



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Ciencias

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Jaime Figueroa

INSTITUTO: Bioquímica y Microbiología

FACULTAD: Ciencias

Evaluación de mecanismos de activación de las células NK contra virus ISA, en cultivo primario de riñón anterior de *Salmo salar*

**Seminario de Graduación
presentada como parte de los
requisitos para optar al Grado
de Licenciado en Ciencias
Biológicas.**

Maria Albina Almonacid Soto

VALDIVIA – CHILE

2013

“Un carácter fuerte se forma por medio de pensamientos fuertes y nobles. Un buen carácter es el fruto del esfuerzo personal. Es el resultado de los propios empeños personales.”

Swami Sivananda

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. Jaime Figueroa, por brindarme la posibilidad de llevar a cabo mi trabajo de tesis en su respectivo laboratorio, y formar parte de su gran equipo de trabajo, pero por sobre todo, por tener la paciencia y dedicación de enseñarme, cada una de las técnicas llevadas a cabo en el presente trabajo.

A mis compañeros del LaBMP, Lorenza, Barbará, Conchita, CC, Pablo, Matias, los cuales me han hecho muy grata mi presencia en laboratorio y por ultimo Fernando, que me ha hecho reír con sus tallas que solo entiendo yo, por ultimo agradecer a los chicos GK, wili y andres. De forma especial a Adolfo Isla y a mi jefa Dra. Denise Haussmann, ya que ellos, se dedicaron a enseñarme todo el cuerpo teórico y práctico, llevado a cabo en presente trabajo, aplicando su teoría, pero por sobre todo muchas gracias por todo lo que hicieron por mí.

A mi querida familia, mi hermosa madre María Soto, padre y hermanos los cuales desde que tengo memoria han estado conmigo y me han apoyado en todo momento, ya que sin su apoyo, este sueño no se hubiese llevado a cabo.

Y por último a mis queridos amigos y compañeros de carrera, Gabriela, Dani, Felipe, Yessenia y su familia, Gleny, Paulina, Pepe, Caro, los cuales me han acompañado y han sido mi mano derecha desde el primer día que llegue a estudiar a Valdivia, ya que me han abierto las puertas de su casa, y me han hecho sonreír cada vez que compartía con ellos. Muchas gracias también a mis queridos amigos de Calbuco Luzganda, Shana, Melisa, Boris, Cornelio, gracias por todo esos momentos que hemos compartimos juntos, se los agradezco de todo corazón. Pero más que agradecida a mi amiga, hermana y con quien he vivido en Valdivia, Daniela Sepúlveda.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Paginas
IDICE DE CONTENIDOS	I
INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS	V
INDICE DE ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.-INTRODUCCION	3
1.1.- Características generales de la inmunidad	3
1.2.- Inmunología de peces teleósteos	4
1.3.- Las células <i>natural killer</i> (NK) en mamíferos	6
1.3.1.- Etapas de lisis celular	7
1.4.- Mecanismo de citotoxicidad	8
1.4.1.- Mecanismo de citotoxicidad mediado por Granzima- Perforina	8
1.4.2.- Mecanismo de citotoxicidad mediado por FasL	9
1.5.- Citoquinas secretadas y estimuladoras de las células NK	11
1.5.1.- TNF α	12
1.5.2.- RIL-2	12
1.5.3.- Interferones	12
1.6.- Células NK en teleósteos	13
1.7.- Virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAv)	15

1.7.1.- Genoma viral	17
1.7.2.- Síntomas	17
1.7.3.- Patogénesis	17
1.8.- Prolactina	19
1.9.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS	21
2.-MATERIALES Y METODOS	22
2.1.- Materiales	22
2.1.1.- Peces para experimentación (<i>Salmo salar</i>)	22
2.1.2.- Equipos e instrumentos	22
2.1.3.- Reactivos	23
2.1.4.- Soluciones	24
2.1.5.- kit de reactivos	25
2.1.6.- Material biológico	25
2.1.7.- Aislados de ISAv	25
2.2.- Métodos	26
2.2.1.- Propagación del virus ISA en cultivos celulares	26
2.2.1.1.- Concentración del virus	26
2.1.1.2.- Titulación viral	27
2.2.2.- Obtención de riñón de <i>Salmo salar</i>	28
2.2.3.- Soluciones y medios de cultivo	28
2.2.4.- Cultivo primario	29

2.2.4.1.- Purificación de células de la línea blanca, del cultivo primario de riñón anterior de <i>Salmo salar</i>	29
2.2.4.2.- Desafío en cultivo primario con virus ISA	30
2.2.4.3.- Estandarización de PRL	31
2.2.4.4.- Cultivo primario desafiado con PRL	31
2.2.5.- Extracción de RNA de cultivo primario de riñón anterior	33
2.2.5.1.- Extracción de RNA de virus en suspensión con reactivo Trizol LS	33
2.2.5.2.- Obtención de cDNA (RT-PCR)	34
2.2.6.- PCR convencional	34
2.2.6.1.- PCR convencional confirmatorio para ISAv	35
2.2.6.2.- Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa	35
2.2.7.- Partidores	35
2.2.7.1.- Estandarización de partidores mediante RT-q PCR	37
2.2.8.- Análisis de expresión de mecanismos de citotoxicidad y citoquinas involucradas mediante RT-q PCR	37
3.- RESULTADOS	38
3.1.- Propagación del virus ISA en la línea celular	38
3.2.- Determinación de la carga viral de ISA	40
3.3.- Calidad de c DNA de células NK de salmón	43
3.4.- PCR convencional para estandarizar partidores	44

3.4.1.- Evaluación de partidores para q PCR	48
3.5.- Confirmatorio de ISAv	50
3.6.- Estandarización de prolactina	52
3.7.- Evaluación cuantitativa de la expresión mediante qPCR de genes involucrados en citotoxicidad de las células NK de salmon, sanas e infectadas con ISAv	52
4.- DISCUSIÓN	63
4.1.- Expresión de mediadores de citotoxicidad en células de cultivo primario sanas e infectadas con ISAv	64
4.1.1.- Granzima y Perforina	64
4.1.2.- FasL	65
4.1.3.- Interleuquinas	66
4.2.- Prolactina	67
5.- CONCLUSION	69
6.- REFERENCIAS	70

INDICE DE TABLAS

Paginas

Tabla 1: Lista de partidores para el análisis de expresión de los mecanismos de citotoxicidad de las células NK	45
--	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de citotoxicidad celular	10
Figura 2: Esquema resumen de la regulación del sistema Inmune por las células NK	14
Figura 3: Distribución del brote de ISAv en Chile	16
Figura 4: Etapas de infección del virus ISA	18
Figura 5: Modelo de experimentación	32
Figura 6: Proceso de infección del virus ISA	39
Figura 7: Etapas de titulación viral	41
Figura 8: PCR convencional para verificar la calidad del cDNA	43
Figura 9 A: Optimización de la temperatura de apareamiento de los partidores para FasL	46
Figura 9 B: Optimización de la temperatura de apareamiento de los partidores para Granzima B	46
Figura 9 C: Optimización de la temperatura de apareamiento de los partidores para RIL-2	47

Figura 9 D: Optimización de la temperatura de apareamiento de los partidores para Serglicina	47
Figura 10: Curva de disociación para cada uno de los partidores por q PCR	49
Figura 11: PCR convencional confirmatorio para ISAv en células de SHK-1 infectadas con ISAv	51
Figura 12: PCR convencional confirmatorio para partículas virales en suspensión de ISAv	51
Figura 13: Cinética de expresión relativa de Perforina	57
Figura 14: Cinética de expresión relativa de Serglicina	58
Figura 15: Cinética de expresión relativa de FasL	59
Figura 16: Cinética de expresión relativa de IFN γ	60
Figura 17: Cinética de expresión relativa de RIL-2	61
Figura 18: Cinética de expresión relativa de TNF α	62

ABREVIATURAS

- EST : *expressed sequence tag*
- IL : Interleuquina
- IgG : inmunoglobulina G
- IgM : inmunoglobulina M
- ISAv : Virus ISA
- MHC : *Major Histocompatibility Complex*
- NCC : *Non-specific Cytotoxic Cell*
- NK : *Natural Killer*
- PBS : tampón fosfato salino
- PRL : prolactina
- SBF : suero bovino fetal
- SHK-1 : Línea celular de cabeza de riñón de salmón

RESUMEN

El sistema inmune de peces muestra características similares al de aves y mamíferos, llevando a cabo tanto respuesta inmune adaptativa como respuesta inmune innata, esta última, tiene como principales células involucradas, los macrófago/monocitos, granulocitos y células “*natural killer*” (NK). Las células NCCs han sido postuladas como la contraparte de las células NK mamífera. Su función es identificar y destruir células tumorales, células infectadas por parásitos y virus, por medio de mecanismos de citotoxicidad mediado por granzima-perforina o FasL, como también la secreción de citoquinas (IFN γ , TNF α , IL-12) y quimiocinas. Para este estudio se eligió el virus ISA como modelo, por las enormes pérdidas en la producción de *S. salar*. Debido a la necesidad de encontrar herramientas, que controlen infecciones, surgió PRL, que juega un rol importante en la modulación de la respuesta inmune, en animales y seres humanos, función que está siendo investigada en peces. El objetivo general es analizar los mecanismos de activación de las células NK (perforina, Fas-ligando, TNF- α , IFN- γ , granzima B), mediante qPCR, en cultivo primario de riñón anterior infectado con ISAv, comparado con peces sanos. Para ello, se estandarizó partidores, se determinó la capacidad infectiva del ISAv mediante el método Reed y Muench, se observó el efecto citopático en la línea celular SHK-1. Cultivos primarios de riñón anterior se infectaron con dos dosis de virus TCID₅₀ y₇₀, y PRL, luego de 72 horas de infección se evaluó la expresión de distintas citoquinas, mediadores de citotoxicidad, y actividad de prolactina, mediante RT-qPCR. Por consiguiente, Perforina, FasL, Serglicina, están directamente involucrados en modular los mecanismos de citotoxicidad de las células NK de *S. salar* desafiadas con ISAv, como también Interleuquinas asociadas a tal mecanismo, como RIL-12, TNF α , IFN γ y por último, prolactina ha resultado como un potencial inmunomodulador de la respuesta inmune en peces teleósteos, para el control de enfermedades.

ABSTRACT

The immune system of fish shows similar characteristics to birds and mammals, taking a both adaptive immune answer as well as natural immune answer, this last one, has as its main involved cells the macrophage / monocytes, granulocytes and *natural killer* cells. The NCCs cells have been postulated as the counterpart of the mammal NK cells, their function is to identify and destroy the tumoral cells, infected cells by virus and parasites, through mechanisms of cytotoxicity, conducted by granzyme perforin or FasL, as well as the secretion of cytokines, and chemokines. For this study, the virus ISA was chosen as model, due the huge loss in the production of *salmo salar*, due to the need of finding tools that could control infection, emerged PRL, which plays a huge important part in the modulation of the immune answer, in animals and human beings, function that is been investigated in teleosts. The main objective is to analyze the mechanisms of activation of the NK cells. Perforin, Fas-ligand, TNF- α , IFN- γ , granzyme B), through qPCR, in primal harvest of kidney infected with ISA, compared with healthy fish. For that were standardized particles and it was determined the infective capacity of ISA through the Reed and Muench method of it was observed the cytopathic effect in the SHK-1 cell line. Primal harvest of front kidney were infected with two doses of TCID₅₀ y₇₀, y PRL virus, after 72 hours of infection, it was evaluated the expression of the different kinds of cytokines, mediators of cytotoxicity, and prolactin activity, through qPCR. Therefore perforin, FasL, Serpin are directly involved in the modulating of the mechanisms of cytotoxicity of the NK cells, threatened with ISA virus, as well as interleukins, related to that mechanism, like RIL-12, TNF α , IFN γ , finally prolactin has resulted as a potential immunomodulator of immune answer in teleost fish.

1.-INTRODUCCION

1.1.-Características generales de la inmunidad

La inmunidad es una reacción frente a sustancias extrañas, como los microorganismos (virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos multicelulares) y contra macromoléculas proteínicas y polisacáridos (Abbas *et al.*, 2001). El sistema inmune está formado por una gran cantidad de células, receptores de membrana que activan cascadas de señalización, que se activan frente al reconocimiento de patógenos y agentes extraños en cuestión o también llamados antígenos. Debido a la gran cantidad de antígenos presentes en el medio ambiente en el que vivimos, es necesario recurrir a mecanismos de la respuesta inmune, para combatir al antígeno.

La respuesta inmunitaria comienza con el reconocimiento del patógeno o del material extraño y finaliza con el desarrollo de un mecanismo capaz de eliminarlo (Male & Roitt, 1996). Entre las respuestas inmunitarias involucradas en el reconocimiento y destrucción del patógeno se destaca la respuesta inmune innata (natural o inespecífica) y respuesta adaptativa (adquirida o específica).

Dentro de la respuesta innata se incluyen las barreras físicas, diversos tipos celulares. Tales como, fagocitos, eosinófilos, células citotóxicas naturales (NK) y varias moléculas que circulan en la sangre como el complemento y proteínas de la fase aguda (Male & Roitt, 1996; Abbas *et al.*, 2001). Por su parte la respuesta adaptativa, es específica frente al ataque de cualquier patógeno, posee memoria, esta incluye entre otros a los linfocitos B y a sus productos de secreción, denominados anticuerpos (Abbas *et al.*, 2001). Se destacan además los linfocitos T y los linfocitos B, que secretan citoquinas.

1.2.-Inmunología de peces teleósteos

El sistema inmunitario de peces teleósteos muestra características similares al de aves y mamíferos, presentando tanto respuesta inmune adaptativa como respuesta inmune innata (van Muiswinkel *et al*, 1995).

El sistema inmune presenta, como una de las primeras líneas de defensa contra patógenos lo constituyen las escamas, las mucosas que recubren las branquias, el sistema gastrointestinal, el mucus que recubre la piel la cual contiene una variedad de compuestos antimicrobianos y antiparasitarios como lisozimas y proteasas, entre otros.

Entre los componentes del sistema inmune innato, se encuentra, el sistema del complemento, el cual está compuesto por una variada gama de proteínas séricas, las cuales tienen 3 funciones asociadas: 1) recubrir al patógeno de estas proteínas séricas para así permitir un reconocimiento y destrucción de la célula patogénica, mediante las células fagocíticas, 2) iniciar la respuesta inflamatoria y 3) lisis de los patógenos (Rubio-Godoy, 2010).

Otro de los constituyentes que forma parte del sistema inmune innato de los teleósteos son los interferones (IFN), que forman parte de una familia heteróloga de proteínas, que le proporciona a los peces protección contra las infecciones virales (Olabuena, 2000).

La relevancia para estudiar el sistema inmune innato de peces teleósteos, se evidencia en dos puntos importantes; el primero es que al ser organismos poiquiloterms, provoca que cuando los peces se encuentran a temperaturas muy bajas no son capaces de activar adecuadamente algunas funciones inmunitarias adaptativas, como la producción de anticuerpos y dependen sobretudo de las defensas innatas. El segundo punto, es que cuando la inmunidad adquirida no funciona cabalmente, se incrementa la actividad del complemento y los factores de coagulación, que

comprende 2 mecanismos defensivos importantes: por un lado la fagocitosis, y por otro la citotoxicidad no específica, mecanismos que son llevados a cabo cuando es reconocido el patógeno.

El proceso de fagocitosis en teleósteos es muy similar al llevado a cabo en vertebrados; el cual consiste en los procesos de: reconocimiento, unión, incorporación destrucción y digestión del antígeno, para la eliminación completa del antígeno o agente externo que ingresa al pez (Rubio-Godoy, 2010).

Los componentes celulares que conforman el sistema inmune innato en peces teleósteos incluye a las células fagocíticas, tales como: los macrófagos/monocitos, las células citotóxicas no específicas (NCCs) que fueron pensadas para ser la contraparte de las células NK en mamíferos (Ordàs *et al.*, 2011), los granulocitos, que incluyen a los neutrófilos y eosinófilos (Olabuenaga S, 2000).

Todos los animales no mamíferos, en su mayoría carecen de médula ósea, siendo este el caso de los teleósteos. La producción de células sanguíneas, proceso denominado hematopoyesis, se realiza en el riñón, órgano en el cual se encuentran localizadas, las células madres hematopoyéticas y que en reemplazo de ganglios linfáticos, los teleósteos tienen una extensa red para atrapar partículas acarreadas en la sangre, principalmente en el riñón y el bazo, órganos donde se localizan poblaciones de macrófagos y linfocitos capaces de iniciar una respuesta inmune (Rubio-Godoy, 2010).

1.3.-Las células *Natural Killer* (NK) en mamíferos

Forman parte de las células involucradas en la respuesta inmune innata, estas células no solo “matan” a células tumorales, sino que también, juegan un papel importante en la defensa contra, patógenos, como parásitos y los virus (Trinchieri, 1989; Biron *et al.*, 1999).

Estas células, forman parte de la tercera población de linfocitos, diferentes a los linfocitos B y linfocitos T (Sepúlveda *et al.*, 2000), no tiene receptores específicos para el antígeno extraño y su misión es la defensa innata de los organismos. Su función más importante es identificar y destruir a la célula diana y también contribuye a la regulación del sistema inmune en la secreción de citoquinas y quimioquinas. Presentan en su citoplasma gránulos citotóxicos y además de expresar marcadores proteicos como CD56 y FcγR-III(CD-16) en la superficie celular (Bryceson *et al.*,2011).

Cualquier tipo de célula, ya sea normal o patológica, puede ser sensible al ataque de las células NK, pero para ello necesita del reconocimiento de los receptores de la célula diana, de los cuales, uno de ellos tiene como ligando una molécula de histocompatibilidad clase I (puede ser del tipo inhibidor o activador).

La forma en que las células NK destruyen a las células infectadas por virus, células tumorales, células normales o alogénicas, es debida a la acción citolítica de esta. Tal destrucción puede llevarse a cabo mediante los mecanismos de citotoxicidad a través del proceso de lisis celular, o bien mediante la citotoxicidad dependientes de anticuerpos ADCC, esta última, gracias a que las células NK presentan en su superficie celular un marcador denominado CD16, reconocen la fracción Fc de los anticuerpos que recubren a la célula diana, permitiendo la lisis de esta (Sepúlveda *et al.*, 2000).

1.3.1.-Etapas de la lisis celular

1.-Fase de reconocimiento y adhesión celular: La célula efectora reconoce una serie de receptores de superficie de la membrana en la célula diana.

2.-Fase de activación de la célula efectora: El reconocimiento de los receptores de superficie de la célula diana con sus ligando, genera la transmisión de la señal hacia dentro de la célula produciendo tanto, vías de señalización, cambios estructurales, entre los que destacan, reorganización del citoesqueleto, polarización del aparato de Golgi y la exocitosis de los gránulos de secreción al espacio intercelular. Esta interacción también puede generar una secreción de citoquinas como IFN- γ y TNF- α .

3.-Fase lítica: Las células NK lisan a la célula diana a través de la liberación de los factores citotóxicos, tales como, la granzima y la perforina, mediante el proceso de exocitosis de sus gránulo; lo que trae como consecuencia la eliminación de célula diana por apoptosis, además de la activación de citotoxicidad mediada por FasL, que finaliza en la destrucción de la células diana.

1.4.-Mecanismos de citotoxicidad

1.4.1 Mecanismo de citotoxicidad mediado por granzima-perforina

Las enzimas granulares, que se encuentran en las células NK y que participan activamente en la citotoxicidad, son las granzimas, la perforina o proteína formadora de poros (PFP), que se encuentran específicamente en los gránulos citotóxicos de las células NK, además de carboxipeptidasas, catepsina, ari-sulfatasa y beta-glucuronidasa.

Perforina, proteína formadora de poros (Voskoboinik *et al.*, 2006; Krzewski *et al.*, 2012). Se encuentra en los gránulos secretorios de las células NK, formando un complejo junto a granzima B y una proteína de alto peso molecular llamada serglycina (Raja *et al.*, 2003). Perforina tiene la propiedad de interactuar con fosfolípidos de la membrana plasmática de la célula diana, y como consecuencia de lo anterior se genera la exocitosis de los gránulos sobre la membrana de la célula diana y además genera la inducción de la permeabilización de la membrana (Sunil *et al.*, 2002). Una vez endocitado el complejo por la célula diana, conduce a la formación de una vacuola endocítica, en donde el complejo queda retenido (Liebermann, 2003). El pH ácido de estas vacuolas induce la activación de las perforinas, desestabilizando la membrana endocítica de la célula diana, lo cual genera poros, que permiten la entrada de granzima B, hacia el citosol de la célula diana, que posteriormente, activa las vías de las caspasas, llevando a la apoptosis de la célula diana.

El sistema inmune tiene una variada gama de granzimas, entre las que se encuentra, granzima A, B, C, D, F, G, H, K que forman parte de la familia de las serinas proteasas y constituyen el componente de mayor importancia en los gránulos citotóxicos de las células NK y linfocitos T citotóxicos (CTLs). A su vez, las granzimas juegan el rol más importante en la inducción de la lisis de la célula diana (Kesavannair *et al.*, 2006) ,y se clasifican en 4 actividades enzimáticas:

Trypsase (granzimas A y K), Asp-ase granzimas B, Met-ase (granzimas M, and chymase (otras granzimas) (Kam *et al.*, 2000). Las granzimas A y B son muy frecuentes de encontrar en humanos y en ratones, siendo la granzima B, la que activa la vía dependiente de las caspasas, para el inicio de la apoptosis de la célula diana, y de la misma forma, se encuentra muy expresada en células NK formando un complejo con perforina, la cual contiene una tercera proteína de alto peso molecular denominada serglycina que actúa como proteína transportadora o *carrier* (Metkar *et al.*, 2002; Raja *et al.*, 2003).

1.4.2.-Mecanismo de citotoxicidad mediado por FasL

FasL, es una proteína de transmembrana tipo II que es expresada en las células NK, reconoce la porción Fas expresada en la célula diana, induciendo la apoptosis de la célula blanco. Este mecanismo de citotoxicidad se desencadena por la interacción del receptor de membrana FasL de la célula NK, con el sitio Fas de la célula diana, poniendo en marcha una serie de eventos de lisis celular. Este mecanismo apoptótico se desarrolla en 3 fases: Fase de iniciación, se genera por la unión de Fas a su respectivo ligando; Fase efectora, se activan las enzimas proteolíticas denominadas caspasas, proceso en el cual la célula está programada para morir; Fase degradativa, donde la célula muerta es reconocida y fagocitada por lo macrófagos (Marcel *et al.*, 2002).

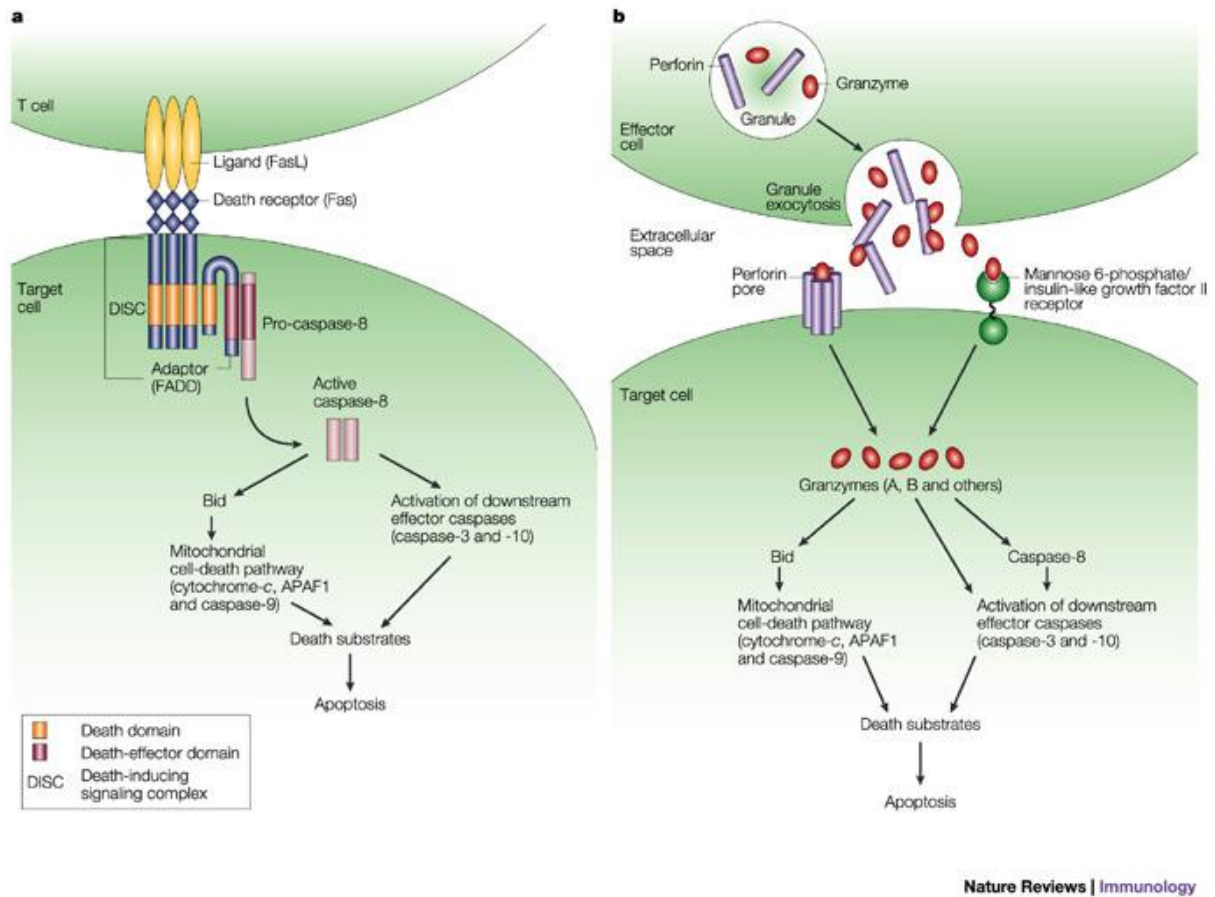


Figura 1: Mecanismos de citotoxicidad celular. (A) Citotoxicidad mediada por Fas-FasL. (B) Citotoxicidad mediada por perforina-granzima. Los dos mecanismos conllevan a la muerte celular, desencadenada por la activación de caspasas y/o vía Bid, terminando en apoptosis. (Marcel *et al.*, 2002).

1.5.-Citoquinas secretadas y estimuladoras de las células NK

Las citoquinas forman parte de un gran grupo de proteínas o glicoproteínas que son producidas por estímulos exógenos o endógenos, que poseen la capacidad de modular la actividad funcional de las células. Son producidas durante las fases efectoras de la inmunidad innata y específica, regulando las respuesta inmunitarias e inflamatorias (Olavarria, 2010).

Debido a las características funcionales de las citoquinas y su alto nivel de pleiotropismo, se hace difícil clasificarlas en una función determinada, es razón de ello que se dividen en: 1) Citoquinas implicadas en el desarrollo hematopoyético 2) Citoquinas implicadas en el desarrollo de la respuesta inmune innata 3) Citoquinas generadas en la respuesta inmune adaptativa. Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, se le otorga mayor énfasis a las citoquinas implicadas en el desarrollo de la respuesta inmune innata. Estas citoquinas se generan de manera inmediata al contacto con el agente infeccioso, los monocitos, macrófagos, o algún tipo de linfocito activado.

Además de la función citotóxica, estas células presentan una función secretora, que consiste en la liberación de varias citoquinas, tales como: TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-15, IL-13, GM-CSF y MGSF (Sepúlveda *et al.*, 2000), que se producen como consecuencia de la activación de la células NK por el encuentro con la célula diana, y la respuesta a citoquinas exógenas: IL-12, IL-2, IL-15 y IL-18, que paralelamente son estimuladas por quimioquinas, entre las cuales: MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES (Bryceson *et al.*, 2011).

Las citoquinas son secretadas al espacio extracelulares, para producir su efecto en la célula diana o cualquier otro agente que cause la activación de éstas, pudiendo ejercer estímulos autocrinos, paracrinos, o endocrinos. Los efectos biológicos pueden ser muy amplios y no solamente

dedicados a la respuesta inmune, sino también enfocados a procesos de embriogénesis, y desarrollo de órganos.

1.5.1.- Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

Es un citoquina proinflamatoria y de defensa al huésped (Varga,2009), con funciones reguladoras en el sistema inmune. Es producido principalmente por monocitos y macrófagos, en respuesta a los agentes infecciosos, siendo capaz de activar a las células NK (Leibson, 1997). Induce la expresión de moléculas de adhesión, lo que constituye la principal causa del efecto shock séptico asociado a bacterias (Sepúlveda *et al.*, 2000).

1.5.2.- RIL-12

Producida por monocitos y macrófagos o también por células dendríticas y linfocitos B, es el factor estimulador de las células NK. Su producción es fuertemente estimulada por bacterias, parásitos intracelulares y virus, que a su vez estimula y aumenta la actividad citotóxica de las células NK (Sepúlveda, 2000; Yadav *et al.*, 2011). Influye en la capacidad de dirigir la diferenciación de los linfocitos T hacia los linfocitos Th1 (Sepúlveda, 2000).

1.5.3.- IFN interferones

Son el producto de las células infectadas por virus, pero con el tiempo se descubrió que ejercían efectos reguladores sobre la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares, además de la capacidad de modular al sistema inmune. Se clasifican en: IFN tipo I, entre los que

se incluye IFN- α y IFN- β (antiviral y antiproliferativa) producidos por células infectadas con virus, y por último el IFN tipo II, que incluye IFN γ (derivado de macrófagos, linfocitos T y células NK, en respuesta a células infectadas por virus).(Sepúlveda *et al.*, 2000). El IFN γ incrementa la expresión de MHC-I y II, activa macrófagos y células NK (Leibson, 1997), también inhibe la proliferación de células Th2, permite la capacidad presentadora de antígenos a los macrófagos y así facilitar su activación, además de aumentar la defensa contra infecciones virales y la habilidad tumoricida, generando lisis de la célula tumoral y/o célula infectada por virus; en la medula ósea genera un aumento hematopoyético, y por ultimo un aumento de la expresión HLA en las células dendríticas, pero la más importante acción biológica de este receptor, es el aumento en la defensa contra infecciones virales, además de la activación de las células NK y macrófagos que propician la respuesta inmune frente a patógenos, como virus.

1.6.-Células NK en teleósteos

Se ha expuesto que las células NCCs o también denominadas células citotóxicas no específicas, se desarrollaron como la contraparte de las células NK en mamíferos, desde la descripción inicial de la línea celular de *catfish* (Graves *et al.* 1985; Evans *et al.*, 1988; 1999). La identificación en la línea celular de *catfish* muestra que son morfológica y funcionalmente similares, también usan similares vías efectoras para la destrucción de células tumorales y células infectadas por virus, como los mecanismos de citotoxicidad mediada por granzima/perforina y mecanismo de citotoxicidad mediado por FasL/Fas (Ordás *et al.*, 2011).

Se han detectado NCCs en la sangre periférica, bazo, hígado y por último en el riñón de los peces, forman parte de las células involucradas en el sistema inmune innato de los peces

De acuerdo a todo lo previamente mencionado es importante destacar la acción de las células NK en la defensa contra agentes infecciosos ya que proporcionan al individuo de una variada gama de receptores involucrados en el reconocimiento y destrucción del patógeno, entre los cuales destacan, los mecanismos citotóxicos y citoquinas mencionados en párrafos precedentes.

En los últimos años el estudio del sistema inmune de peces teleósteos, ha sido de gran ayuda para control, de diversas enfermedades, tales como el agente infeccioso que genera la anemia infecciosa del salmón provocada por el virus ISA, a estudiar en el presente trabajo, virus que ha producido una enorme repercusión negativa en la economía nacional y mundial, provocando cerca de un 40% de pérdidas en la producción *Salmo salar*.

1.7.-Virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAv)

ISAv es un virus de la familia *Orthomyxoviridae*, del género *Isa virus*(Kibenge *et al.*, 2009), afecta a peces cultivados en agua de mar de la especie *Salmo salar*, siendo una de las enfermedades que causo la mayor mortalidad en la producción en nuestro país.

Esta enfermedad fue inicialmente detectada en Noruega el año 1984 y durante 25 años ha sido una de las patologías que se ha expandido en el hemisferio norte.

El primer brote en Chile del virus ISA se describió en Chile en julio de 2007 (Kibenge *et al.*, 2009). En la figura 3 se puede observar la distribución del virus ISA en nuestro país en el año 2008, en el cual se muestra el gran impacto que ha causado en la X región y las consecuencias negativas en la economía, por la mortalidad de la producción de la especie *Salmo salar*.

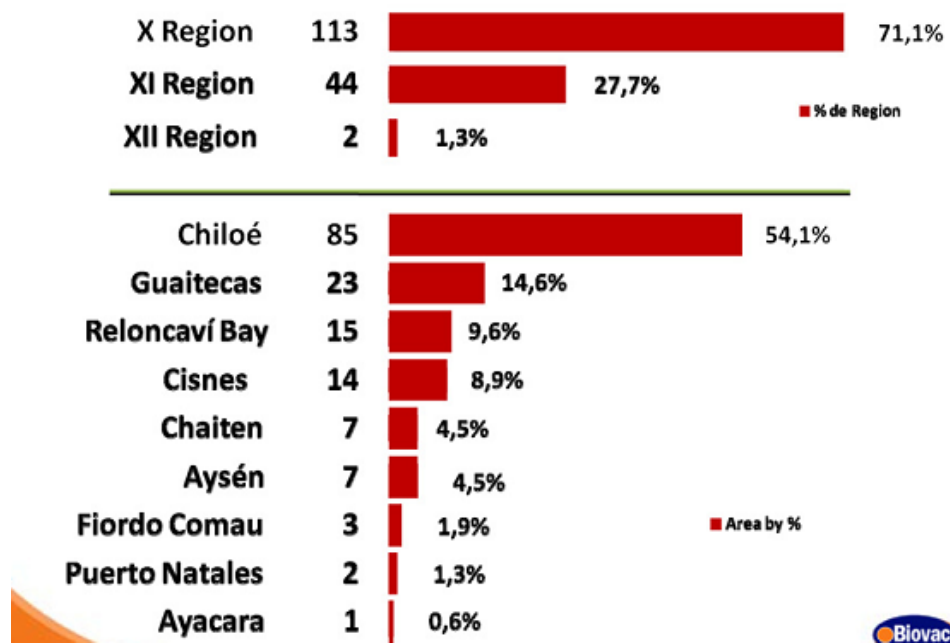


Figura 3: Distribución del brote de ISAv en Chile. Se observa la distribución de los brotes del virus ISA en Chile, donde se muestra el porcentaje de la enfermedad de acuerdo a las regiones. Esto fue descrito el 1 de diciembre del 2008 (Kibenge *et al.*, 2009).

1.7.1.-Genoma viral

Las principales características del virus ISAv, es que incluyen viriones de 90-140nm, cuyo genoma es de RNA de cadena simple de 45-140 nm de diámetro. Exhibe ocho segmentos de RNA simple hebra negativa, y utiliza su propia RNA polimerasa, dependiente de RNA para replicar y transcribir su genoma (Cottet *et al.*,2011). El genoma viral codifica al menos 10 proteínas, 9 de las cuales son estructurales, con un tamaño total de aproximadamente 14,3kb (Kibenge *et al.*, 2004).

1.7.2.-Síntomas

Los peces infectados con virus ISA presentan una coloración oscura, siendo los efectos físicos externos una hemorragia peri-ocular y palidez branquial, y los efectos físicos internos son palidez hepática, enteritis hemorrágica, hemorragia de ciegos pilóricos y grasa visceral hemorrágica, congestión del hígado, inflamación del bazo, congestión intestinal, anemia severa (Cottet *et al.*,2011).

1.7.3.-Patogénesis

El ISAv para poder infectar las células del salmón lleva a cabo el ciclo lítico de multiplicación viral, en el cual se unen las proteínas de la envoltura del virus a la membrana de la célula del salmón para penetrar hacia el interior de la célula. El ISAv tiene una proteína llamada hemaglutinina-esterasa(HE), esta proteína interactúa con el receptor de ácido sialico permitiendo la endocitosis del virus y la posterior unión entre la membrana viral y endosomal por la proteína de fusión (Cottet *et al.*,2011), para que posteriormente se lleve a cabo el proceso de replicación

viral en el citoplasma y la adquisición de la membrana viral que se lleva a cabo en la superficie de la membrana plasmática de la célula diana.

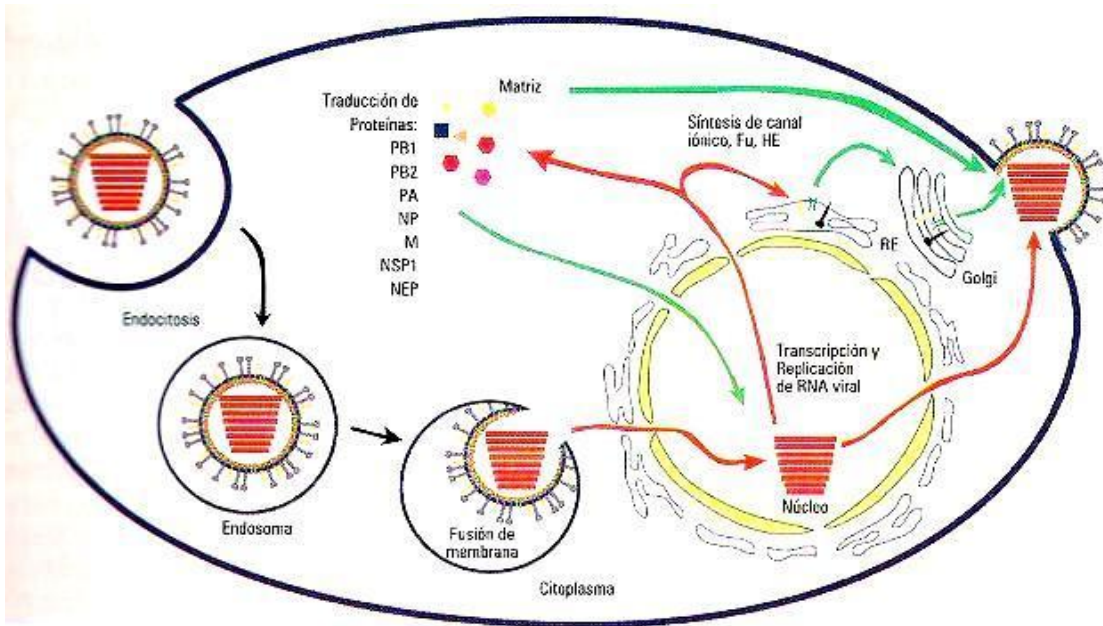


Figura 4: Etapas de infección del virus ISA. Esquema que muestra las distintas etapas de la infección por ISAv de una célula de salmón, las flechas en negro indican la ruta de endocitosis. Las flechas rojas muestran la ruta que sigue el genoma viral y las flechas verdes muestran la ruta que siguen las proteínas virales. (Cottet *et al.*,2010b)

La transmisión de la infección en peces se ha dado mayoritariamente por la cohabitación de peces enfermos y sanos, también por el contacto con secreciones y excreciones (Cottet *et al.*,2011).

Es importante destacar que el sistema inmune de peces teleósteos, depende casi exclusivamente del sistema inmune innato, siendo importante centrarse en su estudio para el control de patógenos, como virus. Para luego utilizarlo como herramienta, para el control de estas

enfermedades. Es por ello que se ha establecido, que prolactina juega un rol importante en la modulación de la respuesta inmune a través de hormonas neuropeptídicas, en animales y seres humanos (Chikanza, 1999; Dan & Lall, 1998; De Bellis *et al.*, 2005). La prolactina (PRL), ha sido relacionada con la modulación inmune-neuroendocrina tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*, y estos han sido bien documentados en mamíferos (Figuroa *et al.*, 1994, 1997). Ahí su importancia, para el control de enfermedades, especialmente, para abordar el ataque del virus ISA contra las células de salmón.

1.8.- Prolactina

Prolactina (PRL), es una hormona polipeptídica de 23 kDa, secretada por la glándula pituitaria, y células inmune (Shelly *et al.*, 2011; De Bellis *et al.*, 2005), siendo influenciado por el sistema endocrino y mecanismos paracrino/ autocrino. Siendo asociada a una infinidad de funciones biológicas, entre las que podemos encontrar: relacionada con el crecimiento y desarrollo, endocrinología, metabolismo, comportamiento, balance de agua y electrolitos y por ultimo reproducción e inmunorregulación (Bole- Feysot *et al.*, 1998).

Juega un rol importante en la modulación de la respuesta inmune en animales y humanos, este rol depende de la unión del receptores de prolactina (RPRL) a receptores específicos expresados en la membrana de células inmunitarias y células hematopoyéticas (De Bellis *et al.*, 2005). Entre los receptores específicos, secretados por la membrana de células inmunitarias, encontramos a la súper familia de citoquinas, que incluye a los receptores para IL-2, 3, 4, 6, 7, 9, 12 y 15, por ultimo IFN γ (De Bellis *et al.*, 2005).

En el genoma humano, el gen de PRL, se encuentra en el cromosoma 6 (Overbach *et al.*, 1981).

Obtenido un tamaño de 10 kpb, está compuesto de 5 exones y 4 intrones (Truong *et al.*, 1984).

En peces, PRL fue aislada por primera vez en 1983 desde la glándula pituitaria de salmón chum (*oncorhynchus keta*) (Kawauchi *et al.*, 1983). Siendo clásicamente relacionada con procesos de osmorregulación, hecho que fue demostrado en peces el año 1950, por estudios en la *kilifish* (Manzon, 2001). Forma parte de la familia de la hormona de crecimiento (GH) y patógeno placentar, como también somatolactina (SL), presente solo en peces (Lopez *et al.*, 2001; Manzon, 2001) y actualmente se ha asociado su efecto estimulador sobre la respuesta inmune, situación que se ha vuelto relevante, a la hora de estudiar el sistema inmune innato de peces teleósteos.

En última instancia, es de relevancia señalar, la gran importancia de analizar y evaluar los mecanismos de citotoxicidad de las células NK en *Salmo salar*, debido a la escasa información de los mecanismos de citotoxicidad mediada por las células NK en especies como salmón frente a la presencia de algún patógeno, para así lograr una mayor comprensión de las defensas inmunológicas de los peces frente a virus. Como también, lograr comprender el verdadero efecto inmunomodulador sobre la respuesta inmune, de la hormona polipeptídica prolactina (PRL), en *Salmo salar*. Por tanto, se puede utilizar esta información, como base de futuros estudios, en mejorar el conocimiento relacionado con los mecanismos de citotoxicidad mediado por las células NK en peces teleósteos, y encontrar herramientas más eficientes, que ayuden al control de enfermedades, relacionadas con patógenos, como virus.

Hipótesis:

I) En peces infectados con ISAv existe un aumento de la expresión de distintos mediadores relacionados con la citotoxicidad como perforina, Fas-ligando, TNF- α , IFN- γ , y granzima B.

II) En peces infectados con ISAv, prolactina es un importante estimulador de la actividad citotóxica de las células NK y de las interleuquinas asociadas a su activación.

Objetivo general:

Analizar los mecanismos de activación de las células NK por virus ISA en cultivo primario de riñón de *S. salar*.

Objetivos específicos:

- 1.-Analizar la expresión del RNA mensajero de proteínas mediadoras de la citotoxicidad (perforina, Fas-ligando, TNF- α , IFN- γ , granzima B) frente a virus ISA, mediante RT qPCR.
- 2.- Evaluar si los mecanismos de citotoxicidad se activan frente a virus ISA
- 3.-Analizar el Efecto citopático en la línea celular SHK-1, ocasionado por el virus ISA.
- 4.- Evaluar el efecto inmunomodulador del PRL, comparando células infectadas, y células tratadas con PRL.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-Materiales

2.1.1-Peces para experimentación (*Salmo salar*)

En los experimentos se utilizaron peces sanos de aproximadamente 45 g, obtenidos de los estanques de las dependencias de la empresa Aquasan, Valdivia, a los cuales se les diseccionó el órgano riñón anterior para la extracción de células de riñón cefálico con la finalidad de llevar a cabo el cultivo primario en las dependencias del laboratorio de Biología Molecular de Peces de la Universidad Austral de Chile, Valdivia.

2.1.2.- Equipos e instrumentos

- Balanza acculab v-mg.
- Balanza: Satorius TE4101.
- Cámara de electroforesis, Enduro.
- Fuente de poder, Enduro Labnet.
- Cámara de Flujo Laminar: Nuair NU425-400E.
- Transiluminado, Maestrogen.
- Incubador, ZSD-1270.
- Refrigerador, Consul 260.
- Propipeta, Rota-Filler 3000.

- Minicentrifuga, Labnet.
- Centrifuga: Sigma 2-16 multigene.
- Microcentrifuga: Sigma 1-14.
- Microondas: Somela Faney WT1700.
- Microscopio confocal: Zeiss (Axiovert 100 M).
- Microscopio: Olympus BKX41.
- Microscopio invertido: Olympus CKX41.
- Microscopio: Axio Zeiss
- Espectometro Nanovue
- Micropipetas: Axygen, Labnet.
- pH metro: InoLab.
- Termociclador: Eppendorf Mastercycler personal.
- Termociclador en gradiente: Labnet.
- Termociclador tiempo real: Roche, Ligth Cyclor 1,5.
- Vortex: Branstead International.

2.1.3.- Reactivos

Merck, Alemania	Winkler, Chile	Promega,USA	Sigma,USA
Isopropanol, Cloroformo	-Ac.Borico -Hidroxido de sodio	-Inhibidor de RNAsa, -DNA polimerasa -Nucleotidos	-Penicilina- estreptomocina -Glucosa -Medio L-15

		-Transcriptasa reversa -random primer	
Lonza,Suiza	Invitrogen,USA	Arquimed, chile	G.E.Heathcare, USA
Agarosa	-Suero bovino fetal -syber safe	Etanol	Percoll
Ambion			
Reactivo Trizol LS			

2.1.4.-Soluciones

-Medio L-15: Suplementado con 10 % y 2 % de suero bovino fetal.

-PBS: NaCl 136.89 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10.14 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, pH 7.4.

-Solución de Chomczynski: Tiocianato de Guanidina 4M; citrato de Sodio 25mM; sarkosyl 0,5% p/v; autoclavado y posteriormente se agrega β-mercaptoetanol 0,1M.

-Buffer SB (20x): ácido bórico, hidróxido de sodio (NaOH), agua destilada, ajustar pH 8.2 con ácido bórico

- Gene ruler DNA,Ladder mix: DNA Ladder, Loadingdy 6X, agua DEPC.

2.1.5.- kit de reactivos

E.Z.N.A. Plasmid Miniprep kit I, Omega Biotek (USA).

LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche (USA).

SV Total RNA Isolation System, Promega (USA).

2.1.6.-Material Biológico

-Línea celular SHK-1 (línea celular de cabeza de riñón de *Salmo salar*).

2.1.7.- Aislados de ISA_v

La alícuota viral fue traída del campus puerto Montt de la Universidad Austral de Chile

2.2.-Métodos

2.2.1.- Propagación del virus ISA en cultivos celulares

Los virus por ser parásitos intracelulares obligados, deben ser cultivados en células vivas (Navarro, 2004). Para ello se utilizó una línea celular llamada SHK-1 (cabeza de riñón de salmón), células que son divididas con una enzima proteolítica llamada tripsina, para ser sembradas en botellas de cultivo celular, las cuales rápidamente se adhieren al plástico y se multiplican, hasta formar una monocapa confluyente.

Cuando la botella de cultivo celular (15mL) sembrada con la línea celular SHK-1 se encuentra confluyente con medio L-15 al 10 % SBF (suero bovino fetal) + antibiótico. La alícuota del virus ISA de 1 mL ya descongelada, y se agrega sobre la línea celular sin medio, de esta manera el virus se propaga por la monocapa durante 30 min a 1 hora, luego se agrega el medio L-15 al 2 % SBF + antibiótico para la mantención de las células, hasta observar el efecto citopático del virus sobre la línea celular SHK-1. En paralelo se mantuvo una botella de cultivo celular (15 mL) sembrada con la línea celular SHK-1 sin infectar, a modo de control.

2.2.1.1.-Concentración del virus ISA

Para poder concentrar las partículas virales en suspensión, luego de la propagación en la línea celular SHK-1, se utilizó un centricon de 30 kDa, previamente hidratado con agua destilada autoclavada o PBS 1X estéril. Se agregaron las alícuotas virales al centricon y se centrifugaron a 3.000xg durante 15 min, una vez transcurrido el tiempo de centrifugación, se eliminó el

sobrenadante y las partículas virales quedaron adheridas al centricon, para luego agregar 200 μ L de medio L-15 al 2 % SBF, pipeteando suavemente. Las partículas virales concentradas fueron guardadas a -80 °C, hasta su próxima utilización.

2.2.1.2.- Titulación viral

Para determinar la capacidad infectiva del virus ISA se utilizó el método de Reed y Muench, el cual consiste en una serie de diluciones del virus 1; 1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000; 1:100.000; 1:1.000.000; 1:100.000.000 en placas de cultivo de 96 pocillos. Donde previamente se sembraron 2000 células de la línea celular SHK-1 con 100 μ L de medio L-15 al 2 % SBF + antibiótico por c/pocillo, fueron mantenidas por un día para que se adhieran a la placa de cultivo celular de 96 pocillos. Una vez adheridas a la placa de cultivo celular se llevó a cabo las diluciones en tubos Eppendorf de 1,5 mL, tomando 70 μ L de la alícuota viral y agregando tal cantidad en tubos Eppendorf de 1,5 mL con medio L-15 al 2% SBF + antibiótico. Una vez realizada la dilución se toman 50 μ L de c/tubo con su respectiva dilución, para infectar la placa de cultivo de 96 pocillos, aforándolos con 50 μ L de medio L-15 al 2% SBF + antibiótico con sus respectivos controles pocillos sin infectar y observar el efecto citopático de la línea celular SHK-1.

Para calcular del título viral TCID₅₀, se contó los pocillos que obtuvieron efecto citopático y los que no obtuvieron efecto citopático, una vez contado, se prosiguió a calcular la frecuencia acumulada de pocillos con efecto citopático y sin efecto citopático, ya obtenidos los totales. Se calcula la razón del efecto citopático y posteriormente % de efecto citopático para cada una de las diluciones. Una vez obtenidos tales proporciones, se llevó a cabo el cálculo de la distancia

proporcional (DP) del 50% de efecto citopático entre dos diluciones, que se obtiene de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$DP = \frac{\% \text{ efecto citopático} > 50 \% - 50 \%}{\% \text{ efecto citopático} > 50 \% - \% \text{ efecto citopático} < 50 \%}$$

Una vez obtenida la distancia proporcional, se calculó el TCID₅₀/m L.

2.2.2.- Obtención del riñón de *Salmo salar*

Especímenes sanos de salmón, que pesaron 45g aproximadamente, recién obtenidos del estanque de agua dulce, fueron sacrificados para la obtención del órgano de estudio. Para ello, se cercenaron en forma sagital, con el objetivo de ubicar los órganos, luego se realizó un corte longitudinal para dejar expuesto el riñón y extraerlo de la especie en estudio (para la realización del cultivo primario se requiere del órgano fresco).

2.2.3.-Soluciones y medios de cultivo

Las soluciones para la composición de los medios de cultivo fueron preparados bajo una cámara de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Del mismo modo todas las soluciones y tampones preparados para el medio de cultivo fueron filtrados con filtros de nitrocelulosa (0.2 µm). El medio de cultivo utilizado fue L-15 suplementado con 10% de suero

bovino fetal + antibiótico y medio de cultivo L-15 suplementado al 2% suero bovino fetal + antibiótico y mantenido a 17°C, sin CO₂.

2.2.4.-Cultivo primario

Para llevar a cabo el cultivo primario de riñón, se cumplieron las siguientes fases; en primer lugar, seleccionar y aislar el riñón anterior; posteriormente, se procedió a la disección del riñón anterior de *S. salar* y su depósito en placa Petri con medio L-15 suplementado con 10 % suero bovino fetal + antibiótico. Acto seguido, se tamiza el órgano con una malla de 70 µm puesta en un tubo de 50 mL, sobre esta malla se colocaron trozos del órgano, para disgregar el tejido con vástagos de jeringa previamente autoclavados. Una vez disgregado el tejido en su totalidad, se tomaron 2 mL medio L-15 10 % SBF + antibiótico para lavar y sacar restos de células de la malla y depositarlos en tubo de 50 mL. Luego el tubo con las células se tapa y se centrifuga a 600 xg por 10 min a 4°C. Transcurrido el tiempo de centrifugado se eliminó el sobrenadante y se resuspendió suavemente las células en 15 mL medio L-15 al 10 % SBF. Todo el proceso anteriormente descrito se realizó bajo campana para evitar contaminación.

2.2.4.1.-Purificación de células de la línea blanca, del cultivo primario de riñón anterior de *Salmo salar*

Para poder distinguir a las células NK de otras células involucradas en la generación de la respuesta inmune innata como monocitos, macrófagos y otros, se procedió a preparar un gradiente continua de Percoll, utilizando 3 mL de Percoll al 60 % en Falcón de 15mL. Para

purificar las células, se cargaron 1,8 mL de suspensión celular sobre el Percoll utilizando pipeta Pasteur (cuidando de no dañar el gradiente). Los tubos se centrifugaron a 700 xg por 60 min a 20°C. Luego de la centrifugación, se procedió a la recuperación del anillo de células de la línea blanca aspirando con pipeta Pasteur un volumen aproximado de 1 mL de Percoll/células de la línea blanca que se mezcló con 5 mL de medio L-15 AL 10 % SBF en tubos de 15 mL. Posteriormente se centrifugó a 400 xg por 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se repitió el lavado. Finalmente las células se resuspendieron en 1mL L-15 10% SBF. Las células se mantuvieron a 4°C por algunos minutos hasta su utilización.

2.2.4.2.-Desafío en cultivo primario con virus ISA

Para llevar a cabo la infección en cultivo primario de cabeza de riñón de *Salmo salar*, se purificaron previamente las células NK mediante gradiente continuo de percoll y se contaron en cámara de Neubauer, para sembrar 1×10^6 de células x pocillos, en placas de cultivo de 6 pocillos, infectarlas luego con 2 dosis letales TCID₅₀ y TCID₇₀, con sus respectivos controles. Los puntos fueron recolectados a las 24, 48 y 72 h post-infección (figura 5A).

2.2.4.3.- Estandarización de Prolactina

La purificación, estandarización, y confirmación de PRL, se realizó por Soto (2012), con una concentración obtenida de 0,47 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y la actividad de PRL medida, a 500 ng/mL. Datos vitales que fueron obtenidos, para posteriores tratamientos con PRL, PRL + ISAv en células de cultivo primario de riñón anterior de *S.salar*.

2.2.4.4.- Cultivo primario desafiado con PRL

Las células de riñón de riñón, previamente contadas y sembradas se dejaron asentando por 1 hora con PRL a una concentración de 0,47 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con medio L-15 al 2 % SBF + antibiótico, por último se agregó el volumen ya calculado de virus ISAv, a cada uno de los pocillos, con un volumen final de 1 mL por pocillo y desde este momento comenzó a correr el tiempo para recolectar la información a graficar (figura 5B).

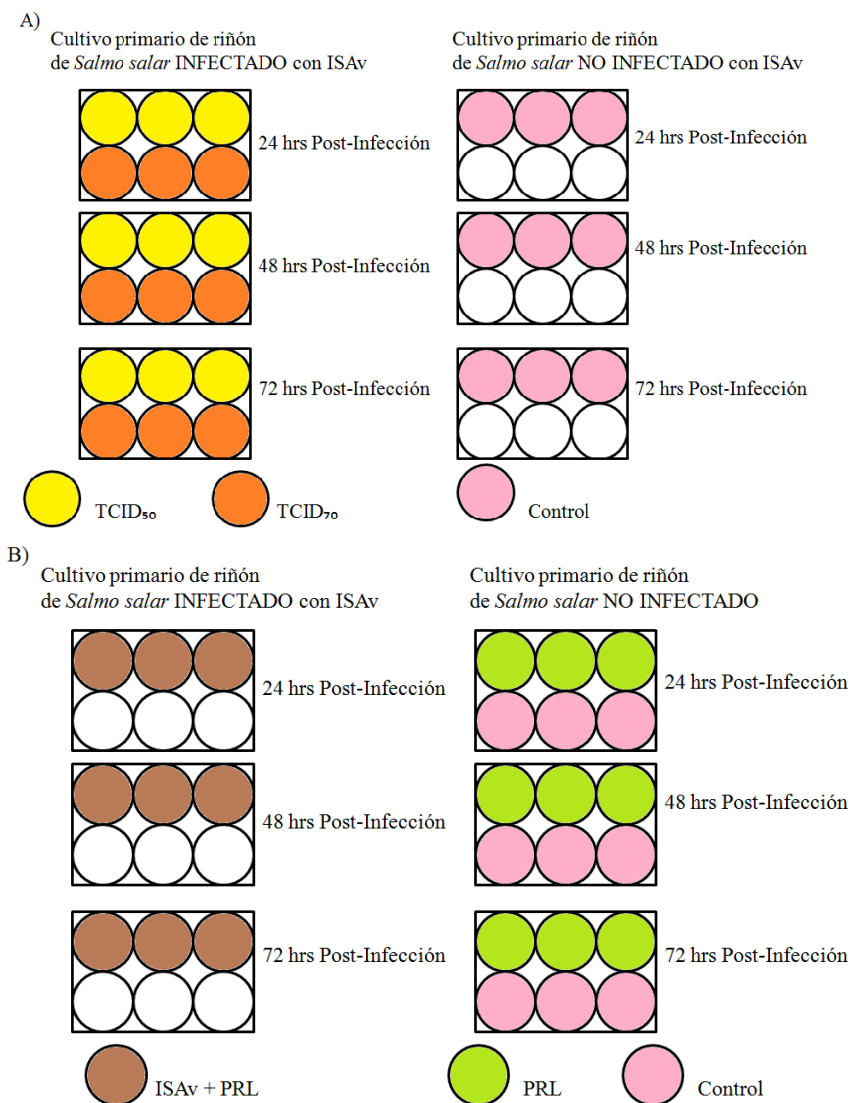


Fig 5. Modelo de experimentación. A) Desafío de cultivo primario de riñón anterior de *S. salar*, infectado con dos dosis letales TCID₅₀ (amarillo) y TCID₇₀ (naranja) a distintos tiempos, con sus respectivos controles (color rosado). B) Desafío de cultivo primario de riñón anterior de *Salmo salar*, tratado con ISAv + prolactina (color café), prolactina (verde), con sus respectivos controles (color rosado) a diferentes tiempos.

2.2.5.- Extracción de RNA de cultivo primario de riñón de *S. salar*

Se extrajo de RNA total desde de riñón anterior, además de la extracción de RNA del cultivo primario de riñón infectado con virus ISA, tratados con PRL, y ISAv + PRL y sus respectivos controles, mediante el método de *Chomezynski* (Chomczynski & Sacchi, 1987). Para llevar a efecto la extracción se procedió a la ejecución de las siguientes etapas, (1) se homogenizó el tejido con 1mL de solución de Chomczynski, (2) se incubó por 5 min a T° ambiente, (3) se agregó 0,2 mL de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, (4) se agitó por inversión, (5) se centrifugó a 12000 xg por 15 min a 4°C, (6) se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril de 1,5 mL a 4°C, (7) se añadió 0,5 mL de Isopropanol + glicógeno 50ug/mL + acetato de amonio 0,5M, (8) se incubó a -20°C toda la noche para favorecer la preparación de RNA, (9) se recuperó el RNA precipitado por centrifugación a 16600 xg durante 12-13 min a 4°C, (10) se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado de RNA con 1mL de alcohol etílico 75%, (11) mezclando por inversión y luego se centrifugó a 16600 xg durante 5 min, (12) se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado al aire por 10 min, (13) se disolvió el precipitado en 80 µL de agua sin nucleasas. Por último se cuantificó el RNA por espectrofotometría a 260/280 y se guardó la preparación a -80°C.

2.2.5.1.- Extracción de RNA de virus en suspensión con Trizol LS.

Se llevó a cabo la extracción de RNA, del virus en suspensión, mediante el reactivo Trizol LS, con el cual se homogenizó la muestra (virus ISA en suspensión), para luego agregar el cloroformo, mezclar vigorosamente y centrifugar al máximo durante 15 min. Una vez terminada la centrifugación, se retiró la fase acuosa superior y transparente, a un tubo Eppendorf de 1,5 mL limpio, se agregó el Isopropanol y se dejó toda la noche a -20°C, al siguiente día se centrifugó el

tubo, para luego el sedimento obtenido ser lavado con etanol al 75%, en último lugar se resuspendió el RNA en agua tratada con DEPC, para su posterior cuantificación.

2.2.5.2.- Obtención de cDNA (RT-PCR)

La transcripción reversa se realizó en un total de 30 μ l de solución de RNA total, pero dividido en dos partes. La primera reacción se efectuó en una mezcla conteniendo 1 μ M de oligo-dT, 10mM de cada dNTP; 5 μ g de RNA y agua libre de nucleasas. Ésta se incubó por 10 minutos a 60°C. Paso seguido se le adicionó la segunda mezcla comprendida de 100 Unidades de transcriptasa reversa (Promega), 4 μ l del tampón de la transcriptasa reversa 5X, 2 Unidades de inhibidor de RNAsa. Como último paso, los 40 μ L de mezcla final se incubaron por 50 minutos a 42°C seguido de 10 minutos a 70°C.

Por consiguiente se procedió a realizar un PCR convencional para β -actina, para comprobar la calidad del cDNA y que esté libre de DNA genómico

2.2.6.-PCR convencional

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 μ L, conteniendo 0.5 unidades de *Taq* DNA polimerasa; 5 μ L de tampón de *Taq* DNA polimerasa 10X; 2 mM de MgCl₂; 10 mM de cada dNTP; 25 μ M de cada partidor, 1 μ L de cDNA y agua DEPC. 25 μ L. La mezcla fue incubada en el termociclador.

2.2.6.1.- PCR Convencional, confirmatorio para ISAv

Se utilizó 5 µL buffer, 1ul dNTPs 10 mM, 2 µL MgCl₂25 mM se toman, cDNA de SHK-1 infectado y sin infectar, agua libre de DNase y RNase, Taq polimerasa 0,2 µL, y por último los partidores para ISAv (Snow. *et al.*, 2006) e IPN (CITAR).

2.2.6.2.- Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa

Los geles se prepararon fundiendo la agarosa necesaria en buffer SB 1X y agregando 4 µL de *Syb safe* 10.000x., se cargaron las muestras en los pocillos tomando 10 µL del producto de PCR, agregando de esta manera un ladder mix, para poder visualizar el tamaño de las bandas, por último se llevó a cabo la corrida electroforética, la cual se realizó a 100 Volt en buffer SB1X. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue expuesto a luz UV en el transiluminador para visualizar los productos de PCR y capturar la imagen digital.

2.2.7.-Partidores

Se diseñaron cuatro juegos de partidores con el fin de amplificar parte del mensajero, los cuales se obtuvieron del banco de datos del NCBI .

Granzima B, se encontró en el banco de datos EST usando como sonda una secuencia de granzima de tilapia (secuencia genómica de la Granzyme B-tilapia TLGR-1). Los partidores específicos para PCR son:

Forward primer 5'- TGGGCCTCGGGAAAGCTGTCA -3'

Reverse primer 5'- GCAGCAAGGCACTTTGTGTCGG -3'

Receptor de IL-12, fue obtenida de un clon de *S. salar*: *ssal-rgf-503-048 receptor de Interleuquina-12 beta-2 chain precursor putative mRNA, complete cDNA*.

Forward primer 5'- ATTGTGCAGCCCTTGCCCCC -3'

Reverse primer 5'- CCTGGTCCCTGGGCGGTTCT -3'

Serglicina, fue obtenida de *S. salar* Serglicina (srgn), mRNA.

Forward primer: 5'- CGGACATGGGGCTCCAGCAA -3'

Reverse primer: 5'- AGCCAGCCTCTTCCGGCACT -3'

FasL, se encontró en el banco de datos EST (NCBI) usando como sonda, FasL de *D. rerio*, y la secuencia que se encontro gracias a una sonda, *S. salar* *Tumor necrosis factor ligand superfamily*, donde se generaron los siguien partidores especificos para PCR.

Forward primer 5'- AGGTCCACAGCCGTCGGTCC -3'

Reverse primer 5'- CTCCAGGAGCCAAGCCCCCT -3'

Virus ISA, partidores de deteccion para ISAv (Snow. *et al.*, 2006)

Forward primer 5'- CTACAGAGCAGGACGCAGATGT-3'

Reverse primer 5'- CAGGAGGCCGGAACCTCGAT-3'

Virus IPN, partidores de deteccion para IPN

Forward primer 5' AAA GCC ATA GCC GCC CAT GAA C 3'

Reverse primer 5' TCT CAT CAG CTG GCC CAG GTA C 3'

2.2.7.1.-Estandarizacion de partidores mediante RT-q PCR

Para realizar el PCR en tiempo real, se utilizó un kit Promega, el cual está compuesto de un mix de PCR, que contiene Taq polimerasa, dNTPs, fluorofororo FAM y cloruro de magnesio. Para luego añadir el cDNA de tejido de cabeza de riñón (1 μ L), partidior *reverse* y *forward* de acuerdo a cada reacción y por ultimo H₂O libre de nucleasas, el contenido total para cada reacción de PCR tiempo real es de 25 μ L. Esto se realizó bajo una cámara de flujo laminar para lograr una máxima esterilidad del PCR, y así evitar que pueda medir la expresión de cualquier agente no deseado, antes de la realización del análisis. Los implementos a utilizar son esterilizados con luz UV durante 15-20 min.

2.2.8.-Análisis de expresión de mecanismos de citotoxicidad y citoquinas involucradas, mediante RT-qPCR

Una vez estandarizados cada uno de los partidores con sus respectivas T_m, se prosigue al análisis de expresión de los mecanismos de citotoxicidad de las NK por RT-q PCR con el kit Promega, el cual está compuesto de un mix de PCR, que contiene Taq polimerasa, dNTPs, fluorofororo FAM y cloruro de magnesio. Para luego añadir el cDNA de cultivo primario de cabeza de riñón de *S. salar* infectado y sin infectar (control) tomando 1 μ L, partidores para INF- γ , TNF- α , FasL, Serglicina, RIL-12, Granzima B, Perforina, por ultimo H₂O libre de nucleasas, el contenido total para cada reacción de PCR tiempo real es de 25 μ L.

3.-RESULTADOS

3.1.-Propagación del virus ISA en la línea celular SHK-1.

La inoculación viral se aplicó en la monocapa confluyente de la línea celular SHK-1, lo cual permitió la observación de la manifestación de la replicación viral del ISAv (figura 6), generando un efecto citopático de la línea celular. Se comenzó a observar placas de lisis al día 18 post-infección, tiempo en el cual el virus comienza a manifestar sus efectos citopático sobre las células, terminando con la lisis celular total de la línea celular SHK-1 al día 25 post-infección.

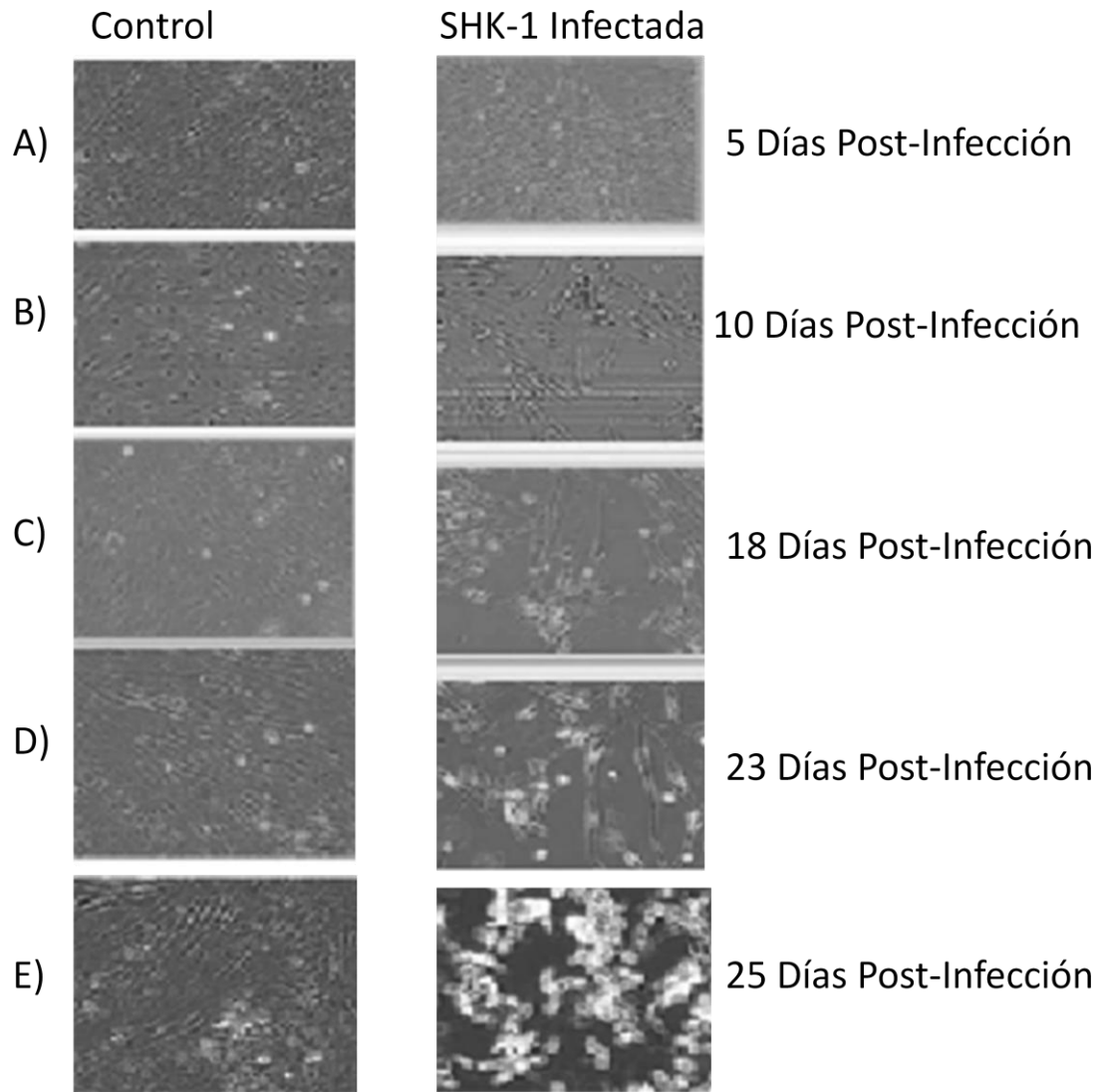


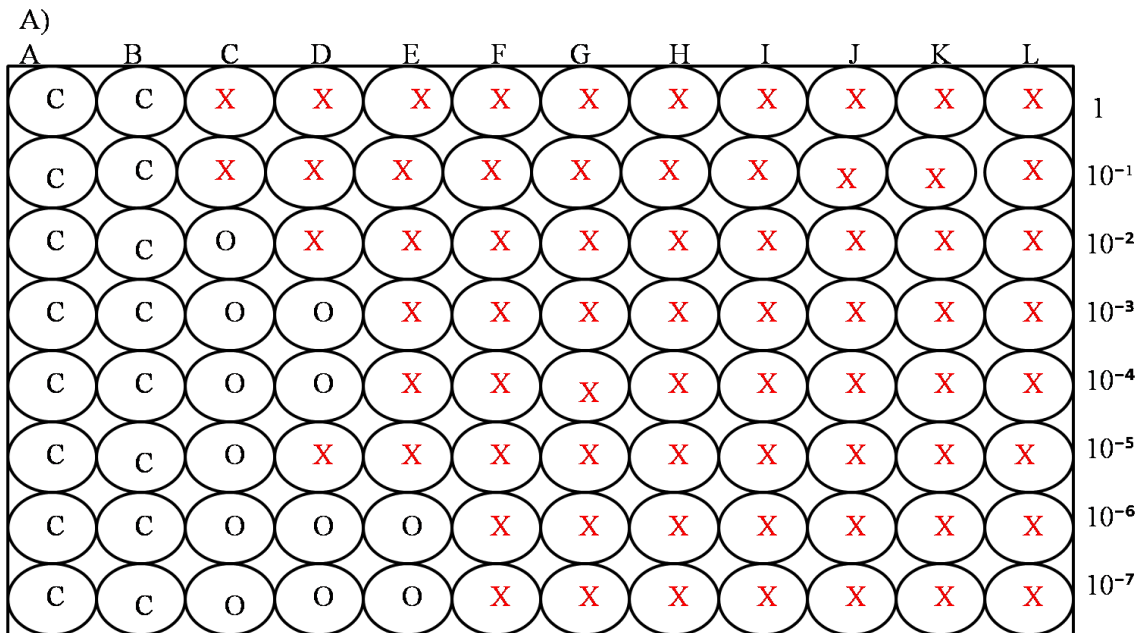
Figura 6: Proceso de infectividad del virus ISA, comparando tanto a la línea celular SHK-1 no infectada (control) como línea celular SHK-1 infectada (ISAv), desde el día 5 post-infección a 25 post-infección, para la observación del efecto citopático (Magnificación 10x).

3.2.- Determinación de la carga viral de ISA v

El título viral del virus ISA, se realizó mediante el método de Reed y Muench, (Navarro, 2004), en el cual se cuantifica la dilución viral en la que el 50 % de la placa celular de 96 pocillos inoculada presenta efecto citopático. TCID₅₀ es una medida que representa la dosis letal en la cual el 50% de la placa celular de 96 pocillos inoculada con el virus ISA presenta efecto citopático (figura 7A, B, C), el cálculo se llevó a cabo mediante una ecuación llamada distancia proporcional.

Entonces la dilución que produce la mortalidad en el 50% de las placas inoculadas es $10^{-6.69}$ y el título viral TCID₅₀ = $10^6 \times 10^{6.69} / 0,1$ mL. Esto significa que se debe diluir 4897788,2 veces la suspensión viral e inocular 0,1 mL para producir la muerte del 50 % de las placas inoculadas (figura 7D).

La cantidad de partículas virales de cada virus dependen única y exclusivamente, de las características intrínsecas de cada virus, es por ello que cada alícuota viral que fue entregada, para llevar a cabo esta tesis, tuvo que ser sometida al cálculo del TCID₅₀, para la determinación de su carga viral. Es por ello que cada alícuota viral posee una carga viral diferente.



B)

Dilución	Células		Frecuencia Acumulada		Total
	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	
10 ⁻¹	10	0	58	0	58
10 ⁻²	9	1	48	1	49
10 ⁻³	8	2	39	3	42
10 ⁻⁴	8	2	31	5	36
10 ⁻⁵	9	1	23	6	29
10 ⁻⁶	7	3	14	9	23
10 ⁻⁷	7	3	7	12	19

C)

Dilución	Razón de efecto citopático	% Efecto citopático
10^{-1}	58:58	100%
10^{-2}	48:49	98%
10^{-3}	39:42	93%
10^{-4}	31:36	86%
10^{-5}	23:29	79%
10^{-6}	24:23	60%
10^{-7}	7:19	37%

D)

$$DP = \frac{79 - 50}{79 - 37} = \frac{29}{42} = 0,69$$

$$(6 + 0,69)(-1) = -6,69$$

$$TCID_{50} = 10^{6,69}$$

$$10^{6,69} TCID_{50} / 0,1 \text{ mL}$$

$$\frac{4.897.788,194}{0,1 \text{ mL}} = \frac{X}{1 \text{ mL}} = 48.977.881,94 \text{ Partículas virales / mL}$$

Figura 7: Etapas de titulación viral. A) placa de cultivo sembrada con 2000 células de la línea celular SHK-1 por c/ pocillo en placa de cultivo de 96 pocillos e inoculada con el virus ISA, para observar el efecto citopático en cada uno de los pocillos, (O) células sin efecto citopático y (X) células que presentan efecto citopático .B) tabla que representa la frecuencia acumulada, para cuantificar los pocillos con efecto citopático y los que no presentan efecto citopático. C) representa la razón del efecto citopático para cada una de las diluciones. D) ecuación de la distancia proporcional.

3.3.- Análisis de la calidad del cDNA de células NK de salmón

Para llevar a cabo la estandarización de los partidores en PCR convencional, se tuvo que verificar la calidad del cDNA obtenido. Para ello, se realizó, un PCR convencional para β -actina cuyo producto de PCR tiene un tamaño de 467 pb, el cual se encuentra libre de DNA genómico. En el caso de tener DNA genómico contaminante en la muestra se obtiene un producto de tamaño mayor al del cDNA (aproximadamente 1600 pb). Este método permite verificar que el cDNA de cabeza de riñón de *S. salar* (figura 8), está libre de DNA genómico y está en óptimas condiciones para la posterior estandarización de partidores, tanto en PCR convencional como PCR de tiempo real.

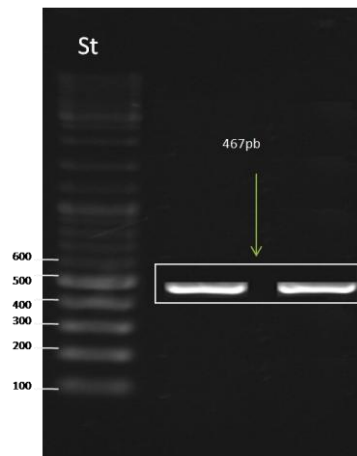


Figura 8: Análisis electroforético de PCR para verificar la calidad del cDNA, de cabeza de riñón de *Salmo salar* usando β -actina como gen blanco, con un producto esperado de 467pb, con una temperatura de *annealing* de 58°C.

3.4.-PCR convencional para estandarizar partidores

Análisis de PCR en gradiente para la estandarización de partidores. Se realizaron distintas reacciones de PCR para cada uno de los genes estandarizados con cDNA de riñón anterior. Tal como se muestra en la Tabla 1, el listado de cada uno de los partidores utilizados en la presente tesis, con sus respectivas secuencias y los tamaños esperados (medidos como pares de bases), para cada uno de ellos.

El primer marcador que se analizó fue FasL, involucrado en el mecanismo de citotoxicidad vía FasL para la destrucción de la célula diana (figura 9A). Tal como se muestra en la figura, se obtuvo un producto de PCR esperado de 120 pb a una temperatura de apareamiento de partidores (*annealing*) de 64°C. Se utilizó un control negativo (templado de agua tratada con DEPC) en todos los casos (figura 9A, B,C,D), para descartar cualquier tipo de contaminación en la reacción de PCR.

El segundo marcador que se estandarizó fue Granzima B, involucrado en el mecanismo de citotoxicidad vía dependiente granzima-perforina para la destrucción de la célula diana, muestra una banda de 193 pb, al igual que producto específico de variados tamaños, mostrado en la (figura 9 B), con una temperatura de *annealing* escogida de 67°C.

El siguiente marcador que se estandarizó fue RIL-12, que con el juego de partidores diseñados, origina un producto único de 128 pb, a una temperatura de *annealing* de 64°C, mostrado en la (figura 9C).

Para el caso de la estandarización del marcador serglicina, que funciona como transportador o *carrier* para perforina y granzima, origina un producto de PCR esperado de 167pb, con una temperatura de apareamiento de los partidores de 64°C, mostrado en la (figura 9D).

El resto de los marcadores, tales como TNF- α , IFN- γ , Perforina, fueron previamente estandarizados, en la tesis de doctorado de Haussman, (2011). Por último los marcadores para ISAv, fueron estandarizados en el paper (Snow *et al*,2006).

Nombre	Secuencias Primer	Tamaño Producto (pb)
Granzima B	Forward 5' - TGGGCCTCGGGAAAGCTGTCA - 3' Reverse 5' - GCAGCAAGGCACTTTGTGTCCG - 3'	193
Fas-L	Forward 5' - AGGTCCACAGCCGTCCGGTCC - 3' Reverse 5' - CTCCAGGAGCCAAGCCCCCT - 3'	120
RIL-12	Forward 5' - ATTGTGCAGCCCTTGCCCCC - 3' Reverse 5' - CCTGGTCCTGGGCGGTTCT - 3'	128
Serglicina	Forward 5' - CGGACATGGGGCTCCAGCAA - 3' Reverse 5' - AGCCAGCCTCTTCCGGCACT - 3'	167
Perforina	Forward 5' - CTGCCCACCACCAACCCAGC - 3' Reverse 5' - TCCCCACAGGTTGGCCCCTC - 3'	240
TNF- α	Forward 5' - TGGCCCGGGCGAGAATACCA - 3' Reverse 5' - CCCTGCTCTGGCTCCACGTT - 3'	246
IFN - γ	Forward 5' - GTTACCGTACACCGATTGAG - 3' Reverse 5' - TCACTGCCTCAAACGTGTC - 3'	108
ISAv	Forward 5' - CTACAGAGCAGGACGCAGATGT - 3' Reverse 5' - CAGGAGCCGGAACCTCGAT - 3'	104
IPN	Forward 5' - AAAGCCATAGCCGCCCATGAA - 3' Reverse 5' - TCTCATCAGCTGGCCCAGGTA - 3'	174

Tabla 1: lista de partidores para el analisis de expresión de los mecanismos de citotoxicidad de las células NK. En la tabla se detalla la secuencia y el tamaño molecular esperado.

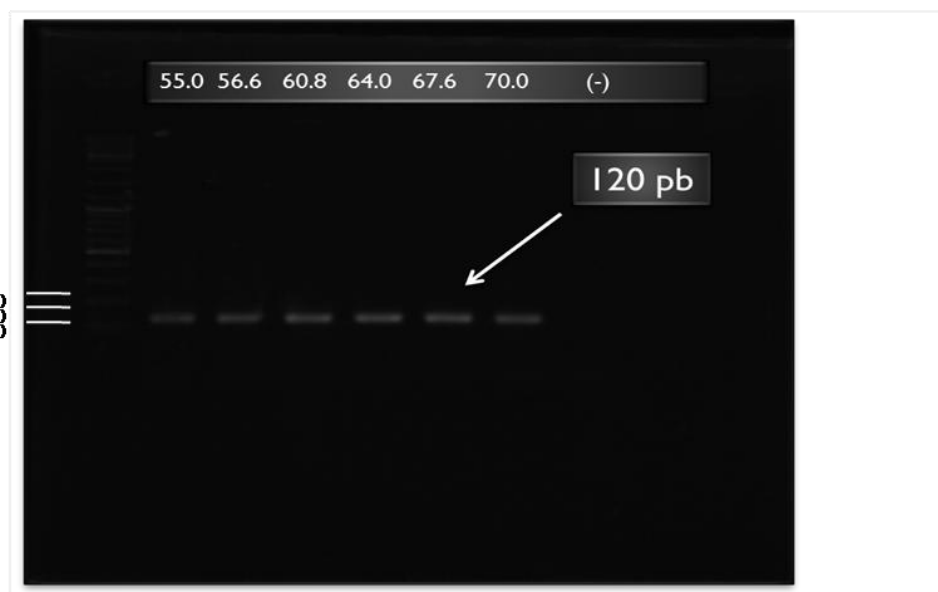


Figura 9A: Optimización de la temperatura de apareamiento de los partidores para FasL. Se observaron los productos de PCR obtenidos para FasL, utilizando distintas temperaturas de apareamiento detalladas en el gel. Se destaca el producto 120 pb generado y la temperatura de apareamiento elegida.

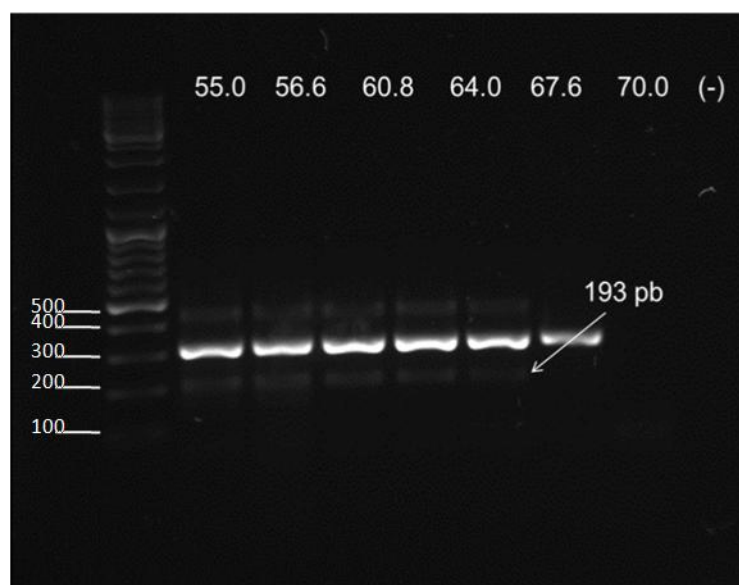


Figura 9B: Optimización de la temperatura de apareamiento de los partidores para Granzima B, Se observaron los productos de PCR obtenidos para Granzima B, utilizando distintas temperaturas de apareamiento detalladas en el gel. Se destaca el producto 193 pb generado y la temperatura de apareamiento elegida.

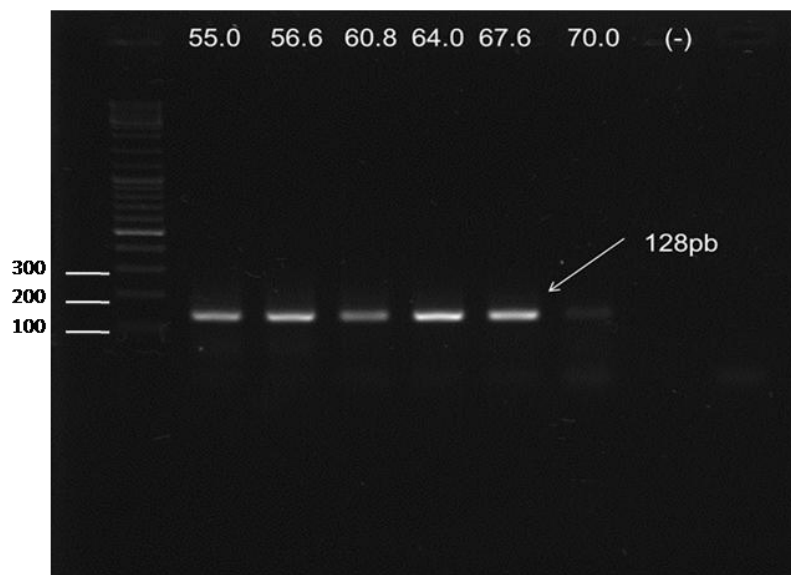


Figura 9C: Optimización de la temperatura de apareamiento de los partidores contra RIL-12, Se observaron los productos de PCR obtenidos para RIL-12, utilizando distintas temperaturas de apareamiento detalladas en el gel. Se destaca el producto de 128 pb generado y la temperatura de apareamiento elegida.

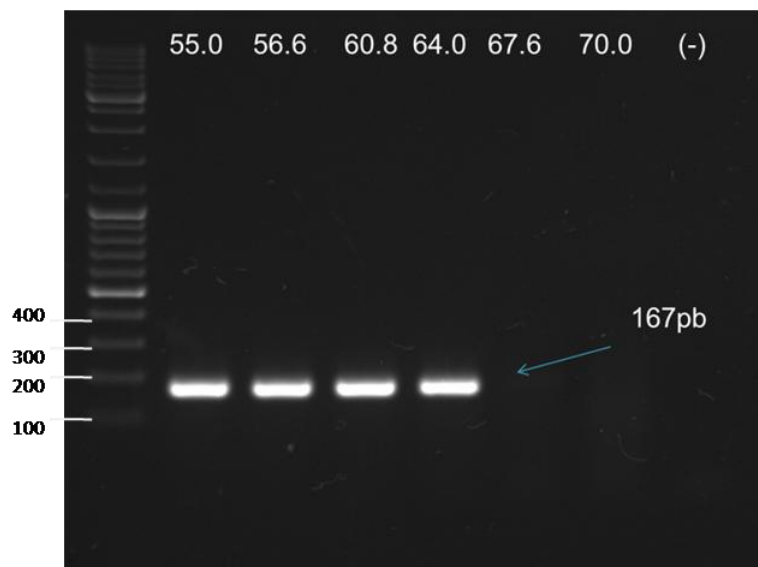


Figura 9D: Optimización de la temperatura de apareamiento de los partidores para Serglicina, Se observaron los productos de PCR obtenidos para Serglicina, utilizando distintas temperaturas de apareamiento detalladas en el gel. Se destaca el producto 167 pb esperado y la temperatura de apareamiento elegida.

3.4.1.-Evaluación de partidores para qPCR

La evaluación de expresión de los genes INF- γ , TNF- α , Perforina, FasL, RIL-12, Serglicina, se llevó a cabo mediante PCR tiempo real. Para su análisis se diseñaron diversos partidores, tales para genes blanco como INF- γ , TNF- α , Perforina, FasL, RIL-12, Serglicina (ver materiales y métodos), los cuales fueron estandarizados por RT-qPCR, obteniéndose un producto único para cada uno ellos y la ausencia de dimerización de los partidores (figura 10 A, B, C, D, E, F), en el caso del gen Granzima B no fue analizado por PCR tiempo real, debido a la presencia de producto inespecífico al momento de hacer la estandarización por PCR convencional (figura 9B).

En la figura 10 A, B, C, D, E, F, se observa solo una curva de disociación para cada uno de los partidores antes mencionados, mostrando un único peak de amplificación y su respectiva temperatura de *melting*. El control negativo no muestra peak de fluorescencia lo cual indica que no existe dimerización de los partidores. La temperatura de *melting* correspondiente para cada uno de los partidores es la siguiente: Serglicina con una temperatura de *melting* de 64°C, mostrado en la (figura 10A), FasL de 64°C mostrado en la (figura 10B), RIL-12 de 64°C mostrado en la (figura 10C), INF- γ de 56°C mostrado en la (figura 10 D), Perforina de 68°C mostrado en la (figura 10E), y por ultimo TNF- α de 63°C mostrado en la (figura 10E), cada uno de los genes con sus respectivas temperaturas de *melting* correspondientes.

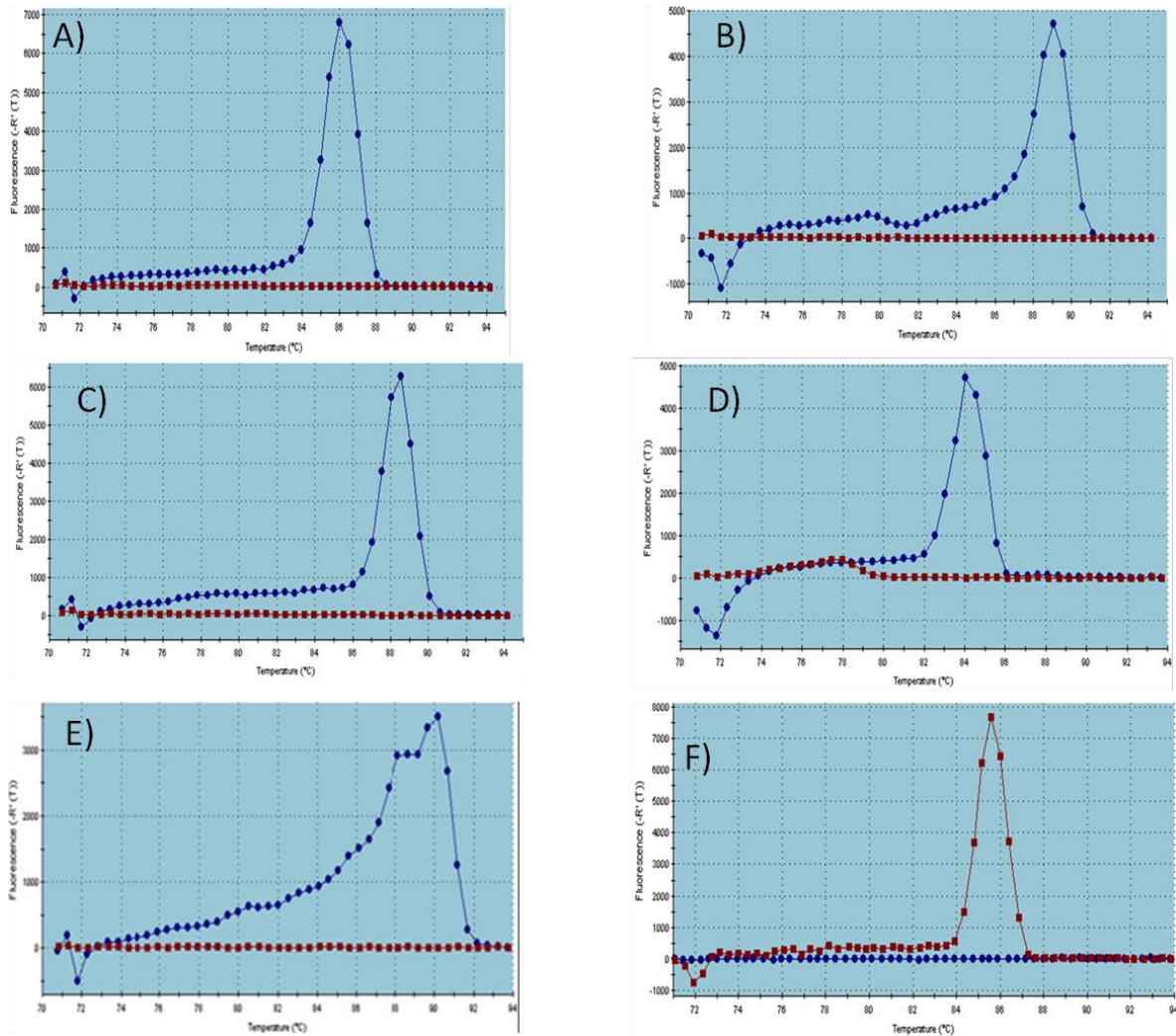


Figura 10: Curva de disociación para cada uno de los partidos por qPCR. En azul se muestra el pick para cada una de las amplificaciones y en rojo el control negativo, con excepción de la figura F, que en rojo muestra el Peak de fluorescencia y en azul el control negativo. A) Expresión de Serglicina, B) Expresión de FasL. C) Expresión de RIL-12, D) Expresión de IFN γ . E) Expresión de Perforina. F) Expresión de TNF- α .

3.5.- PCR confirmatorio de ISAv

Para corroborar que realmente la alícuota entregada de virus tenía efectivamente ISAv, y no existía contaminación cruzada con otro virus como IPN, se llevó tal verificación mediante un PCR convencional, para confirmar la presencia del virus en las muestras de cDNA de la línea celular SHK-1 en la cual el virus fue propagado. Paralelamente, se hizo un PCR confirmatorio directamente a partir de las partículas virales en suspensión, de la alícuota viral original.

Se analizó el gen de ISAv, para corroborar la presencia del ISAv en las muestras de cDNA de SHK-1 (figura 11), se obtuvo un producto único de 104 pb a una temperatura de *annealing* de 60°C. Se utilizó como control positivo (templado plasmidial de ISAv) y como control negativo (templado de agua tratada con DEPC). El resultado fue favorable (negativo), ya que al momento de llevar a cabo el PCR, este no amplificó para la muestras de cDNA de SHK-1 infectado con ISAv.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para la muestra de cDNA a partir de partículas virales en suspensión, resultado que dio positivo para ISAv ya que hubo amplificación del producto esperado, para los partidores de ISAv. Con respecto al virus IPN no hubo amplificación del producto esperado en la muestra de cDNA de partículas virales en suspensión (figura 12), esto indicaría que cada uno de los experimentos que se llevaron a cabo en el presente trabajo, fueron realizador con el virus ISA.

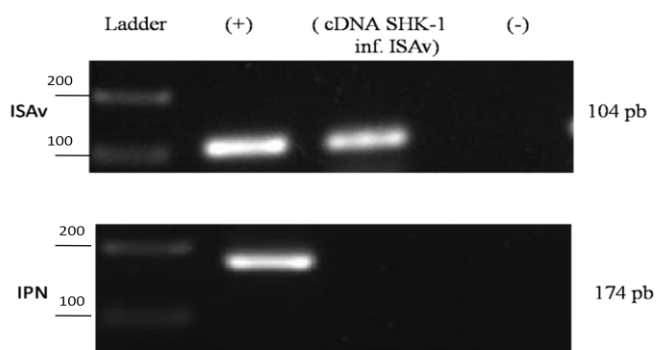


Figura 11: PCR convencional confirmatorio para ISAv en células SHK-1 infectadas con ISAv. Se observó el producto de PCR obtenido para ISAv, utilizando una temperatura de apareamiento de 60°C. Se destaca un producto esperado de 104 pb, y para IPNv solo amplifica el control (+), para las muestra de cDNA de SHK-1 infectada con ISAv.

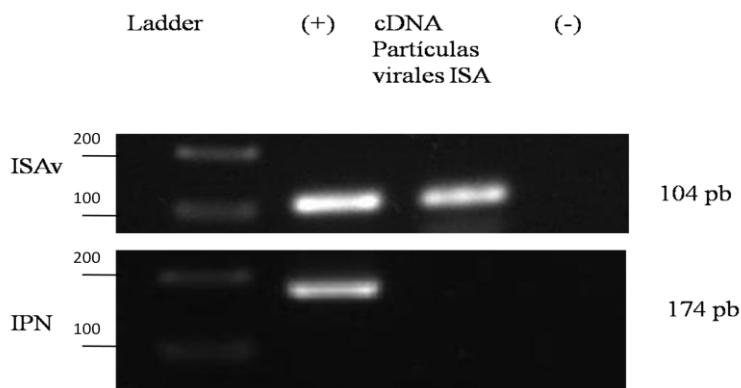


Figura 12: PCR convencional confirmatorio para partículas virales en suspensión de ISAv. Se observó el producto de PCR obtenido para ISAv, utilizando una temperatura de apareamiento de 60°C. Se destaca un producto esperado de 104 pb, y para IPN solo amplifica el control (+), para las muestra de cDNA de partículas virales en suspensión.

3.6.- Estandarización de Prolactina

La purificación, estandarización, y confirmación de PRL, se realizó en la tesis de Soto (2012), con una concentración obtenida de 0,47 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y la actividad de PRL medida a 500 ng/mL. Datos vitales que fueron obtenidos, para posteriores desafíos con PRL, para medir su capacidad inmunomoduladora mediante qPCR en células de cultivo primario de cabeza de riñón de *S.salar* infectadas con ISAv, y desafiadas con PRL.

3.7.- Evaluación cuantitativa de la expresión genes involucrados en citotoxicidad de las células NK de salmón, sanas e infectadas con ISAv, mediante RT-qPCR

La expresión de los genes de Serglycina, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, Perforina, RIL-12 y FasL, se llevó a cabo mediante una cinética a 24, 48 y 72 h post-Infección, en células NK obtenidas a partir del cultivo primario de riñón anterior de *S. salar* sanas e infectadas con ISAv. Al mismo tiempo se evaluó mediante qPCR la expresión relativa de estos genes en cultivos tratados con prolactina, en células infectadas con ISAv + PRL, células tratadas con PRL, y los respectivos controles, los cuales se evaluaron mediante la fórmula:

$$2^{\Delta\text{ct}} (\text{ct muestra}-\text{ct normalizador})$$

De esta manera se pudo calcular la relación entre la expresión relativa al normalizador β -actina, para cada una de las muestras de cDNA de cultivo primario, en células sanas e infectadas con ISAv, al igual que las muestras incubadas con PRL y así observar si aumenta o disminuye la expresión, comparando las condiciones—células incubadas con ISAv, PRL, ISAv + PRL, y células sin infectar, esto se aplicó para cada uno de los genes en estudio.

Una vez obtenidos los resultados de la formula, se graficó la expresión relativa al normalizador en la ordenada y en la abscisa los tiempos post-infección con sus respectivas condiciones. Este cálculo se llevó a cabo con un n=3muestras de cDNA por cada gen. Los desafíos con ISAv se efectuaron, con 2 dosis letales, la primera a $10^{6.69}$ TCID₅₀/mL y la segunda dosis fue de $10^{6.99}$ TCID₇₀/mL.

Los análisis de expresión indican que existe una expresión superior en las muestras desafiadas con la segunda dosis letal, mostrados en las figura 13A, 14A, 15A, 16A, 17A, 18A, 19A. Por consiguiente los análisis de expresión relativa, se realizaron, en base a los desafíos con ISAv con una dosis letal TCID₇₀, debido a la mayor expresión obtenida con tal dosis.

Para el caso de la cuantificación de la expresión relativa de Perforina, se observó que hay amplificación del producto esperado en todos los casos analizados. Específicamente, es notorio el mayor nivel de transcritos para Perforina en el caso de la dosis TCID₇₀ a las 24 h post-infección (figura 13A), lo que da cuenta de un aumento de la expresión a las 24 h de infección. Por su parte, a los otros tiempos, no se alcanzó similares niveles de transcrito, pero tanto a las 48 como a las 72 h, se alcanzó siempre un mayor nivel con la dosis TCID₇₀ por sobre la TCID₅₀.

Respecto a la medición de los niveles de transcritos en cultivo primario tratados solo con PRL, PRL + ISAv a los diferentes tiempos post-infección, la figura 13B muestra claramente que PRL tiene un claro efecto estimulador para el gen de Perforina en la infección experimental con virus ISA que comienza a manifestarse a las 24 h y alcanza su máximo a las 48 h. Posteriormente a las 72 h, el efecto sinérgico de PRL e ISAv decae drásticamente en comparación con el control de células tratadas solo con PRL.

En relación al caso de la cuantificación de la expresión relativa de Serglicina, se observó amplificación de los productos esperados en todos los casos analizados. Específicamente, es notorio el mayor nivel de transcritos para Serglicina en el caso de la dosis TCID₇₀ a las 24 y 48 h post-infección (figura 14A). Por su parte, el último tiempo, no se alcanzó similares niveles de transcrito, pero a las 72 h, se alcanzó siempre un mayor nivel con la dosis TCID₇₀ por sobre la TCID₅₀ (figura 14A).

En referencia a la medición de los niveles de transcritos en cultivo primario tratados solo con PRL y PRL + ISAv a los diferentes tiempos post-infección, la figura 14B muestra claramente que PRL tiene un claro efecto estimulador para el gen de Serglicina en la infección experimental con virus ISA que tiene su máximo de expresión a las 24 h. Posteriormente a las 48 y 72 h, el efecto sinérgico de PRL e ISAv decae drásticamente comparativamente con el control de células tratadas sólo con PRL.

En cuanto a la cuantificación de la expresión relativa de FasL, se observó que hay amplificación del producto esperado en todos los casos analizados. Específicamente, es notorio el mayor nivel de transcritos para FasL en el caso de la dosis TCID₇₀ a las 48 h post-infección (figura 15A). Por su parte, a los otros tiempos, no se alcanzó similares niveles de transcrito, pero tanto a las 24 como a las 72 h, se alcanzó siempre un mayor nivel con la dosis TCID₇₀ por sobre la TCID₅₀ (figura 15A).

En lo que respecta a la medición de los niveles de transcritos en cultivo primario tratados solo con PRL, PRL + ISAv a los diferentes tiempos post-infección, la figura 15B muestra claramente que PRL tiene un claro efecto estimulador para el gen de FasL a las 24 y 72 h tratadas con PRL, para el caso de las células de cultivo tratadas con PRL y con virus ISA, existe una baja expresión

del transcrito, desde las 24 a las 72 h de la infección comparativamente con el control de células tratadas solo con PRL (figura 15B).

En lo relativo a la cuantificación de la expresión de $IFN\gamma$, se observó que hay amplificación del producto esperado en todos los casos analizados. Específicamente, es notorio el mayor nivel de transcritos para $IFN\gamma$ en el caso de la dosis $TCID_{70}$ a las 48 h post-infección (figura 16A). Por su parte, a los otros tiempos, no se alcanzó similares niveles de transcrito, pero tanto a las 24 como a las 72 h, se alcanzó siempre un mayor nivel con la dosis $TCID_{70}$ por sobre la $TCID_{50}$ (figura 16A).

Por consiguiente a la medición de los niveles de transcritos en cultivo primario tratados solo con PRL, PRL + ISAv a los diferentes tiempos post-infección, la figura 16B muestra claramente que PRL tiene un claro efecto estimulador para el gen de $IFN\gamma$ en la infección experimental con virus ISA que alcanza su máximo a las 24 h. Posteriormente a las 48 y 72 h, el efecto sinérgico de PRL e ISAv decae drásticamente en comparación con el control de células tratadas solo con PRL.

De este modo, la cuantificación de la expresión relativa de RIL-2, se observó que hay amplificación del producto esperado en todos los casos analizados. Específicamente, es notorio el mayor nivel de transcritos para RIL-2 en el caso de la dosis $TCID_{70}$ a las 48 y 72 h post-infección (figura 17A). Por su parte, a las 24 h, no se alcanzó similares niveles de transcrito, pero tanto a las 24 h, se alcanzó siempre un mayor nivel con la dosis $TCID_{70}$ por sobre la $TCID_{50}$ (figura 17A).

Respecto a la medición de los niveles de transcritos en cultivo primario tratados solo con PRL, PRL + ISAv a los diferentes tiempos post-infección, la figura 17B muestra claramente que PRL tiene un claro efecto estimulador para el gen de RIL-2 en la infección experimental con virus ISA que comienza a manifestarse a las 24 h y alcanza su máximo a las 48 h. Posteriormente a las 72 h,

el efecto sinérgico de PRL e ISAv decae drásticamente comparativamente con el control de células tratadas solo con PRL.

Por último, para el caso de la cuantificación de la expresión relativa de $TNF\alpha$, se observó que hay amplificación del producto esperado en todos los casos analizados. Específicamente, es notorio el mayor nivel de transcritos para $TNF\alpha$ en el caso de la dosis $TCID_{70}$ a las 48 h post-infección (figura 18A). Por su parte, a los otros tiempos, no se alcanzó similares niveles de transcrito, pero tanto a las 24 como a las 72 h, se alcanzó siempre un mayor nivel con la dosis $TCID_{70}$ por sobre la $TCID_{50}$ (figura 18A).

En referencia a la medición de los niveles de transcritos en cultivo primario tratados solo con PRL, PRL + ISAv a los diferentes tiempos post-infección, la figura 18B muestra claramente que PRL tiene un claro efecto estimulador para el gen de $TNF\alpha$ en la infección experimental con virus ISA que comienza a manifestarse a las 24 h y alcanza su máximo a las 48 h. Posteriormente a las 72 h, el efecto sinérgico de PRL e ISAv decae drásticamente comparativamente con el control de células tratadas solo con PRL.

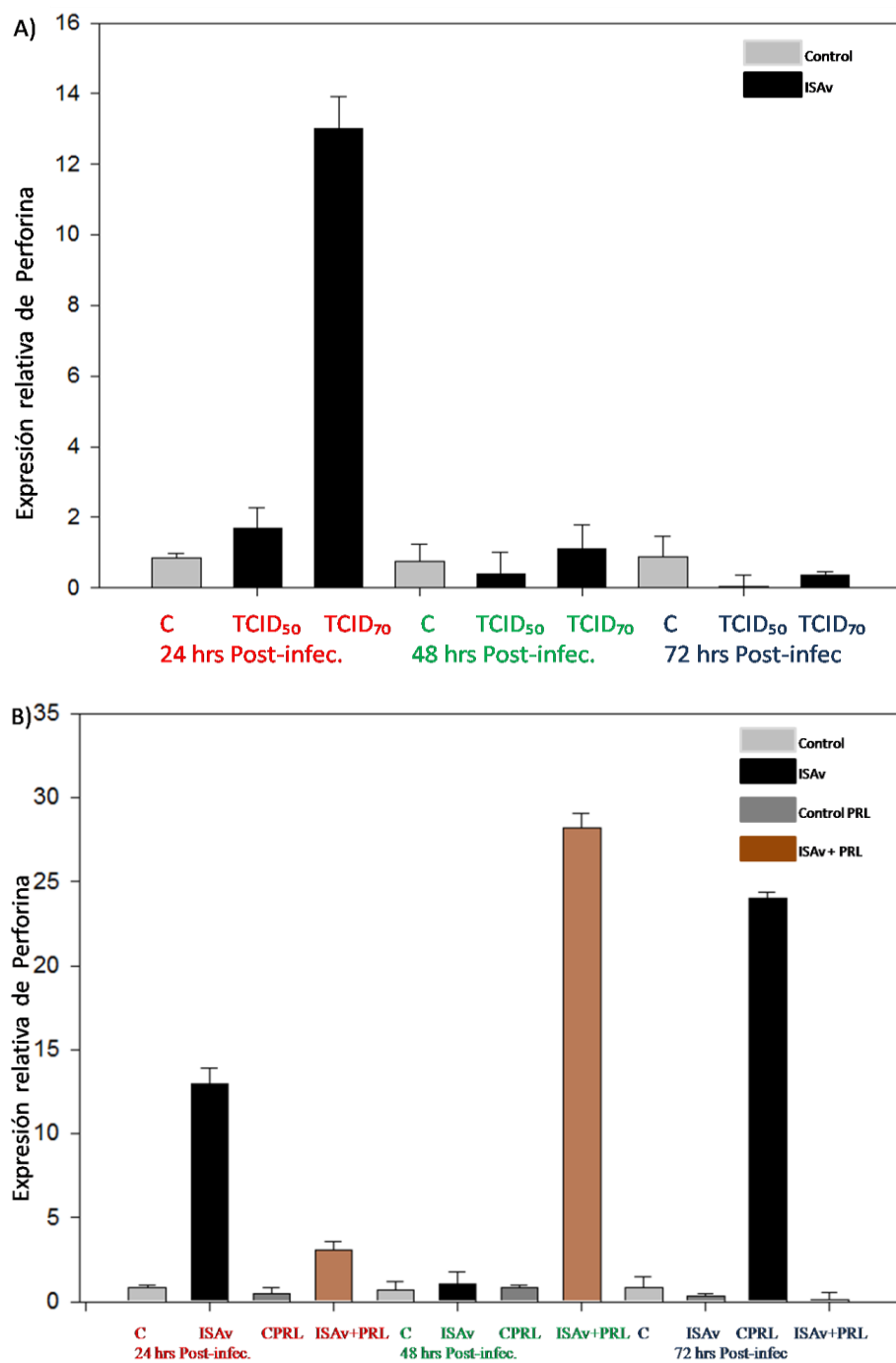


Figura 13: Cinética de expresión relativa de perforina. A) En negro se observa la expresión de las células infectadas con ISAv a dos dosis letales diferentes, con sus respectivos controles en color plomo, a 3 diferentes tiempo post-infección. B) En café se observa la expresión de células tratadas con PRL, ISAv +PRL, y sus respectivos controles, a 3 tiempos post-infección.

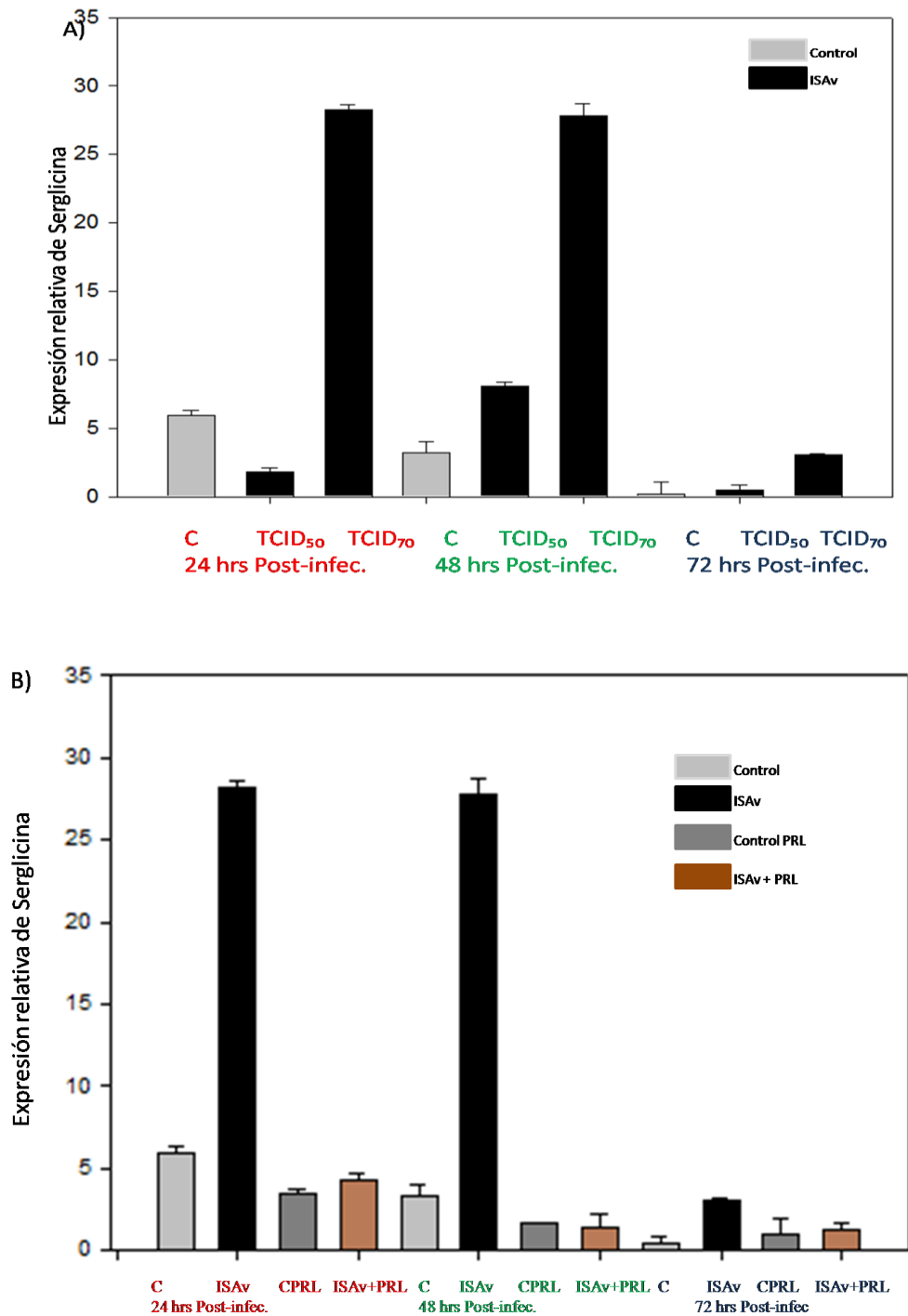


Figura 14: Cinética de expresión relativa de Serglycina. A) El cambio de color de las barras, indica la expresión diferencial para células sanas e infectadas con ISAv, a distintos tiempos. B) Las barras de color café indican la expresión diferencial de las células desafiadas con ISAv + PRL, plomo oscuro células incubadas con PRL, y sus respectivos controles, a diferentes tiempos.

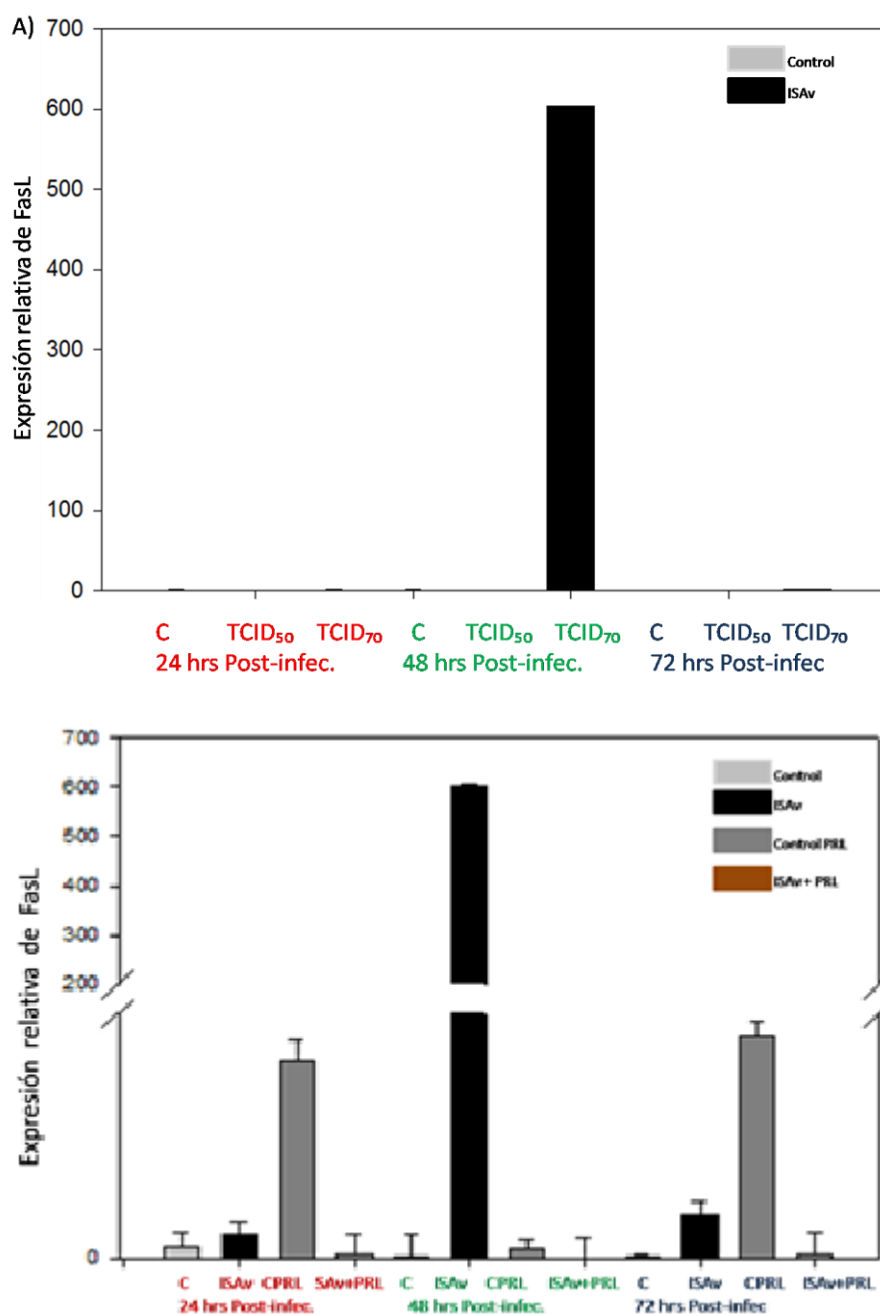


Figura 15: Cinética de expresión relativa de FasL. A) La ausencia de las barras indica falta de expresión, y la barra de color negro indica las células incubadas con ISAv, a 3 diferentes tiempos post-Infección. B) Expresión de FasL tratadas con PRL, ISAv +PRL, y sus respectivos controles, a diferentes tiempos post-Infección.

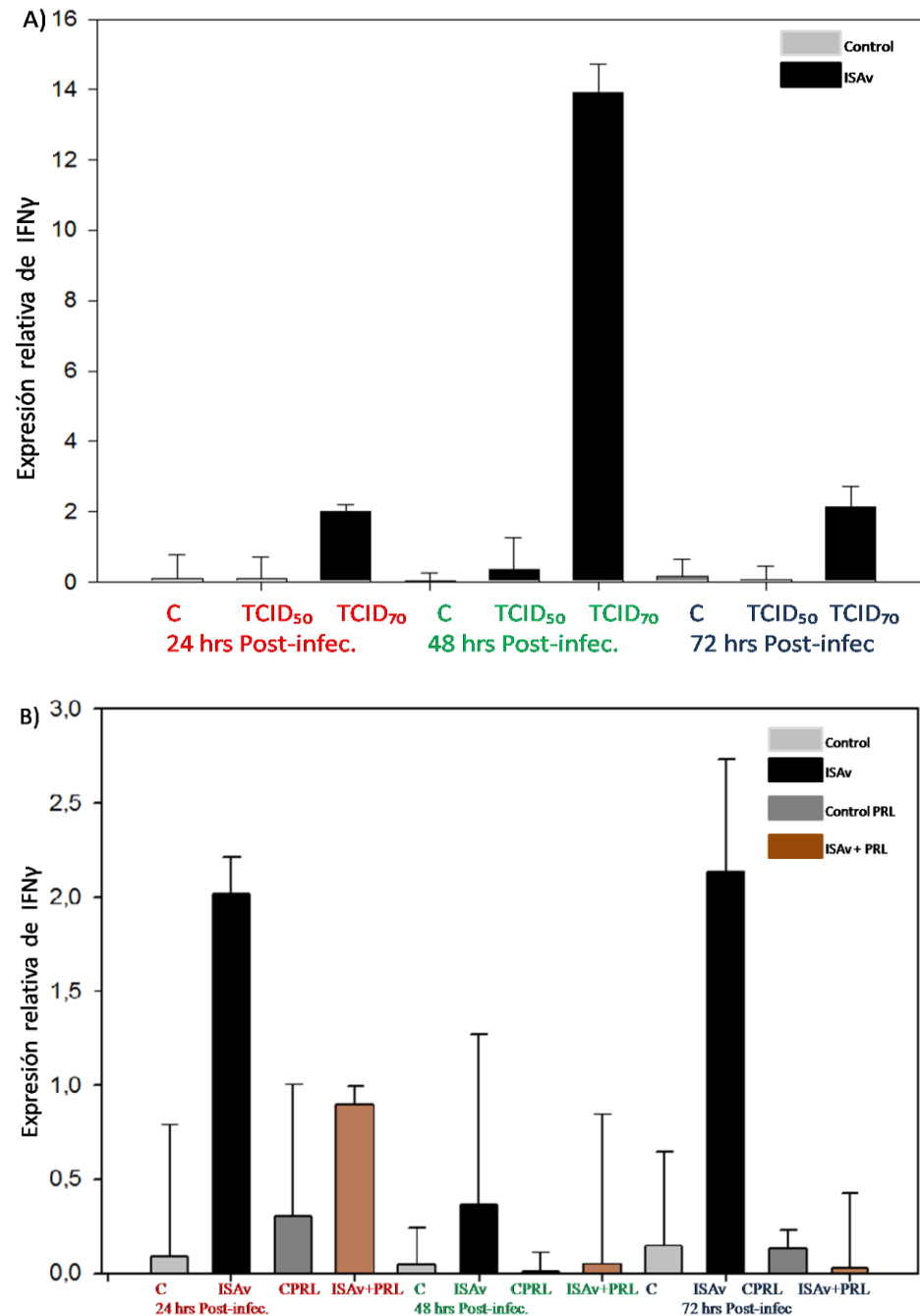


Figura 16: Cinética de expresión relativa de IFN- γ . A) El cambio de color de las barras, indica la expresión diferencial para células sanas (plomo) e infectadas con ISAv (negro), a distintos tiempos, B) Las barras de color café indican la expresión diferencial de las células desafiadas con ISAv+PRL, plomo oscuro células desafiadas con PRL, y sus respectivos controles, a diferentes tiempos.

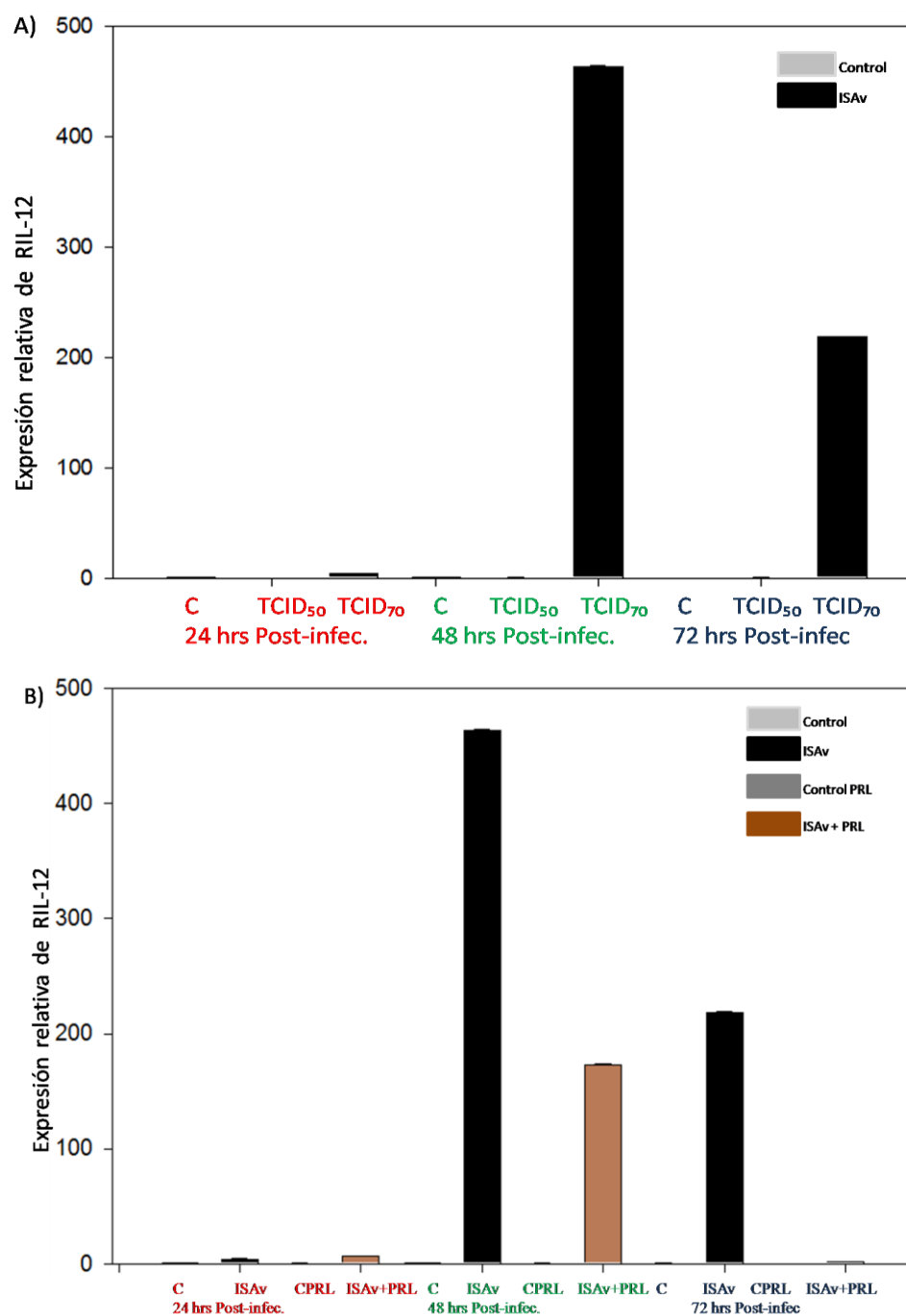


Figura 17: Cinética de expresión relativa de RIL-12.A) El cambio de color de las barras, indica la expresión diferencial para células sanas (barras color plomo) e infectadas con ISAv (barras en negro), a distintos tiempos. B) Las barras de color café indican la expresión diferencial de las células incubadas con ISAv + PRL, en plomo células tratadas con PRL, y sus respectivos controles, a diferentes tiempos.

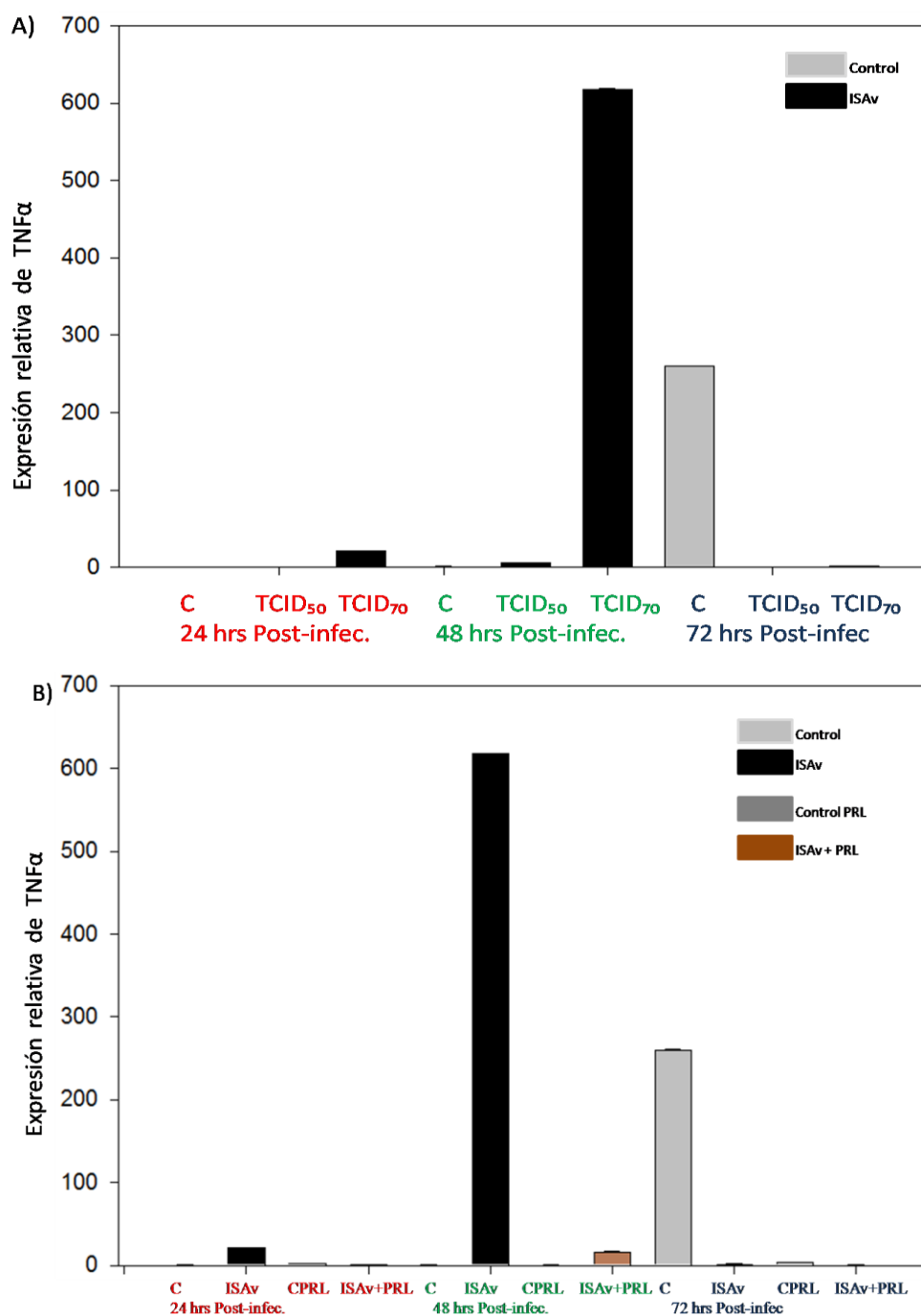


Figura 18: Cinética de expresión relativa de TNF- α . A) El cambio de color de las barras, indica la expresión diferencial para células sanas (barras en plomo) e infectadas con ISAv (barras en negro), a distintos tiempos. B) Las barras de color café indican la expresión diferencial de las células incubadas con ISAv + PRL, plomo oscuro células incubadas con PRL y sus respectivos controles, a diferentes tiempos.

4.-DISCUSIÓN

El sistema inmune innato en peces ha sido estudiado recientemente, en comparación al sistema inmune de los mamíferos. Debido a ello, se han suscitado una infinidad de interrogantes, sin embargo, en los últimos años el estudio del sistema inmune de peces ha cobrado gran importancia, debido al interés económico que ha surgido, a raíz de las empresas salmoneras a lo largo de Chile y el mundo.

Las células *natural killer* de mamíferos, se conocen desde la década de los 70, se identificó la primera población de células con actividad citotóxica (Kiessling *et al.*, 1975). Hoy en día se conocen las células NK, y se han estudiado por su gran relevancia en el sistema inmune innato. En peces, recién en el año 1984, el grupo de Evans y colaboradores descubrió una población de células con actividad citotóxica, denominada NCCs (células citotóxicas no específicas), contraparte de las células NK de mamíferos (Evans *et al.*, 1984). Las células NK de mamíferos tiene la función de reconocer y destruir células tumorales, células infectadas por virus, y parásitos (Trinchieri, 1989; Biron *et al.*, 1999). Para ello requiere de una gran cantidad de receptores involucrados con mecanismo citotóxicos y expresión de citoquinas, para provocar la destrucción de la célula diana (Bryceson *et al.*, 2011).

4.1.- Expresión de mediadores de citotoxicidad en peces sanos y desafiados con ISAv

4.1.1.- Granzima y perforina, como ya es sabido estas proteínas, se encuentran en los gránulos secretorios de las células NK. Forman un complejo entre perforina, granzima B y una proteína de alto peso molecular llamada serglicina (Raja *et al.*, 2003), las que son liberadas al espacio

extracelular cuando las células NK reconocen a la célula diana. Una vez que estas proteínas son liberadas, son endocitadas por la célula diana, formando una vacuola endocítica (Libermann, 2003). Debido al pH ácido de estas vacuolas, perforina desestabiliza la membrana endocítica, formando un poro, permitiendo el ingreso de granzima B, y Serglycina, hacia el citosol. Una vez dentro, se activa la vía dependiente de la caspasas, y posterior apoptosis de la célula diana (Libermann, 2003).

Estas células fueron evaluadas por su mecanismo de citotoxicidad, en cultivo primario de riñón de *Salmo salar*, infectadas con el virus ISA, y sus respectivos controles. El resultado de ella, fue positivos para perforina, serglycina y negativas para granzima B. Una explicación del resultado negativo de granzima B, es debida a que la secuencia de los partidores, encontrados en banco de datos EST, al momento de llevar a cabo el PCR convencional, para determinar las Tm de los partidores, mostraron producto inespecífico.

Para el caso, de Perforina, se observa un aumento significativo de su expresión en 11 veces, en células de cabeza de riñón infectadas con ISAv, de forma significativa, a las primeras 24 h post-infección, con respecto a los controles, con el paso del tiempo, esta expresión disminuye 12 veces. En segundo lugar, Serglycina, muestra un aumento de la expresión en 18 veces, en células de cabeza de riñón infectadas con ISAv, de forma significativa, a las 24 y 48 h post-infección, con respecto a los controles, para luego disminuir de forma significativa. Esto se relaciona, con los mecanismos de citotoxicidad mediado por perforina, debido a que serglycina actúa como un transportador o carrier de perforina, cuando las células NK, reconocen a la célula diana, este complejo es liberado hacia el espacio extracelular, y así generar su efecto citotóxico sobre la célula diana. Esto se vincularía, con la expresión de forma significativa a las 24 h post-infección de Perforina, para luego disminuir de forma considerable. Algo similar ocurrido con el resultado

positivo de Serglycina, de la misma manera que perforina, tiene un aumento significativo de 11 veces a las primeras horas post-infección, para luego seguir actuando con el paso de las horas, esto hace sentido, ya que perforina, al hacer un poro, en la membrana de la vacuola endocítica, Serglycina, también logra ingresar hacia el citosol, para luego disminuir su expresión de forma significativa. Como también, en estudios de expresión de estos genes en ratones indican claramente que la vía de perforina está involucrada íntimamente en la defensa contra patógenos virales y células transformadas (Trapani *et al.*, 2002), esto se relaciona considerablemente, con los resultados positivos obtenidos de perforina.

4.1.2.- FasL, se expresa en la membrana de la célula NK, y reconoce el receptor Fas expresado en la célula diana, induciendo la trimerización de Fas por FasL, resultando en la activación de la caspasa 8, trayendo como consecuencia la apoptosis de la célula diana (Waring & Müllbacher, 1999). Esto se relaciona, con el resultado positivo a las 48 h post-infección, donde existe una expresión, mayormente significativa de 600 veces, en comparación al resto de los tratamientos y tiempos post-infección, para células de cultivo primario de cabeza de riñón de *Salmo salar* desafiadas con ISAv.

4.1.3.- Interleuquinas, las citoquinas forman parte de un gran grupo de proteínas o glicoproteínas que son producidas por estímulos exógenos o endógenos, que poseen la capacidad de modular la actividad funcional de las células (Sepúlveda, 2000).

Es importante destacar, que las citoquinas, ayudan a los mecanismos de citotoxicidad de las células NK, activándolas, y mediando su actividad, mediante la secreción citoquinas, tales como IFN γ (producida en respuesta a células infectadas por virus), TNF α –citoquina pro-inflamatoria,

producida por macrófagos en respuesta a agentes infecciosos y RIL-12 secretada por macrófagos y monocitos en respuesta al reconocimiento de agentes infecciosos. Todas estas citoquinas, están intrínsecamente relacionadas, con la activación y proliferación de las células NK, para que, una vez activadas, puedan ejercer sus mecanismos citotóxicos, y lisar a la célula diana (Bryceson *et al.*, 2011).

La expresión de IFN γ , TNF α , RIL-12 resultó positiva, para células del cultivo primario de cabeza de riñón de *S. salar* infectadas con ISAv, y negativo para células de cultivo primario de cabeza de riñón no infectadas. Para el caso de IFN γ , se obtuvo expresión, a las 24, 48, y 72 h post-infección y de forma significativa a las 48 h post-infección, esto hace sentido, debido a que IFN γ es el producto de las células infectadas por virus y que activa la producción de las células NK (Sepúlveda, 2000).

Para el caso de TNF α , se observó la expresión de forma significativa a las 48 h post-infección en células de cultivo primario de cabeza de riño desafiadas con ISAv. Esto hace sentido ya que, TNF α , es una proteína pro-inflamatoria, es producido principalmente por monocitos y macrófagos, en respuesta a los agentes infecciosos, siendo capaz de activar a las células NK (Leibson, 1997).

Y por último, para RIL-12, se observó la expresión de forma significativa las 48 y 72 h post-infección en células de cultivo primario de cabeza de riño desafiadas con ISAv, esto hace sentido, debido a que, el RIL-12 producida por macrófagos y monocitos en respuesta a agentes infecciosos, y de la misma manera aumenta la actividad citotóxica de las células NK (Yadav *et al.*, 2011).

4.2.- Prolactina

Prolactina (PRL), es una hormona polipeptídica secretada por la glándula pituitaria, y células inmune (Shelly *et al.*,2011), conocida por modular las respuesta inmune en mamíferos (De Bellis *et al.*, 2005), siendo esta función, muy poco conocida en peces teleósteos, y muy importante a la hora, de utilizarla como herramienta, para el control de patógenos, como virus. La relación entre la regulación neuroendocrina y el sistema inmune, ha sido sujeto a intensa investigación (Berczi & Nagy, 1987, Kelley, 1989, Gala, 1991). Por ello, se ha descrito que PRL, afecta a las células inmunocompetentes como macrófagos, linfocitos y células NK (Berczi & Nagy, 1987). Se sabe en mamíferos, que prolactina activa a las células NK, incrementando su actividad citotóxica y por ende aumenta la expresión de receptores propios de las células NK (Mavoungou *et al.*, 2004). También se sabe que prolactina estimula la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IFN γ , IL-1A, IL-12 en macrófagos humanos (Olavarria., 2010). Siendo importante PRL en la producción de anión superóxido en macrófagos (Saiki *et al.*, 1996). Como también la relación de, TNF α y IFN γ , en la estimulación de anión superóxido en macrófagos (Almeida *et al.*,2005).

El efecto estimulador de prolactina sobre los genes involucrados en los mecanismos de citotoxicidad y la activación de las citoquinas relacionada con estos mecanismos , en la infección experimental con ISAv, son resultados inéditos, y observados por primera vez en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos de la estimulación de prolactina en células de cultivo primario de cabeza de riñón desafiadas con ISAv + prolactina, células tratadas con PRL y sus respectivos controles, dieron positivos, para los mecanismos de citotoxicidad mediado por perforina,

Serglicina y FasL. Como también, dieron positivas las citoquinas involucradas en la activación de las células NK, tales como, RIL-12, TNF α y IFN γ .

Para el caso de, Perforina se vio aumentada la expresión de forma significativa en 26 veces, en células tratadas con ISAv + PRL, en comparación a sus respectivos controles, al igual que Serglicina, que muestra un aumento significativo en 4 veces, en células tratadas con ISAv + PRL.

De la misma manera, tomando en cuenta, FasL, existe mayor expresión, para el caso de células tratadas con PRL, en comparación a células tratadas con ISAv + PRL. Con respecto a las citoquinas involucradas en la activación de las células NK, resultaron positivas para PRL, y para células tratadas con ISAv + PRL.

Para el caso de IFN γ , que resulto positiva para PRL, se vio, que existe expresión significativa en 1 ves, a las primeras horas del desafío, en células tratadas con ISAv + PRL, para luego disminuir, con el transcurso del tiempo. Para el caso de TNF α , en células tratadas con PRL, se vio, que existe, mayor expresión en células de cultivo primario de cabeza de riñón solo tratadas con PRL, aunque de la misma manera, resultan positivas para ISAv + PRL. Por último para RIL-12, que resulto positivo para PRL, se vio, una mayor expresión en células del cultivo primario de cabeza de riñón, tratadas con ISAv + PRL, con respecto a sus controles.

De esta manera prolactina, sería un buen inmunomodulador, no solo aumentando la expresión de Interleuquinas asociadas a la activación de las células NK, sino que también aumentando la expresión de los mediadores de la citotoxicidad de las células NK, frente a células de cultivo primario de cabeza de riñón de *Salmo salar* desafiadas con ISAv + PRL como la producción de anión superóxido en macrófagos.

5.-CONCLUSION

Este trabajo ha contribuido significativamente, al conocimiento del sistema inmune de *Salmo salar*, principalmente por lo que se concluye a continuación:

- Se determinó el tiempo en generar efecto citopático del virus ISA, en la línea celular SHK-1, como también la carga viral de ISAv.
- Se evaluó la expresión del mensajero de los mecanismos de citotoxicidad de las células NK, mediado por perforina, FasL, y serglicina, como también las citoquinas involucradas directamente con este mecanismo, como son RIL-12, INF- γ , TNF α , que se encuentran sobre-expresadas en células de cultivo primario de riñón infectadas con ISAv, en comparación a células sanas, indicando que estos receptores modulan la actividad citotóxica de las células NK, frente a células infectadas por virus.
- Prolactina como un potencial inmunomodulador de la respuesta inmune en peces teleósteos, aumentando la expresión de los mediadores de la citotoxicidad de las células NK, como también las interleuquinas asociadas en aumentar la actividad de las células NK, en células de cultivo primario de cabeza de riñón desafiadas con ISAv + PRL.

Estos resultados, van en directa ayuda, para comprender de mejor manera, como el sistema inmune innato de teleósteos, se defiende contra organismos, tan complejos de atacar, como son los virus, y de esta manera contribuir a encontrar una mejor alternativa de cura, contra infecciones virales, como el ISAv, en *Salmo salar*.

6.- REFERENCIAS

- Abbas, L., Yu, V. (2001) Infectious diseases journals on the World Wide Web: attractions and limitations. *Clin Infect Dis.* 15:817-828.
- Berczi, I., Nagy E (1987) The effect of prolactin and growth hormone on hemolymphopoietic tissue and immune function. In *Hormone and Immunity*, pp 145-171. Eds I Berczi & Kovacs. Lancaster: MTP Press.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N & Kelly PA. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* **19** 225–268.
- Biron, C., Nguyen, K., Pien, G., Gri, G., Cousens, L., Salazar-Mather, T. (1999) Natural killer cells in anti-viral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Ann Rev Immunol.* 17:189-220.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.
- Chikanza, IC (1999) Prolactin and neuroimmunomodulation: in vitro and in vivo observations. *Ann N Y Acad Sci* 1999;876:119– 130.
- Cottet, L., Rivas, A., Cortez, M., Sandino, AM., and Spencer, E. (2010b) Infectious salmon anemia virus-genetics and pathogenesis. *Virus res.*
- Cottet, L., Imarai, M., Spence, E. (2011) Virus de la anemia infecciosa del salmon: Genética y pathogenesis. *Virus revista version diferente Salmon Acuicola*

- Dan, G. and Lall, S. (1998) Neuroendocrine Modulation of Immune System. *Indian Journal of Pharmacology* 30: 120-140.
- Evans, D. (2009) Identification of phagocytic cells, NK-like cytotoxic cell activity and the production of cellular exudates in the coelomic cavity of adult zebrafish, *Immunology* 1077–1087.
- Evans, D. L., Jaso-Friedmann L. (1999) Nonspecific cytotoxic cells and innate cellular immunity in teleost fish. In: Fingerma M, Nagabhushanam R. (eds) *Recent advances in marine biotechnology*, Vol 5. Science Publishers, Enfield, pp 243–268
- Evans, DL., Jaso-Friedmann, L., Smith, EE., St John, A., Koren HS, Harris DT. (1988) Identification of a putative antigen receptor on fish nonspecific cytotoxic cells with monoclonal antibodies. *J Immunol* 141:324–332.
- Evans, D., Hogan, K., Gravess, S., Carlson, R., Floyd, E., Dawe, D. (1984) Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*) III. Biophysical and biochemical properties affecting cytolysis. *Dev. & Com. Immunol.* 8:599-608.
- Graves, SS., Evans, D. L., Dawe DL. (1985) Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J Immunol* 134:78–85.
- Harris, D., Jaso-Friedmann, L., Devlin, R., Koren, H., Evans, D. (1991) Identification of an evolutionarily conserved, function-associated molecule on human natural killer cells. *Proc. Natl. acad. Sci.* 88:3009-3013

- Haussmann, D. (2011) Análisis de expresión del receptor NCCRP-1 en *Salmo salar* y medición de actividad NK en peces inmunoestimulados, Tesis doctoral en Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Jaso-Friedmann, L., Leary, J., Evans, D. (1997a) NCCRP-1: a novel receptor protein sequenced from teleost nonspecific cytotoxic cells. *Mol. Immunol.* 34: 955-965.
- Jaso-Friedmann, L., Leary, J., Evans, D. (2001) The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties. *Dev. & Com. Immunol.* 25:701-711.
- Kesavannair P., Evans D., Jaso-Friedmann L. (2006) Molecular characterization and expression of a granzymes of an ectothermic vertebrate with chymase-like activity expressed in the cytotoxic cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Immunogenetics* 58: 41–55
- Kam, C. M., Hudig, D., Powers JC. (2000) Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1477:307–323
- Kibenge, F. (2009) Infectious salmon anemia virus (ISAV) isolated from the ISA disease outbreaks in Chile diverged from ISAV isolates from Norway around 1996 and was disseminated around 2005, based on surface glycoprotein gene sequences. doi:10.1186/1743-422X-6-88.
- Kibenge, FS. (2004) Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. *Canada C1A 4P3*.

- Kelley, KW. (1989) Growth hormone, lymphocytes and macrophages. *Biochemical Pharmacology* 38 705-713.
- Krzewski, K., and Coligan J. (2012) Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. doi: 10.3389/fimmu.2012.00335.
- Lieberman, J. (2003) The ABCS of granule-mediated cytotoxicity:new weapons in the arsenal, 2003.doi:10.1038.
- Leibson, P. (1997) Signal transduction during natural killer cell activation: Inside the mind of killer. *Immunity*. 6: 655-661.
- Metkar, S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja S., Uhlin-Hansen L., Podack E., Trapani, J., Froelich, J. (2002). Cytotoxic cell granule mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation.*Immunity*.3:417-428.
- Martínez, A. (1991) Proliferación y diferenciación celular en cultivos primarios de adipocitos marrones, tesis doctoral, en farmacia, Universidad complutense Madrid.
- Marcel, R. (2002) The cytolytic pathways: Fas-FasL and perforin granzyme. *NatRev Immunol*. 2:273-281.
- Male & Roitt. (1996)*Advanced Immunology*,Londres: Mosby.
- Waring, P.,& Müllbacher A. (1999).Review article, Cell death induced by the Fas/Fasligand pathway and its role in pathology. *Immunology and cell biology* 77,312-317.
- Olabuenaga, S. (2000) *Sistema Inmuneg en Peces*. Gallana (concepcion) ISNN0717-6538.

- Owerbach, D., Ruttier, WJ. (1981)The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science* 212: 815–816, 1981.
- Olavarria, V. (2010). Prolactina activa la respuesta inmune innata en leucocitos de *Salmo salar* y *Sparus aurata*: Rol de Jak2/Stat, NF- κ B Y PKC, Tesis doctoral en Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Rubio-Godoya, M. (2010).Inmunología de los peces óseos. *SIÓN Rev Mex Cienc Pecu* 2010;1(1):47-57
- Rojas, V., Olivares, P. (2008) Characterization of a novel and genetically different small infective variant of *Piscirickettsia salmonis*. *Microb. Pathogenesis*. 44: 370-378.
- Rimstad, E. (2002)Infectious salmon anaemia virus. PMID: 12076262.
- Raja, S.,Metkar, S.,Froelich, C.(2003) Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism.*Curr Opin Immunol*. 5:528-532.
- Sepúlveda, C., Puente, J. (2000)Células *naturalkiller* y el sistema inmune innato en la patología infecciosa, *Revista Medica de Chile* ISSN 0034-9887.
- Shelly, S., Boaz, M., Orbach, H. (2011) Prolactin and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 11 (2012) A465–A470.
- Trapani, J., and Smyth M. (2002) Functional significance of the Perforin/Granzyme cell death pathway. *Nature Reviews, Immunology* doi:10.1038/nri911.
- Truong, AT., of the human prolactin gene. *EMBO J* 3: 429–437.

- Metkar. (2002) Cytotoxic Cell Granule-Mediated Apoptosis: Perforin Delivers Granzyme B-Serglycin Complexes into Target Cells without Plasma Membrane Pore Formation. *Immunity*, Vol. 16, 417–428 stem in infectious.
- Duez, C., Belayew, A., Renard, A., Pictet, R., Bell, GI. and Martial, JA. (1984) Isolation and characterization Trinchieri, G (1989) Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47:187-375.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S. (2008) Functions of natural killer cells. *Nature Immunol.* 9:503-510.
- Van Muiswinkel. (1995) Investigations into the ubiquitous nature of high or low immune responsiveness after divergent selection for antibody production in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Veterinary immunology and immunopathology* 1995;48(3-4):355-6 diseases.
- Yadav, P., Chen, C., and Liu, Z. (2011) Potential Role of NK Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease, Rev. Article. ID348530.