



CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Aislamiento y caracterización primera del gen del IFN γ y la inmunoglobulina T en tilapia (*Oreochromis niloticus*)

UNIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

AUTORES PRINCIPALES: Janet Velázquez Pérez, Yamila Carpio González, Mario Pablo Estrada García

Otros autores: Antonio Morales Rojas, Osmany Rodrigo González de Sosa, Fidel Herrera Miyares, Juana María Lugo González, Elsa María Rodríguez Rodríguez, José Ángel Silva Guirado, Regla Caridad Estrada Vázquez, Omar Gell Cuesta, Lilianne López Nocado, Eduardo Canales

Filiación: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

RESUMEN

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es empleada como modelo animal para estudiar la efectividad de los productos desarrollados para la acuicultura, tales como inmunoestimulantes y vacunas contra patógenos que afectan algunas especies de interés comercial. Esta especie constituye a su vez una de las más importantes para la acuicultura a escala global, con una sólida demanda en el mercado y una producción que aumentó considerablemente en las últimas décadas. Sin embargo, la intensificación de su cultivo enfrenta serios retos, entre los que se destacan la alta incidencia de patógenos en el medio acuático. En este contexto, es necesario el desarrollo de métodos y herramientas para el monitoreo y el control efectivos de patógenos en las granjas de cultivo. Por ello, la capacidad de medir la respuesta inmunitaria humoral y celular facilita la evaluación y la comprensión de la respuesta inmunológica desarrollada en la tilapia ante diferentes estímulos. En el presente trabajo, se identifica y aísla por primera vez el gen que codifica para el IFN γ de tilapia, además de la forma secretada y de membrana de la inmunoglobulina T y un fragmento de la IgM de tilapia. Se analizaron los cambios transcripcionales de estos genes mediante PCR cualitativa y cuantitativa en larvas y en diferentes tejidos de adultos de tilapia en condiciones *naive* y después de la estimulación con LPS de *Escherichia coli*, Poli I:C y una bacteria de importancia en la acuicultura (*Edwardsiella tarda*). El análisis de expresión diferencial en tejidos mostró que el gen del IFN γ de tilapia se expresa de forma constitutiva en diferentes tejidos, excepto en las branquias. Sin embargo, en condiciones de estimulación con Poli I:C y LPS y tras la infección con la bacteria *E. tarda*, la expresión del IFN γ se induce en las branquias a las 24 h tras la estimulación, lo que sugiere que tiene un papel importante en la inmunidad contra las bacterias intracelulares. La proteína de IFN γ de tilapia producida en *E. coli* indujo la transcripción del gen Mx en un ensayo *in vitro* en células de cultivo primario de riñón anterior, lo cual demuestra que la proteína obtenida por vía recombinante posee actividad biológica *in vitro*. Como parte de la caracterización de IgT e IgM, se pudo detectar la presencia de los transcritos de ambos

Palabras clave

Oreochromis niloticus; gen del IFN γ ; inmunoglobulina T



genes en etapas tempranas del desarrollo larval. Estos genes exhibieron un perfil de expresión diferencial después del tratamiento con LPS y la infección por *E. tarda* en tilapias adultas, lo cual se encuentra en correspondencia con las funciones efectoras conferidas a estas inmunoglobulinas en los compartimentos sistémicos y mucosales. Estos resultados contribuyen al conocimiento acerca de la respuesta inmunológica de la tilapia ante diferentes estímulos, pues constituyen el primer acercamiento para determinar la función biológica del IFN γ y comprender la participación de las inmunoglobulinas en la respuesta inmunitaria humoral en la tilapia. Además, permiten obtener nuevas herramientas como marcadores moleculares del sistema inmunitario en la tilapia, que contribuyan al control inmunológico y la sanidad acuícola.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento acerca de las moléculas que forman parte del sistema inmunitario en la tilapia y en la respuesta inmunológica desarrollada ante diferentes estímulos, en el presente trabajo se aisló y caracterizó por primera vez los ADNc que codifican el IFN γ y la cadena pesada de las formas secretada y transmembrana de la inmunoglobulina T (IgT) en *O. niloticus*. En este contexto se caracterizaron las secuencias de nucleótidos y de proteínas deducidas, se analizaron sus perfiles de expresión en etapas tempranas del desarrollo larval, así como la distribución tisular en peces sanos, bajo estimulación con lipopolisacáridos (LPS), Poli I:C y tras la infección por *Edwardsiella tarda*. Además, se obtuvo de forma biológicamente activa el gen del IFN γ en un sistema procarionte.

El ADNc del IFN γ de tilapia identificado a partir de linfocitos de bazo codifica una proteína con las características estructurales típicas de las moléculas de IFN γ descritas en los vertebrados, incluidas las estructuras tipo α -hélices, el péptido señal (que lo marca como una citoquina secretada), el motivo distintivo y la señal de localización nuclear (NLS) en la región C-terminal. El péptido maduro es altamente catiónico y posee numerosos residuos de lisina y arginina, principalmente en el extremo C terminal, lo que resulta en un extremo carboxilo altamente hidrófilo, importante para su actividad biológica y necesario para su unión al dominio extracelular de los receptores. El análisis de identidad de secuencias entre varias moléculas de IFN γ en peces teleosteos y la secuencia de IFN γ de tilapia reveló que esta posee hasta un 62 % de identidad con las secuencias analizadas. Los genes y proteínas funcionalmente similares a menudo tienen una mayor similitud de secuencia en las regiones requeridas para su actividad biológica. Por lo tanto, los sitios encontrados con mayor porcentaje de similitud de secuencia corresponden a las estructuras tipo α -hélice, el núcleo de interfaz y las regiones de intercalación de la proteína, principalmente en las regiones correspondientes al motivo distintivo y la NLS. La modelación tridimensional de la estructura terciaria de IFN γ de tilapia predijo que esta molécula pertenece a la familia de las citoquinas α -helicoidales y comparte una homología estructural significativa con otras moléculas de IFN γ .

En el presente estudio se obtuvieron las secuencias completas de ADNc de las cadenas pesadas de la forma secretada y transmembrana de la IgT de tilapia, a partir de linfocitos de riñón anterior utilizando la técnica de RACE-PCR. Ambas isoformas poseen alto porcentaje de identidad tanto en la secuencia de nucleótidos como en la de aminoácidos, y es posible que estén codificados por el mismo gen a través de diferentes empalmes. La cadena pesada de las isoformas de IgT tiene una región variable con un péptido señal, 2 regiones marco y 3 regiones determinantes de complementariedad, así como una región conservada con 2 dominios constantes de Ig (CH1-CH2), lo cual está en correspondencia con lo informado para las moléculas de IgT de otras especies de peces teleosteos. Además, poseen residuos de aminoácidos conservados importantes que participan en la formación de los enlaces disulfuro intra- e intercatenarios y en la formación de los dominios IgSF, que son cruciales para la estabilización y el correcto plegamiento de la estructura terciaria.

La sIgT posee un motivo PxxxNxSLxxxDxxxxCY que se requiere típicamente para la polimerización multimérica de esta Ig, donde el sitio de N-glicosilación y la penúltima cisteína son críticos para la asociación de la cadena J. La mIgT muestra un alto grado de conservación en los residuos de aminoácidos involucrados en la formación del dominio CART (siglas del inglés *conserved antigen receptor transmembrane motif*). Este motivo interactúa con otras proteínas que desempeñan un papel en el ensamblaje o en las propiedades de señalización de los receptores de antígenos de linfocitos.

Además, en el presente trabajo, se obtuvo un fragmento de ADNc que codificaba 300 aminoácidos de la cadena pesada de la IgM de tilapia, en el cual se pudieron identificar 2 dominios funcionales C μ con cisteínas conservadas involucradas en la formación de los enlaces disulfuro intracatenarios y 4 sitios potenciales de N-glicosilación, requeridos para la actividad biológica de esta inmunoglobulina. Esta secuencia posee una alta identidad con las regiones constantes CH3 y CH4 de las secuencias IgM identificadas en las bases de datos de tilapia. Sin embargo, las diferencias detectadas tanto en los niveles de nucleótidos como de aminoácidos sugieren

que la secuencia obtenida pertenece a otra isoforma de esta inmunoglobulina en la tilapia del Nilo.

La identificación y clonaje de esta secuencia permitió realizar estudios comparativos para investigar la posible función de los transcritos de IgT identificados en tilapia con respecto a los de IgM. Las estructuras 3D predichas revelaron que las inmunoglobulinas de tilapia adoptan la conformación estructural conservada de las moléculas de anticuerpos, donde los aminoácidos estructurales importantes (W, P y C) se encuentran en las mismas posiciones espaciales, lo que sugiere que estas Ig pueden desempeñar funciones biológicas similares a los anticuerpos.

En los peces, las larvas se encuentran expuestas a diversos microorganismos inmediatamente después de la eclosión. Sin embargo, el sistema inmunitario todavía está en desarrollo, y no todas las estructuras y funciones presentes en los adultos están en las larvas. Por lo tanto, el conocimiento sobre la ontogenia del sistema inmunitario en los peces puede ofrecer nuevas estrategias de protección e indicar el momento óptimo de la vacunación. Estudios realizados por Takemura y Takano (1997) demuestran la presencia de la IgM en las larvas de tilapia (*O. mossambicus*) producto de la transferencia materna. Sin embargo, existen pocos estudios acerca de la expresión de los genes de IgT en etapas tempranas del desarrollo. Este trabajo constituye el primer informe

acerca de la presencia de los transcritos de IgT en las larvas de tilapia.

En la tilapia del Nilo, mediante la técnica de PCR cuantitativo, se observó la presencia de los genes RAG-1, IgM e IgT desde etapas muy tempranas del desarrollo larval, pero con diferentes perfiles de expresión. Tanto IgM como la IgT se expresan en etapas tempranas del desarrollo, siendo los niveles de expresión de IgM mayores que los de IgT. Esto sugiere que la IgM es el anticuerpo predominante en la protección de las larvas; sin embargo, la expresión temprana y consistente de IgT indica que este isotipo también puede desempeñar un papel protector importante durante las etapas iniciales del desarrollo larval. Las larvas de los peces se encuentran expuestas a patógenos durante un largo período de tiempo hasta que ocurre la maduración de sus órganos linfoides. Es por ello que la presencia de genes relacionados con el sistema inmunitario en este periodo crítico del desarrollo puede ser esencial para la supervivencia.

En las tilapias adultas, el análisis del perfil de expresión del gen del IFN γ en diferentes tejidos de tilapia mediante RT-PCR convencional reveló que se expresa de forma constitutiva en el riñón anterior, la piel, el intestino, el cerebro y el músculo, pero mediante esta técnica no se detectó en las branquias. El análisis de PCR cuantitativo corroboró la expresión constitutiva en el riñón anterior, la piel y el músculo, y

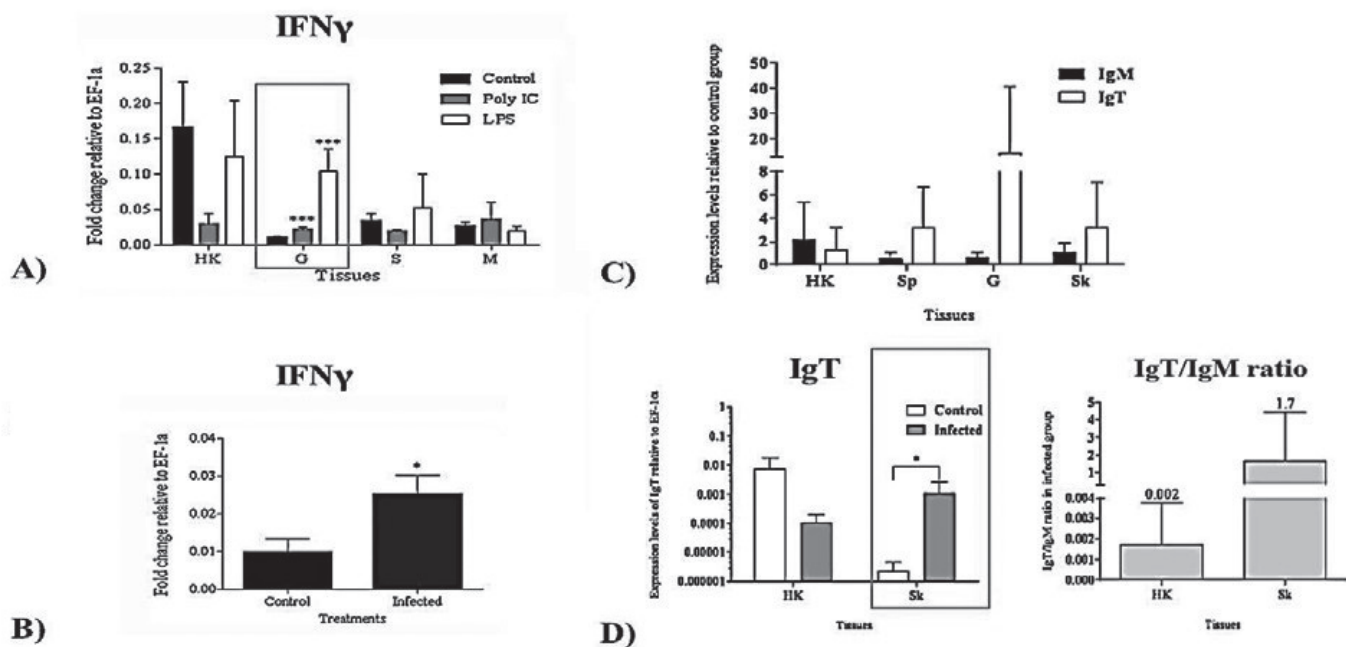


Fig. 1. Análisis de la expresión génica del IFN γ , la IgT e IgM en la tilapia del Nilo (*O. niloticus*). Niveles de expresión relativos a EF-1 α del IFN γ a las 24 h después de A) la inyección con LPS o Poli I: C y B) la exposición por baño de inmersión con 108 CFU/mL de *E. tarda* durante 1 h. D) Niveles de expresión de sIgT e IgM en relación con el grupo de control en diferentes tejidos a las 24 h de la estimulación con 1 μ g/pez de LPS. Niveles de expresión relativos de sIgT relativos a EF-1 α y relación IgT/IgM en el grupo infectado a las 24 h después de la infección por baño de inmersión con 108 CFU/mL de *E. tarda* durante 1 h.

Leyenda: HK, riñón anterior; G, branquias; S o Sk, piel; M, músculo y Sp, bazo.

niveles muy bajos en las branquias. Sin embargo, después de la estimulación con LPS o Poli I: C ocurrió un aumento significativo de los niveles de expresión del IFN γ en las branquias, lo que confirma el carácter inducible de esta citoquina y su potencial rol protector.

Por otro lado, el análisis mediante PCR en tiempo real confirmó que, en condiciones naive, los transcritos de IgM son más abundantes que los de IgT en todos los tejidos analizados, manteniendo el patrón de expresión descrito, donde los niveles de expresión de IgM son mayores que los IgT. Los mayores niveles de expresión de IgT e IgM se detectaron en los tejidos linfoides primarios y secundarios, como riñón anterior y bazo, respectivamente. Sin embargo, la contribución del transcrito de IgT con respecto a IgM aumenta en el bazo, en las branquias y en la piel; los últimos contienen tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT, siglas del inglés *mucosa-associated lymphoid tissue*) y tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de las mucosas.

Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes de la membrana celular de las bacterias gramnegativas y pueden inducir una importante respuesta inflamatoria en los peces sin que se desarrolle un *shock séptico*. Los niveles de expresión de los genes de inmunoglobulinas en la tilapia se examinaron a las 24 h después de la inyección intraperitoneal con LPS. Este tratamiento tuvo efectos en el aumento de los transcritos de IgT e IgM en los tejidos analizados, con mayores aumentos en los niveles de expresión para el gen de la IgT de tilapia. El perfil de expresión de la IgT en tilapia indicó que esta molécula se induce tanto en los tejidos linfoides primarios como en los secundarios.

Edwardsiella tarda es un patógeno intracelular oportunista que resulta significativo en una variedad de especies de peces y crece a temperaturas adecuadas para el mantenimiento de la tilapia. La infección por esta bacteria puede afectar todas las etapas de la vida de los peces, lo que da como resultado mortalidades masivas y grandes pérdidas económicas en peces de importancia comercial. En este estudio, se examina por primera vez a *E. tarda* como un patógeno potencial capaz de estimular la respuesta inmunitaria en adultos de tilapia a las 24 h de la infección mediante baños de inmersión. El análisis de los niveles de expresión del IFN γ reveló una regulación positiva de esta citoquina en las branquias de las tilapias infectadas, lo que puede resultar en una respuesta inflamatoria

debido a la infección. La infección con esta bacteria no tuvo efectos en los niveles de expresión del transcrito de IgM en los tejidos analizados. Sin embargo, para el transcrito de IgT, se observa que en la piel aumentan aproximadamente 510 veces los niveles de expresión en el grupo tratado con respecto al grupo control. Los resultados obtenidos aquí revelaron un aumento en la proporción de IgT con respecto a IgM en la piel en el grupo infectado. En el presente estudio, se demuestra por primera vez una regulación positiva de la expresión de la IgT en la piel de la tilapia después de una infección mediante baños de inmersión, lo sugiere que la IgT podría desempeñar un papel predominante en la inmunidad mucosal en esta especie.

Con el objetivo de demostrar que la secuencia identificada del IFN γ de tilapia posee actividad biológica, dicha molécula se produjo mediante la tecnología del ADN recombinante en células de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) como una proteína de fusión con 6-histidinas en el extremo C-terminal de la proteína, formando cuerpos de inclusión en el precipitado de ruptura. Se obtuvo la proteína heteróloga (rIFN γ) con más de un 90 % de pureza luego del proceso de purificación por IMAC. Mediante un ensayo funcional *in vitro* en células de cultivo primario de riñón anterior, fue se pudo encontrar un aumento significativo en el nivel de expresión del gen Mx, a las 4 h después de la administración de 100 ng/mL del IFN γ de tilapia obtenido por vía recombinante, con lo que se demostró por primera vez que el rIFN γ de tilapia posee actividad biológica *in vitro*.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la primera aproximación al estudio de sistema de IFN e IgT en la tilapia del Nilo y crean las bases para caracterizar el tipo de respuesta celular y humoral que se desencadena en este organismo ante una infección viral o bacteriana, o bajo esquemas de estimulación inmunitaria y vacunación, resultando en beneficios generales para la acuicultura.

AUTORES PARA LA CORRESPONDENCIA

Dra. Yamila Carpio González. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Apto 6162, La Habana 10600 Teléfono: 7271 6022 Ext. 5155 o 7250 4424. Correo electrónico: yamila.carpio@cigb.edu.cu

MSc. Janet Velázquez Pérez. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Apto 6162, La Habana 10600 Teléfono: 7271 6022 Ext. 5155 o 7250 4424. Correo electrónico: janet.velazquez@cigb.edu.cu