



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

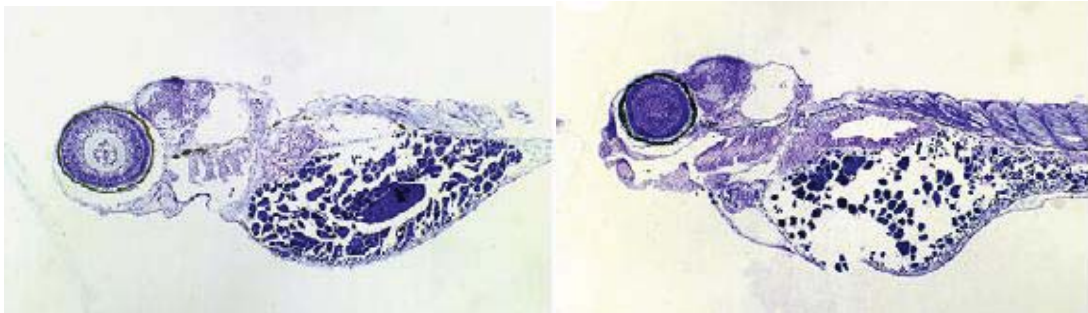
## Grao en Bioloxía

### Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Revisión bibliográfica: Peixe cebra (*Danio rerio*) como modelo de infección para o estudo da resposta inmune innata antiviral en peixes**

**Revisión bibliográfica: Pez cebra (*Danio rerio*) como modelo de infección para el estudio de la respuesta inmune innata antiviral en peces**

**Literature review: Zebrafish (*Danio rerio*) as an infection model for the study of innate antiviral immune response in fish**



**Antía Baña Castro**

Julio, 2020

*Director Académico: Ibán Lamas Criado*

**Portada sacada de:** Gabor et al., (2014).



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Facultad de Ciencias**

**Grado en Biología**

**Departamento de Biología**

**Área de Biología Celular**

D. Ibán Lamas Criado, Profesor Interino de Universidad en el Departamento de Biología de la Universidad de A Coruña,

INFORMA,

Que el Trabajo de Fin de Grado presentado por Antía Baña Castro y con título “Revisión bibliográfica: Pez cebra (*Danio rerio*) como modelo de infección para el estudio de la respuesta inmune innata antiviral en peces” ha sido realizado bajo mi dirección y, considerándolo finalizado, autorizo su envío y presentación al tribunal calificador correspondiente.

Y, para que así conste, expido el presente informe en A Coruña a 22 de julio de 2020.

Fdo. Ibán Lamas Criado.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Biología pez cebra .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Pez cebra como organismo modelo .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Inmunidad innata del pez cebra .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4. PRRs en el pez cebra .....</b>	<b>5</b>
1.4.1. Receptores Toll-like (TLRs, <i>Toll-like receptors</i> ) .....	5
1.4.2. Receptores tipo I inducidos por el ácido retinoico (RLRs, <i>Retinoic acid-inducible gene I-like receptors</i> ) .....	6
1.4.3. Receptores de dominio de oligomerización de nucleótidos (NLRs, <i>Nucleotide oligomerization domain-like receptors</i> ) .....	6
<b>1.5. Tipos celulares implicados en respuesta inmune .....</b>	<b>7</b>
<b>1.6. Sistema interferón .....</b>	<b>8</b>
1.6.1. Estructura molecular .....	8
1.6.2. Vía de señalización .....	9
<b>1.7. Vacunas ADN .....</b>	<b>10</b>
1.7.1. IFN como adyuvante .....	11
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>11</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1. Pez cebra como modelo de infecciones virales en peces .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2. Virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) .....</b>	<b>13</b>
4.2.1. Signos clínicos externos .....	13
4.2.2. Tasa de mortalidad .....	13
4.2.3. Histopatología .....	14
4.2.4. Datos <i>in vitro</i> .....	15
4.2.5. Datos <i>in vivo</i> .....	16
<b>4.3. Pez cebra como modelo para el estudio de vacunas .....</b>	<b>17</b>
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>21</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>23</b>

## RESUMEN

Recientemente el pez cebra (*Danio rerio*) es considerado como uno de los modelos experimentales emergentes en la investigación de patologías humanas y animales, debido principalmente a su sistema inmune altamente desarrollado así como su capacidad para ser infectado con diferentes agentes víricos.

En la presente memoria, se revisa detalladamente la capacidad antiviral del sistema interferón (IFN) ya que numerosos estudios han registrado una respuesta favorable tras la infección con un patógeno que cursa con severidad (SVCV), proponiendo su posible utilización como adyuvante molecular en la mejora de vacunas de ADN. Esto no sólo tendría una repercusión en la salud animal, sino también en la investigación y desarrollo de posibles tratamientos en patologías humanas.

**Palabras clave:** *Danio rerio*, modelo infección, inmunidad innata, IFN-I, adyuvante, vacuna.

## RESUMO

Recentemente o peixe cebra (*Danio rerio*) é considerado como un dos modelos experimentais emerxentes na investigación de patoloxías humanas e animais, debido principalmente ó seu sistema inmune altamente desenvolvido así como a súa capacidade para ser infectado con diferentes axentes víricos.

Na presente memoria, revísase detalladamente a capacidade antiviral do sistema interferón (IFN) xa que numerosos estudos rexistraron unha resposta favorable tras a infección con un patóxeno que cursa con severidade (SVCV), propoñendo a súa posible utilización como adxuvante molecular na mellora de vacinas de ADN. Isto non só tería unha repercusión na saúde animal, senón tamén na investigación e desenvolvemento de posibles tratamentos en patoloxías humanas.

**Palabras clave:** *Danio rerio*, modelo infección, inmunidad innata, IFN-I, adxuvante, vacina.

## SUMMARY

Recently zebrafish (*Danio rerio*) is considered to be one of the emerging experimental models in the research of human and animal pathologies, mainly due to its highly developed immune system as well as its ability to be infected with different viral agents.

In this report, the antiviral capacity of the interferon system (IFN) is reviewed in detail as numerous studies have recorded a favorable response after infection with a severe pathogen (SVCV), proposing its possible use as a molecular adjuvant in the improvement of DNA vaccines. This would not only have an impact on animal health, but also on the research and development of possible treatments in human pathologies.

**Key words:** *Danio rerio*, infection model, innate immunity, IFN-I, adjuvant, vaccine.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Biología pez cebra

El pez cebra (*Danio rerio*) es un vertebrado teleósteo de la familia Cyprinidae (Tabla 1) de pequeño tamaño, cuyos adultos alcanzan los 4,5 a 5 cm de longitud. Los ejemplares de esta especie presentan unas tonalidades doradas que se intensifican en un color blanco en la zona ventral. Este organismo se caracteriza por presentar un patrón rayado que recorre ambos costados desde los opérculos hasta la aleta caudal (Cubilos, 2017).

<b>Reino</b>	Animalia	<b>Superorden</b>	Ostariophysii
<b>Filo</b>	Chordata	<b>Orden</b>	Cypriniformes
<b>Subfilo</b>	Vertebrata	<b>Superfamilia</b>	Cyprinoidea
<b>Superclase</b>	Osteichthyes	<b>Familia</b>	Cyprinidae
<b>Clase</b>	Acnitopterygii	<b>Subfamilia</b>	Danioninae
<b>Subclase</b>	Neopterygii	<b>Género</b>	<i>Danio</i>
<b>Infraclase</b>	Teleostei	<b>Especie</b>	<i>Danio rerio</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica pez cebra (*Danio rerio*). Información obtenida de NCBI Taxonomy Browser: NCBI:txid7955.

Esta especie presenta un claro dimorfismo sexual (Fig.1), ya que los machos son de menor tamaño que las hembras, con un cuerpo comprimido lateralmente y con una papila genital poco prominente. Las hembras, exhiben una forma corporal más ancha con el vientre abultado, y su papila genital es distintiva (Cubilos, 2017). Además, también hay diferencias etológicas, siendo los machos los que adoptan tácticas para defender los sitios de desove más favorables.



Figura 1. Dimorfismo sexual del pez cebra (*Danio rerio*). A: Adulto macho B: Adulto hembra. (Avdesh et al., 2012).

Con respecto a su ecología, es nativo del sureste asiático, con una distribución natural amplia, que incluye las cuencas del Ganges y Brahmaputra, además de aguas dulces tropicales de regiones monzónicas de la India, Bangladesh, Nepal, Pakistán, Bután, Tailandia y norte de Myanmar.

El pez cebra se cría en pequeños bancos de 5 a 20 individuos, que se reproducen mediante fecundación externa, cuyo desove es asincrónico y carente de cuidado parental por parte de los progenitores. Al tratarse de un pez de región monzónica, la época de lluvias marca el inicio de la estación reproductiva al estar correlacionada con mayor disponibilidad de alimento.

Las larvas son activas tras 3-5 días post-fecundación, y alcanzan la madurez sexual aproximadamente a los 3 meses. Dicha velocidad en su ciclo reproductor es una de las ventajas que hacen tan atractiva a esta especie para ser utilizada en investigación científica (Cubilos, 2017; Espinosa, 2016).

Es considerada una especie de preocupación menor según la base de datos de especies amenazadas de la IUCN.

Las características fisicoquímicas (Tabla 2) óptimas de su hábitat son, entre otras, temperaturas que oscilen entre los 16,5 a 33 °C y salinidad de 0.4 a 0.6 ppt, las cuales deben ser lo más precisas posible de cara su cría en cautividad, ya sea con fines científicos o recreativos (Cubilos, 2017).

pH	~0.8
Dureza	100 mg/L CaCO <sub>3</sub>
Salinidad	0.4-0.6 (ppt)
Transparencia	>35 cm
Profundidad	>35 cm
Temperatura	16.5 – 33 °C
Corriente	0.1 m/s
Sustrato	Barro, lodo, grava

Tabla 2. Características fisicoquímicas óptimas del pez cebra (Cubilos, 2017).

Finalmente, cabe destacar su dieta omnívora, abarcando una amplia variedad de crustáceos, gusanos y larvas de insectos, con una tendencia a la preferencia por las larvas de dípteros. Por ello, puede utilizarse para el control de especies de mosquitos, muchas de ellas portadoras de enfermedades (Cubilos, 2017),

## 1.2. Pez cebra como organismo modelo

Se considera como organismo modelo a aquellas especies que presentan suficiente similitud con otras para realizar investigaciones que permitan extrapolar datos para la totalidad de un grupo de organismos análogos (Cubilos, 2017).

Actualmente, uno de los modelos experimentales emergentes en la investigación de patologías humanas y animales es el pez cebra (*Danio rerio*). Las características principales que lo convierten en un modelo experimental para el estudio de enfermedades incluyen:

- Transparencia en embriones y larvas, lo que permite realizar una visualización *in vivo* de células, tejidos y órganos así como estudios inmunohistoquímicos en tiempo real (Novoa & Figueras, 2012).
- Su temprana organogénesis, ya que gran parte de los órganos se encuentran presentes en larvas entre 5-6 días post-fecundación. Además, algunos de dichos órganos conservan similitudes con los órganos de los mamíferos (Hsu et al., 2007).
- Presenta una gran homología anatómica y genética con el ser humano, con una similitud aproximada del 75% entre sus genomas (Hsu et al., 2007). Así mismo, es una buena herramienta molecular, dada la variedad de líneas mutantes y transgénicas por su expresión génica temprana (Rakus et al., 2019).
- Su alta tasa de fecundación y su rápida embriogénesis, permiten trabajar con un número significativo de muestras generando un mayor número de meiosis para estudios de clonación (Arteaga Almeida, 2017).
- Cuenta con un sistema inmune altamente desarrollado similar al del ser humano, con inmunidad innata y adaptativa, cuyos mecanismos y receptores inmunes se encuentran conservados en vertebrados. Esto, junto con un medio altamente expuesto y su infección con diferentes agentes víricos, lo convierten en un buen modelo para investigar la interacción hospedador-patógeno (Novoa & Figueras, 2012; Rakus et al., 2019)
- Finalmente, su pequeño tamaño y su sencilla alimentación, generan unos costes de mantenimiento muy inferiores con respecto a los de mamíferos. (Arteaga Almeida, 2017).

### **1.3. Inmunidad innata del pez cebra**

El pez cebra se caracteriza por su desarrollado sistema inmune, el cual comparte determinadas similitudes con el del ser humano, por lo que cabe esperar que ciertas vías de señalización activadas para generar una respuesta inmune se encuentren conservadas en mamíferos (Varela et al., 2017).

Dado que el medio acuático constituye una buena vía de transmisión de patógenos, el sistema inmune innato resulta ser un factor limitante de cara a la supervivencia de los individuos más jóvenes, puesto que es la única barrera de defensa presente en los primeros estadios de su ontogenia.

Una de las características más distintivas que presenta esta especie, es la existencia de un sesgo temporal entre la inmunidad innata y la adaptativa, que favorece el estudio exclusivo de la inmunidad innata, detectable y activa desde el día 1 de la embriogénesis hasta las 4-6 semanas post-fecundación, que es cuando la inmunidad adaptativa se vuelve morfológica y funcionalmente madura (Novoa & Figueras, 2012).



Para que se produzca una respuesta inmune innata, se requiere la intervención de un conjunto de células, incluyendo: células fagocíticas, dendríticas y células citotóxicas no específicas, caracterizadas por poseer receptores codificados en línea germinal, no sujetos a recombinación. Su función es reconocer estructuras muy conservadas en los distintos grupos de microorganismos, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *pathogen associated molecular patterns*).

El reconocimiento e interacción con los PAMP, lo llevan a cabo moléculas inmunosensoras denominadas receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptors*), que no necesitan una exposición previa para generar una respuesta eficaz (Medina Gali, 2017).

Los múltiples PAMPs y PRRs de detección de patógenos, inician vías de señalización que activan la expresión de diferentes genes asociados a la síntesis de determinadas moléculas como citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular e inmunorreceptores, que generan una respuesta rápida y eficaz frente a la infección.

No obstante, específicamente en la detección de agentes virales, destacan los factores reguladores del interferón (IRF) y el factor nuclear kappa B (NFkB) que inducen la producción de interferón y una cascada de inflamación, destacando la interleucina-6 (IL6), interleucina-1b (IL1b) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) por su eficacia en la eliminación del agente viral (Medina Gali, 2017).

#### **1.4. PRRs en el pez cebra**

##### **1.4.1. Receptores Toll-like (TLRs, *Toll-like receptors*)**

Los receptores Toll-like (TLRs) presentan una secuencia de homología elevada con los presentes en mamíferos (Varela et al., 2017), identificándose en el genoma del pez cebra un total de 24 TLRs (Fig.2). Su eficacia en el reconocimiento viral ha sido objeto de estudio, dando como resultado los siguientes TLRs que responden correctamente frente a estos patógenos: TLR3, TLR7, TLR8a/b, TLR9 Y TLR22, siendo el último descrito solamente en peces (Medina Gali, 2017).

TLR3 y TLR22 muestran una semejanza con respecto a su localización celular y función molecular, además de su capacidad para detectar la replicación viral mediante la unión al ARN bicatenario (dsRNA, *Double-stranded RNA*) o a su análogo poly I:C (ácido poli-inosínico:poli-citidílico, dsRNA sintético). Concretamente, las transcripciones de TLR3 en el pez cebra fueron reguladas en respuesta a la infección con rhabdovirus cabeza de serpiente (SHRV, *snakehead rhabdovirus*), virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV, *viral haemorrhagic septicaemia virus*) y durante el estadio larvario donde se observó una infección sistémica transmitida por el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV, *spring viraemia of carp virus*).

Por el contrario, TLR7 y TLR8 reconocen específicamente ARN monocatenario (ssRNA, *Single-stranded RNA*), y su modulación ha sido confirmada contra SVCV; mientras que TLR9, reconoce el ADN CpG no metilado encontrado en los genomas virales.

Estos últimos TLR han sido poco estudiados en pez cebra, pero se asume que presentan una funcionalidad similar en este organismo, por la extrapolación de datos obtenidos en estudios realizados con compuestos sintéticos antivirales, como por ejemplo las imidazoquinolinas, en otras especies de peces (Varela et al., 2017).

#### 1.4.2. Receptores tipo I inducidos por el ácido retinoico (RLRs, *Retinoic acid-inducible gene I-like receptors*)

Esta familia de receptores citosólicos está compuesta por tres componentes: gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I, *retinoic acid-inducible gene I*), factor 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5, *melanoma differentiation associated factor 5*) y laboratorio de genética y fisiología 2 (LGP2, *laboratory of genetics and physiology 2*).

Los dos primeros son inmunoestimulados por las diferentes poly I:C, ya que estos compuestos sintéticos simulan las propiedades inmunoestimuladoras de los ARN de doble cadena. Esta propiedad los hace candidatos potenciales para su utilización como adyuvantes en vacunas (Papic et al., 2015).

Con respecto a LGP2, su función es controvertida, dado la existencia de estudios que indican que se une con mayor afinidad al ARN (ssRNA y dsRNA) que los receptores RIG-1 y MDA5 (Moresco & Beutler, 2010), mientras que otros sugieren que tiene roles positivos y negativos en el reconocimiento vírico (Zhu et al., 2014).

Estudios realizados en el pez cebra, muestran que las cascadas de señalización activadas tras el reconocimiento viral por los receptores RLRs, son muy similares a los encontrados en vertebrados superiores (Varela et al., 2017).

#### 1.4.3. Receptores de dominio de oligomerización de nucleótidos (NLRs, *Nucleotide oligomerization domain-like receptors*)

Comprenden una familia de receptores intracelulares de reconocimiento de patógenos que pueden activar el sistema inmune innato vía factor nuclear kappa B (NFκB), la señalización del interferón (IFN), proteín-quinasas activadas por mitógenos (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) e inflammasoma.

Solamente NLRP3, NLRC2, NLRX1 y NLRC5 se han asociado con la detección viral, concretamente muchos virus que afectan a humanos activan los inflamasomas NLRP3, por el contrario, en el pez cebra, a pesar de los múltiples NLRs localizados en su genoma no se encontraron indicios de su implicación en la infección viral (Varela et al., 2017).

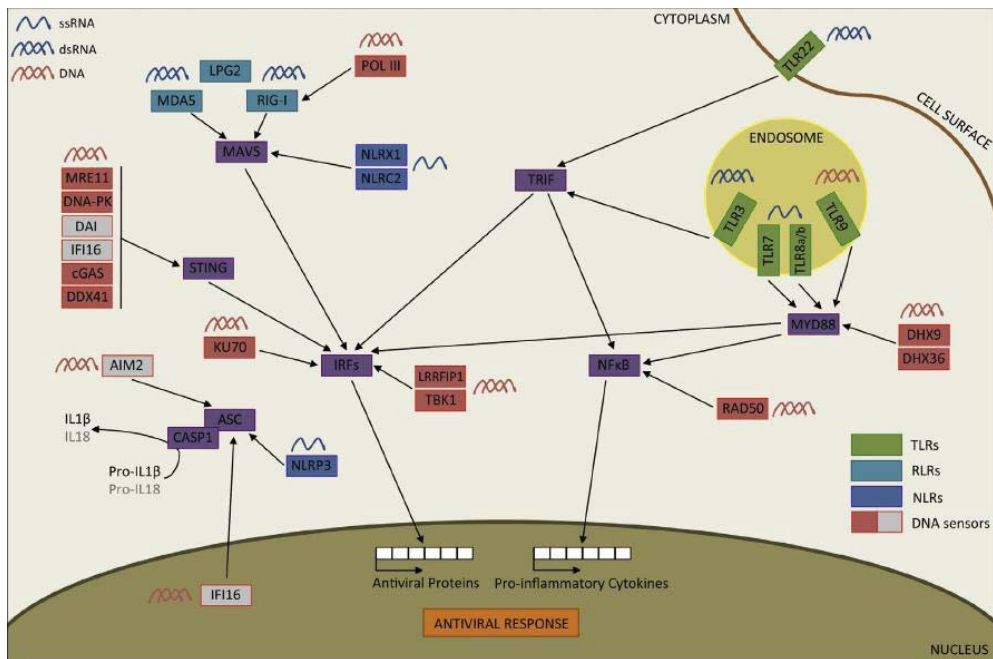


Figura 2. Receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptors*) del pez cebra Varela et al., 2017).

### 1.5. Tipos celulares implicados en respuesta inmune

Entre los componentes celulares implicados en la respuesta inmune innata que presenta el pez cebra, destacan los **Macrófagos** y **Neutrófilos**, los cuales tienen características morfológicas y funcionales similares a las encontradas en mamíferos (Varela et al., 2017).

Los primeros, cuentan con funciones enfocadas frente microorganismos patógenos (bacterias, virus, hongos y parásitos) mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-23 o citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ . Los segundos, son los primeros en migrar al sitio de inflamación, envolviendo y reteniendo en su interior los cuerpos extraños causantes de la infección (Gatica, 2018).

Otros componentes asociados a la respuesta inmune son las **células citotóxicas no específicas** (NCCs), consideradas evolutivamente como precursoras de las células *Natural Killer* de mamíferos, cuya funcionalidad se encuentra todavía en estudio (Medina Gali, 2017).

Las **células dendríticas** se encargan del reconocimiento de antígenos, y posteriormente inducen la diferenciación de una célula T *native* a una célula T colaboradora (Th, *T Helper*), que pueden producir INF- $\gamma$  como las Th1.

Finalmente, las células innatas de origen linfóide son las **Natural Killer**, cuya funcionalidad es producir INF- $\gamma$ , encargado de activar a los macrófagos para destruir a los patógenos (Gatica, 2018).

## 1.6. Sistema interferón

El Interferón (IFN) está formado por un grupo de citoquinas helicoidales de clase II, que representa el primer sistema de defensa empleado por los peces para establecer un estado antiviral, que en determinados casos, está capacitado para controlar una infección viral sin la necesidad de la intervención de la inmunidad adaptativa (Varela et al., 2017; Pérez, 2019).

La inducción de estas moléculas tras la entrada en contacto con un virus, provoca la transcripción de genes estimuladores por interferón (ISGs, *interferon-stimulated genes*), que codifican proteínas efectoras que limitan la replicación viral restringiendo su propagación a las células vecinas. Las ISGs mejor estudiadas dentro de la ruta del IFN en peces son la proteína Mx y Viperina (Vig-1), siendo la primera utilizada para determinar la activación del sistema interferón mediante la cuantificación de sus niveles de expresión (Pérez, 2019).

### 1.6.1. Estructura molecular

En peces teleósteos estas moléculas se han clasificado en dos familias:

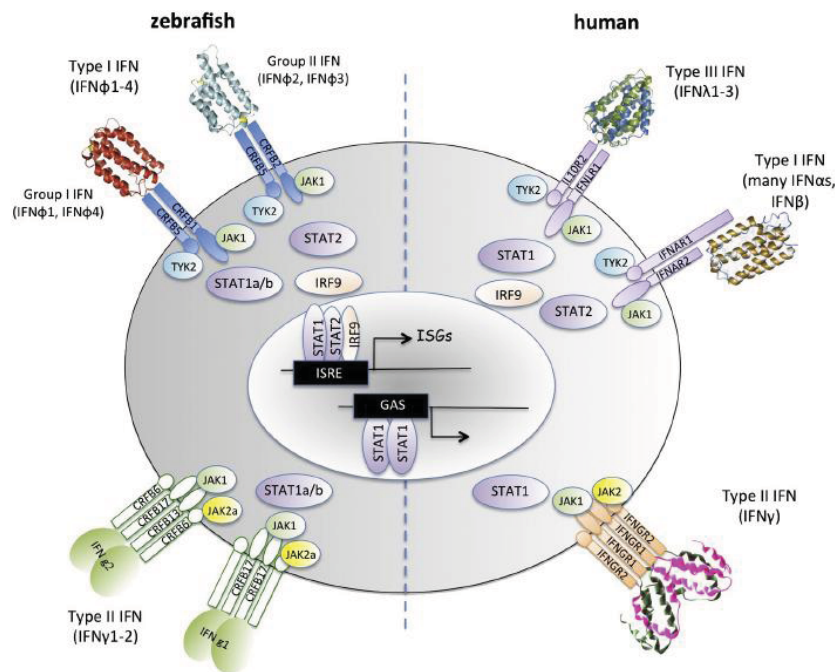
- Interferón tipo I (IFN-I), el cual lo produce cualquier tipo celular en respuesta a un virus, confiriendo un estado de defensa antiviral.
- Interferón tipo II (IFN-II), producido por células *Natural Killer* y Linfocitos T en respuesta a Interleucina 12 (IL-12), Interleucina 18 (IL-18), mitógenos o antígenos.

Dentro del IFN-I se pueden distinguir 2 subconjuntos principales, en base al número de residuos de cisteína (C) presentes en el péptido maduro. El Grupo I cuenta con 2C, y se encuentra presente en todas las especies de teleósteos, mientras que el Grupo II presenta 4C y está limitado a salmónidos, silúridos y ciprínidos (Álvarez de Haro, 2015).

Concretamente, en el pez cebra hay 4 genes IFN inducidos por virus (conocido como IFN $\phi$ ), que señalizan a través de receptores diferentes, y presentan protección antiviral (Fig.3) (Langevin et al., 2013; Varela et al., 2017).

En mamíferos los IFNs han sido clasificados en 3 tipos:

- “Interferones inducidos por virus”: Interferón tipo I (IFN-  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\epsilon$  y  $\kappa$ ) y III (IFN-  $\lambda$ ), agrupados con esta terminología por poseer una verdadera especialización como citoquinas antivirales innatas.
- Interferón tipo II (IFN $\gamma$ ): citoquina reguladora tanto de inmunidad innata como adaptativa, más especializada en bacterias intracelulares (Langevin et al., 2013)



**Figura 3. Representación esquemática de la estructura molecular de los distintos Interferones (IFN) y sus receptores en pez cebra y humanos (Langevin et al., 2013).**

### 1.6.2. Vía de señalización

A pesar de la correcta identificación de los receptores de IFN tipo I en el pez cebra, la estructura detallada de su vía de señalización no se encuentra bien caracterizada, por lo que se infiere principalmente en el mecanismo de mamíferos, dada la homología entre los IFN tipo I de peces codificados por genes que contienen intrones con los IFN tipo I de mamíferos (Langevin et al., 2019).

Ante el curso de una infección viral, el IFN-I es liberado a la sangre y se une a su receptor celular (IFNR) desencadenando la vía de señalización intracelular JAK/STAT (Álvarez de Haro, 2015).

Tras la asociación del IFN-I con su receptor, se produce el reclutamiento y unión de quinasas TYK2 y JAK1 a IFNAR1 e IFNAR2, respectivamente. A continuación, estas quinasas promueven la fosforilación de las proteínas STAT1 y STAT2 antes de su oligomerización (Fig.3).

Posteriormente, la conjugación de IRF9 citoplasmático con los oligómeros STAT1 / 2 genera el complejo ISGF3 (factor genético estimulado por IFN), que induce la transcripción de ISG después de unir elementos de respuestas nucleares estimulados por IFN en su promotor.

Por el contrario, los IFN de tipo II señalan después de unirse a IFNGR1–2 reclutando JAK1 y JAK2, promoviendo la fosforilación del homodímero STAT1. Como consecuencia, STAT1 se transloca directamente al núcleo y se une a un elemento GAS (sitio activado por gamma IFN), mediando así la regulación ascendente de un amplio repertorio de genes, superponiéndose en parte con la respuesta mediada por IFN tipo I (Langevin et al., 2013).

En el caso del pez cebra, su genoma codifica para dos parálogos diferentes del gen stat 1 (stat1a y stat1b), pero sus funciones en la regulación de la ruta del IFN siguen sin ser claras. Además, en lo referente al resto de quinasas, algunos autores, han propuesto que TYK2 podría estar asociado a CRFB5, mientras que JAK1 lo estaría a CRFB1 y 2. Esto supondría la activación de la vía de señalización de IFN y a la transcripción de Viperina (Fig. 3) (Langevin et al., 2013).

### 1.7. Vacunas ADN

Las vacunas de ADN son plásmidos derivados de bacterias que contienen un gen codificador del antígeno deseado que inducen una respuesta inmunitaria celular y humoral. Al no contener el agente patógeno, son más seguras que otras vacunas tradicionales.

La estructura y componentes de un plásmido son: el gen de interés, que se encuentra bajo el control de un promotor (CMV el más utilizado), al que se unen diversos factores de transcripción para guiar y activar a las polimerasas. Seguido del gen de interés, se encuentra una señal de poliadenilación, que contiene las secuencias apropiadas para estabilizar los transcritos de dicho gen. Finalmente, para facilitar su selección en cultivos de bacterias transformadas, presentan diversos genes de resistencia a antibióticos (Fig.4) (Mota-Sánchez, 2009).

De cara a aumentar la inmunogenicidad de estas vacunas, se está desarrollando la administración conjunta de estas con adyuvantes moleculares, incluidos en el propio plásmido, aumentando la protección y duración de la vacuna. Entre estos adyuvantes moleculares destacan diferentes citoquinas, como las interleuquinas o el interferón (Jiménez et al., 2016).

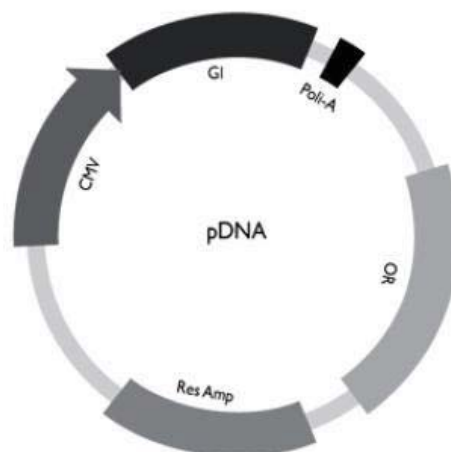


Figura 4. Representación esquemática de un vector típico de vacunas de ADN. CMV: región del promotor. GI: gen de interés. Res: gen resistencia antibiótico (en este caso Ampicilina (AMP)). OR: origen replicación de bacterias (Mota-Sánchez, 2009).

### 1.7.1. IFN como adyuvante

Los primeros informes que mostraron una alta capacidad adyuvante del IFN-I en peces fueron los desarrollados por Chang et al. (2015), utilizando una vacuna de ADN administrada por vía intramuscular (i.m.), sola o en combinación con plásmidos de expresión para IFNa1 (grupo 1), IFNb o IFNc (grupo 2). La combinación de ambos tipos de IFN mejoraron la protección frente a la infección vírica, incluso 10 días post-vacunación.

En el caso de mamíferos, se ha estudiado la capacidad de las células dendríticas (DC) para la presentación cruzada de antígenos, donde el IFN tipo I ayudan a la diferenciación de DC, generando una alta eficacia de vacunación (Langevin et al., 2019).

## 2. OBJETIVOS

El pez cebra es uno de los organismos modelo en el que actualmente se están centrando gran parte de los estudios de investigación biomédica y procesos biológicos, por sus ventajas significativas con respecto a otros organismos. Dado que el grado de homología con genes humanos asociados a enfermedades supera el 80%, justifica la revisión bibliográfica que se presenta en el siguiente trabajo. En este sentido los objetivos propuestos en esta revisión bibliográfica han sido:

1. Realizar un revisión bibliográfica detallada de las aplicaciones del pez cebra como organismo modelo para el estudio de enfermedades virales en peces.
2. Analizar los resultados obtenidos en esta especie para determinar la capacidad antiviral del mecanismo molecular implicado en su respuesta inmune innata: El sistema interferón (IFN).
3. Estudiar las aplicaciones del sistema interferón en el desarrollo de vacunas de ADN.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Dado el carácter bibliográfico de esta memoria, la información obtenida se ha extraído de bases de datos como: NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), Scielo, Scopus, WoS (*Web of Science*) o Google Scholar, así como a través de la consulta de citas bibliográficas empleadas en los artículos científicos utilizados.

Inicialmente se han empleado palabras clave muy generalizadas como: pez cebra (*Danio rerio*), modelo de laboratorio, modelo de infección, virus de peces, vacuna o inmunidad.

A medida que se ha adquirido mayor grado de especialidad y conocimiento del tema a desarrollar se han utilizado palabras clave como: vacuna DNA, adyuvante, inmunidad innata, SVCV (virus de la viremia primaveral de la carpa), respuesta antiviral o IFN.

Para mejorar la amplitud de la búsqueda, se ha recurrido a la utilización de términos tanto en español como inglés, durante un período que comprende desde el 07/04/2020 hasta 17/07/2020.

Cabe mencionar que para garantizar una información lo más actualizada posible, los artículos anteriores al año 2000 no se han utilizado para el desarrollo del presente informe. Además, salvo casos excepcionales que resultaron relevantes para continuar con este proyecto, gran parte de los artículos son de publicaciones recientes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Pez cebrá como modelo de infecciones virales en peces

Las grandes densidades de los stocks asociadas al cultivo intensivo producen una alteración en el equilibrio ambiente-patógeno-hospedador, aumentando la vulnerabilidad de los individuos a los agentes patógenos (bacterias, virus y parásitos), que cursan con gran severidad y se transmiten con rapidez a través del agua (Embregts & Forlenza, 2016; Jiménez et al., 2016).

Es por ello que múltiples estudios han recurrido a la utilización del pez cebrá como modelo para el estudio de la interacción hospedador-patógeno. Esto puede permitir dilucidar determinados aspectos asociados a su desarrollado sistema inmune y obtener posibles tratamientos eficaces para paliar las elevadas tasas de mortalidades asociadas, especialmente, a agentes víricos.

Numerosas investigaciones, tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que el pez cebrá es susceptible a una amplia variedad de virus de ARN y ADN (Tabla 3).

Familia	Tipo	Nombre	Abreviatura
Rhabdoviridae	ARN	Virus de la viremia primaveral de la carpa	SVCV, <i>spring viraemia of carp virus</i>
Rhabdoviridae	ARN	Rabdovirus cabeza de serpiente	SHRV, <i>snakehead rhabdovirus</i>
Rhabdoviridae	ARN	virus de septicemia hemorrágica viral	VHSV, <i>viral haemorrhagic septicaemia virus</i>
Rhabdoviridae	ARN	Virus de necrosis hematopoyética infecciosa	IHNV, <i>infectious hematopoietic necrosis virus</i>
Birnaviridae	ARN	Virus de la necrosis pancreática infecciosa	IPNV, <i>infectious pancreatic necrosis virus</i>
Nodaviridae	ARN	Virus de necrosis nerviosa	NNV, <i>nervous necrosis virus</i>
Retroviridae	ARN	Retrovirus endógeno del pez cebrá	ZFERV, <i>zebrafish endogenous retrovirus</i>
Iridoviridae	ADN	Virus de la necrosis infecciosa del bazo y riñón	ISKNV, <i>infectious spleen and kidney necrosis virus</i>

Tabla 3. Tipos de virus que tienen capacidad para infectar al pez cebrá (Rakus et al., 2019)



A continuación se presentan una serie de estudios donde utilizan el pez cebra como modelo de infección bajo los efectos patogénicos del virus SVCV , que demuestran la importancia del sistema interferón en el control antiviral, mediante el seguimiento de las proteína Mx y Viperina (Vig-1), por ser ISG bien caracterizadas y con propiedades antivirales (Rakus et al., 2019).

#### **4.2. Virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV)**

El virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) es miembro del género *Spirivivirus*, perteneciente a la familia Rhabdoviridae, con un genoma de ARN monocatenario negativo que contiene cinco marcos de lectura abiertos (ORF, *Open Reading frame*) (Ashraf et al., 2016).

Es uno de los modelos de infección viral más utilizados en el pez cebra (Rakus et al., 2019), donde se induce la infección mediante inyección intraperitoneal, en individuos adultos; o por microinyección en el torrente sanguíneo para inducir una infección sistémica, en larvas. Además, en ambos casos, es posible la infección mediante baños por inmersión (Varela et al., 2017).

Este tipo de modelo tiene gran utilidad para estudiar en profundidad el sistema interferón tipo I en peces y su eficacia frente a infecciones virales (Rakus et al., 2019).

##### **4.2.1. Signos clínicos externos**

Al inicio del curso de la infección se pueden apreciar síntomas inespecíficos, como exoftalmia y distensión abdominal; así como un oscurecimiento anatómico externo con branquias pálidas.

Los signos más característicos son las hemorragias petequiales epidérmicas, pero que pueden traspasarse a branquias, ojos y órganos internos, particularmente en las paredes de la vejiga natatoria.

A medida que aumenta la carga viral, aparecen otro tipo de lesiones que pueden incluir degeneración de las láminas branquiales, órganos internos edematosos, bazo hinchado y de textura gruesa, necrosis hepática, enteritis y pericarditis (Ashraf et al., 2016).

##### **4.2.2. Tasa de mortalidad**

El SVCV es uno de los virus con mayor impacto en la supervivencia de los individuos afectados, puesto que cuenta con una tasa de mortalidad muy elevada, y genera gran preocupación por su gran extensión a nivel mundial (Coll, 2016; Rakus et al., 2019).

La utilización del pez cebra como modelo de infección, permite llevar un seguimiento de la letalidad tras su exposición al patógeno. A medida que la carga viral aumenta, los individuos exhiben síntomas iniciales característicos de la enfermedad, hasta que se inicia la mortalidad en los peces infectados a partir del 3 día post-infección (dpi).

Puede producirse un incremento exponencial de la mortalidad a partir del 7dpi, cuyos valores pueden alcanzar el 80% a partir del 13dpi (Fig.5), hasta que finalmente se alcanza el 100% de la mortalidad de los individuos infectados, situación que ha sido descrita de forma coincidente en otros trabajos realizados con este virus (Medina Gali, 2017).

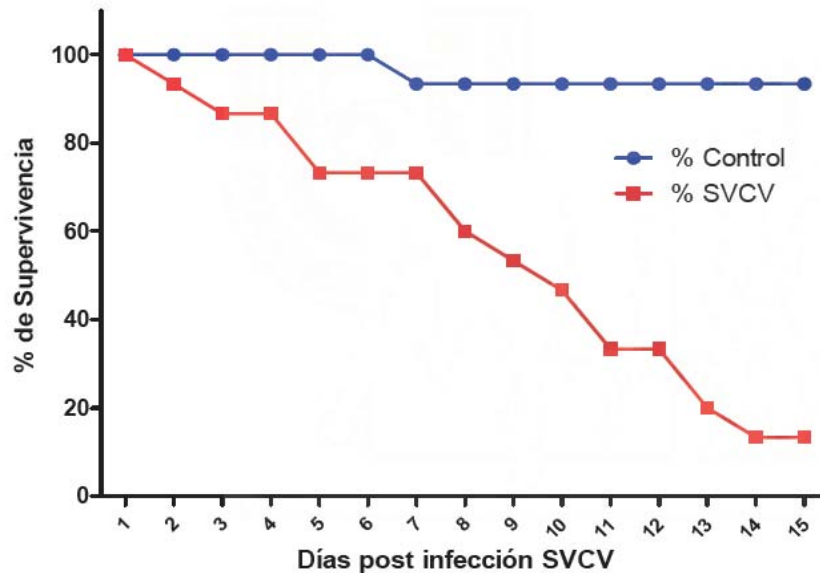


Figura 5. Análisis de supervivencia en pez cebra infectado con SVCV (Medina Gali, 2017)

#### 4.2.3. Histopatología

Debido a la escasez de informes sobre cambios histológicos en el pez cebra infectado con SVCV, los datos presentados a continuación muestran las patologías causadas por este virus en otras especies de peces en los que se replica, para mostrar de forma representativa su efecto en los diferentes tejidos.

Los cambios histológicos asociados con el riñón, pueden variar desde nefrosis renal hasta una necrosis intersticial multifocal (Fig.6), que también puede afectar al páncreas. Los túbulos renales pueden estar obstruidos por los moldes del tubo y pueden presentar vacuolación y degeneración hialina (Ashraf et al., 2016).

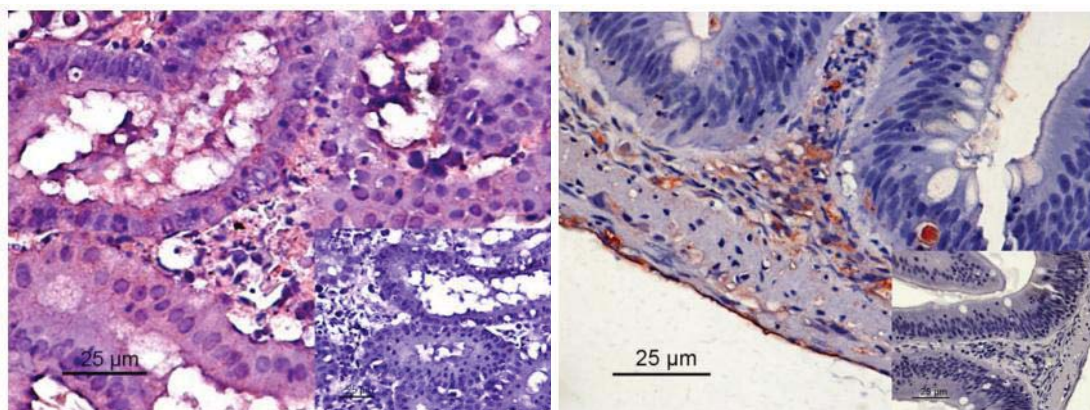


Figura 6. Histopatologías de *Pimephales promelas* tras 22 dpi con SVCV en riñón (Izquierda) y tras 25 dpi en intestino (Derecha) (Misk et al., 2015).

El corazón puede verse gravemente afectado mostrando pericarditis y miogeneración discontinua (Misk et al., 2015).

El hígado puede presentar varios signos de infección que pueden abarcar desde perivasculitis hasta panvasculitis, con un mayor grado de edematización, y pérdida de estructura de las paredes de los vasos sanguíneos. Además, el parénquima hepático puede mostrar hiperemia, necrosis multifocal y degeneración adiposa (Ashraf et al., 2016).

Con respecto al intestino, se observa con frecuencia una perivasculitis con atrofia posterior de La vellosidad (Fig.6) (Misk et al., 2015).

Para finalizar la descripción patológica, cabe destacar que la capa epitelial de la vejiga natatoria se transforma en una multicapa discontinua y las hemorragias se observan comúnmente en la submucosa (Ashraf et al., 2016).

#### 4.2.4. Datos *in vitro*

Estudios *in vitro* sobre la permisividad de una línea celular de fibroblastos derivada de embriones de 1 día de edad de pez cebra (ZF4), demuestran la elevada patogenicidad del virus (en un rango de temperaturas de 20-25°C), tras la evaluación de los cambios en la monocapa celular, que concluyen en la completa destrucción del cultivo celular tras 3-4 días post-infección (dpi), a causa de la inducción de un fuerte efecto citopático.

Mediante la utilización de una qPCR en tiempo real, también se puede probar la permisividad de esta especie a este virus, tras observar un aumento significativo en los niveles de ARN viral de células de 1 y 4 dpi en la línea celular ZF4. Para confirmar si esta condición puede darse en individuos adultos, se utiliza una línea celular derivada de fibroblastos de aletas caudales amputadas (SJD.1), donde obtuvieron resultados similares (Fig.7).

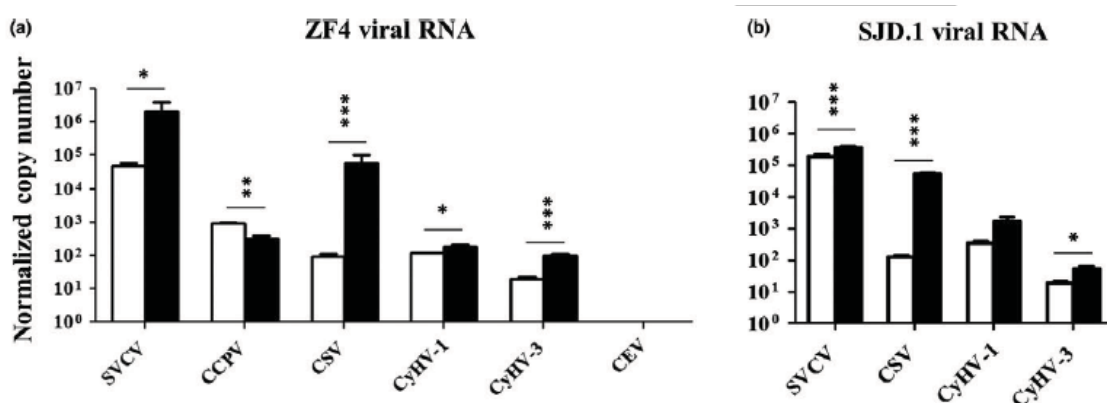


Figura 7. Carga viral tras la Infección *in vitro* de las líneas celulares ZF4 (Izquierda) y SJD.1 (Derecha) tras 1 dpi (barras blancas) y 4 dpi (Barras oscuras) con el virus SVCV (Rakus et al., 2019).

A continuación, los datos obtenidos para estudiar la respuesta inmune antiviral en células ZF4 y SJD.1, se muestran en la figura 8, donde se puede observar una regulación positiva significativa de la expresión de los genes que codifican para las proteínas Mx y vig-1 tras 1 y 4 dpi.

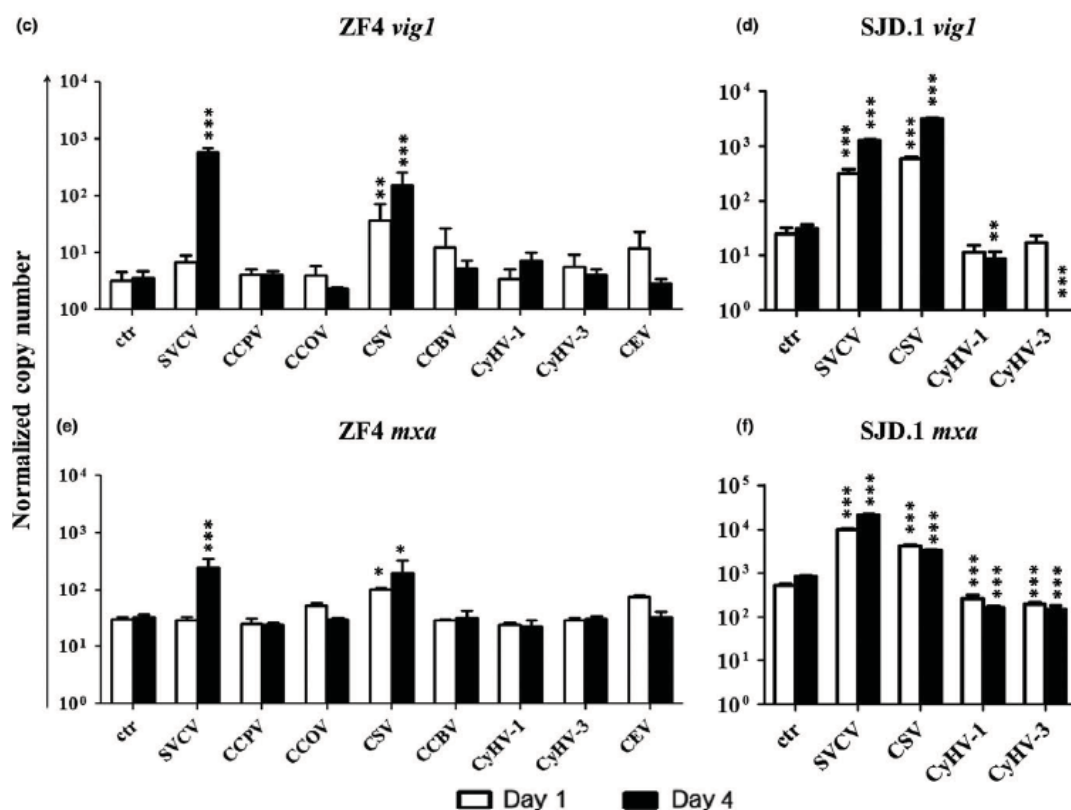


Figura 8. Control de la expresión de los genes que codifican para las proteínas Mx y Vig-1 tras la Infección *in vitro* de las líneas celulares ZF4 (Izquierda) y SJD.1 (Derecha) tras 1 dpi (barras blancas) y 4 dpi (Barras oscuras) con el virus SVCV (Rakus et al., 2019).

#### 4.2.5. Datos *in vivo*

Los estudios realizados *in vivo* en individuos adultos de pez cebra, tras su infección por microinyección muscular, muestran resultados coherentes con los datos obtenidos en experimentos *in vitro*, al observarse una regulación positiva de los genes *mx* y *vig-1*, que se correlacionan con un aumento de la carga viral (Fig.9). Este monitoreo de la expresión génica se determina en riñones y bazo tras 1 dpi y 3 dpi.

Cabe destacar la importancia de la toma de muestras en puntos estratégicos a lo largo del curso de la infección, puesto que las mayores tasas de mortalidad se producen entre los 2 y 5dpi (en este caso).

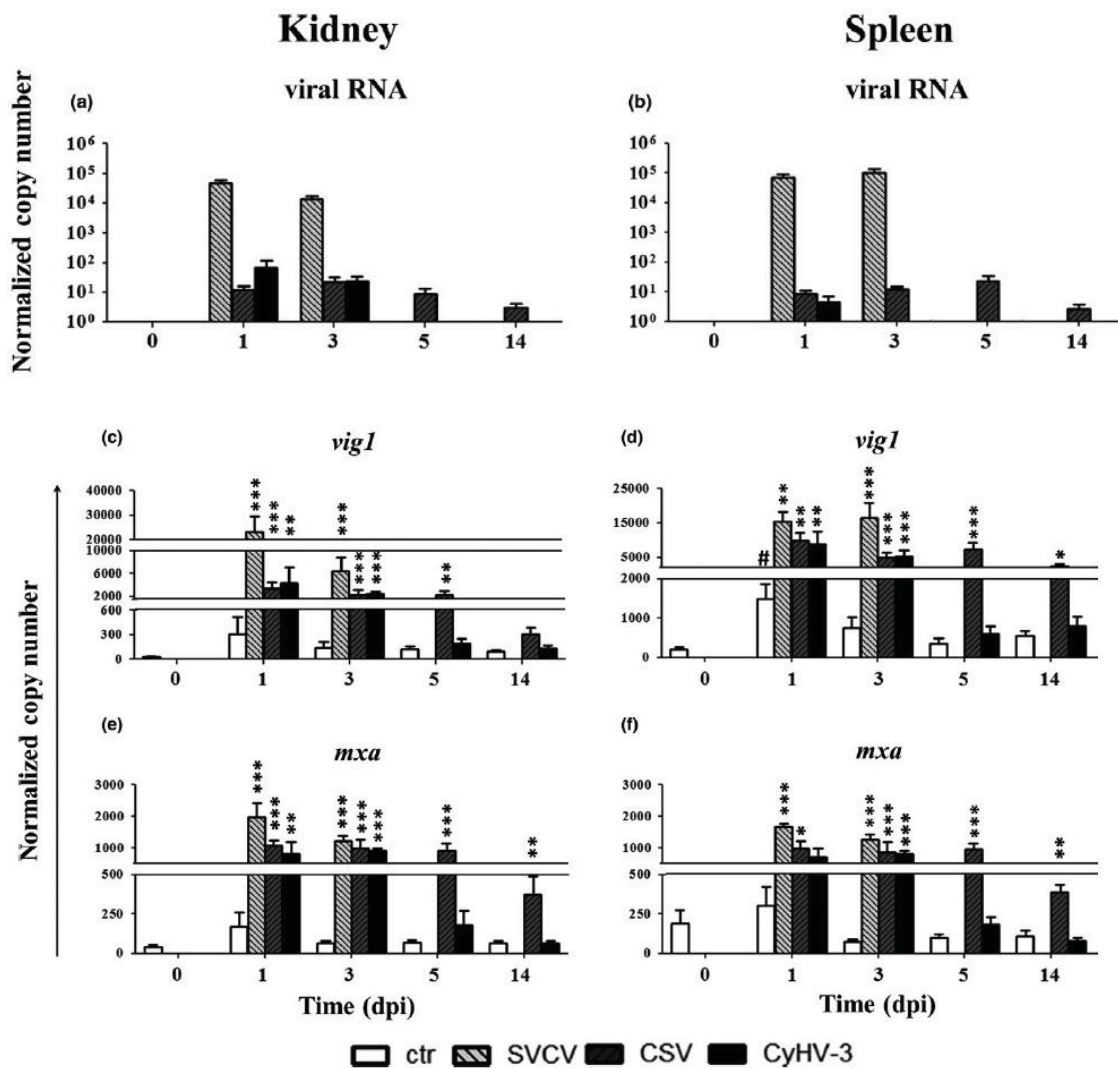


Figura 9. Infección *in vivo* de individuos adultos de pez cebra con SVCV (Barras grises) con el recuento de la carga viral y la expresión génicas de *mx* y *vig-1* (Rakus et al., 2019).

#### 4.3. Pez cebra como modelo para el estudio de vacunas

El pez cebra no solo tiene gran notoriedad como modelo de infección, sino como modelo de vacunación para infecciones víricas.

Se ha demostrado la eficacia de la utilización de vacunas en este organismo tras ser infectado con el virus VHSV, donde los índices de supervivencia varían en torno al 20 o 60% dependiendo de la dosis suministrada, frente a valores de mortalidad que pueden alcanzar el 80% en individuos no vacunados (Fig.10)

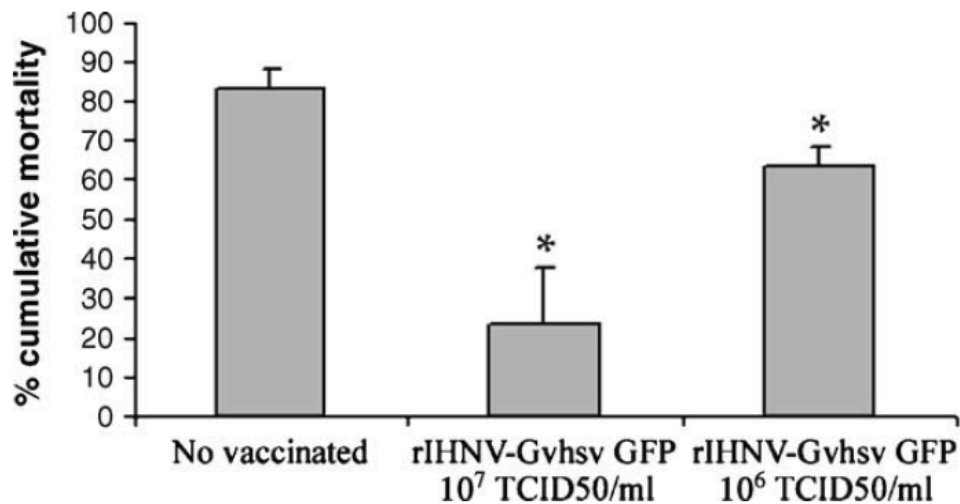


Figura 10. Recuento de la tasa de mortalidad entre individuos adultos de pez cebra no vacunados y con diferentes dosis de vacunación frente al virus VHSV (Novoa et al., 2006).

Además, la inoculación de la vacuna en este organismo no induce la aparición de una sintomatología externa, la cual es muy similar a la causada por el virus SVCV (dificultad o letargo en la natación, exoftalmia, cavidad visceral distendida y hemorragias anatómicas) ni tampoco daños en los diferentes órganos internos (Novoa et al., 2006).

Tras este tipo de observaciones, las investigaciones se centran cada vez más en el desarrollo de vacunas de ADN, por su mayor seguridad al utilizar únicamente el material genético de una proteína del virus, imposibilitando fenómenos de reversión.

Sabiendo esto, numerosos estudios sobre los virus VHSV o IHNV, aportan información sobre la protección heteróloga a corto plazo (1 semana) de este tipo de vacunas para hacer frente incluso a virus de otras familias como los Nodavirus (Jimenez et al., 2016).

Este tipo de protección a tiempos cortos post- vacunación, está mediada por el sistema inmune innato, por lo que se postula la mediación del sistema interferón de tipo I en esta protección.

Dicha hipótesis es demostrada tras observar la expresión de la proteína Mx inducida por IFN de tipo I en peces inmunizados con vacunas de ADN frente a VHSV o IHNV a los 7 días de inmunización (Lorenzen et al., 2002).

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en los apartados anteriores de esta memoria evalúan el uso del pez cebra, atendiendo a las múltiples ventajas que este organismo presenta, para el estudio de enfermedades infecciosas de origen viral en peces.

Se ha mostrado un mayor interés fundamental en la utilización del SVCV por ser un modelo bien descrito en el pez cebra, que ha permitido demostrar en primer lugar, su correcta replicación en el organismo mediante el seguimiento de los transcritos de ARN de los genes virales implicados, utilizando una qPCR en tiempo real; y segundo, la existencia de una regulación positiva de la expresión de genes antivirales, concretamente mx y vig-1, con atención especial por su implicación en la respuesta inmune innata, tras la exposición a este patógeno.

Las proteínas codificadas resultan cruciales para el estudio de la respuesta inmune antiviral, y permiten comprender mejor el funcionamiento del sistema interferón tipo I en peces y su impacto en la resistencia a infecciones virales.

Estos resultados sustentan la posibilidad de utilizar al pez cebra como modelo de infección, no solo para investigar la respuesta inmune innata a este virus sino para desarrollar estrategias terapéuticas o profilácticas para hacer frente a este tipo de enfermedades.

Atendiendo a los datos proporcionados con anterioridad, cabe destacar que hay determinados factores que pueden afectar a la cuantificación de los niveles de expresión génica, y como consecuencia, a la efectividad antiviral. Uno de esos factores es la edad de los individuos hospedadores, puesto que se ha observado una regulación más débil de genes que codifican para IFN tipo I y proteínas antivirales en larvas inyectadas por vía intravenosa con SVCV en comparación con peces adultos inyectados intraperitonealmente con el virus (Rakus et al., 2019).

A pesar de ello, estas variables no suponen un obstáculo para hacer frente al patógeno, puesto que con el transcurso de los días post infección, se puede observar una disminución de la regulación de estos genes, asociada a la rápida eliminación de la infección (Rakus et al., 2019).

Tras comprobar la capacidad antiviral del sistema IFN-I (a través de los ISG mx y vig-1), múltiples estudios se plantean la utilización de vacunas para incrementar su expresión en el tiempo. Los resultados de uno de esos estudios se han desarrollado en el apartado anterior, mediante la utilización del virus VHSV recombinante como vacuna viva atenuada, donde se muestran unos resultados positivos tras aumentar significativamente la tasa de supervivencia y disminuir el daño patológico externo e interno en los individuos vacunados.

No obstante, el método de vacunación más idóneo es por vía oral, puesto que se administra junto con la comida, pero se requiere seguir progresando en el refinamiento de este tipo de vacunas puesto que proporcionan una protección débil o corta.

Como consecuencia de esto, para alcanzar la efectividad deseada se necesita el establecimiento de un protocolo de vacunación que comience con la vacunación por inmersión, seguido de una dosis de refuerzo (por inmersión u oral) y finalmente una vacunación por inyección (Brudeseth et al., 2013).

Este proceso, no resulta rentable ni asegura la efectividad de la vacuna puesto que uno de los problemas asociados a las vacunas orales en peces, es la descomposición del antígeno en el ambiente gástrico hostil, pero también al ambiente intestinal altamente tolerogénico (Embregts & Forlenza, 2016).

Como solución a estos problemas el desarrollo de vacunas de ADN se encuentra en pleno auge, por su seguridad y eficacia al ser administrada por vía intramuscular. Es por ello que recientemente muy pocos estudios han comenzado a analizar su combinación con plásmidos que codifican IFN tipo I, al tener el potencial de mejorar aún más este tipo de vacunas, aumentando la longevidad de protección y reduciendo los costes (Langevin et al., 2019).

Entre estos estudios destaca el liderado por Chang et al. (2015), donde se utiliza un modelo de vacuna de ADN contra el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), informando por primera vez de la fuerte capacidad adyuvante del IFN-I. La vacuna se administra por vía intramuscular (i.m.) sola o en combinación con la expresión de plásmidos para IFNa1 (grupo 1), IFNb o IFNc (grupo 2). Los resultados obtenidos desvelan que la vacuna sola conduce a una protección deficiente, mientras que los tres IFN mejoran la protección contra ISAV tras 10 semanas post vacunación.

En otro estudio, también se han reportado de los efectos adyuvantes del IFNa intracelular de trucha arco iris sobre una vacuna de ADN que codifica la glucoproteína del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV). Los datos recopilados concluyeron, que los *Ab titers* que se observaron tras la inyección intramuscular solo con el plásmido IHNV G, alcanzaron su punto máximo a los 21 días post-vacunación; mientras tanto, la coinyección del plásmido iIFNa mantuvo los *Ab titers* en el nivel máximo hasta los 35 días post-vacunación (Cao et al., 2017).

Cabe destacar que la inyección intramuscular de un pequeño volumen de material, incluido el plásmido de la vacuna de ADN, puede provocar un daño tisular local y hemorragia, potenciando la aparición de otros tipos celulares inmunes que interactúen con las células transfectadas, afectando al análisis (Langevin et al., 2019).

Reuniendo todo este tipo de conocimientos, estos estudios realizados en peces pueden expandirse al área de la biomedicina, y utilizar al pez cebra como modelo de infección para las enfermedades virales humanas, dadas las similitudes existentes en los procesos mediados del sistema interferón que comparten ambos organismos.



En los últimos años se han establecido con éxito una serie de enfermedades virales humanas en el pez cebra. Gracias a su capacidad como modelo de laboratorio para la realización de exámenes químicos y genéticos, ha resultado ser crucial para el estudio de enfermedades que causan miles de muertes cada año, como es el caso del virus de la influenza A (IAV), un virus ampliamente estudiado, en gran parte debido a la amenaza de un brote pandémico (Varela et al., 2019).

Es por ello que dedicando un mayor esfuerzo en el estudio del sistema inmune de este organismo pueden obtenerse propuestas de futuro prometedoras, no solo para aumentar el control de las enfermedades virales, sino también para el desarrollo de nuevas vacunas o tratamientos antivirales con aplicaciones potenciales en biomedicina.

## **6. CONCLUSIONES**

La presente revisión bibliográfica muestra el potencial que puede tener el pez cebra como modelo de estudio de la patogénesis y respuesta antiviral contra enfermedades infecciosas en peces.

Diversos estudios demuestran que esta especie puede ser un excelente modelo animal para el estudio de la infección con un virus con elevada patogenicidad (SVCV), mediante el seguimiento de la regulación de los genes mx y vig-1 (ISGs del IFN-I), cuyos resultados sugieren una respuesta antiviral a la infección.

Es un hecho constatable que su uso como modelo de laboratorio también ha permitido aportar datos prometedores de la utilización del IFN-I como adyuvante molecular en vacunas de ADN frente enfermedades virales como VHSV o IHNV.

Con todo ello y debido a las múltiples ventajas que presenta, el pez cebra no sólo representa un buen modelo para el estudio de enfermedades víricas en peces, sino para el desarrollo de futuros modelos de infección de enfermedades virales humanas.

## **CONCLUSIÓNS**

A presente revisión bibliográfica mostra o potencial que pode ter o peixe cebra como modelo de estudo da patoxénese e resposta antiviral contra enfermidades infecciosas en peixes.

Diversos estudos demostran que esta especie pode ser un excelente modelo animal para o estudo da infección con un virus con elevada patoxenicidade (SVCV), mediante o seguimento da regulación dos xenos mx e vig-1 (ISGs do IFN-I), cuxos resultados suxiren unha resposta antiviral á infección.

É un feito evidente que o seu uso como modelo de laboratorio tamén permitiu aportar datos prometedores da utilización do IFN-I como adxuvante molecular en vacinas de ADN fronte enfermidades virais como VHSV ou IHNV.

Con todo isto e debido as múltiples vantaxes que presenta, o peixe cebra non só representa un bo modelo para o estudo de enfermidades virais en peixes, senón para o desenvolvemento de futuros modelo de infección de enfermidades virais humanas.

## **CONCLUSIONS**

This literature review shows the potential that zebrafish may have as a study model of pathogenesis and antiviral response against infectious diseases in fish.

Studies show that this species can be an excellent animal model for the study of infection with a virus with high pathogenicity (SVCV), by monitoring the regulation of the mx and vig-1 genes (ISGs of IFN-I), whose results suggest an antiviral response to infection.

It is a verifiable fact that its use as a laboratory model has also provided promising data on the use of IFN-I as a molecular adjuvant in DNA vaccines against viral diseases like VHSV or IHNV.

With all this and due to the multiple advantages that it presents, the zebrafish not only represents a good model for the study of viral diseases in fish, but for the development of future models of infection of human viral diseases.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez de Haro, N. (2015). Cultivos celulares para el desarrollo de vacunas DNA frente a virus de peces utilizando el modelo de trucha arco iris/rhabdovirus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV) (Doctoral dissertation, Universidad de León).
- Arteaga Almeida, C. A. (2017). Evaluación de la actividad anti-inflamatoria mediante modelos experimentales basados en el embrión de pez cebra. Aplicación a compuestos presentes en la Alimentación (Doctoral dissertation, Universidad de Barcelona).
- Ashraf, U., Lu, Y., Lin, L., Yuan, J., Wang, M., & Liu, X. (2016). Spring viraemia of carp virus: recent advances. *Journal of General Virology*, 97(5), 1037-1051.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M.T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S.,... & Martins, R.N. (2012). Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (69), e4196.
- Brudeseth, B.E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Løkling, K.E., Bordevik, M.,...& Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1759-1768.
- Cao, Y., Zhang, Q., Xu, L., Li, S., Wang, D., Zhao, J.,... & Lu, T. (2017). Effects of different cytokines on immune responses of rainbow trout in a virus DNA vaccination model. *Oncotarget*, 8(68), 112222.
- Chang, C.J., Sun, B., & Robertsen, B. (2015). Adjuvant activity of fish type I interferon shown in a virus DNA vaccination model. *Vaccine*, 33(21), 2442-2448.
- Coll, J.M. (2016). Prevalencia de las rabdovirus en la Acuicultura Europea. *Revista AquaTIC*, (6).
- Cubillos, M.A. (2017). Pez cebra como modelo de investigación biomédica. *Researchgate*. Recuperado de: <https://www.researchgate.net>
- Embregts, C.W., & Forlenza, M. (2016). Oral vaccination of fish: lessons from humans and veterinary species. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 118-137.
- Espinosa, M.B. (2016). El Pez Cebra: una herramienta en educación; Asociación de Docentes en Ciencias Biológicas de la Argentina; *Revista de Educación en Biología*; 19(1), 11-18.
- Gabor, K.A., Goody, M.F., Mowel, W.K., Breitbach, M.E., Gratacap, R.L., Witten, P.E., & Kim, C.H. (2014). Influenza A virus infection in zebrafish recapitulates mammalian infection and sensitivity to anti-influenza drug treatment. *Disease models & mechanisms*, 7(11), 1227-1237.

Gatica, M.A.C. (2018). Caracterización de las células inmunes innatas y adaptativas durante una inflamación intestinal gatillada por la ingesta de harina de soya en larvas de pez cebra (*Danio rerio*) (Doctoral dissertation, Universidad Andrés Bello).

Hsu, C.H., Wen, Z.H., Lin, C.S., & Chakraborty, C. (2007). The zebrafish model: use in studying cellular mechanisms for a spectrum of clinical disease entities. *Current neurovascular research*, 4(2), 111-120.

Jiménez, N., Coll, J., Estepa, A., & Tafalla, C. (2016). Futuro de las vacunas ADN frente a virus en Acuicultura. *Revista AquaTIC*, (23).

Langevin, C., Aleksejeva, E., Passoni, G., Palha, N., Levraud, J.P., & Boudinot, P. (2013). The antiviral innate immune response in fish: evolution and conservation of the IFN system. *Journal of molecular biology*, 425(24), 4904-4920.

Langevin, C., Boudinot, P., & Collet, B. (2019). IFN signaling in inflammation and viral infections: New insights from fish models. *Viruses*, 11(3), 302

Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., & LaPatra, S.E. (2002). Immunity induced shortly after DNA vaccination of rainbow trout against rhabdoviruses protects against heterologous virus but not against bacterial pathogens. *Developmental & Comparative Immunology*, 26(2), 173-179.

Medina Gali, R.M. (2017). Cambios a nivel epigenético y proteómico en pez cebra en respuesta a la infección con virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) (Doctoral dissertation, Universidad Miguel Hernández de Elche).

Moresco, E.M.Y., & Beutler, B. (2010). LGP2: positive about viral sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1261-1262.

Mota-Sánchez, J. (2009). Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud pública de México*, 51, s463-s469.

Novoa, B., & Figueras, A. (2012). Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases. In *Current topics in innate immunity II* (pp. 253-275). Springer, New York, NY.

Novoa, B., Romero, A., Mulero, V., Rodríguez, I., Fernández, I., & Figueras, A. (2006). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of vaccination against viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Vaccine*, 24(31-32), 5806-5816.

Papic, L., García, K., & Romero, J. (2015). Avances y limitaciones en el uso de los dsRNA como estrategias de control y prevención de enfermedades virales en sistemas acuícolas. *Latin american journal of aquatic research*, 43(3), 388-401.

Pérez, M.L.B. (2019). Descubrimiento y caracterización de la actividad antiviral inducida por las moléculas tipo crp de pez cebra (*Danio rerio*) (Doctoral dissertation, Universidad Miguel Hernández de Elche).

Rakus, K., Adamek, M., Mojżesz, M., Podlasz, P., Chmielewska-Krzesińska, M., Naumowicz, K.,... & Steinhagen, D. (2019). Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) as an animal model for the viral infections of fish. *Journal of fish diseases*, 42(6), 923-934.

Varela, M., Figueras, A., & Novoa, B. (2017). Modelling viral infections using zebrafish: innate immune response and antiviral research. *Antiviral research*, 139, 59-68.

Zhu, Z., Zhang, X., Wang, G., & Zheng, H. (2014). The laboratory of genetics and physiology 2: emerging insights into the controversial functions of this RIG-I-like receptor. *BioMed research international*, 2014.