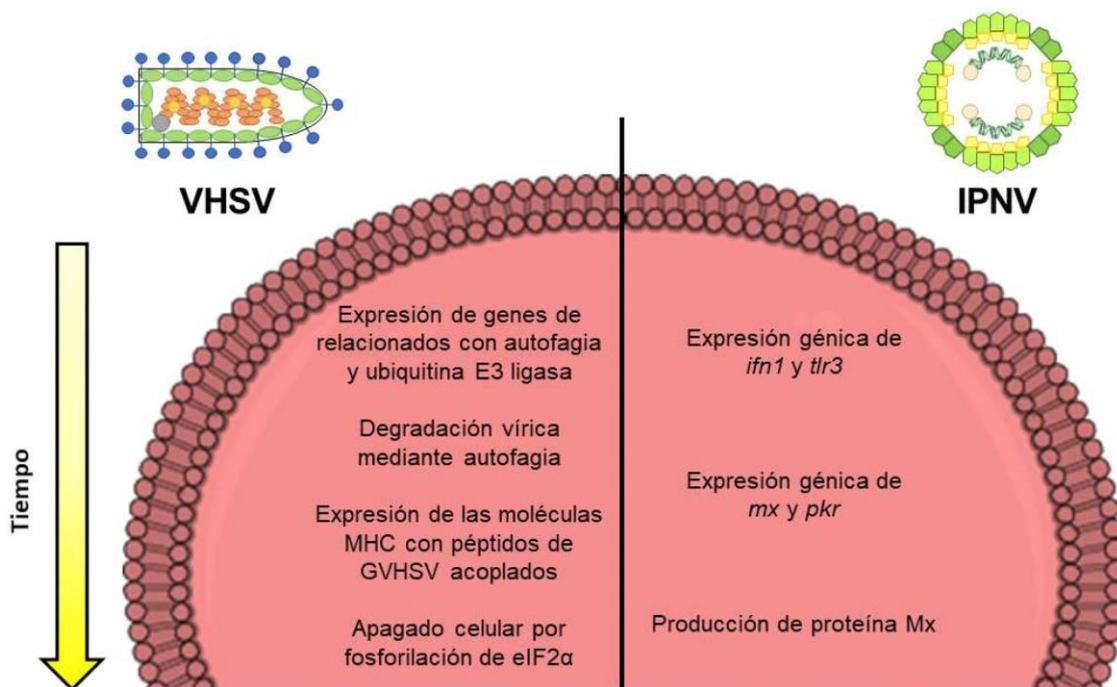
expresión. Finalmente, en RBCs expuestos a VHSV se detectó un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y genes expresados en respuesta a la presencia de ROS.

En la segunda publicación de esta tesis, se estudió la respuesta inducida por IPNV en RBCs expuestos al virus *ex vivo*. Dicha respuesta se caracterizó por la expresión del gen de interferón de tipo I, Mx y el receptor de tipo Toll 3, entre otros. También se detectó la expresión de la proteína antiviral Mx en RBCs expuestos a IPNV tras 6 días post-exposición. Por tanto, en este artículo se muestra una respuesta inmune de distinta naturaleza a la inducida por VHSV en RBCs de trucha arcoíris.

El tercer artículo que conforma esta tesis está centrado en el estudio de los mecanismos de degradación de péptidos y presentación de antígenos en el RBC. Los resultados de esta publicación muestran que existe ubiquitinación de VHSV en el interior del RBC, pero la degradación ocurre mediante autofagia. Dicho proceso estaría mediado por adaptadores semejantes a p62, el cual es también degradado durante la infección. Tras 24 horas post-infección, las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHCI) y II (MHCII) se encuentran reguladas positivamente, junto con otros marcadores de presentación antigénica como CD86 y CD83. Por último, se detectó colocalización de péptidos de las proteínas G de VHSV con moléculas de MHCI y MHCII.

En el cuarto artículo de esta tesis, se analizó la respuesta celular de RBCs de sangre periférica y riñón anterior provenientes de truchas infectadas con VHSV mediante transcriptómica y proteómica. Los resultados mostraron un incremento en la expresión de interferón de tipo I, genes estimulados por interferón como Mx, presentación de antígenos y reguladores del sistema del complemento.

En conclusión, en esta tesis se describen los mecanismos de los RBCs en la respuesta antiviral. En el contexto de la acuicultura, estos resultados son relevantes por demostrar diversas capacidades del RBC como célula inmune. En acuicultura, la vacunación es una necesidad para evitar potenciales pérdidas económicas causadas por infecciones víricas. De este modo, el presente estudio abre la puerta a desarrollar nuevas estrategias antivirales dirigidas a estimular los RBCs, que potencialmente podrían establecerse como nuevas estrategias altamente eficaces para combatir dichas infecciones en el futuro.



Palabras clave: eritrocitos, VHSV, IPNV, trucha arcoíris, presentación de antígenos.

Publicaciones de la Tesis

Enlace al documento completo: <http://hdl.handle.net/11000/5463>

- Nombela, I., Requena-Platek, R., Morales-Lange, B., Chico, V., Puente-Marin, S., Ciordia, S., Mena, M. C., Coll, J., Perez, L., Mercado, L., Ortega-Villaizan, M. D. M. (2019). Rainbow Trout Red Blood Cells Exposed to Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Up-Regulate Antigen-Processing Mechanisms and MHC I&II, CD86, and CD83 Antigen-presenting Cell Markers. *Cells*, 8(5): 386. DOI: 10.3390/cells8050386
- Nombela, I., Lopez-Lorigados, M., Salvador-Mira, M. E., Puente-Marin, S., Chico, V., Ciordia, S., Mena, M. C., Mercado, L., Coll, J., Perez, L., Ortega-Villaizan, M. D. M. (2019). Integrated transcriptomic and proteomic analysis of red blood cells from rainbow trout challenged with VHSV points towards novel immunomodulant targets. *Vaccines* 7(3): 63. DOI: 10.3390/vaccines7030063
- Nombela, I., Ortega-Villaizan, M. D. M. (2018). Nucleated red blood cells: Immune cell mediators of the antiviral response. *PLoS pathogens*, 14(4): e1006910. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006910
- Nombela, I., Puente-Marin, S., Chico, V., Villena, A. J., Carracedo, B., Ciordia, S., Mena, M. C., Mercado, L., Perez, L., Coll, J., Estepa, A., Ortega-Villaizan, M. D. M. (2017). Identification of diverse defense mechanisms in rainbow trout red blood cells in response to halted replication of VHS virus. *F1000Research*, 6: 1958. DOI: 10.12688/f1000research.12985.2
- Nombela, I., Carrion, A., Puente-Marin, S., Chico, V., Mercado, L., Perez, L., Coll, J. (2017). Infectious pancreatic necrosis virus triggers antiviral immuneresponse in rainbow trout red blood cells, despite not being infective. *F1000Research*, 6, 1968 DOI: 10.12688/f1000research.12994.2