



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterización molecular del reflejo inflamatorio y modulación de la respuesta inmune frente a infecciones en peces

Débora Alejandra Torrealba Sandoval

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Tesis Doctoral

2016

**Caracterización molecular
del **reflejo inflamatorio**
y modulación
de la **respuesta inmune**
frente a infecciones
en **peces****

Débora Alejandra Torrealba Sandoval

Caracterización molecular del reflejo inflamatorio y modulación de la respuesta inmune frente a infecciones en peces

Memoria presentada por

Débora Alejandra Torrealba Sandoval

Instituto de Biotecnología y de Biomedicina,
Parc de Recerca UAB, Universitat Autònoma de Barcelona



*para optar al grado de Doctor por la
Universitat de Barcelona*

Directores

Nerea Roher Armentia

Instituto de Biotecnología y de Biomedicina,
Parc de Recerca UAB,
Universitat Autònoma de Barcelona

Simon Mackenzie

Institute of Aquaculture, University of Stirling

Tutor

Josep Planas Vilarnau

Dept. de Fisiología e Inmunología,
Universitat de Barcelona

*A mi mamita,
mi mayor inspiración.*

Agradecimientos



Que difícil resumir en palabras el agradecimiento que siento por cada gesto, cada vivencia, cada mano amiga que han hecho posible este trabajo, lo que ha sido mi vida estos últimos años. Que no se resume solo en la realización del doctorado, sino que también en la decisión de dejar mi país y a mi familia por cumplir un sueño.

A Simon

Gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo y de ser parte de tu laboratorio. Por confiar en mí y por brindarme tu optimismo en los momentos difíciles.

A Nerea

Gracias por enseñarme desde lo más práctico del trabajo en el laboratorio hasta cómo abordar la ciencia. Por aceptar tomar este desafío a medio camino y por darme la oportunidad de aprender y mejorar cada día. Gracias por tu dedicación tanto dentro como fuera del laboratorio, y por toda la ayuda que nos brindaste a mí y a Danilo.

A mi grupo de Inmunología Evolutiva

Tanta gente que ha pasado por este grupo desde que llegue, que es tan difícil mencionarlos a todos sin olvidar a alguien. Desde los postdoc, hasta los estudiantes en prácticas, ha sido un gusto poder trabajar con ustedes y compartir nuestra pasión por la ciencia. Gracias por los consejos y por la ayuda que me dieron cada vez que lo necesite, sobre todo cuando perdía la cabeza con algún experimento.

A Joan Carles

Gracias por tenderme una mano en lo que fue la ardua tarea de esta tesis. No me termino de sorprender de como logras dar un toque de color y estilo a la ciencia, que tantas veces es tan monótona. Desde el trabajo científico hasta el artístico, eres un crack!.

A Visila

Lejos una de las mejores cosas que me han pasado en Europa fue conocerte. Más que una compañera, encontré en ti a una amiga con la que compartir la odisea del trabajo en el laboratorio, el escape perfecto en los momentos difíciles y una familia en las alegrías.

A mis amigos

Gracias por ser mi club de fans y darme las palabras precisas cuando las he necesitado, por permanecer a pesar de la distancia.

Ya vuelvo!!!

A mi familia

A Ricardo, a mis manis, Andrea, Valeria y Cony, y a mis sobrinos Camila y Alejandro, que siempre me han apoyado y brindado la confianza para seguir mis sueños, aunque, esto significará alegrarme de ustedes. Gracias por animarme a seguir adelante y alegrarse con locura por mis logros.

Los amo.

A mi mamita

Usted es mi mayor inspiración, mi pilar y mi guía. Sé que este camino ha sido largo, pero a pesar de las dificultades lo he disfrutado y vivido al máximo. Gracias por apoyarme en cada decisión, por enseñarme a volar y por hacerme sentir que estaba con ustedes, a pesar de la distancia. La amo.

A Danilo

Amor al fin! hemos sobrevivido a nuestra tercera tesis!. Gracias por estar aquí en cada paso, por sacrificar todo para que pudiera disfrutar esta aventura, por aceptar seguirme al otro lado del mundo. Este logro es tan mío como tuyo, sin ti esto no sería realidad.

A todos, gracias de corazón.

Contenidos

The image features a minimalist design. The top half is a plain white background. A large, white, curved shape, resembling a stylized 'C' or a wave, is positioned in the upper right. Below this, the background transitions into a dark grey, textured area. This textured area is composed of various shades of grey and black, with numerous overlapping circles and dots of different sizes, creating a complex, organic pattern. The overall aesthetic is modern and abstract.

Introducción

La acuicultura [15]

El sistema inmune en teleósteos [17]

Inmunología comparada [26]

El reflejo inflamatorio en el control de la inmunidad innata [27]

Modulando el sistema inmune [37]

Las nanopartículas como plataformas de entrega de inmunoestimulantes en la acuicultura [41]

Los cuerpos de inclusión [45]

Referencias [53]

Objetivos [75]

Capítulo 1

El receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 ($\alpha 7$ nAChR) modula la respuesta frente a poly (I:C) en macrófagos de trucha: estudio del reflejo inflamatorio en teleósteos.

Resumen [79]

Introducción [79]

Materiales y métodos [83]

Resultados [89]

Discusión [104]

Conclusiones [109]

Referencias [109]

Capítulo 2

Nanopartículas proteicas como plataforma de entrega de inmunoestimulantes para peces

Resumen [121]

Introducción [121]

Materiales y métodos [123]

Resultados [129]

Discusión [140]

Conclusiones [142]

Referencias [142]

Capítulo 3

Citoquinas recombinantes nanoestructuradas como candidatas para inmunoestimulantes de peces

Resumen [149]

Introducción [149]

Materiales y métodos [153]

Resultados [158]

Discusión [174]

Conclusiones [177]

Referencias [177]

Discusión y conclusiones generales

Discusión general [185]

Conclusiones generales [201]

Referencias [203]

Información suplementaria

Anexo 1. Información suplementaria para capítulo 1: El receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 ($\alpha 7nAChR$) modula la respuesta frente a poly (I:C) en macrófagos de trucha: estudio del reflejo inflamatorio en teleósteos. [217]

Anexo 2. Información suplementaria para capítulo 2: Nanopartículas proteicas como plataforma de entrega de inmunoestimulantes para peces. [225]

Anexo 3: Información suplementaria para capítulo 3: Citoquinas recombinantes nanoestructuradas como candidatas para inmunoestimulantes de peces. [229]

Abreviaturas

α nAChR [*Alpha nicotinic acetylcholine receptor*] Receptor nicotínico de acetilcolina alfa.

α -BTX [*Alpha bungarotoxine*] Alfa bungarotoxina.

ACh [*Acetylcholine*] Acetilcolina.

AChE [*Acetylcholinesterase*] Acetilcolinesterasa.

AF647 Alexa fluor 647.

AP-1 [*Activator protein 1*] Proteína activadora 1.

APC [*Antigen-presenting cell*] Célula presentadora de antígenos.

BL21(DE3) Cepa de *Escherichia coli*.

CAMP 1 [*Cathelicidin antimicrobial peptide 1*] Péptido antimicrobiano catelicidina 1.

CCL4 [*Chemokine (C-C motif) ligand 4*] Quimioquina (C-C motivo) ligando 4.

CD [*Cluster of differentiation*] Clúster de diferenciación.

ChAT [*Choline acetyltransferase*] Colina acetiltransferasa.

CI Cuerpo de inclusión.

CK6 [*CC chemokines CK6*] CC quimioquina CK6.

ClpA-Cepa de *E. coli* carente de la proteasa ClpA.

CLR [*C-type lectin receptor*] Receptor de lectina tipo C.

COX-2 Ciclooxigenasa 2.

CpG CpG oligodesoxinucleótido.

DAMP [*Damage-associated molecular pattern*] Patrón molecular asociado a daños.

EF1 α [*Elongation factor 1 alpha*] Factor de elongación 1 alfa.

ERM [*Enteric redmouth*] Enfermedad entérica de la boca roja.

FESEM [*Field emission scanning electron microscopy*] Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo.

FITC [*Fluorescein isothiocyanate*] Isotiocianato de fluoresceína.

GALT [*Gut-associated lymphoid tissue*] Tejido linfóide asociado al intestino.

GFP [*Green fluorescent protein*] Proteína verde fluorescente.

HKM [*Head kidney macrophage*] Macrófago de riñón anterior.

HK [*Head kidney*] Riñón anterior.

IEL [*Intraepithelial lymphocyte*] Linfocito intraepitelial.

IFN Interferón.

Ig Inmunoglobulinas.

IHNV [*Infectious haematopoietic necrosis virus*] Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa.

IL Interleuquina.

IMF Intensidad media de fluorescencia.

IPNV [*Infectious pancreatic necrosis virus*] Virus de la necrosis pancreática.

ISAV [*Infectious salmon anemia virus*] Anemia infecciosa del salmón.

IRFP [*infrared fluorescent protein*] Proteína fluorescente en el infrarrojo.

Jak2 Janus quinasa 2.

KHV [*Koi herpesvirus*] Koi herpesviriosis.

KPM335 Cepa de *E. coli* libre de endotoxina.

LPS Lipopolisacárido.

MD2 [*Myeloid differentiation factor 2*] Factor de diferenciación mielóide 2.

MDA5 [*Melanoma differentiation-associated protein 5*] Proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5.

MHC [*Major histocompatibility complex*] Complejo mayor de histocompatibilidad.

MMP9 [*Matrix metalloproteinase 9*] Metaloproteasa de la matriz 9.

Mx [*Myxovirus resistance*] Resistencia a mi-xovirus.

NF- κ B [*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*] Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NIC Nicotina.

NLR [*NOD-like receptor*] Receptor tipo NOD.

OIE [*Organization for animal health*] Organización para la salud animal.

PAMP [*Pathogen-associated molecular pattern*] Patrón molecular asociado a patógenos.

PAO1 [*Pseudomonas aeruginosa 1*].

PGN Peptidoglicano.

PLGA [*Poly(lactic-co-glycolic acid)*] Ácido poli (lactico-co-glicólico).

Poly (I:C) [*Polyinosinic-polycytidylic acid*] Ácido polirribonucleosídico-policitídico.

PRR [*Pattern recognition receptor*] Receptor de reconocimiento de patrones.

RIC-3 [*Resistance-to-cholinesterase 3*] Resistencia a la colinesterasa.

RIG-I [*Retinoic acid-inducible gene 1*] Gen inducible por ácido retinoico 1.

RLR [*RIG-I-like receptor*] Receptor tipo RIG I.

RPS [*Relative percentage of survival*] Porcentaje relativo de supervivencia.

SEAP [*Secreted embryonic alkaline phosphatase*] Fosfatasa alcalina embrionaria secretada.

SEM [*Scanning electron microscope*] Microscopio electrónico de barrido.

SOCS3 [*Suppressor of cytokine signalling 3*] Supresor de la señalización de citoquinas 3.

SPM [*Spleen macrophage*] Macrófago de bazo.

SP [*Spleen*] Bazo.

SRS [*Salmonid rickettsial septicemia*] Septicemia por rickettsia de salmónidos.

STAT3 [*Signal transducer activator of transcription 3*] Transductor de señal y activador de la transcripción 3.

SVC [*Spring viraemia of carp*] Viremia primaveral de la carpa.

TCR [*T cell receptor*] Receptor de células T.

TEM [*Transmission electron microscopy*] Microscopía de transmisión de electrones.

TICAM [*TIR domain-containing adapter molecule 1*] Dominio TIR de la molécula adaptadora 1.

TIR [*Toll/interleukin-1 receptor*] Receptor Toll/interleuquina 1.

TLR [*Toll like receptor*] Receptor tipo Toll.

TNF α [*Tumor necrosis factor alpha*] Factor de necrosis tumoral alfa.

TRIF [*TIR-domain-containing adapter inducing interferon beta*] TIR-dominio que contiene el adaptador de la inducción del interferón beta.

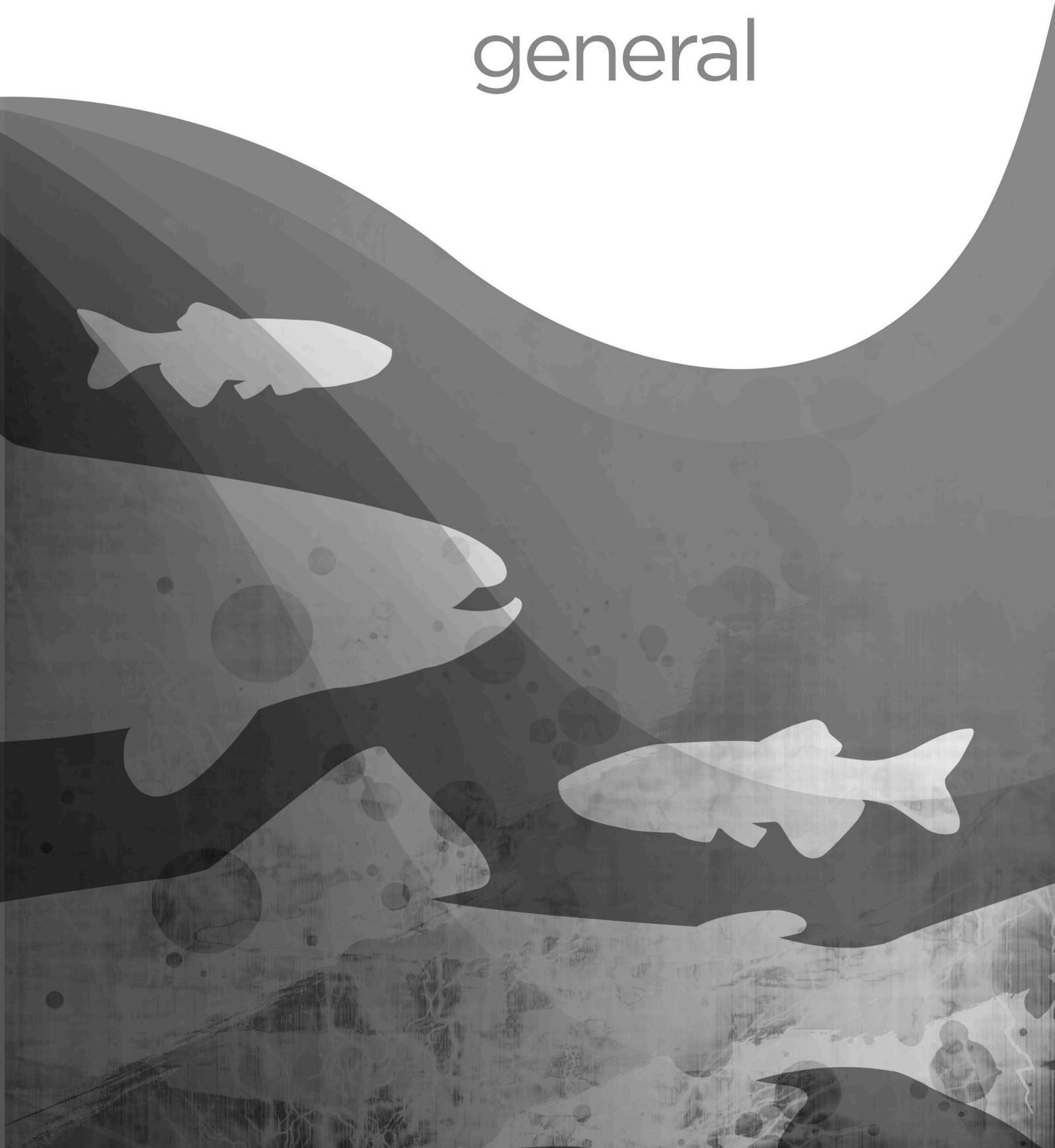
VHS [*Viral haemorrhagic septicaemia*] Septicemia hemorrágica viral.

VIG-1 [*Viperin 1*] Viperina 1.

VPI [*Viral protein 1*] Proteína viral 1.

ZFL [*Zebrafish liver cells*] Células de hígado del pez cebra.

Introducción general



La acuicultura

La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos como peces, crustáceos, moluscos y plantas acuáticas, tanto de agua dulce como marina. La acuicultura hace posible la producción selectiva de las especies más utilizadas para la alimentación humana (p. ej., el salmón, la ostra, la dorada, la trucha), la industria (p. ej., la algicultura) y el ocio (p. ej., la pesca deportiva) [1]. Además, la acuicultura complementa la cantidad de peces obtenidos mediante la pesca, lo que ofrece una solución a la creciente demanda de proteína para el consumo humano y alivia la presión sobre las poblaciones de peces silvestres, sobreexplotados por la pesca [2-4].

La producción acuícola ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. En 1970 la acuicultura representaba tan sólo el 3,9 % de la producción total de peces, a diferencia del 42,3 % del año 2012, donde se alcanzó un máximo de 90,4 millones de toneladas de producto a nivel mundial. China ha sido responsable en mayor parte de este aumento, como consecuencia de la expansión de su producción acuícola, representando un 61,7 % de la producción mundial total, que corresponden a 43,5 millones de toneladas de peces y a 13,5 millones de toneladas de algas (**Figura 1**) [2].



Figura 1. Producción mundial en pesca y acuicultura.

(de [2]).

Los teleósteos son un gran grupo conformado por alrededor de 40000 especies identificadas [5]. A nivel mundial, se estima una diversidad de aproximadamente 600 especies que son cultivadas en acuicultura, y que abarcan tres etapas de producción: incubación y criadero, crianza temprana y engorde. A pesar de la diversidad de especies disponibles para el cultivo, un 46 % de la producción total se basa en unas pocas especies como, la carpa, el barbo y otros ciprínidos [2, 6]. La acuicultura se puede desarrollar usando diferentes métodos de cultivos, como por ejemplo, sistemas de recirculación en tierra o en jaulas en lagos, ríos o mar adentro. En estos últimos casos, los peces de cultivo se crían a altas densidades en jaulas flotantes, con redes abiertas cerca de la costa (para la acuicultura marina) o en un lago o río (para la acuicultura en el interior), en la misma columna de agua que los peces silvestres [2, 7]. El cultivo a altas densidades puede aumentar las tasas de contacto entre individuos o entre hospedador y patógeno, resultando en un aumento de la transmisión y la persistencia de enfermedades [8]. El tipo de cultivo, junto con la alta densidad, hacen a la acuicultura altamente vulnerable a brotes de contaminación y enfermedades [3, 7]. Las enfermedades infecciosas son un grave problema, ya que los patógenos se transmiten rápidamente a través del agua y a grandes distancias. Un brote infeccioso provoca generalmente una alta mortalidad, así como una costosa descontaminación de las instalaciones y de los equipos, lo que conlleva importantes pérdidas económicas. Por ello, las enfermedades han sido identificadas como un importante factor limitante en la acuicultura [9]. Los principales agentes infecciosos causantes de enfermedades en la acuicultura son las bacterias (54,9 %) seguidos por los virus (22,6 %), los parásitos (19,4 %) y finalmente los hongos (3,1 %) [7].

El aumento de las enfermedades ha llevado a un incremento en el uso de productos químicos para su tratamiento, como antimicrobianos y antiparasitarios, lo que ha provocado problemas de resistencia a bacterias y parásitos [10, 11]. Algunas de las principales enfermedades causadas por bacterias son la yersiniosis (*enteric redmouth*, ERM) provocada por *Yersinia ruckeri*, la vibriosis producida por *Listonella anguillarum* y *Vibrio spp*, la furunculosis causada por *Aeromonas salmonicida*, la piscirickettsiosis (*salmonid rickettsial septicaemia*, SRS) ocasionada por *Piscirickettsia salmonis* [6]. Por otro lado, las enfermedades virales son más difíciles de controlar, siendo algunas de ellas de notificación obligatoria a la Organización para la salud animal (*Organization for Animal Health*, OIE). Algunos de los virus que son de declaración obligada se mencio-

nan a continuación: la necrosis hematopoyética infecciosa (*infectious haematopoietic necrosis virus*, IHNV), la anemia infecciosa del salmón (*infectious salmon anemia virus*, ISAV), Koi herpesvirosis (*koi herpesvirus disease*, KHV), viremia primaveral de la carpa (*spring viraemia of carp*, SVC) y la septicemia hemorrágica viral (*viral haemorrhagic septicaemia*, VHS) [6, 7].

La mayor parte del conocimiento del sistema inmune y de los patógenos de peces viene de las especies de interés para la acuicultura. En este contexto, el diagnóstico y la vacunación son de considerable importancia económica. Las principales especies de acuicultura de interés para la inmunología son la trucha arcoíris y el salmón del atlántico (*Oncorhynchus mykiss* y *Salmo salar*, Salmoniformes), la carpa y el carpín (*Cyprinus carpio* y *Carassius auratus*, Cypriniformes), el pez gato de canal (*Ictalurus punctatus*, Siluriformes), la tilapia, la lubina y la dorada (*Oreochromis niloticus*, *Dicentrarchus labrax* y *Spaurus aurata*, Perciformes), el lenguado (*Paralichthys olivaceus*, Pleuronectiformes) y el bacalao común (*Gadus morhua*, Gadiformes). El sistema inmune de algunas especies adicionales ha sido estudiado por su importancia económica, como la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*, Cypriniformes) y el pez mandarín (*Siniperca chuatsi*, Perciformes). Así mismo, algunas especies de agua dulce han sido investigadas por sus características como especies modelo, éstas incluyen al pez cebra (*Danio rerio*, Cipriniformes), el medaka (*Oryzias latipes*, Beloniformes) y el espinoso (*Gasterosteus aculeatus*, Gasterosteiformes) [5].

El aumento en la producción de la acuicultura en las últimas décadas ha ido acompañada de un incremento de enfermedades y brotes infecciosos que han llevado a importantes pérdidas económicas. Esto ha significado que sea imperativo la mejora y la creación de nuevos métodos de profilaxis, y de tratamientos para estas enfermedades. Un pilar fundamental para el desarrollo de nuevas tecnologías profilácticas es la comprensión que se tiene del sistema inmune. Un mayor conocimiento de las bases del funcionamiento del sistema inmune de teleósteos, permitiría crear sistemas más eficientes y en consonancia con las características específicas tanto del patógeno como del hospedador.

El sistema inmune en teleósteos

La principal función del sistema inmune es el reconocimiento y la eliminación de los patógenos para mantener la homeostasis del organismo. El sistema inmune está compuesto por dos ramas, el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa, se

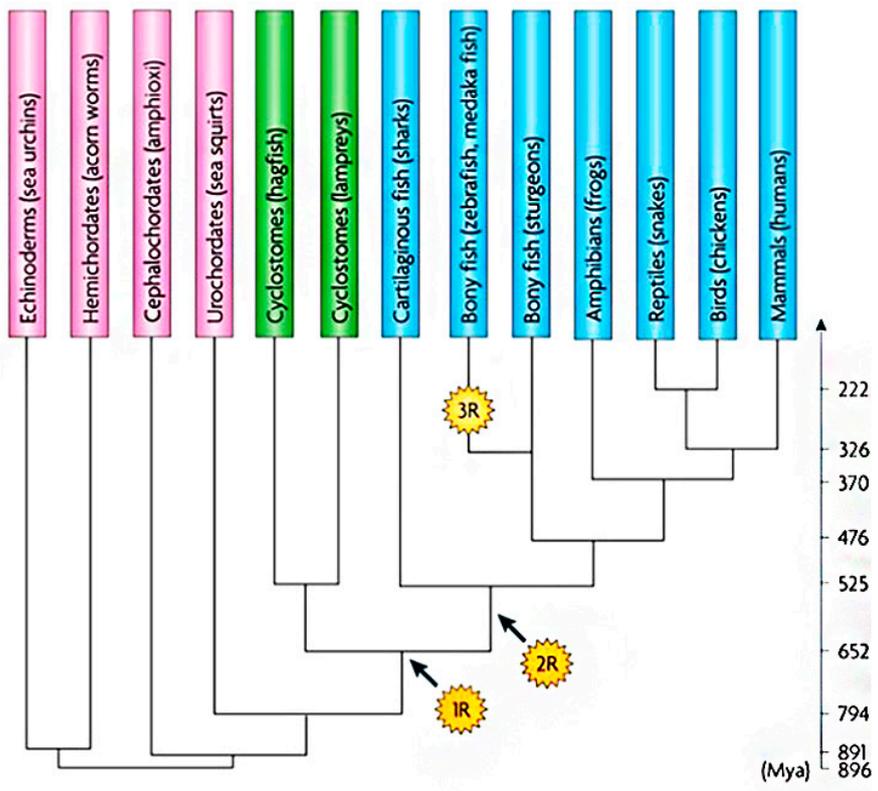
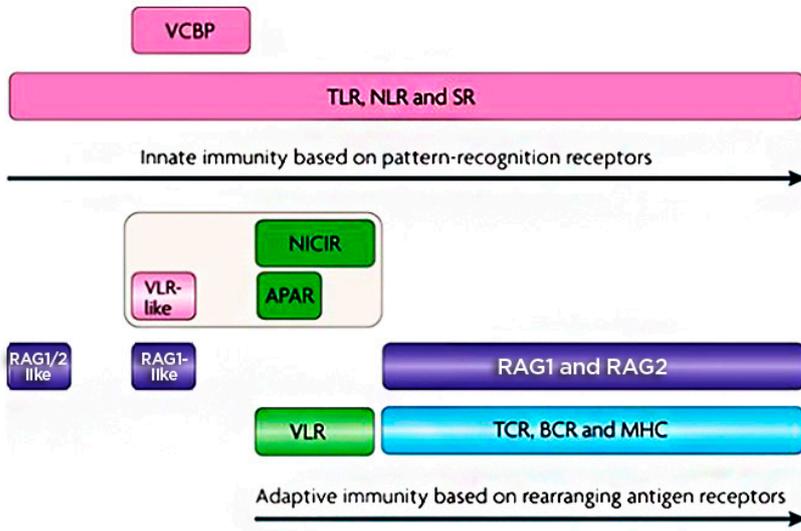
caracteriza por una respuesta rápida, que lleva a cabo el proceso de reconocimiento de los patógenos y la activación del sistema inmune adaptativo. Por otro lado, el sistema inmune adaptativo se caracteriza por su especificidad y se desarrolla por la selección clonal de un vasto repertorio de linfocitos que expresan receptores de antígenos específicos.

La ontogenia del sistema inmune en teleósteos ha sido descrita como un modelo primitivo de hematopoyesis [12]. En teleósteos marinos se desarrolla primero el riñón, seguido por el bazo y, por último el timo [13], estos son los principales órganos linfoides en peces, donde el riñón equivale a la médula ósea de vertebrados, siendo el principal órgano donde tiene lugar la hematopoyesis [14].

Evolutivamente hablando, el sistema inmune innato es filogenéticamente muy antiguo. Los metazoos diblásticos más primitivos (esponjas y celentéreos) presentan una barrera epitelial y amebocitos fagocíticos que cumplen un doble rol como células digestivas y defensivas, siendo los precursores de los macrófagos de vertebrados [15]. La generación de un sistema inmune adaptativo, al parecer, surgió abruptamente en los antepasados directos de los vertebrados mandibulados, hace 500 millones de años [16, 17] (**Figura 2**). Los peces cartilaginosos son los organismos vivos más antiguos con un sistema inmune adaptativo, ya que tienen inmunoglobulinas, receptores de antígenos de células T, complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*, MHC) clase I y II, bazo y timo [18]. Los peces óseos muestran una gran variabilidad en cuanto a los componentes que conforman su sistema inmune [19], esto se puede deber a que forman un grupo de vertebrados muy diverso, con 40000 especies descritas, en comparación con las 10000 especies identificadas en aves y los 5700 especies de mamíferos [5, 20].

Figura 2 (página siguiente). **Esquema general de la evolución del sistema inmune en deuteróstomos.**

Las moléculas restringidas a los vertebrados con mandíbulas y sin mandíbula se indican en azul y verde, respectivamente. Las moléculas que surgieron en la etapa de los invertebrados se indican en rosa. La recombinación de genes tipo RAG (se indican en morado). 1R y 2R indican las rondas de duplicación de todo el genoma (whole-genome duplication, WGD). Es una controversia, si la segunda ronda de duplicación del genoma, ocurrió antes o después de la divergencia de los vertebrados con mandíbulas o sin mandíbulas. Se muestra también el tiempo de divergencia de los animales (expresado en millones de años (million years ago, Mya)). Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), receptor tipo NOD (NLR), receptor scavenger (SR), receptor tipo Toll (TLR), región V que contiene el sitio de unión a quitina (VCBP), receptor de linfocitos variable (VLR) (de [17]).



El sistema inmune innato se basa en el reconocimiento de los patógenos para la iniciación de los mecanismos de defensa del sistema inmune y la subsiguiente activación de las cascadas de señales que contribuyen a la eliminación del patógeno [21]. La identificación de patógenos está mediada por receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*, PRRs). Los PRRs reconocen estructuras moleculares conservadas de los patógenos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) que inducen la respuesta inmune. Células especializadas del linaje mieloide en vertebrados como, macrófagos y neutrófilos, contienen un amplio número de receptores responsables del reconocimiento de PAMPs, tales como, peptidoglicanos (PGN), lipopolisacáridos (LPS), β 1,3-glucanos de hongos, ARN viral de doble cadena y ADN bacteriano. Este reconocimiento puede activar múltiples vías que contribuyen a la erradicación del patógeno, como por ejemplo, la opsonización y la fagocitosis, la atracción de células inmunes al sitio de infección y la inflamación local [22, 23].

El sistema inmune innato reconoce microorganismos a través de un número limitado de PRRs codificados en la línea germinal [24]. Los PRRs poseen tres características comunes: primero, reconocen componentes de patógenos que son esenciales para los microorganismos, y por lo tanto, es difícil para éstos modificarlos; segundo, los PRRs se expresan constitutivamente en el huésped y son funcionales independientemente de su ciclo de vida, y tercero, son de una línea germinal codificada, no clonal, expresado en todos los tipos celulares e independientes de la memoria inmunológica [24, 25]. Diferentes clases de PRRs han sido descritos, como los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores tipo RIG-I (RLRs), los receptores tipo NOD (NLRs) y los receptores tipo C (CLRs). Todos ellos se encuentran presentes en diferentes especies de organismos, incluyendo mamíferos, aves y teleósteos [26].

Los TLRs fueron los primeros PRRs en ser caracterizados por Lemaitre y colaboradores, que describieron en 1996 el primer receptor tipo Toll en *Drosophila* [27]. Posteriormente, en 1997 fue descrito el TLR4, su homólogo en humanos [28]. Hasta la fecha, se han caracterizado 12 TLRs funcionales en mamíferos. Cada TLRs puede detectar un tipo de PAMPs, aunque, algunos pueden reconocer una colección diversa de ligandos no relacionados estructuralmente. Por ejemplo, TLR4 puede reconocer una colección diversa de ligandos como, LPS, paclitaxel diterpeno de plantas, la proteína de fusión del virus respiratorio sincitial, fibronectina y proteínas de choque térmico, los cuales tienen diferentes estructuras. Los TLRs se pueden localizar en la superficie celular (TLR1, TLR2,

TLR4, TLR5 y TLR6) y reconocer PAMPs de bacterias, hongos y protozoos o expresarse en compartimentos intracelulares y reconocer ácidos nucleicos (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9). Los PAMPs bacterianos son reconocidos por el TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 y TLR9, mientras que, los ácidos nucleicos virales son reconocidos por TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 [24].

En teleosteos se han descrito 17 TLRs (TLR1, 2, 3, 4, 5S, 5, 7, 8, 9, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22 y 23), los cuales han sido identificados en una docena de especies diferentes [19] (**Tabla 1**). Su ortología sugiere que el mecanismo de reconocimiento de patógenos es similar al de sus homólogos en mamíferos [29], aunque, existen importantes diferencias.

PRR	Location	Recognized PAMPs	Mediated signaling pathway	Adaptors
<i>TLR</i>				
TLR1*	Plasma membrane	Triacyl lipoprotein	Associate with TLR2 mediated signaling pathway	TIRAP; MyD88
TLR2*	Plasma membrane	Lipoproteins; LAM	NF-κB signaling pathway	TIRAP; MyD88
TLR3*	Endosome	dsRNA; poly(I:C)	NF-κB signaling pathway; IRF3 mediated type I IFN production	TRIF
TLR4*	Plasma membrane	LPS	NF-κB signaling pathway	TIRAP; MyD88
	Phagosome	GIPIs; LPS	NF-κB signaling pathway; IRF3 mediated type I IFN production	TRAM; TRIF
TLR5*	Plasma membrane	Flagellin	NF-κB signaling pathway	MyD88
TLR6*	Plasma membrane	Diacyl lipoprotein	Associate with TLR2 mediated signaling pathway	TIRAP; MyD88
TLR7*TLR8*	Endosome	ssRNA	NF-κB signaling pathway; IRF7 mediated type I IFN production	MyD88
TLR9*	Endosome	CpG DNA	NF-κB signaling pathway	MyD88
	Lysosome-related organelles (LRO)		IRF7 mediated type I IFN production	MyD88
TLR10	Endosome	Unknown	Unknown	Unknown
TLR11*	Plasma membrane	Profilin	NF-κB signaling pathway	MyD88
<i>RLR</i>				
RIG-1*	Cytoplasm	dsRNA	NF-κB signaling pathway; IRF3 and IRF7 mediated type I IFN production	MAVS
MDA5*	Cytoplasm	Poly(I:C); dsRNA	NF-κB signaling pathway; IRF3 and IRF7 mediated type I IFN production	MAVS
<i>NLR</i>				
NOD1*	Cytoplasm	iE-DAP dipeptide; Virus	NF-κB signaling pathway; IRF3 mediated IFNβ production	RIP2
NOD2*	Cytoplasm	MDP; ssRNA	NF-κB signaling pathway; MAPK signaling pathway; IRF3 mediated IFNβ production	RIP2; MAVS
NLRC4	Cytoplasm	Flagellin	Inflammasome mediated signaling pathway; IL-1β mediated signaling pathway	-
NLRP1	Cytoplasm	Lethal toxins; MDP	Inflammasome mediated signaling pathway; IL-1β mediated signaling pathway	-
NLRP3	Cytoplasm	Toxins; Intracellular bacteria derived molecules; Viral ssRNA and dsRNA	Inflammasome mediated signaling pathway; IL-1β mediated signaling pathway	-
<i>CLR</i>				
DC-SIGN*	Plasma membrane	High mannose; Fucose	RAF1-p65 acetylation pathway; NF-κB signaling pathway	-
Dectin-1	Plasma membrane	β-1,3-glucan	SYK-CARD9 pathway; NF-κB signaling pathway; IL-1β mediated signaling pathway	-
Dectin-2	Plasma membrane	High mannose	SYK-CARD9 pathway; NF-κB signaling pathway	-
Mincle	Plasma membrane	α-Mannose	SYK-CARD9 pathway; NF-κB signaling pathway	-

Tabla 1. **Receptores de reconocimiento de patrones, PRRs.**

* indican PRRs identificados en peces. Abreviaturas: GIPIs, Glicosilfosfatidilinositol; LAM, lipoarabinomano; iE-DAP, ácido g-D-glutamil-meso-diaminopimélico; MDP, muramil dipéptido; MAPK, proteína de quinasas activadas por mitógenos; SYK, tirosina quinasa del bazo; CARD9, miembro de la familia de dominio de reclutamiento de caspasa 9 (modificado de [26]).

Por ejemplo, los receptores TLR14, TLR19, TLR20, TLR21, TLR22 y TLR23 no tienen su homólogo en mamíferos [23]. El TLR5S es una isoforma soluble de TLR5 que parece ser exclusiva de peces [30]. Adicionalmente, el TLR4 de mamíferos reconoce el LPS mediando el shock séptico, lo cual contrasta con la mayoría de especies de peces que carecen de este receptor, a excepción de los ciprínidos (el pez cebra (*D. rerio*); la carpa (*C. carpio*); el pez pequeño raro (*Gobiocypris rarus*)) y los silúridos (el pez gato (*I. punctatus*)) [31]. A pesar de la presencia del TLR4 en estas especies, estudios funcionales han demostrado en el pez cebra, que el TLR4 actúa como un regulador negativo de la señalización de TLR [32]. Además, hasta la fecha, todos los genomas secuenciados de peces carecen de las moléculas coestimuladoras esenciales para la activación de TLR4 por LPS (es decir, MD2 y CD14) [32]. Los TLRs se conservan en la mayoría de los vertebrados [33, 34], sin embargo, en teleósteos un considerable número de ellos tienen distintas características en comparación con los mamíferos, siendo mucho más diversos en peces [26].

A diferencia del sistema inmune adaptativo, el sistema inmune innato no es una entidad única, sino que el reconocimiento y la activación de este sistema está conformado por diferentes módulos, que conciertan una respuesta frente a una infección [35]. Éstos llevan a cabo diferentes funciones y están compuestos por variados elementos que van desde factores humorales a mecanismos celulares. Más de un módulo puede ser inducido durante la infección, por lo tanto, se encuentran funcionalmente unidos (p. ej., fagocitos y el sistema del complemento) y regulados por las mismas citoquinas [35] (**Tabla 2**).

Los teleósteos presentan la mayoría de los componentes descritos en el sistema inmune innato de mamíferos, siendo algunos de estos más diversos, por ejemplo, las lectinas, el sistema del complemento y los receptores de las células NK (*natural killer cells*, NK) [18, 36]. Por el contrario el sistema inmune adaptativo de teleósteos es menos variado, lo que puede deberse a que la respuesta del sistema adaptativo presenta algunas limitaciones como un repertorio de anticuerpos limitado, una baja maduración por afinidad y una memoria limitada [37]. Una de las primeras barreras físicas de los peces es el mucus, que recubre diferentes superficies como la piel, las branquias y el intestino. El mucus contiene una gran variedad de compuestos como, lectinas, lisozimas, proteínas del complemento, péptidos antibacterianos e inmunoglobulinas [38–41]. Un amplio rango de tipos celulares están involucrados en la respuesta inflamatoria de los peces. Los componentes celulares del sistema innato están compuestos por

macrófagos, monocitos, neutrófilos y células dendríticas, que tienen la capacidad de fagocitar [32, 42–44]. La fagocitosis es un importante proceso en animales poiquiloterms, el cual no está influenciado por la temperatura [45–47]. Además, las células B también poseen la capacidad de fagocitar, siendo capaces de matar bacterias internalizadas [48].

Innate host-defence module	Prototypical responses
Mucosal epithelia	Production of antimicrobial peptides Production of mucins
Phagocytes	Production of antimicrobial proteins Production of cytokines: IL-1 β , IL-6 and TNF
Acute-phase proteins and complement system	Lysis or opsonization of pathogens Chemotactic attraction of leukocytes
Inflammasomes	Production of IL-1-family members Apoptosis of infected host cells
NK cells	Apoptosis of infected host cells
Type-I-IFN-induced antiviral proteins	Induction of an antiviral state Apoptosis of infected host cells
Eosinophils and basophils	Contraction of smooth muscle Production of mucins Peristalsis Production of biogenic amines Production of cytokines: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 and TNF
Mast cells	Contraction of smooth muscle Production of mucins Peristalsis Production of biogenic amines Production of cytokines: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 and TNF

Tabla 2. **Módulos del sistema inmune innato de mamíferos.**

Lista de módulos y respuestas simplificadas del sistema inmune innato (modificado de [35]).

El **sistema inmune adaptativo** es regulado por el sistema inmune innato, el cual, una vez activado, libera citoquinas proinflamatorias que median la primera respuesta frente a la infección, y que activan la respuesta específica. Posteriormente, el sistema inmune adaptativo es capaz de activar mecanismos del sistema inmune innato [35] (**Figura 3**). El sistema inmune adaptativo es mediado por la acción de dos grupos principales de linfocitos clasificados como células B y T. Mientras las células B producen anticuerpos para neutralizar patógenos específicos, o etiquetarlos para que sean eliminados del sistema inmune, las células T liberan factores para coordinar la respuesta de otras células inmunes o factores citotóxicos que matan directamente las células infectadas o

anormales. Las células B y T presentan receptores de antígenos de especificidad única, llamados receptores de células T (*T cell receptor*, TCR).

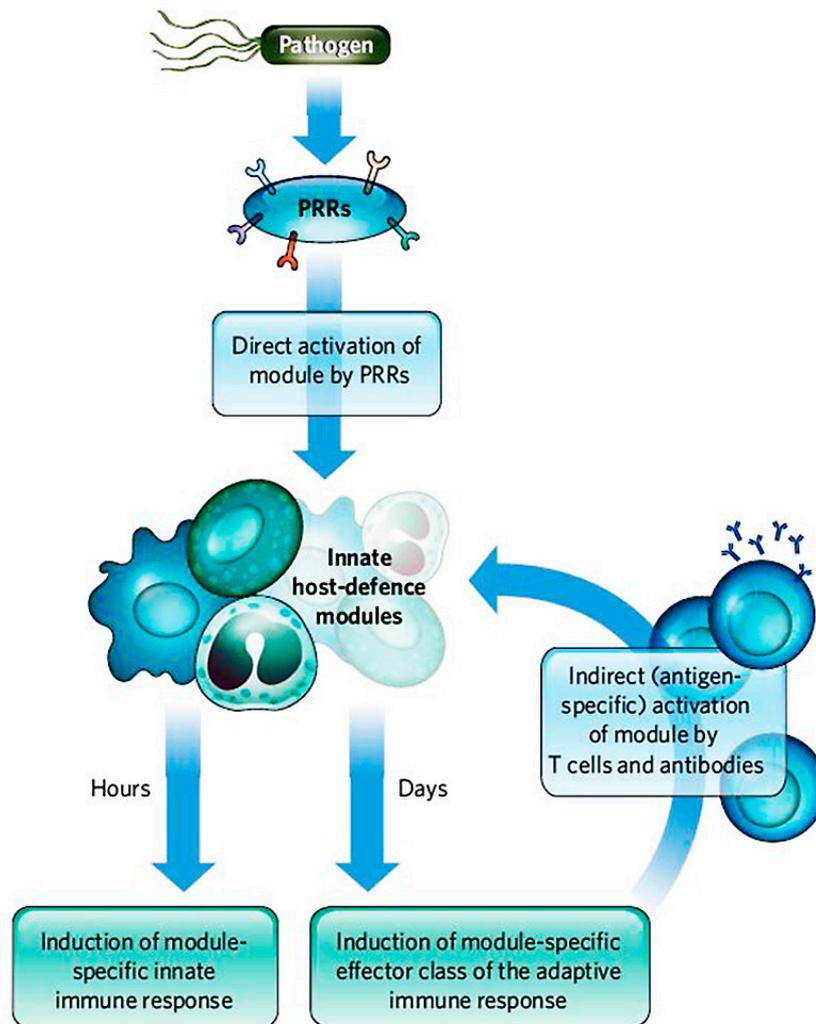


Figura 3. **Activación de los mecanismos de defensa del huésped.**

Los mecanismos de defensa del huésped pueden ser activados directamente mediante el reconocimiento de los PRRs o indirectamente por las células T, anticuerpos o ambos. Después de la iniciación de la respuesta inmune adaptativa, se activa el mismo módulo del sistema inmune innato que activó la respuesta del sistema inmune adaptativo (de [35]).

Una de las formas por la cual el sistema inmune innato regula al sistema adaptativo es a través de las células presentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells*, APCs), las cuales, actúan como una interfase entre ambos sistemas. Las APCs como, células dendríticas y macrófagos, son reguladores críticos de la inmunidad, que continuamente examinan su microambiente, tomando materiales antigénicos o fragmentos de patógenos para procesarlos y presentarlos a células T específicas para ese antígeno [49]. Esta presentación ocurre en el contexto de MHCII, el cual está limitado en expresión a APCs profesionales y a unos pocos tipos celulares después de su apropiada estimulación. En contraste, la vía de presentación por MHC clase I está orientada hacia la presentación de antígenos endógenos localizados en el citoplasma, núcleos y mitocondrias de la mayoría de los tipos celulares [49]. Las células T son activadas diferencialmente a través de sus receptores TCRs al interactuar con las proteínas MHC. La interacción de MHC clase I conlleva la activación de las células T CD8⁺ y MHC clase II activa a las células T CD4⁺. Las células T CD4⁺ pueden diferenciarse en células T auxiliares 1 (*T helper 1*, Th1) o en células T auxiliares 2 (*T helper 2*, Th2), dependiendo de las citoquinas que liberen [50]. Entonces, las células auxiliares T activan a las células T CD8⁺ o linfocitos B, las células T CD8⁺ se diferencian en células T citotóxicas [51] y los linfocitos B producen anticuerpos que participan en la respuesta humoral [52].

El sistema inmune adaptativo de teleósteos presenta algunas similitudes con el sistema de mamíferos, aunque, se ha sugerido que tiene un rol menor en comparación con el sistema inmune innato. Por ejemplo, las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígenos (APCs) en mamíferos, y han sido descritas en diferentes especies de peces, como, el pez cebra (*D. rerio*), el medaka (*O. latipes*) y la trucha arcoíris (*O. mykiss*) [53–55]. No obstante, el sistema inmune adaptativo, también presenta importantes diferencias. Como se ha mencionado anteriormente, los principales órganos linfoides en peces son el timo, el bazo y el riñón anterior. En comparación con los mamíferos, los peces carecen de médula ósea y de ganglios linfáticos, siendo el riñón anterior el que cumple la función de la médula ósea. Otra importante diferencia, es el número de inmunoglobulinas (Igs) descritas en teleósteos, de hecho, los loci de las Igs de algunas especies de peces se encuentran entre los mayores y más complejos descritos hasta hoy [5]. Se han identificado tres clases de Igs en teleósteos, éstas son IgM e IgD, las cuales se encuentran en vertebrados [17] e IgT/Z (por *Teleost/Zebrafish*), la cual es específica de peces (**Tabla 3**). La IgM fue la primera Ig identificada en peces, y puede ser expresada en la superficie

de las células B o puede ser secretada. La IgD se pensó inicialmente que sólo se expresaba en roedores y primates, pero también fue identificada en el pez gato (*I. punctatus*) [56]. Por último, la IgT/Z fue descrita en la trucha arcoíris (IgT) y en el pez cebra (IgZ) [57, 58] (**Tabla 3**).

Comparative developmental vertebrate immunology	Teleosts ^a	Mammals
Physical barriers and interfaces	Skin mucus; scales; gills	Skin; respiratory epithelium of the lungs
Immune effector cell types	Neutrophil/heterophil; Eosinophil; Monocyte/Macrophage; Dendritic cell (only identified in trout gill structures so far); NK cell; T lymphocytes (helper, cytotoxic); B lymphocytes (plasma cells)	Neutrophil; Eosinophil; Basophil; Mast cell Monocyte/Macrophage; Dendritic cell; NK cell; T lymphocytes (helper, cytotoxic); B lymphocytes (plasma cells)
Major antigen presentation cells	Monocyte/macrophage	Dendritic cell, macrophage/monocyte
Lymphoid tissues	Head kidney; Thymus; Spleen; Gut-associated lymphoid tissue (not well organized); Interbranchial lymphoid tissue	Bone marrow; Thymus; Spleen; Lymph nodes; Gut-associated lymphoid tissue; Germinal centres
Antibody Ig Diversity	IgM; IgD; IgT	IgM; IgD; IgA; IgE; IgG
Response to challenge/rechallenge	Slow and weak memory response (temperature dependent)	Fast and strong memory
Affinity maturation (AM)	Low affinity, and low AM	High affinity and high AM

^a In particular, salmonids (information restricted to development in environments within physiological optima: 10–15 °C).

Tabla 3. Comparación del sistema inmune de mamíferos y teleosteos.

(de [7]).

El sistema inmune en teleosteos tiene importantes similitudes con el sistema inmune de mamíferos, ya que presenta la mayoría de los componentes descritos en este grupo. No obstante, existen importantes diferencias, principalmente en el rol que cumple cada rama del sistema inmune. El sistema innato posee un amplio abanico de respuestas frente a una infección, en muchos casos presentando una mayor diversidad que la descrita en mamíferos, a diferencia del sistema adaptativo, que posee una función menor en el control de una infección, aunque, necesaria para una inmunidad duradera.

Inmunología comparada

La mayor parte de los conocimientos que tenemos hoy en día acerca de la composición, la función y la regulación del sistema inmune en peces está relacionada con estudios de inmunología comparada con mamíferos [15]. Sin embargo, el interés por el conocimiento de la inmunología en peces ha aumentado por diferentes razones. Evolutivamente, el sistema inmune en teleosteos puede proporcionar claves para entender la evolución del sistema inmune de otras especies. Existen descubrimientos en peces que han contribuido sustancialmente al entendimiento de la evolución del sistema inmune y además, han planteado nuevos paradigmas sobre la inmunología de mamíferos [18]. Por

ejemplo, en el sistema inmune de teleósteos se describió la habilidad de las células B para actuar como fagocitos profesionales [48] y este hallazgo llevó al descubrimiento de un subconjunto de células B fagocíticas en los mamíferos.

Por otro lado, existen razones prácticas, ya que el coste del tratamiento de las infecciones en el cultivo de peces es claramente un factor limitante para el crecimiento de la acuicultura. Un ejemplo de esto, son las pérdidas producidas por el virus ISAV en Chile. Un brote en el año 2007 llevó a la reducción de la producción en un 9 % y a una reducción de la fuerza laboral de un 3 %. En 2009, un nuevo brote representó una caída del 60 % de la producción del salmón del atlántico (*S. salar*), desde un máximo aproximado de 400000 toneladas antes del 2007. La proyección de pérdidas para el período entre el 2007-2011 fue de aproximadamente \$1 billón de dólares, es decir, el 50 % del valor económico de la industria chilena [7].

Con el fin de explorar nuevas características del sistema inmune en peces, una de las finalidades de esta tesis es la descripción en una especie de interés para la acuicultura de un mecanismo de regulación del sistema inmune innato, que ha sido previamente descrito en mamíferos.

El reflejo inflamatorio en el control de la inmunidad innata

El mantenimiento de la homeostasis es fundamental, y en el caso del sistema inmune, éste debe mantener una respuesta cuidadosa y equilibrada frente a microbios y patógenos, la cual oscilará entre: una inmunidad insuficiente, que permitiría a los patógenos prevalecer, y una inmunidad excesiva que puede ser perjudicial para el huésped. Los componentes que ayudan a este equilibrio son los factores humorales (glucocorticoides, hormonas y citoquinas antiinflamatorias) y los mecanismos celulares (células T reguladoras y macrófagos activados). Sin embargo, están limitados por varios aspectos: primero, el tiempo de respuesta es relativamente lento, en comparación a otros sistemas de respuesta; segundo, estos sistemas son ineficientes en la integración de respuestas biológicas y tercero, dependen del sistema circulatorio para operar de manera sistémica [59]. Por lo que, los factores humorales y los mecanismos celulares por si solos no proporcionan las características esenciales necesarias para mantener la homeostasis del sistema inmune innato.

Durante el siglo veinte se ha descrito como los circuitos neuronales mantienen la homeostasis durante las repuestas del sistema inmune innato [60–62]. Las señales neuronales, son rápidas, direccionales, regionales, capaces de integrar

estímulos divergentes y de inhibir señales confusas, características ideales para monitorizar y modular. En otros sistemas fisiológicos, como el sistema circulatorio, pulmonar o gastrointestinal es el sistema nervioso el que mantiene la homeostasis. Pero hasta hace poco, era un dogma el hecho de que el sistema inmune se autorregulaba sólo a través de las vías humorales y celulares.

El **reflejo inflamatorio** es un circuito neural, descrito en mamíferos, que modula la respuesta del sistema inmune innato, previniendo las consecuencias de una excesiva activación [63] (**Figura 4**). Éste actúa a través del arco aferente y eferente del nervio vago. Los nervios aferentes de la periferia transmiten las señales de peligro y provocan reflejos neurales, regulando la respuesta inmune. Las neuronas en el nervio vago aferente expresan receptores para diferentes moléculas que indican una infección en progreso, por ejemplo, interleuquina 1 beta (IL-1 β), prostaglandinas, ARNm o proteínas [64, 65]. Estas moléculas activan el arco aferente del nervio vago que a su vez envía señales al cerebro, específicamente al tracto del núcleo solitario en el bulbo raquídeo del tronco cerebral.

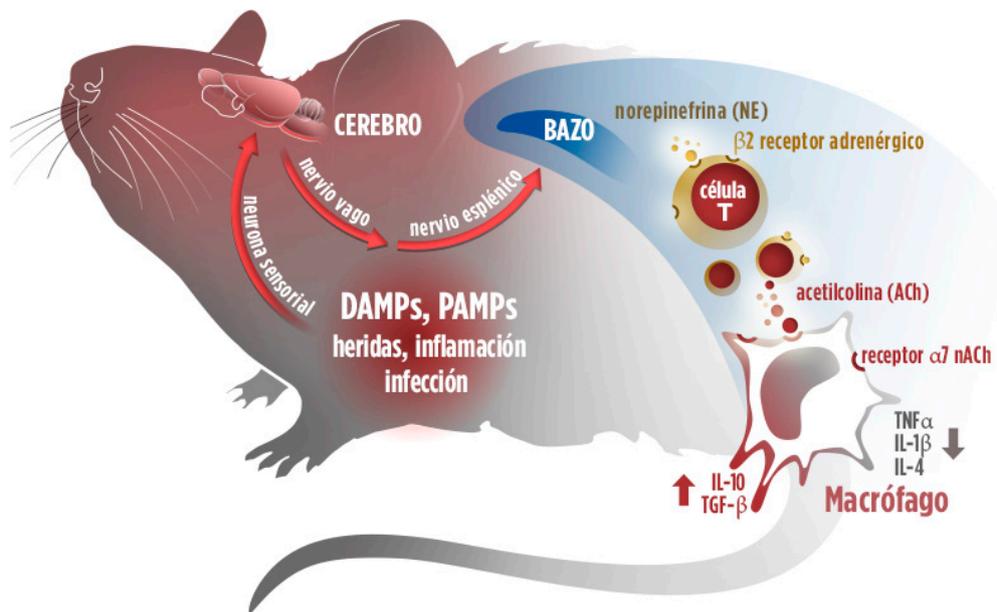


Figura 4. El reflejo inflamatorio en los mamíferos.

El arco eferente del nervio vago es denominado la **vía colinérgica antiinflamatoria** [61, 66, 67]. Los nervios de esta vía se originan en el bulbo raquídeo del tronco cerebral, descienden por el cuello y se extienden por los órganos del tórax y el abdomen. Experimentos en ratas inyectadas con colorantes fluorescentes permitieron la detección de las señales del nervio vago eferente (vía colinérgica antiinflamatoria) propagándose por el bazo a través del nervio esplénico [68, 69]. Aproximadamente el 90 % de la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en la fase temprana del shock séptico se origina en el bazo [68], y la esplenectomía protege contra la mortalidad observada durante una septicemia [69]. Esto señala al bazo como uno de los principales objetivos del reflejo inflamatorio. La estimulación del nervio vago *in vivo* durante el shock séptico, atenúa la producción de TNF α por parte de los macrófagos localizados en el bazo [68], asimismo, la estimulación eléctrica del nervio vago después de una vagotomía cervical protege contra lesiones por hipovolemia hemorrágica de choque, quemaduras y lesiones por ventilación mecánica [70–72]. La vía colinérgica antiinflamatoria regula la respuesta inmune innata frente a PAMPs, en cultivos de macrófagos con agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (p. ej., nicotina y acetilcolina (ACh)), los cuales disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias [73–76]. Anatómicamente, las fibras del nervio esplénico adrenérgico terminan en aéreas ricas en células T, con las que forman estructuras del tipo sinápticas [77], lo que sugiere que hay comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune. El uso de agonistas β -adrenérgicos tiene el mismo resultado que la vagotomía, disminuye los efectos de TNF α en el shock séptico [78], lo que significa que las señales adrenérgicas en el bazo tienen un efecto en los niveles de TNF α . La regulación del reflejo inflamatorio no se limita exclusivamente al shock séptico, agonistas del receptor también inhiben la secreción de citoquinas en macrófagos activados por diferentes agentes patógenos, que incluyen ligandos de los receptores TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 y TLR9 [79].

Un elemento clave del reflejo inflamatorio es el **receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7** ($\alpha 7$ nACh). Se ha demostrado en ratones que tanto la estimulación eléctrica como la farmacológica no atenúan el shock séptico en ratones deficientes (*knock-out*) para este receptor [74, 80]. El receptor $\alpha 7$ nACh se expresa en células neuronales, células gliales, células T, células B, monocitos y macrófagos [67, 81–83]. La evidencia indica que la presencia del receptor $\alpha 7$ nACh en macrófagos es primordial, ya que suprime los niveles en suero de TNF α en ratones inyectados intraperitonealmente con LPS y este efecto antiinflamatorio

es dependiente de la señalización del receptor $\alpha 7$ nACh [84]. La presencia del receptor en el arco eferente del reflejo inflamatorio, indica que los ligandos colinérgicos regulan directamente las células *in vivo*. La vía colinérgica antiinflamatoria funcionalmente no es parasimpática ni simpática, porque las señales clásicas parasimpáticas en la periferia son traducidas por el nervio vago y por receptores muscarínicos, no por el receptor $\alpha 7$ nACh. El nervio esplénico, un nervio catecolaminérgico componente de la vía colinérgica antiinflamatoria, puede ser controlado por células presinápticas que se originan en el cordón espinal o por neuronas presinápticas transmitiendo al nervio vago [67]. Entonces, ¿como la vía colinérgica antiinflamatoria depende del receptor $\alpha 7$ nACh si las neuronas esplénicas liberan catecolaminas y no ACh? Desde hace tiempo se sabe que el bazo es una importante fuente de ACh (de hecho, esta molécula fue originalmente descrita en el bazo del buey y del caballo) y la estimulación eléctrica del nervio esplénico aumenta sus niveles en el bazo [85, 86]. Al no encontrar fibras nerviosas colinérgicas en el bazo que explicaran la presencia de ACh, se planteó la hipótesis de que otro tipo celular no neuronal fuera capaz de producirla. Las fibras nerviosas del nervio esplénico se encuentran cerca de aéreas ricas en células T, las cuales son capaces de sintetizar ACh. Las células T expresan colina acetiltransferasa (ChAT) una enzima que utiliza la colina y la acetyl-CoA como sustratos para producir ACh. La estimulación adrenérgica promueve la liberación de ACh desde las células T, siendo necesarias para la integridad del reflejo inflamatorio. La activación de las células T probablemente ocurre a través de los receptores β -adrenérgicos que unificarían la norepinefrina liberada por el nervio esplénico cuando es estimulado por el nervio vago, ya que se ha demostrado un aumento de la norepinefrina después de la estimulación de éste [78].

La estimulación del receptor $\alpha 7$ nACh en la superficie de monocitos o macrófagos de bazo, conlleva a la desfosforilación y la inhibición del inhibidor NF- κ B ($I\kappa$ B) [87], lo que se traduce en un aumento de las citoquinas proinflamatorias. El mecanismo molecular a través del cual el receptor $\alpha 7$ nACh inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias, ocurre a través de la interacción del receptor con la adenilato ciclasa 6 (AC6). Dicha unión provoca un aumento del AMPc intracelular, que activa la fosforilación del elemento de respuesta al AMPc (CREB), lo que a su vez incrementa la expresión de *cfos*. La activación de *cfos* inhibe la actividad de NF- κ B, disminuyendo la transcripción de citoquinas proinflamatorias [72] (**Figura 5**).

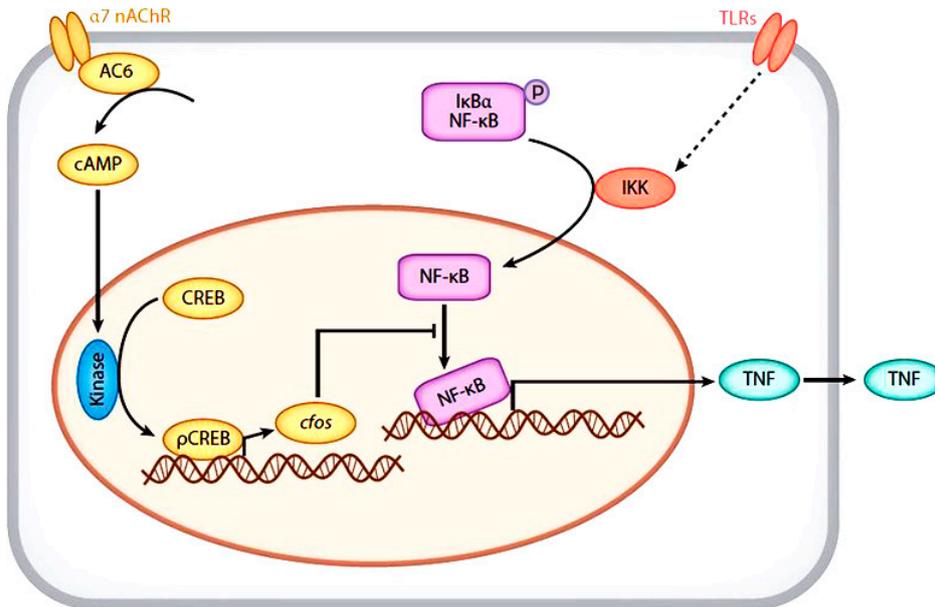


Figura 5. Mecanismo de inhibición de la liberación de citoquinas mediada por el receptor $\alpha 7nACh$

(modificado de [59]).

La estimulación del receptor $\alpha 7nACh$ implica la inhibición de la liberación de diferentes citoquinas proinflamatorias, como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, interleuquina 6 ($IL-6$) e interleuquina-18 ($IL-18$) en cultivos celulares de macrófagos estimulados con LPS [73–75], así como la inhibición a nivel de la expresión génica y de la liberación de la metalopeptidasa de la matriz 9 ($MMP9$), la cual media la migración de macrófagos [89]. En cambio, en macrófagos estimulados con poly (I:C) se ha observado que la inhibición ocurre tanto a nivel de la expresión de ARNm como de proteínas ($TNF\alpha$, $IL-\beta$ e $IL-6$) [76]. Además, la estimulación del receptor $\alpha 7nACh$ produce la fosforilación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 ($STAT3$) [90]. El $STAT3$ fosforilado desencadena una señal antiinflamatoria que produce el aumento de la expresión del supresor de la señalización de citoquinas 3 ($SOCS3$), el cual suprime la señalización de receptores de citoquinas [88] (**Figura 6**). La regulación del reflejo inflamatorio es nulo en ratones deficientes de $STAT3$, lo que demuestra la importancia de $JAK2/STAT3$ en la vía colinérgica antiinflamatoria [90].

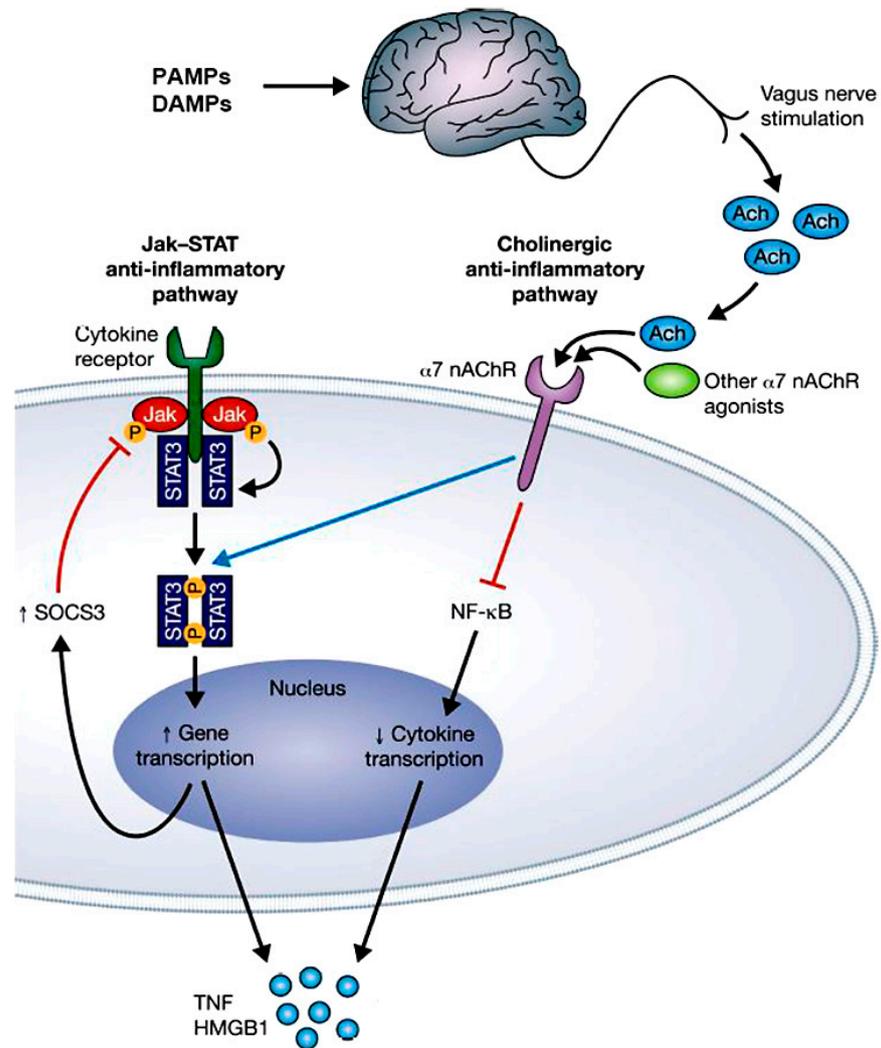


Figura 6. Mecanismo de activación de Jak2/STAT3.

(modificado de [88]).

El receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 ($\alpha 7$ nACh) es una pieza esencial en la respuesta antiinflamatoria del reflejo inflamatorio [74], teniendo una función clave en tejidos no neuronales [91]. Pertenece a la superfamilia de receptores de canales iónicos cuyo efecto depende de ligando (*Ligand-gated ion channel*), específicamente de la superfamilia *Cys-loop* [66]. La amplia variedad de subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina surgen de la combinación

de las diferentes subunidades que componen el sitio de unión. Aunque, estos receptores muestran una amplia gama de propiedades funcionales y farmacológicas, comparten algunas características [92, 93]. Se encuentran en tres estados principales en respuesta a los agonistas: 1) cerrado en reposo; 2) poros abiertos y 3) cerrado desensibilizado. Una breve exposición a altas concentraciones de ACh, provoca la apertura selectiva del poro para los cationes. Después de unos milisegundos, el receptor cierra a un estado de no conducción.

Dos grupos principales forman los receptores nicotínicos, los musculares y los neuronales, los cuales se diferencian en las subunidades que los conforman (**Tabla 4**). Los receptores nicotínicos neuronales están compuestos por diferentes subunidades alfa y beta que forman el sitio de unión. Estos receptores se clasifican en: heteropentámeros compuestos por las subunidades $\alpha 6$ a $\alpha 7$ y $\beta 2$ a $\beta 4$ o homopentámeros compuestos por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ o $\alpha 10$ ($\alpha 8$ sólo ha sido descrita en *Gallus gallus* y $\alpha 10$ puede formar heteropentámeros con $\alpha 9$) [94, 95] (**Tabla 4**).

Heteromeric receptors			
Muscle type			
$\alpha 1\delta$	Ligand binding dimers $\alpha 1\gamma$ (embryonic) $\alpha 1\epsilon$ (adult)		Structural $\beta 1$
Neuronal type			
Ligand-binding alphas $\alpha 2$ $\alpha 3$ $\alpha 4$ $\alpha 6$		Ligand-binding betas $\beta 2$ $\beta 4$	Structural $\alpha 5$ $\beta 3$
Homomeric receptors			
$\alpha 7$ ($\alpha 8$) ^a $\alpha 9$ ($\alpha 10$) ^b			

^a $\alpha 8$ found only in chick.

^b $\alpha 10$ may form heteromeric receptors with $\alpha 9$.

Tabla 4. **Subunidades de los receptores nicotínicos.**

(de [94]).

El receptor $\alpha 7$ nACh es un homopentámero de subunidades $\alpha 7$ que se activa por la unión de ACh [73, 74, 94], que se expresa principalmente en el cerebro, en particular, en el hipocampo y el hipotálamo [96]. Adicionalmente, se ha descrito la presencia del receptor en diferentes células inmunológicas como monocitos, macrófagos, células B, células T y células dendríticas [67]. La actividad del receptor puede ser estimulada por antagonistas muy débiles como

GTS-21 o ligandos alternativos como la nicotina y la colina [74, 79, 97]. Cada receptor $\alpha 7$ nACh está constituido por cinco sitios de unión para la ACh que se encuentran entre subunidades adyacentes [94, 98–100] (**Figura 7**).

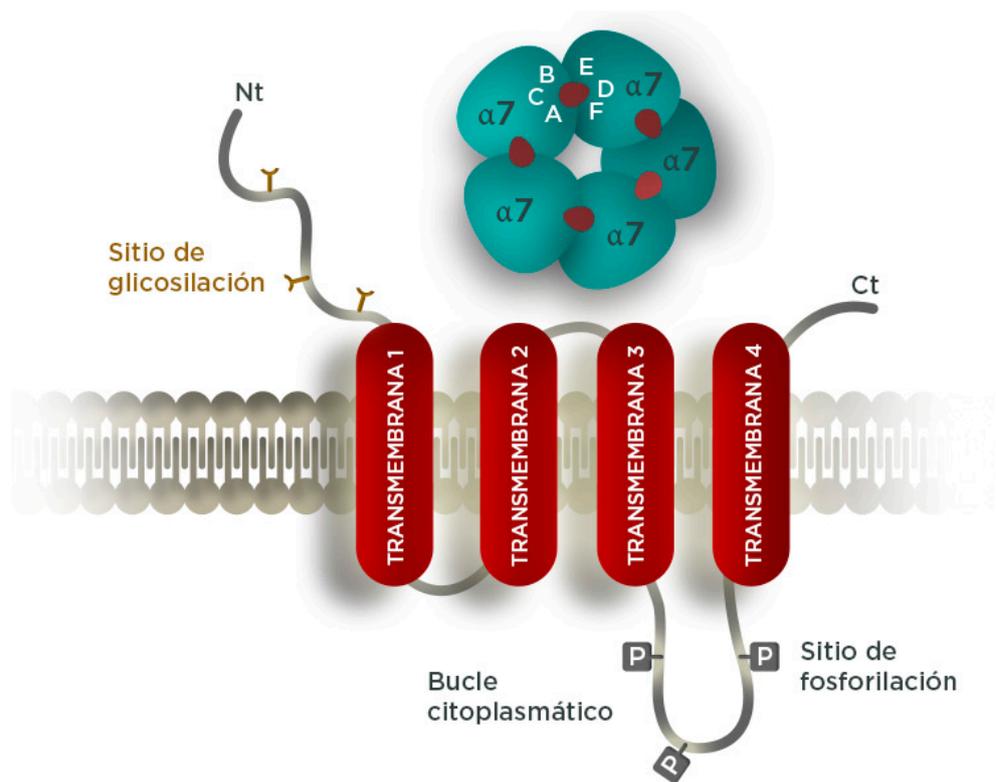


Figura 7. Estructura del receptor $\alpha 7$ nACh.

El receptor $\alpha 7$ nACh está formado por cinco subunidades $\alpha 7$, entre subunidades se encuentran los bucles (A, B, C, D, E y F) que forman el sitio de unión de la ACh. Cada subunidad $\alpha 7$ posee un dominio extracelular N-terminal, cuatro regiones transmembrana, un bucle citoplasmático y un dominio extracelular C-terminal.

Cada subunidad incluye un dominio extracelular N-terminal hidrofílico donde se encuentran tres sitios de N-glicosilación. En esta región se encuentra el *Cys-loop*, una secuencia de 15 aminoácidos altamente conservada ubicada entre dos cisteínas, que da el nombre a esta familia de receptores (**Figura 8**). A continuación, hay cuatro dominios transmembrana, un bucle citoplasmático entre el tercer y el cuarto dominio transmembrana y un dominio extracelular C-terminal donde se encuentran tres sitios de fosforilación [66]. El sitio de

unión de la ACh está conformado por 6 bucles de diferente longitud, los bucles A, B y C forman el componente principal y los bucles D, E y F el componente complementario [101– 103] (**Figura 7**). Los bucles del componente principal pertenecen a una subunidad $\alpha 7$ y los bucles del componente complementario pertenecen a la subunidad $\alpha 7$ adyacente [104]. El funcionamiento del receptor depende de su correcta síntesis, plegado y montaje. La biosíntesis de los receptores nicotínicos ha sido caracterizada en diferentes tipos celulares de mamíferos [105–107]. La evidencia indica que la no apropiada formación de puentes disulfuro, así como mutaciones en el bucle citoplasmático, impide el correcto plegamiento del receptor $\alpha 7$ nACh [108, 109].

En teleósteos, no existe un gran número de trabajos que describan los receptores nicotínicos de ACh y, aunque se ha detectado la presencia de diferentes componentes que participan en el reflejo inflamatorio, no hay información relacionada con el funcionamiento de este sistema en peces. Existen algunas descripciones de receptores nicotínicos en peces modelo como el fugu (*T. rubripes*) y el pez cebra (*D. rerio*), que tienen como finalidad última comprender la diversidad de los receptores nicotínicos en vertebrados, y como modelo de estudio de enfermedades relacionadas con este tipo de receptores, como el Alzheimer y el Parkinson [110, 111]. Adicionalmente, se ha descrito la presencia de ACh y AChE en tilapia (*Oreochromis niloticus*) [112]. A nivel funcional, el receptor $\alpha 7$ nACh del pez cebra ha sido expresado en oocitos de *Xenopus* como una herramienta para evaluar diferentes agonistas y antagonistas del receptor para el desarrollo de tratamientos farmacológicos [111]. Asimismo, se ha descrito la modulación del receptor $\alpha 7$ nACh y de la AChE a nivel de la expresión génica después de una infección viral, sugiriendo una posible inhibición de la vía antiinflamatoria [113].

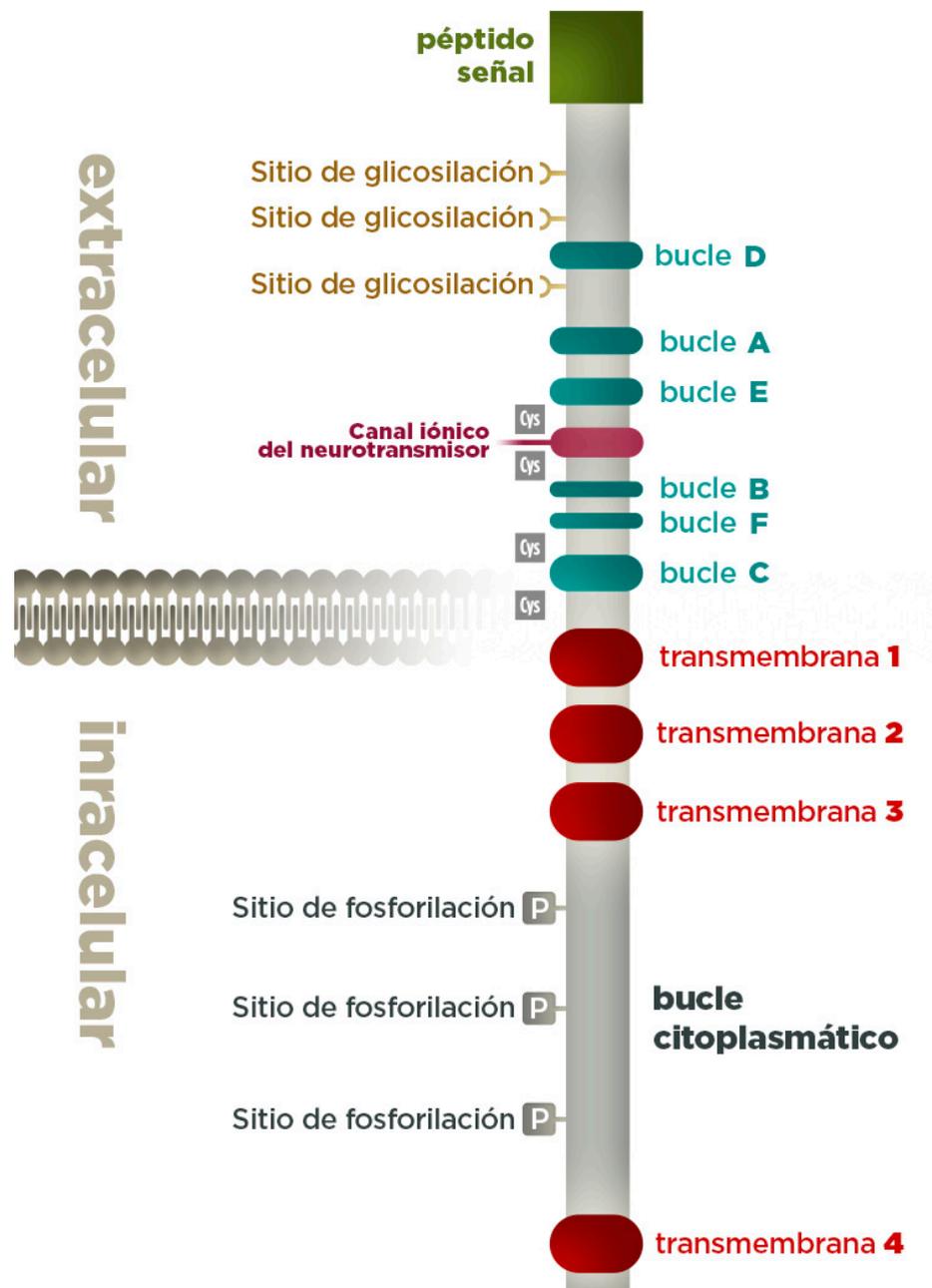


Figura 8. Esquema de la subunidad del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$.

Modulando el sistema inmune

La prevención de enfermedades en acuicultura supone un gran desafío, ya que presenta desventajas en comparación con la producción terrestre de animales [114]. Los patógenos pueden ser fácilmente transmitidos a través del agua, esto hace que los procedimientos de desinfección sean difíciles y costosos. Esto implica que las medidas profilácticas basadas en la estimulación del sistema inmune en peces, sean una importante estrategia para la prevención de enfermedades. Entre estas medidas se incluyen la vacunación y la inmunoestimulación.

La vacunación ha dado buenos resultados en peces, siendo muy efectivas para algunas enfermedades. De hecho, se encuentran disponibles comercialmente 22 vacunas para enfermedades bacterianas y 6 para enfermedades virales, no obstante, no existen vacunas comerciales para parásitos y todavía existen muchas enfermedades para las cuales no hay un tratamiento exitoso disponible [6, 115–117]. La vacunación actúa como una imitación de una infección, activando el sistema inmune innato y adaptativo, promoviendo una protección prolongada en base a la aparición de células de memoria y de anticuerpos específicos. Las vacunas en acuicultura están principalmente formadas por bacterias inactivadas, patógenos atenuados, subunidades recombinantes y ácidos nucleicos [115, 118–119]. Una de las principales limitaciones de la vacunación comercial es la relación coste-efectividad, los cuales pueden ser muy diferentes dependiendo de la especie (el esturión comparado con la carpa); este es el caso de las vacunas antivirales, donde ha sido difícil el desarrollo de una alternativa con un conveniente coste-efectividad [6]. Adicionalmente, los peces pueden necesitar una mayor dosis que los animales terrestres. Existen tres métodos principales de administración de vacunas en peces: por inyección, por inmersión y por vacunación oral, y cada una posee una serie de ventajas y desventajas (**Tabla 5**). La administración por inyección se realiza por vía intraperitoneal o intramuscular, no es el método más económico, ya que se deben sacar los peces del agua y anestesiarlos, y además se necesitan mecanismos automatizados o profesionales para la manipulación de los peces. Asimismo, la administración por inyección necesita de peces de un cierto tamaño (> 15 - 20 g), es altamente estresante y está asociado a efectos secundarios en el sitio de inyección. Por otro lado, la administración por inmersión de la vacuna es menos estresante, permitiendo la vacunación por baño, inmersión o pulverización. Este método posibilita la vacunación de un mayor número de peces y de tallas menores, pero se necesita de un mayor volumen de vacuna y la duración de la protección es

menor. En cambio, la administración oral es a través de la dieta y es el método más buscado, ya que se puede administrar de manera masiva y a peces de todas las tallas sin ningún tipo de estrés. A pesar de lo prometedor de la vacunación oral, son necesarias importantes mejoras como, métodos de encapsulación que eviten la degradación en el tracto gastrointestinal, la evaluación del tiempo que permanecen los antígenos en el tracto intestinal (para determinar si es el tiempo suficiente para activar la inmunidad) y controles de la dosis ingerida por los peces.

	Injection vaccination	Immersion vaccination	Oral vaccination
Target	Systemic	Skin and gills	Digestive system
Ease of administration	+(labour intensive)	++	+++ (mass vaccination of fish any size)
Fish weight	>15 g	1–5 g	1–5 g
Stress	Severe (requires anaesthetization & handling); Moderate for automated vaccination	None for baths; Moderate for spray; Severe for dip	None or negligible
Cost	Cost-effective for high value species ^a	Cost-effective for fish <10 g	Moderate
Efficacy/Potency	+++ (with adjuvants)	++	Weak (Inferior)
Side-effects	Severe with oil-adjuvant	None or negligible	None or negligible
Duration of immunity	6–12 months	Shorter	Shortest

^a High value species include Atlantic salmon and Rainbow trout.

Tabla 5. **Comparación de los métodos de vacunación en peces.**

(de [7]).

Los inmunoestimulantes aumentan la resistencia de los peces frente a enfermedades y cubren una amplia variedad de sustancias que pueden activar el sistema inmune. Los inmunoestimulantes suelen tener diferentes orígenes por ejemplo, 1) bacteriano: LPS, PGN, ADN bacteriano; 2) plantas: β -glucano; 3) parásitos, inactivados con formalina o 4) compuestos sintéticos: oligodeoxinucleótidos citosina/guanina sintéticos (CpG, que simulan ADN bacteriano o viral) y poly (I:C) (ARN de doble cadena) [120–125]. La mayoría de los PAMPs estudiados activan las APCs, que junto con las células T pueden inducir respuestas de las células Th1 y Th2 [51, 126]. Las vías de administración de los inmunoestimulantes son las mismas que las utilizadas en la vacunación, aunque, se ha empleado principalmente la administración oral. A continuación, se detallarán los inmunoestimulantes utilizados y propuestos en esta tesis.

El lipopolisacarido (LPS) es el principal componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas (**Figura 9**). Diferentes bacterias producen LPS estructuralmente diferentes, los cuales varían en sus patrones de fosfato, número de cadenas de acilo y en la composición del ácido graso [32]. El lípido A del LPS está altamente conservado y es el que posee las propiedades endotóxicas [127]. El LPS en mamíferos es reconocido específicamente por el TLR4, y si bien se ha descrito la presencia de este receptor en algunas especies de peces,

diferentes estudios funcionales confirman que no está involucrado en su reconocimiento [32, 128]. A pesar de esto, el LPS es ampliamente utilizado *in vitro* como un potente activador (a dosis altas) de la respuesta inmune en teleósteos, logrando estimular la producción de citoquinas proinflamatorias, de especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) y la activación de macrófagos [129–131]. Aunque, se ha sugerido que sería el PGN presente en las preparaciones comerciales de LPS el que podría ser el responsable de la estimulación de la expresión de las citoquinas [132]. Además, se ha demostrado el efecto inmunoestimulante del LPS en diferentes especies (p. ej., *Labeo rohita*, *O. mykiss*, *Pangasianodon hypophthalmus*, *Cyprinus carpio*), en las cuales es capaz de activar la inmunidad innata y aumentar la protección contra diferentes enfermedades [125, 133–135].

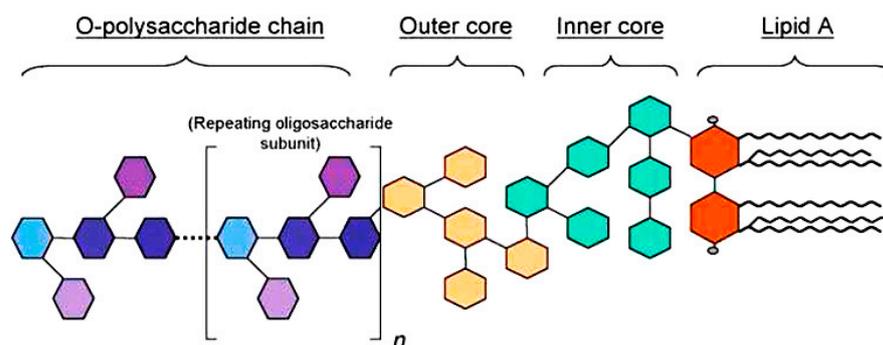


Figura 9. Estructura general del LPS.

Son moléculas complejas anfífilicas compuestas por tres regiones: 1) el lípido A, 2) el núcleo es un oligosacárido que se puede dividir en una región interna y una externa y 3) el antígeno O (de [127]).

El peptidoglicano (PGN) es un componente de la pared celular de bacterias gram negativas y gram positivas que otorga estabilidad estructural. Al igual que el LPS, la estructura del PGN puede variar dependiendo de la bacteria que lo produce. Es reconocido por diferentes receptores en mamíferos como, receptores NLRs (NOD1 y NOD2) y por las proteínas de reconocimiento de PGN (PGRPs) [136, 137]. En peces, se han detectado 3 receptores que son capaces de detectar el PGN, el PGLYRP-2 (homólogo del receptor de mamíferos) y PGLYRP-5 y PGLYRP-6 que sólo se han descritos en teleósteos [138–140]. La capacidad inmunoestimulante del PGN se ha evaluado *in vitro* [141–143] e *in vivo* donde se ha observado que aumenta la resistencia contra patógenos [124, 144].

Los ácidos nucleicos bacterianos son potentes estimulantes del sistema inmune [145], los cuales son reconocidos por el TLR9 en el caso del ADN y por TLR7 en el caso del ARN [24]. En teleósteos, estos receptores están descritos en diferentes especies como, la trucha arcoíris, el pez cebra, el salmón del Atlántico y la dorada [146–149], demostrando cierto grado de similitud con el sistema en mamíferos. En peces el uso de ADN bacteriano actúa como una cascada que estimula el sistema inmune, culminando en la maduración, diferenciación y proliferación de múltiples células inmunológicas [126]. En estudios *in vivo* con ADN sintético (oligodeoxinucleótidos citosina/guanina sintéticos, CpG) se ha observado que promueve los sistemas antimicrobianos y protege contra infecciones bacterianas (p. ej., *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*) [122, 150].

Las citoquinas se han utilizado ampliamente como adyuvantes y agentes terapéuticos en diferentes animales, por ejemplo, interleuquina 2 (IL-2) en cerdos; el TNF α e interferón alfa (IFN α) en felinos; el IFN α en gallinas o la IL-1 β en ovejas [151–154]. El interés por el uso de las citoquinas está asociado a su función en la patogénesis de muchas enfermedades, ya que son proteínas con pocas probabilidades de provocar una respuesta alérgica, son capaces de estimular el sistema inmune sin la presencia de un patógeno, y en estudios con diferentes animales se ha demostrado que pueden actuar como adyuvantes para vacunas virales, bacterianas y parasitarias [155–157]. En peces, algunos estudios han explorado la utilización de citoquinas como adyuvante e inmunoestimulante. Por ejemplo, se ha estudiado la interleuquina 8 recombinante (IL-8r) en trucha, administrada intraperitonealmente (i.p.) y se observó un aumento de leucocitos en la cavidad intraperitoneal [158]. Además, se ha evaluado como adyuvante la IL-1 β recombinante (IL-1 β r), administrada i.p. en barrabundi (*Lates calcarifer*) y en carpa (*C. carpio*) junto con una vacuna inactivada con formalina (*Vibrio harveyi* y *Aeromonas hydrophila*, respectivamente). En ambos estudios se observó un aumento de los anticuerpos específicos contra las bacterias, contenidas en las vacunas con diferencias significativas, en comparación con los otros tratamientos (IL-1 β r y la vacuna administrados por separado) [159, 160]. Asimismo, el TNF α recombinante soluble (TNF α r) de lubina (*Dicentrarchus labrax*) fue producida en levadura y evaluada en la misma especie, donde se administró oralmente, junto con una vacuna comercial contra *Vibrio anguillarum*. En un desafío contra la vibriosis se obtuvo altos niveles de protección en comparación con el tratamiento que incluía sólo la vacuna [161].

Las nanopartículas como plataformas de entrega de inmunoestimulantes en acuicultura

Las nanopartículas han sido utilizadas como una estrategia alternativa de plataforma de entrega (*delivery system*) de inmunoestimulantes y para aumentar la eficacia de la vacunación, ya que algunos funcionan como potentes adyuvantes. Los sistemas de plataformas de entrega son aquellos materiales utilizados para la administración de productos farmacéuticos de una manera controlada con el objetivo de lograr un efecto terapéutico. Estos sistemas proporcionan: una administración dirigida de compuestos activos a células o tejidos, una biodisponibilidad mejorada, una mejor solubilidad de fármacos hidrófobos, una liberación sostenida y la protección del agente terapéutico de la degradación [162].

La nanoencapsulación implica la formación de partículas, cargadas con fármacos, con diámetros que van desde 1 a 1000 nm [163–165], aunque, existen definiciones más estrictas que se refieren únicamente a las estructuras de un rango entre 1 a 100 nm [166]. El tamaño de las nanopartículas les permite interactuar fácilmente con biomoléculas como, enzimas y receptores, tanto en la superficie como en el interior de las células. Hoy en día, las nanopartículas se pueden modificar fácilmente para tener características físicas únicas en tamaño, forma, química de la superficie o ligandos específicos en la superficie. Los beneficios de las nanopartículas como plataforma de entrega son la reducción de las dosis, la especificidad del tejido diana, la reducción de los efectos tóxicos o secundarios de la droga y el aumento de la eficiencia de entrega [167]. En general, las moléculas encapsuladas, tendrán propiedades completamente diferentes (p. ej., la solubilidad o la vida media en circulación) en comparación con las no encapsuladas. Por lo tanto, es muy importante entender y controlar el comportamiento *in vivo* en células y tejidos de estos compuestos bioactivos una vez encapsulados, para conocer sus efectos secundarios y su eficacia. El tamaño de la nanopartícula no sólo es importante para la interacción con las biomoléculas, sino también, porque va a influir en su biodistribución *in vivo*. En mamíferos ha sido ampliamente estudiado la internalización de las partículas y se ha observado que aquellas de menos de 5 nm se eliminan de la circulación a través de la extravasación o aclaramiento renal, mientras que las nanopartículas más grandes (hasta 15 μm) se acumulan en el bazo, el hígado y la médula ósea [168]. El tamaño de la partícula también influye en los mecanismos de internalización celular como la fagocitosis, la macropinocitosis o la endocitosis mediada por caveolas, entre otras. Cabe destacar que el destino del material interiorizado será diferente en cada caso [169, 170].

En teleósteos, hay pocos estudios sobre cómo las nanopartículas se distribuyen por el organismo a través del sistema circulatorio, las branquias, el intestino, el bazo, el hígado o el cerebro [123, 171]. Los actuales resultados indican que la forma de las partículas y la rigidez también son factores claves para la cinética y el destino de las nanopartículas, que afectan principalmente a la endocitosis. La gran mayoría de las nanopartículas tienen forma esférica, sin embargo, volúmenes similares con diferentes formas se internalizan a diferentes velocidades [172, 173]. El aumento de la rigidez de las nanopartículas se ha relacionado con una mayor fagocitosis por parte de los macrófagos [174]. El uso de nanopartículas también tiene sus limitaciones. Por ejemplo, su pequeño tamaño y gran superficie pueden conducir a la agregación de las partículas, lo que conlleva a una carga limitada de moléculas y una liberación explosiva, por lo que la manipulación física de las nanopartículas es difícil en sus formas líquidas y secas [175]. A continuación, se describirán los diferentes nanomateriales utilizados en peces como sistemas de plataforma de entrega de inmunoestimulantes o en vacunación, hasta el momento estos son; el quitosano, los liposomas, el PLGA, los nanotubos de carbón, los lípidos sólidos y las nanopartículas de fosfato de calcio (**Figura 10**).

El quitosano es un compuesto polisacárido lineal obtenido a partir del derivado N-acetilado de la quitina mediante procesos enzimáticos o químicos. La quitina es un polímero natural, biodegradable, biocompatible y no tóxico, derivado de las conchas de crustáceos, insectos y algunos microorganismos. Los beneficios de la utilización del quitosano en peces se han demostrado en diferentes estudios, en los que se administraron nanopartículas de quitosano a través de la dieta. Las dietas suplementadas con quitosano han sido evaluadas en diferentes especies, por ejemplo, *O. mykiss*, *P. olivaceus*, *Epinephelus bruneus*, *Scophthalmus maximus* y *C. auratus* [176–180]. Estos estudios han demostrado que el quitosano puede mejorar el crecimiento, la inmunidad innata, la resistencia a enfermedades y estrés, mejorar los parámetros hematológicos así como la calidad del agua. Desde la perspectiva de la inmunidad de peces, las nanopartículas de quitosano debido a su carga positiva y su solubilidad en solución acuosa, se han utilizado para la entrega de vitamina C, ARN o ADN [181–185]. Además, las nanopartículas de quitosano protegen a los compuestos activos de las condiciones extremas del tracto gastrointestinal y mejoran su absorción [186].

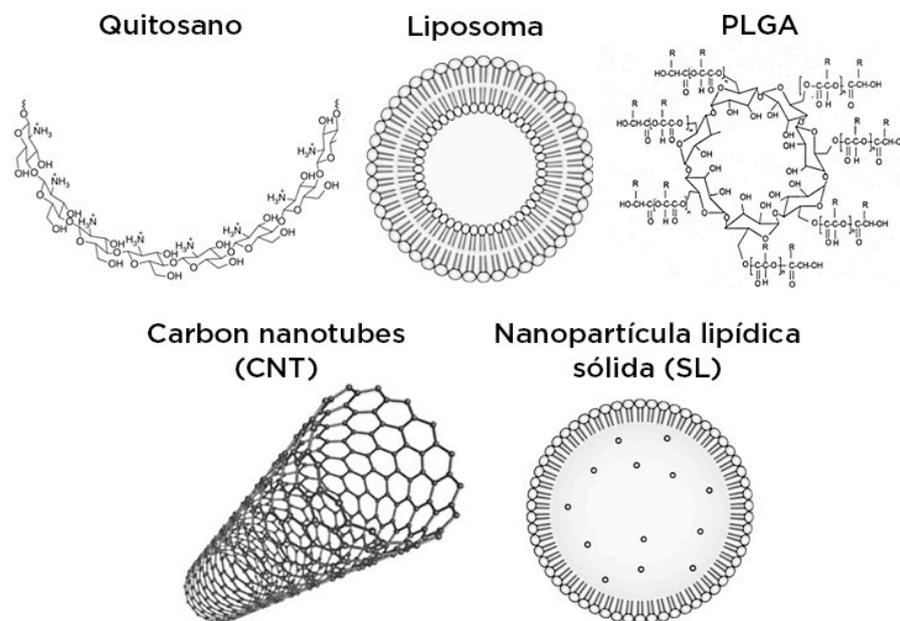


Figura 10. **Nanopartículas investigadas en teleósteos.**

Los liposomas son partículas esféricas, con estructura cerrada compuestas por bicapas de fosfolípidos, que encierran parte del disolvente circundante en su interior [187]. Poseen la capacidad de autosellado y permiten incorporar drogas tanto hidrófilicas como lipófilicas. En comparación con los microliposomas, los nanoliposomas proporcionan una mayor superficie y tienen el potencial de aumentar la solubilidad, mejorar la biodisponibilidad y la liberación controlada de drogas, permitiendo una mayor precisión para localizar las células o tejidos diana del material encapsulado. Los liposomas han sido utilizados para encapsular diferentes compuestos, por ejemplo, bacterianos (bacterias inactivadas con formalina y LPS) [188–192]; virales (virus inactivados con formalina y poly (I:C)) [123, 188, 193] y otros como, BSA, melitina (un péptido antimicrobiano) y cinamaldehído (un compuesto natural) [194–196]. En general, los antígenos bacterianos encapsulados en liposomas, otorgan una mayor protección que los antígenos sin encapsular, siendo capaces de estimular la producción de anticuerpos específicos contra los antígenos encapsulados. Por otro lado, los antígenos virales contenidos en liposomas confieren elevados niveles de protección y son capaces de estimular una respuesta proinflamatoria y antiviral, aunque no son resultados tan consistentes como con los antígenos

bacterianos. Finalmente, los liposomas encapsulando otros compuestos, disminuyen la capacidad de infección frente a un patógeno, otorgan un incremento en la supervivencia y son capaces de estimular la producción de anticuerpos específicos, sin embargo, son necesarios más estudios para demostrar el alcance de su eficacia.

El PLGA, poli (láctico-co-ácido glicólico) es un copolímero biodegradable y biocompatible sintetizado a partir de dos monómeros diferentes, el ácido láctico y el ácido glicólico [197]. Cuando el PLGA es hidrolizado, sus compuestos son liberados y eventualmente eliminados del organismo, a través del ciclo del ácido cítrico [198]. Por esta razón, hay una mínima toxicidad asociada a la utilización del PLGA. Una amplia variedad de antígenos han sido encapsulados con este material como: antígenos bacterianos (complejo exterior de la membrana y bacterias inactivadas con formalina) [199, 200]; antígenos virales (principalmente vacunas de ADN) [201, 202]; y otros compuestos como γ -globulinas, hemocianina o β -glucano [203, 204]. Las nanopartículas de PLGA otorgan buenos niveles de protección, aunque, no siempre tan elevados como los que otorga el antígeno desnudo; aún así son capaces de estimular tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Los antígenos virales encapsulados con PLGA muestran resultados menos favorables que los descritos en antígenos bacterianos. Por otro lado, el PLGA encapsulando compuestos como γ -globulinas, hemocianina o β -glucano, otorgan una leve respuesta inflamatoria, aunque, es capaz de estimular la producción de anticuerpos específicos en contra del antígeno encapsulado (depende del antígeno), teniendo una función potencial como adyuvante.

Existe un gran esfuerzo por descubrir nuevas plataformas de entrega de inmunostimulantes en teleósteos para cubrir las diversas necesidades relacionadas con la prevención de enfermedades en acuicultura. Algunos ejemplos son: los nanotubos de carbón (*carbon nanotubes*, CNTs), las nanopartículas de fosfato de calcio (*calcium phosphate*, CaP) y las nanopartículas lipídicas solidas (*solid lipid*, SL). Los resultados obtenidos con CNTs son muy prometedores ya que ofrece una elevada protección después de una infección viral (100 % de RPS de CNTs en comparación con un 44 % del antígeno sin encapsular a una dosis de 10 μ g) [205]. En el caso de CaP también otorga altos niveles de protección pero similares al concedido por el adyuvante incompleto de Freund (*Freund's incomplete adjuvant*, FIA) [206]. Finalmente, los SL sólo han sido evaluados *in vitro*, encapsulando una molécula fluorescente (*6-coumarin*), se ha observado

que las nanopartículas de SL son internalizados por las células de manera dependiente de la dosis y del tiempo, sin afectar la viabilidad celular [207].

Hoy en día, existe una amplia variedad de materiales que pueden ser utilizados como plataforma de entrega de vacunas o inmunoestimulantes en peces. Sin embargo, el estudio de las nanopartículas en acuicultura es reciente. Las investigaciones muestran una eficiencia variable de la protección, dependiendo de diversos factores como, la naturaleza del nanomaterial, el método utilizado para producir las nanopartículas, los antígenos encapsulados y las especies evaluadas. Además, el conocimiento que se tiene del sistema inmune en peces es limitado en varios aspectos, por ejemplo, cómo trabaja la memoria del sistema inmune adaptativo, qué tipos celulares están relacionados o el rol de la inmunidad mucosal. Adicionalmente, diferentes especies tienen diferentes respuestas a la vacunación [115], y esto debería ser considerado cuando se elige el método de encapsulación, ya que puede que no sea transferible de una especie a otra. Igualmente, es importante tener en consideración el coste final del proceso de encapsulación para la producción industrial. Algunos sistemas desarrollados bajo condiciones de investigación son costosos y no suelen ser asequibles para la acuicultura. En este contexto, proponemos en esta tesis una nueva plataforma de entrega de inmunoestimulantes, basada en nanoproteínas que proporcionan características, que no están presentes en otros nanomateriales, y que la hace altamente atractiva para su utilización en acuicultura.

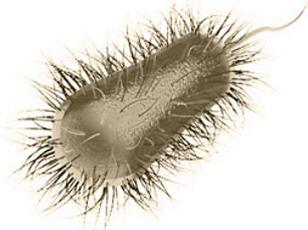
Los cuerpos de inclusión

La producción de proteínas recombinantes es la mayor plataforma tecnológica de la biotecnología. El desarrollo de la genética recombinante en la década de los 70 proporcionó las herramientas que permitieron modificar secuencias de ADN, copiando, cortando y uniéndolo covalentemente pequeñas secuencias de ADN. Estas tres acciones fueron cruciales para el origen de las proteínas recombinantes, ya que hicieron posible la introducción de genes codificadores de proteínas en vectores de expresión y la síntesis de la proteína en un sistema heterólogo. La producción de proteínas recombinantes en sistemas de sobreexpresión, comenzó con la producción de proteínas de interés, como la insulina y los interferones [208–210]. La posibilidad de producción en grandes cantidades, ofrece la oportunidad de explotar las funciones de estas proteínas en diversos sectores.

El proceso de producción de las proteínas recombinantes requiere de: **1)** la selección del sistema heterólogo de producción; **2)** la selección del vector de expresión; **3)** clones de alto rendimiento y calidad y **4)** que la producción sea escalable, constante, altamente productiva y de bajo coste [211]. La producción de proteínas recombinantes se puede realizar en diferentes sistemas de expresión, dependiendo de las características de la proteína; generalmente se utilizan sistemas eucariotas, si la proteína está glicosilada o debe ser modificada después de la traducción [212]. Existe una amplia gama de sistemas para la producción de proteínas recombinantes, tales como, bacterias, levaduras, células de insectos, protozoos y células de mamíferos o plantas [213, 214] (**Figura 11**).

Escherichia coli es uno de los sistemas de producción de proteínas más populares tanto a nivel académico como industrial [218–220]. Es una bacteria entérica gram negativa que presenta diferentes ventajas sobre otros sistemas como: un crecimiento rápido y a una alta densidad; bajo coste de cultivo, fácil manejo y producción a gran escala; rápida expresión de genes; una amplia comprensión de su biología; un genoma conocido; fácil modificación genética y existe una extensa variedad de vectores de clonación y expresión para utilizar en esta especie [211, 221]. La producción de proteínas recombinantes en bacterias como *E. coli* no siempre resulta en proteínas funcionales, ya que no hay garantías de que se plieguen correctamente, siendo constante la formación de agregados [222, 223]. La sobreexpresión de estas proteínas en bacterias lleva a su deposición en el citoplasma o a la formación de agregados periplásmicos, llamados **cuerpos de inclusión** (CI). La formación de los CI está asociada con un rendimiento de producción de la proteína soluble reducido. Durante mucho tiempo se creyó que los CI eran agregados sin estructura, formados solamente por polipéptidos desplegados e incorrectamente plegados, siendo considerados productos de desecho de la producción de proteínas recombinantes [224] (**Figura 12**). Contrariamente a las hipótesis propuestas, hoy en día se sabe que los CI conservan una consistente actividad biológica [225]. Consecuentemente, esto impulsó el estudio del proceso de agregación *in vivo* para comprender como los factores físicos-químicos podían modular sus características y así mejorar sus posibles aplicaciones en biotecnología [226].

Bacterias



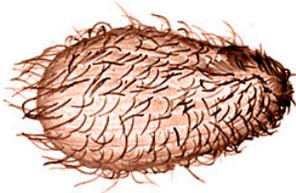
Escherichia coli
Lactobacillus lactis
Pseudoalteromonas haloplanktis

Levaduras



Saccharomyces cerevisiae
Pichia pastoris

Protozoos



Tetrahymena thermophila

Células de insectos



High five cells de *Trichoplusia ni*
Mimic™ Sf9 células de insectos

Células de plantas



Nicotiana benthamiana
Nicotiana tabacum
Arabidopsis thaliana
Medicago sativa
Lemna minor
Physcomitrella patens

Células de mamíferos



Ovario de hámster chino (CHO)
Mieloma de ratón (NS0)
Riñón de hámster bebé (BHK)
Riñón embrionario humano (HEK-293)
Retina derivada de humano (PERC6)

Figura 11. **Sistemas de producción de proteínas recombinantes.**

(referencias [213–217]).

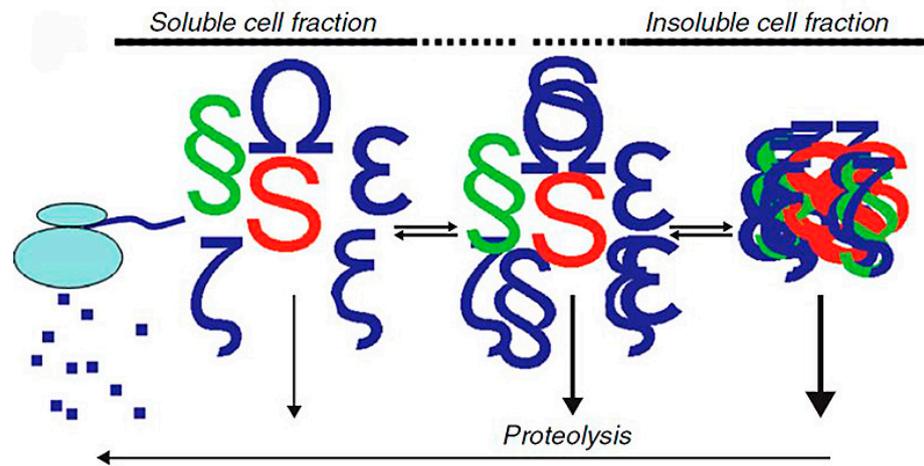


Figura 12. **Conformación de las proteínas que estructuran los CI.**

Los CI están formados por proteínas con conformación nativa y por lo tanto funcionales (rojo), isoformas funcionales (verde) y en mayor proporción por proteínas incorrectamente plegadas (azul) (modificado de [224]).

Actualmente, los CI son considerados como un nuevo y prometedor nanomaterial que se puede emplear en diferentes aplicaciones biotecnológicas [224]. En condiciones de sobreexpresión heteróloga, diferentes condiciones pueden predisponer a la producción de CI tales como, la incapacidad de la bacteria de realizar modificaciones post-transcripcionales requeridas por la proteína heteróloga, la saturación de los moduladores celulares plegables, la sobreexpresión de la proteína recombinante, el incremento de la concentración de plegamientos intermedios (agregados/nativos) que a su vez se ensamblan en agregados solubles e insolubles [227]. Además, los polipéptidos sintetizados por los ribosomas liberan su conformación nativa mediante intermediarios de plegamiento que pueden ser más propensos a la agregación que a la conformación nativa. Las condiciones de cultivo también afectan a la formación de los CI, como las fluctuaciones de temperatura y las condiciones de estrés. Las diferentes rutas de formación y degradación de los CI se detallan en la **Figura 13**.

Los CI están compuestos principalmente por proteína recombinante, que puede representar del 80 al 100 % del contenido de proteína total de la célula. Sin embargo, los CI pueden contener también fragmentos proteolíticos de la proteína recombinante, componentes ribosomales, fosfolípidos, ácidos nucleicos y componentes de la membrana bacteriana, como LPS y PGN [228–232].

La **caracterización de la estructura** de los CI mediante microscopía de transmisión de electrones (*transmission electron microscopy*, TEM) muestra un material electro denso con regiones electro transparentes de 20 a 30 Å, probablemente debido a la presencia de poros [233]. Por otra parte, los CI a través de microscopía electrónica de barrido (*scanning electron microscopy*, SEM) aparecen como estructuras porosas con superficies rugosas o lisas.

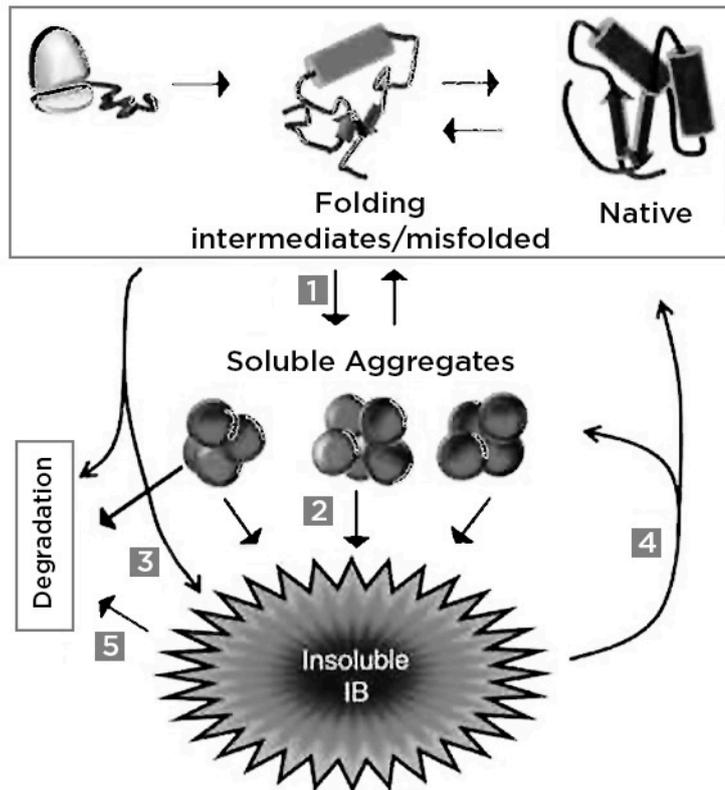


Figura 13. **Esquema de la formación y degradación de los CI.**

La formación de los CI puede ocurrir mediante diferentes procesos: 1) proteínas parcialmente plegadas e incorrectamente plegadas se pueden formar desde la proteína original; 2) desde múltiples agregados solubles; 3) uno o pocos sitios de nucleación desencadenan la deposición de polipéptidos recién sintetizados en el CI; 4) las proteínas pueden ser liberadas desde los CI y plegarse correctamente y 5) los CI pueden ser degradados por sistemas de control de calidad bacterianos (modificado de [227]).

El análisis por microscopía electrónica de los CI, tanto purificados como no purificados, revelan diferentes formas (ovoide, cilíndrica y esférica), con un tamaño que varía dependiendo de la proteína entre los 50 a 1600 nm, siendo la densidad de los CI del orden de 1,3 g/ml [234] (**Tabla 6**). Los CI poseen dos estructuras principales: el tipo nativo y el tipo amiloide. Se ha demostrado que los CI tienen proteínas con su conformación nativa (tipo nativo) y por tanto mantienen su función. Por otro lado, los CI también pueden contener estructuras de tipo amiloide, que se caracterizan por la presencia de láminas- β intermoleculares, la capacidad de unir los típicos colorantes amiloides y la habilidad de formar fibras [235] (**Tabla 6**). Sin embargo, se desconoce como los dos tipos de proteínas, nativa y amiloide, pueden coexistir en los CI.

Una gran variedad de características físico-químicas de los CI pueden ser moldeables modificando el fondo genético del huésped y las condiciones de cultivo (tiempo, pH, temperatura) [224]. Características como el tamaño, la geometría, la rigidez, la humectabilidad, la carga neta, la bioadhesividad, la estabilidad proteolítica, la actividad específica, la densidad/porosidad y la liberación de proteínas, pueden ser modificadas dependiendo de las características finales que se deseen [224, 231, 236–238]. La plasticidad que presentan los CI los convierten en un material con un alto potencial para ser utilizado en biotecnología.

Los CI bacterianos han sido considerados como residuos de la producción de las proteínas recombinantes. Sin embargo, durante la última década el estudio del proceso de deposición planteó la aparición de nuevos usos. Una de las principales aplicaciones de los CI a nivel biotecnológico ha sido como biocatalizadores inmovilizados, presentando, en este caso, mayores ventajas que la utilización de biocatalizadores solubles [239, 240]. También han sido utilizados en biotecnología como modelo de agregación de proteínas por su similitud con la formación de fibrillas amiloides en mamíferos (causante de enfermedades) [244, 245]. Adicionalmente, los CI se han testeado como nanomaterial con fines terapéuticos, en ingeniería de tejidos y como plataforma de entrega de drogas y polipéptidos [237, 251–252]. Una de las propiedades de los CI de interés en esta tesis, es su capacidad de funcionar como plataforma de entrega de polipéptidos. Por ejemplo, los CI formados con una chaperona (Hsp70) o con el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) se depositan en las células suministrando proteínas y mejorando la viabilidad celular, respectivamente [237]. Utilizados en suspensión, los CI formados por estas proteínas (Hsp70 y FGF-2) pueden penetrar las células y la membrana nuclear, en ausencia de to-

xicidad celular, promoviendo la viabilidad celular a través de su efecto terapéutico, por lo que se sugiere que existe una liberación de proteínas desde los CI [252, 253]. La liberación funcional de proteínas desde los CI parece implicar solo una fracción de sus proteínas, ya que, después de la incubación, aún es posible observar en las células los CI, sugiriendo una estructura tipo andamio mecánicamente estable. Mientras las fibras amiloides pueden conferir estabilidad, las proteínas correctamente plegadas otorgan funcionalidad a los CI. El potencial de los CI como nanomaterial terapéutico es altamente prometedor, por lo cual, en esta tesis se exploran las características de los CI para su aplicación en la acuicultura.

Propiedades funcionales y estructurales	Implicaciones biotecnológicas	Referencias
<p>Estabilidad general La estabilidad es dependiente de la proteína y de las condiciones de cultivo.</p>	<p>Solubilidad leve para mejorar la recuperación de proteínas funcionales. CI no clásicos pueden ser usados como sistema de entrega de proteínas funcionales.</p>	[224, 241]
<p>Tamaño, forma y morfología Forma ovoide, cilíndrica y esférica. El tamaño fluctúa entre los 50 a 1600 nm. Morfología porosa con una superficie rugosa o lisa. Material electro denso con regiones electro transparentes.</p>	<p>La forma de los CI y el volumen es principalmente dependiente del fondo genético del huésped y de las condiciones y tiempo de cultivo. La posibilidad de modificar la geometría de los CI y sus características mecánicas tienen un gran potencial para el uso de los CI como biomaterial para la ingeniería de tejidos.</p>	[228, 231, 234, 242, 243]
<p>Tipo Nativo Las proteínas contenidas en los CI pueden retener su conformación y función nativa.</p>	<p>CI activos se pueden emplear como un eficiente, estable y reutilizable biocatalizador. Liberación de proteínas funcionales.</p>	[224]
<p>Tipo Amiloide Alta presencia de láminas β. Unión a colorantes amiloides: Rojo congo, Tioflavinas T y S. Organización de los CI en fibras de proteínas <i>in vitro</i>. Interacción específica entre proteínas en el proceso de agregación. Presencia de estructuras prefibrilares y fibrilares con CI.</p>	<p>Los CI como un modelo de estudio de la agregación amiloide en células y para la investigación de compuestos que inhiben la agregación amiloide.</p>	[235, 244–250]

Tabla 6. **Propiedades estructurales de los cuerpos de inclusión.**

(modificado de [227]).

Referencias

- [1] F. González, H. Lupin, y J. Breton de la Cal. **Acuicultura: producción, comercio y trazabilidad**. España: Netbiblio, 2004. p 168.
- [2] Food and Agriculture Organization of the United. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. Rome, 2014.
- [3] D. Pauly, V. Christensen, S. Guénette, T. J. Pitcher, U. R. Sumaila, C. J. Walters, R. Watson, y D. Zeller. **Towards sustainability in world fisheries**. *Nature*. vol. 418, no. Agosto, pp. 689–695, 2002.
- [4] D. Pauly, R. Watson, y J. Alder. **Global trends in world fisheries: impacts on marine ecosystems and food security**. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 360, no. 1453, pp. 5–12, 2005.
- [5] S. Fillatreau, A. Six, S. Magadan, R. Castro, J. O. Sunyer, y P. Boudinot. **The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish**. *Front. Immunol.*, vol. 4, no. Febrero, pp. 1–14, 2013.
- [6] I. Sommerset, B. Krossøy, E. Biering, y P. Frost. **Vaccines for fish in aquaculture**. *Expert Rev. Vaccines*, vol. 4, no. 1, pp. 89–101, 2005.
- [7] F. S. B. Kibenge, M. G. Godoy, M. Fast, S. Workenhe, y M. J. T. Kibenge. **Countermeasures against viral diseases of farmed fish**. *Antiviral Res.*, vol. 95, no. 3, pp. 257–81, 2012.
- [8] M. Krkosek. **Host density thresholds and disease control for fisheries and aquaculture**. *Aquac. Environ. Interact.*, vol. 1, no. 1, pp. 21–32, 2010.
- [9] T. L. F. Leung y A. E. Bates. **More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security**. *J. Appl. Ecol.*, vol. 50, no. 1, pp. 215–222, 2013.
- [10] B. T. Hargrave. **Environmental Effects of Marine Finfish Aquaculture**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005.
- [11] K. O. Helgesen, S. Bravo, S. Sevatdal, J. Mendoza, y T. E. Horsberg. **Deltamethrin resistance in the sea louse *Caligus rogercresseyi* (Boxhall and Bravo) in Chile: Bioassay results and usage data for antiparasitic agents with references to Norwegian conditions**. *J. Fish Dis.*, vol. 37, no. 10, pp. 877–890, 2014.
- [12] C. Uribe, H. Folch, R. Enriquez, y G. Moran. **Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review**. *Veterinari Medicina.*, vol. 2011, no. 10, pp. 486–503, 2011.
- [13] I. Mulero, A. García-Ayala, J. Meseguer, y V. Mulero. **Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview**. *Aquaculture*, vol. 268, no. 1–4, pp. 244–250, 2007.
- [14] A. Zapata, B. Diez, T. Cejalvo, C. Gutiérrez-De Frías, y A. Cortés. **Ontogeny of the immune system of fish**. *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 126–136, 2006.
- [15] G. J. Lieschke y N. S. Trede. **Fish immunology**. *Curr. Biol.*, vol. 19, no. 16, pp. 678–682, 2009.

- [16] L. Du Pasquier. **The immune system of invertebrates and vertebrates.** *Comp. Biochem. Phys. Part B.* vol 129 pp. 1–15, 2001.
- [17] M. F. Flajnik y M. Kasahara. **Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures.** *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, no. 1, pp. 47–59, 2010.
- [18] J. O. Sunyer. **Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system.** *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 4, pp. 320–6, 2013.
- [19] A. Rebl, T. Goldammer, y H. M. Seyfert. **Toll-like receptor signaling in bony fish.** *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 134, no. 3–4, pp. 139–50, 2010.
- [20] J. N. Volff. **Genome evolution and biodiversity in teleost fish.** *Heredity* (Edinb.), vol. 94, no. 3, pp. 280–294, 2005.
- [21] S. A. Arancibia, C. J. Beltrán, I. M. Aguirre, P. Silva, A. L. Peralta, F. Malinarich, y M. A. Hermoso. **Toll-like receptors are key participants in innate immune responses.** *Biol. Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 97–112, 2007.
- [22] J. A. Hoffmann. **Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity.** *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1313–1318, 1999.
- [23] Z. Kanwal, G. F. Wiegertjes, W. J. Veneman, A. H. Meijer, y H. P. Spaink. **Comparative studies of Toll-like receptor signalling using zebrafish.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 46, no. 1, pp. 35–52, 2014.
- [24] S. Akira, S. Uematsu, y O. Takeuchi. **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783–801, 2006.
- [25] T. Kawai y S. Akira. **Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity.** *Immunity*, vol. 34, no. 5, pp. 637–50, 2011.
- [26] L. Zhu, L. Nie, G. Zhu, L. Xiang, y J. Shao. **Advances in research of fish immune-relevant genes: a comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 39, no. 1–2, pp. 39–62, 2013.
- [27] B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, y J. A. Hoffmann. **The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/Cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.** *Cell*, vol. 86, no. 6, pp. 973–983, 1996.
- [28] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, y C. A. Janeway. **A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.** *Nature*, vol. 388, no. 6640, pp. 394–397, 1997.
- [29] T. Aoki, T. Takano, M. D. Santos, y H. Kondo. **Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: Review and Future Perspectives.** *Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress*, pp. 263–276, 2008.
- [30] Y. Palti. **Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 35, no. 12, pp. 1263–72, 2011.
- [31] D. Pietretti y G. F. Wiegertjes. **Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 43, no. 2, pp. 205–22, 2014.

- [32] M. P. Sepulcre, F. Alcaraz-Pérez, A. López-Muñoz, F. J. Roca, J. Mesguer, M. L. Cayuela, y V. Mulero. **Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation.** *J. Immunol.*, vol. 182, no. 4, pp. 1836–1845, 2009.
- [33] M. K. Purcell, K. D. Smith, L. Hood, J. R. Winton, y R. C. Jared. **Conservation of Toll-Like Receptors Signaling Pathways in Teleost Fish.** *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*, vol. 1, no. 1, pp. 77–88, 2006.
- [34] C. Jault, L. Pichon, y J. Chluba. **Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*.** *Mol. Immunol.*, vol. 40, no. 11, pp. 759–771, 2004.
- [35] R. Medzhitov. **Recognition of microorganisms and activation of the immune response.** *Nature*, vol. 449, no. 7164, pp. 819–26, 2007.
- [36] G. R. Vasta, M. Nita-Lazar, B. Giomarelli, H. Ahmed, S. Du, M. Cammarata, N. Parrinello, M. A. Bianchet, y L. M. Amzel. **Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: relevance to innate and adaptive immunity.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 35, no. 12, pp. 1388–99, 2011.
- [37] S. K. Whyte. **The innate immune response of finfish—a review of current knowledge.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 23, no. 6, pp. 1127–51, 2007.
- [38] J. H. W. M. Rombout, N. Taverne, M. van de Kamp, y A. J. Taverne-Thiele. **Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.).** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 17, no. 4, pp. 309–317, 1993.
- [39] F. Aranishi y M. Nakane. **Epidermal proteases of the Japanese eel.** *Fish Physiol. Biochem.*, vol. 16, no. 6, pp. 471–478, 1997.
- [40] H. Boshra, J. Li, y J. O. Sunyer. **Recent advances on the complement system of teleost fish.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 239–262, 2006.
- [41] S. Saurabh y P. K. Sahoo. **Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system.** *Aquac. Res.*, vol. 39, no. 3, pp. 223–239, 2008.
- [42] C. J. Secombes y T. C. Fletcher. **The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish.** *Annu. Rev. Fish Dis.*, vol. 2, no. C, pp. 53–71, 1992.
- [43] N. F. Neumann, J. L. Stafford, D. Barreda, A. J. Ainsworth, y M. Belosevic. **Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 25, no. 8–9, pp. 807–825, 2001.
- [44] V. Wittamer, J. Y. Bertrand, P. W. Gutschow, D. Traver, W. Dc, V. Wittamer, J. Y. Bertrand, P. W. Gutschow, y D. Traver. **Characterization of the mononuclear phagocyte system in zebrafish.** *Blood*. vol. 117, no. 26, pp. 7126–7135, 2012.
- [45] V. S. Blazer. **Piscine Macrophage Function and Nutritional Influences: A Review.** *J. of Aquat. Anim. Heal.*, vol. 3, no. Enero, 2015, pp. 77–86, 1991.

- [46] S. Lange y B. Magnadóttir. **Spontaneous haemolytic activity of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) serum.** *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 136, no. 1, pp. 99–106, 2003.
- [47] B. Magnadóttir, S. Lange, S. Gudmundsdóttir, J. Bogwald, y R. A. Dalmo. **Ontogeny of humoral immune parameters in fish.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 19, no. 5, pp. 429–439, 2005.
- [48] J. Li, D. R. Barreda, Y. A. Zhang, H. Boshra, A. E. Gelman, S. Lapatra, L. Tort, y J. O. Sunyer. **B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities.** *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 10, pp. 1116–24, 2006.
- [49] A. R. Mantegazza, J. G. Magalhaes, S. Amigorena, y M. S. Marks. **Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II.** *Traffic*, vol. 14, no. 2, pp. 135–52, 2013.
- [50] G. Scapigliati. **Functional aspects of fish lymphocytes.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 41, no. 2, pp. 200–8, 2013.
- [51] K. J. Laing y J. D. Hansen. **Fish T cells: recent advances through genomics.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 35, no. 12, pp. 1282–95, 2011.
- [52] C. C. Goodnow, C. G. Vinuesa, K. L. Randall, F. Mackay, y R. Brink. **Control systems and decision making for antibody production.** *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 8, pp. 681–8, 2010.
- [53] G. Lugo-Villarino, K. M. Balla, D. L. Stachura, K. Bañuelos, M. B. F. Werneck, y D. Traver. **Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 36, pp. 15850–5, 2010.
- [54] N. Aghaallaei, B. Bajoghli, H. Schwarz, M. Schorpp, y T. Boehm. **Characterization of mononuclear phagocytic cells in medaka fish transgenic for a *cxcr3a: gfp* reporter.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 42, pp. 18079–84, 2010.
- [55] E. Bassity y T. G. Clark. **Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33196, 2012.
- [56] M. Wilson, E. Bengtén, N. Miller, L. Clem, L. Du Pasquier, y G. Warr. **A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. Abril, pp. 4593–4597, 1997.
- [57] J. D. Hansen, E. D. Landis, y R. B. Phillips. **Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 19, pp. 6919–24, 2005.
- [58] N. Danilova, J. Bussmann, K. Jekosch, y L. A. Steiner. **The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z.** *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 3, pp. 295–302, 2005.
- [59] U. Andersson y K. J. Tracey. **Reflex Principles of Immunological Homeostasis.** *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, no. 1, pp. 313–335, 2012.

- [60] J. Andersson. **The inflammatory reflex-introduction.** *J. Intern. Med.*, vol. 257, no. 2, pp. 122–125, 2005.
- [61] M. Rosas-Ballina y K. J. Tracey. **The Neurology of the Immune System: Neural Reflexes Regulate Immunity.** *Neuron*, vol. 64, no. 1, pp. 28–32, 2009.
- [62] K. J. Tracey. **Immune cells exploit a neural circuit to enter the CNS.** *Cell*, vol. 148, no. 3, pp. 392–394, 2012.
- [63] K. J. Tracey. **Understanding immunity requires more than immunology.** *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 7, pp. 561–4, 2010.
- [64] M. Ek, M. Kurosawa, T. Lundeberg, y A. Ericsson. **Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins.** *J. Neurosci.*, vol. 18, no. 22, pp. 9471–9479, 1998.
- [65] T. Hosoi, Y. Okuma, T. Matsuda, y Y. Nomura. **Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: Possible role of nodose ganglion.** *Auton. Neurosci. Basic Clin.*, vol. 120, no. 1–2, pp. 104–107, 2005.
- [66] M. Gallowitsch-Puerta y K. J. Tracey. **Immunologic role of the cholinergic anti-inflammatory pathway and the nicotinic acetylcholine alpha 7 receptor.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1062, pp. 209–219, 2005.
- [67] K. J. Tracey. **Reflex control of immunity.** *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 6, pp. 418–428, 2009.
- [68] M. Rosas-Ballina, M. Ochani, W. R. Parrish, K. Ochani, Y. T. Harris, J. M. Huston, S. Chavan, y K. J. Tracey. **Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 31, pp. 11008–13, 2008.
- [69] J. M. Huston, M. Ochani, M. Rosas-Ballina, H. Liao, K. Ochani, V. A. Pavlov, M. Gallowitsch-Puerta, M. Ashok, C. J. Czura, B. Foxwell, K. J. Tracey, y L. Ulloa. **Splenectomy inactivates the cholinergic anti-inflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis.** *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 7, pp. 1623–8, 2006.
- [70] X. M. Song, J. G. Li, Y. L. Wang, H. Liang, Y. Huang, X. Yuan, Q. Zhou, y Z. Z. Zhang. **Effect of vagus nerve stimulation on thermal injury in rats.** *Burns*, vol. 36, no. 1, pp. 75–81, 2010.
- [71] C. C. Dos Santos, Y. Shan, A. Akram, A. S. Slutsky, y J. J. Haitzma. **Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 183, no. 4, pp. 471–482, 2011.
- [72] S. Guarini, D. Altavilla, M. M. Cainazzo, D. Giuliani, A. Bigiani, H. Marini, G. Squadrito, L. Minutoli, A. Bertolini, R. Marini, E. B. Adamo, F. S. Venuti, y F. Squadrito. **Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock.** *Circulation*, vol. 107, no. 8, pp. 1189–1194, 2003.
- [73] L. V. L. Borovikova, S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G. I. Botchkina, L. R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J. W. Eaton, y K. J. Tracey. **Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin.** *Nature*, vol. 405, no. Mayo, pp. 458–462, 2000.

- [74] H. Wang, M. Yu, M. Ochani, C. A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J. H. Li, H. Wang, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C. J. Czura, y K. J. Tracey. **Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation.** *Nature*, vol. 421, no. 6921, pp. 384–388, 2003.
- [75] M. A. S. Khan, M. Farkhondeh, J. Crombie, L. Jacobson, M. Kaneki, y J. A. J. Martyn. **Lipopolysaccharide Upregulates α 7 Acetylcholine Receptors.** *Shock*, vol. 38, no. 2, pp. 213–219, 2012.
- [76] W. Y. Cui, S. Zhao, R. Polanowska-Grabowska, J. Wang, J. Wei, B. Dash, S. L. Chang, J. J. Saucerman, J. Gu, y M. D. Li. **Identification and characterization of poly(I:C) induced molecular responses attenuated by nicotine in mouse macrophages.** *Mol. Pharmacol.*, vol. 83, no. 1, pp. 61–72, 2013.
- [77] O. J. Felten SY. **Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminals form synapticlike contacts on lymphocytes in the splenic white pulp.** *J Neurosci. Res.*, vol. 18, pp. 37–48, 1987.
- [78] G. Vida, G. Peña, E. a Deitch, y L. Ulloa. **Alpha 7 Cholinergic Receptor Mediates Vagal Induction of Splenic Norepinephrine.** *J. Immunol.*, vol. 186, no. 7, pp. 4340–4346, 2011.
- [79] M. Rosas-Ballina, R. Goldstein, M. Gallowitsch-Puerta, Y. Lihong, S. I. Valdés-Ferrer, P. N. B, S. Chavan, Y. Al-Abed, Y. Huan, y K. J. Tracey. **The Selective α 7 Agonist GTS-21 Attenuates Cytokine Production in Human Whole Blood and Human Monocytes Activated by Ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE.** *Mol. Med.*, vol. 15, no. 7–8, pp. 195–202, 2009.
- [80] V. A. Pavlov, W. R. Parrish, R.-B. Mauricio, M. Ochani, M. Puerta, K. Ochani, S. Chavan, Y. Al-Abed, y K. J. Tracey. **Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway.** *Brain Behav. Immun.*, vol. 23, no. 1, pp. 41–45, 2009.
- [81] R. S. Broide y Leslie FM. **The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity.** *Mol Neurobiol.*, vol. 20, pp. 1 – 16, 1999.
- [82] K. Z. Sato, T. Fujii, Y. Watanabe, S. Yamada, T. Ando, F. Kazuko, y K. Kawashima. **Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines.** *Neurosci. Lett.*, vol. 266, no. 1, pp. 17–20, 1999.
- [83] K. S. Lips, P. König, K. Schätzle, P. Uwe, K. Gabriela, S. Markus, H. R. Viktor, G. S. A., y K. Wolfgang. **Coexpression and Spatial Association of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits alpha7 and alpha10 in Rat Sympathetic Neurons.** *J. Mol. Neurosci.*, vol. 30, pp. 55–56, 2006.
- [84] W. Parrish, M. Rosas-Ballina, M. Gallowitsch-Puerta, M. Ochani, K. Ochani, L. Yang, L. Hudson, X. Lin, N. Patel, S. M. Johnson, M, S. Chaven, R. S, Goldstein, C. J. Czura, E. Miller, Y. Al-Abed, K. J. Tracey, y V. A. Pavlov. **Modulation of TNF Release by Choline Requires α 7 Subunit Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Signaling.** *Mol. Med.*, vol. 14, no. 9–10, pp. 567– 574, 2008.

- [85] K. Brandon y M. Rand. **Acetylcholine and the Sympathetic Innervation of the Spleen.** *J. Physiol.*, vol. 157, pp. 18–32, 1961.
- [86] F. E. Leaders y C. Dayrit. **The Cholinergic Component in the Sympathetic Innervation to the Spleen.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 147, pp. 145–152, 1965.
- [87] H. Yoshikawa, M. Kurokawa, N. Ozaki, K. Nara, K. Atou, E. Takada, H. Kamochi, y N. Suzuki. **Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-KappaB phosphorylation and nuclear factor-KappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7.** *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 146, no. 1, pp. 116–123, 2006.
- [88] K. J. Tracey. **Fat meets the cholinergic antiinflammatory pathway.** *J. Cell Biol.*, vol. 171, no. 2, pp. 1017–1021, 2005.
- [89] Y. H. Yang, D. L. Li, X. Y. Bi, L. Sun, X. J. Yu, H. L. Fang, Y. Miao, M. Zhao, X. He, J. J. Liu, y W. J. Zang. **Acetylcholine Inhibits LPS-Induced MMP9 Production and Cell Migration via the alpha7nAChR JAK2/STAT3 Pathway in RAW264.7 Cells.** *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 36, no. 5, pp. 2025–2038, 2015.
- [90] W. J. de Jonge, E. P. van der Zanden, F. O. The, M. F. Bijlsma, D. J. van Westerloo, R. J. Bennink, H.-R. Berthoud, S. Uematsu, S. Akira, R. M. van den Wijngaard, y G. E. Boeckxstaens. **Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway.** *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 8, pp. 844–51, 2005.
- [91] R. D. Egleton, K. C. Brown, y P. Dasgupta. **Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis.** *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 29, no. 3, pp. 151–158, 2008.
- [92] D. Williams, J. Wang, y R. Papke. **Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: advantages and limitations.** *Biochem. Pharmacol.*, vol. 82, no. 8, pp. 915–930, 2011.
- [93] D. K. Williams, C. Peng, M. R. Kimbrell, y R. L. Papke. **Intrinsically low open probability of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors can be overcome by positive allosteric modulation and serum factors leading to the generation of excitotoxic currents at physiological temperatures.** *Mol. Pharmacol.*, vol. 82, no. 4, pp. 746–59, 2012.
- [94] R. L. Papke. **Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors.** *Biochem. Pharmacol.*, vol. 89, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [95] K. Kawashima, K. Yoshikawa, Y. X. Fujii, Y. Moriwaki, y H. Misawa. **Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells.** *Life Sci.*, vol. 80, no. 24–25, pp. 2314–2319, 2007.
- [96] P. Seguela, J. Wadiche, K. Dineley-Miller, J. A. Dani, y J. W. Patrick. **Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium.** *J. Neurosci.*, vol. 13, no. 2, pp. 596–604, 1993.

- [97] M. Alkondon y E. X. Albuquerque. **Subtype-specific inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by choline: a regulatory pathway.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 318, no. 1, pp. 268–275, 2006.
- [98] P. J. Corringer, N. Le Novère, y J. P. Changeux. **Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level.** *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 40, pp. 431–458, 2000.
- [99] S. Huang, S. X. Li, N. Bren, K. Cheng, R. Gomoto, L. Chen, y S. M. Sine. **Complex between α -bungarotoxin and an $\alpha 7$ nicotinic receptor ligand-binding domain chimera.** *Biochem. J.*, vol. 454, no. 2, pp. 303–10, 2013.
- [100] S. M. Sine, S. Huang, S.X. Li, C. da Costa, y L. Chen. **Inter-residue coupling contributes to high affinity, subtype selective binding of alpha-bungarotoxin to nicotinic receptors.** *Biochem. J.*, vol. 454, no. 2, pp. 311–321, 2013.
- [101] K. Brejc, W. J. van Dijk, R. V. Klaassen, M. Schuurmans, J. van Der Oost, A. B. Smit, y T. K. Sixma. **Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors.** *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 269–276, 2001.
- [102] A. Smit, K. Brejc, N. Syed y T. K. Sixma. **Structure and Function of AChBP, Homologue of the Ligand-Binding Domain of the Nicotinic Acetylcholine.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 998, pp. 81–92, 2003.
- [103] S. X. Li, S. Huang, N. Bren, K. Noridomi, C. D. Dellisanti, S. M. Sine, y L. Chen. **Ligand-binding domain of an $\alpha 7$ -nicotinic receptor chimera and its complex with agonist.** *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 10, pp. 1253–1259, 2011.
- [104] A. Taly, P. J. Corringer, D. Guedin, P. Lestage, y J. P. Changeux. **Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system.** *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 8, no. 9, pp. 733–750, 2009.
- [105] A. S. Vallés, A. M. Roccamo, y F. J. Barrantes. **Ric-3 chaperone-mediated stable cell-surface expression of the neuronal alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in mammalian cells.** *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 30, no. 6, pp. 818–27, 2009.
- [106] S. T. Cooper y N. S. Millar. **Host cell-specific folding and assembly of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit.** *J. Neurochem.*, vol. 68, no. 5, pp. 2140–2151, 1997.
- [107] S. T. Cooper y N. S. Millar. **Host cell-specific folding of the neuronal nicotinic receptor alpha 8 subunit.** *J. Neurochem.*, vol. 70, no. 0022–3042, pp. 2585–2593, 1998.
- [108] F. Castelán, J. Mulet, M. Aldea, S. Sala, F. Sala, y M. Criado. **Cytoplasmic regions adjacent to the M3 and M4 transmembrane segments influence expression and function of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. A study with single amino acid mutants.** *J. Neurochem.*, vol. 100, no. 2, pp. 406–415, 2007.
- [109] J. Mukherjee, A. Kuryatov, S. J. Moss, J. M. Lindstrom, y R. Anand. **Mutations of cytosolic loop residues impair assembly and maturation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors.** *J. Neurochem.*, vol. 110, no. 6, pp. 1885–1894, 2009.

- [110] A. K. Jones, G. Elgar, y D. B. Sattelle. **The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the pufferfish, *Fugu rubripes***. *Genomics*, vol. 82, no. 4, pp. 441–451, 2003.
- [111] R. L. Papke, F. Ono, C. Stokes, J. M. Urban, y R. T. Boyd. **The nicotinic acetylcholine receptors of zebrafish and an evaluation of pharmacological tools used for their study**. *Biochem. Pharmacol.*, vol. 84, no. 3, pp. 352–365, 2012.
- [112] G. A. Toledo-Ibarra, K. J. G. Díaz-Resendiz, L. Pavón, y M. I. Girón-Pérez. **Cholinergic activity in mononuclear cells of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish**. *Adv. Neuroimmune Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 229–234, 2014.
- [113] S. Boltaña, S. Rey, N. Roher, R. Vargas, M. Huerta, F. Anne, F. W. Goetz, J. Moore, P. Garcia-valtanen, A. Estepa, S. Boltan, F. A. Huntingford, y S. Mackenzie. **Behavioural fever is a synergic signal amplifying the innate immune response**. *Proceedings of the Royal Society Part B*, vol. 280. 1766, 2013.
- [114] R. Gudding y W. B. Van Muiswinkel. **A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture**. *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1683–8, 2013.
- [115] B. E. Brudeseth, R. Wiulsrød, B. N. Fredriksen, K. Lindmo, K.E. Løkling, M. Bordevik, N. Steine, A. Klevan, y K. Gravningen. **Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming**. *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1759–68, 2013.
- [116] P. Alvarez-Pellitero. **Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects**. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 126, no. 3–4, pp. 171–98, 2008.
- [117] C. J. Secombes. **Can Advances in Fish Immunology Change Vaccination Strategies?**. *Fish Pathol.*, vol. 44, no. 1, pp. 14–15, 2009.
- [118] S. Sharma y L. A. Hinds. **Formulation and delivery of vaccines: On-going challenges for animal management**. *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 4, no. 4, pp. 258–66, 2012.
- [119] L. B. Hølvold, A. I. Myhr, y R. A. Dalmo. **Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish**. *Vet. Res.*, vol. 45, p. 21, 2014.
- [120] V. Vetvicka, L. Vannucci, y P. Sima. **The Effects of β -Glucan on Fish Immunity**. *N. Am. J. Med. Sci.*, vol. 5, no. 10, pp. 580–8, 2013.
- [121] D. K. Meena, P. Das, S. Kumar, S. C. Mandal, A. K. Prusty, S. K. Singh, M. S. Akhtar, B. K. Behera, K. Kumar, A. K. Pal, y S. C. Mukherjee. **Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review)**. *Fish Physiol. Biochem.*, vol. 39, no. 3, pp. 431–57, 2013.
- [122] A. C. Carrington y C. J. Secombes. **A review of CpGs and their relevance to aquaculture**. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 112, no. 3–4, pp. 87–101, 2006.
- [123] A. Ruyra, M. Cano-Sarabia, P. García-Valtanen, D. Yero, I. Gibert, S. a Mackenzie, A. Estepa, D. MasPOCH, y N. Roher. **Targeting and stimulation of the zebrafish (*Danio rerio*) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes**. *Vaccine*, vol. 32, no. 31, pp. 3955–62, 2014.

- [124] T. Itami, M. Kondo, M. Uozu, A. Suganuma, T. Abe, A. Nakagawa, N. Suzuki, y Y. Takahashi. **Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel), by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*.** *J. Fish Dis.*, vol. 19, no. 2, pp. 185–187, 1996.
- [125] S. K. Nayak, P. Swain, P. K. Nanda, S. Dash, S. Shukla, P. K. Meher, y N. K. Maiti. **Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 24, no. 4, pp. 394–9, 2008.
- [126] C. Tafalla, J. Bøgwald, y R. A. Dalmo. **Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1740–1750, 2013.
- [127] C. Erridge, E. Bennett-Guerrero, y I. R. Poxton. **Structure and function of lipopolysaccharides.** *Microbes Infect.*, vol. 4, no. 8, pp. 837–851, 2002.
- [128] D. B. Iliev, J. C. Roach, S. Mackenzie, J. V Planas, y F. W. Goetz. **Endotoxin recognition: in fish or not in fish?** *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 29, pp. 6519–28, 2005.
- [129] M. Joerink, H. F. J. Savelkoul, y G. F. Wiegertjes. **Evolutionary conservation of alternative activation of macrophages: structural and functional characterization of arginase 1 and 2 in carp (*Cyprinus carpio* L.).** *Mol. Immunol.*, vol. 43, no. 8, pp. 1116–28, 2006.
- [130] S. MacKenzie, J. V. Planas, y F. W. Goetz. **LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and *in vitro* differentiated macrophages.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 27, no. 5, pp. 393–400, 2003.
- [131] P. Jurecka, I. Irnazarow, J. L. Stafford, A. Ruszczuk, N. Taverne, M. Belosevic, H. F. J. Savelkoul, y G. F. Wiegertjes. **The induction of nitric oxide response of carp macrophages by transferrin is influenced by the allelic diversity of the molecule.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 26, no. 4, pp. 632–8, 2009.
- [132] S. A. MacKenzie, N. Roher, S. Boltaña, y F. W. Goetz. **Peptidoglycan, not endotoxin, is the key mediator of cytokine gene expression induced in rainbow trout macrophages by crude LPS.** *Mol. Immunol.*, vol. 47, no. 7–8, pp. 1450–1457, 2010.
- [133] E. J. Nya y B. Austin. **Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).** *J. Appl. Microbiol.*, vol. 108, no. 2, pp. 686–94, 2010.
- [134] B. T. B. Hang, S. Milla, V. Gillardin, N. T. Phuong, y P. Kestemont. ***In vivo* effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on regulation of immune response and protein expression in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*).** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 34, no. 1, pp. 339–47, 2013.
- [135] V. Selvaraj, K. Sampath, y V. Sekar. **Administration of lipopolysaccharide increases specific and non-specific immune parameters and survival in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*.** *Aquaculture*, vol. 286, no. 3–4, pp. 176–183, 2009.

- [136] R. Wheeler, G. Chevalier, G. Eberl, y I. Gomperts Boneca. **The biology of bacterial peptidoglycans and their impact on host immunity and physiology.** *Cell. Microbiol.*, vol. 16, no. 7, pp. 1014–1023, 2014.
- [137] U. Bertsche, C. Mayer, F. Götz, y A. A. Gust. **Peptidoglycan perception-Sensing bacteria by their common envelope structure.** *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 305, no. 2, pp. 217–223, 2015.
- [138] L. Sun, S. Liu, R. Wang, C. Li, J. Zhang, y Z. Liu. **Pathogen recognition receptors in channel catfish: IV. Identification, phylogeny and expression analysis of peptidoglycan recognition proteins.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 46, no. 2, pp. 291–299, 2014.
- [139] J. H. Li, M. X. Chang, N. N. Xue, y P. Nie. **Functional characterization of a short peptidoglycan recognition protein, PGRP5 in grass carp *Ctenopharyngodon idella*.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 2, pp. 221–230, 2013.
- [140] Q. L. Sun y L. Sun. **A short-type peptidoglycan recognition protein from tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) promotes phagocytosis and defense against bacterial infection.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 47, no. 1, pp. 313–320, 2015.
- [141] S. A. MacKenzie, N. Roher, S. Boltaña, y F. W. Goetz. **Peptidoglycan, not endotoxin, is the key mediator of cytokine gene expression induced in rainbow trout macrophages by crude LPS.** *Mol. Immunol.*, vol. 47, no. 7–8, pp. 1450–7, 2010.
- [142] A. Callol, N. Roher, C. Amaro, y S. A. MacKenzie. **Characterization of PAMP/PRR interactions in European eel (*Anguilla anguilla*) macrophage-like primary cell cultures.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 4, pp. 1216–23, 2013.
- [143] A. Ruyra, D. Torrealba, D. Morera, L. Tort, S. MacKenzie, y N. Roher. **Zebrafish liver (ZFL) cells are able to mount an anti-viral response after stimulation with Poly (I:C).** *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 182, pp. 55–63, 2015.
- [144] E. Casadei, S. Bird, S. Wadsworth, J. L. González Vecino, y C. J. Seccombe. **The longevity of the antimicrobial response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a peptidoglycan (PG) supplemented diet.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 44, no. 1, pp. 316–320, 2015.
- [145] T. Eigenbrod y A. H. Dalpke. **Bacterial RNA: An Underestimated Stimulus for Innate Immune Responses.** *J. Immunol.*, vol. 195, no. 2, pp. 411–418, 2015.
- [146] Y. Palti, S. A. Gahr, M. K. Purcell, S. Hadidi, C. E. Rexroad, y G. D. Wiens. **Identification, characterization and genetic mapping of TLR7, TLR8a1 and TLR8a2 genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 34, no. 2, pp. 219–33, 2010.
- [147] D. W. Yeh, Y. L. Liu, Y. C. Lo, C. H. Yuh, G. Y. Yu, J. F. Lo, Y. Luo, R. Xiang, y T. H. Chuang. **Toll-like receptor 9 and 21 have different ligand and recognition profiles and cooperatively mediate activity of CpG-oligodeoxynucleotides in zebrafish.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 51, pp. 20711–20716, 2013.

- [148] I. Skjæveland, D. B. Iliev, G. Strandskog, y J. B. Jørgensen. **Identification and characterization of TLR8 and MyD88 homologs in Atlantic salmon (*Salmo salar*)**. *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 33, no. 9, pp. 1011–1017, 2009.
- [149] R. Franch, B. Cardazzo, J. Antonello, M. Castagnaro, T. Patarnello, y L. Bargelloni. **Full-length sequence and expression analysis of Toll-like receptor 9 in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)**. *Gene*, vol. 378, pp. 42–51, 2006.
- [150] C. H. Lee, H. D. Jeong, J. K. Chung, H. H. Lee, y K. H. Kim. **CpG motif in synthetic ODN primes respiratory burst of olive flounder *Paralichthys olivaceus* phagocytes and enhances protection against *Edwardsiella tarda***. *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 56, no. 1, pp. 43–48, 2003.
- [151] A. Weinberg y T.C. Merigan. **Recombinant interleukin 2 as an adjuvant for vaccine-induced protection. Immunization of guinea pigs with herpes simplex virus subunit vaccines**. *J. Immunol.*, vol. 140, pp. 294–299, 1988.
- [152] A. D. Nash, S. A. Lofthouse, G. J. Barcham, H. J. Jacobs, K. Ashman, E. N. Meeusen, M. R. Brandon, y A. E. Andrews. **Recombinant cytokines as immunological adjuvants**. *Immunol Cell Biol.*, vol. 71, no. Mayo, pp. 367–379, 1993.
- [153] S. P. Dunham. **Cytokines and anti-cytokine therapy: clinical potential for Treatment of Feline Disease**. *Nature Journal Feline Med. Surg.*, vol. 1, pp. 7–14, 1999.
- [154] P. I. Marcus, L. van der Heide, y M. J. Sekellick. **Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon-alpha ameliorates newcastle disease**. *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 19, pp. 881–885, 1999.
- [155] B. J. Kullberg y J. W. M. Van der Meer. **Introduction: Cytokines in the biotherapy of infectious diseases**. *Biotherapy*, vol. 7, no. 3–4, pp. 149–150, 1994.
- [156] A. Nohria y R. H. Rubin. **Cytokines as potential vaccine adjuvants**. *Biotherapy*, vol. 7, no. 3–4, pp. 261–269, 1994.
- [157] A. R. Mire-Sluis. **Cytokines: from technology to therapeutics**. *Trends Biotechnol.*, vol. 17, no. 8, pp. 319–325, 1999.
- [158] N. O. Harun, J. Zou, Y.-A. A. Zhang, P. Nie, y C. J. Secombes. **The biological effects of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant interleukin 8**. *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 32, no. 6, pp. 673–681, 2008.
- [159] Z. Yin y J. Kwang. **Carp interleukin-1 in the role of an immuno-adjuvant**. *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 10, pp. 375–378, 2000.
- [160] A. R. Bridle, P. B. B. Crosbie, R. N. Morrison, J. Kwang, y B. F. Nowak. **The immuno-adjuvant effect of carp interleukin-1 beta on the humoral immune response of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch)**. *J. Fish Dis.*, vol. 25, no. 7, pp. 429–432, 2002.

- [161] J. Galindo-Villegas, I. Mulero, A. García-Alcazar, I. Muñoz, M. Peñalver-Mellado, S. Streitenberger, G. Scapigliati, J. Meseguer, y V. Mulero. **Recombinant TNF α as oral vaccine adjuvant protects European sea bass against vibriosis: Insights into the role of the CCL25/CCR9 axis.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 4, pp. 1260–1271, 2013.
- [162] J. Shi, A. R. Votruba, O. C. Farokhzad, y R. Langer. **Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications.** *Nano Lett.*, vol. 10, no. 9, pp. 3223–3230, 2010.
- [163] US Food and Drug Administration. **Considering whether an FDA regulated product involves the application of nanotechnology: guidance for industry.** FDA [online], <http://www.FDA.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>. Office of the Commissioner, 2014.
- [164] European Medicines Agency. **Medicines and emerging science - Nanotechnology.** [online], http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000345.jsp&mid=WC000340b000301ac005800baed000349&jsenabled=true, 2014.
- [165] D. M. Smith, J. K. Simon, y J. R. Baker. **Applications of nanotechnology for immunology.** *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 8, pp. 592–605, 2013.
- [166] US National Nanotechnology Initiative. **What is nanotechnology?** [online] <http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>, 2014.
- [167] H. Toyokawa, A. Nakao, R. J. Bailey, M. A. Nalesnik, T. Kaizu, J. L. Lemoine, A. Ikeda, K. Tomiyama, G. D. Papworth, L. Huang, A. J. Demetris, T. E. Starzl, y Murase Noriko. **Relative contribution of direct and indirect Allorecognition in developing tolerance after liver transplantation.** *Liver Transpl.*, vol. 14, no. 3, pp. 346–357, 2008.
- [168] S. Li y L. Huang. **Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles.** *Mol. Pharm.*, vol. 5, no. 4, pp. 496–504, 2008.
- [169] H. Hillaireau y P. Couvreur. **Nanocarriers entry into the cell: relevance to drug delivery.** *Cell Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 17, pp. 2873–2896, 2009.
- [170] J. Canton, R. Khezri, M. Glogauer, y S. Grinstein. **Contrasting phagosomal pH regulation and maturation in human M1 and M2 macrophages.** *Mol. Biol. Cell*, vol. 25, no. 21, pp. 3330–41, 2014.
- [171] R. D. Handy. **Nanotechnology in fisheries and aquaculture.** *FSBI Brief.*, Pap. no. 0, pp. 1 – 29, 2012.
- [172] N. Doshi y S. Mitragotri. **Designer biomaterials for nanomedicine.** *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, no. 24, pp. 3843–3854, 2009.
- [173] S. E. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, y J. M. De Simone. **The effect of particle design on cellular internalization pathways.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 33, pp. 11613–11618, 2008.
- [174] J. A. Champion y S. Mitragotri. **Role of target geometry in phagocytosis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, pp. 4930–4934, 2006.
- [175] V. Mohanraj, Y. Chen, y M. & Chen. **Nanoparticles – A Review.** *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 5, no. June, pp. 561–573, 2006.

- [176] S. Meshkini, A. A. Taky, A. Tukmechi, y F. Farhang-Pajuh. **Effects of chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Vet. Res. Forum.*, vol. 3, no. 1, pp. 49–54, 2012.
- [177] S. H. Cha, J. S. Lee, C. B. Song, K. J. Lee, y Y. J. Jeon. **Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus***. *Aquaculture*, vol. 278, pp. 110–118, 2008.
- [178] R. Harikrishnan, J. S. Kim, C. Balasundaram, y M. S. Heo. **Dietary supplementation with chitin and chitosan on haematology and innate immune response in *Epinephelus bruneus* against *Philasterides dicentrarchi***. *Exp. Parasitol.*, vol. 131, no. 1, pp. 116–124, 2012.
- [179] L. Cui, W. Xu, Q. Ai, D. Wang, y K. Mai. **Effects of dietary chitosan oligosaccharide complex with rare earth on growth performance and innate immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* L.** *Aquac. Res.*, vol. 44, no. 5, pp. 683–690, 2013.
- [180] Y. Chen, X. Zhu, Y. Yang, D. Han, J. Jin, y S. Xie. **Effect of dietary chitosan on growth performance, haematology, immune response, intestine morphology, intestine microbiota and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)**. *Aquac. Nutr.*, vol. 20, no. 5, pp. 532–546, 2014.
- [181] A. Alishahi, A. Mirvaghefi, M. R. Tehrani, H. Farahmand, S. Koshio, F. A. Dorkoosh, y M. Z. Elsabee. **Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, no. 1, pp. 142–146, 2011.
- [182] S. Ferozekhan, S. Gupta, A. R. Singh, M. A. Rather, R. Kumari, D. C. Kothari, A. K. Pal, y S. B. Jadhao. **RNA-Loaded Chitosan Nanoparticles for Enhanced Growth, Immunostimulation and Disease Resistance in Fish**. *Curr. Nanosci.*, vol. 10, no. 3, pp. 453–464, 2014.
- [183] E. A. Ramos, J. L. V Relucio, y C. A. T. Torres-Villanueva. **Gene expression in tilapia following oral delivery of chitosan-encapsulated plasmid DNA incorporated into fish feeds**. *Mar. Biotechnol.*, vol. 7, no. 2, pp. 89–94, 2005.
- [184] S. Rajesh Kumar, V. P. Ishaq Ahmed, V. Parameswaran, R. Sudhakaran, V. Sarath Babu, y A. S. Sahul Hameed. **Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum***. *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 25, no. 1–2, pp. 47–56, 2008.
- [185] L. Li, S. L. Lin, L. Deng, y Z. G. Liu. **Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker to protect from *Vibrio parahaemolyticus***. *J. Fish Dis.*, vol. 36, no. 12, pp. 987–995, 2013.
- [186] I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Panos, B. Mirales, N. Acosta, G. Galed, y A. Heras. **Functional characterization of chitin and chitosan**. *Curr. Chem. Biol.*, vol. 3, pp. 203–203, 2009.
- [187] M. Trotta, M. R. Gasco, y S. Morel. **Release of drugs from oil-water microemulsions**. *J. Control release*, vol. 10, pp. 237–243, 1989.

- [188] S. Yasumoto, Y. Kuzuya, M. Yasuda, T. Yoshimura, y T. Miyazaki. **Oral immunization of common carp with a liposome vaccine fusing Koi Herpesvirus antigen.** *Fish Pathol.*, vol. 41, no. 4, pp. 141–145, 2006.
- [189] R. Hari Krishnan, J. S. Kim, C. Balasundaram, y M. S. Heo. **Vaccination effect of liposomes entrapped whole cell bacterial vaccine on immune response and disease protection in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*.** *Aquaculture*, vol. 342–343, no. 1, pp. 69–74, 2012.
- [190] T. Irie, S. Watarai, T. Iwasaki, y H. Kodama. **Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunisation with bacterial antigen entrapped liposomes.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 18, no. 3, pp. 235–242, 2005.
- [191] A. N. Nakhla, A. J. Szalai, J. H. Banoub, y K. M. W. Keough. **Serum anti-LPS antibody production by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to the administration of free and liposomally-incorporated LPS from *Aeromonas salmonicida*.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 7, no. 6, pp. 387–401, 1997.
- [192] C. J. Rodgers. **Immersion vaccination for control of fish furunculosis.** *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 8, no. 1971, pp. 69–72, 1990.
- [193] A. Ruyra, M. Cano-Sarabia, S. A. MacKenzie, D. MasPOCH, y N. Roher. **A Novel Liposome-Based Nanocarrier Loaded with an LPS-dsRNA Cocktail for Fish Innate Immune System Stimulation.** *PLoS One*, vol. 8, no. 10, pp. 1–13, 2013.
- [194] E. N. Faikoh, Y. H. Hong, y S. Y. Hu. **Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio vulnificus* and *Streptococcus agalactiae*.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 38, no. 1, pp. 15–24, 2014.
- [195] A. Falco, J. Barrajón-Catalán, E. Menéndez-Gutiérrez, M.P. Coll, V. Micol, y A. Estepa. **Melittin-loaded immunoliposomes against viral surface proteins, a new approach to antiviral therapy.** *Antivir. Res.*, vol. 97, no. 218–221, 2013.
- [196] T. Irie, S. Watarai, y H. Kodama. **Humoral immune response of carp (*Cyprinus carpio*) induced by oral immunization with liposome-entrapped antigen.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 27, no. 5, pp. 413–421, 2003.
- [197] D. T. O'Hagan, H. Jeffery, M. J. Roberts, J. P. McGee, y S. S. Davis. **Controlled release microparticles for vaccine development.** *Vaccine*, vol. 9, no. 10, pp. 768–771, 1991.
- [198] J. Panyam y V. Labhasetwar. **Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 3, pp. 329–347, 2003.
- [199] P. R. Rauta y B. Nayak. **Parenteral immunization of PLA/PLGA nanoparticle encapsulating outer membrane protein (Omp) from *Aeromonas hydrophila*: Evaluation of immunostimulatory action in *Labeo rohita* (rohu).** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 44, no. 1, pp. 287–294, 2015.

- [200] S. Altún, A. Kubilay, S. Ekici, B. I. Dibinen, y O. Diler. **Oral Vaccination Against Lactococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using Sodium Alginate and Poly(lactide-co-glycolide) carrier.** *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, vol. 16, pp. 211–217, 2010.
- [201] J. Tian y J. Yu. **Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against lymphocystis disease virus.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 30, no. 1, pp. 109–117, 2011.
- [202] M. Adomako, S. St-Hilaire, Y. Zheng, J. Eley, R. D. Marcum, W. Sealey, B. C. Donahower, S. Lapatra, y P. P. Sheridan. **Oral DNA vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against infectious haematopoietic necrosis virus using PLGA [Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid)] nanoparticles.** *J. Fish Dis.*, vol. 35, no. 3, pp. 203–214, 2012.
- [203] B. N. Fredriksen, K. Sævareid, L. McAuley, M. E. Lane, J. Bøgwald, y R. A. Dalmo. **Early immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after immunization with PLGA nanoparticles loaded with a model antigen and β -glucan.** *Vaccine*, vol. 29, no. 46, pp. 8338–8349, 2011.
- [204] B. N. Fredriksen y J. Grip. **PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** *Vaccine*, vol. 30, no. 3, pp. 656–667, 2012.
- [205] B. Zhu, G. Liu, Y. Gong, F. Ling, y G. Wang. **Protective immunity of grass carp immunized with DNA vaccine encoding the vp7 gene of grass carp reovirus using carbon nanotubes as a carrier molecule.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 42, no. 2, pp. 325–334, 2015.
- [206] T. Behera y P. Swain. **Antigen adsorbed calcium phosphate nanoparticles stimulate both innate and adaptive immune response in fish, *Labeo Rohita* H.** *Cell. Immunol.*, vol. 271, no. 2, pp. 350–359, 2011.
- [207] A. Trapani, D. Mandracchia, C. Di Franco, H. Cordero, P. Morcillo, R. Comparelli, A. Cuesta, y M. A. Esteban. **In vitro characterization of 6-Coumarin loaded solid lipid nanoparticles and their uptake by immunocompetent fish cells.** *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 127, pp. 79–88, 2015.
- [208] J. A. Langer y S. Pestka. **Purification, bacterial expression, and biological activities of the human interferons.** *J. Invest. Dermatol.*, vol. 83, no. 1 Suppl, pp. 128–136, 1984.
- [209] E. Baron y Narula S. **From cloning to a commercial realization: human alpha interferon.** *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 10, no. 3, pp. 179–190, 1990.
- [210] J. M. Tibaldi. **Evolution of insulin development: Focus on key parameters.** *Adv. Ther.*, vol. 29, no. 7, pp. 590–619, 2012.
- [211] S. K. Gupta y P. Shukla. **Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications.** *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–10, 2015.
- [212] G. Walsh. **Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals.** *Drug Discov. Today*, vol. 15, no. 17–18, pp. 773–780, 2010.

- [213] S. Ohtake y T. Arakawa. **Recombinant therapeutic protein vaccines.** *Protein Pept. Lett.*, vol. 20, no. 12, pp. 1324–1344, 2013.
- [214] R. M. Bill. **Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: A role for yeast?**, *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 67, no. 3, pp. 319–328, 2015.
- [215] J. L. Corchero, B. Gasser, D. Resina, W. Smith, E. Parrilli, F. Vázquez, I. Abasolo, M. Giuliani, J. Jäntti, P. Ferrer, M. Saloheimo, D. Mattanovich, S. Schwartz, M. L. Tutino, y A. Villaverde. **Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics.** *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 2, pp. 140–153, 2013.
- [216] E. García-Fruitós, Ed. **Insoluble Proteins, Methods and Protocols.** New York, Springer New York, 2015.
- [217] S. Gerasimova, O. Smirnova, A. Kochetov, y V. Shumnyi. **Production of recombinant proteins in Plant Cells.** *Russ. J. Plant Physiol.*, vol. 63, no. 1, pp. 26–37, 2016.
- [218] A. Berry. **Improving production of aromatic compounds in Escherichia coli by metabolic engineering.** *Trends Biotechnol.*, vol. 14, no. 7, p. 250, 1996.
- [219] D. C. Cameron, N. E. Altaras, M. L. Hoffman, y A. J. Shaw. **Metabolic engineering of propanediol pathways.** *Biotechnol. Prog.*, vol. 14, no. 1, pp. 116–125, 1998.
- [220] M. Fakruddin, R. Mohammad Mazumdar, K. S. Bin Mannan, A. Chowdhury, y M. N. Hossain. **Critical Factors Affecting the Success of Cloning, Expression, and Mass Production of Enzymes by Recombinant E. coli.** *ISRN Biotechnol.*, vol. 2013, no. 3, pp. 1–7, 2013.
- [221] L. Soufi, S. M. Hoseini-alfatemi, M. Sharifi-rad, M. Iriti, M. Sharifi-rad, M. Hoseini, y J. Sharifi-rad. **Recombinant Proteins in Escherichia coli: Optimizing Production Strategies.** *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* vol. 15, no. 11, pp. 2149–2159, 2015.
- [222] A. de Marco. **Recombinant polypeptide production in E. coli: towards a rational approach to improve the yields of functional proteins.** *Microb. Cell Fact.*, vol. 12, no. 1, p. 101, 2013.
- [223] T. W. Overton. **Recombinant protein production in bacterial hosts.** *Drug Discov. Today*, vol. 19, no. 5, pp. 590–601, 2014.
- [224] E. García-Fruitós, E. Vázquez, C. Díez-Gil, J. L. Corchero, J. Seras-Franzoso, I. Ratera, J. Veciana, y A. Villaverde. **Bacterial inclusion bodies: making gold from waste.** *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 2, pp. 65–70, 2012.
- [225] N. González-Montalbán, E. García-Fruitós, y A. Villaverde. **Recombinant protein solubility - does more mean better?.** *Nat. Biotechnol.*, vol. 25, no. 7, pp. 718–720, 2007.
- [226] D. Ami, A. Natalello, M. Lotti, y S. M. Doglia. **Why and how protein aggregation has to be studied in vivo.** *Microb. Cell Fact.*, vol. 12, p. 17, 2013.

- [227] A. Natallelo, D. Ami y S. M. Doglia. **Capítulo 6, Structural properties of Bacterial inclusion bodies**. S. M. Doglia, y M. Lotti, Ed. **Protein aggregation in bacteria: functional and structural properties of inclusion bodies in bacterias cells**. USA, Wiley, pp. 268, 2014.
- [228] M. M. Carrió, J. L. Corchero, y A. Villaverde. **Dynamics of *in vivo* protein aggregation: Building inclusion bodies in recombinant bacteria**. *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 169, no. 1, pp. 9–15, 1998.
- [229] M. M. Carrió y A. Villaverde. **Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies**. *J. Biotechnol.*, vol. 96, no. 1, pp. 3–12, 2002.
- [230] G. Georgiou y P. Valax. **Isolating inclusion bodies from bacteria**. *Methods Enzymol.*, vol. 309, no. 1975, pp. 48–58, 1999.
- [231] E. García-Fruitós, J. Seras-Franzoso, E. Vazquez, y A. Villaverde. **Tunable geometry of bacterial inclusion bodies as substrate materials for tissue engineering**. *Nanotechnology*, vol. 21, no. 20, p. 205101, 2010.
- [232] E. Rodríguez-Carmona y A. Villaverde. **Nanostructured bacterial materials for innovative medicines**. *Trends Microbiol.*, vol. 18, pp. 423–430, 2010.
- [233] Bowden GA. **Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli***. *Biotechnology*, vol. 9, pp. 725–730, 1991.
- [234] G. Margreiter, P. Messner, K. D. Caldwell, y K. Bayer. **Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation**. *J. Biotechnol.*, vol. 138, no. 3–4, pp. 67–73, 2008.
- [235] M. Morell, R. Bravo, A. Espargaró, X. Sisquella, F. Avilés, X. Fernández-Busquets, y S. Ventura. **Inclusion bodies: specificity in their aggregation process and amyloid-like structure**. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1783, no. 10, pp. 1815–1825, 2008.
- [236] C. Díez-Gil, S. Krabbenborg, E. García-Fruitós, E. Vazquez, E. Rodríguez-Carmona, I. Ratera, N. Ventosa, J. Seras-Franzoso, O. Cano-Garrido, N. Ferrer-Miralles, A. Villaverde, y J. Veciana. **The nanoscale properties of bacterial inclusion bodies and their effect on mammalian cell proliferation**. *Biomaterials*, vol. 31, no. 22, pp. 5805–12, 2010.
- [237] J. Seras-Franzoso, K. Peebo, J. Luis Corchero, P. M. Tsimbouri, U. Unzueta, U. Rinas, M. J. Dalby, E. Vazquez, E. García-Fruitós, y A. Villaverde. **A nanostructured bacterial bioscaffold for the sustained bottom-up delivery of protein drugs**. *Nanomedicine (Lond.)*, vol. 8, no. 10, pp. 1587–99, 2013.
- [238] S. Peternel, J. Grdadolnik, V. Gaberc-Porekar, y R. Komel. **Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins**. *Microb. Cell Fact.*, vol. 7, p. 34, 2008.
- [239] E. García-Fruitós, M. M. Carrió, A. Arís, y A. Villaverde. **Folding of a misfolding-prone beta-galactosidase in absence of DnaK**. *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 90, no. 7, pp. 869–75, 2005.
- [240] J. Nahalka, P. Gemeiner, M. Bucko, y P. G. Wang. **Bioenergy beads: a tool for regeneration of ATP/NTP in biocatalytic synthesis**. *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, vol. 34, no. 5, pp. 515–521, 2006.

- [241] A. K. Upadhyay, A. Murmu, A. Singh, y A. K. Panda. **Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli***. *PLoS One*, vol. 7, no. 3, 2012.
- [242] A. Villaverde y M. M. Carrió. **Protein aggregation in recombinant bacteria: Biological role of inclusion bodies**. *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, no. 17, pp. 1385–1395, 2003.
- [243] E. García-Fruitós, M. Martínez-Alonso, N. González-Montalbán, M. Valli, D. Mattanovich, y A. Villaverde. **Divergent genetic control of protein solubility and conformational quality in *Escherichia coli***. *J. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 374, pp. 195–205, 2007.
- [244] A. Espargaró, R. Sabate, y S. Ventura. **Thioflavin-S staining coupled to flow cytometry. A screening tool to detect *in vivo* protein aggregation**. *Mol. Biosyst.*, vol. 8, no. 11, pp. 2839–44, 2012.
- [245] E. García-Fruitós, R. Sabate, N. S. de Groot, A. Villaverde, y S. Ventura. **Biological role of bacterial inclusion bodies: a model for amyloid aggregation**. *FEBS J.*, vol. 278, no. 14, pp. 2419–27, 2011.
- [246] N. S. de Groot, R. Sabate, y S. Ventura. **Amyloids in bacterial inclusion bodies**. *Trends Biochem. Sci.*, vol. 34, no. 8, pp. 408–416, 2009.
- [247] G. Invernizzi, F. A. Aprile, A. Natalello, A. Ghisleni, A. Penco, A. Relini, S. M. Doglia, P. Tortora, y M. E. Regonesi. **The Relationship between Aggregation and Toxicity of Polyglutamine-Containing Ataxin-3 in the Intracellular Environment of *Escherichia coli***. *PLoS One*, vol. 7, no. 12, 2012.
- [248] A. Villar-Piqué y S. Ventura. **Modeling amyloids in bacteria**. *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, p. 166, 2012.
- [249] A. Villar-Piqué, A. Espargaró, R. Sabaté, N. S. de Groot, y S. Ventura. **Using bacterial inclusion bodies to screen for amyloid aggregation inhibitors**. *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 1, p. 55, 2012.
- [250] M. Carrió, N. González-Montalbán, A. Vera, A. Villaverde, y S. Ventura. **Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies**. *J. Mol. Biol.*, vol. 347, no. 5, pp. 1025–1037, 2005.
- [251] I. Ratera, S. Peternel, J. Seras-Franzoso, O. Cano-Garrido, E. García-Fruitós, R. Cubarsí, E. Vázquez, J. L. Corchero, E. Rodríguez-Carmona E., J. Veciana, y A. Villaverde. **Capítulo 8, Biomedical Applications of Bacterial Inclusion Bodies**. S. M. Doglia y M. Lotti, Ed. **Protein aggregation in bacteria: functional and structural properties of inclusion bodies in bacterial cells**. USA, Wiley, pp. 268, 2014.
- [252] E. Vázquez, J. L. Corchero, J. F. Burgueño, J. Seras-Franzoso, A. Kosoy, R. Bosser, R. Mendoza, J. M. Martínez-Láinez, U. Rinas, E. Fernández, L. Ruiz-Avila, E. García-Fruitós, y A. Villaverde. **Functional inclusion bodies produced in bacteria as naturally occurring nanopills for advanced cell therapies**. *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 13, pp. 1742–7, 2012.
- [253] M. Liovic, M. Ozir, A. B. Zavec, S. Peternel, R. Komel, y T. Zupancic. **Inclusion bodies as potential vehicles for recombinant protein delivery into epithelial cells**. *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 1, p. 67, 2012.

Objetivos



La primera hipótesis de esta tesis es que el reflejo inflamatorio descrito en mamíferos es un sistema de control de la inflamación también presente en otros vertebrados y para ello nos centramos en su estudio en teleósteos. Concretamente, y para estudiar las bases moleculares del sistema de reflejo inflamatorio, nos centramos en la pieza principal del sistema que es el receptor $\alpha 7$ nACh y establecimos los siguientes **objetivos específicos**:

- (1)** La obtención y caracterización de la secuencia completa de la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) en *Oncorhynchus mykiss* y su caracterización filogenética en relación a otras especies.
- (2)** El estudio *in vivo* de la distribución tisular del receptor $\alpha 7$ nACh y del efecto de diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), el ácido polirribonucleico-policitidílico (poly (I:C)) y el lipopolisacárido bacteriano (LPS), sobre la liberación de acetilcolina.
- (3)** La evaluación *in vitro* en macrófagos de la funcionalidad del receptor $\alpha 7$ nACh: la expresión génica, la capacidad del receptor de unir α -bungarotoxina, el efecto de agonistas del receptor (acetilcolina y nicotina) en la fagocitosis, y el efecto modulador de la respuesta inmune de la nicotina después de una estimulación con diferentes PAMPs (poly (I:C) y LPS).

Los resultados derivados de estos objetivos se detallan en el **Capítulo 1**.

La segunda hipótesis de esta tesis es que nanopartículas proteicas obtenidas de los cuerpos de inclusión bacterianos pueden servir como plataformas de entrega de inmunoestimulantes para peces. Los objetivos planteados fueron los siguientes:

- (4)** El desarrollo y la caracterización de cuerpos de inclusión formados por proteínas recombinantes con y sin una función inmunológica en peces: **A)** proteínas fluorescentes: la proteína verde fluorescente fusionada con la proteína de la cápside del virus de la fiebre aftosa (GFPVP1) y la proteína fluorescente en el infrarrojo (iRFP); y **B)** citoquinas de peces: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la quimioquina (C-C) ligando 4 (CCL4).

- (5) El análisis *in vitro* de la captación celular de los diferentes cuerpos de inclusión producidos y los efectos moduladores de la respuesta inflamatoria de los cuerpos de inclusión.
- (6) El estudio *in vivo* de la distribución tisular, así como, el estudio de los macrófagos como células diana de los cuerpos de inclusión.
- (7) La evaluación de la protección conferida por los cuerpos de inclusión contra una enfermedad bacteriana letal modelo causada por *Pseudomonas aeruginosa*.
- (8) El análisis de la estabilidad de los cuerpos de inclusión bajo diferentes condiciones de pH y temperatura y durante el proceso de liofilización.
- (9) El estudio de la dinámica de absorción *in vivo* por la mucosa intestinal de los cuerpos de inclusión administrados oralmente.

Los resultados derivados de estos objetivos se detallan en los **Capítulos 2 y 3** de esta tesis.

Capítulo

1

El receptor nicotínico de
acetilcolina alfa 7 ($\alpha 7$ AChR)
modula la respuesta
frente a poly (I:C)
en macrófagos de trucha:
estudio del
reflejo inflamatorio
en teleósteos

Resumen

El receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 ($\alpha 7$ nAChR) pertenece a la superfamilia *Cys-loop* de receptores de canales iónicos activados por ligando. El receptor $\alpha 7$ nACh juega un rol crucial en el sistema del reflejo inflamatorio modulando la expresión de citoquinas inflamatorias a través de la vía colinérgica antiinflamatoria. En peces, la información en relación con este tipo de receptores es limitada y sólo se han realizado algunos estudios de caracterización de receptores en peces modelo (*Danio rerio* y *Takifugu rubripes*), pero sin relacionarlos con el sistema del reflejo inflamatorio. En este trabajo describimos y caracterizamos por primera vez la presencia del receptor $\alpha 7$ nACh en trucha arcoíris. El análisis de la secuencia del receptor $\alpha 7$ nACh evidencia que posee todos los dominios estructurales necesarios para un adecuado funcionamiento, así como una secuencia altamente conservada en comparación con otras especies de vertebrados. Nuestros resultados demuestran que el receptor es capaz de unir α -bungarotoxina, lo que indica su presencia en la membrana de macrófagos de trucha. Además, existe una respuesta por parte de los principales componentes del reflejo inflamatorio frente al estímulo con diferentes PAMPs. La estimulación del receptor con nicotina conlleva a una disminución de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune producidos por una estimulación con poly (I:C), pero no se observa esta modulación frente a una estimulación con LPS. En base a estos resultados, planteamos que en trucha arcoíris existe un sistema de regulación de la respuesta del sistema inmune innato similar al descrito en mamíferos, con algunas características distintivas relacionadas con la propia arquitectura del sistema inmune innato de peces.

Introducción

El reflejo inflamatorio es un circuito neural descrito en mamíferos, que modula respuesta del sistema inmune innato previniendo las consecuencias de una excesiva activación [1]. Este sistema es activado por la presencia de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), DAMPs (*danger-associated molecular patterns*) o por daño tisular, desencadenándose un potencial de acción a través del nervio vago aferente hasta el tronco cerebral y otros núcleos que controlan las señales de respuesta del nervio vago [2]. La respuesta es enviada a través del nervio vago eferente, también llamada vía colinérgica antiinflamatoria, lo que estimula a los órganos del sistema retículo endotelial, incluyendo el bazo, el hígado y el tracto gastrointestinal [3, 4]. El sistema más detalladamente

descrito es el del nervio vago que estimula al nervio esplénico del bazo, lo que produce una liberación de norepinefrina [5]. La norepinefrina estimula a los linfocitos residentes en el bazo que expresan la enzima colina acetiltransferasa (ChAT⁺), los cuales son capaces de secretar acetilcolina (ACh), un neurotransmisor que se une al receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 ($\alpha 7$ nACh) de macrófagos. Al mismo tiempo que se libera ACh, ésta es rápidamente hidrolizada por la acetilcolinesterasa (AChE) [6, 7]. La unión de la ACh al receptor $\alpha 7$ nACh produce una inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias por la vía NF- κ β y la supresión de la señalización de los receptores de citoquinas a través de la vía Jak2/STAT3 [8–10].

El receptor $\alpha 7$ nACh es una pieza clave en la respuesta antiinflamatoria del reflejo inflamatorio [11], pertenece a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) de la superfamilia *Cys-loop* de canales iónicos activados por ligando (*Ligand-gated ion channel*) [12]. Los receptores nicotínicos se clasifican en: heteropentámeros compuestos por las subunidades $\alpha 6$ a $\alpha 7$ y $\beta 2$ a $\beta 4$ o homopentámeros compuestos por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ o $\alpha 10$ ($\alpha 8$ sólo ha sido descrito en *Gallus gallus* y $\alpha 10$ puede formar heteropentámeros con $\alpha 9$) [7]. Diferentes subunidades de los receptores nicotínicos son expresadas en células neuronales como, células B, células T y timocitos de mamíferos [13]. El receptor $\alpha 7$ nACh es un homopentámero de subunidades $\alpha 7$ que se activa por la unión de ligandos como la ACh, la nicotina (NIC) y la colina [14, 11–15]. Se expresa principalmente en el cerebro, en el hipocampo y el hipotálamo [16], pero también ha sido descrito en diferentes células inmunológicas como monocitos, macrófagos, células B, células T y células dendríticas [5, 17–18]. El receptor $\alpha 7$ nACh se distingue de otros receptores nicotínicos por sus propiedades fisiológicas y farmacológicas, incluyendo su permeabilidad al calcio y su rápida desensibilización [19, 20]. Cada receptor $\alpha 7$ nACh tiene cinco sitios de unión a ACh, que se encuentran entre subunidades adyacentes [21]. La estructura de cada subunidad incluye un dominio extracelular N-terminal hidrofílico de unos 200 aminoácidos donde se encuentran tres sitios de N-glicosilación [12]. En este dominio se encuentra el *Cys-loop*, una secuencia de 15 aminoácidos altamente conservada posicionada entre dos cisteínas, que da el nombre a esta familia de receptores. Posteriormente, se encuentran cuatro dominios transmembranas, un bucle citoplasmático entre el tercer y el cuarto dominio transmembrana y un dominio extracelular C-terminal donde se encuentran tres sitios de fosforilación [12]. Diferentes aminoácidos contribuyen a formar el sitio de unión de la ACh, el cual está conformado por seis bucles de diferente

longitud. Los bucles A, B y C forman el componente principal y los bucles D, E y F el componente complementario [22–24]. Los bucles del componente principal pertenecen a una subunidad $\alpha 7$ y los bucles del componente complementario pertenecen a la subunidad $\alpha 7$ adyacente. Estos bucles se encuentran en el dominio extracelular formando un bolsillo compacto donde se une la ACh [25].

A nivel de la secuencia genómica, el receptor $\alpha 7$ nACh (CHRNA7) de humanos tiene un tamaño de 75 kb. Presenta un promotor putativo 5' al inicio de la traducción en el exón 1. La región promotora carece de *TATA box*, tiene un alto contenido de GC (77 %) e incluye cuatro sitios de unión a factores de transcripción: Sp-1, Ap-2, Erg-1 y CREB, que parecen estar conservados entre bovinos y humanos [26]. La secuencia genómica del receptor $\alpha 7$ nACh presenta 10 exones altamente conservados entre diferentes especies (p. ej., *G. Gallus* y *Mus musculus*) [27].

La ACh y la NIC (un agonista de la ACh), son capaces de estimular al receptor $\alpha 7$ nACh e inhibir, de manera dosis dependiente, la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleuquina 1 beta (IL-1 β), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8) y la metalopeptidasa de la matriz 9 (MMP9). Inicialmente, se había descrito en cultivos de macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS), que esta modulación ocurría después de la traducción [11, 14], pero nuevos estudios en macrófagos estimulados con LPS y ácido poli (lactico-co-glicólico) (poly (I:C)) han demostrado que esta modulación sucede tanto a nivel del ARNm como a nivel de la proteína [28, 29]. Más aún, se ha demostrado *in vivo*, en ratones deficientes de $\alpha 7$ (*knock-out*) que la inhibición en la producción de TNF α a través del nervio vago es dependiente del receptor $\alpha 7$ nACh [11].

A su vez, se ha descrito que diferentes antagonistas son capaces de bloquear la activación de los receptores nicotínicos uniéndose al sitio de unión de la ACh. Algunos actúan específicamente sobre determinados receptores nicotínicos, lo que ayuda a su estudio y caracterización. Por ejemplo, la metilicacnitina es una toxina obtenida de las semillas de *Delphinium brownii* que se une específicamente a los receptores $\alpha 7$ nACh y $\alpha 8$ nACh [30]. La α -conotoxina es una neurotoxina peptídica obtenida del caracol (*Conus consors*) que se une específica y reversiblemente a los receptores $\alpha 7$ nACh y $\alpha 9$ nACh [31]. Otro antagonista ampliamente utilizado es la α -bungarotoxina (α -BTX), una neurotoxina de pequeño tamaño (8 kDa) que se obtiene del veneno de serpiente (*Bungarus*

multicinctus). Esta proteína posee un andamio con tres extensiones unidas por puentes disulfuro intramoleculares y se une específica e irreversiblemente a los receptores nicotínicos $\alpha 7$ nACh y $\alpha 9$ nACh [32, 33].

En peces, el escenario es un tanto diferente, ya que no existe un gran número de trabajos que describan los receptores nicotínicos de acetilcolina. No obstante, se ha detectado la presencia de diferentes componentes que participan en el reflejo inflamatorio, pero no hay información relacionada con el funcionamiento de este sistema en peces. Existen algunas descripciones de receptores nicotínicos en peces modelo como el fugu y el pez cebra, que se han realizado con la finalidad de comprender la diversidad de los receptores nicotínicos en vertebrados, y como modelo de estudio de enfermedades relacionadas con este tipo de receptores, como el Alzheimer y el Parkinson [34, 35]. En fugu (*Taki-fugu rubripes*) se han descrito tres secuencias de $\alpha 7$: $\alpha 7$ a, b y c. Por ejemplo, la subunidad $\alpha 7$ a posee 1362 pb que codifican una proteína de 454 AA y que se expresa en diferentes tejidos como, el cerebro, las branquias, las gónadas, el estómago, el corazón y el músculo. Además, las tres isoformas del receptor $\alpha 7$ nACh presentan 10 exones, al igual que las secuencias en aves y en mamíferos [34]. En el pez cebra (*Danio rerio*) el gen del receptor $\alpha 7$ nACh tiene una longitud de 1527 pb y codifica una proteína de 509 AA y la secuencia genómica también se encuentra distribuida en 10 exones como en otras especies [27]. Adicionalmente, se ha descrito la presencia de ACh y AChE en células mononucleares del bazo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) [36]. A nivel funcional, el receptor alpha 7 del pez cebra ha sido expresado en oocitos de *Xenopus*, para la evaluación de agonistas y antagonistas como tratamientos farmacológicos para enfermedades en humanos. El receptor $\alpha 7$ nACh expresado en este sistema es activado a través de diferentes agonistas como la ACh, la NIC y la cisteína, y a su vez se ha demostrado la inhibición del receptor por un antagonista, la mecamilamina [35]. Asimismo, se ha descrito a nivel de expresión génica, una inhibición de la expresión del receptor $\alpha 7$ nACh y un incremento de la expresión de la AChE después de una infección viral, sugiriendo la inhibición de la vía antiinflamatoria en el pez cebra [37]. En trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), Drescher y colaboradores han clonado y caracterizado el receptor $\alpha 9$ nACh obtenido a partir de *saccular hair cells* con el objetivo de analizar a nivel evolutivo al receptor $\alpha 9$ nACh, por su función en la estimulación de las *hair cells*, que filogenéticamente en vertebrados tiene una función a nivel de la audición. Éste

receptor presenta tres isoformas, que son expresadas en tejidos como, el cerebro, la retina o el hígado, entre otros. Estas secuencias muestran una alta similitud con receptores $\alpha 9$ nACh descritos en otras especies [38].

En relación a estos antecedentes, nos planteamos la hipótesis de que la trucha arcoíris presenta receptores $\alpha 7$ nACh, similares a los descritos en otras especies, y que éstos cumplirían un rol a nivel inmunológico, en el contexto del reflejo inflamatorio descrito en mamíferos.

Materiales y métodos

Animales

Truchas arcoíris adultas (*O. mykiss*) de 100-120 g de peso corporal fueron cultivadas en tanques de recirculación con un fotoperíodo de 12:12 h luz/oscuridad a $16 \pm 0,5$ °C. Todos los procedimientos experimentales fueron presentados al Comité de Ética de la Universitat Autònoma de Barcelona (Número de referencia 1555) que trabaja de acuerdo con los Principios Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales (EU 2010/63).

Muestreo de tejidos, extracción de ARN y síntesis de ADNc

Truchas arcoíris fueron sacrificadas por sobredosis de anestesia (300 mg/l, MS-222, Sigma) y se diseccionaron el cerebro y el bazo, siendo congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su uso. El ARN total fue extraído usando TriReagent (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad del ARN fueron evaluados usando el Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y el Bioanalyser-2100 con el Nano Kit RNA 6000 (Agilent Technologies), respectivamente. La síntesis de ADNc fue realizada con 1 μ g de ARN total usando Superscript III (Invitrogen) y el cebador oligo-dT₁₅ (Promega). La PCR convencional (RT-PCR) fue llevada a cabo usando 1 μ l de ADNc con cebadores específicos (**Ver Anexo 1, Tabla 1**). El factor de elongación 1 alfa (EF1 α) se utilizó como gen de referencia. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1 % teñidos con GelGreen (Biotium).

Clonación del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ de trucha

La clonación del receptor $\alpha 7$ nACh se llevó a cabo analizando las secuencias de nucleótidos y de proteínas del receptor, descritas en otras especies y disponibles en bases de datos públicas [39, 40]. Las alineaciones de las secuencias del

receptor $\alpha 7nACh$ de diferentes especies fueron realizadas utilizando el software ClustalX v2.1 [27, 41] y se diseñaron cebadores degenerados en regiones altamente conservadas (**Ver Anexo 1, Tabla 1**). La secuencia completa del receptor fue clonada desde cerebro usando 3' - y 5' - PCR RACE (3' - y 5' - RACE Kit, Life Technologies) con cebadores específicos para el receptor (**Ver Anexo 1, Tabla 1**). Los productos de PCR fueron purificados con Nucleospin Gel y PCR Clean-up (Macherey-Nagel) y fueron clonados con pGEM-T Easy Vector (Promega) en *Escherichia coli* DH5 α (Life Technologies). Los clones del plásmido fueron aislados mediante el Nucleospin plásmido QuickPure (Macherey-Nagel) y digeridos con EcoRI (Thermo Fisher Scientific). Los plásmidos fueron secuenciados usando los cebadores SP6 y T7.

Análisis de la secuencia de $\alpha 7nACh$

La secuencia de ADNc del receptor $\alpha 7nACh$ fue obtenida y anotada con BankIt en NCBI (número de acceso: KT634308). Los dominios característicos de la secuencia deducida de aminoácidos fueron identificados con las siguientes herramientas de análisis: *Simple modular architecture research tool* (SMART), Pfam, NetNGlyc v1.0, NetPhos v2.0 y SignalP v4.1 [42–47]. El software BLAST suite fue utilizado para la búsqueda de secuencias similares de nucleótidos y de aminoácidos y las secuencias ortólogas fueron alineadas y analizadas con ClustalX v2.1 [27, 41].

Análisis filogenético

Para la evaluación filogenética de las secuencias nucleotídicas se realizó (1) una inferencia Bayesiana mediante algoritmos MCMC (*markov chain monte carlo*) implementado en el programa BEAST v2.2 [48] y (2) una estimación de las relaciones filogenéticas mediante el método de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*, ML), utilizando el programa de análisis RaxML [49]. Se escogió *Periplaneta americana* como grupo externo (*outgroup*). El análisis Bayesiano mediante MCMC se desarrolló durante 10^7 generaciones, utilizando un modelo evolutivo GTR+I+G (*general time reversible*) que incluyó la estimación de la distribución gamma para las tasas de sustitución de nucleótidos entre las posiciones de alineamiento, un modelo de Yule para el patrón de bifurcación del árbol filogenético y la asunción de un reloj molecular (*relaxed lognormal*) para modelar la longitud de las ramificaciones. Se utilizó el programa Tracer v1.6 para evaluar la convergencia y eficiencia de muestreo de los diferentes árboles escogidos (rechazando el 10% como *burn-in*). Para el análisis ML, se utilizó el mismo modelo (GTR+I+G) y se analizaron los árboles filogenéticos

consenso (*majority rule*) después de 10^4 réplicas remuestreadas mediante *bootstrapping*.

Análisis de los exones e intrones del receptor $\alpha 7nACh$

Los exones e intrones del ADN genómico (ADNg) fueron analizados mediante la comparación de la secuencia codificante del receptor con la secuencia disponible del proyecto de genoma de la trucha arcoíris [50, 51]. Las secuencias del receptor $\alpha 7nACh$ fueron alineadas de manera manual y con el software Spidey [52]. Los límites de los exones y de los intrones fueron determinados con la predicción del sitio Splice y NetGene 2 [53, 54]. Además, se realizó la extracción de ADNg para analizar las secuencias no definidas de exones e intrones. El ADNg fue extraído a partir del tejido cerebral de trucha arcoíris y fue obtenido utilizando un protocolo estándar de extracción de fenol-cloroformo [55], y el ADNg fue cuantificado usando el Nanodrop ND-1000. Una PCR convencional (RT-PCR) se llevó a cabo con 100 ng de ADNg usando cebadores específicos (**Ver Anexo 1, Tabla 1**), los fragmentos amplificados fueron secuenciados.

Distribución tisular del receptor $\alpha 7nACh$ en trucha arcoíris

Truchas arcoíris ($n = 3$) fueron estimuladas con poly (I:C) o LPS para evaluar la distribución tisular del receptor $\alpha 7nACh$ en condiciones basales y estimuladas con diferentes PAMPs. Los peces fueron anestesiados con metasulfato de triclaína a 50 mg/l (MS-222, Sigma) e inyectados intraperitonealmente (i.p.) con 450 μ l de poly (I:C) (4,5 mg/kg) (Invivogen), 160 μ l de LPS (8 mg/kg) (Sigma) o con tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) (control). Después de 12 h los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia (300 mg/l de MS-222) y fueron diseccionados el cerebro, el bazo, el riñón anterior, el riñón posterior, el músculo blanco, el músculo rojo, el intestino, las branquias y el corazón. Las muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. La extracción de ARN y síntesis de ADNc fue realizada como se ha mencionado anteriormente.

Medición de los niveles de acetilcolina en plasma y bazo de trucha

Los peces fueron anestesiados (50 mg/l de MS-222) e inyectados i.p. con 450 μ l de poly (I:C) (4,5 mg/kg), 160 μ l de LPS (8 mg/kg) o PBS (control). A diferentes tiempos (0, 20, 30, 60, 90, 180 y 720 min) cuatro animales de cada tratamiento fueron sacrificados por sobredosis de anestesia (300 mg/l de MS-222). Se obtuvieron muestras de sangre que fueron centrifugadas a 1200 \times g durante

15 min a 4 °C para obtener el plasma. Se diseccionaron los bazos y fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido, todas las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Los bazos se homogeneizaron con el Polytron PT-MB 1600 E (Kinematica) en 350 µl de PBS frío al 1 % de Triton X-100 (Sigma), luego se centrifugaron a 16000 *xg* durante 10 min a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. Las mediciones de ACh se realizaron utilizando el kit Amplex Red de acetilcolina (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguida por el test de Tukey (software GraphPad Prism v5, EE.UU.).

Cultivos celulares

Cultivos primarios de macrófagos del bazo (*spleen macrophages*, SPM) y del riñón anterior (*head kidney macrophages*, HKM) de trucha arcoíris fueron obtenidos como se ha descrito previamente [56] y cultivados en DMEM 4,5 g/l de glucosa suplementado con 10 % (v/v) FBS (*fetal bovine serum*, FBS) inactivado por calor y Primocin (Invivogen) a 16 °C y 5 % de CO₂. El patrón de expresión de los genes del receptor α7nACh y α9nACh en macrófagos de trucha fueron analizados por RT-PCR utilizando monocitos/macrófagos del día 1 al día 6 de diferenciación. La extracción de ARN, la síntesis de ADNc y RT-PCR se llevaron a cabo como se ha indicado anteriormente.

Ensayo de fagocitosis

Los efectos de la ACh y de la NIC sobre la fagocitosis fueron analizados en cultivos primarios de macrófagos mediante citometría de flujo (FACS-Canto, Becton Dickinson). Para el ensayo de dosis respuesta, las células HKM fueron sembradas en placas de 12 pocillos al 80 % de confluencia. Las células fueron incubadas con ACh a diferentes dosis (0,1, 1, 10, 100 y 1000 µM) durante 20 min, previo a añadir zimosan conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*, FITC, Life Technologies), en una relación 5:1 (partículas de zimosan/macrófagos) durante 15 y 30 min. En el caso del ensayo de dinámica temporal, las células fueron incubadas con 500 µM de ACh o 100 µM de NIC durante 20 min, antes de añadir el zimosan, en los tiempos indicados (5, 10 y 30 min) (**Figura 1**). Posterior a la incubación, se retiró el medio y las células fueron lavadas con PBS para eliminar las partículas de zimosan no fagocitadas. Los macrófagos fueron desenganchados de la placa con TrypLE Express (Life Technologies) y posteriormente las células fueron centrifugadas a 300 *xg* durante 5 min. Las células sedimentadas fueron suspendidas en 200 µl de PBS y analizadas mediante citometría. Ambos experimentos se repitieron por triplicado y se analizaron 10000 eventos de cada muestra. Los resultados

fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguida por el test de Tukey (GraphPad).



Figura 1. Esquema de estimulación de las células HKM en los ensayo de fagocitosis.

A) Dosis respuesta, B) Dinámica temporal.

Ensayo de unión de α -bungarotoxina

Con la finalidad de identificar la presencia del receptor $\alpha 7nACh$, en la membrana de macrófagos de trucha arcoíris se utilizó α -bungarotoxina (α -BTX). La unión de la α -BTX fue evaluada mediante citometría de flujo y microscopía confocal (Zeiss LSM 700). Brevemente, para el ensayo por citometría las células de HKM y SPM fueron sembradas en placas de 6 pocillos al 80 % de confluencia, las cuales fueron incubadas en suspensión, en un volumen final de 200 μ l de medio. Las células fueron estimuladas con 100, 500 o 1000 μ M de NIC (Sigma) durante 20 min y luego se añadió 1,5 mg/ml de α -BTX conjugado con Alexa Fluor 647 (α -BTX-AF647) (Life Technologies) durante 1 h a temperatura ambiente. En un experimento adicional, las células fueron estimuladas con 20 μ g/ml de poly (I:C) o 10 μ g/ml de LPS durante 2 h y luego se añadió 1,5

$\mu\text{g/ml}$ de $\alpha\text{-BTX-AF647}$ durante 2 h. Tras cada experimento, el medio fue retirado y las células fueron lavadas con PBS para eliminar la $\alpha\text{-BTX}$ no unida, siendo analizadas mediante citometría. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada muestra y se analizaron 10000 eventos. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguida por el test de Tukey (GraphPad). En el caso de los ensayos por microscopía confocal, las células HKM se sembraron en placas individuales al 60 % de confluencia. Las células fueron incubadas en suspensión en un volumen final de 200 μl de medio con 1,5 mg/ml de $\alpha\text{-BTX-AF647}$, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado con PBS, las células fueron teñidas con Hoechst 33342 (10 $\mu\text{g/ml}$) y las imágenes fueron analizadas con el software Imaris v8.1 (Bitplane AG).

Análisis de la expresión génica

Con el objetivo de determinar si el receptor $\alpha 7\text{nACh}$ tiene una función en la modulación de la expresión de citoquinas, los macrófagos (HKM) fueron estimulados con agonistas y antagonistas del receptor antes de una estimulación con diferentes PAMPs (LPS o poly (I:C)). Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos al 80 % de confluencia e incubadas con 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de $\alpha\text{-BTX}$ durante 30 min, posteriormente con 100 μM de NIC durante 20 min y finalmente con 20 $\mu\text{g/ml}$ de poly (I:C) o 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS durante 12 h. Los tratamientos fueron: control, NIC, $\alpha\text{-BTX}$, LPS, poly (I:C), NIC + LPS/poly (I:C) y $\alpha\text{-BTX}$ + NIC + LPS/poly (I:C) (**Figura 2**). La extracción de ARN y la síntesis de ADNc fue realizada como se ha indicado previamente.

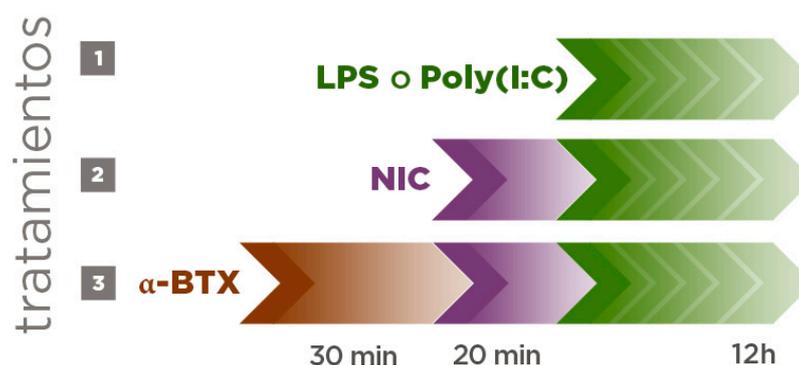


Figura 2. **Esquema de estimulación de las células HKM en el ensayo de expresión génica.**

Los genes seleccionados para evaluar la respuesta frente a poly (I:C) fueron: quimioquina (C-C motivo) ligando 4 (CCL4), IL-1 β , IL-6, TNF α , interferón alfa (IFN α), resistencia a mixovirus (Mx), proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5 (MDA5), viperina 1 (VIG-1), receptor tipo Toll 3 (TLR3), receptor tipo Toll 7 (TLR7) y receptor tipo Toll 8 (TLR8). Los genes seleccionados para evaluar la respuesta frente a LPS fueron: TNF α , IL-1 β , IL-6, CCL4, CC quimiocinas CK6 (CK6), metalopeptidasa de la matriz 9 (MMP9), péptido antimicrobiano catelicidina 1 (CAMP 1) y supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3) (**ver Anexo 1, Tabla 1**). El factor de elongación 1 alfa (EF1 α) fue utilizado como gen de referencia. La Q-PCR fue llevada a cabo usando SYBR Green I PCR Supermix (Bio-Rad), 250 nM de cebadores y 2,5 μ l de ADNc previamente diluido (1:50 para el ARNm diana y 1:500 para el gen de referencia) en un volumen final de 10 μ l. EF1 α fue usado como gen de referencia y la cuantificación fue realizada de acuerdo con el método de Livak [57]. El experimento fue repetido tres veces y todas las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados fueron analizados utilizando ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey (GraphPad).

Resultados

Clonación de la subunidad $\alpha 7$ del receptor de acetilcolina en trucha

La secuencia completa de la subunidad $\alpha 7$ del receptor de acetilcolina presentó una longitud de 1761 pb (número de acceso: KT634308), que codifica a una proteína de 587 AA con un peso molecular estimado de 65,4 kDa (**Figura 3**). La subunidad $\alpha 7$ de trucha arcoíris posee las principales características de los receptores nicotínicos neuronales: un péptido señal de 36 AA en el N-terminal y un dominio extracelular de 210 AA, donde se localiza el canal iónico del neurotransmisor o *Cys-loop* (C128 - C142). En el dominio extracelular también están presentes dos cisteínas características (C190 - C191) que forman puentes disulfuro como parte del sitio de unión. Estas cisteínas son distintivas de la subunidad α de los receptores nicotínicos (**Figura 3**). Además, se encontraron en el dominio extracelular diferentes bucles que integran el sitio de unión de la ACh. Tres bucles forman el componente principal del sitio de unión de la ACh: bucle A (W86 - Y93), bucle B (W149 - L119) y bucle C (T182 - D197); y otros tres bucles forman el componente complementario: el bucle D (W55 - W60); bucle E (K105 - L119) y bucle F (N161 - I165) (**Figura 4**).

cagactggctcctggactgttgct
 tgaaaaaacatttcgataactaatgagacttttcccactacaatcatatttgcataaatt
 aaatgcatttcaggagccatagacttgaatgggaaaaattccggttcgctactacagtag
 tcttcaaccggttaagctagaaaatgccattcaaactttaaagtgcagaccagctctgga
 taggttacttgatgcagctttttgataccttttatttctgtcacctctcttctgaaatc -108
M Q L F D T F Y F C H L S S E I -36
Peptido señal
 ccccgctctccttttccatctccctctcctccggttctctctcagtgctcggtgcag -60
P R S P F P S I S L S S V L L S V S V Q -20
 ggccctcaccagaggaccctggtgaagaacctactgaaggactacaatcgatggagagg 60
 G P H Q R T L L K N L L K D Y N R M E R 20
 ●
 ccggtgggcaacgattcacactccctcacctcttctctctatcagctctgatgcagatc 120
 P V G N D S H S L T V F F S I S L M Q I 40
 atggatgtggatgagaagaatcaggctcgtcaccactaacatctggcttcggatgagctgg 180
 M D V D E K N Q V V T T N I W L R M S W 60
 ●
 tttgatcattatcttcagtggaaccaatctgaataccctggagtgaaaaaccttcggttt 240
 F D H Y L Q W N Q S E Y P G V K N L R F 80
Bucle D
 acaactgaccaggtgtggagcgcagacatcctcctctataacagtgacagatgacttt 300
 T T D Q V W T P D I L L Y N S A D D D F 100
 ●
 gactctacctttaagaccaatgtgctggtaactccagtggttcgcagatctcctcct 360
 D S T F K T N V L V N S S G F A E Y L P 120
 ◆
 ccaggattttcatgagcacatgtaacgtggatgtacgttggttccccttcgacatccaa 420
 P G I F M S T C N V D V R W F P F D I Q 140
 ◆
Canal iónico del neurotransmisor
 aagtgtgagatgaagtttgctcgtggacgtacgatggctggctgatggacctacaatg 480
K C E M K F G S W T Y D G W L M D L Q M 160
Bucle B
 aatgaggccgacatctccgggtacatgtccaacggggagtgaggacctagtgaggagtgcca 540
N E A D I S G Y M S N G E W D L V G V P 180
Bucle F
 ggtactcgtagcaggtgttctatgactgttgtaaggagccctaccctgacgtgacgttc 600
G T R S E V F Y D C C K E P Y P D V T F 200
 ◆ ◆
Bucle C
 gttgtaaccatccgcccgcactctctactacgtctctaaacttgctcatcccctgtgtg 660
 V V T I R R R T L Y Y A L N L L I P C V 220
TM1
 atgctatcctccatgacctgctcatcttctactgctcctgactctggagagaagatc 720
L L S S M T L L I F L L P A D S G E K I 240
 tctctgggtatcactgtgctgctctctcactgtcttcatgttgctgggtggcagagatc 780
S L G I T V L L S L T V F M L L V A E I 260
TM2
 atgccagccacttcagattccatccctctcataggacagtagtactttgccagtagtactatgatc 840
M P A T S D S I P L I G Q Y F A S T M I 280
TM3
 attgttggatgtcagtcatagctacaacgggtgctgctgacagtagtaccatgacca 900
I V G M S V I A T T V V L Q Y H H H D P 300
 aacggaggacagatgccccaaatgggttaatgtggtcctactgacagtggttagcatggttc 960
 N G G Q M P K W V N V V L L Q W V A W F 320

ctacgtatgaagcgcccaggggagagtgatgaccagagcgaccacccctgcgccccccac	1020
L R M K R P G E S D D P E R P P C A P H	340
ctacggcgtgctcctcaagctcccagagcggtagcatcgctaaccctccagacccccaca	1080
L R R C S S S S Q S G S I A N P P D P T	360
ctccaccaactccacccccagaacctggtccctctccaggctggccccagcaacttgggt	1140
L H Q L H P Q N L V P L Q A G P Q H L G	380
catccccatcttcagcccagtcagcgccaacaacaacggaacctgctctacattggc	1200
H P H L H A Q S S A N N N G N L L Y I G	400
ttccagaatctggagcagccccactgctcccagatcacatccagaattacagcatctcg	1260
F Q N L D D P P L L P D H I Q N Y S I S	420
gccgggctcctcgagttagcaggcagtcctccctcccatctgccccctcattctgcagc	1320
A G P P R V A G S P P P H L P P P F C S	440
cctccgccaccccccccccaacgaggacacccgtgggctgccttagcaccatttccagt	1380
P P P P P T P N A D T V G C P S T I S S	460
ggcggagttttcgaatggggggtggaggacagtactcagcagggcgtataggcgacccc	1440
G G V F G M G G G G Q Y S A G R I G D P	480
cagctccagctattctggaggaagtgcgttacatggcgaccgcttccgtgagcaggat	1500
Q L Q A I L E E V R Y M A D R F R E Q D	500
gagacggagagcgtggccgaccagtggaagtttgccgagcagtcacgaccggctctgc	1560
E T E S V A D Q W K F A A A V I D R L C	520
ctgggtggccttcagtgtgttcaacatcatctgcaccatcgccatcctcatgtccgctccc	1620
L V A F S V F N I I C T I A I L M S A P	540
TM4	
aactttgtggagccgctccaagacttcttctctgaggaagaataggatggggcagagg	1654
N F V E A A S K D F F -	551
aggaggagatattaagagtgaggggagaagtaggggagaagagcaggatgtggaatgat	
ttggggctcagctaaagaggctattgtcgggcacaacagac	

Figura 3. Secuencia codificante del receptor $\alpha 7nACh$ de trucha.

Se presentan las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos. La numeración de los aminoácidos y de los nucleótidos se muestra en el margen derecho. En las secuencias se señalan: el péptido señal (línea roja), las cisteínas (◆) que forman los enlaces disulfuro en el sitio de unión, los sitios putativos de glicosilación (●) y de fosforilación (■). Además, se señalan los bucles que forman el sitio de unión de la ACh (A, B, C, D, E y F). El canal iónico del neurotransmisor o *Cys-loop* se indica con una línea amarilla. Las líneas grises marcan las regiones transmembranas (TM1 - TM4).

En trucha, los aminoácidos que están hipotéticamente en contacto con la ACh son: bucle A: W86 y Y93; bucle B: W149 y W154; bucle C: Y188, C190, C191 e Y195; bucle D: W55 y R57; bucle E: L109, N111, E117 y L119 y bucle F: E162 y D164 (**Figura 4**).

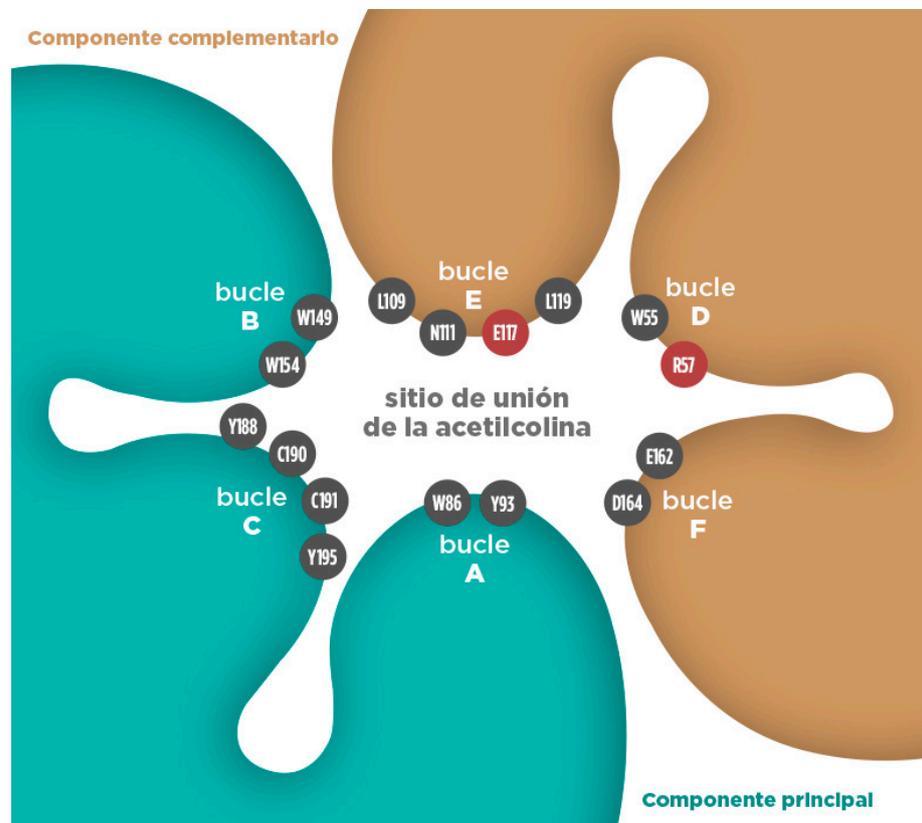


Figura 4. **Esquema del sitio de unión de la acetilcolina del receptor $\alpha 7$ nACh de trucha arcoiris.**

En el esquema se indican los residuos que estarían en contacto con la ACh.

Las secuencias de los bucles están altamente conservadas en comparación con las secuencias de mamíferos (*Homo sapiens*, *M. musculus*), aves (*G. gallus*) y peces (*Poecilia reticulata*, *Esox lucius*, *D. rerio*, *T. rubripes* y *Haplochromis burtoni*) (**Anexo 1, Figura 1**). Por otro lado, en el dominio extracelular, se encontraron tres sitios putativos de N-glicosilación (N24, N68 y N111) como ha sido descrito en otras especies [16, 26]. Adicionalmente, fueron detectadas cuatro regiones transmembranas muy conservadas (TM1: Y210 - L232; TM2: K238 - M261; TM3: I271 - V292 y TM4: L521 - V543). Aunque, entre el TM3 y TM4 el típico bucle citoplasmático está presente, está poco conservado en comparación con otras especies de vertebrados (**Anexo 1, Figura 1**). Este bajo nivel de conservación es debido a la larga longitud de la secuencia presente en trucha, 228 AA de longitud, en comparación con otras especies, por ejemplo, 156 AA en *H. sapiens*, 156 AA en *G. gallus*, 162 AA en *D. rerio*, pero similar a la de *T.*

rubripes, que tiene una longitud de 207 AA (**Figura 3**). Finalmente, tres sitios putativos de fosforilación fueron encontrados en el bucle citoplasmático (S345, S429 y Y491), similares a los presentes en otras especies [16, 26, 32] (**Figura 3**). En resumen, la secuencia del receptor $\alpha 7nACh$ está altamente conservada en comparación con otros receptores $\alpha 7nACh$ de vertebrados.

Exones e intrones del receptor $\alpha 7nACh$ de trucha arcoíris

El análisis de los límites de los exones e intrones del receptor mostró que la estructura del gen estaba distribuida en 9 exones (**Tabla 1**), mientras que en otras especies como, *H. sapiens*, *G. gallus*, *D. rerio* y *T. rubripes* [26, 58-60] el gen se distribuye en 10 exones. El gen de la trucha arcoíris presentó un primer exón de mayor tamaño en comparación con otras especies. El análisis de la secuencia sugiere que este primer exón incluye el primer y el segundo exón descritos para otras especies. Desde el exón 2 hasta el exón 8 la estructura es homóloga a los exones de otras especies, en cuanto al último exón (exón 9), éste fue el más largo, similar en longitud al exón 10 de otras especies (**Figura 5**).

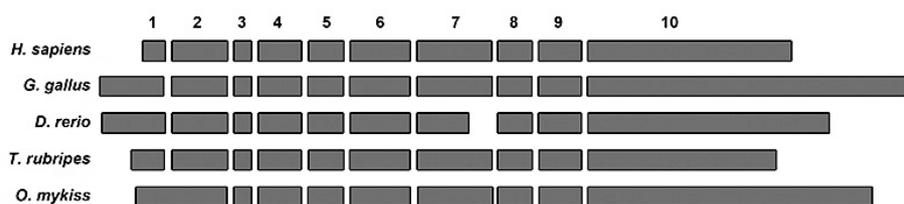


Figura 5. Diagrama de los exones e intrones del gen $\alpha 7nACh$ de trucha arcoíris y de otras especies.

Secuencias de unión de exones e intrones			
Tamaño exón (pb)	5' donante	3' receptor	Tamaño intrón (pb)
237	GGATGTG G tagggatc	ATCTTAC A ggatgaga	211
45	TCGGATG G taagcacg	GTCTTCC A gagctggt	668
110	ATAACAG G taatacac	CGTTAAA A gtgcagat	457
80	TTCCAC G tctgtta	GTCTGTT A gggatttt	990
168	CTAGTGG G tcagtggg	TCTCTCA A ggagtgcc	127
195	TCTCTGG G tgagcaga	TCTTTTC A ggtatcac	1750
87	CTCATAG G tgtgtgtt	ACCTTTC A ggacagta	341
110	CAAATGG G taaggcca	TCCTTTC A ggttaatg	4101
732			

Tabla 1. Secuencias de unión de exones e intrones del receptor $\alpha 7nACh$ de trucha arcoíris.

Las secuencias de los exones se indican con letras mayúsculas y las secuencias de los intrones se señalan con letras minúsculas. Los sitios de empalme de donantes y receptores se indican con letra en negrita. Los tamaños de los exones e intrones se señalan en pares de bases (pb).

Análisis filogenético

El análisis filogenético muestra que el análisis de ML y el Bayesiano del receptor $\alpha 7nACh$ para los taxones seleccionados convergen en la misma topología, aunque los valores que refuerzan la ramificación difieren en cada estimación filogenética. En el árbol consenso representado, las diferentes especies de peces se agrupan en un mismo nodo alejado del que incluye a los mamíferos terrestres, con el mayor apoyo de ramificación en el grupo que incluye a *O. mykiss* y *E. lucius*. (Figure 6).

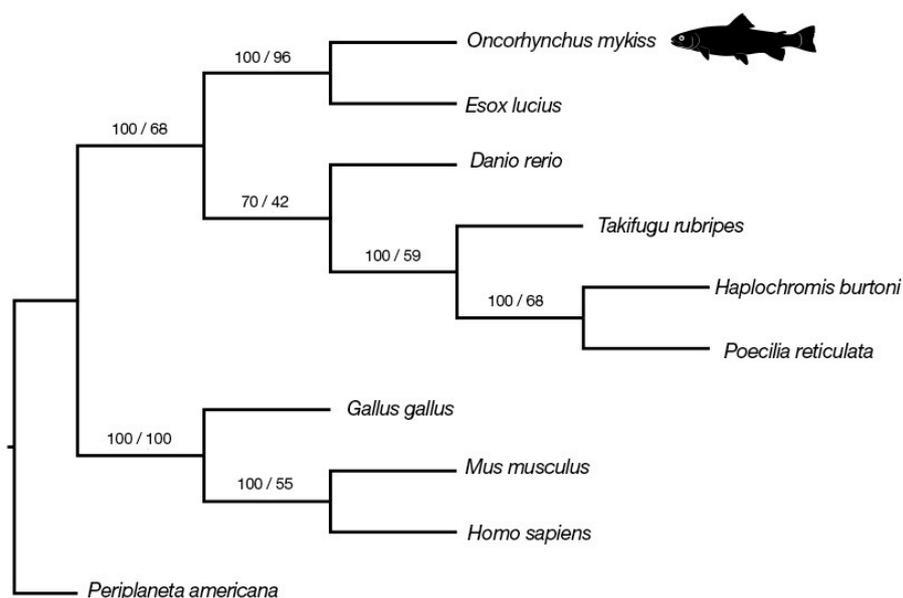


Figura 6. Relaciones filogenéticas del receptor $\alpha 7nACh$ de trucha arcoíris con otras especies.

Los valores en cada ramificación indican las probabilidades posteriores Bayesianas y el porcentaje de bootstrap para el análisis ML, respectivamente. *O. mykiss* comparte un 80% de similitud en la secuencia nucleotídica con *E. lucius*, y un 72%, 71%, 70% y 69% de similitud con *P. reticulata*, *H. burtoni*, *D. rerio* y *T. rubripes*, respectivamente. Números de acceso de las secuencias: *E. lucius*: XM_010899081.2, *P. reticulata*: XM_008422486.1, *H. burtoni*: XM_005927614.1, *T. rubripes*: XM_003969344.1, *D. rerio*: XM_009294051.1, *G. gallus*: NM_204181.2, *M. Musculus*: AF225980.1, *H. sapiens*: AF385585.1, *P. americana*: JX466891.1.

Distribución tisular del receptor $\alpha 7nACh$ en trucha arcoíris

La distribución tisular del receptor $\alpha 7nACh$ fue evaluada utilizando RT-PCR. Los animales fueron inyectados i.p. con poly (I:C), LPS o PBS y se sacrificaron 12 h después de la inyección. En condiciones basales, el receptor se expresa en todos los tejidos, siendo más abundante en cerebro y en riñón anterior. Resultados similares se obtuvieron en el tratamiento con poly (I:C) donde el receptor se expresa en todos los tejidos, observándose un aumento de la señal con respecto al control en cerebro, en riñón posterior y en músculo. En cuanto a los peces estimulados con LPS la señal del receptor se obtuvo en todos los tejidos, con un aumento de la intensidad de la señal con respecto al control en cerebro, riñón anterior e hígado (**Figura 7**).

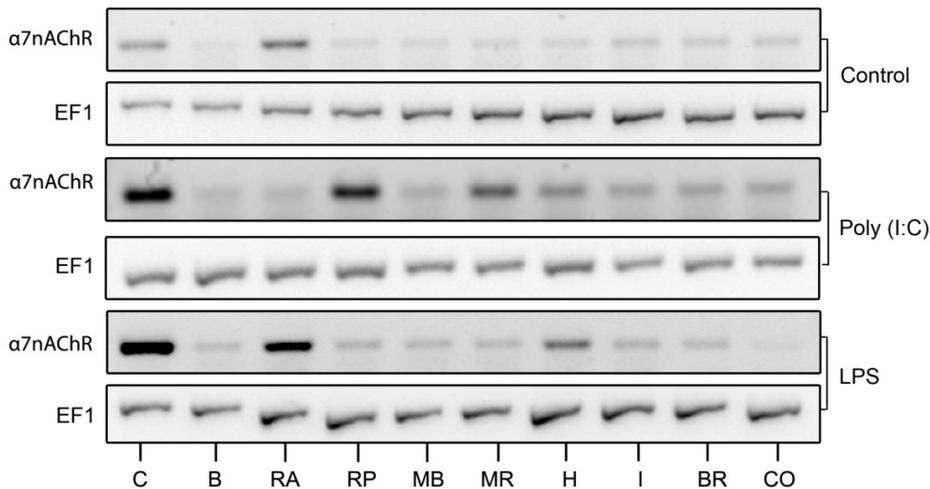


Figura 7. Distribución tisular del receptor $\alpha 7nACh$ de trucha.

Distribución del receptor en truchas tratadas con poly (I:C), LPS o PBS como control. La distribución tisular fue analizada a través de RT-PCR. Siglas: C: cerebro; B: bazo; RA: riñón anterior; RP: riñón posterior; MB: músculo blanco; MR: músculo rojo; H: hígado; I: intestino; BR: branquias y CO: corazón.

Diferentes PAMPs incrementan la cantidad de ACh en plasma y bazo

Los linfocitos T son capaces de producir ACh en respuesta a una infección, o en presencia de PAMPs o DAMPs [61]. A partir de estos antecedentes, los peces fueron estimulados con poly (I:C) o LPS *in vivo* para evaluar si estos PAMPs

eran capaces de modular los niveles de ACh (**Figura 8**). Los resultados mostraron que el poly (I:C) es capaz de aumentar los niveles de ACh tanto en plasma como en bazo. En plasma se observó un aumento significativo de la ACh a los 30 min ($1,17 \pm 0,41$ fold-change, $p < 0,01$) (**Figura 8A (i)**) y en bazo a los 20 y 30 min después de la estimulación ($3,27 \pm 0,84$ fold-change, $p < 0,01$; $3,42 \pm 0,28$ fold-change, $p < 0,01$, respectivamente) (**Figura 8A (ii)**), siendo mayor que en plasma.

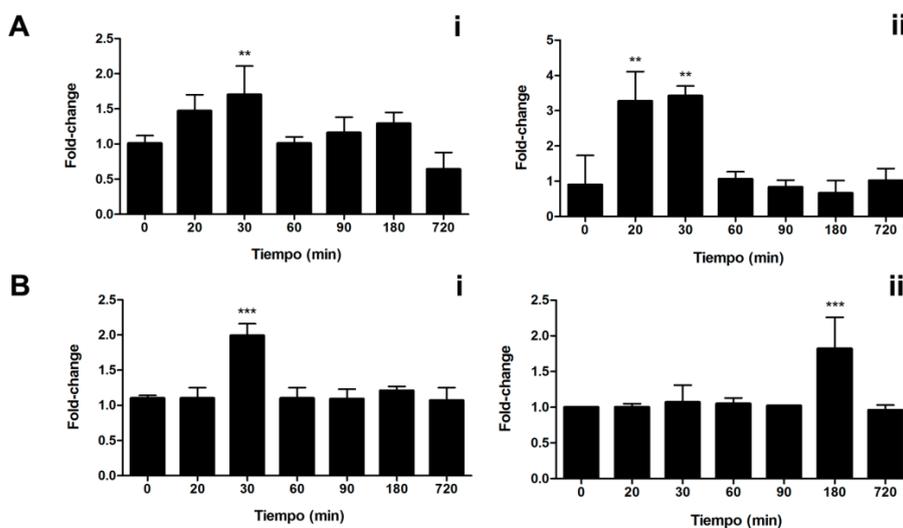


Figura 8. Niveles de ACh en plasma y bazo de trucha arcoíris después de una estimulación *in vivo* con poly (I:C) y LPS.

Niveles de ACh después de una inyección i.p. de A) poly (I:C) y B) LPS. Las muestras de (i) plasma y (ii) de bazo fueron tomadas a diferentes tiempos (0, 20, 30, 60, 90, 180 y 720 min después de la inyección). El fold-change fue calculado con respecto al control. Los valores representan el promedio y la desviación estándar ($n = 4$). Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey, respecto al control: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,0001$.

Los resultados muestran una tendencia similar en los peces tratados con LPS. Se observó un aumento en los niveles de ACh en plasma a los 30 min después de la inyección ($1,99 \pm 0,01$ fold-change, $p < 0,0001$) (**Figura 4B (i)**), y en bazo a los 180 min después de la inyección ($1,82 \pm 0,44$ fold-change, $p < 0,0001$) (**Figura 8A (ii)**). Estos resultados demuestran que diferentes PAMPs son capaces de estimular una parte de la vía colinérgica antiinflamatoria que corresponde a la producción de ACh por parte de los linfocitos, probablemente para estimular al receptor $\alpha 7$ nACh.

Los macrófagos de trucha expresan el receptor $\alpha 7$ nAChR y no el receptor $\alpha 9$ nAChR

El siguiente paso fue caracterizar la presencia de receptores de acetilcolina en macrófagos de trucha arcoíris mediante RT-PCR. Drescher y colaboradores han clonado y caracterizado el receptor $\alpha 9$ nACh y sus isoformas ($\alpha 9$ -I, $\alpha 9$ -II y $\alpha 9$ -III) en trucha arcoíris [38]. Tanto la subunidad $\alpha 7$ como la subunidad $\alpha 9$ son capaces de unir α -BXT, por lo que evaluamos la expresión de estos receptores en macrófagos tanto del bazo como del riñón anterior.

Los resultados mostraron que el receptor $\alpha 7$ nACh se expresa durante todo el proceso de diferenciación de los monocitos, con un claro aumento al tercer día, sostenido hasta el quinto día (**Figura 9A**). El receptor $\alpha 7$ nACh se expresa tanto en macrófagos derivados del riñón anterior como del bazo de trucha arcoíris (**Figura 9B**), por el contrario, las subunidades $\alpha 9$ -I, $\alpha 9$ -II y $\alpha 9$ -III no se expresaron en macrófagos de HK y SP (**Figura 9B**). Estos resultados sustentan el uso de α -BTX como una herramienta específica para identificar la presencia de receptor $\alpha 7$ nACh en la membrana de los macrófagos de trucha.

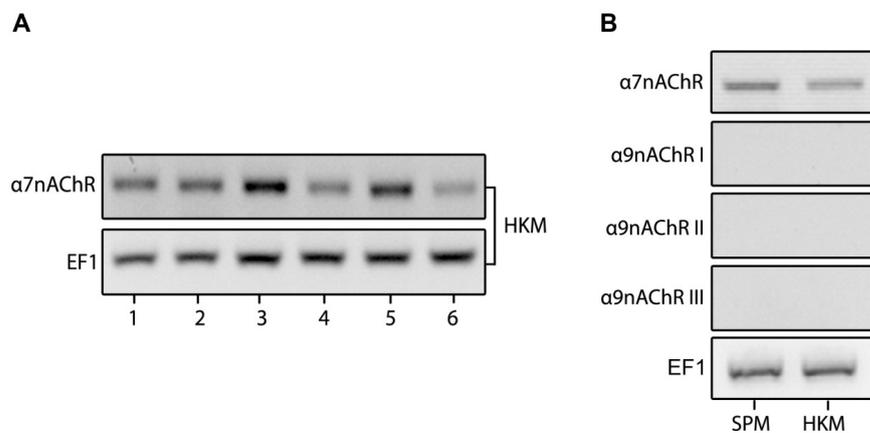


Figura 9. Análisis de la expresión génica de los receptores $\alpha 7$ nACh y $\alpha 9$ nACh en SPM y HKM.

A) Expresión génica del receptor $\alpha 7$ nACh desde el día 1 al día 6 de diferenciación en HKM. B) Expresión génica de los receptores $\alpha 7$ nACh y $\alpha 9$ nACh I, II y III al día cinco de diferenciación en SPM y HKM. La expresión génica fue analizada a través de RT-PCR.

La ACh y la NIC no modulan la fagocitosis en HKM

La fagocitosis es una de las funciones principales de los macrófagos, con un papel central en la respuesta inmune de peces [62]. Para explorar si la ACh y la NIC son capaces de modular la fagocitosis en macrófagos de trucha estimulamos las células de HKM con ACh o NIC, antes de la incubación con partículas de zimosan fluorescentes. Es importante señalar que se utilizaron células de HKM en lugar de células de SPM debido a que el rendimiento de aislamiento de macrófagos es mucho mayor en riñón anterior que en bazo, y además, la vida media de las células es más larga en macrófagos derivados del riñón anterior. Los resultados mostraron que tanto la ACh como la NIC no fueron capaces de modular la fagocitosis en HKM (**Figura 10**). En los ensayos de dosis respuesta, los resultados indican que la ACh, independientemente de la concentración evaluada, no tiene efectos significativos en la fagocitosis (61 ± 11 % de células positivas en el tratamiento sin ACh y 60 ± 8 % de células positivas en el tratamiento con $1000 \mu\text{M}$ de ACh, respectivamente) (**Figura 10A**). En relación a los ensayos de dinámica temporal, tampoco se observaron diferencias significativas en los diferentes tiempos analizados ($50,8 \pm 2,3$ % de células positivas incubadas sólo con zimosan, $53,8 \pm 6,5$ % de células positivas en el tratamiento con ACh y $57,7 \pm 12,7$ % de células positivas en el tratamiento con NIC a los 10 min) (**Figura 10B**).

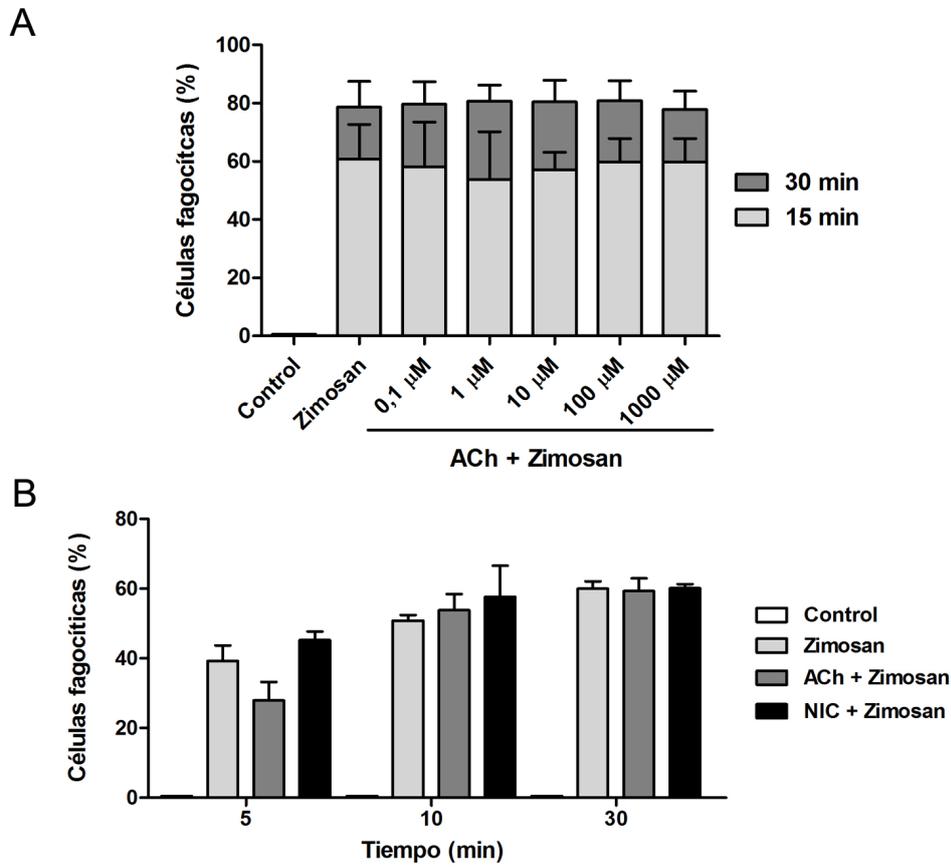


Figura 10. **Efectos de la ACh y de la NIC en la fagocitosis de zimosan por macrófagos de HKM.**

A) Dosis respuesta. Las células fueron incubadas con 0,1 a 1000 μ M de ACh durante 20 min antes de añadir zimosan durante 15 y 30 min. B) Dinámica temporal. Las células fueron incubadas con 500 μ M de ACh o 100 μ M de NIC durante 20 min antes de la adición de zimosan por 5, 10 y 30 min. Los valores representan el promedio y la desviación estándar (n = 3). Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando un ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey.

Los macrófagos de trucha son capaces de unir α -BTX y la NIC es capaz de disminuir esta unión

Con el objetivo de analizar la presencia del receptor $\alpha 7nACh$ en la membrana de los macrófagos se evaluó la unión de la α -BTX, un antagonista de la ACh que se une irreversiblemente a los receptores $\alpha 7nACh$ y $\alpha 9nACh$ [32]. Como se describió anteriormente, los macrófagos de trucha obtenidos desde el bazo y el riñón anterior expresan al receptor $\alpha 7nACh$ y no el receptor $\alpha 9nACh$, por lo que la unión de α -BTX indicaría sólo la presencia del receptor $\alpha 7nACh$. Además, se evaluó el efecto de la NIC (un agonista de la ACh) en la unión de la α -BTX. En primer lugar, se observó que las células HKM fueron capaces de unir α -BTX ($22,7 \pm 4$ % de unión de α -BTX, $p < 0,0001$) (**Figura 11A (i)**), y en segundo lugar, se observó que la NIC fue capaz de disminuir de manera dependiente de la dosis la unión de la α -BTX (p. ej., $12,6 \pm 1,5$ % de unión de α -BTX a $500 \mu M$ de NIC, $p < 0,0001$). Asimismo, las células SPM fueron capaces de unir α -BTX ($34,9 \pm 0,5$ % de unión de α -BTX, $p < 0,0001$) (**Figura 11A (ii)**) y la NIC fue capaz de disminuir la unión de la α -BTX ($19,1 \pm 10$ %, $p < 0,01$) al igual que en la células HKM. Las imágenes de microscopía confocal permiten la visualización de la unión de la α -BTX a la membrana de las células HKM (**Figura 11B (i - iv)**). Adicionalmente, los resultados mostraron que una estimulación previa de las células con poly (I:C) aumentó la unión de la α -BTX ($47,5 \pm 6,4$ % y $32,8 \pm 3,4$ % de unión de la α -BTX en células estimuladas con o sin poly (I:C), respectivamente, $p < 0,05$) (**Figura 11C (i)**), pero este fenómeno no se observó en células estimuladas con LPS (**Figura 11C (ii)**).

Se realizó el mismo experimento en una línea celular de macrófagos de ratón (J774A.1) que posee el receptor $\alpha 7nACh$ [63], como control del protocolo utilizado. En la **Figura 2 del Anexo 1** se puede observar como los macrófagos de ratón pueden unir ACh con el mismo protocolo utilizado para el ensayo de unión de la α -BTX en macrófagos de peces y, también se puede observar como la incubación previa con ACh disminuye el número de células fluorescentes (**Anexo 1, Figura 2A**). Además, en las imágenes de microscopía confocal se puede observar la unión de la α -BTX-FITC en la superficie de los macrófagos de ratón de manera similar a lo observado en peces (**Anexo 1, Figura 2B**).

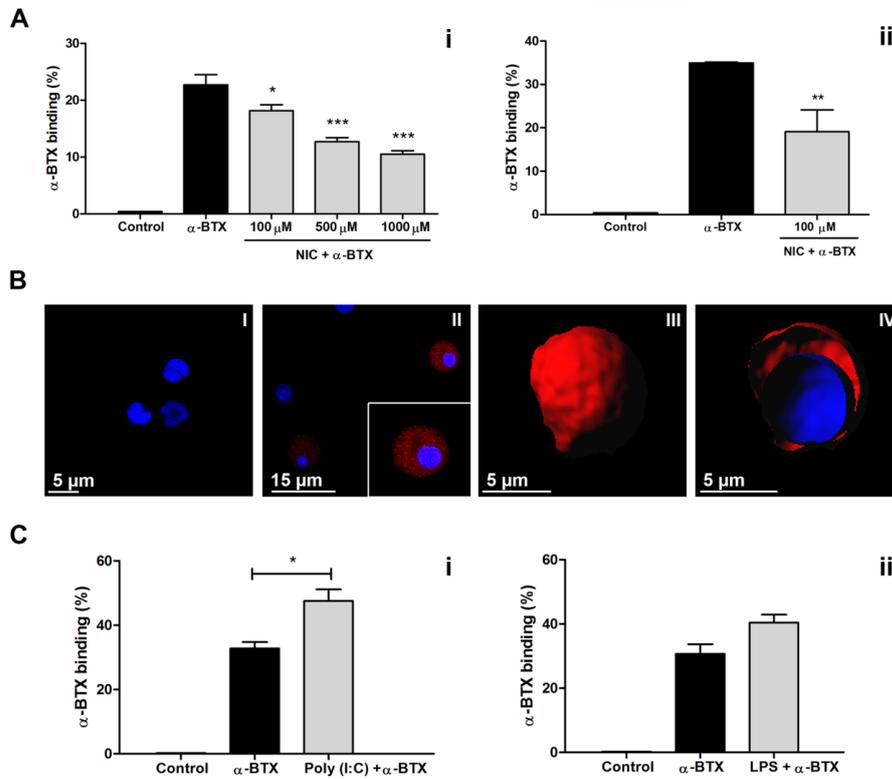


Figura 11. Unión de α -BTX en macrófagos de trucha arcoíris.

A) Unión de α -BTX en macrófagos de trucha. **(i)** Las células HKM fueron incubadas con 100, 500 o 1000 μ M de NIC y **(ii)** las células SPM fueron incubadas con 100 μ M de NIC durante 20 min previo a la adición de 1,5 μ g/ml de α -BTX-AF647 durante 1 h.

B) Imágenes de microscopía confocal de la unión de α -BTX (rojo) en las células HKM. Las células fueron incubadas con 1,5 μ g/ml de α -BTX-AF647 durante 1 h. Hoechst (azul) fue utilizado para la tinción del núcleo. **(i)** Células control, **(ii)** células a 1 h de la estimulación, **(iii)** imágenes digitalizadas de la membrana completa **(iv)** y de un corte en el eje Z de la misma célula. **C)** Unión de α -BTX en las células HKM después de la estimulación con **(i)** 20 μ g/ml de poly (I:C) y **(ii)** 10 μ g/ml de LPS durante 2 h previo a la adición de α -BTX-AF647 durante 2 h. Los valores representan el promedio y la desviación estándar (n = 4). Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey, respecto a la α -BTX: *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

La NIC modula la respuesta de macrófagos frente a una estimulación con poly (I:C)

Con el fin de explorar la capacidad del receptor $\alpha 7nACh$ de inhibir la respuesta inflamatoria producida por diferentes PAMPs, se utilizó NIC como un agonista del receptor y α -BTX como un antagonista que une irreversiblemente al receptor $\alpha 7nACh$. Nuestros resultados mostraron, que la NIC fue capaz de inhibir el aumento de la expresión génica de genes antivirales inducidos por poly (I:C). IFN, Mx, CCL4, CK6 y VIG fueron regulados a la baja por la NIC (p. ej., Mx: 25 ± 4 fold-change después del tratamiento con poly (I:C) y 8 ± 11 fold-change después del tratamiento con NIC + poly (I:C), $p < 0,001$). También se evaluó la expresión de diferentes receptores como, TLR3 y TLR8, los resultados indicaron que la NIC fue capaz de regular a la baja la expresión de TLR3 ($2,65 \pm 0,5$ fold-change después del tratamiento con poly (I:C) y $1,5 \pm 0,3$ fold-change después del tratamiento con NIC + poly (I:C), $p < 0,01$), y, aunque, es posible observar la misma tendencia para la expresión TLR8, no observamos diferencias significativas (**Figura 12**). Al mismo tiempo, se observó que la α -BTX es capaz de atenuar el efecto de la NIC (p. ej., Mx: 25 ± 7 fold-change en el tratamiento de α -BTX + NIC + poly (I:C) y TLR3: $2,1 \pm 0,1$ fold-change en el tratamiento con α -BTX + NIC + poly (I:C), $p < 0,001$) (**Figura 12**).

Estos resultados sugieren que existe una competencia entre la α -BTX y la NIC por el sitio de unión. Sin embargo, este efecto no se observó en citoquinas proinflamatorias como, TNF α , IL-6 o IL-1 β (datos no mostrados). Por otro lado, la expresión génica de los genes relacionados con la respuesta inmunológica como, TNF α , IL-6, IL-1- β , CCL4, CK6, CAMP1, SOCS3, MMP9 no son modulados por la NIC en las células tratadas con LPS, y en consecuencia, tampoco se observó ningún efecto de la α -BTX (**Anexo 1, Figura 3**).

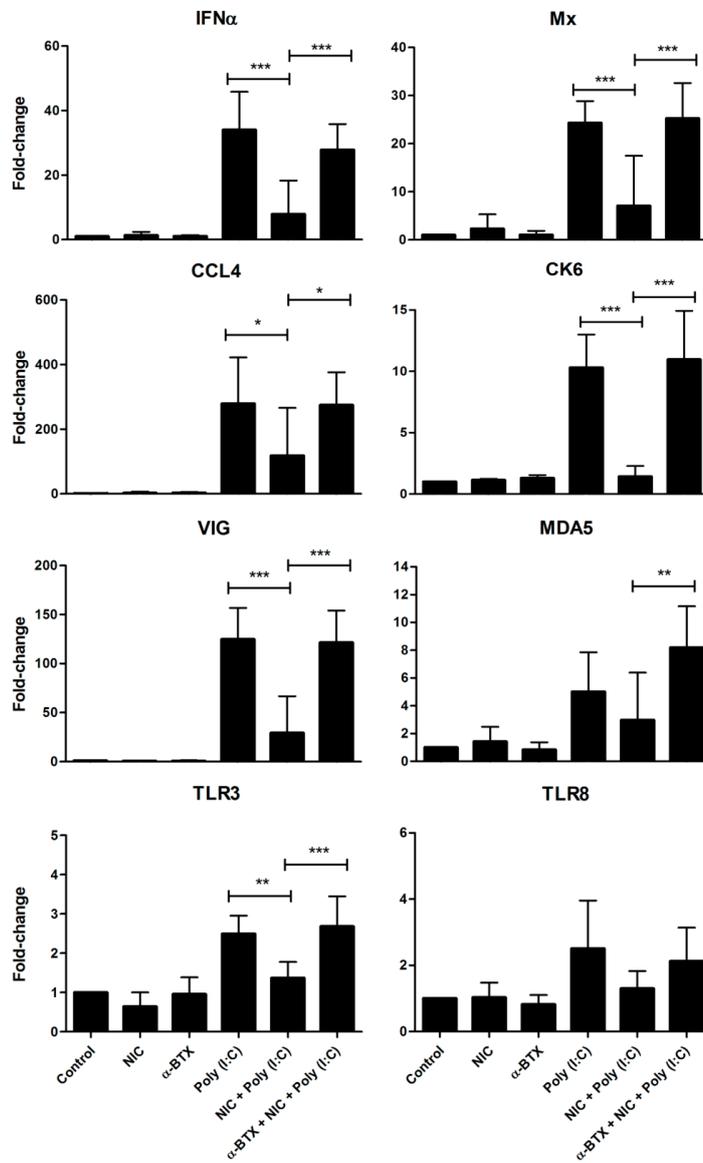


Figura 12. **Análisis de expresión génica en células HKM estimuladas con NIC y α-BTX previo a la estimulación con poly (I:C).**

Las células fueron cultivadas con 1,5 µg/ml de α-BTX durante 30 min, posteriormente se agregó 100 µM de NIC durante 20 min y finalmente se añadió 20 µg/ml de poly (I:C) durante 12 h. La expresión génica fue analizada a través de Q-PCR. Los valores representan el promedio y la desviación estándar (n = 4). Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey, respecto al control:

*, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

Discusión

El reflejo inflamatorio es un sistema de control que modula la expresión de moléculas proinflamatorias para prevenir las consecuencias de una excesiva activación del sistema inmune innato. Una pieza fundamental de este sistema de homeostasis es el receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 ($\alpha 7$ nACh). El receptor $\alpha 7$ nACh, al ser estimulado por ligandos como la ACh y la NIC, inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias. La presencia del receptor ha sido descrita en diferentes tipos celulares, entre ellos, los macrófagos. En el presente trabajo describimos, por primera vez, la presencia del receptor $\alpha 7$ nACh y su capacidad de unir diferentes ligandos en macrófagos de trucha arcoíris, además de su efecto en la modulación de la respuesta inflamatoria.

El receptor $\alpha 7$ nACh está formado por cinco subunidades $\alpha 7$ y cada subunidad se organiza en una región extracelular, donde se forma el sitio de unión y una región intracelular, donde se encuentran los dominios transmembranas. Los diferentes aminoácidos que contribuyen al sitio de unión de la ACh, y que están en contacto con los ligandos, se organizan en bucles [25, 64, 65]. En la trucha arcoíris los aminoácidos que están hipotéticamente en contacto con la ACh, están altamente conservados, en comparación a diferentes especies (p. ej., *H. sapiens*, *G. gallus*, *D. rerio*, *T. rubripes*) (**Anexo 1, Figura 1**). Al comparar la secuencia que forma el sitio de unión de la ACh de humanos, con la secuencia de trucha, se observan sólo dos residuos diferentes, uno presente en el bucle D (Q57 \rightarrow R57) y el otro en el bucle E (Q117 \rightarrow E117) (**Anexo 1, Figura 1**). Sin embargo, estos aminoácidos (R57 y E117) no están demasiado conservados en otras especies, por ejemplo el residuo R57 está presente en: *E. lucius* y *T. rubripes*, pero difiere con el residuo presente en *D. rerio*, una asparagina (N) y *H. burtoni*, *P. reticulata*, *G. gallus*, *M. musculus* y *H. sapiens* presentan una glutamina (Q) (**Figura 4**). En cuanto al residuo E117 coincide con el aminoácido presente en *E. lucius* y *T. rubripes*, pero difiere del residuo presente en *H. burtoni*, *P. reticulata*, que presentan una lisina (K), *D. rerio* presenta una asparagina (N) y *G. gallus*, *M. musculus* y *H. sapiens* presentan una glutamina (Q). Por lo tanto, se deduce que la diferencia entre estos aminoácidos no debería incidir en la capacidad del receptor $\alpha 7$ nACh de unir ACh.

La α -BTX es una pequeña proteína que se une irreversiblemente al receptor $\alpha 7$ nACh. Esta proteína forma un complejo con el bucle C del sitio de unión de la ACh necesario para la unión de agonistas y antagonistas del receptor [66]. De hecho, una fenilalanina y dos tirosinas en el bucle C son esenciales para la

alta afinidad de la unión de la α -BTX [67, 68]. Estos residuos están presentes en la secuencia de aminoácidos deducida de trucha (F187, Y188 y Y195) y se encuentran separados por seis residuos altamente conservados (**Figura 13A**). En base al análisis de la secuencia, el receptor α 7nACh posee todos los elementos necesarios para tener una alta afinidad por la α -BTX.

A	187 188 189 190 191 192 193 194 195	B	313 314 315 316 317 318 319 320 321
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	V F Y D C C K E P Y P	V L L Q W V A W F L R	
<i>Takifugu rubripes</i>	V F Y D C C K E P Y P	V L L Q W V A W F L R	
<i>Danio rerio</i>	R F Y D C C K E P Y P	V L L Q W V A W F L R	
<i>Gallus gallus</i>	S F Y E C C K E P Y P	I L L N W C A W F L R	
<i>Mus musculus</i>	K F Y E C C K E P Y P	I L L N W C A W F L R	
<i>Homo sapiens</i>	R F Y E C C K E P Y P	I L L N W C A W F L R	

Figura 13. **Comparación del sitio de unión de la α -BTX y del bucle citoplasmático del receptor de α 7nAChR de trucha arcoíris.**

A) Comparación de los aminoácidos esenciales (azul) para la unión de α -BTX en el receptor α 7nACh de trucha y otras especies. B) Comparación de los aminoácidos esenciales (azul) para la correcta expresión y funcionalidad del receptor α 7nACh en trucha arcoíris y de otras especies. La numeración de los aminoácidos corresponde a la secuencia de trucha arcoíris.

El bucle citoplasmático (residuos 293 - 520) es determinante para la correcta expresión, plegamiento y tráfico del receptor a la membrana (**Figura 1**). Este bucle se ha estudiado muy detalladamente y mediante mutagénesis dirigida se han descrito una serie de residuos clave (residuos 313 - 321) que son capaces de impedir la expresión del receptor funcional [69, 70]. El receptor de trucha presenta esta región (L313 - L321) compuesta por dos pares de aminoácidos hidrofóbicos separados por cinco aminoácidos poco conservados (**Figura 13B**). Los aminoácidos críticos descritos por Mukherjee y colaboradores son tres leucinas y una cisteína [70]. En trucha están presentes las leucinas (L313, L314 y L321) en la secuencia, pero no la cisteína. Sin embargo, esta cisteína tampoco está presente en ninguna de las secuencias de peces analizadas, aunque, se ha demostrado la funcionalidad del receptor α 7nACh del pez cebra en un sistema heterólogo (oocitos de *Xenopus laevis*) a pesar de no tener esta cisteína [35]. Esto sugiere que el cambio de una cisteína por una valina (C \rightarrow V) en peces no afectaría el correcto plegamiento, montaje y tráfico del receptor a la membrana.

En cuanto a la secuencia genómica del receptor $\alpha 7nACh$, existe una alta conservación en el número de exones e intrones en diferentes especies (p. ej., *D. rerio*, *T. rubripes*, *G. gallus*, *M. musculus*, *H. sapiens*). La secuencia de trucha es la única que presenta un exón menos, la cual en base a la homología de la secuencia representaría una fusión del primer y segundo exón presente en otras especies. En el análisis de las secuencias (ADNc y ADNg de trucha [51]) no se encontró ninguna secuencia de empalme en el primer exón que permitiera deducir la existencia de un intrón.

Nuestros resultados muestran que diferentes PAMPs son capaces de estimular la expresión del receptor $\alpha 7nACh$ en diferentes tejidos de trucha. El tejido donde mayormente ha sido observada la presencia del receptor es el cerebro, lo cual es consistente con la principal función de los receptores neuronales nicotínicos, que es modular la función neuronal en distintos procesos cerebrales [71]. Además, hemos descrito la presencia del receptor en todos los tejidos analizados con poca diferencia entre los peces estimulados con poly (I:C) y LPS, aunque, la mayor expresión se observó en el riñón posterior, el riñón anterior, el hígado y el músculo. Existe poca información acerca de la distribución tisular de los receptores nicotínicos, ya que su caracterización se ha centrado principalmente en su distribución en el cerebro y su presencia en células inmunológicas (células T, células B, monocitos, macrófagos, células dendríticas) [5]. Sin embargo, se ha descrito la presencia del receptor $\alpha 7nACh$ (isoforma a) de fuga en diferentes órganos como, el cerebro, las branquias, las gónadas, el estómago, el corazón y el músculo [34], y el receptor $\alpha 9nACh$ (isoforma I, II y III) de trucha en tejidos como, el cerebro, el bazo, el hígado, la glándula pituitaria y la retina [38]. En macrófagos derivados del bazo y del riñón anterior de trucha se ha detectado la expresión del receptor $\alpha 7nACh$. Esta observación es consistente con lo descrito hasta el momento en mamíferos (p. ej., en líneas celulares de macrófagos de ratón RAW264.7 y J774A.1 [29, 63], en la línea celular Mf4/415 de macrófagos de bazo humano [72] y en cultivos primarios de macrófagos humanos [14]. Todos los resultados de expresión génica confirman la presencia del receptor en bazo, aunque, en la distribución tisular se observa una baja expresión en comparación con el riñón. Esto podría deberse a que en el bazo existe una menor presencia de macrófagos en comparación con el riñón [73], produciendo una menor señal por RT-PCR.

Una manera indirecta de observar la posible activación del reflejo inflamatorio, es estimular las truchas con diferentes PAMPs que activen la vía colinérgica antiinflamatoria y que induzcan un aumento de la ACh, con el fin de activar al

receptor $\alpha 7$ nACh. Nuestros resultados muestran que el poly (I:C) y el LPS son capaces de aumentar los niveles de ACh en plasma y en extractos totales de bazo de trucha a tiempos cortos. La presencia de ACh ha sido descrita en plasma y en bazo en diferentes especies (p. ej., humanos, ratón, ovejas, conejos, caballo, buey) [6, 13, 74, 75]. En peces, se ha descrito la presencia de ACh en condiciones basales en células mononucleares de sangre y en el bazo de tilapia [36, 76].

A través de un antagonista específico del receptor $\alpha 7$ nACh (la α -BTX) hemos demostrado que los macrófagos de trucha poseen un receptor $\alpha 7$ nACh funcional, que es capaz de unir un ligando específico. Esto concuerda con nuestros resultados de caracterización de la secuencia del receptor $\alpha 7$ nACh, en donde, se describe la presencia de todos los aminoácidos esenciales para la unión de esta neurotoxina (**Figura 13A**). En macrófagos de trucha se observa una competencia por el sitio de unión entre la NIC y la α -BTX. Este fenómeno ha sido observado previamente en macrófagos de humanos, donde una incubación con NIC previa a la adición de α -BTX, produce una disminución de la unión de la neurotoxina [11, 29]. La estimulación de macrófagos de trucha con poly (I:C), antes de la incubación con α -BTX, produce un aumento de la unión de ésta, aunque, este fenómeno no se observa con LPS. Esto indicaría que el poly (I:C), que simula una infección vírica, estimula las células produciendo un aumento del receptor en la membrana, lo que deriva en un aumento de la unión de la α -BTX, pero no así el LPS, que simula una infección bacteriana. En mamíferos se ha descrito que el LPS produce un aumento de la presencia del receptor $\alpha 7$ nACh en la membrana de los macrófagos, aumentando la unión de la α -BTX a las 9 h después de la estimulación [63]. Nuestros resultados demuestran que el LPS es capaz de aumentar la expresión génica del receptor a las 12 h posteriores a la estimulación (distribución tisular), pero no es capaz de aumentar la unión de α -BTX tras 4 h de estimulación. Estos resultados sugieren que el LPS necesitaría más tiempo para inducir un aumento del receptor en la membrana de los macrófagos de trucha.

La NIC y la ACh no modulan la fagocitosis a través del receptor $\alpha 7$ nACh en macrófagos derivados del bazo y del riñón anterior de trucha, de forma similar a lo que ha sido descrito en monocitos y macrófagos humanos. Por ejemplo, en monocitos obtenidos desde sangre no se observa una modulación de la fagocitosis por diferentes antagonistas no selectivos de receptores nicotínicos (p. ej., tubocurarina y bromoacetilcolina) [77], y además, se ha descrito que la fagocitosis es principalmente regulada por NIC o ACh a través del receptor $\alpha 4\beta 2$ y no por el receptor $\alpha 7$ nACh en macrófagos peritoneales de ratón [72].

Nuestros resultados indican que la NIC es capaz de modular la respuesta inmune frente a una estimulación con poly (I:C), pero no con LPS. En mamíferos se ha descrito que la activación del receptor $\alpha 7nACh$, a través de LPS y poly (I:C) produce una disminución de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína [11, 14, 29, 28, 63]. En nuestros resultados observamos una regulación a nivel de expresión génica de genes directamente relacionados con la respuesta antivírica (IFN α , Mx, CCL4, VIG y TLR3), pero no en citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-6 e IL-1 β). Esta modulación se realiza a través del receptor $\alpha 7nACh$, ya que la adición de un antagonista específico produce una disminución del efecto de la NIC, aumentando la expresión génica de estos genes. La mayor sensibilidad del receptor $\alpha 7nACh$ de trucha a poly (I:C) en comparación con el LPS se puede deber a que los peces son sensibles al LPS pero en el orden de 1000 veces menor a lo descrito en mamíferos [78], por lo cual no sería imperativo activar un sistema de homeostasis del sistema inmune frente a LPS. En mamíferos el LPS es especialmente importante ya que puede provocar un shock séptico [79]. El receptor tipo Toll 4 (*Toll like receptor 4*, TLR4) de mamíferos es la proteína central del complejo receptor de LPS y el TLR4, junto con MD2 y CD14 [80] pueden detectar hasta picogramos de LPS y activar diferentes vías que conducen a la expresión de moléculas inflamatorias como TNF α o IL-1 β , [81]. En peces, la sensibilidad al LPS es mucho menor, en el rango de microgramos y, aunque, algunas especies presentan el receptor TLR4, se ha demostrado que este no está relacionado con la detección del LPS [82]. La ausencia de las moléculas MD2 y CD14 en el genoma de peces puede ayudar a explicar su alta tolerancia al LPS [83-85]. De hecho se ha postulado que la presencia de peptidoglicanos en las preparaciones de LPS podría ser la responsable de la estimulación de la expresión de citoquinas [86]. Por otro lado, la detección de poly (I:C) en mamíferos es realizada principalmente por el receptor de membrana tipo Toll 3 (*Toll like receptor 3*, TLR3) y los receptores intracelulares del gen inducible por ácido retinoico 1 (*retinoic acid-inducible gene 1*, RIG-1) y la proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*, MDA5) [87]. El TLR3 reconoce el ARN de doble cadena y activa una respuesta a través de la vía TRIF (*TIR-domain-containing adapter inducing interferon beta*), también conocido como TICAM1 (*TIR domain-containing adapter molecule 1*), el cual activa la respuesta antiviral produciendo moléculas inflamatorias como interferón tipo I, citoquinas y quimioquinas [88, 89]. RIG-1 y MDA5 juegan un rol principal en el reconocimiento de ARN vírico en células dendríticas y macrófagos [90]. En teleósteos, han sido descritos ortólogos de los TLR

humanos que reconocen ARN vírico en diferentes especies como, trucha arcoíris, pez cebra, salmón del Atlántico, carpa y dorada [84, 91-97], demostrando cierto grado de similitud con el sistema en mamíferos. Adicionalmente, se ha descrito en trucha la presencia de RIG-1 y MDA5, los cuales, al ser estimulados con poly (I:C), son capaces de activar una respuesta antiviral [98]. Otros componentes y vías del sistema inmune de mamíferos que responden a una infección viral han sido encontrados y descritos en salmónidos [99], lo que explicaría que poly (I:C) active un sistema de homeostasis como el reflejo inflamatorio.

Conclusiones

Este es el primer trabajo donde se describe la presencia y funcionalidad del receptor $\alpha 7nACh$ de trucha y su posible rol en el reflejo inflamatorio. El análisis de la secuencia confirma su alta similitud con el receptor descrito en otras especies, así como la presencia de todos los residuos y dominios necesarios para ser un receptor funcional. La unión del receptor a un antagonista específico como la α -BTX indica su presencia en la membrana de los macrófagos de trucha. Además, nuestros resultados demuestran que hay una respuesta por parte de los principales componentes del reflejo inflamatorio frente al estímulo con diferentes PAMPs, por ejemplo, existe una mayor expresión del receptor y un aumento de la producción de acetilcolina *in vivo*. El principal rol del receptor $\alpha 7nACh$, en el contexto del reflejo inflamatorio, queda demostrado en cuanto es capaz de modular la respuesta inmune de macrófagos de trucha frente a una simulación de una infección viral. Esto abre la posibilidad de explorar otros aspectos del reflejo inflamatorio que nos permitan comprender si efectivamente el nervio vago podría estar regulando esta capacidad del receptor de modular la respuesta del sistema inmune innato en peces.

Referencias

- [1] K. J. Tracey. **Understanding immunity requires more than immunology.** *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 7, pp. 561–4, 2010.
- [2] K. J. Tracey. **Immune cells exploit a neural circuit to enter the CNS.** *Cell*, vol. 148, no. 3, pp. 392–394, 2012.
- [3] M. Flesner, L. Goehler, B. Schwartz, M. McGorry, D. Martin, S. Maier, y L. Watkins. **Thermogenic and corticosterone responses to intravenous cytokines (IL-1beta and TNF-alpha) are attenuated by subdiaphragmatic vagotomy.** *J. Neuroimmunol.*, vol. 15, no. 86, pp. 131–141, 1998.

- [4] K. J. Tracey. **The inflammatory reflex.** *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 853–859, 2002.
- [5] K. J. Tracey. **Reflex control of immunity.** *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 6, pp. 418–428, 2009.
- [6] P. S. Olofsson, M. Rosas-Ballina, Y. A. Levine, y K. J. Tracey. **Rethinking inflammation: Neural circuits in the regulation of immunity.** *Immunol. Rev.*, vol. 248, no. 1, pp. 188–204, 2012.
- [7] K. Kawashima, T. Fujii, Y. Moriwaki, y H. Misawa. **Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function.** *Life Sci.*, vol. 91, no. 21–22, pp. 1027–1032, 2012.
- [8] W. J. de Jonge, E. P. van der Zanden, F. O. The, M. F. Bijlsma, D. J. van Westerloo, R. J. Bennink, H.-R. Berthoud, S. Uematsu, S. Akira, R. M. van den Wijngaard, y G. E. Boeckxstaens. **Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway.** *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 8, pp. 844–51, 2005.
- [9] H. Yoshikawa, M. Kurokawa, N. Ozaki, K. Nara, K. Atou, E. Takada, H. Kamochi, y N. Suzuki. **Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7.** *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 146, no. 1, pp. 116–123, 2006.
- [10] S. Guarini, D. Altavilla, M. M. Cainazzo, D. Giuliani, A. Bigiani, H. Marini, G. Squadrito, L. Minutoli, A. Bertolini, R. Marini, E. B. Adamo, F. S. Venuti, y F. Squadrito. **Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock.** *Circulation*, vol. 107, no. 8, pp. 1189–1194, 2003.
- [11] H. Wang, M. Yu, M. Ochani, C. A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J. H. Li, H. Wang, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C. J. Czura, y K. J. Tracey. **Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation.** *Nature*, vol. 421, no. 6921, pp. 384–388, 2003.
- [12] M. Gallowitsch-Puerta y K. J. Tracey. **Immunologic role of the cholinergic anti-inflammatory pathway and the nicotinic acetylcholine alpha 7 receptor.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1062, pp. 209–219, 2005.
- [13] K. Kawashima y T. Fujii. **Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function.** *Front. Biosci.*, vol. 9, pp. 2063–2085, 2004.
- [14] L. V. L. Borovikova, S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G. I. Botchkina, L. R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J. W. Eaton, y K. J. Tracey. **Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin.** *Nature*, vol. 405, no. May, pp. 458–462, 2000.
- [15] M. Alkondon y E. X. Albuquerque. **Subtype-specific inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by choline: a regulatory pathway.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 318, no. 1, pp. 268–275, 2006.
- [16] P. Seguela, J. Wadiche, K. Dineley-Miller, J. A. Dani, y J. W. Patrick. **Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat**

brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.*, vol. 13, no. 2, pp. 596–604, 1993.

- [17] K. Z. Sato, T. Fujii, Y. Watanabe, S. Yamada, T. Ando, F. Kazuko, y K. Kawashima. **Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines.** *Neurosci. Lett.*, vol. 266, no. 1, pp. 17–20, 1999.
- [18] K. Kawashima, K. Yoshikawa, Y. X. Fujii, Y. Moriwaki, y H. Misawa. **Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells.** *Life Sci.*, vol. 80, no. 24–25, pp. 2314–2319, 2007.
- [19] D. Williams, J. Wang, y R. Papke. **Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: advantages and limitations.** *Biochem. Pharmacol.*, vol. 82, no. 8, pp. 915–930, 2011.
- [20] D. K. Williams, C. Peng, M. R. Kimbrell, y R. L. Papke. **Intrinsically low open probability of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors can be overcome by positive allosteric modulation and serum factors leading to the generation of excitotoxic currents at physiological temperatures.** *Mol. Pharmacol.*, vol. 82, no. 4, pp. 746–59, 2012.
- [21] R. L. Papke. **Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors.** *Biochem. Pharmacol.*, vol. 89, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [22] K. Brejc, W. J. van Dijk, R. V. Klaassen, M. Schuurmans, J. van Der Oost, a B. Smit, y T. K. Sixma. **Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors.** *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 269–276, 2001.
- [23] S. August, B. Katjusa, S. Naweed, y S. Titia. **Structure and Function of AChBP, Homologue of the Ligand-Binding Domain of the Nicotinic Acetylcholin.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 998, pp. 81–92, 2003.
- [24] S. X. Li, S. Huang, N. Bren, K. Noridomi, C. D. Dellisanti, S. M. Sine, y L. Chen. **Ligand-binding domain of an $\alpha 7$ -nicotinic receptor chimera and its complex with agonist.** *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 10, pp. 1253–1259, 2011.
- [25] A. Taly, P. J. Corringer, D. Guedin, P. Lestage, y J. P. Changeux. **Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system.** *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 8, no. 9, pp. 733–750, 2009.
- [26] J. Gault, M. Robinson, R. Berger, C. Drebing, J. Logel, J. Hopkins, T. Moore, S. Jacobs, J. Meriwether, M. J. Choi, E. J. Kim, K. Walton, K. Buiting, A. Davis, C. Breese, R. Freedman, y S. Leonard. **Genomic Organization and Partial Duplication of the Human alpha 7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene (CHRNA7).** *Library (Lond).*, vol. 185, pp. 173–185, 1998.
- [27] P. Flicek, R. Amode, D. Barrell, K. Beal, K. Billis, S. Brent, D. Carvalho-Silva, P. Clapham, G. Coates, S. Fitzgerald, L. Gil, C. G. Girón, L. Gordon, T. Hourlier, S. Hunt, N. Johnson, T. Juettemann, A. K. Kähäri, S. Keenan, E. Kulesha, F. J. Martin, T. Maurel, W. M. McLaren, D. N. Murphy, R. Nag, B. Overduin, M. Pignatelli, B. Pritchard, E. Pritchard, H. S. Riat, M.

- Ruffier, D. Sheppard, K. Taylor, A. Thormann, S. J. Trevanion, A. Vullo, S. P. Wilder, M. Wilson, A. Zadissa, B. L. Aken, E. Birney, F. Cunningham, J. Harrow, J. Herrero, T. J. P. Hubbard, R. Kinsella, M. Muffato, A. Parker, G. Spudich, A. Yates, D. R. Zerbino, y Stephen M.J. Searle. **Ensembl**. *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, pp. 749-755, 2014.
- [28] Y. H. Yang, D. L. Li, X. Y. Bi, L. Sun, X. J. Yu, H. L. Fang, Y. Miao, M. Zhao, X. He, J. J. Liu, y W. J. Zang. **Acetylcholine Inhibits LPS-Induced MMP9 Production and Cell Migration via the alpha7nAChR JAK2/STAT3 Pathway in RAW264.7 Cells**. *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 36, no. 5, pp. 2025–2038, 2015.
- [29] W. Y. Cui, S. Zhao, R. Polanowska-Grabowska, J. Wang, J. Wei, B. Dash, S. L. Chang, J. J. Saucerman, J. Gu, y M. D. Li. **Identification and characterization of poly(I:C)-induced molecular responses attenuated by nicotine in mouse macrophages**. *Mol. Pharmacol.*, vol. 83, no. 1, pp. 61–72, 2013.
- [30] J. M. Ward, V. B. Cockcroft, G. G. Lunt, F. S. Smillie, y S. Wonnacott. **Methyllycaonitine: a selective probe for neuronal alpha-bungarotoxin binding sites**. *FEBS Lett.*, vol. 270, no. 1–2, pp. 45–48, 1990.
- [31] M. Pohanka. **Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology**. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 2, pp. 2219–2238, 2012.
- [32] S. J. Moss, B. J. McDonald, Y. Rudhard, y R. Schoepfer. **Phosphorylation of the predicted major intracellular domains of the rat and chick neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit by cAMP-dependent protein kinase**. *Neuropharmacology*, vol. 35, no. 8, pp. 1023–1028, 1996.
- [33] H. R. Arias. **Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor**. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, vol. 25, no. 2, pp. 133–191, 1997.
- [34] A. K. Jones, G. Elgar, y D. B. Sattelle. **The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the pufferfish, *Fugu rubripes***. *Genomics*, vol. 82, no. 4, pp. 441–451, 2003.
- [35] R. L. Papke, F. Ono, C. Stokes, J. M. Urban, y R. T. Boyd. **The nicotinic acetylcholine receptors of zebrafish and an evaluation of pharmacological tools used for their study**. *Biochem. Pharmacol.*, vol. 84, no. 3, pp. 352–365, 2012.
- [36] G. A. Toledo-Ibarra, K. J. G. Díaz-Resendiz, L. Pavón, y M. I. Giron-Perez. **Cholinergic activity in mononuclear cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish**. *Adv. Neuroimmune Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 229–234, 2014.
- [37] S. Boltaña, S. Rey, N. Roher, R. Vargas, M. Huerta, F. Anne, F. W. Goetz, J. Moore, P. Garcia-valtanen, A. Estepa, S. Boltan, F. A. Huntingford, y S. Mackenzie. **Behavioural fever is a synergic signal amplifying the innate immune response**. *Proc. Biol. Sci.* vol. 280, pp. 1766, 2013.
- [38] D. G. Drescher, N. a Ramakrishnan, M. J. Drescher, W. Chun, X. Wang, S. F. Myers, G. E. Green, K. Sadrazodi, a a Karadaghy, N. Poopat, a N. Karpenko, K. M. Khan, y J. S. Hatfield. **Cloning and characterization of alpha9 subunits of the nicotinic acetylcholine receptor expressed**

- by saccular hair cells of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Neuroscience*, vol. 127, no. 3, pp. 737–52, 2004.
- [39] L. Geer, A. Marchler-Bauer, R. Geer, L. Han, J. He, S. He, C. Liu, W. Shi, y S. Bryant. **The NCBI BioSystems database.** *Nucleic acids Res.*, vol. 38, pp. 492–496, 2010.
- [40] The UniProt Consortium. **UniProt: a hub for protein information.** *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, pp. 204–212, 2014.
- [41] M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. Mcgettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, y D. G. Higgins. **Clustal W and Clustal X version 2.0.** *Bioinformatics*, vol. 23, no. 21, pp. 2947–2948, 2007.
- [42] I. Letunic, R. R. Copley, B. Pils, S. Pinkert, J. Schultz, y P. Bork. **SMART 5: domains in the context of genomes and networks.** *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, pp. 257–260, 2006.
- [43] R. D. Finn, A. Bateman, J. Clements, P. Coghill, R. Y. Eberhardt, S. R. Eddy, A. Heger, K. Hetherington, L. Holm, J. Mistry, E. L. L. Sonnhammer, J. Tate, y M. Punta. **Pfam: The protein families database.** *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. D1, pp. 222–230, 2014.
- [44] C. Steentoft, S. Y. Vakhrushev, H. J. Joshi, Y. Kong, M. B. Vester-Christensen, K. T.-B. G. Schjoldager, K. Lavrsen, S. Dabelsteen, N. B. Pedersen, L. Marcos-Silva, R. Gupta, E. P. Bennett, U. Mandel, S. Brunak, H. H. Wandall, S. B. Levery, y H. Clausen. **Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology.** *EMBO J.*, vol. 32, no. 10, pp. 1478–88, 2013.
- [45] N. Blom, S. Gammeltoft, y S. Brunak. **Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites.** *J. Mol. Biol.*, vol. 294, no. 5, pp. 1351–1362, 1999.
- [46] T. Petersen, B. S. G. Von Heijne, y H. Nielsen. **SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions.** *Nat. Methods*, vol. 8, pp. 785–786, 2011.
- [47] P. Artimo, M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. De Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier, E. Gasteiger, A. Grosdidier, C. Hernandez, V. Ioannidis, D. Kuznetsov, R. Liechti, S. Moretti, K. Mostaguir, N. Redaschi, G. Rossier, I. Xenarios, y H. Stockinger. **ExpASY: SIB bioinformatics resource portal.** *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. W1, pp. 597–603, 2012.
- [48] R. Bouckaert, J. Heled, D. Kühnert, T. Vaughan, C. H. Wu, D. Xie, M. A. Suchard, A. Rambaut, y A. J. Drummond. **BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis.** *PLoS Comput. Biol.*, vol. 10, no. 4, pp. 1–6, 2014.
- [49] A. Stamatakis. **RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies.** *Bioinformatics*, vol. 30, no. 9, pp. 1312–1313, 2014.
- [50] P. N. A. G. Research. **NRSP-8 Bioinformatics Coordination Program.** [Online]. Available: <http://www.animalgenome.org/>, 2013
- [51] Y. Palti, C. Genet, G. Gao, Y. Hu, F. M. You, M. Boussaha, C. E. Rexroad, y M. C. Luo. **A Second Generation Integrated Map of the Rainbow**

- Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Genome: Analysis of Conserved Synteny with Model Fish Genomes.** *Mar. Biotechnol.*, vol. 14, no. 3, pp. 343–357, 2012.
- [52] S. J. Wheelan, D. M. Church, y J. M. Ostell. **Spidey: A tool for mRNA-to-genomic alignments.** *Genome Res.*, vol. 11, no. 11, pp. 1952–1957, 2001.
- [53] M. Reese, F. Eeckman, D. Kulp, y D. Haussler. **Improved Splice Site Detection in Genie.** *J. Comp. Biol.*, vol. 4, no. 3, pp. 311–323, 1997.
- [54] S. M. Hebsgaard, P. G. Korning, N. Tolstrup, J. Engelbrecht, P. Rouze, y S. Brunak. **Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information.** *Nucleic Acids Res.*, vol. 24, no. 17, pp. 3439–3452, 1996.
- [55] J. Sambrook, E. Fritsch, y T. Maniatis. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989.
- [56] N. Roher, A. Callol, J. V Planas, F. W. Goetz, y S. A. MacKenzie. **Endotoxin recognition in fish results in inflammatory cytokine secretion not gene expression.** *Innate Immun.*, vol. 17, no. 1, pp. 16–28, 2011.
- [57] K. J. Livak y T. D. Schmittgen. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [58] Ensembl. ***Gallus gallus*, gene CHRNA7.** Ensembl [online], http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG00000004096;r=10:6156717-6199170;t=ENSGALT00000006519, 2013.
- [59] Ensemble. ***Danio rerio*, gene CHRNA7.** Ensembl [online], http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Transcript/Summary?db=core;g=ENSDARG00000101702;r=7:53371605-53400001;t=ENSDART00000171463, 2013.
- [60] Ensembl. ***Takifugu rubripes*, gene CHRNA7.** Ensemble [online], http://www.ensembl.org/Takifugu_rubripes/Gene/Summary?db=core;g=ENSTRUG00000016472;r=scaffold_1:2525614-2531987, 2013.
- [61] M. Rosas-Ballina, P. S. Olofsson, M. Ochani, S. I. Valdés-Ferrer, Y. A. Levine, C. Reardon, M. W. Tusche, V. A. Pavlov, U. Andersson, S. Chavan, T. W. Mak, y K. J. Tracey. **Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit.** *Science*, vol. 334, no. 6052, pp. 98–101, 2011.
- [62] C. J. Secombes y T. C. Fletcher. **The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish.** *Annu. Rev. Fish Dis.*, vol. 2, no. C, pp. 53–71, 1992.
- [63] M. A. S. Khan, M. Farkhondeh, J. Crombie, L. Jacobson, M. Kaneki, y J. A. J. Martyn. **Lipopolysaccharide Upregulates $\alpha 7$ Acetylcholine Receptors.** *Shock*, vol. 38, no. 2, pp. 213–219, 2012.
- [64] P. J. Corrienger, L. N. Novere, y J. P. Changeux. **Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level.** *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 40, pp. 431–458, 2000.

- [65] S. M. Sine y A. G. Engel. **Recent advances in Cys-loop receptor structure and function.** *Nature*, vol. 440, no. 7083, pp. 448–455, 2006.
- [66] S. M. Sine. **The nicotinic receptor ligand binding domain.** *J. Neurobiol.*, vol. 53, no. 4, pp. 431–446, 2002.
- [67] S. Huang, S. X. Li, N. Bren, K. Cheng, R. Gomoto, L. Chen, y S. M. Sine. **Complex between α -bungarotoxin and an $\alpha 7$ nicotinic receptor ligand-binding domain chimaera.** *Biochem. J.*, vol. 454, no. 2, pp. 303–10, 2013.
- [68] S. M. Sine, H. Sun, S. X. Li, da C. Corrie, y C. Lin. **Inter-residue coupling contributes to high affinity, subtype selective binding of α -bungarotoxin to nicotinic receptors.** *Biochem. J.*, vol. 454, no. 2, pp. 311–321, 2013.
- [69] F. Castelán, J. Mulet, M. Aldea, S. Sala, F. Sala, y M. Criado. **Cytoplasmic regions adjacent to the M3 and M4 transmembrane segments influence expression and function of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. A study with single amino acid mutants.** *J. Neurochem.*, vol. 100, no. 2, pp. 406–415, 2007.
- [70] J. Mukherjee, A. Kuryatov, S. J. Moss, J. M. Lindstrom, y R. Anand. **Mutations of cytosolic loop residues impair assembly and maturation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors.** *J. Neurochem.*, vol. 110, no. 6, pp. 1885–1894, 2009.
- [71] J. Lindstrom. **Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease.** *Mol. Neurobiol.*, vol. 15, no. 2, pp. 193–222, 1997.
- [72] E. P. van der Zanden, S. A. Snoek, S. E. Heinsbroek, O. I. Stanisor, C. Verseijden, G. E. Boeckxstaens, M. P. Peppelenbosch, D. R. Greaves, S. Gordon, y W. J. De Jonge. **Vagus Nerve Activity Augments Intestinal Macrophage Phagocytosis via Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 4\beta 2$.** *Gastroenterology*, vol. 137, no. 3, pp. 1029–1039, 2009.
- [73] C. M. Press, B. H. Dannevig, y T. Landsverk. **Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 4, no. 2, pp. 79–93, 1994.
- [74] K. Brandon y M. Rand. **Acetylcholine and the Sympathetic Innervation of the Spleen.** *J. Physiol.*, vol. 157, pp. 18–32, 1961.
- [75] F. E. Leaders y C. Dayrit. **The Cholinergic Component in the Sympathetic Innervation to the Spleen.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 147, pp. 145–152, 1965.
- [76] M. Girón-Pérez, G. Zaitseva, J. Casas-Solis, y A. Santerre. **Effects of diazinon and diazoxon on the lymphoproliferation rate of splenocytes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): The immunosuppressive effect could involve an increase in acetylcholine levels.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 25, no. 5, pp. 517–521, 2008.
- [77] S. Neumann, M. Razen, P. Habermehl, C. U. Meyer, F. Zepp, C. J. Kirkpatrick, y I. Wessler. **The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: Effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration.** *Life Sci.*, vol. 80, no. 24–25, pp. 2361–2364, 2007.

- [78] S. MacKenzie, J. V. Planas, F. W. Goetz. **LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and *in vitro* differentiated macrophages.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 27, no. 5, pp. 393–400, 2003.
- [79] J. L. Vincent, S. M. Opal, J. C. Marshall, y K. J. Tracey. **Sepsis definitions: Time for change.** *Lancet*, vol. 381, no. 9868, pp. 774–775, 2013.
- [80] B. S. Park, D. H. Song, H. M. Kim, B. S. Choi, H. Lee, y J. O. Lee. **The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex.** *Nature*, vol. 458, no. 7242, pp. 1191–1195, 2009.
- [81] O. Takeuchi y S. Akira. **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 805–20, 2010.
- [82] M. P. Sepulcre, F. Alcaraz-Pérez, A. López-Muñoz, F. J. Roca, J. Me-seguer, M. L. Cayuela, y V. Mulero. **Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-kappaB activation.** *J. Immunol.*, vol. 182, no. 4, pp. 1836–45, 2009.
- [83] Z. Kanwal, G. F. Wiegertjes, W. J. Veneman, A. H. Meijer, and H. P. Spaink. **Comparative studies of Toll-like receptor signalling using zebrafish.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 46, no. 1, pp. 35–52, 2014.
- [84] Y. Palti. **Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 35, no. 12, pp. 1263–72, 2011.
- [85] D. B. Iliev, J. C. Roach, S. Mackenzie, J. V. Planas, y F. W. Goetz. **Endotoxin recognition: in fish or not in fish?** *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 29, pp. 6519–28, 2005.
- [86] S. A. MacKenzie, N. Roher, S. Boltaña, y F. W. Goetz. **Peptidoglycan, not endotoxin, is the key mediator of cytokine gene expression induced in rainbow trout macrophages by crude LPS.** *Mol. Immunol.*, vol. 47, no. 7–8, pp. 1450–7, 2010.
- [87] M. Matsumoto y T. Seya. **TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C).** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 7, pp. 805–12, 2008.
- [88] M. Yamamoto, S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, S. Akira, y E. Alerts. **Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN- β Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling.** *J. Immunol.*, vol. 169, pp. 6668–6672, 2002.
- [89] H. Oshiumi, M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, y T. Seya. **TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction.** *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 2, pp. 161–167, 2003.
- [90] M. Yoneyama, M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, S. Akira, S. Yonehara, A. Kato, y T. Fujita. **Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity.** *J. Immunol.*, vol. 175, no. 5, pp. 2851–2858, 2005.

- [91] M. F. Rodriguez, G. D. Wiens, M. K. Purcell, y Y. Palti. **Characterization of Toll-like receptor 3 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Immunogenetics*, vol. 57, no. 7, pp. 510–519, 2005.
- [92] M. X. Chang, W. Q. Chen, y P. Nie. **Structure and expression pattern of teleost caspase recruitment domain (CARD) containing proteins that are potentially involved in NF- κ B signalling**. *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 34, no. 1, pp. 1–13, 2010.
- [93] A. Matsuo, H. Oshiumi, T. Tsujita, H. Mitani, H. Kasai, M. Yoshimizu, M. Matsumoto, y T. Seya. **Teleost TLR22 Recognizes RNA Duplex to Induce IFN and Protect Cells from Birnaviruses**. *J. Immunol.*, vol. 181, no. 5, pp. 3474–3485, 2008.
- [94] P. E. Phelan, M. T. Mellon, y C. H. Kim. **Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*)**. *Mol. Immunol.*, vol. 42, no. 9, pp. 1057–71, 2005.
- [95] G. Strandskog, I. Skjæveland, T. Ellingsen, y J. B. Jørgensen. **Double-stranded RNA- and CpG DNA-induced immune responses in Atlantic salmon: comparison and synergies**. *Vaccine*, vol. 26, no. 36, pp. 4704–15, 2008.
- [96] J. Su, S. Jang, C. Yang, Y. Wang, y Z. Zhu. **Genomic organization and expression analysis of Toll-like receptor 3 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)**. *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 27, no. 3, pp. 433–9, 2009.
- [97] R. Franch, B. Cardazzo, J. Antonello, M. Castagnaro, T. Patarnello, y L. Bargelloni. **Full-length sequence and expression analysis of Toll-like receptor 9 in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)**. *Gene*, vol. 378, pp. 42–51, 2006.
- [98] M. Chang, B. Collet, P. Nie, K. Lester, S. Campbell, C. J. Secombes, y J. Zou. **Expression and functional characterization of the RIG-I-like receptors MDA5 and LGP2 in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *J. Virol.*, vol. 85, no. 16, pp. 8403–8412, 2011.
- [99] B. Collet. **Innate immune responses of salmonid fish to viral infections**. *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 43, no. 2, pp. 160–173, 2014.

Capítulo

2

Nanopartículas proteicas
como plataforma de entrega
de inmunoestimulantes para peces



Resumen

Actualmente, el control de enfermedades infecciosas es uno de los mayores desafíos en la acuicultura intensiva. La mayoría de las vacunas comerciales se basan en patógenos atenuados o inactivados, que normalmente se combinan con adyuvantes. Sin embargo, esta estrategia es económicamente costosa y todavía existen muchas enfermedades para las cuales no hay un tratamiento exitoso disponible. Por lo tanto, el desarrollo de medidas profilácticas rentables es altamente deseable. Hemos explorado la capacidad de las proteínas recombinantes nanoestructuradas en forma de cuerpos de inclusión de bacterias como agentes profilácticos para proteger a los peces contra infecciones bacterianas. En este contexto, el presente estudio muestra que la organización nanoestructurada de las proteínas en los cuerpos de inclusión junto con otros componentes de los mismos (como lipopolisacáridos, peptidoglicanos y ácidos nucleicos) los convierte en excelentes inmunomoduladores independientes de antígenos, capaces de proteger a peces contra una infección bacteriana. Los cuerpos de inclusión son nanopartículas de proteínas altamente estables, no tóxicas y producidas mediante procesos totalmente escalables y de bioproducción de bajo coste. Además, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que su inherente naturaleza estructural los hace excepcionalmente interesantes para fines profilácticos. Por todo ello, proponemos estas nanopartículas como una alternativa prometedora para propósitos de inmunoestimulación en acuicultura.

Introducción

La industrialización de la producción de peces ha planteado numerosos problemas derivados del proceso de explotación intensiva. Uno de los desafíos más importantes es el control de enfermedades infecciosas, que se transmiten fácilmente bajo las condiciones de cultivo intensivo, lo que conlleva importantes pérdidas económicas [1, 2]. Las actuales vacunas comerciales se fabrican a partir de patógenos vivos atenuados, patógenos inactivados, subunidades recombinantes o ácidos nucleicos [1, 3], que en algunos casos están combinados con inmunoestimulantes, adyuvantes o ambos [4]. Sin embargo, muchas infecciones de peces todavía necesitan aproximaciones exitosas en cuanto a la profilaxis y además, hay limitaciones importantes en relación al coste-efectividad de las vacunas existentes. En este contexto, sería altamente conveniente el desarrollo de nuevas plataformas de entrega de inmunoestimulantes capaces de pro-

teger diferentes especies de peces de un extenso grupo de enfermedades infecciosas. Una gran diversidad de materiales y biomateriales están bajo investigación como inmunomoduladores transversales independientes de antígenos, esencialmente polímeros biodegradables y formulaciones de lípidos como micelas, emulsiones, nanopartículas mecánicamente estables, hidrogeles y diferentes tipos de matrices [5–7]. Como en el caso de otros nanomateriales, para ser usados como interfaces biológicas, la toxicidad es el principal problema en el desarrollo de inmunomoduladores [7].

En este estudio, hemos explorado y caracterizado cuerpos de inclusión (CI) bacterianos como una plataforma profiláctica de entrega de inmunoestimulantes para peces. Los CI son materiales particulados de proteína, mecánicamente estables [8], que pueden servir como un sistema no tóxico de entrega de drogas [9–13]. Los CI contienen diferentes componentes bacterianos tales como, fragmentos de membranas, proteínas unidas a membrana, ácidos nucleicos, fragmentos de pared celular y en consecuencia lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos (PGN) [14–16]. Es destacable que el LPS mejora la respuesta no específica en peces y actúa como un potenciador inmunológico contra varios patógenos [17–19]. El LPS o endotoxina es particularmente importante, ya que puede provocar un shock séptico en humanos, siendo todavía uno de los problemas más importantes en medicina de cuidados intensivos [20]. El receptor tipo Toll 4 (*Toll like receptor 4*, TLR4) de mamíferos es la proteína central del complejo receptor de LPS y TLR4, que junto con MD2 y CD14, puede detectar hasta picogramos de LPS y activar diferentes vías que conducen a la expresión de moléculas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) o la interleuquina 1 beta (IL-1 β), con el objetivo final de eliminar la infección bacteriana [21]. El TLR4 es también el receptor de LPS en aves [22], reptiles (GeneBank; secuencias inéditas) y anfibios [23]. En peces, el escenario es muy diferente, ya que estos son sensibles al LPS pero su nivel de sensibilidad es fundamentalmente diferente (picogramos o nanogramos en mamíferos frente a microgramos en peces). Debido a esta diferencia en la sensibilidad, los peces son altamente resistentes al shock séptico mediado por endotoxina. Además, el LPS mejora la respuesta no específica en peces y actúa como un potenciador de la respuesta inmune contra varios patógenos [18, 19, 24–26]. A destacar que es posible obtener un efecto protector utilizando el LPS extraído de la misma bacteria con la que se desafía a los peces, a partir de una especie de bacteria diferente o de un no patógeno de peces como, por ejemplo, *Escherichia coli* [27, 25]. Además, del LPS, otros componentes presentes en los CI purificados como

el PGN y los ácidos nucleicos han sido descritos como fuertes estimuladores del sistema inmune de peces [4, 26, 28–32].

La resistencia de los peces al LPS, junto con las propiedades inmunoestimulantes y la presencia de múltiples componentes purificados en conjunto con los CI, nos llevan a la hipótesis de que estos podrían ser utilizados como una plataforma de entrega de inmunoestimulantes para peces. Como otros materiales de origen bacteriano, los CI son producidos por procesos totalmente escalables, de biofabricación rentable, y con parámetros fisicoquímicos que son totalmente moldeables [8, 15]. Estas características señalan a los CI como un material altamente versátil, con un potencial inesperado para fines profilácticos, el cual proponemos como una plataforma de entrega de inmunoestimulantes en peces.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo fueron *E. coli* K12 derivados de JGT4 (ClpA; *clpA::kan*, *araD139 (argF-lac)* U169 *rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 Rbs^R, Sm^R*) [33], conocido como ClpA⁻ y la cepa libre de endotoxinas KPM335 (*msbA52, ΔgutQ, ΔkdsD, ΔlpxL, ΔlpxM, ΔpagP, ΔlpxP, ΔeptA, frr181*) [34]. Estas cepas fueron transformadas con el vector pTrc99a-VP1GFP (Ap^R) (GenBank, número de acceso: KM242650) para la producción del CI VP1GFP (VP1GFP^{CI}). El VP1GFP es una proteína modular que contiene la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) fusionada con la proteína VP1 de la cápside del virus de la fiebre aftosa. Adicionalmente, *E. coli* BL21(DE3) (F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lon λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gen 1 ind1 sam7 nin5])*) (Novagen) fue transformada con pET22b-iRFP-H6 (Ap^R) para la producción del CI iRFP-H6 (iRFP-H6^{CI}). El iRFP-H6 es una proteína fluorescente en el infrarrojo (*infraRed fluorescent protein*, iRFP) fusionada a una cola de histidinas (6xHis).

Producción y purificación de cuerpos de inclusión

Las cepas de *E. coli* con los vectores de expresión de proteínas se cultivaron en medio LB suplementado con antibióticos (100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina). Los cultivos se iniciaron a una densidad óptica a 550 nm (OD₅₅₀) de 0,05 y se incubaron aeróbicamente a 37 °C (250 rpm) hasta alcanzar una OD₅₅₀ de 0,5. Posteriormente, se añadió isopropil-D-tiogalactopiranosido

(IPTG) a 1 mM y se indujo la expresión de proteínas durante 3 h. Para la purificación de los CI los cultivos bacterianos fueron procesados a través de la combinación de disrupción enzimática y mecánica (**Figura 1**). Primero, se añadió lisozima (1 µg/ml) y fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF, 0,4 mM) y se incubaron durante 2 h a 37 °C y 250 rpm. Posteriormente, las células fueron congeladas y descongeladas, se añadió Tritón X-100 (0,2 % (v/v)) y se incubaron durante 1 h bajo agitación suave a temperatura ambiente. Los CI fueron recuperados por centrifugación y suspendidos en tampón de lisis (50 mM de Tris HCl pH 8, 100 mM de NaCl y 1mM de EDTA) usando una décima parte del volumen original del cultivo. A continuación, las muestras se trataron con ADNasa a 0,6 µg/ml, 1 h a 37 °C bajo agitación. Se llevaron a cabo ciclos de congelación/descongelación hasta que no se detectaron bacterias viables. Las muestras fueron centrifugadas a 15000 *xg* durante a -80 °C hasta su uso. Se realizaron dos controles de esterilidad, en el primero se cultivaron los CI en placas de LB sin antibióticos durante 12 h, y en el segundo se cultivaron los CI en DMEM suplementado con suero bovino fetal (*fetal bovine serum*, FBS) sin antibióticos durante 5 días, para determinar que no quedaban bacterias viables en la producción. Los CI fueron semicuantificados mediante densitometría de Western Blot (software ImageJ v1.5, National Institute of Health) utilizando anticuerpos anti-GFP y anti-RFP (Santa Cruz) y la concentración de proteínas fueron inferidas a partir de curvas estándar de proteínas recombinantes.

Caracterización estructural de los cuerpos de inclusión

Los VP1GFP^{CI} producidos en ClpA⁻ (VP1GFP (ClpA⁻)^{CI}), VP1GFP producido en KPM335 (VP1GFP (KPM335)^{CI}) y iRFP-H6^{CI} producido en BL21(DE3) (iRFP-H6 (BL21(DE3))^{CI}) fueron suspendidos en agua desionizada a una concentración final de 1 µg/ml. Veinte microlitros de estas suspensiones fueron incubados en chips de silicio durante 2 min a temperatura ambiente. Posterior a la incubación, se eliminó el exceso de agua y las muestras se secaron al aire durante la noche antes de la observación en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (*field emission scanning electron microscopy*, FESEM, Zeiss Merlin). Las imágenes obtenidas en FESEM fueron procesadas usando el software de análisis de imágenes ImageJ v1.5. Las medidas del diámetro de al menos 105 partículas por muestra fueron analizadas, y se realizaron gráficos de distribución con el software Past3 v3.03 (University of Oslo).

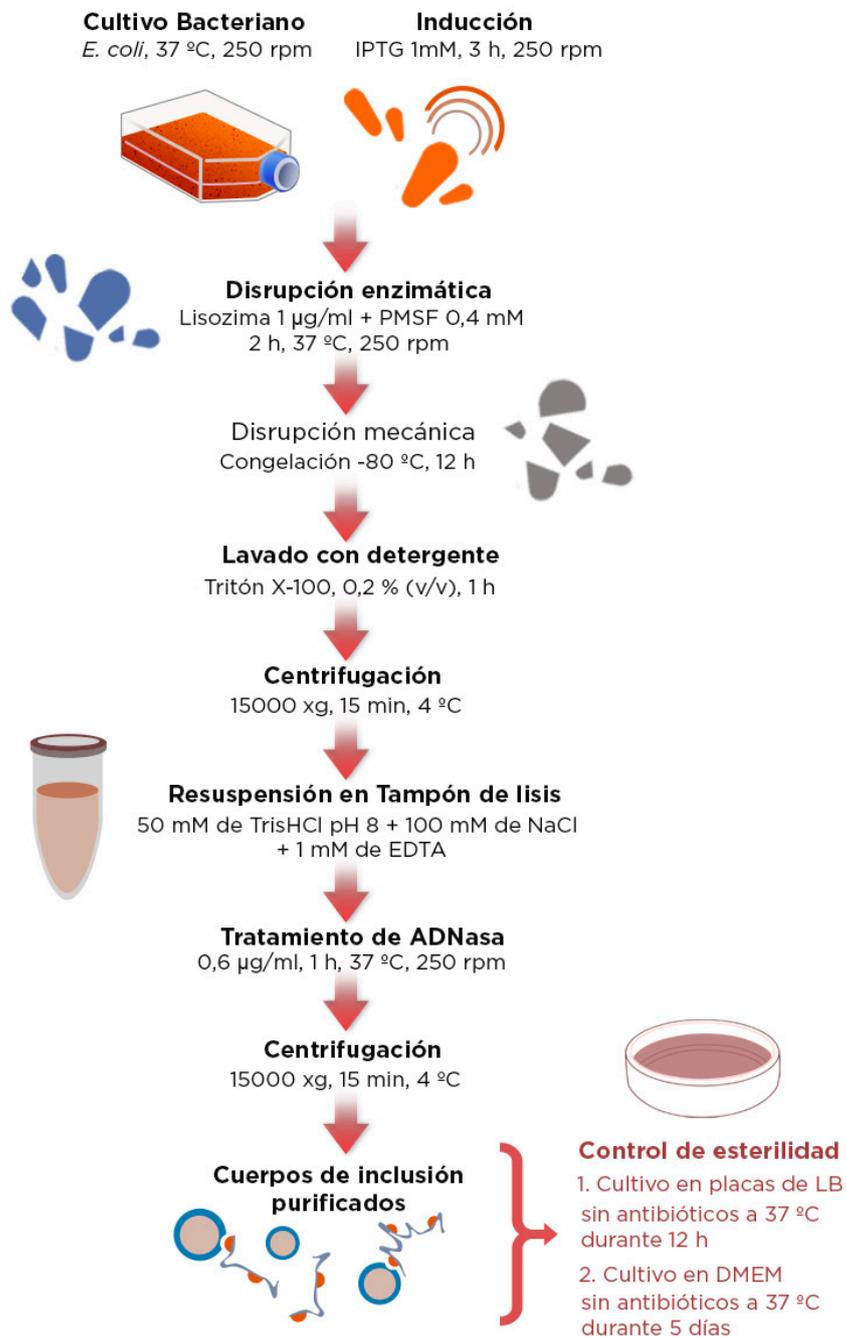


Figura 1. Esquema de producción y purificación de cuerpos de inclusión.

Cultivo celular

Las células de hígado de pez cebra (*zebrafish liver cells*, ZFL, CRL-2643, ATCC) fueron cultivadas a 28 °C en un ambiente humidificado con un 5 % de CO₂ en DMEM 4,5 g/l de glucosa, 0,01 mg/ml de insulina, 50 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF), 5 % (v/v) de antibiótico/antimicótico, 10 % (v/v) de FBS inactivado por calor y 0,5 % (v/v) de suero de trucha arcoíris inactivado por calor [26]. Los macrófagos de trucha arcoíris (*head kidney macrophages*, HKM) fueron obtenidos de riñón anterior como se ha descrito anteriormente [30] y cultivados en DMEM 4,5 g/l de glucosa suplementado con FBS al 10 % con 50 µg/ml de Primocin (Invivogen) a 16 °C y 5 % de CO₂. Los macrófagos completamente diferenciados a día 5 fueron usados para los experimentos de endocitosis y expresión génica.

Endocitosis de VP1GFP (ClpA)^{CI} por ZFL y HKM

Los VP1GFP (ClpA)^{CI} endocitados por ZFL y HKM fueron analizados por citometría de flujo y microscopía confocal. Para los ensayos de dosis respuesta de endocitosis las células ZFL y HKM fueron cultivadas en placas de 24 pocillos e incubadas con VP1GFP (ClpA)^{CI} a diferentes dosis (2, 4, 10 y 40 µg/ml) durante 24 h. En el caso de los ensayos de dinámica temporal de endocitosis, las células fueron tratadas con 20 µg/ml de VP1GFP (ClpA)^{CI} a los tiempos indicados (ZFL: 2, 4, 8, 16 y 24 h; HKM: 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 h). Después de la incubación, el medio fue eliminado y las células fueron lavadas con tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) para eliminar los CI unidos a la membrana. Cada muestra fue tratada con 1 mg/ml de Tripsina (Gybc) durante 15 min para descartar los CI unidos externamente a las células y seguidamente se centrifugó a 300 *xg* durante 5 min. Las células precipitadas fueron suspendidas en 200 µl de PBS y analizadas en el citómetro FACS-Canto (Becton Dickinson). Ambos experimentos fueron repetidos 4 veces de forma independiente y se analizaron 10000 eventos en cada uno. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey (software GraphPad Prism v5). Para el microscopio confocal, las células ZFL y HKM fueron cultivadas en placas individuales al 60 % de confluencia e incubadas con 20 µg/ml de VP1GFP (ClpA)^{CI} durante 24 h. Después de tres lavados con PBS, los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342 (10 µg/ml) y las membranas con CellMask (5 µg/ml). Las muestras fueron observadas en un microscopio Zeiss LSM 700 y el análisis de las imágenes fue realizado con el software Imaris v8.1 (Bitplane AG).

Análisis de la expresión génica

Se analizaron los efectos de iRFP-H6^{CI} y de LPS (Sigma) en la expresión génica de los macrófagos de trucha arcoíris mediante Q-PCR. Las células HKM fueron cultivadas en placas de 6 pocillos al 80 % de confluencia y estimuladas con 10 µg/ml de iRFP-H6 (BL21(DE3))^{CI} o 10 µg/ml de LPS durante 12 h. El ARN total fue extraído usando TriReagent (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante, la concentración y calidad del ARN se evaluaron utilizando el Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y el Bioanalyser-2100 con el kit ARN 6000 Nano (Agilent Technologies), respectivamente. La síntesis de ADNc fue realizada con 1 µg de ARN total usando SuperScript III (Invitrogen) y el cebador oligo-dT₁₅ (Promega). La Q-PCR fue llevada a cabo empleando SYBR Green I PCR Supermix (Bio-Rad), 250 nM de cebadores y 2,5 µl de ADNc previamente diluido (1:50 para el ARNm diana y 1:500 para el gen de referencia) en un volumen final de 10 µl. Los cebadores incluidos en este estudio se mencionan en la **Tabla 1 (Ver Anexo 2)**. El factor de elongación 1 alfa (EF1α) fue utilizado como gen de referencia y la cuantificación fue realizada de acuerdo al método de Livak [35]. El experimento fue repetido tres veces y todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados fueron analizados usando ANOVA de una vía seguido del test de Tukey (GraphPad).

Detección de LPS por HEK-Blue

Los ensayos de detección de LPS se llevaron a cabo con células HEK-Blue™ hTLR4 de acuerdo con las especificaciones del proveedor (InvivoGen), se realizaron diez diluciones seriadas de VP1GFP (ClpA)^{CI}, VP1GFP (KPM335)^{CI} e iRFP-H6 (BL21(DE3))^{CI}. La estimulación de estas células induce la producción de NF-κB y la proteína activadora-1 (*activator protein 1*, AP-1) indicador dependiente de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (*secreted embryonic alkaline phosphatase*, SEAP). El NF-κB dependiente de la actividad de SEAP fue determinado mediante la lectura de absorbancia a 655 nm seguido de una incubación de las muestras a 37 °C durante 3 h en presencia del sustrato QUANTI-Blue. Las células HEK-Blue Null2, la línea parenteral de las células HEK-Blue hTLR4 que carecen del complejo receptor hTLR4/MD-2, fueron utilizadas como control en todos los ensayos de activación de hTLR4/MD-2.

Análisis del contenido total de lípidos

El contenido total de lípidos de los CI fue analizado siguiendo el procedimiento descrito por Izard & Limberger [36]. Brevemente, 1 mg de CI fue liofilizado, seguidamente se añadió 200 µl de cloroformo y se dejó evaporar. Se agregaron 2 ml de ácido sulfúrico 18 M, seguido de una incubación de 10 min en un baño

de agua hirviendo. Una vez que las muestras se enfriaron, se adicionaron 5 ml de ácido fosfórico-vanillina (0,12 g vanillina en 100 ml de ácido fosfórico al 85 %) y se incubaron a 37 °C durante 15 min. Se midió la absorbancia a 530 nm y las muestras fueron cuantificadas al inferir la cantidad total de lípidos con una curva estándar de trioleína. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Animales

Peces cebra *wild type* adultos (*Danio rerio*) fueron mantenidos en sistemas de recirculación de agua dulce bajo un fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad a 28 ± 0,5 °C. Todos los procedimientos experimentales fueron presentados al Comité de Ética de la Universitat Autònoma de Barcelona (Número de referencia 1555) que trabaja siguiendo las líneas y los Principios Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales (EU 2010/63).

Desafío con *Pseudomonas aeruginosa* en pez cebra después de la administración de cuerpos de inclusión

Los peces cebra (0,53 ± 0,07 g de peso corporal) se colocaron en tanques pequeños un día antes de los experimentos. *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1, sub-línea MPAO1; obtenido de la librería de mutantes de Seattle PAO1 (Biblioteca de Transposones Mutantes, University of Washington) se cultivó como previamente se ha descrito [26]. Para la inyección de los CI (VP1GFP (KPM335)^{CI}, VP1GFP (ClpA-)^{CI} e iRFP-H6^{CI} (BL21(DE3))^{CI}) y de PAO1, los peces fueron anestesiados con metasulfato de triclaína a 166 ppm (MS-222, Sigma) e inyectados intraperitonealmente (i.p.) con 20 µl de CI o PBS estéril como control. A los 7 días después de la inyección, los peces fueron desafiados por inyección i.p. con 20 µl de PAO1 (LD₅₀) en suspensión y su supervivencia fue seguida durante los siguientes 7 días. Las curvas de supervivencia fueron analizadas usando el método de Kaplan–Meier y las diferencias estadísticas fueron evaluadas usando la prueba Log-rank (GraphPad). El porcentaje relativo de supervivencia (*relative percentage of survival*, RPS) fue calculado de acuerdo a $RPS (\%) = [(1 - \text{mortalidad del grupo tratado}) / \text{mortalidad del grupo control}] \times 100$.

Resultados

Purificación y caracterización de los cuerpos de inclusión

Los CI bacterianos se produjeron exitosamente en *E. coli* y se purificaron mediante una combinación de métodos mecánicos y enzimáticos. Como se muestra en la **Figura 2A** la apariencia de las nanopartículas varía en función de la proteína y la cepa bacteriana empleada para la producción. El iRFP-H6^{CI} aparece como una partícula esférica mientras que VP1GFP^{CI} exhibió sobre todo en el caso de las nanopartículas producidas en la cepa KPM335, formas muy irregulares. Con respecto a la distribución de los tamaños, los CI resultaron ser partículas polidispersas que van desde 100 hasta 800 nm de diámetro. Sin embargo, se puede observar claramente un tamaño mayoritario de 300 a 400 nm, 400 a 500 nm y 500 a 600 nm de diámetro para VP1GFP (KPM335)^{CI}, VP1GFP (ClpA-)^{CI} e iRFP-H6^{CI} (BL21(DE3))^{CI} respectivamente (**Figura 2A**).

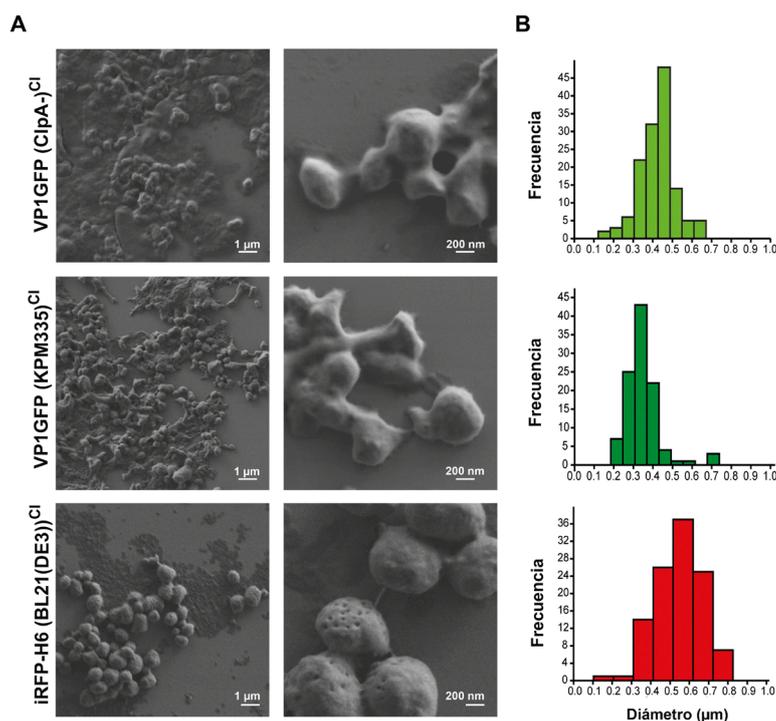
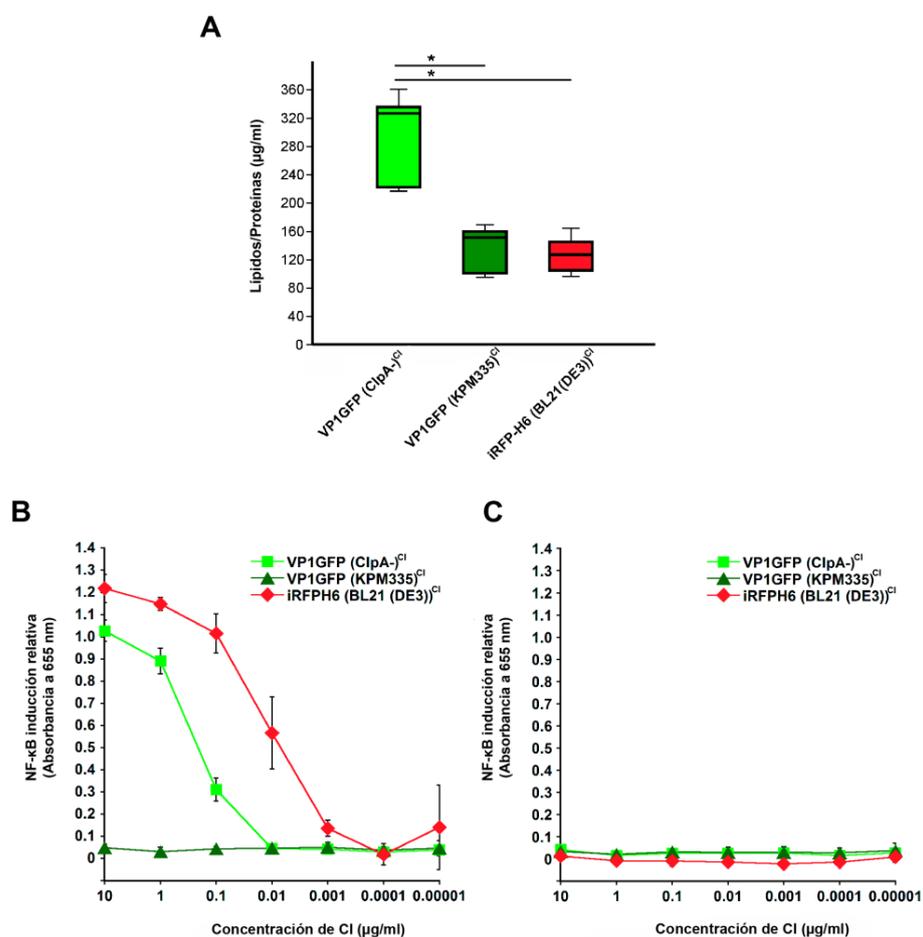


Figura 2. Caracterización de los cuerpos de inclusión.

A) Imágenes de FESEM y B) distribución de tamaño de VP1GFP (ClpA-)^{CI}, VP1GFP (KPM335)^{CI} e iRFP-H6 (BL21(DE3))^{CI}.

En este sentido, la naturaleza de las proteínas, así como el fondo genético de las células productoras tienen una incidencia significativa en el tamaño final de los CI.

Por otra parte, el análisis de las imágenes de FESEM revela diferencias en la cantidad de restos celulares asociados a los CI, que muy probablemente sean remanentes de membranas celulares bacterianas. Las nanopartículas producidas en las cepas de *E. coli* carentes de ClpA parece que presentan mayores cantidades de restos celulares purificados junto con las nanopartículas de proteínas (**Figura 2A**). Esta observación está en concordancia con los valores obtenidos de la cuantificación de lípidos totales de los CI purificados, siendo VP1GFP (ClpA)⁻CI los que muestran la mayor proporción de lípidos/proteínas (**Figura 3A**).



Endocitosis de VP1GFP (ClpA)^{CI} por células de pez cebra y trucha arcoíris

Una de las principales características de los CI es su capacidad para penetrar membranas celulares en células de mamíferos [9]. Para explorar la interacción de los CI con células de peces, se evaluó la endocitosis de los VP1GFP (ClpA)^{CI} por las células ZFL. Los resultados muestran que las células ZFL fueron capaces de endocitar VP1GFP (ClpA)^{CI} además, los CI no causan toxicidad en estas células (**Figura 4**), como ha sido previamente descrito en líneas celulares de mamíferos [9, 10].

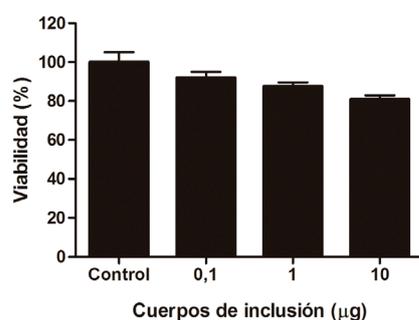


Figura 4. **Viabilidad de las células ZFL incubadas con VP1GFP (ClpA)^{CI}**

Número de células ZFL viables después de una incubación con 0,1, 1 y 10 µg de VP1GFP (ClpA)^{CI} durante 24 h. Las células controles sin CI se ajustan a un 100 % de viabilidad celular.

Figura 3 (página anterior). **Cuantificación de lípidos y curvas de dosis respuesta de la inducción de NF-κB por cuerpos de inclusión.**

A) Cuantificación de lípidos totales en CI, las diferencias significativas fueron analizadas utilizando la prueba t de Student, *, p<0,01. Los CI producidos en cepas de *E. coli* con diferentes quimiotipos de LPS fueron analizados con HEK-Blue hTLR4, B) y células Null2 C) para la inducción relativa de NF-κB por determinación colorimétrica de NF-κB dependiente de la actividad de SEAP. La inducción relativa de NF-κB fue medida siguiendo la estimulación de HEK-Blue hTLR4 y células Null2 con diez diluciones seriadas de los CI. Los valores representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos individuales. Los CI muestran una estimulación insignificante de la línea celular parenteral HEK-Blue Null2, C) lo que indica que la expresión de NF-κB dependiente de SEAP se indujo específicamente a través de la vía de señalización de hTLR4/MD-2 en células HEK-Blue hTLR4.

Los ensayos de dosis respuesta indican que VP1GFP (ClpA)^{CI} fueron significativamente endocitadas por las células ZFL en todas las concentraciones analizadas (p. ej., $14 \pm 1,35$ % de células positivas a $2 \mu\text{g/ml}$ y $35 \pm 4,9$ % de células positivas a $40 \mu\text{g/ml}$) (**Figura 5A**). La dinámica temporal muestra que los VP1GFP (ClpA)^{CI} comenzaron a ser endocitados por ZFL de forma rápida ($10 \pm 1,87$ % a las 2 h posterior a la incubación) y después de 24 h la mitad de las células habían internalizado CI ($48 \pm 5,9$ % a las 24 h) (**Figura 5B**).

Para explorar la interacción de los CI con fagocitos profesionales como, los macrófagos, se evaluó la endocitosis de VP1GFP (ClpA)^{CI} por macrófagos de trucha arcoíris (HKM) (**Figura 6**). Los resultados mostraron que los macrófagos de trucha fueron capaces de endocitar VP1GFP (ClpA)^{CI} aún de manera más eficiente que las células ZFL, ya que a $40 \mu\text{g/ml}$ cerca del 70 % de los macrófagos de trucha fueron positivos para la endocitosis de los CI ($72,17 \pm 3,08$ %) (**Figura 6A**). También observamos que los VP1GFP (ClpA)^{CI} comenzaron a ser endocitados por las células HKM más rápido que por las células ZFL ($30,3 \pm 6,99$ % a 0,5 h) y después de 24 h alrededor del 80 % de las células fueron positivas ($78,67 \pm 2,23$ % a 24 h) (**Figura 5B y 6B**). Las imágenes de microscopía confocal y reconstrucción 3D permitieron la visualización de aglomerados de VP1GFP (ClpA)^{CI} en el citosol de las células de ZFL y HKM (**Figura 5C y Figura 6C**). Las imágenes demuestran la completa internalización de los CI en ZFL y en HKM (**Figura 5C y Figura 6C (i - iv)**).

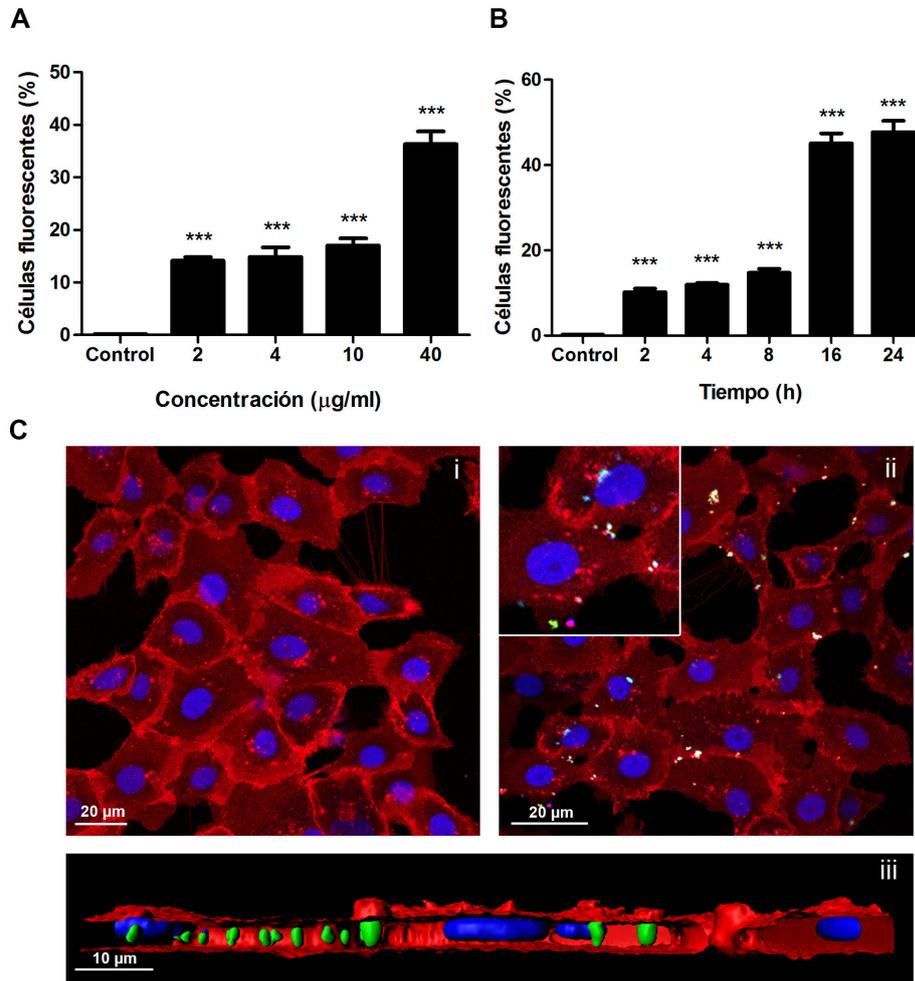


Figura 5. Endocitosis de VP1GFP (ClpA)^{CI} por células ZFL

A) Dosis respuesta. Las células fueron incubadas con 2 a 40 µg/ml de VP1GFP (ClpA)^{CI} durante 24 h. **B)** Dinámica temporal. Las células fueron incubadas con 20 µg/ml de VP1GFP (ClpA)^{CI} durante 2, 4, 8, 16 y 24 h. Los valores representan el promedio y la desviación estándar (n = 4). Las diferencias fueron analizadas con ANOVA de una vía y después con el test de Tukey. Las diferencias significativas fueron evaluadas respecto al control: ***, p<0,0001. **C)** Imágenes de microscopía confocal de VP1GFP (ClpA)^{CI} endocitadas por células ZFL (verde). Las células fueron incubadas durante 24 h con 20 µg/ml de VP1GFP (ClpA)^{CI}. CellMask (rojo) fue usado para la tinción de la membrana plasmática y Hoechst (azul) para la tinción de los núcleos. **(i)** Células control, **(ii)** células ZFL estimuladas con VP1GFP (ClpA)^{CI} durante 24 h, **(iii)** reconstrucción 3D de VP1GFP (ClpA)^{CI} endocitadas por células ZFL.

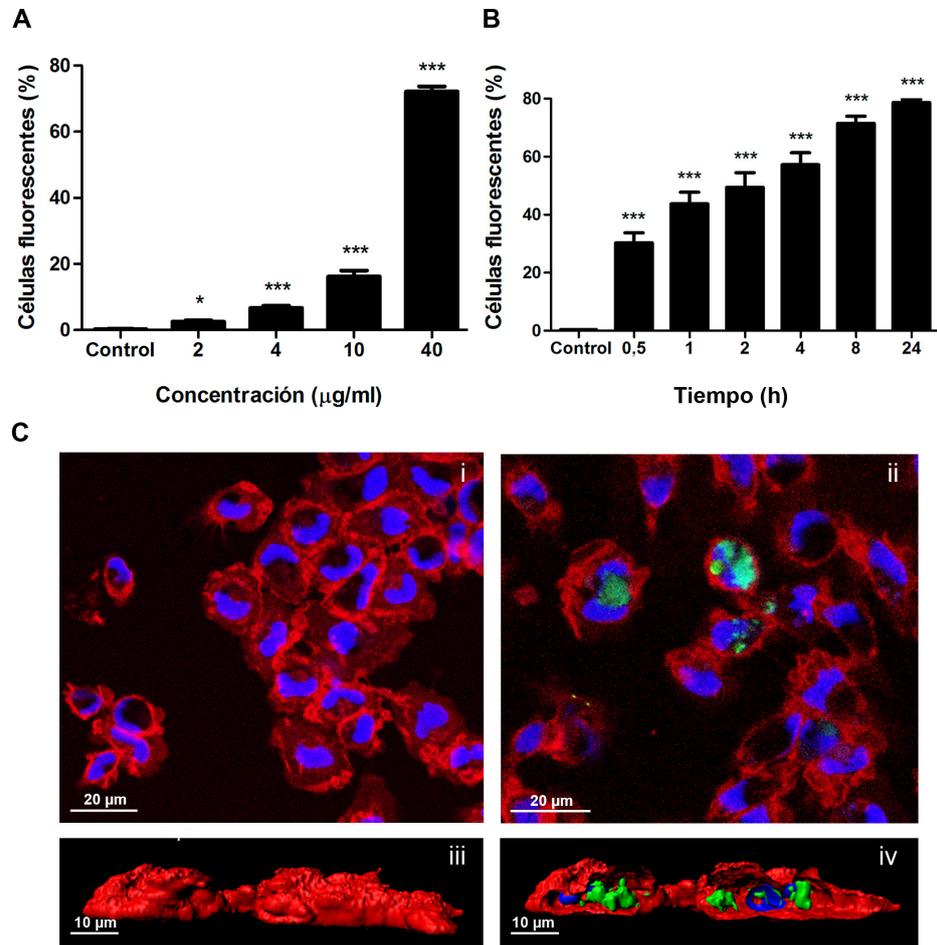


Figura 6. Endocitosis de VP1GFP (ClpA)^{CI} por células HKM

A) Dosis respuesta. Las células fueron incubadas con 2 a 40 µg/ml de VP1GFP (ClpA)^{CI} durante 24 h. **B)** Dinámica temporal. Las células fueron incubadas con 20 µg/ml de VP1GFP (ClpA)^{CI} durante 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 h. Los valores representan el promedio y la desviación estándar (n = 4). Las diferencias fueron analizadas con ANOVA de una vía y después con el test de Tukey. Las diferencias significativas fueron evaluadas respecto al control: ***, p<0,0001. **C)** Imágenes de microscopía confocal de VP1GFP (ClpA)^{CI} endocitadas por células HKM (verde). Las células fueron incubadas durante 24 h con 20 µg/ml de VP1GFP (ClpA)^{CI}. CellMask (rojo) fue usado para la tinción de la membrana plasmática y Hoechst (azul) para la tinción del núcleo. **(i)** Células control, **(ii)** células HKM estimuladas con VP1GFP (ClpA)^{CI} durante 24 h, **(iii)** membrana completa, **(iv)** reconstrucción 3D de VP1GFP (ClpA)^{CI} endocitadas por células HKM.

VP1GFP^{Cl} producido en cepas de *E. coli* con LPS y libres de LPS protegen al pez cebra contra un desafío letal de *P. aeruginosa*

A continuación, para evaluar si los CI son capaces de conferir protección contra una infección letal *in vivo*, utilizamos un modelo de infección bacteriana en pez cebra con *P. aeruginosa* (PAO1) como agente infeccioso [26]. Los animales fueron inyectados i.p. con diferentes dosis de VP1GFP (ClpA⁻)^{Cl} y posteriormente fueron desafiados con PAO1 en LD₅₀. Los resultados mostraron una mayor tasa de supervivencia en los peces cebra tratados con diferentes dosis de VP1GFP (ClpA⁻)^{Cl} (RPS de 76 % a 300 µg, 79 % a 150 µg y 67 % a 75 µg) (**Figura 7**).

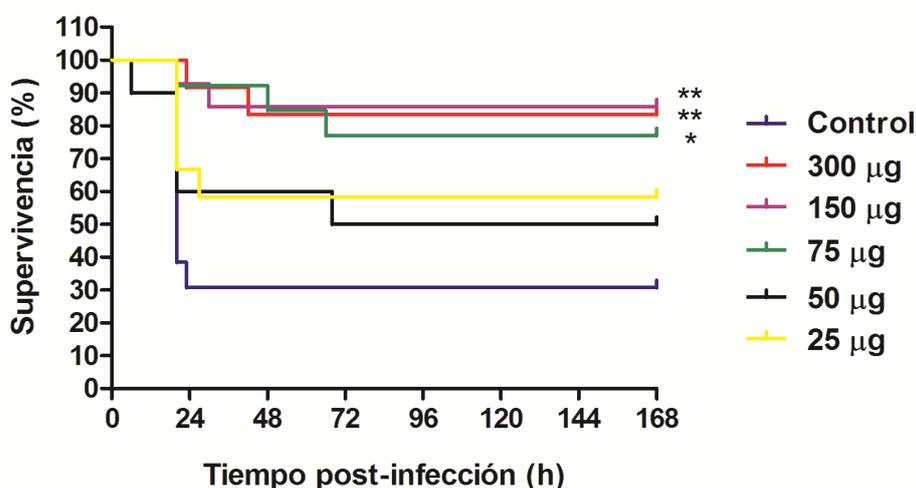


Figura 7. Supervivencia del pez cebra después de una inyección i.p. de VP1GFP (ClpA⁻)^{Cl} y posterior desafío con *P. aeruginosa*.

El pez cebra fue inyectado i.p. con VP1GFP (ClpA⁻)^{Cl} a diferentes dosis (300, 150, 75, 50 y 25 µg/pez) y desafiado con *P. aeruginosa* PAO1 (LD₅₀) (4,3x10⁷ ufc/dosis) (n = 13). Peces no tratados fueron inyectados con PAO1 (LD₅₀) y usados como control de mortalidad. Las diferencias significativas fueron analizadas mediante el test de

Log-rank: **, p<0,01; *, p<0,05.

Después de establecer la protección óptima alcanzada por VP1GFP (ClpA⁻)^{Cl}, y desde nuestra hipótesis de trabajo de usar los CI como una plataforma de entrega de inmunoestimulantes, decidimos analizar si la protección se relaciona con la actividad del LPS normalmente presente en los CI. Para ello, se compararon los efectos de la supervivencia en peces tratados con VP1GFP^{Cl} producidos en *E. coli* ClpA⁻ y *E. coli* KPM335. La última cepa ha sido utilizada para demostrar la síntesis de lípido IV_A como la única molécula relacionada

con LPS, que carece de actividad endotóxica en células humanas sensibles al LPS [37]. Los resultados del ensayo de HEK-blue mostraron que, como se esperaba, los CI producidos en KPM335 fueron incapaces de activar la vía de señalización hTHR4/MD-2 en el ensayo HEK-blue (**Figura 3B**). Por contra, la estimulación de la línea celular HEK-blue fue elevada cuando se utilizaron las cepas estándar de *E. coli* K12 y BL21 que contienen LPS (**Figura 3B**). A pesar de esta diferencia en la actividad endotóxica, la tasa de supervivencia de los peces inmunizados con CI de la cepa libre de LPS (VP1GFP (KPM335)^{CI}) alcanzó un RPS de un 75 %, siendo significativamente superior que el control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las tasas de supervivencia asociados a VP1GFP (ClpA⁻)^{CI} y VP1GFP (KPM335)^{CI} (**Figura 8**).

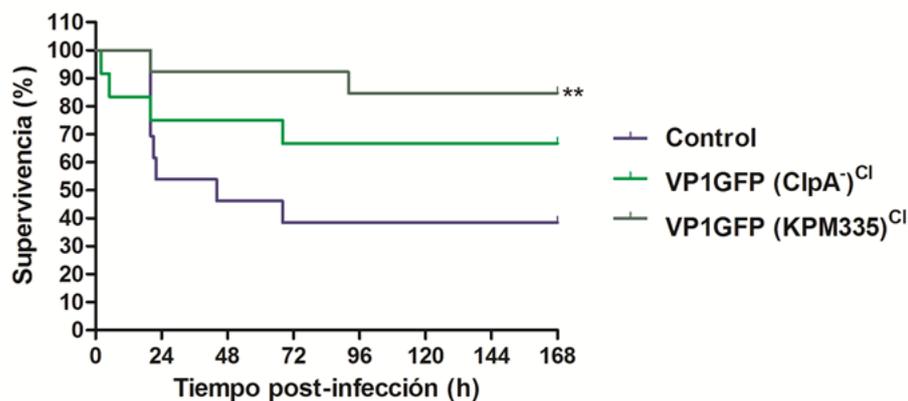


Figura 8. **Supervivencia del pez cebra después de una inyección i.p. de VP1GFP (ClpA⁻)^{CI} o VP1GFP (KPM335)^{CI} y posterior desafío con *P. aeruginosa*.**

El pez cebra fue inyectado i.p. con VP1GFP (ClpA⁻)^{CI} o VP1GFP (KPM335)^{CI} a 300 µg/pez y desafiado con *P. aeruginosa* PAO1 (LD₅₀) (3,4x10⁷ ufc/dosis) (n = 15). Peces no tratados fueron inyectados con PAO1 (LD₅₀) y usados como control de mortalidad. Las diferencias significativas fueron analizadas mediante el test de Log-rank, **, p<0,01.

Estos resultados sugieren que el efecto protector de los CI es independiente del quimiotipo del LPS de las cepas productoras. Como hemos mencionado anteriormente, también se analizó el contenido total de lípidos en las diferentes cepas de *E. coli* utilizadas como cepas productoras (**Figura 3A**). La presencia de lípidos totales fue menor en KPM335 (140 µg/µg de CI) comparados con ClpA⁻ (320 µg/µg de CI) (**Figura 3A**), indicando que los diferentes niveles de lípidos tampoco explican las diferencias de protección observada tras la administración de VP1GFP (ClpA⁻)^{CI}, comparada con VP1GFP (KPM335)^{CI} (**Figura 8**).

VP1GFP (ClpA)^{Cl} e iRFP-H6 (BL21(DE3))^{Cl} protegen al pez cebra en contra de un desafío letal con *P. aeruginosa*

Con el objetivo de examinar si la secuencia de aminoácidos de la proteína que forma el CI puede contribuir a la protección del pez cebra, comparamos VP1GFP (ClpA)^{Cl} e iRFP-H6 (BL21(DE3))^{Cl}. Nuestros resultados mostraron que tanto VP1GFP (ClpA)^{Cl} (RPS de 55 %) como iRFP-H6 (BL21(DE3))^{Cl} (RPS de 72,5 %) otorgaron altos y similares niveles de protección después de una exposición letal a *P. aeruginosa* (PAO1). La ausencia de diferencias significativas entre las capacidades inmunoprotectoras de estos dos materiales sugiere que la naturaleza de la proteína en sí misma no parece tener ningún efecto en la protección (**Figura 9**).

iRFP-H6 (BL21 (DE3))^{Cl} induce la expresión génica de genes relacionados con la respuesta inmune en macrófagos de trucha arcoíris.

Con la finalidad de explorar la capacidad de los CI de estimular la expresión de genes relacionados con la inmunidad de células inmunes específicas, se trataron las células HKM con 10 µg/ml de iRFP-H6 (BL21(DE3))^{Cl} y con 10 µg/ml de LPS, como control por sus bien descritas propiedades proinflamatorias en peces [30]. Es importante aclarar que decidimos utilizar los cultivos primarios

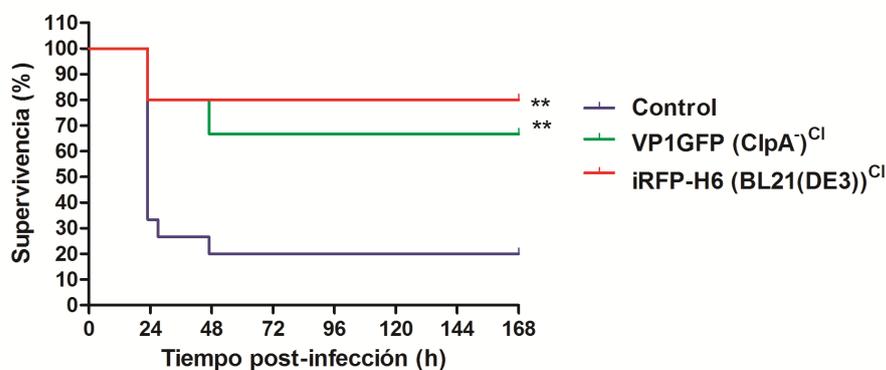


Figura 9. Supervivencia del pez cebra después de una inyección con VP1GFP (ClpA)^{Cl} o iRFP-H6 (BL21(DE3))^{Cl} y posterior desafío con *P. aeruginosa*.

El pez cebra fue inyectado i.p. con VP1GFP (ClpA)^{Cl} o iRFP-H6 (BL21(DE3))^{Cl} a 150 µg/pez y desafiado con *P. aeruginosa* (PAO1) (LD₅₀) (4,9x10⁷ ufc/dosis) (n = 15). Peces no tratados fueron inyectados con PAO1 (LD₅₀) y usados como control de mortalidad. Diferencias significativas fueron analizadas usando el test de Log-rank, **, p<0,01.

de trucha arcoíris ya que el tamaño del pez cebra no nos permite obtener suficientes células para realizar el análisis de expresión génica por Q-PCR. En general, se observó un aumento similar de expresión génica en macrófagos tratados con iRFP-H6^{Cl} y LPS (**Figura 10**). Las citoquinas proinflamatorias TNF α , ciclooxigenasa 2 (COX-2), IL-1 β e interleuquina 8 (IL-8) alcanzaron prácticamente los mismos niveles de expresión que las células tratadas con iRFP-H6^{Cl} y LPS, lo que indica que iRFP-H6^{Cl} fueron, al menos tan potente como el LPS en la inducción de la activación de los macrófagos. Además, se evaluó los niveles de expresión de la metalopeptidasa de la matriz 9 (MMP9) y el supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3) en HKM para evaluar algunas de las moléculas implicadas en la remodelación de la matriz extracelular y en las vías de señalización claves para la respuesta inmune. Como se muestra en la **Figura 10**, los niveles de expresión génica también se incrementaron en macrófagos tratados con iRFP-H6^{Cl} ($11,9 \pm 4,9$ fold-change para MMP9 y $14,88 \pm 6,94$ fold-change para SOCS3), pero no alcanzaron los mismos niveles de expresión que las células tratadas con LPS (alrededor del 50% o más).

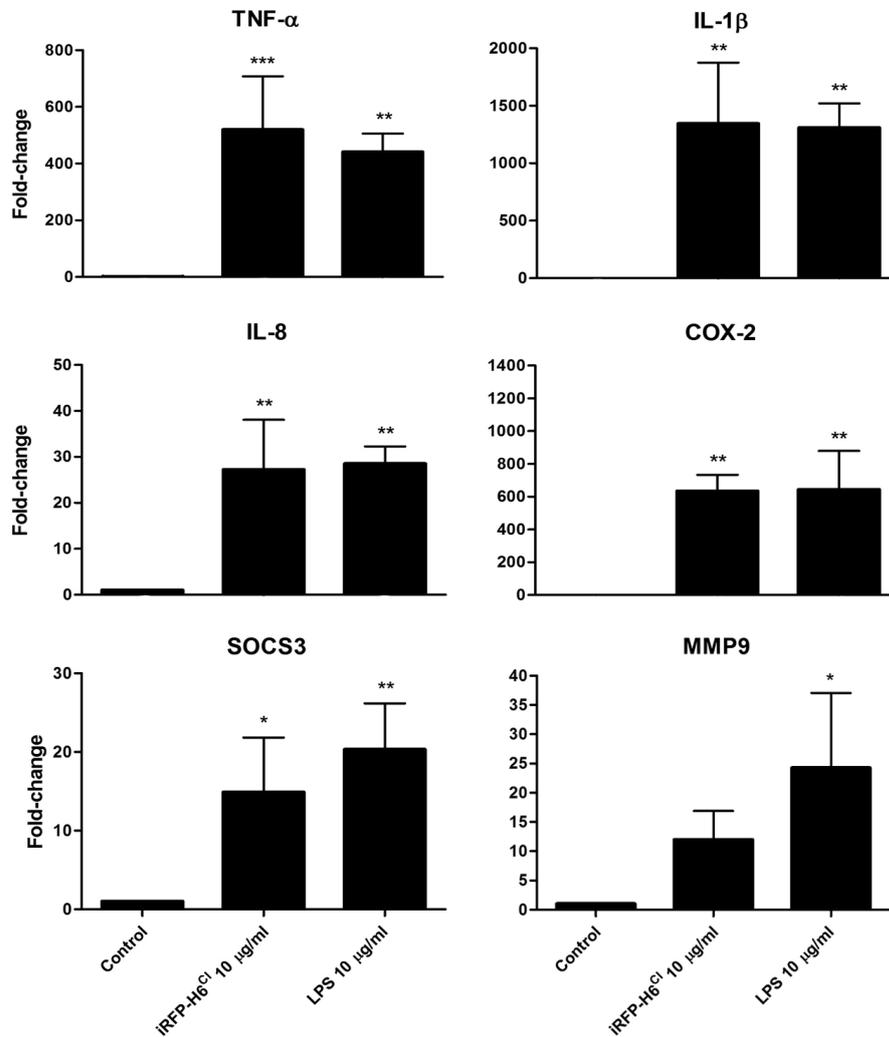


Figura 10. **Análisis de expresión génica en células HKM estimuladas con iRFP-H6^{Cl} y LPS.**

Las células fueron cultivadas con 10 µg/ml de iRFP-H6 (BL21(DE3))^{Cl} y 10 µg/ml LPS durante 12 h y la expresión génica fue analizada a través de Q-PCR. Los valores representan el promedio y la desviación estándar (n = 3). Las diferencias significativas fueron analizadas con respecto al control, utilizando ANOVA de una vía seguido del test de Tukey:

*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

Discusión

El desarrollo de nuevos métodos profilácticos con buenos niveles de eficacia es una necesidad en la acuicultura intensiva para la prevención y control de las principales enfermedades infecciosas que afectan a las especies de interés comercial. Hasta el momento, las vacunas basadas en patógenos vivos atenuados o inactivados han sido el enfoque más ampliamente utilizado para prevenir enfermedades importantes. Sin embargo, estas estrategias presentan importantes riesgos biológicos asociados, además de la necesidad de administrar altas dosis para lograr los niveles de protección deseada [1]. Con el objetivo de desarrollar nuevos enfoques y vacunas alternativas, algunos grupos de investigación se han centrado en el desarrollo de vacunas basadas en proteínas recombinantes. No obstante, los resultados publicados hasta la fecha no son particularmente prometedores, ya que no muestran niveles consistentes de protección [38], que probablemente podrían ser parcialmente explicados al tener en cuenta la baja estabilidad de las proteínas solubles. Además, los antígenos recombinantes a menudo necesitan la adición de adyuvantes. Por lo tanto, teniendo en cuenta todos estos factores, el desarrollo de un enfoque estable y rentable de inmunostimulación sigue siendo una tarea pendiente. En este contexto, los resultados resumidos en este estudio muestran que los CI bacterianos se pueden utilizar como una plataforma de entrega de un amplio espectro de inmunostimulantes para peces. Los CI son nanopartículas tipo amiloide complejas, mecánicamente estables y funcionalmente activas que combinan varias propiedades clave para la inmunostimulación. Aunque, sus principales componentes son proteínas recombinantes, también contienen cantidades indeterminadas de otras moléculas de la cepa de producción, tales como, ADN y ARN bacteriano y componentes de la pared celular, incluyendo LPS y PGN. Tal complejidad composicional combinada en una nanoestructura es lo que los hace tan atractivos. Curiosamente, nuestros resultados demuestran que los restos celulares purificados junto con las nanopartículas, y más específicamente la cuantificación total de lípidos, dependen en gran medida del fondo genético de las células productoras. Además, y como se ha descrito anteriormente, el fondo genético de la cepa productora, así como la naturaleza de la proteína utilizada, también tiene un impacto significativo en la forma y el tamaño final de los CI [39]. Tal complejidad combinada con una forma nanoestructurada, siendo ambas propiedades fácilmente modulables, es lo que los hace potencialmente adecuados como plataforma de entrega de inmunostimulantes. Teniendo en cuenta que el LPS y las nano/micropartículas a menudo se agregan a vacunas

como adyuvantes e inmunomoduladores [26], el uso de los CI nos permite combinar diferentes propiedades en una sola partícula que mejora la protección inmune. En este trabajo, aportamos pruebas de que los CI heterólogos se pueden utilizar para otorgar protección al pez cebra frente a un desafío bacteriano letal. Nuestros resultados sugieren que ninguno de los componentes integrados en los CI, como, LPS, lípidos totales o proteínas recombinantes por sí solos son los únicos responsables de conferir una protección inmune, pero la combinación de todos ellos en un material nanoestructurado y estable puede ser utilizado como una plataforma de entrega de inmunoestimulantes. Los niveles de protección obtenidos con los CI son mayores en comparación con otros estudios realizados en el campo, por ejemplo, con nanoliposomas cargados con LPS/poly (I:C) como inmunoestimulantes, se observa niveles de protección del 47,1 % a los 7 días posteriores al desafío [26]. Igualmente, la administración de vacunas de ADN encapsuladas en quitosano otorga niveles de protección del 42 % de RPS a los 14 días posteriores al desafío [40].

La capacidad intrínseca de los CI para ser endocitados es crucial teniendo en cuenta la importancia de la captación de antígenos y su posterior procesamiento y presentación [41]. En este contexto, se observó tanto en las células del pez cebra como en las de trucha, una acumulación intracelular de las nanopartículas de proteína, compatible con una localización endosomal. En trabajos anteriores hemos demostrado, usando inhibidores, que liposomas cargados con LPS y poly (I:C) fueron endocitados a través del sistema de las vías caveola y clatrina [26]. Además, los receptores tipo Toll (TLR) implicados en la respuesta al ARN viral y ADN bacteriano se encuentran en compartimientos endosomales y es de gran importancia que las nanopartículas sean capaces de dirigirse a estos receptores intracelulares que activan las correspondientes vías de señalización de TLR7 y TLR9 [42]. Así, por ejemplo, TLR9, situado en membranas endosomales, reconocen motivos específicos no metilados de CpG presentes en bacterias pero no en el ADN genómico de vertebrados lo que conduce a la activación de las vías de señalización que terminan con la síntesis de citoquinas. En cultivos primarios de trucha se observó un aumento de expresión en varios marcadores de inflamación tales como, TNF α , COX-2, IL-1 β , IL-8 o MMP9, siendo todos ellos cruciales para la respuesta inmune en peces.

En cuanto a las proteínas usadas para formar las nanopartículas, ambas proteínas empleadas como modelo en este estudio son proteínas fluorescentes sin ninguna función adicional conocida en peces, esto podría explicar la falta de influencia en la supervivencia otorgada por los diferentes CI frente a un desafío

bacteriano letal. Sin embargo, no se puede descartar que si se utilizan CI con una proteína específica de peces implicada en la respuesta inflamatoria (p. ej., citoquinas) se podría alcanzar niveles de protección aún más elevados. Además, es importante señalar que el uso de diferentes cepas de *E. coli* nos permiten diseñar CI con una composición fácilmente modulable influyendo en la eficacia de la nanopartícula utilizada.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten proponer a los CI como una alternativa prometedora para propósitos de inmunoestimulación en acuicultura intensiva. Los CI son nanopartículas de proteínas altamente estables, obtenidos bajo condiciones de producción recombinante, capaces de proporcionar buenos niveles de protección al pez cebrá contra de un desafío bacteriano letal. Su propia naturaleza los hace excepcionalmente interesantes, ya que los componentes integrados en una sola partícula les permiten mejorar la protección inmunológica en peces. Además, los CI, en contraste con las nanopartículas sintéticas, son naturales y se pueden producir fácilmente por biofabricación de una manera rentable usando bacterias recombinantes como fabricas de proteína. Esto significa que su producción se puede escalar fácilmente, convirtiéndose en una alternativa atractiva para fines veterinarios.

Referencias

- [1] I. Sommerset, B. Krossøy, E. Biering, y P. Frost. **Vaccines for fish in aquaculture**. *Expert Rev. Vaccines*, vol. 4, no. 1, pp. 89–101, 2005.
- [2] B. E. Brudeseth, R. Wiulsrød, B. N. Fredriksen, K. Lindmo, K. E. Løkling, M. Bordevik, N. Steine, A. Klevan, y K. Gravningen. **Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming**. *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1759–1768, 2013.
- [3] B. Magnadóttir. **Immunological control of fish diseases**. *Mar. Biotechnol. (NY)*, vol. 12, no. 4, pp. 361–379, 2010.
- [4] C. Tafalla, J. Bøgwald, y R. A. Dalmo. **Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives**. *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1740–1750, 2013.
- [5] S. K. Mallapragada y B. Narasimhan. **Immunomodulatory biomaterials**. *Int. J. Pharm.*, vol. 364, no. 2, pp. 265–271, 2008.
- [6] A. Singh y N. A. Peppas. **Hydrogels and Scaffolds for Immunomodulation**. *Adv. Mater.*, vol. 26, no. 38, pp. 6530–6541, 2014.

- [7] Y. K. Kim. **Immunomodulatory Biomaterials to Mitigate Material-Induced Host Responses in Biomedical Engineering.** University of California, Irvine ed., 2013.
- [8] E. García-Fruitós, E. Vázquez, C. Díez-Gil, J. L. Corchero, J. Seras-Franzoso, I. Ratera, J. Veciana, y A. Villaverde. **Bacterial inclusion bodies: making gold from waste.** *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 2, pp. 65–70, 2012.
- [9] E. Vázquez, J. L. Corchero, J. F. Burgueño, J. Seras-Franzoso, A. Kosoy, R. Bossier, R. Mendoza, J. M. Martínez-Láinez, U. Rinas, E. Fernández, L. Ruiz-Avila, E. García-Fruitós, y A. Villaverde. **Functional inclusion bodies produced in bacteria as naturally occurring nanopills for advanced cell therapies.** *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 13, pp. 1742–1747, 2012.
- [10] J. Seras-Franzoso, K. Peebo, J. Luis Corchero, P. M. Tsimbouri, U. Unzueta, U. Rinas, M. J. Dalby, E. Vázquez, E. García-Fruitós, y A. Villaverde. **A nanostructured bacterial bioscaffold for the sustained bottom-up delivery of protein drugs.** *Nanomedicine (Lond.)*, vol. 8, no. 10, pp. 1587–1599, 2013.
- [11] C. Díez-Gil, S. Krabbenborg, E. García-Fruitós, E. Vázquez, E. Rodríguez-Carmona, I. Ratera, N. Ventosa, J. Seras-Franzoso, O. Cano-Garrido, N. Ferrer-Miralles, A. Villaverde, y J. Veciana. **The nanoscale properties of bacterial inclusion bodies and their effect on mammalian cell proliferation.** *Biomaterials*, vol. 31, no. 22, pp. 5805–5812, 2010.
- [12] M. Liovic, M. Ozir, A. B. Zavec, S. Peternel, R. Komel, y T. Zupancic. **Inclusion bodies as potential vehicles for recombinant protein delivery into epithelial cells.** *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 1, p. 67, 2012.
- [13] O. Cano-Garrido, E. Rodríguez-Carmona, C. Díez-Gil, E. Vázquez, E. Elizondo, R. Cubarsi, J. Seras-Franzoso, J. L. Corchero, U. Rinas, I. Ratera, N. Ventosa, J. Veciana, A. Villaverde, y E. García-Fruitós. **Supramolecular organization of protein-releasing functional amyloids solved in bacterial inclusion bodies.** *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 4, pp. 6134–6142, 2013.
- [14] E. García-Fruitós. **Inclusion bodies: a new concept.** *Microb. Cell Fact.*, vol. 9, no. 1, p. 80, 2010.
- [15] E. Rodríguez-Carmona, O. Cano-Garrido, J. Seras-Franzoso, A. Villaverde, y E. García-Fruitós. **Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies.** *Microb. Cell Fact.*, vol. 9, p. 71, 2010.
- [16] G. Georgiou y P. Valax. **Isolating inclusion bodies from bacteria.** *Methods Enzymol.*, vol. 309, no. 1975, pp. 48–58, 1999.
- [17] J. Watzke, K. Schirmer, y S. Scholz. **Bacterial lipopolysaccharides induce genes involved in the innate immune response in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*).** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 23, no. 4, pp. 901–905, 2007.
- [18] V. Selvaraj, K. Sampath, y V. Sekar. **Adjuvant and immunostimulatory effects of beta-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in**

- carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 114, no. 1–2, pp. 15–24, 2006.**
- [19] B. T. B. Hang, S. Milla, V. Gillardin, N. T. Phuong, y P. Kestemont. ***In vivo* effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on regulation of immune response and protein expression in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*).** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 34, no. 1, pp. 339–347, Jan. 2013.
- [20] R. Medzhitov. **Septic shock: on the importance of being tolerant.** *Immunity*, vol. 39, no. 5, pp. 799–800, 2013.
- [21] O. Takeuchi y S. Akira. **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 805–820, 2010.
- [22] A. M. Keestra, M. R. de Zoete, L. I. Bouwman, M. M. Vaezirad, y J. P. M. van Putten. **Unique features of chicken Toll-like receptors.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 41, no. 3, pp. 316–323, 2013.
- [23] S. Nikolaeva, V. Bachteeva, E. Fock, S. Herterich, E. Lavrova, A. Borodkina, S. Gambaryan, y R. Parnova. **Frog urinary bladder epithelial cells express TLR4 and respond to bacterial LPS by increase of iNOS expression and L-arginine uptake.** *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 303, no. 10, pp. 1042–1052, 2012.
- [24] B. Magnadottir, B. K. Gudmundsdottir, S. Lange, A. Steinarsson, M. Oddgeirsson, T. Bowden, I. Bricknell, R. A. Dalmo, y S. Gudmundsdottir. **Immunostimulation of larvae and juveniles of cod, *Gadus morhua* L.** *J. Fish Dis.*, vol. 29, no. 3, pp. 147–55, 2006.
- [25] E. J. Nya y B. Austin. **Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).** *J. Appl. Microbiol.*, vol. 108, no. 2, pp. 686–94, 2010.
- [26] A. Ruyra, M. Cano-Sarabia, P. García-Valtanan, D. Yero, I. Gibert, S. A. Mackenzie, A. Estepa, D. Maspoch, y N. Roher. **Targeting and stimulation of the zebrafish (*Danio rerio*) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes.** *Vaccine*, vol. 32, no. 31, pp. 3955–3962, 2014.
- [27] S. K. Nayak, P. Swain, P. K. Nanda, S. Dash, S. Shukla, P. K. Meher, y N. K. Maiti. **Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 24, no. 4, pp. 394–399, 2008.
- [28] D. B. Iliev, J. C. Roach, S. Mackenzie, J. V. Planas, y F. W. Goetz. **Endotoxin recognition: in fish or not in fish?** *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 29, pp. 6519–6528, 2005.
- [29] S. A. MacKenzie, N. Roher, S. Boltaña, y F. W. Goetz. **Peptidoglycan, not endotoxin, is the key mediator of cytokine gene expression induced in rainbow trout macrophages by crude LPS.** *Mol. Immunol.*, vol. 47, no. 7–8, pp. 1450–1457, 2010.
- [30] N. Roher, A. Callol, J. V. Planas, F. W. Goetz, y S. A. MacKenzie. **Endotoxin recognition in fish results in inflammatory cytokine secretion not gene expression.** *Innate Immun.*, vol. 17, no. 1, pp. 16–28, 2011.

- [31] A. C. Carrington y C. J. Secombes. **A review of CpGs and their relevance to aquaculture.** *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 112, no. 3–4, pp. 87–101, 2006.
- [32] C. H. Lee, H. Do Jeong, J. K. Chung, H. H. Lee, y K. H. Kim. **CpG motif in synthetic ODN primes respiratory burst of olive flounder *Paralichthys olivaceus* phagocytes and enhances protection against *Edwardsiella tarda*.** *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 56, no. 1, pp. 43–48, 2003.
- [33] J. G. Thomas, y F. Baneyx. **Roles of the *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA and IbpB in Thermal Stress Management: Comparison with ClpA, ClpB, and Htp *in vivo*.** vol. 180, no. 19, pp. 5165–5172, 1998.
- [34] U. Mamat, K. Wilke, D. Bramhill, A. B. Schromm, B. Lindner, T. A. Kohl, J. L. Corchero, A. Villaverde, L. Schaffer, S. R. Head, C. Souvignier, T. C. Meredith, y R. W. Woodard. **Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins.** *Microb. Cell Fact.*, vol. 14, no. 1, p. 57, 2015.
- [35] K. J. Livak y T. D. Schmittgen. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [36] J. Izard y R. J. Limberger. **Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells.** *J. Microbiol. Methods*, vol. 55, no. 2, pp. 411–418, 2003.
- [37] A. N. Vallejo, N. W. Miller, N. E. Harvey, M. A. Cuchens, G. W. Warr, y W. L. Clem. **Cellular Pathway(s) of Antigen Processing and Presentation in Fish APC: Endosomal Involvement and Cell-free Antigen Presentation.** *Dev. Immunol.*, vol. 3, no. C, pp. 51–65, 1992.
- [38] S. Deshmukh, M. K. Raida, I. Dalsgaard, J. K. Chettri, P. W. Kania, y K. Buchmann. **Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 145, no. 1–2, pp. 379–385, 2012.
- [39] M. C. Johnson, A. Sangrador-Vegas, T. J. Smith, y M. T. Cairns. **Molecular cloning and expression analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) matrix metalloproteinase-9.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 17, no. 5, pp. 499–503, 2004.
- [40] S. Rajesh Kumar, V. P. Ishaq Ahmed, V. Parameswaran, R. Sudhakaran, V. Sarath Babu, y A. S. Sahul Hameed. **Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 25, no. 1–2, pp. 47–56, 2008.
- [41] E. Gomez-Casado, a. Estepa, y J. M. Coll, **A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines,** *Vaccine*, vol. 29, no. 15, pp. 2657–2671, 2011.
- [42] S. Akira, S. Uematsu, y O. Takeuchi. **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783–801, 2006.

Capítulo

3

Citoquinas recombinantes
nanoestructuradas
como candidatas para
inmunoestimulantes de peces



Resumen

Las citoquinas han sido ampliamente utilizadas como adyuvantes y vacunas en diferentes animales. El potencial de las citoquinas se asocia al hecho de que están involucradas en la patogénesis de muchas enfermedades y que son capaces de estimular el sistema inmune sin la presencia de un patógeno. Las citoquinas pueden ser producidas en diferentes sistemas heterólogos. Una manera rentable de producir proteínas recombinantes es mediante las factorías bacterianas y uno de los productos que se obtienen a través de éstas son los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son proteínas nanoestructuradas y altamente estables, con características moldeables que pueden ser producidas a gran escala. En este trabajo proponemos el uso de las citoquinas recombinantes purificadas de cuerpos de inclusión para la inmunoestimulación de peces por vía oral. Los resultados obtenidos, indican que los cuerpos de inclusión son candidatos ideales para la administración oral de citoquinas en peces, ya que son altamente estables, y además, otorgan altos niveles de protección en un modelo experimental como el pez cebra frente a una infección bacteriana letal.

Introducción

La producción de proteínas recombinantes es la mayor plataforma tecnológica de la biotecnología. La producción se realiza en sistemas de expresión heterólogos como, bacterias (principalmente *Escherichia coli*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*), células de insectos (p. ej., High five cells de *Trichoplusia ni*), protozoos (*Tetrahymena thermophila*) y células de mamíferos o plantas [1, 2]. La fábrica de proteínas más común es el sistema de expresión bacteriano en *E. coli* y uno de los productos obtenidos más prometedores son las proteínas conocidas como cuerpos de inclusión (CI). Los CI son proteínas nanoestructuradas y altamente estables (p. ej., frente a temperatura o liofilización) [3], que muestran una liberación de proteínas prolongada y sostenida en el tiempo [4]. La mayoría de las propiedades biológicas y fisicoquímicas de estas proteínas recombinantes son moldeables, como el tamaño, la bioadhesividad, la carga neta, la densidad y la velocidad de liberación de la proteína funcional [3–6]. Estas características permiten una gran combinación de propiedades de los CI, siendo ideal para el tratamiento de diferentes células diana o enfermedades. Además, los CI contienen diferentes componentes bacterianos como, fragmentos de membranas, proteínas unidas a membrana, ácidos nucleicos, fragmentos de pared celular y en consecuencia lipopolisacáridos

(LPS) y peptidoglicanos (PGN), cuya concentración también puede ser controlada en función de la cepa bacteriana utilizada [7–9].

La inducción de una protección inmunológica requiere que los antígenos sean captados, tratados y presentados por las células presentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells*, APCs) [10]. Las principales APCs en peces son los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas y los linfocitos B [11–13]. Las APCs activadas secretan citoquinas y quimioquinas que regulan la respuesta inmune innata y adaptativa [14]. En general, las citoquinas poseen un efecto pleiotrópico y tienen un papel central proporcionando señales que ayudan a dirigir la respuesta inmune hacia una mediación por anticuerpos o por células [15]. En este estudio, utilizamos factorías bacterianas para producir citoquinas nanoestructuradas concretamente, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la quimioquina (C-C motivo) ligando 4 (CCL4), para caracterizarlas como potenciales candidatas a inmunoestimulantes.

Las citoquinas recombinantes se han utilizado ampliamente como adyuvantes y agentes terapéuticos en diferentes animales (p. ej., interleuquina 2 (IL-2) en cerdos; el TNF α e interferón alfa (IFN α) en felinos; el IFN α en gallinas o la interleuquina 1beta (IL-1 β) en ovejas [16–19]. Su potencial se asocia con el hecho de que las citoquinas están implicadas en la patogénesis de muchas enfermedades, son proteínas con pocas probabilidades de provocar una respuesta alérgica, son capaces de estimular el sistema inmune sin la presencia de un patógeno y en diferentes estudios con diferentes animales, se ha demostrado que pueden actuar como adyuvantes para vacunas virales, bacterianas y parasitarias [20–22]. A pesar de estas ventajas, las citoquinas presentan desventajas importantes como, la vida media relativamente corta (de minutos), lo que implica la administración de altas dosis que pueden llegar a ser tóxicas y la costosa producción en grandes cantidades [23, 24].

Si bien la utilización de citoquinas como adyuvantes ha sido ampliamente estudiada, no existen muchos estudios que exploren la posibilidad del uso de citoquinas como adyuvantes o inmunoestimuladores en peces. Esto se puede deber, a que su función inmunológica no está completamente descifrada en la mayoría de las citoquinas descritas en teleósteos [25]. Aún así, existen algunos trabajos que exploran el empleo de citoquinas como adyuvantes en peces. Por ejemplo, se ha utilizado interleuquina 8 (IL-8) recombinante administrada intraperitonealmente (i.p.) en trucha arcoíris y se ha observado un aumento significativo en la migración de leucocitos a la cavidad peritoneal, siendo mayor

que el tratamiento con LPS [26]. También, ha sido evaluada la administración i.p. de IL-1 β recombinante en conjunto con bacterias inactivadas en carpa (*Cyprinus carpio*) y barramundi (*Lates calcarifer*), en donde se obtuvo un aumento significativo de los anticuerpos en contra de las bacterias inactivadas administradas (*Aeromonas salmonicida* y *Vibrio harveyi*, respectivamente) en comparación con el tratamiento, donde sólo se administró la bacteria inactivada [27, 28]. En este estudio, hemos explorado el uso de TNF α y CCL4 recombinantes nanoestructurados como potenciales inmunoestimulantes. El TNF α es una citoquina pleiotrópica con efectos proinflamatorios o efectos inmunosupresores, dependiendo del contexto, que puede ser secretada por macrófagos y leucocitos activados [29]. En peces, TNF α recombinante encapsulado ha sido administrado oralmente como adyuvante en trucha arcoíris, el cual aumenta la supervivencia de los peces contra un desafío letal de *Vibrio anguillarum* [30]. Por otro lado, se ha descrito que CCL4 juega un rol como inductor del reclutamiento de monocitos en sitios de inflamación [31]. En mamíferos, se han realizado estudios para confirmar el posible rol fisiopatológico de CCL4 como potencial factor activo en el ictus isquémico y su posible actividad neuroprotectora o su papel en la inmunidad mucosal contra la infección de VIH [32, 33]. En teleósteos se ha descrito que CCL4 tiene actividad quimiotáctica [31], y se ha sugerido que puede jugar un rol fundamental en la orquestación de la inflamación [34]. Sin embargo, hasta hoy en día no existen trabajos que describan el uso de CCL4 de forma terapéutica en peces o en mamíferos.

En las últimas décadas, la inmunología de la mucosa ha sido un campo ampliamente explorado en los vertebrados superiores. Aunque, los peces poseen un sistema inmune mucosal funcional, no existen muchos detalles acerca de este sistema en teleósteos. El mucus actúa como una barrera física y química que protege el epitelio tanto externo como interno y, por lo tanto, actúa como un importante mecanismo de defensa que mantiene la homeostasis, lo cual es muy beneficioso en el ambiente acuático, que es abundante en patógenos [35, 36]. El mucus está principalmente compuesto por agua (95 %) y algunas glicoproteínas, como la mucina que le concede la consistencia viscosa. Además, presenta otras moléculas en pequeñas cantidades, que incluyen factores del sistema inmune innato como, moléculas antimicrobianas e inmunoglobulinas [37, 36]. El intestino de teleósteos presenta dos poblaciones principales de células inmunes: 1) la lamina propia, el cual incluye una variedad de células inmune como, granulocitos, macrófagos, linfocitos y células del plasma; y 2) lin-

focitos intraepiteliales (*intraepithelial lymphocytes*, IELs) compuestos por células T y células B localizadas entre las células epiteliales [38]. Estas células inmunes, en conjunto con las células epiteliales, las células globet y las células neuroendocrinas producen y regulan la respuesta inmune en el intestino.

La administración oral en acuicultura es una prometedora alternativa en comparación con otras vías de administración, por ejemplo, la administración por inyección conlleva una mayor manipulación y estrés en los peces y la administración por inmersión implica el uso de una elevada cantidad de inmunoestimulantes, siendo difícil el determinar las dosis administradas. La administración oral evita el estrés en peces, permite el tratamiento en masa y a diferentes tamaños de los animales. No obstante, presenta importantes desventajas como, la inactivación de los antígenos por la alta acidez del estómago impidiendo la absorción de éstos y una relación coste-efectividad moderado [10, 39, 40]. Con el objetivo de mejorar la efectividad de la administración oral, se deben desarrollar plataformas de entrega de inmunoestimulantes que eviten la degradación de éstos en la primera sección del tubo digestivo. En este contexto, el uso de nanopartículas se ha propuesto como una estrategia alternativa de encapsulación para tratar este problema. La nanoencapsulación implica la formación de partículas cargadas, por ejemplo, con antígenos o inmunoestimulantes con diámetros que van desde 1 a 1000 nm. Este tamaño permite a las nanopartículas interactuar con moléculas, como enzimas y receptores, tanto en la superficie como dentro de las células. Las nanopartículas se pueden fabricar fácilmente para tener características físicas únicas en tamaño, forma, química de la superficie o superficies con ligandos para receptores específicos. Los beneficios de las nanopartículas como herramientas de entrega de antígenos son: la reducción de las dosis, especificidad de tejido diana, la reducción de los efectos tóxicos y el aumento de la eficiencia en la entrega [41]. Por ejemplo, ensayos realizados con nanopartículas de quitosano administradas oralmente, aumentan el porcentaje relativo de supervivencia (*relative percentage of survival*, RPS) tras un desafío con *Vibrio parahaemolyticus* de un 0 % con antígenos sin encapsular a un 72 % con antígenos encapsulados [42]. El mismo fenómeno se observa en nanopartículas de alginato, también administradas oralmente, que aumentan el RPS tras un desafío con el virus de la necrosis pancreática (*infectious pancreatic necrosis virus*, IPNV) de un 0 % con antígenos sin encapsular a un 80 % con antígenos encapsulados [43]. A pesar de estos antecedentes, las nanopartículas administradas oralmente son las menos eficientes y no muestran

niveles consistentes de protección en comparación con otras formas de administración; de aquí la necesidad de desarrollar nuevas nanopartículas que permitan explotar sus características y aumentar la protección conferida por los antígenos.

En el capítulo anterior hemos descrito como los CI de proteínas sin una función inmunológica específica en peces son capaces de proteger al pez cebra frente a una infección bacteriana letal. La complejidad nanoestructural de los CI, en conjunto con la capacidad de las citoquinas de estimular el sistema inmune, nos llevan a la hipótesis de que los CI compuestos por citoquinas pueden ser utilizados como inmunoestimulantes orales en peces aumentando la protección conferida por los CI descritos en nuestro trabajo anterior (**ver Capítulo 2**).

Materiales y Métodos

Clonación de CCL4, cepas bacterianas y plásmidos

La secuencia de CCL4 de trucha arcoíris (Genbank, número de acceso AY561709.1) fue utilizada para el diseño de cebadores específicos para su clonación (**ver Anexo 3, Tabla 1**). La secuencia completa de CCL4 fue amplificada desde ADNc sintetizado a partir de ARN del riñón anterior de trucha y purificado usando TriReagent (Sigma). El producto obtenido de PCR fue purificado desde el gel, ligado en el vector pET-30 Xa/LIC (Novagen) y transformado en *E. coli* DH5 α (Invitrogen). El CCL4-pET-30 Xa/LIC fue purificado utilizando Nucleo-Spin plásmido Quick-Pure (Macherey-Nagel), cuantificado con Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y secuenciado para comprobar su correcta orientación. Por último, para la expresión de CCL4, recombinante el vector CCL4-pET-30 Xa/LIC se subclonó en *E. coli* BL21(DE3)pLysS. La cepa bacteriana utilizada para la producción de los CI de TNF α (TNF α^{Cl}) fue *E. coli* M15[pREP4] (Qiagen). Esta cepa se transformó con el vector TNF-pQE30 (Qiagen), como se ha descrito anteriormente [44]. El CCL4-pET-30Xa/LIC e iRFP-H6-pET22b se transformaron en *E. coli* BL21(DE3) para la producción recombinante de CI de CCL4 (CCL4 Cl) y de iRFP-H6 (iRFP-H6 Cl), respectivamente. Todas las proteínas recombinantes contenían una cola de histidinas (6 histidinas) y fueron detectados por Western blot utilizando un anticuerpo anti-His-tag (GenScript).

Producción de cuerpos de inclusión, purificación y marcaje

E. coli fue transformada con TNF-pQE30, CCL4-pET-30Xa/LIC e iRFP-H6-pET22b y cultivada en medio LB suplementado con los antibióticos requeridos. Los cultivos bacterianos se iniciaron a una densidad óptica de 0,05 a 550 nm (OD_{550}) y se incubaron aeróbicamente a 37 °C (250 rpm) hasta alcanzar una OD_{550} de 0,5. Se realizó la inducción con 1 mM de IPTG (Panreac) durante 3 h. Con respecto a la purificación de los CI, los cultivos bacterianos fueron procesados a través de una combinación de disrupción mecánica y enzimática. En primer lugar, se añadió lisozima a 1 mg/ml (Roche) y PMSF a 0,4 mM (Roche) y se incubó durante 2 h a 37 °C y 250 rpm. Seguidamente, las células fueron congeladas y descongeladas y se añadió Triton X-100 (Sigma) (0,2 % (v/v)). La suspensión se incubó durante 1 h bajo agitación suave a temperatura ambiente. Los CI fueron recolectados por centrifugación y suspendidos en tampón de lisis (50 mM de TrisHCl pH 8, 100 mM de NaCl y 1mM de EDTA) (concentrado 10 veces con respecto al volumen original del cultivo). A continuación, las muestras se incubaron con ADNasa a 0,6 mg/ml (Roche), 1 h a 37°C, bajo agitación. Varios ciclos de congelación/descongelación se llevaron a cabo hasta que no se detectaron bacterias viables. Las muestras se centrifugaron a 15000 $\times g$ durante 15 min y el precipitado que contenía los CI purificados fue almacenado a -80 °C hasta su uso. Se realizaron dos controles de esterilidad, en el primero, se cultivaron CI en placas de LB sin antibióticos durante 12 h, y en el segundo, se cultivaron CI en DMEM suplementado con suero bovino fetal (*fetal bovine serum*, FBS), sin antibióticos, durante 5 días, para determinar que no habían células viables en la producción. Los CI fueron cuantificados por Western blot utilizando un anticuerpo anti-His-tag, y la concentración de proteína se dedujo a partir de una curva estándar, realizada con proteína recombinante.

Para visualizar TNF α^{CI} y CCL4 CI por citometría de flujo y microscopía confocal, los CI fueron marcados con Atto 488-NHS éster (Sigma), a una proporción molar 1:2 (proteína/marcador fluorescente), siguiendo las instrucciones del fabricante. La eficiencia del marcaje fue calculada utilizando el Nanodrop ND-1000.

Caracterización de TNF α^{CI} y CCL4 CI

TNF α^{CI} y CCL4 CI fueron caracterizados a través del microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (*field emission scanning electron microscopy*, FESEM, Zeiss Merlin). Las muestras fueron suspendidas en agua desionizada, a una concentración final de 100 mg/ml, y 20 μ l fueron depositados en chips de silicio dejándolos secar al aire durante la noche. Las imágenes de FESEM fueron procesadas con el software ImageJ v1.5 (National Institute of Health);

mientras que las medidas de longitud y diámetro, de al menos 300 partículas por muestra, fueron tomadas, y se generaron gráficos de distribución de tamaño, utilizando el software Past3 v3.03 (University of Oslo).

La estabilidad de las partículas fue evaluada bajo las mismas condiciones que se encuentran en el sistema gastrointestinal de trucha [45]. El TNF α ^{CI} fue incubado a una concentración de 0,5 mg/ml en tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS), a pH 2,5 (ajustado con HCl) durante 3 h y, posteriormente, en PBS a pH 8,0 (ajustado con NaOH) durante 6 h, a temperatura ambiente en agitación continua. La estabilidad de las partículas también fue evaluada a altas temperaturas, en las mismas condiciones utilizadas para la producción de la comida de peces [46], para ello TNF α ^{CI} fue incubado a una concentración de 0,5 mg/ml a 100 °C durante 30 s. Por último, se analizó la estabilidad de TNF α ^{CI} después de la liofilización y de su almacenamiento a temperatura ambiente. El TNF α ^{CI} fue liofilizado en un liofilizador Telstar LyoQuest-80 durante 8 h a -80 °C, y se almacenó a temperatura ambiente durante 3 semanas. Los CI de TNF α de los diferentes tratamientos fue analizado por FE-SEM. Se midió el diámetro y la longitud de 300 nanopartículas. Las diferencias estadísticas fueron analizadas utilizando la prueba t de Student (software GraphPad Prism v5).

Cultivo celular

Las células de hígado de pez cebra (*Zebrafish liver cells*, ZFL, CRL-2643, ATCC) fueron cultivadas a 28 °C en un ambiente humidificado con un: 5 % de CO₂ en DMEM 4,5 g/l de glucosa, 0,01 mg/ml de insulina, 50 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF), 5 % (v/v) de antibiótico/antimicótico, 10 % (v/v) de FBS inactivado por calor y 0,5 % (v/v) de suero de trucha arcoíris inactivado por calor [47]. Los macrófagos de trucha arcoíris (*head kidney macrophages*, HKM) fueron obtenidos desde el riñón anterior, como se ha descrito anteriormente [44], y cultivados en DMEM 4,5 g/l de glucosa suplementado con 10 % de FBS y con 50 µg/ml de Primocin (Invivogen) a 16 °C y 5 % de CO₂. Los macrófagos completamente diferenciados a día 5 se emplearon para los experimentos de endocitosis y expresión génica.

Análisis de la expresión génica

Los macrófagos de trucha arcoíris (HKM) fueron estimulados durante 12 h con 10 µg/ml de LPS (Sigma), 10 µg/ml iRFP-H6^{CI}, TNF α ^{CI} y CCL4^{CI} a diferentes concentraciones (5, 10 y 20 µg/ml y 0,01, 0,1 y 1 µg/ml, respectivamente). El ARN total fue extraído usando TriReagent (Sigma) siguiendo las instruccio-

nes del fabricante, la concentración y calidad del ARN fueron evaluados utilizando el Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y el Bioanalyser-2100, con el ARN 6000 Nano Kit (Agilent Technologies), respectivamente. La síntesis de ADNc fue realizada con 1 µg de ARN total empleando para ello SuperScript III (Invitrogen) y el cebador oligo-dT₁₅ (Promega). La Q-PCR fue llevada a cabo usando SYBR Green I PCR Supermix (Bio-Rad), 250 nM de cebadores y 2,5 µl de ADNc previamente diluido (1:50 para el ARNm diana y 1:500 para el gen de referencia) en un volumen final de 10 µl. Los cebadores incluidos en este estudio se mencionan en la **Tabla 1 (Ver Anexo 3)**. El factor de elongación 1 alfa (EF1α) se empleó como gen de referencia y la cuantificación fue realizada de acuerdo con el método de Livak [48]. El experimento fue repetido tres veces y todas las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados fueron analizados utilizando ANOVA de una vía seguido del test de Tukey (GraphPad).

Endocitosis de cuerpos de inclusión por ZFL y HKM

El TNFα^{Cl} y el CCL4^{Cl} marcados fluorescentemente fueron añadidos a cultivos celulares de ZFL y HKM a las dosis y tiempos indicados. Las células fueron analizadas por citometría de flujo (FACS-Canto, Becton Dickinson) y por microscopía confocal (Zeiss LSM 700). Para el ensayo de dosis respuesta, las células ZFL y HKM fueron incubadas con TNFα^{Cl} y CCL4^{Cl} a diferentes dosis (5, 10 y 20 µg/ml) durante 12 h. Después del tratamiento, el medio fue retirado y las células fueron lavadas con PBS para eliminar las partículas unidas a la membrana. Cada muestra fue tratada con 1 mg/ml de tripsina (Gybc) 15 min para descartar los CI unidos externamente y luego fueron centrifugados a 300 xg durante 5 min. Las células precipitadas fueron suspendidas en 200 µl de PBS para el análisis por citometría de flujo. Los experimentos fueron realizados por triplicado, analizando 10000 eventos por muestra. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía seguido del test de Tukey (GraphPad). Con respecto al ensayo de microscopía confocal, las células ZFL y HKM fueron incubadas con 20 µg/ml de TNFα^{Cl} y de CCL4^{Cl} durante 12 h. Después de tres lavados con PBS, el núcleo fue teñido con Hoechst 33342 (10 µg/ml) y las membranas con CellMask (5 µg/ml). Las imágenes fueron analizadas con el software Imaris v8.1 (Bitplane AG).

Animales

Peces cebra *wild type* adultos (*Danio rerio*) y truchas arcoíris adultas (*Onchorhynchus mykiss*) fueron mantenidos bajo un fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad a 28 ± 0,5 °C y 17 ± 0,5 °C, respectivamente y alimentados con una dieta comercial al 0,5 % del peso corporal. Todos los procedimientos experimentales

fueron presentados al Comité de Ética de la Universitat Autònoma de Barcelona (Número de referencia 1555) que trabaja de acuerdo con los Principios Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales (EU 2010/63).

Biodistribución de TNF α ^{CI} *in vivo* en trucha

Los animales ($122,3 \pm 17,13$ g de peso corporal) fueron anestesiados con metasulfato de triclaína a 50 mg/l (MS-222, Sigma), e inyectados intraperitonealmente (i.p.) con 300 μ l de TNF α ^{CI}-Atto488 (5,5 mg/kg) o 300 μ l de PBS estéril. Después de 24, 48 y 72 h, los peces (n = 4) fueron sacrificados por sobredosis de anestesia (300 mg/l de MS-222) y se diseccionaron el riñón anterior y el bazo. Los monocitos/macrófagos adherentes fueron aislados desde el riñón anterior y el bazo como se ha descrito anteriormente [44]. En paralelo, una pieza del tejido fue diseccionada y almacenada a -80 °C para los análisis de expresión génica. A las 24 h de cultivo, las células primarias fueron analizadas mediante citometría de flujo y microscopía confocal.

Desafío con *Pseudomonas aeruginosa* en pez cebrá después de la administración de cuerpos de inclusión

Peces cebrá adultos ($0,64 \pm 0,17$ g de peso corporal) fueron transferidos a un sistema aislado, para su aclimatación, un día antes de cada experimento. Para desafiar a los peces cebras se cultivó *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), como se ha descrito previamente [47]. Para la inyección de los CI y PAO1, los peces fueron anestesiados (166 ppm de MS-222) e inyectados i.p. con 20 μ l de CI o PBS. A los 7 días después de la inyección, los peces fueron desafiados por inyección i.p. con 20 μ l de *P. aeruginosa* PAO1 (LD₅₀) y su supervivencia fue seguida durante 7 días. Posteriormente, las curvas de supervivencia se analizaron utilizando el método de Kaplan–Meier, y las diferencias estadísticas fueron evaluadas usando la prueba Log-rank (GraphPad). El RPS fue calculado de acuerdo a $RPS (\%) = [(1 - \text{mortalidad del grupo tratado}) / \text{mortalidad del grupo control}] \times 100$.

Intubación de TNF α ^{CI} en trucha arcoíris

Truchas arcoíris adultas ($135,3 \pm 16,8$ g de peso corporal) fueron mantenidas en ayuno durante tres días, antes de la administración de los CI. Tras ello, los animales fueron anestesiados e intubados hasta el estómago para administrar 200 μ l de TNF α ^{CI}-Atto488 ($7,49 \pm 0,97$ mg/kg). Después de 24 h las truchas fueron sacrificadas por sobredosis de anestesia y el intestino fue diseccionado y mantenido en DMEM. Se dividió el intestino en tres secciones: apéndice pílorico, intestino medio e intestino posterior (la sección del intestino posterior

fue descartada) [49]. Las células del intestino (muestras del apéndice pilórico y el intestino medio en conjunto) se aislaron por digestión enzimática, con colagenasa (0,15 mg/ml, Invitrogen) durante 2 h, a temperatura ambiente. Posterior a la digestión, las piezas de intestino fueron disgregadas mecánicamente con un filtro de células (100 μm) y centrifugadas durante 15 min a 400 $\times g$ a 4 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente, el precipitado celular fue lavado, resuspendido en DMEM y analizado por citometría de flujo (100000 eventos por muestra). Adicionalmente, las muestras del apéndice pilórico e intestino medio ($n=6$ individuos) fueron sumergidas en Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura), congeladas y almacenadas a -80 $^{\circ}\text{C}$. Secciones de 0,6 μm fueron obtenidas a -20 $^{\circ}\text{C}$ con un cryostato (Leica CM3050S). Por último, se añadió Fluoroshield (Sigma) a cada corte, y todas las muestras fueron analizadas por microscopía confocal.

Resultados

Caracterización de los cuerpos de inclusión

Dos citoquinas de trucha arcoíris, TNF α y CCL4, fueron expresadas con éxito en *E. coli* como CI y se purificaron para obtener partículas de proteína altamente nanoestructuradas (**Figura 1A**). Una tercera citoquina, interleuquina 6 (IL-6) fue producida con éxito en *E. coli*, pero no se logró obtener CI (datos no mostrados). La morfología y el tamaño de los CI fueron caracterizados por FE-SEM y se muestran en la **Figura 1A**. La forma de los CI difiere entre las dos citoquinas, TNF α tiene una forma cilíndrica, con una superficie lisa y varios poros circulares, y CCL4 presenta una forma esférica, con una superficie más irregular. Morfologías similares han sido descritas anteriormente para otros CI [4] (**ver Capítulo 2**). También el tamaño de TNF α^{CI} y CCL4 $^{\text{CI}}$ difirió significativamente. El diámetro de TNF α^{CI} osciló entre 380 a 900 nm con un tamaño medio de $623,3 \pm 105$ nm, y la longitud varió entre 750 a 2000 nm, con una longitud media de $1134,6 \pm 196,6$ nm (**Figura 1B (i-ii)**). Por otro lado, CCL4 $^{\text{CI}}$ presentó un tamaño más pequeño, que osciló entre 220 a 850 nm con un tamaño medio de $383,9 \pm 82,3$ nm (**Figura 1B (i)**). Además, el rendimiento de la purificación de los CI varió entre ambas proteínas obtenidas en las mismas condiciones. Concretamente se obtuvieron 18 veces más CI de TNF α que de CCL4 (18 ± 5 mg/l y $1,2 \pm 0,92$ mg/l, respectivamente).

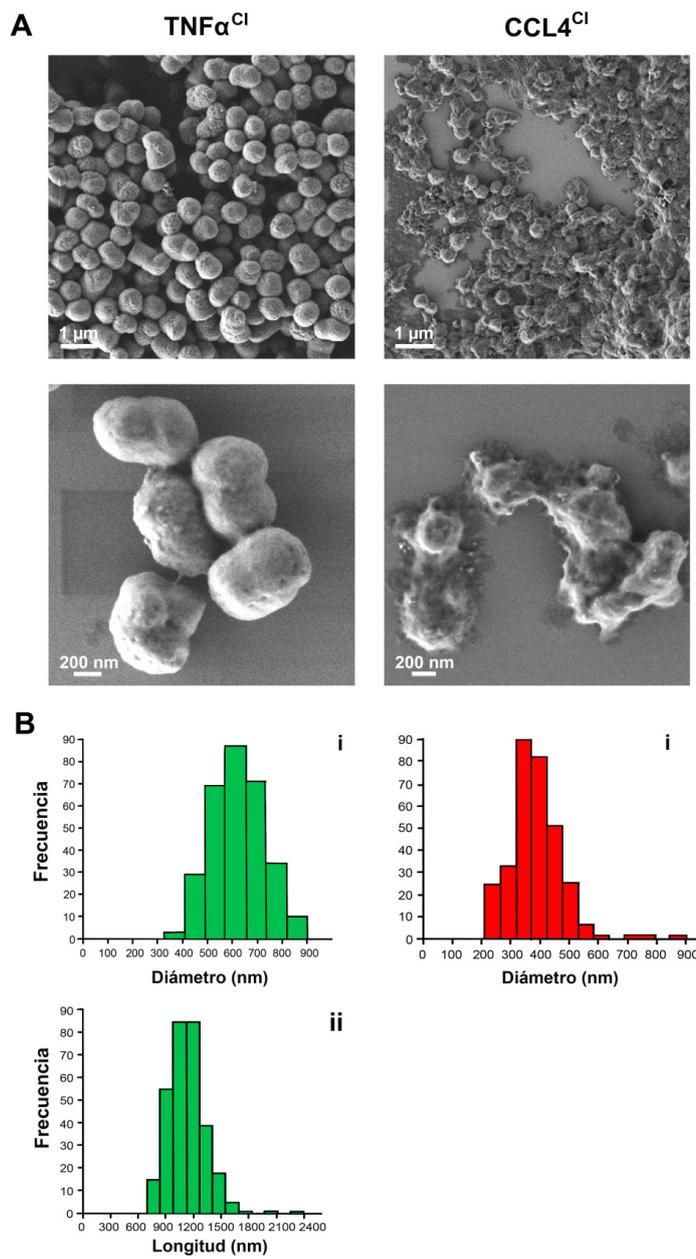


Figura 1. Caracterización de los cuerpos de inclusión.

A) Imágenes de FESEM de TNF α ^{CI} y CCL4^{CI}. B) Distribución del tamaño de los CI, diámetro (i) y longitud (ii).

Endocitosis de TNF α ^{CI} y CCL4^{CI} por células de pez cebra y trucha arcoíris

Con el fin de explorar la interacción de los CI de citoquinas con células, se analizó la captación de TNF α ^{CI} y CCL4^{CI} por una línea celular estable de hígado de pez cebra (ZFL) y por macrófagos primarios de trucha (HKM). Los resultados mostraron que las células ZFL fueron capaces de endocitar TNF α ^{CI} y CCL4^{CI} de manera muy eficiente (**Figura 2**). Los ensayos de dosis respuesta mostraron que todas las concentraciones de TNF α ^{CI} y CCL4^{CI} fueron fácilmente endocitadas por las células ZFL (p. ej., $97 \pm 0,5$ % y $99 \pm 0,1$ % de células positivas a 10 mg/ml, respectivamente) (**Figura 2A**). También los cultivos primarios de macrófagos (HKM) fueron capaces de endocitar TNF α ^{CI} y CCL4^{CI} al mismo nivel que las células ZFL ($96 \pm 1,4$ % y $98 \pm 0,9$ % de células positivas en 10 mg/ml, respectivamente) (**Figura 3A**). Tanto las células ZFL como las HKM endocitaron CI en niveles cercanos al 100 %, sin haber diferencias significativas entre las concentraciones de CI. Pero si se analiza la intensidad media de fluorescencia (IMF), se puede observar que existen diferencias significativas entre los tratamientos, lo que significa que hay células que endocitaron más de una partícula (**Anexo 3, Figura 2**). Las imágenes de microscopía confocal permitieron la visualización de las partículas endocitadas en el citosol de las células ZFL y HKM (**Figura 2B y 3B (i)**), y las imágenes 3D demostraron la internalización completa de los CI (**Figura 2B y 3B (ii - iv)**).

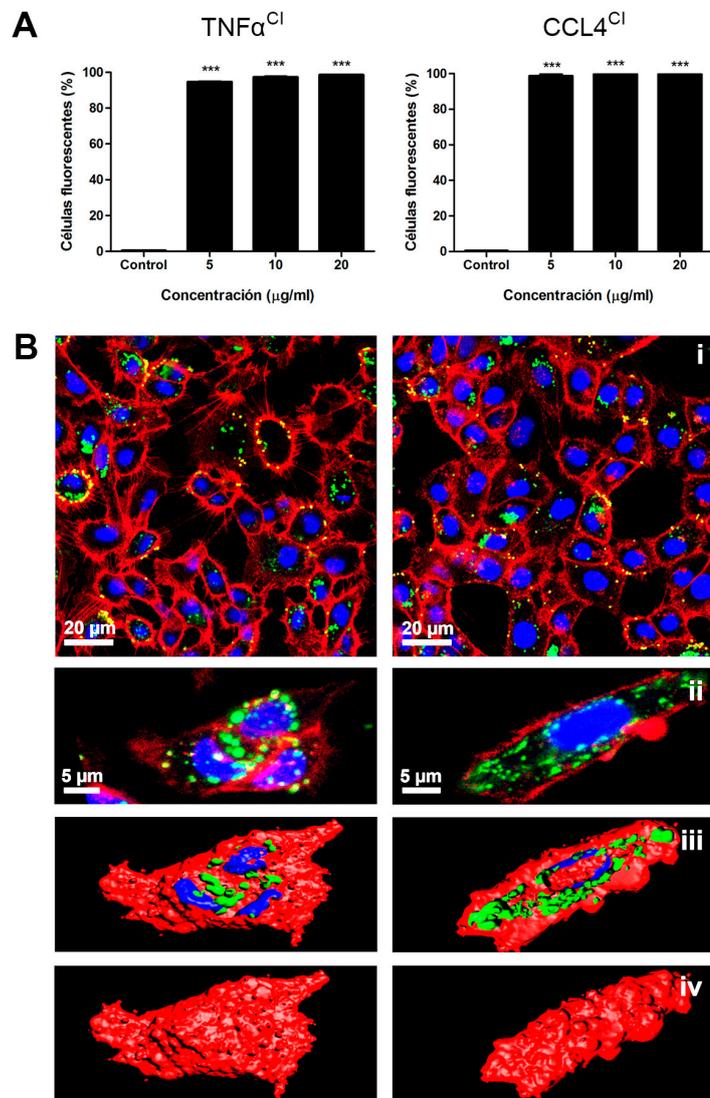


Figura 2. Endocitosis de TNF α ^{Cl} y CCL4^{Cl} por las células ZFL.

A) Dosis respuesta. Las células fueron incubadas con 5 a 20 $\mu\text{g/ml}$ de TNF α ^{Cl} y CCL4^{Cl} durante 12 h. Los datos representan el promedio y la desviación estándar ($n = 3$). Las diferencias fueron analizadas por ANOVA de una vía y luego con el test de Tukey, respecto al control: ***, $p < 0,0001$. **B)** Imágenes de microscopía confocal de la endocitosis de TNF α ^{Cl} y CCL4^{Cl} (verde) por las células ZFL (i). Las células fueron incubadas durante 12 h con 10 $\mu\text{g/ml}$ de TNF α ^{Cl} y CCL4^{Cl}. Las membranas de las células son mostradas en rojo y los núcleos en azul (ii). Imágenes digitalizadas de las mismas células con un corte en el eje Z (iii) y con la membrana completa (iv).

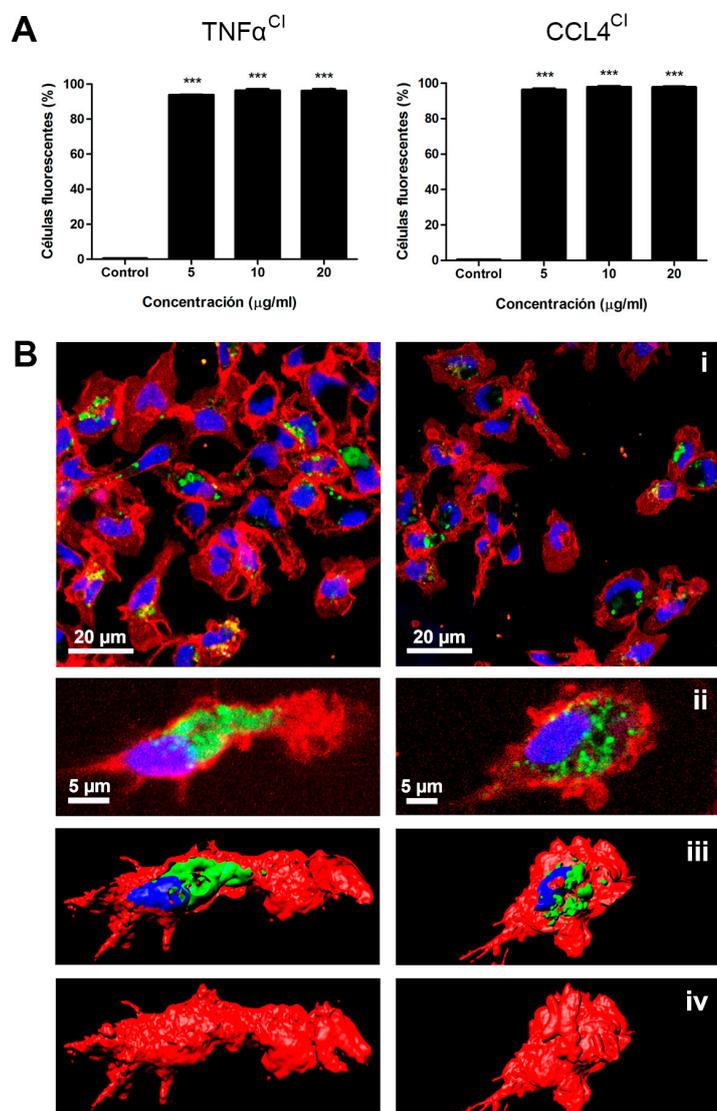


Figura 3. Endocitosis de TNF α ^{Cl} y CCL4^{Cl} por las células HKM.

A) Dosis respuesta. Las células fueron incubadas con 5 a 20 $\mu\text{g/ml}$ de TNF α ^{Cl} y CCL4^{Cl} durante 12 h. Los datos representan el promedio y la desviación estándar ($n = 3$). Las diferencias fueron analizadas por ANOVA de una vía y luego con el test de Tukey, respecto al control: ***, $p < 0,0001$. B) Imágenes de microscopía confocal de la endocitosis de TNF α ^{Cl} y CCL4^{Cl} (verde) por las células HKM (i). Las células fueron incubadas durante 12 h con 10 $\mu\text{g/ml}$ de TNF α ^{Cl} y CCL4^{Cl}. Las membranas de las células son mostradas en rojo y los núcleos en azul (ii). Imágenes digitalizadas de las mismas células con un corte en el eje Z (iii) y con la membrana completa (iv).

Bioactividad de TNF α ^{CI} y CCL4^{CI}

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los CI para activar la respuesta inmune en células inmunitarias específicas, estimulamos macrófagos de trucha arcoíris (HKM) con TNF α ^{CI}, iRFP-H6^{CI}, como un control de un CI formado con una proteína sin un papel inmunológico, y LPS como activador típico de la respuesta inflamatoria en macrófagos de trucha [44]. El TNF α ^{CI} fue capaz de estimular a las células HKM incrementando la expresión génica de citoquinas y reguladores de la inflamación. Los resultados mostraron que el tratamiento de TNF α ^{CI} estimula la expresión de citoquinas proinflamatorias, como: TNF α , IL-6, IL-1 β e interleuquina 8 (IL-8) (**Figura 4**). Además, se analizaron los genes relacionados con la modulación del proceso de inflamación, la inhibición de la señalización del receptor de citoquinas y la remodelación de la matriz extracelular como, la ciclooxigenasa 2 (COX-2), el péptido antimicrobiano caticelidina 1 (CAMP1), el supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3) y la metalopeptidasa de la matriz 9 (MMP9). El TNF α ^{CI} fue capaz de incrementar la expresión génica de estos genes a diferentes concentraciones, pero no de una manera dependiente de la dosis (**Figura 4**). El TNF α es una proteína que cumple una función inmunológica en trucha a diferencia de iRFP, esta diferencia en la funcionalidad de los CI no se refleja en la expresión génica. Sin embargo, TNF α ^{CI} fue capaz de inducir un aumento en la expresión génica, similar al producido por el LPS comercial. Se obtuvieron resultados similares cuando las células HKM fueron estimuladas con CCL4^{CI} pero a dosis menores. Los resultados mostraron que CCL4^{CI} fue capaz de inducir la expresión génica de todos los genes analizados. La expresión génica fue significativamente diferente en comparación con el LPS y el iRFP-H6^{CI}, en el caso de IL-6, SOCS3 y CAMP1 (**Anexo 3, Figura 1**), aunque, este fenómeno no se observa en otros genes como, TNF α , IL-1 β , IL-8, COX-2 y MMP9.

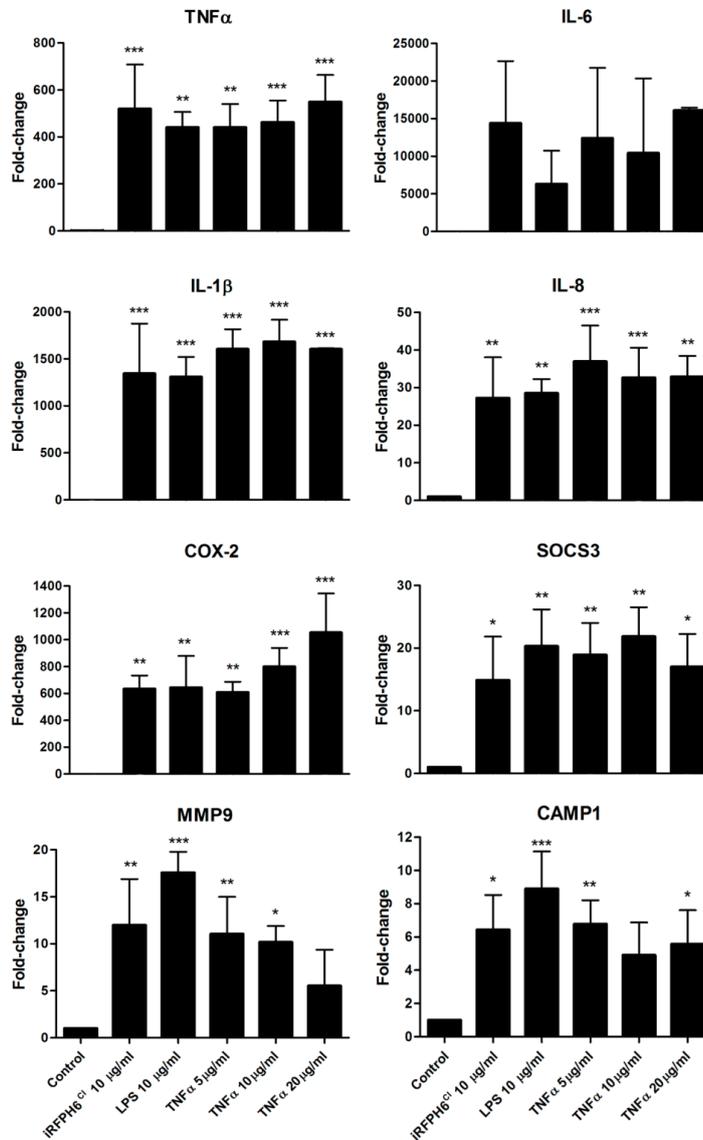


Figura 4. Análisis de expresión génica en células HKM estimuladas con iRFP-H6^{Cl}, LPS y TNFα^{Cl}.

Las células fueron cultivadas con 10 μg/ml de iRFP-H6^{Cl}, 10 μg/ml de LPS y 5, 10 y 20 μg/ml de TNFα^{Cl} durante 12 h. La expresión génica fue analizada a través de Q-PCR. Los valores representan el promedio y la desviación estándar (n = 4). Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey, respecto al control: *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

Biodistribución de TNF α ^{Cl} *in vivo* en trucha

A continuación, para estudiar si TNF α ^{Cl} es capaz de llegar *in vivo* a las APCs, como los macrófagos, inyectamos truchas con TNF α ^{Cl} marcados covalentemente con un marcador fluorescente (Atto488). En estos experimentos, decidimos trabajar sólo con TNF α ^{Cl}, ya que como se mencionó anteriormente el rendimiento de la purificación TNF α ^{Cl} fue mayor que el de CCL4^{Cl}, y podíamos obtener las cantidades necesarias para trabajar con animales de mayor tamaño, como la trucha arcoíris. En el experimento por citometría de flujo, las células fluorescentes fueron detectadas significativamente en el bazo a las 48, 72 y 96 h ($p < 0,0001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$, respectivamente) después de la inyección (**Figura 5A**). También se encontraron células fluorescentes en el riñón anterior a los mismos tiempos (**Figura 5A**), aunque, a niveles más bajos que en el bazo (p. ej., a las 48 h después de la inyección, el porcentaje de células fluorescentes en el bazo fue de $78 \pm 7,5$ %, mientras que en el riñón anterior fue de un $22,9 \pm 2,4$ %, $p < 0,0001$). El número total de células fluorescentes detectadas, tanto en el bazo como en el riñón anterior, disminuyó a lo largo del tiempo (**Figura 5A**), pero las células fluorescentes pudieron ser detectadas hasta 10 días después de la inyección (datos no mostrados). La presencia de TNF α ^{Cl} en los macrófagos del bazo y del riñón anterior también fue detectada por microscopía confocal a las 48, 72 y 96 h después de la inyección (**Figura 5B y 5C(i)**). Una vez más, el número de macrófagos positivos a TNF α ^{Cl} en el riñón anterior fue menor que en los fagocitos del bazo (**Figura 5B y 5C (i)**). La internalización completa de las nanopartículas, y su ubicación en el citoplasma de las células, se demostró con la tinción en paralelo de la membrana de los monocitos y los macrófagos (**Figura 5B y 5C (i - iii)**).

Adicionalmente, evaluamos la expresión génica de citoquinas proinflamatorias y moléculas presentadoras de antígenos en los tejidos del bazo y del riñón anterior, a las 48, 72 y 96 h después de la inyección de TNF α ^{Cl}. En general, se observó un aumento de la expresión génica de citoquinas proinflamatorias como, TNF α , IL-1 β e IL-8 principalmente a las 48 y 72 h después de la inyección, tanto en bazo como en el riñón anterior (p. ej., a las 48 h se observó la expresión de IL-1 β , $13,9 \pm 6,1$ *fold-change*, $p < 0,0001$ y $14 \pm 2,9$ *fold-change*, $p < 0,0001$, respectivamente) (**Anexo 3, Figura 3**). En cuanto a las moléculas presentadoras de antígeno como, clúster de diferenciación 4 (CD4), clúster de diferenciación 8 alfa (CD8 α) y clúster de diferenciación 209 (CD209), fueron expresadas al alza en el bazo, principalmente a las 48 y 72 h después de la inyección (p. ej., CD8 α $2,6 \pm 0,6$ *fold-change*, $p < 0,0001$ a las 72 h).

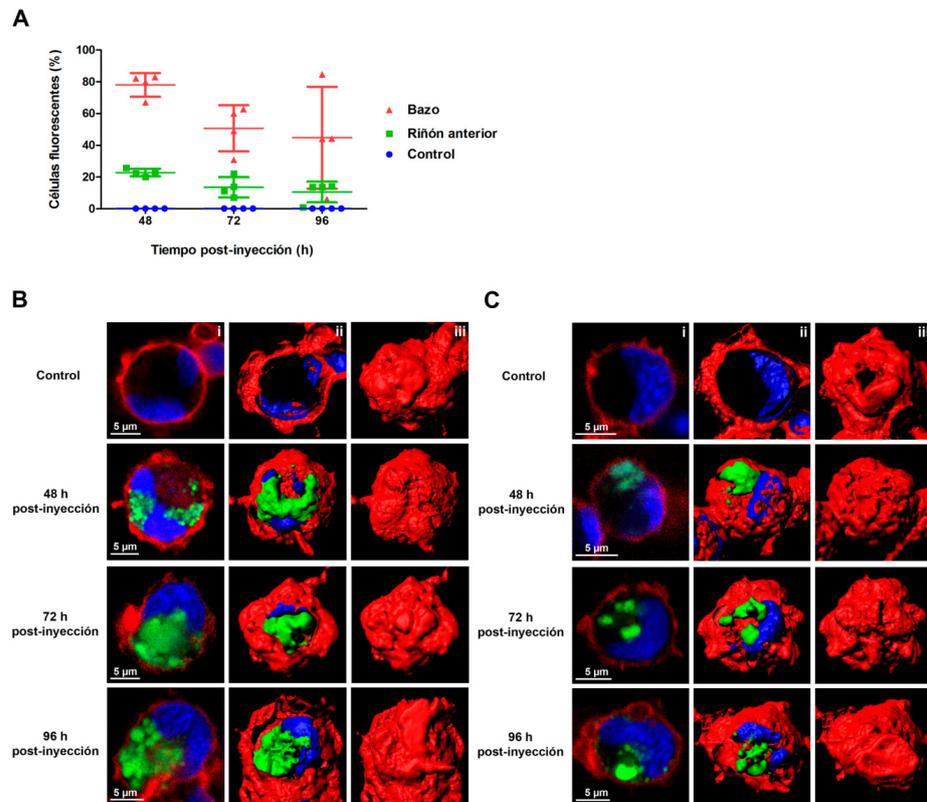


Figura 5. Endocitosis *in vivo* de $TNF\alpha^{Cl}$ por células fagocíticas del bazo y del riñón anterior de trucha arcoiris.

A) Cuantificación de $TNF\alpha^{Cl}$ por fagocitos del bazo y del riñón anterior a las 48, 72 y 96 h después de la inyección. Los valores representan el promedio y la desviación estándar ($n = 4$). Imágenes de microscopía confocal de fagocitos del bazo **B**) y del riñón anterior **C**) a las 48, 72 y 96 h después de la inyección. (i) Imágenes de células que han endocitado $TNF\alpha^{Cl}$, (ii) imágenes de las mismas células con un corte en el eje Z (iii) y con la membrana completa.

Por otro lado, en riñón anterior, se observó un aumento de la expresión de CD8 α , clúster de diferenciación 11 beta (CD11 β) y CD209, principalmente a las 48 y 72 h después de la inyección (p. ej., CD11 β $3 \pm 0,4$ *fold-change*, $p < 0,0001$). Además, evaluamos la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II (MHC I y II). Los resultados mostraron un aumento de la expresión de MHC I en riñón anterior a las 48 h post-inyección ($4,7 \pm 2,6$

fold-change, $p < 0,05$), pero no observamos diferencias significativas en la expresión de MHC II en bazo ni en riñón anterior (datos no mostrados).

Inmunización *in vivo* con $\text{TNF}\alpha^{\text{Cl}}$ y CCL4^{Cl} protege al pez cebra contra de un desafío letal con *P. aeruginosa*

A continuación, se evaluó si $\text{TNF}\alpha^{\text{Cl}}$, CCL4^{Cl} e $\text{iRFP-H6}^{\text{Cl}}$ eran capaces de proteger al pez cebra contra un desafío letal modelo de *P. aeruginosa*. Los resultados mostraron altas tasas de supervivencia de los peces con $\text{TNF}\alpha^{\text{Cl}}$ y CCL4^{Cl} (**Figura 6A**) y los niveles de protección se mantuvieron significativamente altos con la mitad de la dosis de $\text{TNF}\alpha^{\text{Cl}}$, mostrando una protección dependiente de la dosis (**Anexo 3, Figura 4**). Por otro lado, la viscosidad de la solución de CCL4^{Cl} no permitió que se pudiera utilizar una dosis más alta. Sin embargo, con la cuarta parte de la dosis de $\text{TNF}\alpha^{\text{Cl}}$, obtuvimos altos niveles

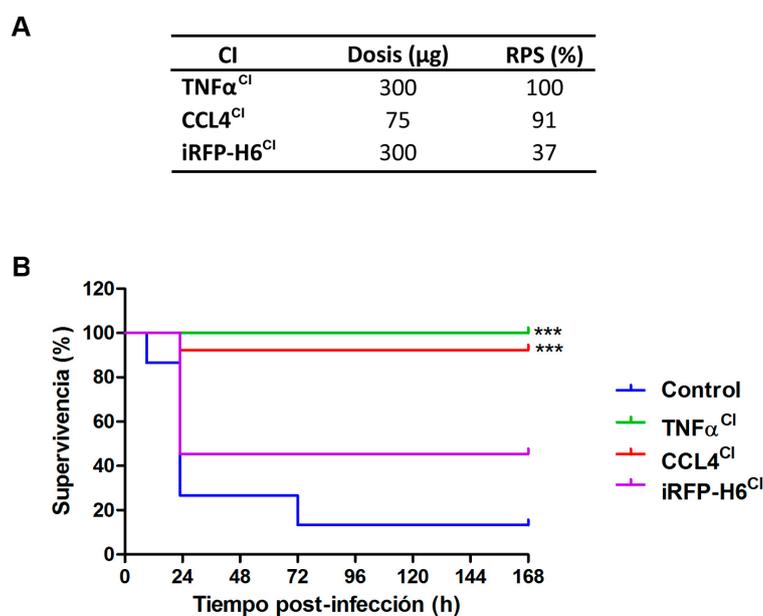


Figura 6. **Supervivencia del pez cebra después de una inyección i.p. de $\text{TNF}\alpha^{\text{Cl}}$, CCL4^{Cl} e $\text{iRFP-H6}^{\text{Cl}}$ y posterior desafío con *P. aeruginosa*.**

A) Porcentaje de supervivencia relativo (RPS). **B)** El pez cebra fue inyectado i.p. con $\text{TNF}\alpha^{\text{Cl}}$, CCL4^{Cl} e $\text{iRFP-H6}^{\text{Cl}}$ y desafiado con *P. aeruginosa* PAO1 (LD_{50}) (4×10^7 ufc/dosis) ($n = 15$). Las dosis de $\text{TNF}\alpha^{\text{Cl}}$ e $\text{iRFP-H6}^{\text{Cl}}$ fueron de 300 μg y de 75 μg para CCL4^{Cl} . Peces no tratados fueron inyectados con PAO1 (LD_{50}) y usados como control de mortalidad.

Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando la prueba de Log-rank, ***, $p < 0,0001$.

de protección (supervivencia del 92 % con CCL4^{Cl} a 75 µg en comparación con una supervivencia del 100 % de TNFα^{Cl} a 300 µg). Además, cuando se comparó con iRFP-H6^{Cl}, los resultados mostraron diferencias significativas con los CI de citoquinas (TNFα^{Cl}, $p < 0,01$ y CCL4^{Cl}, $p < 0,05$) (**Figura 6**), y esta diferencia se mantuvo a una dosis menor (150 µg de CI/pez) (**Anexo 3, Figura 4**).

Análisis de la estabilidad de las nanopartículas

Está bien documentado que los CI son estables en una amplia gama de condiciones *in vitro*, por ejemplo, a diferentes temperaturas (-80 °C, 4 °C, 25 °C y 37 °C) o en condiciones de liofilización (durante 12 h a -80 °C) [3]. Dado que el objetivo final era el uso de los CI para su administración por vía oral en peces, hemos caracterizado su estabilidad en las condiciones de pH presentes en el tracto gastrointestinal de la trucha durante el proceso digestivo [45], en condiciones de alta temperatura, simulando un paso de la producción del alimento de peces, y en condiciones de liofilización para su almacenamiento a largo plazo. En general, se observó una morfología similar de TNFα^{Cl} entre los tratamientos de pH y temperatura, y sus respectivos controles (**Figura 7A y B**). Los resultados mostraron que la distribución del diámetro y la longitud fueron similares entre los tratamientos de pH y control (**Figura 7A (ii - iii)**). Sólo encontramos diferencias significativas en el diámetro y la longitud entre el tratamiento de temperatura (diámetro: $666,2 \pm 84,2$ nm, prueba t de Student, $p < 0,0001$; longitud: $947,1 \pm 186,4$ nm, prueba t de Student, $p < 0,0001$) y el control (diámetro: $623,3 \pm 105$ nm longitud: $1134,6 \pm 196,6$ nm) (**Figura 7B (ii - iii)**).

Figura 7 (página siguiente). **Caracterización de la estabilidad de los cuerpos de inclusión bajo condiciones extremas de pH y temperatura.**

Imágenes de FESEM de TNFα^{Cl} (i) a diferentes pH **A**) simulando las condiciones del tracto gastrointestinal de peces (pH 2,5 durante 3 h y luego pH 8 durante 6 h) y de altas temperaturas y **B**) imitando un paso de la producción del alimento de peces (100 °C durante 30 s) y la distribución del tamaño, diámetro **(ii)** y longitud **(iii)**. C) Porcentaje de células fluorescentes e intensidad media de fluorescencia (IMF) en HKM después de una estimulación con TNFα^{Cl}-Atto488 previamente incubadas a pH 2,5 durante 3 h y luego pH 8 durante 6 h.

Una de las hipótesis que podría explicar el acortamiento de las nanopartículas, es que la temperatura afectaba a los CI, provocando la liberación de proteínas de las nanoestructuras. Para probar esta hipótesis se comprobó la presencia de la proteína en los sobrenadantes de las muestras sometidas a altas temperaturas, y el western blot confirmó que no había proteínas presentes en los sobrenadantes (datos no mostrados). No obstante, de las diferencias de tamaño, los CI de las diferentes condiciones analizadas fueron capaces de estimular la expresión génica de los genes relacionados con la respuesta inmune, al mismo nivel que los CI del control (**Anexo 3, Figura 5**).

También fue evaluado si los TNF α ^{CI} fluorescentes (TNF α ^{CI}-Atto488) eran capaces de mantener estables los niveles de fluorescencia, después de una incubación a diferentes pH. Como se muestra en la **Figura 7C**, las células HKM fueron capaces de endocitar los TNF α ^{CI}-Atto488, tratados a diferentes pH, sin diferencias con respecto al control. Es importante destacar, que la intensidad media de fluorescencia (IMF) fue la misma después del tratamiento de pH. Esto nos permite utilizar TNF α ^{CI}-Atto488 para su administración por vía oral *in vivo* en trucha arcoíris, ya que presumiblemente los niveles de marcaje fluorescente no se verán alterados. Finalmente, analizamos la estabilidad del TNF α ^{CI} después de la liofilización y los resultados mostraron, que la morfología de TNF α ^{CI} no fue modificada después del tratamiento, y que mantuvieron la porosidad (**Figura 8 (i)**) y el tamaño (**Figura 8 (ii - iii)**). Por último, el procedimiento de liofilización tampoco afectó a la capacidad de TNF α ^{CI}, para proteger al pez cebra contra un desafío letal con *P. aeruginosa*. La supervivencia de los animales inyectados con TNF α ^{CI} liofilizados y no liofilizados no mostró diferencias significativas (83 % de RPS y 62 % de RPS, respectivamente) (**Figura 8B**).

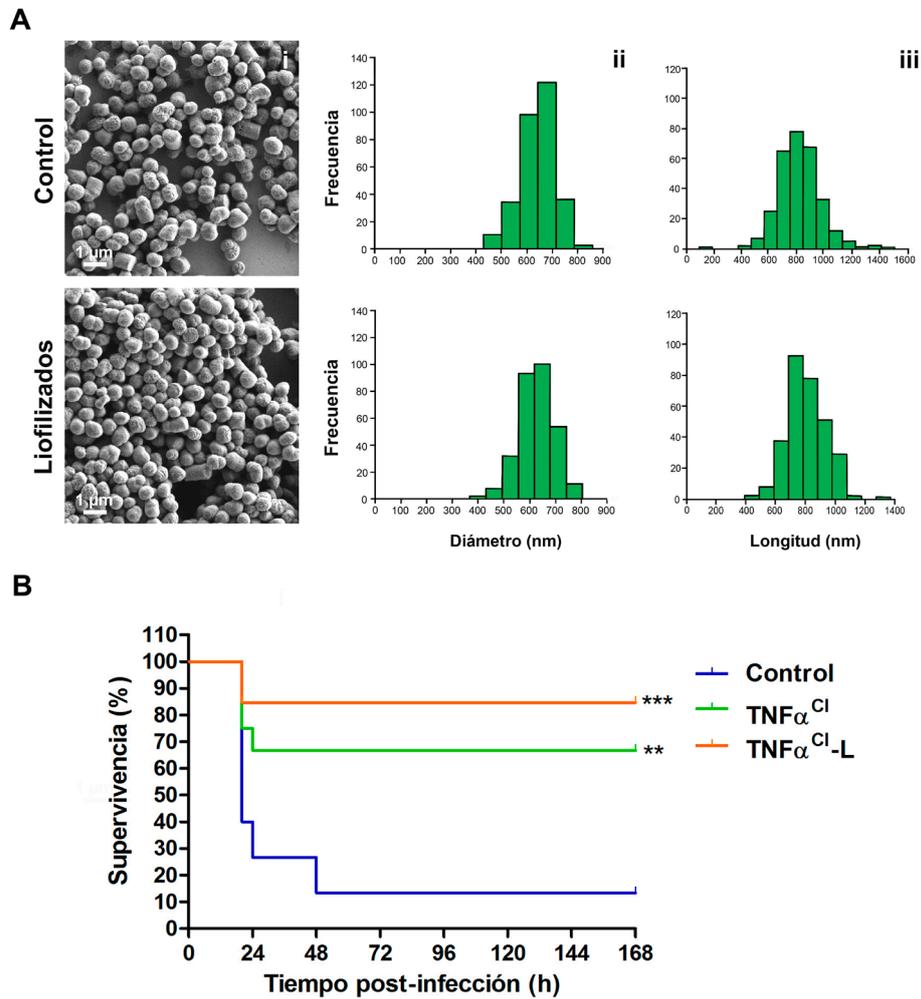


Figura 8. **Caracterización de TNF α^{CI} liofilizados.**

A) Imágenes de FESEM de TNF α^{CI} liofilizados (i) y la distribución del tamaño de los CI, diámetro (ii) y longitud (iii). B) Supervivencia del pez cebra después de una inyección i.p. de TNF α^{CI} y TNF α^{CI} liofilizado (TNF α^{CI} -L) (300 μ g/pez) y posterior desafío con *P. aeruginosa* PAO1 (LD₅₀) (3,4x10⁷ ufc/dosis) (n = 15). Peces no tratados fueron inyectados con PAO1 (LD₅₀) y usados como control de mortalidad. Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando la prueba de Log-rank: **, p<0,01; ***, p<0,0001.

Absorción en la mucosa intestinal de TNF α ^{CI} administrado oralmente

Hemos demostrado una excelente estabilidad mecánica y funcional *in vitro* de TNF α ^{CI}, en condiciones que imitan el tráfico de comida a través del tracto gastrointestinal de trucha. El siguiente paso, fue evaluar si los TNF α ^{CI} administrados por vía oral, podrían alcanzar el tejido de la mucosa intestinal y las células de la mucosa intestinal. Truchas adultas fueron intubadas y se les administró TNF α ^{CI}-Atto488 dentro del estómago. Transcurridas 24 h, se diseccionó el intestino, para realizar un análisis por citometría y microscopía confocal. Para estos análisis se trabajó con el apéndice pilórico y los segmentos del intestino medio, porque éstas son las principales secciones donde se absorben los nutrientes durante la digestión en la trucha [40]. Con respecto al análisis por citometría de flujo se agruparon las células del apéndice pilórico y el intestino medio y se detectó que el $20,2 \pm 7,4$ % de las células eran fluorescentes ($p < 0,001$) (**Figura 9A**). Este es un porcentaje elevado, teniendo en cuenta que ningún tipo de célula fue seleccionado por otros medios (p. ej., mediante el marcaje de anticuerpos específicos o por clasificación de células por forma, tamaño o expresión de proteínas en la superficie). Las imágenes de las secciones del tejido de intestino permite la visualización de los CI, tanto en las células del apéndice pilórico como en el intestino medio (**Figura 9B**). En el apéndice pilórico, la presencia de los TNF α ^{CI}-Atto488 fue cualitativamente más abundante que en el intestino medio. Las células positivas en el apéndice pilórico se encuentran principalmente en la base de las vellosidades y en la submucosa (**Figura 9B (ii-iii)**). En cambio, en las secciones del intestino medio, los TNF α ^{CI}-Atto488 se observaron principalmente en las células del ápice de las vellosidades y en la lámina propia (**Figura 9B (ii-iii)**). Los CI detectados en las células presentes en la mucosa intestinal, formaron aglomerados intracelulares de diferentes tamaños, tanto en el apéndice pilórico como en el intestino medio.

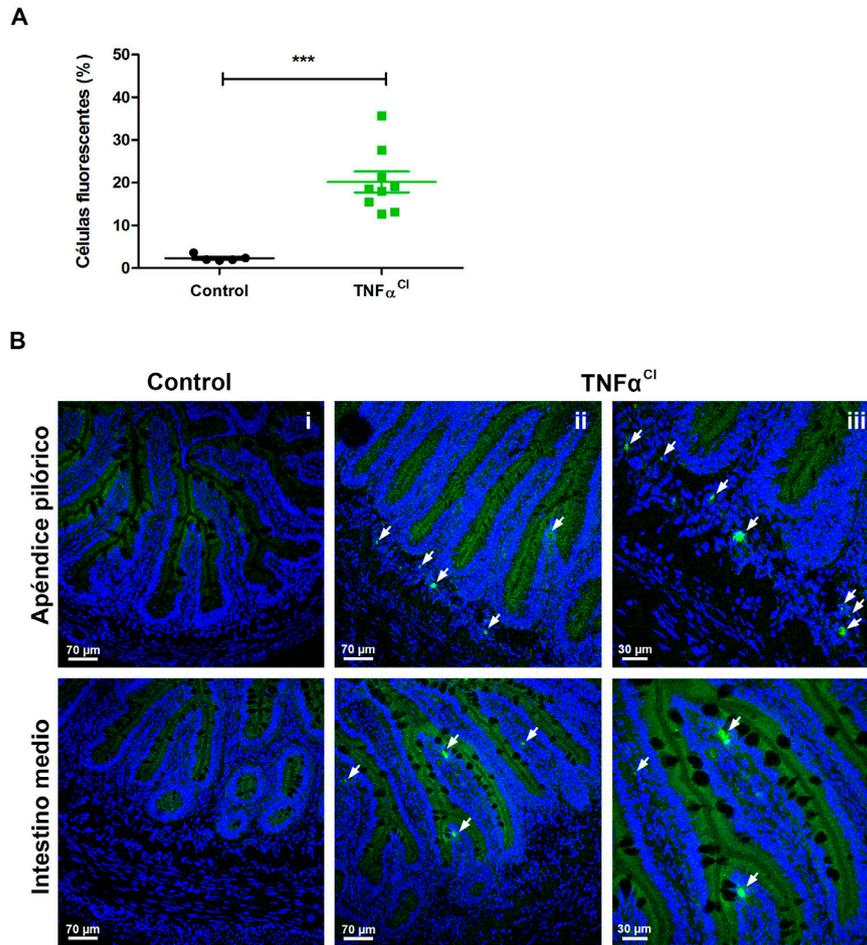


Figura 9. **Endocitosis *in vivo* de TNF α^{Cl} por células intestinales de trucha arcoíris.**

A) Porcentaje de células intestinales fluorescentes de trucha intubadas con TNF α^{Cl} -Atto488 después de 24 h. B) Imágenes de microscopía confocal de células intestinales del apéndice pilórico y del intestino medio 24 h después de la intubación; (i) control, (ii) TNF α^{Cl} -Atto488 y (iii) un mayor aumento de TNF α^{Cl} -Atto488. Las flechas blancas indican la presencia de TNF α^{Cl} -Atto488. Los valores representan el promedio y la desviación estándar (Control, n = 5 animales, TNF α^{Cl} , n = 9 animales). Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey, respecto al control: ***, p<0,001.

Discusión

El desarrollo de una acuicultura sostenible está asociado con el desarrollo de nuevas estrategias de profilaxis que disminuyan las pérdidas derivadas de las enfermedades [50]. Estas nuevas estrategias deberían contemplar la disminución de la manipulación de los animales, la protección en contra de más de un patógeno, en la medida de lo posible, tener un bajo coste de producción y de administración. Las citoquinas recombinantes son una alternativa atractiva, han sido utilizadas ampliamente como adyuvantes y agentes terapéuticos, ya que están implicadas en la patogénesis de muchas enfermedades. No obstante, presentan desventajas, como una vida media relativamente corta y una producción cara, cuando el volumen de producción es elevado. En base a esto, proponemos el uso de CI de citoquinas como TNF α y CCL4, como una nueva forma de inmunoestimulación del sistema inmune en peces.

Los resultados demuestran que los CI al ser inyectados i.p., son capaces de llegar y acumularse en órganos inmunes relevantes como el bazo y el riñón anterior, y en células inmunes como, monocitos/macrófagos. Las nanopartículas se acumularon principalmente en el bazo, y en menor medida en el riñón anterior. Estos resultados son consistentes con el hecho de que el bazo es el principal órgano de filtración para la eliminación de agentes extraños [51], y que junto con el riñón anterior, son los principales órganos linfoides en teleósteos [52]. Además, determinamos que después de una inyección i.p. de los CI, éstos fueron endocitados por macrófagos y monocitos, obtenidos desde el bazo y el riñón anterior, órganos donde los fagocitos son más abundantes [53, 54]. Adicionalmente, se observó una mayor concentración de CI en el bazo, el principal órgano donde tiene lugar la presentación de antígenos en teleósteos [54]. En trabajos anteriores demostramos, que los nanoliposomas cargados con LPS y poly (I:C), también se acumulan preferentemente en el bazo, en comparación con el riñón anterior [47]. Nanopartículas de ácido poli (lactico-co-glicólico) (PLGA), cargadas con β -glucano, también son capaces de llegar a los macrófagos del riñón anterior e inducir una respuesta humoral en el salmón [55].

Los CI tienen la capacidad de incrementar la expresión génica de genes relacionados con la respuesta inflamatoria en macrófagos de trucha, esto demuestra que los CI podrían estimular una respuesta inmunológica y que no son nanopartículas inertes. Los resultados mostraron una mayor respuesta en CCL4^{CI} que en iRFP-H6^{CI}, lo que indica, que la presencia de una proteína con un rol

inmunológico (en este caso una quimioquina), puede aumentar la repuesta inflamatoria producida por los CI. A su vez, los CI también fueron capaces de estimular una respuesta inmunológica cuando se administraron i.p. en trucha, observándose un aumento de la expresión génica de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 β e IL-8) en el bazo y el riñón anterior. Adicionalmente, estimularon la expresión de moléculas presentadoras de antígenos, como: CD4, CD8 α , CD11 β , CD209 y MHCI. Esto demuestra el potencial de los CI como activadores del sistema inmune y de las APCs, esta estimulación es crítica para el desarrollo de una respuesta inmunológica efectiva y para conseguir niveles de protección adecuados.

Los CI de TNF α y CCL4 fueron capaces de proteger al pez cebrá contra una infección bacteriana letal. El CCL4^{CI} confirió una protección similar a la de TNF α ^{CI} pero sólo con una cuarta parte de la dosis de ésta, lo que podría ser explicado por la mayor presencia de restos bacterianos purificados junto con CCL4^{CI}, o debido al hecho de que la actividad estimuladora de CCL4^{CI} fuera intrínsecamente más potente que la de TNF α ^{CI}. El TNF α ^{CI} y el CCL4^{CI} confieren mayores tasas de supervivencia en comparación con los CI evaluados en trabajos anteriores (**ver Capítulo 2**); así con los VP1GFP (ClpA⁻)^{CI}, fabricados con una proteína modular que contiene la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a la proteína VP1 de la cápside del virus de la fiebre aftosa, se obtuvieron RPS del 76 % a una dosis de 300 μ g (**ver Capítulo 2**). Esta supervivencia es inferior a la obtenida en el presente estudio, de hecho, la capacidad protectora de TNF α recombinante soluble (TNF α r) producida en levadura ha sido evaluada en lubina (*Dicentrarchus labrax*), donde fue administrada oralmente, junto con una vacuna comercial contra *V. anguillarum* obteniéndose un RPS de 84 % (la vacuna comercial + TNF α r) [30]. Estos resultados demuestran el potencial de TNF α para mejorar la respuesta inmune en peces. La protección conferida por los CI podría ser debido a su nanoestructuración, combinada con la alta complejidad de su composición (LPS, lípidos, PGN, ácidos nucleicos y la proteína recombinante).

Los CI son nanopartículas proteicas que presentan varias propiedades, las cuales se pueden utilizar para mejorar la inmunoestimulación en peces. Desde el punto de vista comercial es importante demostrar la viabilidad de la producción de los CI en términos de estabilidad. En este contexto, los CI mantienen su estabilidad y funcionalidad después de incubaciones a diferentes condiciones de pH y de temperatura, lo que demuestra que los CI de citoquinas recom-

binantes no requieren de sistemas de encapsulación adicionales, ya que son extremadamente estables en su conformación nanoestructurada. Esto supone una gran diferencia con las citoquinas nativas, que son extremadamente inestables (vida media de minutos) y, a menudo, cuando se desea la administración oral, deben ser diseñadas en combinación con sistemas de nanoencapsulación adicionales que proporcionen protección *in vivo*. Además, los CI no sufrieron modificaciones en sus propiedades después de la liofilización, lo que indica que no requieren del mantenimiento de la cadena de frío durante su envío y almacenaje, ni tampoco la adición de compuestos que mantengan la estabilidad de las proteínas durante el proceso de liofilización. Todas estas características reducirían el coste de producción y proporcionarían un fácil manejo. La estabilidad estructural y funcional junto con la versatilidad de los CI los postulan como una excelente opción de inmunoestimulante para ser administrados oralmente.

La administración oral en acuicultura es el método más adecuado para ser utilizado en masa, en comparación con la administración por inyección y por inmersión. La principal desventaja que presenta la administración oral es que suele perder efectividad por la destrucción parcial o completa del antígeno en el tracto intestinal. Los CI, como se ha demostrado, resisten los cambios de pH y mantienen su actividad, siendo una conveniente alternativa. Adicionalmente, la presencia de un sistema inmune mucosal potente en peces, hace de la administración oral una estrategia prometedora, ya que el primer contacto con los patógenos ocurre a través de las superficies de la mucosa [56]. El principal tejido inmune relacionado con la endocitosis y procesamiento de los antígenos administrados oralmente es el tejido linfoide asociado al intestino (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT). La inmunización oral provoca la activación de linfocitos T y B y la producción de anticuerpos en las secreciones mucosas (moco de la piel, del intestino o de la bilis) [40, 57]. Los teleósteos poseen todas las células inmunes necesarias para una respuesta inmune local (p. ej., células linfoides, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos) [58]. En mamíferos y en teleósteos los principales sitios efectores se encuentran en la lamina propria y en los compartimentos de linfocitos intraepiteliales (*intraepithelial lymphocytes*, IELs), mientras que, el sitio clásico efector (*Peyer's patches* y ganglios linfáticos mesentéricos, MLNs), ha sido descrito solo en mamíferos [38]. Los peces no poseen estas estructuras, pero tienen APCs que también han sido descritas como un sitio alternativo de inducción [59]. De acuerdo con nuestros resulta-

dos detectamos nanopartículas fluorescentes en la sección del apéndice pilórico, más específicamente, en la base de las vellosidades y en la submucosa y, además, en el intestino medio, en la lamina propia y en el ápice de las vellosidades, donde los IELs estarían localizados. En el intestino medio, los enterocitos que forman las vellosidades, se caracterizan por tener una alta actividad pinocítica [40], y una fuerte absorción de macromoléculas (p. ej., peroxidasa de rábano picante o *horseradish peroxidase*, HRP) [60]. En otros estudios, nanopartículas de PLGA [61] y alginato cargadas con *V. anguillarum* [56] han sido detectadas en enterocitos del intestino medio de trucha y carpa, respectivamente. La fuerte capacidad de absorción del intestino medio tiene un valor inmune, ya que se ha demostrado que los antígenos podrían ser transportados hacia el sistema inmunológico local, así como el sistémico [56]. En base a estos resultados, los CI podrían haber sido captados en el apéndice pilórico y el intestino medio, quizás por IELs y las APCs y almacenados intracelularmente, probablemente estimulando la respuesta inmune mucosal. La nanoestructuración y la estabilidad de los CI, junto con su absorción por las células intestinales, abren la posibilidad de su uso como un inmunoestimulante de administración oral.

Conclusiones

En este trabajo producimos CI de citoquinas altamente nanoestructurados, funcionales y estables, los cuales pueden ser utilizados en acuicultura con fines profilácticos, sin la necesidad de encapsulación. Estas citoquinas, TNF α ^{CI} y CCL4^{CI}, interactúan con células inmunes y tejidos relevantes, cuando son administrados por inyección intraperitoneal o por vía oral, y otorgan *in vivo* excelentes niveles de protección contra un modelo de infección letal. Esta nueva aplicación a este nanomaterial abre la puerta a usar las citoquinas recombinantes con fines terapéuticos de una manera más eficiente y coste-efectiva en acuicultura.

Referencias

- [1] S. Ohtake y T. Arakawa. **Recombinant therapeutic protein vaccines.** *Protein Pept. Lett.*, vol. 20, no. 12, pp. 1324–1344, 2013.
- [2] R. M. Bill. **Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: A role for yeast?** *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 67, no. 3, pp. 319–328, 2015.
- [3] E. García-Fruitós, E. Rodríguez-Carmona, C. Díez-Gil, R. M. Ferraz, E. Vázquez, J. L. Corchero, M. Cano-Sarabia, I. Ratera, N. Ventosa, J.

- Veciana, y A. Villaverde. **Surface cell growth engineering assisted by a novel bacterial nanomaterial.** *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 42, pp. 4249–4253, 2009.
- [4] S. Peternel, J. Grdadolnik, V. Gaberc-Porekar, y R. Komel. **Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins.** *Microb. Cell Fact.*, vol. 7, p. 34, 2008.
- [5] C. Díez-Gil, S. Krabbenborg, E. García-Fruitós, E. Vazquez, E. Rodríguez-Carmona, I. Ratera, N. Ventosa, J. Seras-Franzoso, O. Cano-Garrido, N. Ferrer-Miralles, A. Villaverde, y J. Veciana. **The nanoscale properties of bacterial inclusion bodies and their effect on mammalian cell proliferation.** *Biomaterials*, vol. 31, no. 22, pp. 5805–12, 2010.
- [6] J. Seras-Franzoso, C. Díez-Gil, E. Vazquez, E. García-Fruitós, R. Cubarsi, I. Ratera, J. Veciana, y A. Villaverde. **Bioadhesiveness and efficient mechanotransduction stimuli synergistically provided by bacterial inclusion bodies as scaffolds for tissue engineering.** *Nanomedicine (Lond.)*, vol. 7, no. 1, pp. 79–93, 2012.
- [7] G. Georgiou y P. Valax. **Isolating inclusion bodies from bacteria.** *Methods Enzymol.*, vol. 309, no. 1975, pp. 48–58, 1999.
- [8] E. García-Fruitós, J. Seras-Franzoso, E. Vazquez, y A. Villaverde. **Tunable geometry of bacterial inclusion bodies as substrate materials for tissue engineering.** *Nanotechnology*, vol. 21, no. 20, p. 205101, 2010.
- [9] E. Rodríguez-Carmona, O. Cano-Garrido, J. Seras-Franzoso, A. Villaverde, y E. García-Fruitós. **Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies.** *Microb. Cell Fact.*, vol. 9, p. 71, 2010.
- [10] F. S. B. Kibenge, M. G. Godoy, M. Fast, S. Workenhe, y M. J. T. Kibenge. **Countermeasures against viral diseases of farmed fish.** *Antiviral Res.*, vol. 95, no. 3, pp. 257–81, 2012.
- [11] S. K. Whyte. **The innate immune response of finfish--a review of current knowledge.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 23, no. 6, pp. 1127–51, 2007.
- [12] E. Bassity y T. G. Clark. **Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33196, 2012.
- [13] G. Lugo-Villarino, K. M. Balla, D. L. Stachura, K. Bañuelos, M. B. F. Werneck, y D. Traver. **Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 36, pp. 15850–15855, 2010.
- [14] O. Takeuchi y S. Akira. **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 805–820, 2010.
- [15] T. R. Mosmann y S. Sad. **The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.** *Immunol. Today*, vol. 17, no. 3, pp. 138–146, 1996.
- [16] A. Weinberg, y T. C. Merigan. **Recombinant interleukin 2 as an adjuvant for vaccine-induced protection. Immunization of guinea pigs with herpes simplex virus subunit vaccines.** *J. Immunol.*, vol. 140, pp. 294–299, 1988.

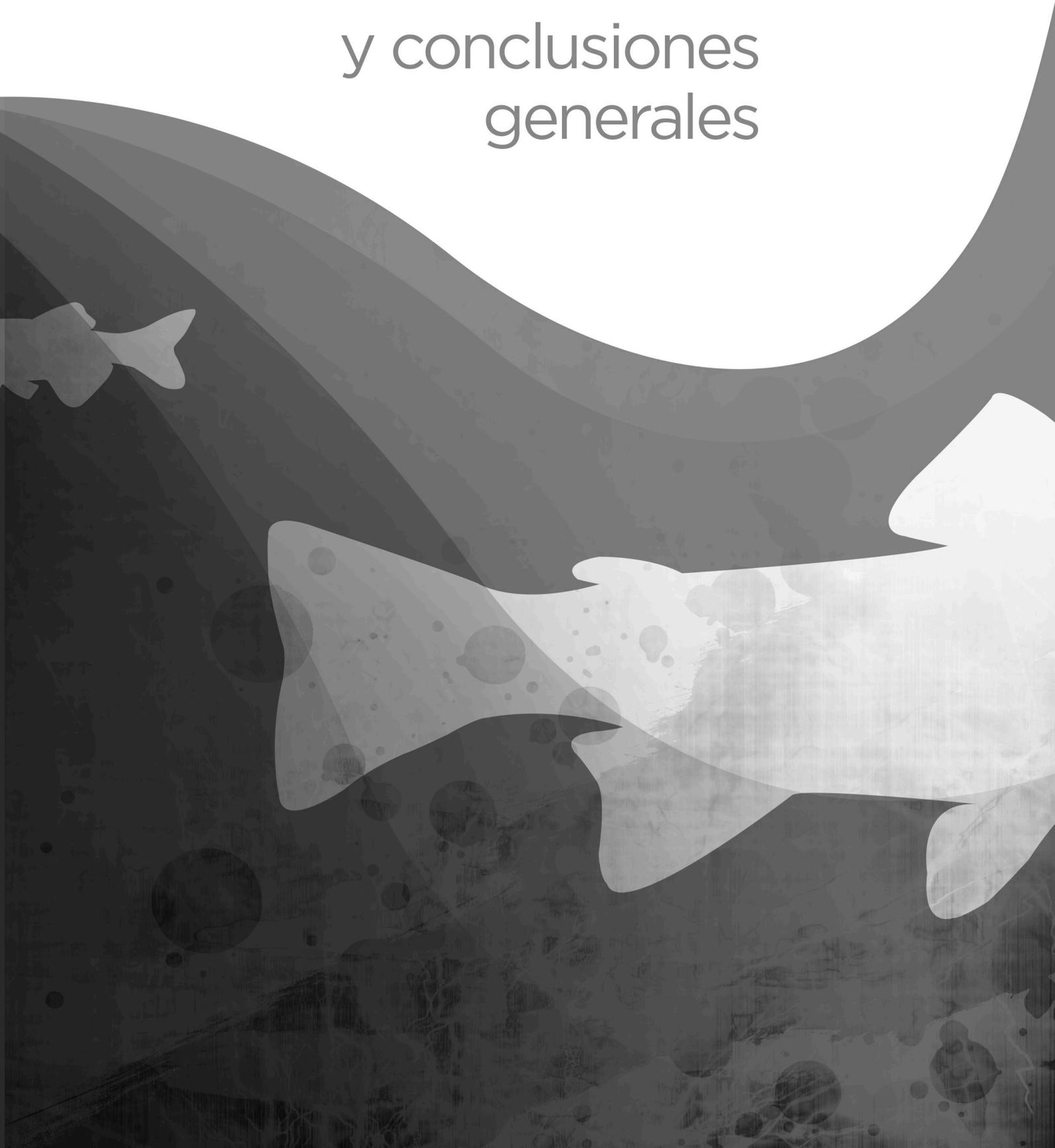
- [17] S. P. Dunham. **Cytokines and anti-cytokine therapy: clinical potential for Treatment of Feline Disease.** *Nature Journal Feline Med. Surg.*, vol. 1, pp. 7–14, 1999.
- [18] P. I. Marcus, L. van der Heide, y M. J. Sekellick. **Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon-alpha ameliorates newcastle disease.** *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 19, pp. 881–885, 1999.
- [19] A. D. Nash, S. A. Lofthouse, G. J. Barcham, H. J. Jacobs, K. Ashman, E. N. Meeusen, M. R. Brandon, y A. E. Andrews. **Recombinant cytokines as immunological adjuvants.** *Immunol. Cell Biol.*, vol. 71, no. May, pp. 367–379, 1993.
- [20] B. J. Kullberg y J. W. M. Van der Meer. **Introduction: Cytokines in the biotherapy of infectious diseases.** *Biotherapy*, vol. 7, no. 3–4, pp. 149–150, 1994.
- [21] A. Nohria y R. H. Rubin. **Cytokines as potential vaccine adjuvants.** *Biotherapy*, vol. 7, no. 3–4, pp. 261–269, 1994.
- [22] A. R. Mire-Sluis. **Cytokines: from technology to therapeutics.** *Trends Biotechnol.*, vol. 17, no. 8, pp. 319–325, 1999.
- [23] F. M. Rollwagen y S. Baqar. **Oral cytokine administration.** *Trends Immunol. Today*, vol. 17, no. 12, pp. 548–550, 1996.
- [24] R. S. Kornbluth y G. W. Stone. **Immunostimulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants.** *J. Leukoc. Biol.*, vol. 80, no. 5, pp. 1084–1102, 2006.
- [25] C. Tafalla, J. Bøgwald, y R. A. Dalmo. **Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1740–1750, 2013.
- [26] N. O. Harun, J. Zou, Y.-A. A. Zhang, P. Nie, y C. J. Secombes. **The biological effects of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant interleukin-8.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 32, no. 6, pp. 673–681, 2008.
- [27] Z. Yin y J. Kwang. **Carp interleukin-1 in the role of an immuno-adjuvant.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 10, pp. 375–378, 2000.
- [28] A. R. Bridle, P. B. B. Crosbie, R. N. Morrison, J. Kwang, y B. F. Nowak. **The immuno-adjuvant effect of carp interleukin-1 beta on the humoral immune response of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch).** *J. Fish Dis.*, vol. 25, no. 7, pp. 429–432, 2002.
- [29] T. Wang y C. J. Secombes. **The cytokine networks of adaptive immunity in fish.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1703–1718, 2013.
- [30] J. Galindo-Villegas, I. Mulero, A. García-Alcazar, I. Muñoz, M. Peñalver-Mellado, S. Streitenberger, G. Scapigliati, J. Meseguer y V. Mulero. **Recombinant TNF α as oral vaccine adjuvant protects European sea bass against vibriosis: Insights into the role of the CCL25/CCR9 axis.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 4, pp. 1260–1271, 2013.
- [31] Y. J. Hsu, C. Y. Hou, S. J. Lin, W. C. Kuo, H. T. Lin, y J. H. Y. Lin. **The biofunction of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) CC**

- chemokine ligand 4 (CCL4) in innate and adaptive immunity.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1891–1898, 2013.
- [32] Y. Alvarez, M. Tuen, G. Shen, F. Nawaz, J. Arthos, M. J. Wolff, M. a Poles, y C. E. Hioe. **Preferential HIV infection of CCR6+ Th17 cells is associated with higher levels of virus receptor expression and lack of CCR5 ligands.** *J. Virol.*, vol. 87, no. 19, pp. 10843–54, 2013.
- [33] A. L. Ferre, P. W. Hunt, J. W. Critchfield, D. H. Young, M. M. Morris, C. Juan, R. B. Pollard, H. F. Yee, J. N. Martin, S. G. Deeks, L. Barbara, J. C. Garcia, H. F. Y. Jr, y B. L. Shacklett. **Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers : a potential correlate of immune control** **Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers : a potential correlate of immune control.** *Immunobiology*, vol. 113, no. 17, pp. 3978–3989, 2009.
- [34] J. Zhang, L. Chen, X. Wei, M. Xu, C. Huang, W. Wang, y H. Wang. **Characterization of a novel CC chemokine CCL4 in immune response induced by nitrite and its expression differences among three populations of *Megalobrama amblycephala*.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 38, no. 1, pp. 88–95, 2014.
- [35] A. E. Ellis. **Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 25, no. 8–9, pp. 827–839, 2001.
- [36] D. Gomez, J. O. Sunyer, y I. Salinas. **The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1729–39, 2013.
- [37] I. Salinas, Y. A. Zhang, y J. O. Sunyer. **Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 35, no. 12, pp. 1346–1365, 2011.
- [38] D. Parra, F. E. Reyes-Lopez, y L. Tort. **Mucosal Immunity and B Cells in Teleosts: Effect of Vaccination and Stress.** *Front. Immunol.*, vol. 6, no. July, pp. 1–12, 2015.
- [39] P. D. Smith. **Oral delivery technologies to develop and implement effective life-long protection strategies.** Workshop on Fish Vaccination, Wageningen Institute of Animal Science (WAIS), Wageningen, The Netherlands, pp. 78–80, 2002.
- [40] J. H. W. M. Rombout Jan, L. Abelli, S. Picchiatti, G. Scapigliati, y V. Kiron. **Teleost intestinal immunology.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 31, no. 5, pp. 616–626, 2011.
- [41] H. Toyokawa, A. Nakao, R. J. Bailey, M. A. Nalesnik, T. Kaizu, J. L. Lemoine, A. Ikeda, K. Tomiyama, G. D. Papworth, L. Huang, A. J. Demetris, T. E. Starzl, y Murase Noriko. **Relative contribution of direct and indirect Allorecognition in developing tolerance after liver transplantation.** *Liver Transpl.*, vol. 14, no. 3, pp. 346–357, 2008.
- [42] L. Li, S. L. Lin, L. Deng, y Z. G. Liu. **Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker to protect from *Vibrio parahaemolyticus*.** *J. Fish Dis.*, vol. 36, no. 12, pp. 987–995, 2013.

- [43] A. I. de las Heras, S. Rodríguez Saint-Jean, y S. I. Pérez-Prieto. **Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 28, no. 4, pp. 562–570, 2010.
- [44] N. Roher, A. Callol, J. V Planas, F. W. Goetz, y S. A. MacKenzie. **Endotoxin recognition in fish results in inflammatory cytokine secretion not gene expression.** *Innate Immun.*, vol. 17, no. 1, pp. 16–28, 2011.
- [45] S. H. Sugiura, P. K. Roy, y R. P. Ferraris. **Dietary acidification enhances phosphorus digestibility but decreases H⁺/K⁺-ATPase expression in rainbow trout.** *J. Exp. Biol.*, vol. 209, no. Pt 19, pp. 3719–3728, 2006.
- [46] J. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot, y R. Metailler. **Nutrition and feeding of fish and crustaceans.** London: Springer, 2001.
- [47] A. Ruyra, M. Cano-Sarabia, P. García-Valtanen, D. Yero, I. Gibert, S. a Mackenzie, A. Estepa, D. Maspoch, y N. Roher. **Targeting and stimulation of the zebrafish (*Danio rerio*) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes.** *Vaccine*, vol. 32, no. 31, pp. 3955–62, 2014.
- [48] K. J. Livak y T. D. Schmittgen. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–8, 2001.
- [49] N. A. Ballesteros, R. Castro, B. Abos, S. S. Rodríguez Saint-Jean, S. I. Pérez-Prieto, y C. Tafalla. **The Pyloric Caeca Area Is a Major Site for IgM⁺ and IgT⁺ B Cell Recruitment in Response to Oral Vaccination in Rainbow Trout.** *PLoS One*, vol. 8, no. 6, 2013.
- [50] K. M. Khan, S. Khan, y K. Miyan. **Aquaculture as a food production system : A review.** *Biology and Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 291–302, 2011.
- [51] A. L. Menke, J. M. Spitsbergen, A. P. M. Wolterbeek, y R. A. Woutersen. **Normal anatomy and histology of the adult zebrafish.** *Toxicol. Pathol.*, vol. 39, no. 5, pp. 759–775, 2011.
- [52] A. Zapata, B. Diez, T. Cejalvo, C. Gutiérrez-De Frías, y A. Cortés. **Ontogeny of the immune system of fish.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 126–136, 2006.
- [53] S. Hadidi, G. W. Glenney, T. J. Welch, J. T. Silverstein, y G. D. Wiens. **Spleen size predicts resistance of rainbow trout to *Flavobacterium psychrophilum* challenge.** *J. Immunol.*, vol. 180, no. 6, pp. 4156–4165, 2008.
- [54] V. Wittamer, J. Y. Bertrand, P. W. Gutschow, D. Traver, W. Dc, V. Wittamer, J. Y. Bertrand, P. W. Gutschow, y D. Traver. **Characterization of the mononuclear phagocyte system in zebrafish.** *Phagocytes, Granulocytes and Myelopoiesis*, vol. 117, no. 26, pp. 7126–7135, 2012.
- [55] B. N. Fredriksen y J. Grip. **PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** *Vaccine*, vol. 30, no. 3, pp. 656–667, 2012.

- [56] P. H. M. Joosten, A. E. Tiemersma, A. Threels, C. Caumartin-Dhieux, y J. H. W. M. Rombout. **Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 7, pp. 471–485, 1997.
- [57] J. H. Rombout, A. A. van der Berg, C. T. van der Berg, P. White, y E. Egberts. **Immunological importance of the second gut segment of carp. III. Systemic and or mucosal immune response after immunization with soluble or particulate antigen.** *J. Fish Biol.*, vol. 35, pp. 179–186, 1989.
- [58] J. O. Sunyer. **Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system.** *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 4, pp. 320–6, 2013.
- [59] J. H. W. M. Rombout y V. Kiron. **Mucosal Vaccination of Fish.** *Fish Vaccin.*, pp. 56–67, 2014.
- [60] J. H. W. M. Rombout, C. H. J. Lamers, M. H. Helfrich, A. Dekker, y J. J. Taverne-Thiele. **Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications.** *Cell Tissue Res.*, vol. 239, no. 3, pp. 519–530, 1985.
- [61] M. Adomako, S. St-Hilaire, Y. Zheng, J. Eley, R. D. Marcum, W. Sealey, B. C. Donahower, S. Lapatra, y P. P. Sheridan. **Oral DNA vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against infectious haematopoietic necrosis virus using PLGA [Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid)] nanoparticles.** *J. Fish Dis.*, vol. 35, no. 3, pp. 203–214, 2012.

Discusión y conclusiones generales



Discusión general

El mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune es fundamental, ya que éste debe mantener una respuesta equilibrada frente a microbios y patógenos, el cual oscila entre una inmunidad insuficiente o una inmunidad excesiva. En mamíferos, la homeostasis durante la respuesta del sistema inmune innato también está modulada por circuitos neuronales [1–4], es decir, por el sistema nervioso, al igual que pasa en otros sistemas fisiológicos, como el sistema circulatorio, el sistema pulmonar o el sistema gastrointestinal. Este sistema de homeostasis del sistema inmune es conocido como reflejo inflamatorio, un circuito neural específico que modula la respuesta del sistema inmune innato previniendo la posibilidad de una sobreactivación [5].

La primera hipótesis de esta tesis es que el reflejo inflamatorio descrito en mamíferos es un sistema de control de la inflamación también presente en otros vertebrados y para ello nos centramos en su estudio en teleósteos. Una pieza clave del sistema del reflejo inflamatorio es el receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 ($\alpha 7$ nAChR) [6]. El receptor $\alpha 7$ nACh es un homopentámero que presenta cinco sitios de unión a la acetilcolina (ACh) [7]. Los diferentes aminoácidos que contribuyen al sitio de unión se organizan en bucles del A al E (**Figura 3 y 4, Capítulo 1**) [8–10]. En la trucha arcoíris los aminoácidos que están hipotéticamente en contacto con la ACh están altamente conservados en comparación con otras especies (*Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Danio rerio*, *Takifugu rubripes*). Al comparar la secuencia que forma el sitio de unión de la ACh de humanos con la secuencia de trucha se observan sólo dos residuos diferentes, uno presente en el bucle D y otro en el bucle E. Sin embargo, estos aminoácidos no están conservados en otras especies, por ejemplo, los residuos en la secuencia de trucha están presentes en las secuencias de *Esox lucius* y *T. rubripes*, pero no en las secuencias de *D. rerio*, *Haplochromis burtoni*, *Poecelia reticulata*, *G. gallus*, *Mus musculus* y *H. sapiens*. Por lo tanto, podemos deducir que la diferencia entre estos aminoácidos no debería incidir en la capacidad del receptor $\alpha 7$ nACh de unir ACh.

La α -bungarotoxina (α -BTX) es una pequeña proteína que ha sido ampliamente utilizada en el estudio del receptor $\alpha 7$ nACh [6, 11, 12], ya que es un antagonista que se une irreversiblemente. Tres aminoácidos, una fenilalanina y dos tirosinas ubicadas en el bucle C, son esenciales para una alta afinidad de unión de la α -BTX al receptor $\alpha 7$ nACh [10, 12]. Estos residuos están presentes en la secuencia de aminoácidos deducida de trucha y se encuentran separados

por seis residuos altamente conservados, al igual que en otras especies (*T. rubripes*, *D. rerio*, *G. gallus*, *M. musculus* y *H. sapiens*). En base al análisis *in silico* de la secuencia del receptor $\alpha 7$ nACh, éste posee todos los residuos necesarios para tener una alta afinidad por la α -BTX, que también se une irreversiblemente al receptor $\alpha 9$ nACh [13, 14]. El receptor $\alpha 9$ nACh era el único receptor nicotínico descrito en trucha, el cual no está presente en macrófagos obtenidos del bazo y del riñón anterior. En relación con el receptor $\alpha 9$ nACh no existen estudios de los residuos que interactúan con la α -BTX, pero basándonos en lo descrito en el receptor $\alpha 7$ nACh, el receptor $\alpha 9$ nACh presenta las dos tirosinas, pero no la fenilalanina, en el bucle C, al igual que la secuencia de humanos [15]. Esta similitud entre las secuencias de los receptores $\alpha 9$ nACh de humanos y trucha sustenta nuestros resultados, donde también obtuvimos una alta conservación de las secuencias de $\alpha 7$ nACh entre diferentes especies.

El bucle citoplasmático ubicado entre la tercera y cuarta región transmembrana del receptor $\alpha 7$ nACh es determinante para la correcta expresión, plegamiento y tráfico del receptor a la membrana [16]. Este bucle se ha estudiado detalladamente y, mediante mutagénesis dirigida, se han descrito una serie de residuos clave que son importantes para la expresión del receptor funcional [17]. Los aminoácidos críticos descritos por Mukherjee y colaboradores son tres leucinas y una cisteína [17], el receptor de trucha presenta las tres leucinas, pero no la cisteína. Sin embargo, esta cisteína tampoco está presente en ninguna de las secuencias de peces analizadas, aunque, se ha demostrado que el pez cebra posee un receptor funcional cuando se expresa en oocitos de *Xenopus laevis*, a pesar de no tener esta cisteína [18]. Esto sugiere que la substitución de una cisteína por una valina en peces no afectaría a la expresión de un receptor funcional.

En base a los resultados del análisis *in silico* de la secuencia del receptor $\alpha 7$ nACh, deduciríamos que la trucha presenta un receptor funcional, lo cual fue validado en este estudio a través de diferentes ensayos *in vitro* realizados en macrófagos. La presencia del ARNm del receptor $\alpha 7$ nACh fue confirmado en macrófagos aislados de bazo y riñón anterior de trucha, al igual que ha sido descrito en mamíferos [11, 19–21]. Además, los receptores $\alpha 7$ nACh de los macrófagos son capaces de unir α -BTX, como ha sido observado también en macrófagos de humano y de ratón [6, 11, 20]. Adicionalmente, los resultados mostraron que la nicotina (NIC) disminuye la unión de la α -BTX, demostrando una competencia por el sitio de unión, este fenómeno ha sido previamente descrito en macrófagos humanos aislados de sangre [6]. La estimulación con ácido

polirribonucleico-policitidílico (poly (I:C)) aumenta la presencia del receptor en la membrana, a diferencia del lipopolisacárido (LPS). En mamíferos se ha observado un aumento de la presencia del receptor $\alpha 7$ nACh en la membrana de macrófagos a las 9 h tras la estimulación con LPS [11], no existen estudios similares con poly (I:C).

Una de las grandes diferencias que presentó el receptor $\alpha 7$ nACh, en el estudio *in silico*, fue a nivel de la secuencia genómica, donde se observó que cuenta con un exón menos, en comparación con los 10 exones descritos para otras especies (*H. sapiens*, *G. gallus*, *D. rerio*, *T. rubripes*) [22–25]. La secuencia del receptor está altamente conservada entre diferentes taxones, existiendo zonas de alta variabilidad que también son consistentes entre especies. A partir de esto, decidimos analizar la secuencia genómica del receptor $\alpha 7$ nACh y para ello realizamos una extracción de ADN genómico de cerebro (por ser el órgano donde obtuvimos una mayor expresión del receptor $\alpha 7$ nACh), pero no fue posible clonar ni secuenciar el exón 1 de trucha para confirmar si existe o no un intrón en esta sección de la secuencia, como lo descrito en otras especies, por lo que serían necesarios nuevos ensayos que nos permitieran determinar si está discrepancia entre especies en el análisis *in silico* se mantiene.

El reflejo inflamatorio es una respuesta que se transmite a través del nervio vago y la vagotomía ha ayudado a esclarecer la magnitud de su función en mamíferos. Por ejemplo, la estimulación eléctrica del nervio vago conlleva a un aumento de la ACh en el torrente sanguíneo [26], y la vagotomía cervical y posterior estímulo eléctrico del nervio vago protege contra lesiones por hipovolemia hemorrágica de choque, quemaduras y lesiones por ventilación mecánica [27–29]. Estos resultados demuestran que el nervio vago es esencial para el funcionamiento del reflejo inflamatorio. Sin embargo, en peces existen limitaciones técnicas que no nos permitieron abordar la observación de este sistema a nivel del organismo. En peces se han realizado vagotomías con el fin de evaluar el ritmo cardíaco [30], pero nuestro laboratorio no cuenta con los conocimientos necesarios para utilizar esta metodología. Sin embargo, se exploraron opciones indirectas para examinar la posible activación del reflejo inflamatorio. La estimulación con diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) *in vivo* (lipopolisacáridos, LPS y ARN vírico sintético de doble cadena, poly (I:C)) nos permitió observar que éstos modulan la expresión génica del receptor $\alpha 7$ nACh en diferentes tejidos. Previamente, se ha descrito en macrófagos que la estimulación

con LPS, puede aumentar la presencia del receptor en la membrana [11], aunque, no hay información a nivel de tejidos, ni utilizando otros PAMPs. Asimismo, en fuga se ha observado la expresión génica del receptor $\alpha 7nACh$ (isoforma a) en diferentes órganos como el cerebro, las branquias, las gónadas, el corazón y el músculo [25]. En trucha, Drescher y colaboradores han descrito al receptor $\alpha 9nACh$ isoforma I, en diferentes órganos como el bazo, el hígado, la glándula pituitaria y el epitelio olfativo [31]. Adicionalmente, los resultados mostraron que existe una modulación de la liberación de ACh en plasma y bazo, posterior a una inyección intraperitoneal (i.p.) con LPS y poly (I:C). Estos resultados en conjunto nos permiten sugerir que existe una respuesta en el contexto del reflejo inflamatorio, toda vez que componentes esenciales de este sistema son modulados por diferentes PAMPs.

La presencia del receptor en macrófagos de trucha y su capacidad de unir α -BTX nos permitieron iniciar diferentes análisis funcionales para dilucidar la implicación del receptor $\alpha 7nACh$ en algunas de las principales funciones de los macrófagos. Uno de los estudios funcionales realizados fue el análisis de la posible modulación de la fagocitosis a través de la estimulación del receptor con diferentes agonistas (ACh y NIC). Los análisis realizados indicaron que la fagocitosis en macrófagos obtenidos desde el bazo y el riñón anterior, no es modulada por la actividad del receptor $\alpha 7nACh$, al igual que lo observado en mamíferos, en donde la estimulación con diversos agonistas del receptor $\alpha 7nACh$ no modulan la fagocitosis [32]. Cabe mencionar que en los experimentos posteriores se utilizó NIC como agonista del receptor $\alpha 7nACh$ en lugar de ACh, por requerir concentraciones menores para observar resultados similares, las cuales se encontraban dentro del rango de las concentraciones utilizadas en mamíferos (en peces: entre 100 y 1000 μM de NIC y en mamíferos: entre 5 y 3000 μM de NIC [6, 21, 33]). Adicionalmente, se consideró evaluar la modulación de la producción de especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS), pero finalmente la auto-fluorescencia de los macrófagos de trucha interfería en el ensayo y no obtuvimos resultados concluyentes.

Un aspecto valioso de los resultados obtenidos en esta tesis, es la descripción de la modulación de la NIC en la expresión génica de moléculas inflamatorias en macrófagos frente a una estimulación con poly (I:C), pero no así con LPS. En mamíferos se ha descrito que la activación del receptor $\alpha 7nACh$, por LPS y poly (I:C) produce una disminución de citoquinas proinflamatorias, tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína [6, 11, 19, 21]. De hecho, los primeros estudios solo describían una modulación post-traducciona, pero estudios más

recientes describen que la modulación de las moléculas inflamatorias también ocurre a nivel de ARNm [21, 34]. Lo que significa que también puede existir un efecto a nivel de las citoquinas proinflamatorias liberadas al medio por los macrófagos, las cuales no fue posible determinar por no contar con los anticuerpos correspondientes. En función de nuestros resultados podemos deducir que esta modulación se realiza a través del receptor $\alpha 7nACh$, ya que la adición de un antagonista específico (α -BTX) produce una disminución del efecto de la NIC, aumentando la expresión génica de genes relacionados con el proceso inflamatorio. La mayor sensibilidad del receptor $\alpha 7nACh$ de trucha a poly (I:C) en comparación con el LPS, se puede deber a que los peces son menos sensibles al LPS, en el orden de 1000 veces menor a lo descrito en mamíferos [35, 36], por lo cual no sería imperativo activar un sistema de homeostasis del sistema inmune frente al LPS. En los mamíferos el receptor tipo Toll 4 (*Toll-like receptor*, TLR4) es el encargado de reconocer al LPS y mediar el shock séptico [37, 38]. En cambio en peces, la mayoría de las especies carecen de TLR4, a excepción de los ciprínidos [39], en los cuales el TLR4 parece no estar relacionado con la detección del LPS. Además, la ausencia de las moléculas accesorias MD2 y CD14 en el genoma de peces también pueden ayudar a explicar la tolerancia al LPS de los peces [40]. Por otro lado, la detección de poly (I:C) se realiza principalmente por el receptor de membrana TLR3 y los receptores intracelulares RIG-I y MDA5 [41], los cuales han sido descritos en diferentes especies de peces incluida la trucha. Esto explicaría que el poly (I:C) active un sistema de homeostasis como el reflejo inflamatorio en trucha. El receptor $\alpha 7nACh$ de mamíferos puede modular la respuesta inflamatoria inducida por diferentes PAMPs en mamíferos como el LPS, el peptidoglicano (PGN), el poly (I:C), el CpG y la HMGB1 [6, 19, 42], los resultados de nuestro estudio demuestran que el sistema del reflejo inflamatorio en peces no responde igual al LPS en comparación con los mamíferos, lo que abre la puerta a investigar otros posibles activadores del reflejo inflamatorio en peces.

Adicionalmente, fue evaluada la funcionalidad de la secuencia del receptor $\alpha 7nACh$ en un sistema heterólogo, se inyectó ARNm del receptor $\alpha 7nACh$ de trucha en ovocitos de *Xenopus laevis* para comprobar si el receptor era funcionalmente activo y capaz de transportar iones. También se coinyectó la chaperona RIC3 (resistencia a la colinesterasa 3, *Resistance-to-cholinesterase 3*) de humanos, que es esencial para el correcto plegamiento del receptor y así aumentar su presencia en membrana, como ya ha sido descrito para receptores

$\alpha 7$ nACh de otras especies en diferentes sistemas heterólogos [43–48]. Los resultados mostraron que $\alpha 7$ nAChR con y sin la presencia de RIC3 no es capaz de transportar iones en ovocitos de *Xenopus*. Esto se puede deber a: 1) la existencia de otras isoformas activas del receptor, como se han descrito en otras especies de peces [18, 25], aunque, en todo el trabajo realizado, el único indicio de la existencia de una isoforma, fue una secuencia parcial de una proteína de trucha (número de referencia: CDQ72725), que posee una similitud parcial con la secuencia del receptor $\alpha 7$ nACh, la cual en ningún caso pudimos detectar en diferentes tejidos de trucha; 2) que el receptor $\alpha 7$ nACh de trucha no sea compatible con la chaperona RIC-3 de humanos y necesite de la chaperona endógena de trucha, aunque, se ha demostrado que la chaperona RIC-3 de *Caenorhabditis elegans* mejora las amplitudes de las corrientes del receptor $\alpha 7$ nACh de rata en un sistema heterólogo [43]; y 3) la expresión del receptor de $\alpha 7$ nACh de trucha no sea compatible con el sistema heterólogo de *Xenopus*, sin embargo, en diferentes estudios en oocitos de *Xenopus* se ha demostrado la expresión de receptores nicotínicos de diferentes especies, por ejemplo: $\alpha 7$ de rata, $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ de ratón, $\alpha 7$ de humanos, $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ del pez cebra [18, 49–51]. Por tanto, sería necesario realizar más estudios al respecto, para determinar si la secuencia clonada es la secuencia funcional del receptor $\alpha 7$ nACh de trucha arcoíris.

En base a la presencia de un elemento clave del reflejo inflamatorio en trucha, como el receptor $\alpha 7$ nACh, así como la modulación de la expresión del receptor en diferentes órganos y la modulación de la ACh tras una inyección intraperitoneal con PAMPs; la capacidad del receptor de unir α -BTX y la capacidad de la NIC de modular la expresión génica de genes relacionados con la respuesta inflamatoria en macrófagos estimulados con poly (I:C), podemos deducir la presencia de un sistema de reflejo inflamatorio en peces similar al presente en mamíferos. La posible presencia del reflejo inflamatorio en teleósteos, nos permiten sugerir que éste podría ser utilizado como un sistema de modulación de la respuesta inflamatoria frente a una enfermedad. La administración de agonistas específicos del receptor $\alpha 7$ nACh ante una infección podría disminuir la inflamación así como la presencia de citoquinas inflamatorias, ya que una respuesta excesiva a las toxinas puede implicar un daño irreversible en los órganos, lo cual va en detrimento del bienestar del animal. Estudios en mamíferos han demostrado que el aumento del reflejo inflamatorio normaliza la respuesta del sistema inmune innato sin su eliminación o sin causar inmunosupresión [52]. La administración de agonistas del receptor $\alpha 7$ nACh reduce las citoquinas

proinflamatorias de un 50 a un 75 %, pero no elimina su actividad [19, 53–56]. Este fenómeno, se corresponde con nuestros resultados, en donde la incubación de macrófagos con poly (I:C) y la posterior estimulación con un agonista del receptor $\alpha 7nACh$ disminuye la expresión génica de genes relacionados con la respuesta inmune, de un 46 a un 86 % en diferentes genes, pero no causa su abolición. Sin embargo, junto con la completa caracterización del reflejo inflamatorio y su real alcance en la modulación de la respuesta inflamatoria en peces, habría que determinar las posibles consecuencias del uso de un agonista del receptor $\alpha 7nACh$ a nivel sistémico que pudiera por ejemplo, estimular al receptor presente en el cerebro, donde se expresa en altos niveles.

Es necesario realizar nuevos estudios que permitan caracterizar el reflejo inflamatorio en peces, para determinar si sería factible su modulación con fines terapéuticos. Por ejemplo, sería muy interesante obtener la secuencia de la colina acetiltransferasa (*choline acetyltransferase*, ChAT) y caracterizarla en células T de peces, para establecer si existe la misma comunicación que en mamíferos entre el nervio vago y el receptor $\alpha 7nACh$ en los macrófagos del bazo. La ChAT ha sido previamente descrita en trucha mediante inmunohistoquímica en el cerebro y por la medición de su actividad enzimática en cerebro, corazón, estómago y músculo [57, 58], pero hasta donde llega nuestro conocimiento no ha sido caracterizado en células T. En este contexto, también aportaría información muy relevante poder medir las concentraciones de ACh en cultivos celulares, para determinar los niveles endógenos de este neurotransmisor en trucha en el contexto del reflejo inflamatorio. En relación a esto, sería necesario utilizar sistemas más sensibles de medición que el utilizado en este trabajo (Amplex Invitrogen, rango de detección entre 0,3 a 100 μM , [59]), como por ejemplo, por radioinmunoensayo (*radioimmunoassay*, RIA), ya que en los estudios en diferentes líneas de células leucémicas de humanos y en linfocitos de rata los niveles de ACh son del orden de pmol/ml [60, 61].

Gran parte de los conocimientos de inmunología en peces han sido obtenidos a partir de la inmunología comparada con mamíferos, lo que ha permitido una mejor comprensión de las características particulares que presentan los teleósteos. Existen descubrimientos en peces que han contribuido al entendimiento de la evolución del sistema inmune y además ha planteado nuevos paradigmas de la inmunología en mamíferos [62]. Un mayor entendimiento del sistema inmune en peces también permite proporcionar soluciones a asuntos más prácticos como el desarrollo de nuevos y eficientes métodos de profilaxis para

el tratamiento de enfermedades. Los resultados presentados en esta tesis otorgan indicios de la existencia de un sistema de reflejo inflamatorio en peces, tanto con similitudes como con diferencias en comparación con el sistema descrito en mamíferos, lo que lo hace sumamente interesante ya que estas discrepancias guardan relación con las características intrínsecas de los peces.

Los teleósteos poseen un sistema inmune innato altamente desarrollado y también un sistema inmune adaptativo, que es esencial para una inmunidad duradera. Esto ha permitido el desarrollo de métodos que modulan la respuesta inmune, con el fin de aumentar la protección frente a enfermedades. Los peces viven en un ambiente acuático que contiene una gran cantidad de microorganismos patogénicos y no patogénicos, donde el mayor inconveniente es que las superficies epiteliales como la piel, las branquias y el sistema gastrointestinal, son grandes superficies en contacto continuo con los posibles patógenos, lo que implica una gran facilidad para el desarrollo de infecciones [63, 64]. El hecho de que la mayoría de las especies responda con un potente sistema inmune innato para eliminar a los patógenos, convierte la modulación de éste, en un buen enfoque para mejorar la capacidad de respuesta de los peces ante una infección. El sistema inmune de los teleósteos puede ser modulado a través de los PAMPs que interactúan con sus receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*, PRRs) y que a su vez activan diferentes vías de respuesta a patógenos [65]. A su vez, el sistema inmune puede ser estimulado por citoquinas, como potenciadores no específicos, lo que puede ser la solución más práctica para la protección frente a diversas enfermedades [66-69]. Recientemente, también se ha descrito en mamíferos la capacidad de memoria del sistema inmune innato. La memoria innata estaría basada principalmente en la modulación del epigenoma de moléculas que codifican por moléculas inflamatorias de la respuesta de macrófagos [70, 71]. El sistema de memoria innata permite que los macrófagos que entran en contacto por segunda vez con un patógeno respondan mejor y con mayor intensidad. En relación a estos antecedentes, el desarrollo de nuevos métodos de profilaxis deben responder a la necesidad de estimular la memoria a corto y largo plazo del sistema inmune para otorgar protección a diferentes especies de peces y contra diferentes patógenos aprovechando las características intrínsecas del sistema inmune innato de teleósteos.

Basándonos en todas estas premisas, la segunda hipótesis de esta tesis es que nanopartículas proteicas, conocidas como cuerpos de inclusión (CI), pueden servir como plataformas de entrega de inmunoestimulantes. Con el objetivo de

determinar la factibilidad de la utilización de los CI como método profiláctico. Primero se utilizaron CI con proteínas sin una función inmunológica en peces: VP1GFP, una proteína modular que contiene la proteína verde fluorescente fusionada con la proteína VP1 de la cápside del virus de la fiebre aftosa e iRFP-H6, una proteína fluorescente en el infrarrojo. Posteriormente, se diseñaron CI con proteínas con una función inmunológica: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la quimioquina (C-C motivo) ligando 4 (CCL4). Cabe mencionar que también se evaluó la utilización de la interleuquina 6 (IL-6), pero, no fue posible la producción de CI nanoestructurados. Los CI han sido evaluados en líneas celulares de mamíferos como plataforma de entrega de drogas y polipéptidos [72–74]. Por ejemplo, CI formados por una chaperona (*heat shock 70*, Hsp70) o por el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) son internalizados por las células suministrando proteínas y mejorando la viabilidad celular, respectivamente [74]. La liberación funcional de proteínas desde los CI parece implicar solo una fracción de sus proteínas, ya que, después de la incubación, aún es posible observar en las células los CI [75]. Mientras las fibras amiloides pueden conferir estabilidad, las proteínas correctamente plegadas otorgan funcionalidad a los CI. Estas dos propiedades de los CI, su estructura, y la capacidad de liberar proteínas funcionales, hacen innecesaria la encapsulación. En el contexto de la aplicación de los CI en la acuicultura, el eliminar la encapsulación de los inmunoestimulantes implica la disminución de los costes de producción. Además, los CI son bien tolerados al ser administrados oralmente a ratones, sin presentar contraindicaciones como pérdida de peso, cambios en la ingesta de alimentos o malestar abdominal [73].

En general, para las diferentes proteínas purificadas como CI se obtuvieron rendimientos similares, a excepción de CCL4 donde se obtuvieron menores rendimientos. Esto se puede deber a que la producción de la proteína soluble es más eficiente que la formación de CI en las condiciones de cultivo utilizadas, que fueron las condiciones estándar de cultivo de *Escherichia coli* (3 h de estimulación con IPTG a 37 °C y 250 rpm). En todo caso estas condiciones podrían optimizarse de ser necesario para incrementar el rendimiento. Diferentes características de los CI fueron evaluadas como, la morfología, el tamaño, el contenido de LPS y de lípidos totales. Todas estas características fueron diferentes en los diferentes CI producidos, lo que evidencia que la cepa productora, al igual que la proteína, son factores importantes en el rendimiento de producción, así como, en las características que se otorgan a los CI, lo que confirma su naturaleza moldeable [76].

La evaluación de la expresión génica de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, sugieren que los CI son capaces de activar el sistema inmune. Sin embargo, por limitaciones técnicas, no fue posible determinar la contribución relativa de cada uno de los componentes presentes en los CI (LPS, PGN y ácidos nucleicos) en el nivel de activación del sistema. Estos componentes derivados de la cepa productora, que son purificados conjuntamente con los CI, han sido descritos como inductores de la respuesta inmune en peces *in vitro* e *in vivo* [35, 77–81]. Sería interesante determinar en futuros trabajos la función que cumple cada componente de los CI en la inmunidad otorgada a los peces, para dilucidar el mecanismo de activación del sistema inmune innato por parte de los CI. Por ejemplo, nuestros resultados señalan que la protección otorgada al pez cebra frente a una infección bacteriana, no es dependiente de la presencia de LPS o de los niveles de lípidos, pero seguramente, en cierto nivel, también influyen en la activación de la respuesta inflamatoria del sistema inmune en peces.

Los ensayos de internalización fueron necesarios para evaluar la interacción de los CI con las células. La conformación estructural de los CI, organizados en un andamio de proteínas insolubles, donde están embebidas las proteínas funcionales [82] facilitarían su reconocimiento por parte de las células presentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells*, APCs) o fagocitos profesionales, como los macrófagos de trucha. Adicionalmente, se evaluó la interacción de los CI con fagocitos no profesionales, como los hepatocitos, que han sido ampliamente utilizados en mamíferos para el estudio de la captación de drogas y la remoción de diferentes sustancias, entre ellas el LPS [83, 84]. En peces, el hígado también tiene una función inmunológica y un rol en la respuesta inmune en la defensa contra los patógenos [85, 86]. Además, los hepatocitos han sido utilizados como herramienta de estudio de la interacción de las células con otro tipo de nanopartículas como los liposomas [87] y para el estudio de la internalización de nanopartículas en ensayos de toxicidad [88]. Tanto los macrófagos de trucha (HKM) como los hepatocitos de pez cebra (ZFL), fueron capaces de internalizar los diferentes CI, los cuales no causaron toxicidad aparente. En estudios con otras plataformas de entrega (*delivery systems*) en peces, se observan los mismos resultados, por ejemplo, nanopartículas lipídicas sólidas (*solid lipid*, SL) encapsulando 6-coumarin son internalizadas tanto por una línea celular de dorada (SAF-1) como por leucocitos obtenidos desde el riñón anterior de dorada [89]; y nanopartículas de quitosano encapsulando veneno

de serpiente son internalizadas sin causar toxicidad en la línea celular de corazón de catla (*Catla catla*) [90]. Mediante microscopía confocal, se observó en ambos tipos celulares, una acumulación intracelular de las nanopartículas, compatibles con una localización endosomal. En trabajos anteriores se ha demostrado, usando inhibidores específicos de diferentes vías de endocitosis, que liposomas cargados con LPS y poly (I:C) son endocitados a través de las vías caveola y clatrina en células de peces [87]. Además, los CI son endocitados por las células de mamíferos, y se ha descrito la presencia de la proteína clatrina en el proceso [74]. Es importante mencionar, que los receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs), implicados en la respuesta al ADN bacteriano, se encuentran en compartimientos endosomales y que es de gran importancia que las nanopartículas sean capaces de dirigirse a estos receptores intracelulares, ya que así activarían las correspondientes vías de señalización de TLR7 y TLR9 [91].

La capacidad de los macrófagos de internalizar CI, nos permitió evaluar la biodistribución de los CI en trucha tras una inyección i.p. Nuestros estudios demuestran que los CI son internalizados por monocitos/macrófagos obtenidos desde el bazo y el riñón anterior. Power y colaboradores han descrito que nanoliposomas administración i.p. son principalmente localizados en el bazo y el riñón de trucha a las 24 h posteriores a la inyección [92]. Además, los CI son capaces de activar la respuesta inflamatoria en estos tejidos, a nivel de la expresión génica de citoquinas proinflamatorias y de moléculas presentadoras de antígenos. Esto indicaría que existe un reconocimiento de los CI por parte del sistema inmune, debido a que el bazo y el riñón anterior son los principales órganos linfoides en teleósteos [93]. Adicionalmente, en estos órganos se ha sugerido que se encuentran los centros de melanomacrófagos, que pueden servir como lugar de presentación de antígenos [94]. Sería interesante determinar si otras células fagocíticas son capaces de endocitar los CI, como células dendríticas o linfocitos B. Así como determinar si la internalización de estas partículas ocurre en el sitio de inyección y si son transportadas a los órganos diana, o si la endocitosis ocurre en los tejidos donde se encuentran los macrófagos. Algunos estudios indican que esta migración es sumamente rápida (ya sea de los fagocitos o de las nanopartículas), ya que justo después de una inyección i.p. en el pez cebra, los liposomas son detectados en el bazo [95]. Además, la migración podría ser realizada por los fagocitos, ya que se ha descrito en el salmón una población específica de células, con morfología similar a los macrófagos, que son capaces de absorber ovoalbúmina antígeno modelo (OVA),

y CpG en la periferia, y acumularlas predominantemente en el riñón anterior y en el bazo, a las 24 h después de la administración [96].

Una serie de estudios *in vivo* se realizaron con el pez cebra, para precisar el nivel de protección que confieren los diferentes CI frente a una infección bacteriana letal de *Pseudomonas aeruginosa*. El pez cebra se está convirtiendo en un modelo de gran alcance para la modelización y estudio de vacunas y enfermedades de especies de interés económico en la acuicultura [98]. Se utiliza como un organismo modelo porque es económico, fácil de cultivar y manejar, es fácil de obtener en diferentes etapas de desarrollo y presentan inmunidad innata y adaptativa [98, 99]. De hecho, el pez cebra se ha utilizado en la evaluación de vacunas y enfermedades que se encuentran en piscifactorías [97, 100, 101]. Se ha empleado como modelo en el estudio de enfermedades tanto virales: septicemia hemorrágica viral (*viral haemorrhagic septicaemia*, VHS), virus de la necrosis pancreática (*infectious pancreatic necrosis virus*, IPNV), virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (*infectious haematopoietic necrosis virus*, IHNV) [102–104], como bacterianas: *Aeromonas hydrophila* y *Listonella anguillarum* [105, 106]. Adicionalmente, infecciones de una serie de patógenos bacterianos han sido demostradas en el pez cebra, las cuales incluyen: *Aeromonas salmonicida*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium marinum*, *Streptococcus iniae* y *Edwardsiella tarda* [107–110]. Por todo ello, el pez cebra se utilizó como modelo experimental en este estudio. Los CI protegen de manera significativa al pez cebra frente a una infección bacteriana, nuestros estudios demuestran que existen diferencias significativas en la protección otorgada cuando el CI está formado por una proteína con una función inmune en peces. Estos resultados confirman las hipótesis de: 1) que los CI pueden ser utilizados como plataforma de entrega de inmunoestimulantes; 2) que los CI confieren protección al pez cebra frente a una infección bacteriana y 3) que las citoquinas aumentan la protección conferida por los CI, en comparación con los formados con proteínas sin una función inmunológica en peces. El transporte de las citoquinas en los CI evita las desventajas de las citoquinas solubles como, una vida media corta, el uso de altas dosis y la necesidad de ser encapsuladas [111, 112]. Las citoquinas son moléculas efectoras que controlan la amplitud y la duración de la respuesta frente a una infección. Consecuentemente, la inducción de citoquinas, como un mecanismo de protección, es una respuesta directa a la presencia de un agente patógeno [113], lo que se traduce en la activación del sistema inmune. La estimulación de las citoquinas, en conjunto con la capaci-

dad de los CI de liberar espontáneamente y de forma sostenida una parte significativa de sus proteínas [82, 114], permiten la estimulación del sistema inmune. El siguiente paso en el estudio de los CI sería analizar el nivel de protección que pueden conferir los CI en un desafío realizado varias semanas después de la inmunización, evaluar si pueden conferir protección a diferentes especies de peces y frente a diferentes patógenos. Además, por las propiedades de los CI es un atractivo modelo para el desarrollo de vacunas con antígenos específicos, como la proteína G vírica.

La caracterización de los CI en función de una etapa clave de la producción del alimento de peces, al proceso de liofilización y de las condiciones en el tracto digestivo de trucha han demostrando la factibilidad de su utilización como una alternativa para ser empleado como un inmunoestimulante de administración oral. La alta estabilidad de los CI reside en su estructura, debido a lo cual las proteínas incorrectamente plegadas forman andamios donde las proteínas funcionales se encuentran completando los espacios de la matriz. La proteólisis de los CI no implica la disminución del volumen de éstos o efectos detectables en su morfología, aunque, existe una pérdida progresiva de su densidad [82]. Asimismo, se ha descrito mediante microscopia de fuerza atómica, que en un CI coexisten regiones estructuralmente más rígidas y regiones más flexibles, lo que confirma la existencia de una diversidad estructural dentro de los CI [115]. Estos fenómenos podrían explicar que los CI resistan diferentes condiciones de pH y temperatura, ya que el andamiaje que contiene las proteínas funcionales, sirve de protección, y algunas regiones podrían verse más afectadas que otras, pero aún así los CI mantienen su funcionalidad. Si bien nuestros resultados señalan que los CI mantienen su capacidad de activar una respuesta inmune en macrófagos, y la capacidad de proteger al pez cebra frente a una infección, sería interesante determinar a qué nivel esta funcionalidad se mantiene después de los tratamientos de pH, temperatura y liofilización.

De acuerdo con los resultados de estabilidad de los CI, se evaluó la posibilidad de administrarlos oralmente. El intestino de teleósteos presenta dos poblaciones principales de células inmunes: 1) la lámina propia de leucocitos, el cual incluye una variedad de células inmune como, granulocitos, macrófagos, linfocitos y células del plasma; 2) linfocitos intraepiteliales (*intraepithelial lymphocytes*, IELs) compuestos por células T y células B localizadas entre las células epiteliales [116]. Estas células inmunes, en conjunto con las células epiteliales, las células globet y las células neuroendocrinas, producen y regulan la respuesta inmune en el intestino. Para evaluar si los CI son endocitados por

células de la mucosa intestinal se intubaron truchas adultas y al cabo de 24 h se analizó la presencia de las nanopartículas en diferentes tramos del intestino. Los CI se encontraron en la sección del apéndice pilórico: en la base de las vellosidades y en la submucosa; y en el intestino medio: en la lamina propia y en el ápice de las vellosidades, donde los IELs estarían localizados. En relación a estos resultados, los CI podrían haber sido captados en el apéndice pilórico y el intestino medio, quizás por los IELs y las APCs y almacenados intracelularmente, probablemente estimulando la respuesta inmune mucosal. Se ha descrito previamente que nanopartículas de liposomas y de ácido poli (lactico-co-glicólico) (*poly(lactic-co-glycolic acid)*, PLGA) administrados oralmente son internalizados a nivel del intestino medio [117, 118], además, la administración oral de quitosano produce un aumento en el intestino medio de IELs en comparación con el tratamiento control [119]. Adicionalmente, nanopartículas de PLGA administradas mediante intubación oral o por alimentación son igualmente absorbidas por el intestino medio [118], lo cual nos permite sugerir que los CI administrados a través de la alimentación de los peces serían igualmente internalizados que los CI administrados por intubación. Estudios de encapsulación de diferentes inmunoestimulantes, administrados por vía oral describen una activación, tanto del sistema inmune innato como el adaptativo. Por ejemplo, preparaciones de vitamina C encapsuladas en quitosano logran estimular la respuesta inmune innata en trucha [120]. Preparaciones con inmunoestimulantes, como γ -globulina de sangre humana (HGG) y β -glucano en nanopartículas de PLGA, logran inducir una elevada respuesta de anticuerpos específicos en el salmón [121]. Ballesteros y colaboradores han demostrado que vacunas de ADN encapsuladas en alginato y administradas por vía oral, son capaces de incrementar las IgM^+ e IgT^+ de IELs en el apéndice pilórico [122]. La administración oral de vacunas y de algunos inmunoestimulantes promueve la activación del sistema inmune innato y adaptativo, incluyendo el reclutamiento de las células B y la respuesta humoral mediada por IgM e IgT . La nanoestructuración y la estabilidad de los CI, junto con su absorción por las células intestinales, abren la posibilidad de su uso como un inmunoestimulante de administración oral. El siguiente paso es caracterizar si, al ser administradas oralmente, logran estimular el sistema inmune, y si mantienen el nivel de protección otorgado frente a una infección, al igual que la administración intraperitoneal.

Actualmente, la acuicultura ofrece una solución a la creciente demanda de proteína para el consumo humano [123]. A pesar de la diversidad de especies disponibles para el cultivo, los miembros de la familia de los ciprínidos son las especies predominantes en la acuicultura [123, 124]. Sin embargo, estas especies tienen un bajo valor en comparación a otras, como, el esturión, el salmón o la trucha. Las vacunas son principalmente producidas para las especies de mayor valor, donde se justifica su precio. No obstante, se estima que la acuicultura seguirá creciendo e industrializándose, siendo las enfermedades un importante factor limitante, que pueden producir devastadoras pérdidas económicas [124]. Basándose en esto, el desarrollo de nuevas tecnologías de bajo coste y alta efectividad podrían jugar un importante rol en la mantención del bienestar de los animales, siendo empleados en temporadas de estrés o relacionados con brotes de enfermedades. Los CI son una atractiva alternativa de plataforma de entrega de diferentes inmunoestimulantes, aunque, es necesario realizar más estudios para comprender el mecanismo y el alcance de su protección.

Conclusiones generales

Las conclusiones generales de esta tesis se resumen a continuación:

(1) Se obtuvo la secuencia completa de la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) de trucha (*Oncorhynchus mykiss*). El $\alpha 7$ nAChR, está altamente conservado en comparación con secuencias de otras especies (*Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Danio rerio*) y presenta todos los residuos y dominios necesarios para ser un receptor funcional.

(2) Diferentes PAMPs como, el ácido polirribonucleico-policitidílico (poly (I:C)) y el lipopolisacárido bacteriano (LPS), son capaces de estimular *in vivo* la expresión génica del receptor $\alpha 7$ nAChR en diferentes órganos y de aumentar la concentración de acetilcolina en sangre en trucha arcoíris.

(3) Los macrófagos obtenidos desde el bazo y el riñón anterior de trucha expresan el receptor $\alpha 7$ nACh y son capaces de unir α -bungarotoxina. Adicionalmente, la nicotina y la acetilcolina no estimulan la fagocitosis en macrófagos aislados desde el riñón anterior de trucha. No obstante, la nicotina tienen un efecto modulador de la respuesta inmune frente a la estimulación de poly (I:C), pero no de LPS.

(4) Se han desarrollado y caracterizado cuerpos de inclusión compuestos por proteínas sin (VP1GFP^{Cl} e iRFP-H6^{Cl}) y con (TNF α ^{Cl} y CCL4^{Cl}) una función biológica en peces. Dependiendo de la cepa y de la proteína producida los cuerpos de inclusión presentaron diferentes tamaños, morfologías, cantidad de LPS y cantidad de lípidos totales.

(5) Los cuerpos de inclusión son internalizados *in vitro* por células del pez cebra y macrófagos de trucha arcoíris, y no muestran toxicidad en estos tipos celulares. Además, los cuerpos de inclusión son capaces de estimular la respuesta inflamatoria a nivel de la expresión génica de diferentes moléculas de la respuesta inflamatoria en macrófagos de trucha.

(6) Después de una inyección intraperitoneal, los cuerpos de inclusión (TNF α ^{CI}) se encontraron acumulados en importantes órganos con función inmunológica, como el bazo y el riñón anterior de la trucha arcoíris. Además, fueron encontrados en células inmunológicamente relevantes como en monocitos/macrófagos obtenidos desde estos órganos.

(7) Los cuerpos de inclusión administrados por vía intraperitoneal protegen al pez cebra contra una infección bacteriana modelo causada por *Pseudomonas aeruginosa*.

(8) Los TNF α ^{CI} mantienen su morfología y funcionalidad en condiciones extremas. Los TNF α ^{CI} son resistentes a diferentes condiciones de pH, temperatura y también a las condiciones que se dan durante el proceso de liofilización.

(9) Los TNF α ^{CI} administrados oralmente llegan a los dos primeros tramos del intestino y son absorbidos por células presentes en la mucosa intestinal, las cuales, por su ubicación podrían corresponder a linfocitos intraepiteliales.

Referencias

- [1] U. Andersson y K. J. Tracey. **Reflex Principles of Immunological Homeostasis.** *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, no. 1, pp. 313–335, 2012.
- [2] M. Rosas-Ballina y K. J. Tracey. **The Neurology of the Immune System: Neural Reflexes Regulate Immunity.** *Neuron*, vol. 64, no. 1, pp. 28–32, 2009.
- [3] K. J. Tracey. **Immune cells exploit a neural circuit to enter the CNS.** *Cell*, vol. 148, no. 3, pp. 392–394, 2012.
- [4] P. S. Olofsson, M. Rosas-Ballina, Y. A. Levine, y K. J. Tracey. **Rethinking inflammation: Neural circuits in the regulation of immunity.** *Immunol. Rev.*, vol. 248, no. 1, pp. 188–204, 2012.
- [5] K. J. Tracey. **Understanding immunity requires more than immunology.** *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 7, pp. 561–4, 2010.
- [6] H. Wang, M. Yu, M. Ochani, C. A. Amella, M. Tanovic, S. Susarla, J. H. Li, H. Wang, H. Yang, L. Ulloa, Y. Al-Abed, C. J. Czura, y K. J. Tracey. **Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation.** *Nature*, vol. 421, no. 6921, pp. 384–388, 2003.
- [7] R. L. Papke. **Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors.** *Biochem. Pharmacol.*, vol. 89, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [8] A. Taly, P. J. Corringer, D. Guedin, P. Lestage, y J. P. Changeux. **Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system.** *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 8, no. 9, pp. 733–750, 2009.
- [9] C. Pierre-Jean, L. N. Nicolas, y Changeux Jean-Pierre. **Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level.** *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 40, pp. 431–458, 2000.
- [10] S. M. Sine, S. Huang, S. X. Li, C. J. da Costa y L. Chen. **Inter-residue coupling contributes to high affinity, subtype selective binding of alpha-bungarotoxin to nicotinic receptors.** *Biochem. J.*, vol. 454, no. 2, pp. 311–321, 2013.
- [11] M. A. S. Khan, M. Farkhondeh, J. Crombie, L. Jacobson, M. Kaneki, y J. A. J. Martyn. **Lipopolysaccharide Upregulates $\alpha 7$ Acetylcholine Receptors.** *Shock*, vol. 38, no. 2, pp. 213–219, 2012.
- [12] S. Huang, S. X. Li, N. Bren, K. Cheng, R. Gomoto, L. Chen, y S. M. Sine. **Complex between α -bungarotoxin and an $\alpha 7$ nicotinic receptor ligand-binding domain chimaera.** *Biochem. J.*, vol. 454, no. 2, pp. 303–10, 2013.
- [13] E. S. Deneris, J. Connolly, S. W. Rogers, y R. Duvoisin. **Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.** *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 12, no. 1, pp. 34–40, 1991.
- [14] S. J. Moss, B. J. McDonald, Y. Rudhard, y R. Schoepfer. **Phosphorylation of the predicted major intracellular domains of the rat and chick neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit by cAMP-**

- dependent protein kinase.** *Neuropharmacology*, vol. 35, no. 8, pp. 1023–1028, 1996.
- [15] R. L. Strausberg, E. A. Feingold, L. H. Grouse, J. G. Derge, R. D. Klausner, F. S. Collins, L. Wagner, C. M. Shenmen, G. D. Schuler, S. F. Altshul, B. Zeeberg, K. H. Buetow, C. F. Schaefer, N. K. Bhat, R. F. Hopkins, H. Jordan, T. Moore, S. I. Max, J. Wang, F. Hsieh, L. Diatchenko, K. Marusina, A. A. Farmer, G. M. Rubin, L. Hong, M. Stapleton, M. B. Soares, M. F. Bonaldo, T. L. Casavant, T. E. Scheetz, M. J. Brownstein, T. B. Usdin, S. Toshiyuki, P. Carninci, C. Prange, S. S. Raha, N. A. Loquellano, G. J. Peters, R. D. Abramson, S. J. Mullahy, S. A. Bosak, P. J. McEwan, K. J. McKernan, J. A. Malek, P. H. Gunaratne, S. Richards, K. C. Worley, S. Hale, A. M. Garcia, L. J. Gay, S. W. Hulyk, D. K. Villalon, D. M. Muzny, E. J. Sodergren, X. Lu, R. A. Gibbs, J. Fahey, E. Helton, M. Kettelman, A. Madan, S. Rodrigues, A. Sanchez, M. Whiting, A. Madan, A. C. Young, Y. Shevchenko, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, J. W. Touchman, E. D. Green, M. C. Dickson, A. C. Rodriguez, J. Grimwood, J. Schmutz, R. M. Myers, Y. S. N. Butterfield, M. I. Krzywinski, U. Skalska, D. E. Smailus, A. Schnerch, J. E. Schein, S. J. M. Jones, y M. A. Marra. **Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 26, pp. 16899–903, 2002.
- [16] F. Castelán, J. Mulet, M. Aldea, S. Sala, F. Sala, y M. Criado. **Cytoplasmic regions adjacent to the M3 and M4 transmembrane segments influence expression and function of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. A study with single amino acid mutants.** *J. Neurochem.*, vol. 100, no. 2, pp. 406–415, 2007.
- [17] J. Mukherjee, A. Kuryatov, S. J. Moss, J. M. Lindstrom, y R. Anand. **Mutations of cytosolic loop residues impair assembly and maturation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors.** *J. Neurochem.*, vol. 110, no. 6, pp. 1885–1894, 2009.
- [18] R. L. Papke, F. Ono, C. Stokes, J. M. Urban, y R. T. Boyd. **The nicotinic acetylcholine receptors of zebrafish and an evaluation of pharmacological tools used for their study.** *Biochem. Pharmacol.*, vol. 84, no. 3, pp. 352–365, 2012.
- [19] L. V. L. Borovikova, S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G. I. Botchkina, L. R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J. W. Eaton, y K. J. Tracey. **Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin.** *Nature*, vol. 405, no. Mayo, pp. 458–462, 2000.
- [20] E. P. van der Zanden, S. A. Snoek, S. E. Heinsbroek, O. I. Stanisor, C. Verseijden, G. E. Boeckstaens, M. P. Peppelenbosch, D. R. Greaves, S. Gordon, y W. J. De Jonge. **Vagus Nerve Activity Augments Intestinal Macrophage Phagocytosis via Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 4\beta 2$.** *Gastroenterology*, vol. 137, no. 3, pp. 1029–1039, 2009.
- [21] W.-Y. Cui, S. Zhao, R. Polanowska-Grabowska, J. Wang, J. Wei, B. Dash, S. L. Chang, J. J. Saucerman, J. Gu, y M. D. Li. **Identification and characterization of poly(I:C)-induced molecular responses attenuated by nicotine in mouse macrophages.** *Mol. Pharmacol.*, vol. 83, no. 1, pp. 61–72, 2013.
- [22] J. Gault, M. Robinson, R. Berger, C. Drebing, J. Logel, J. Hopkins, T. Moore, S. Jacobs, J. Meriwether, M. J. Choi, E. J. Kim, K. Walton, K.

- Buiting, A. Davis, C. Breese, R. Freedman, y S. Leonard. **Genomic Organization and Partial Duplication of the Human alpha 7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene (CHRNA7)**. *Library (Lond)*, vol. 185, pp. 173–185, 1998.
- [23] Ensembl. **Gallus gallus, gene CHRNA7**. *Ensembl* [online], http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG00000004096;r=10:6156717-6199170;t=ENSGALT00000006519, 2013.
- [24] Ensembl. **Danio rerio, gene CHRNA7**. *Ensembl* [online], http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Transcript/Summary?db=core;g=ENSDARG00000101702;r=7:53371605-53400001;t=ENSDART00000171463, 2013.
- [25] A. K. Jones, G. Elgar, y D. B. Sattelle. **The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the pufferfish, *Fugu rubripes***. *Genomics*, vol. 82, no. 4, pp. 441–451, 2003.
- [26] G. Vida, G. Peña, E. a Deitch, y L. Ulloa. **alpha7-Cholinergic Receptor Mediates Vagal Induction of Splenic Norepinephrine**. *J. Immunol.*, vol. 186, no. 7, pp. 4340–4346, 2011.
- [27] X. M. Song, J. G. Li, Y. L. Wang, H. Liang, Y. Huang, X. Yuan, Q. Zhou, y Z. Z. Zhang. **Effect of vagus nerve stimulation on thermal injury in rats**. *Burns*, vol. 36, no. 1, pp. 75–81, 2010.
- [28] C. C. Dos Santos, Y. Shan, A. Akram, A. S. Slutsky, y J. J. Haitzma. **Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury**. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 183, no. 4, pp. 471–482, 2011.
- [29] S. Guarini, D. Altavilla, M. M. Cainazzo, D. Giuliani, A. Bigiani, H. Marini, G. Squadrito, L. Minutoli, A. Bertolini, R. Marini, E. B. Adamo, F. S. Venuti, y F. Squadrito. **Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock**. *Circulation*, vol. 107, no. 8, pp. 1189–1194, 2003.
- [30] I. G. Priede. **The effect of swimming activity and section of the vagus nerves on heart rate in rainbow trout**. *J. Exp. Biol.*, vol. 60, no. Octubre, pp. 305–319, 1974.
- [31] D. G. Drescher, N. A. Ramakrishnan, M. J. Drescher, W. Chun, X. Wang, S. F. Myers, G. E. Green, K. Sadrazodi, A. A. Karadaghy, N. Poopat, A. N. Karpenko, K. M. Khan, y J. S. Hatfield. **Cloning and characterization of alpha9 subunits of the nicotinic acetylcholine receptor expressed by saccular hair cells of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Neuroscience*, vol. 127, no. 3, pp. 737–52, 2004.
- [32] S. Neumann, M. Razen, P. Habermehl, C. U. Meyer, F. Zepp, C. J. Kirkpatrick, y I. Wessler. **The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: Effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration**. *Life Sci.*, vol. 80, no. 24–25, pp. 2361–2364, 2007.
- [33] E. J. Molinari, O. Delbono, M. L. Messi, M. Renganathan, S. P. Arneric, J. P. Sullivan, y M. Gopalakrishnan. **Up-regulation of human alpha7 nicotinic receptors by chronic treatment with activator and antagonist ligands**. *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 347, no. 1, pp. 131–139, 1998.

- [34] Y. H. Yang, D. L. Li, X. Y. Bi, L. Sun, X. J. Yu, H. L. Fang, Y. Miao, M. Zhao, X. He, J. J. Liu, y W. J. Zang. **Acetylcholine Inhibits LPS-Induced MMP9 Production and Cell Migration via the $\alpha 7$ nAChR JAK2/STAT3 Pathway in RAW264.7 Cells.** *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 36, no. 5, pp. 2025–2038, 2015.
- [35] S. MacKenzie, J. V. Planas, y F. W. Goetz. **LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor- α mRNA in primary trout monocytes and *in vitro* differentiated macrophages.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 27, no. 5, pp. 393–400, 2003.
- [36] J. L. Vincent, S. M. Opal, J. C. Marshall, y K. J. Tracey. **Sepsis definitions: Time for change.** *Lancet*, vol. 381, no. 9868, pp. 774–775, 2013.
- [37] T. Kawai y S. Akira. **Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity.** *Immunity*, vol. 34, no. 5, pp. 637–50, 2011.
- [38] R. Medzhitov. **Septic shock: on the importance of being tolerant.** *Immunity*, vol. 39, no. 5, pp. 799–800, 2013.
- [39] D. Pietretti y G. F. Wiegertjes. **Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 43, no. 2, pp. 205–22, 2014.
- [40] M. P. Sepulcre, F. Alcaraz-Pérez, A. López-Muñoz, F. J. Roca, J. Me-seguer, M. L. Cayuela, y V. Mulero. **Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- κ B activation.** *J. Immunol.*, vol. 182, no. 4, pp. 1836–45, 2009.
- [41] M. Matsumoto y T. Seya. **TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C).** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 7, pp. 805–12, 2008.
- [42] M. Rosas-Ballina, R. Goldstein, M. Gallowitsch-Puerta, Y. Lihong, S. I. Valdés-Ferrer, P. N. B, S. Chavan, Y. Al-Abed, Y. Huan, y K. J. Tracey. **The Selective $\alpha 7$ Agonist GTS-21 Attenuates Cytokine Production in Human Whole Blood and Human Monocytes Activated by Ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE.** *Mol. Med.*, vol. 15, no. 7–8, pp. 195–202, 2009.
- [43] S. Halevi, L. Yassin, M. Eshel, F. Sala, S. Sala, M. Criado, y M. Treinin. **Conservation within the RIC-3 gene family: Effectors of mammalian nicotinic acetylcholine receptor expression.** *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 36, pp. 34411–34417, 2003.
- [44] F. Castelán, M. Castillo, J. Mulet, S. Sala, F. Sala, E. Domínguez Del Toro, y M. Criado. **Molecular characterization and localization of the RIC-3 protein, an effector of nicotinic acetylcholine receptor expression.** *J. Neurochem.*, vol. 105, no. 3, pp. 617–627, 2008.
- [45] A. Dau, P. Komal, M. Truong, G. Morris, G. Evans, y R. Nashmi. **RIC-3 differentially modulates $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nicotinic receptor assembly, expression, and nicotine-induced receptor upregulation.** *BMC Neurosci.*, vol. 14, no. 1, p. 47, 2013.
- [46] A. S. Vallés, A. M. Roccamo, y F. J. Barrantes. **Ric-3 chaperone-mediated stable cell-surface expression of the neuronal $\alpha 7$ nicotinic**

- acetylcholine receptor in mammalian cells.** *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 30, no. 6, pp. 818–27, 2009.
- [47] H. M. Bennett, K. Lees, K. M. Harper, A. K. Jones, D. B. Sattelle, S. Wonnacott, y A. J. Wolstenholme. ***Xenopus laevis* RIC-3 enhances the functional expression of the *C. elegans* homomeric nicotinic receptor, ACR-16, in *Xenopus* oocytes.** *J. Neurochem.*, vol. 123, no. 6, pp. 911–918, 2012.
- [48] J. K. Alexander, D. Sagher, A. V Krivoshein, M. Criado, G. Jefford, y W. N. Green. **Ric-3 promotes alpha7 nicotinic receptor assembly and trafficking through the ER subcompartment of dendrites.** *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 30, no. 30, pp. 10112–26, 2010.
- [49] R. L. Papke y J. K. Papke. **Comparative pharmacology of rat and human alpha7 nAChR conducted with net charge analysis.** *Br. J. Pharmacol.*, vol. 137, no. 1, pp. 49–61, 2002.
- [50] D. S. Johnson, J. Martinez, A. B. Elgoyhen, S. F. Heinemann, y J. M. McIntosh. **Alpha-Conotoxin lml exhibits subtype-specific nicotinic acetylcholine receptor blockade: preferential inhibition of homomeric alpha 7 and alpha 9 receptors.** *Mol. Pharmacol.*, vol. 48, no. 2, pp. 194–199, 1995.
- [51] R. L. Papke. **Estimation of both the potency and efficacy of alpha7 nAChR agonists from single-concentration responses.** *Life Sci.*, vol. 78, no. 24, pp. 2812–2819, 2006.
- [52] K. J. Tracey. **Reflex control of immunity.** *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 6, pp. 418–428, 2009.
- [53] T. R. Bernik, S. G. Friedman, M. Ochani, R. DiRaimo, L. Ulloa, H. Yang, S. Sudan, C. J. Czura, S. M. Ivanova, y K. J. Tracey. **Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway.** *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 6, pp. 781–788, 2002.
- [54] J. M. Huston, M. Ochani, M. Rosas-Ballina, H. Liao, K. Ochani, V. A. Pavlov, M. Gallowitsch-Puerta, M. Ashok, C. J. Czura, B. Foxwell, K. J. Tracey, y L. Ulloa. **Splenectomy inactivates the cholinergic anti-inflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis.** *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 7, pp. 1623–8, 2006.
- [55] W. Parrish, M. Rosas-Ballina, M. Gallowitsch-Puerta, M. Ochani, K. Ochani, Y. Li-Hong, H. LaQueta, X. Lin, N. Patel, S. M. Johnson, S. Chanvan, R. S. Goldstein, C. J. Czura, E. J. Miller, Y. Al-Abed, K. J. Tracey, y V. A. Pavlov. **Modulation of TNF Release by Choline Requires α 7 Subunit Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Signaling.** *Mol. Med.*, vol. 14, no. 9–10, pp. 567– 574, 2008.
- [56] V. A. Pavlov, M. Ochani, L. H. Yang, M. Gallowitsch-Puerta, K. Ochani, X. Lin, J. Levi, W. R. Parrish, M. Rosas-Ballina, C. J. Czura, G. J. LaRosa, E. J. Miller, K. J. Tracey, y Y. Al-Abed. **Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis*.** *Crit. Care Med.*, vol. 35, no. 4, pp. 1139–1144, 2007.
- [57] A. Szabó, J. Nemcsók, P. Kása, y D. Budai. **Comparative study of acetylcholine synthesis in organs of freshwater teleosts.** *Fish Physiol. Biochem.*, vol. 9, no. 2, pp. 93–99, 1991.

- [58] S. E. Pérez, J. Yáñez, O. Marín, N. Anadón, A. González, y I. Rodríguez-Moldes. **Distribution of Choline Acetyltransferase (ChAT) Immunoreactivity in the Brain of the Adult Trout and Tract-Tracing Observations on the Connections of the Nuclei of the Isthmus.** *J. Comp. Neurol.*, vol. 474, no. Febrero, pp. 450–474, 2000.
- [59] Molecular Probes, Invitrogen detection technologies. **Amplex® Red Acetylcholine / Acetylcholinesterase Assay Kit (A12217).** 2004.
- [60] T. Fujii, T. Tsuchiya, S. Yamada, K. Fujimoto, T. Suzuki, T. Kasahara, y K. Kawashima. **Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines.** *J. Neurosci. Res.*, vol. 44, no. 1, pp. 66–72, 1996.
- [61] T. Fujii, S. Tajima, S. Yamada, Y. Watanabe, K. Z. Sato, M. Matsui, H. Misawa, T. Kasahara, y K. Kawashima. **Constitutive expression of mRNA for the same choline acetyltransferase as that in the nervous system, an acetylcholine-synthesizing enzyme, in human leukemic T-cell lines.** *Neurosci. Lett.*, vol. 259, pp. 71–74, 1999.
- [62] S. Fillatreau, A. Six, S. Magadan, R. Castro, J. O. Sunyer, y P. Boudinot. **The astonishing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish.** *Front. Immunol.*, vol. 4, no. Febrero, pp. 1–14, 2013.
- [63] A. E. Ellis. **Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 25, no. 8–9, pp. 827–839, 2001.
- [64] J. Corrales, I. Mulero, V. Mulero, y E. J. Noga. **Detection of antimicrobial peptides related to piscidin 4 in important aquacultured fish.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 34, no. 3, pp. 331–343, 2010.
- [65] B. Magnadóttir. **Innate immunity of fish (overview).** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 137–51, 2006.
- [66] L. A. Babiuk, L. M. Sordillo, M. Campos, H. P. A. Hughes, A. Rossi-Campos, y R. Harland. **Application of Interferons in the Control of Infectious Diseases of Cattle.** *J. Dairy Sci.*, vol. 74, no. 12, pp. 4385–4398, 1991.
- [67] F. Blecha. **Cytokines: Applications in Domestic Food Animals.** *J. Dairy Sci.*, vol. 74, no. 1, pp. 328–339, 1991.
- [68] M. Daley, T. Williams, P. Coyle, G. Furda, R. Dougherty, y P. Hayes. **Prevention and treatment of staphylococcus aureus infections with recombinant cytokines.** *Cytokine*, vol. 5, no. 3, pp. 276–284, 1993.
- [69] M. P. Murtaugh, M. J. Baarsch, Y. Zhou, R. W. Scamurra, y G. Lin. **Inflammatory cytokines in animal health and disease.** *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 54, no. 1–4, pp. 45–55, 1996.
- [70] M. G. Netea. **Training innate immunity: The changing concept of immunological memory in innate host defence.** *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 43, no. 8, pp. 881–884, 2013.
- [71] M. G. Netea, E. Latz, H. G. Kingston, L. A. Mills, y J. O. 'Neill. **Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense.** *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 7, pp. 675–679, 2015.
- [72] M. Liovic, M. Ozir, A. B. Zavec, S. Peternel, R. Komel, y T. Zupancic. **Inclusion bodies as potential vehicles for recombinant protein delivery into epithelial cells.** *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 1, p. 67, 2012.

- [73] E. Vázquez, J. L. Corchero, J. F. Burgueño, J. Seras-Franzoso, A. Kosoy, R. Bosser, R. Mendoza, J. M. Martínez-Láinez, U. Rinas, E. Fernández, L. Ruiz-Avila, E. García-Fruitós, y A. Villaverde. **Functional inclusion bodies produced in bacteria as naturally occurring nanopills for advanced cell therapies.** *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 13, pp. 1742–7, 2012.
- [74] J. Seras-Franzoso, K. Peebo, J. Luis Corchero, P. M. Tsimbouri, U. Unzueta, U. Rinas, M. J. Dalby, E. Vazquez, E. García-Fruitós, y A. Villaverde. **A nanostructured bacterial bioscaffold for the sustained bottom-up delivery of protein drugs.** *Nanomedicine (Lond)*, vol. 8, no. 10, pp. 1587–99, 2013.
- [75] I. Ratera, S. Peternel, J. Seras-Franzoso, O. Cano-Garrido, E. García-Fruitós, R. Cubarsí, E. Vazquez, J. L. Corchero, E. Rodríguez-Carmona E., J. Veciana, y A. Villaverde. **Capítulo 8, Biomedical Applications of Bacterial Inclusion Bodies.** S. M. Doglia y M. Lotti, Ed. **Protein aggregation in bacteria: functional and structural properties of inclusion bodies in bacteria cells.** USA, Wiley, pp, 268, 2014.
- [76] E. García-Fruitós, E. Vázquez, C. Díez-Gil, J. L. Corchero, J. Seras-Franzoso, I. Ratera, J. Veciana, y A. Villaverde. **Bacterial inclusion bodies: making gold from waste.** *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 2, pp. 65–70, 2012.
- [77] M. Joerink, H. F. J. Savelkoul, y G. F. Wiegertjes. **Evolutionary conservation of alternative activation of macrophages: structural and functional characterization of arginase 1 and 2 in carp (*Cyprinus carpio* L.).** *Mol. Immunol.*, vol. 43, no. 8, pp. 1116–28, 2006.
- [78] E. J. Nya y B. Austin. **Use of bacterial lipopolysaccharide (LPS) as an immunostimulant for the control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).** *J. Appl. Microbiol.*, vol. 108, no. 2, pp. 686–94, 2010.
- [79] A. Callol, N. Roher, C. Amaro, y S. MacKenzie. **Characterization of PAMP/PRR interactions in European eel (*Anguilla anguilla*) macrophage-like primary cell cultures.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 35, no. 4, pp. 1216–23, 2013.
- [80] E. Casadei, S. Bird, S. Wadsworth, J. L. González Vecino, y C. J. Secombes. **The longevity of the antimicrobial response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a peptidoglycan (PG) supplemented diet.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 44, no. 1, pp. 316–320, 2015.
- [81] C. H. Lee, H. Do Jeong, J. K. Chung, H. H. Lee, y K. H. Kim. **CpG motif in synthetic ODN primes respiratory burst of olive flounder *Paralichthys olivaceus* phagocytes and enhances protection against *Edwardsiella tarda*.** *Dis. Aquat. Organ.*, vol. 56, no. 1, pp. 43–48, 2003.
- [82] O. Cano-Garrido, E. Rodríguez-Carmona, C. Díez-Gil, E. Vázquez, E. Elizondo, R. Cubarsí, J. Seras-Franzoso, J. L. Corchero, U. Rinas, I. Ratera, N. Ventosa, J. Veciana, A. Villaverde, y E. García-Fruitós. **Supramolecular organization of protein-releasing functional amyloids solved in bacterial inclusion bodies.** *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 4, pp. 6134–42, 2013.

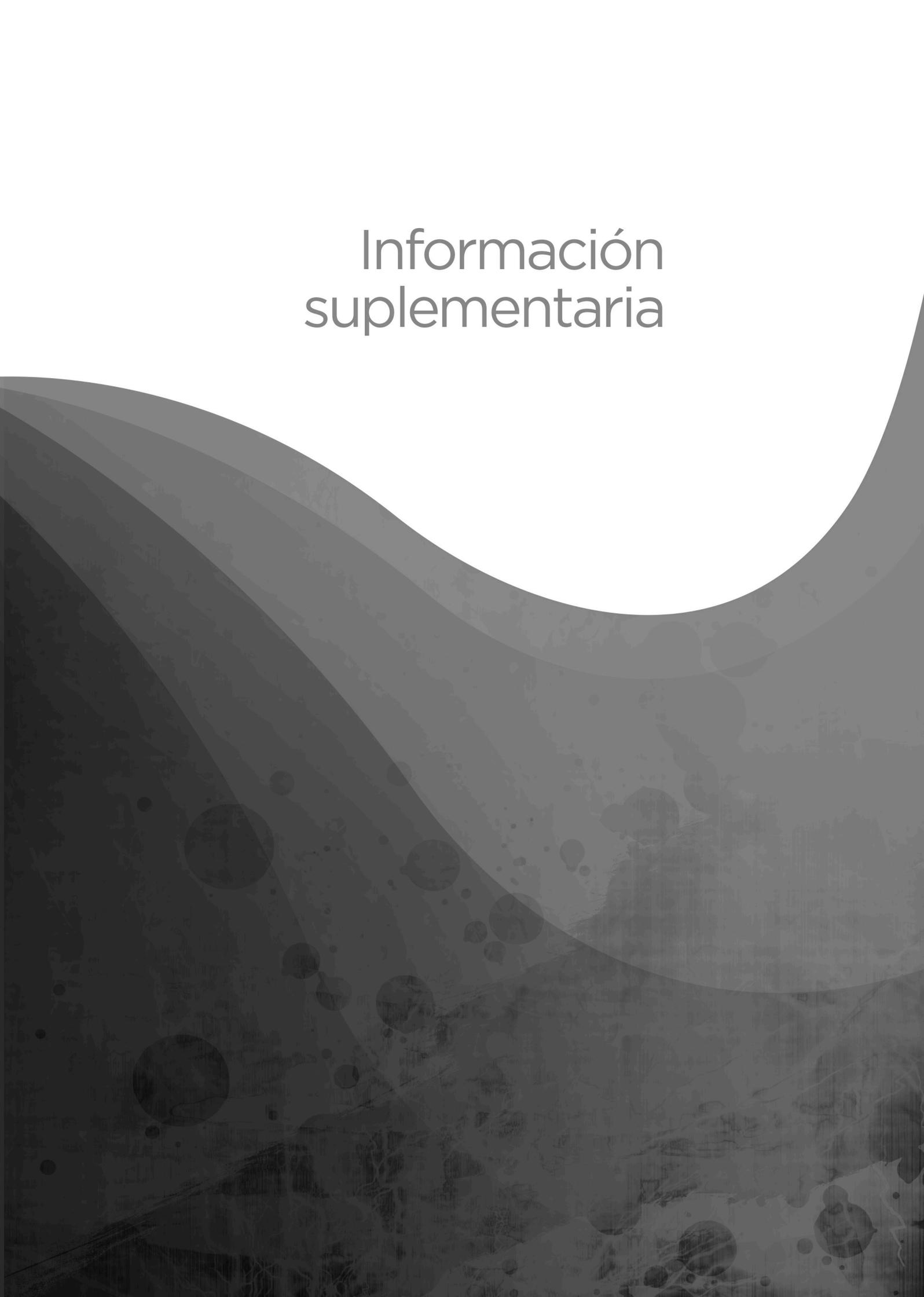
- [83] N. J. Hewitt, M. J. G. Lechón, J. B. Houston, D. Hallifax, H. S. Brown, P. Maurel, J. G. Kenna, L. Gustavsson, C. Lohmann, C. Skonberg, A. Guillouzo, G. Tuschl, A. P. Li, E. LeCluyse, G. M. M. Groothuis, y J. G. Hengstler. **Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies.** *Drug Metab. Rev.*, vol. 39, no. 1, pp. 159–234, 2007.
- [84] M. Deng, M. J. Scott, P. Loughran, G. Gibson, C. Sodhi, S. Watkins, D. Hackam, y T. R. Billiar. **Lipopolysaccharide clearance, bacterial clearance, and systemic inflammatory responses are regulated by cell type-specific functions of TLR4 during sepsis.** *J. Immunol.*, vol. 190, no. 10, pp. 5152–60, 2013.
- [85] S. A. M. Martin, A. Douglas, D. F. Houlihan, y C. J. Secombes. **Starvation alters the liver transcriptome of the innate immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*).** *BMC Genomics*, vol. 11, p. 418, 2010.
- [86] B. G. Pardo, A. Millán, A. Gómez-Tato, C. Fernández, C. Bouza, J. A. Alvarez-Dios, S. Cabaleiro, J. Lamas, J. M. Leiro, y P. Martínez. **Gene Expression Profiles of Spleen, Liver, and Head Kidney in Turbot (*Scophthalmus maximus*) Along the Infection Process with *Phylasterides dicentrarchi* Using an Immune-Enriched Oligo-Microarray.** *Mar. Biotechnol.*, vol. 14, no. 5, pp. 570–582, 2012.
- [87] A. Ruyra, M. Cano-Sarabia, S. A. MacKenzie, D. Maspocho, y N. Roher. **A Novel Liposome-Based Nanocarrier Loaded with an LPS-dsRNA Cocktail for Fish Innate Immune System Stimulation.** *PLoS One*, vol. 8, no. 10, pp. 1–13, 2013.
- [88] T. M. Scown, E. Santos, B. D. Johnston, B. Gaiser, M. Baalousha, S. Mitov, J. R. Lead, V. Stone, T. Fernandes, M. Jepson, van A. R., y C. R. Tyler. **Assessment of cultured fish hepatocytes for studying cellular uptake and (eco)toxicity of nanoparticles.** *Environ. Chem.*, vol. 7, no. 1, pp. 36–46, 2010.
- [89] A. Trapani, D. Mandracchia, C. Di Franco, H. Cordero, P. Morcillo, R. Comparelli, A. Cuesta, y M. A. Esteban. **In vitro characterization of 6-Coumarin loaded solid lipid nanoparticles and their uptake by immunocompetent fish cells.** *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 127, pp. 79–88, 2015.
- [90] C. Venkatesan, S. Vimal, y A. A. Hameed. **Synthesis and Characterization of Chitosan Tripolyphosphate Nanoparticles and its Encapsulation Efficiency Containing Russell's Viper Snake Venom.** *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, vol. 27, no. 8, pp. 406 – 411, 2013.
- [91] S. Akira, S. Uematsu, y O. Takeuchi. **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783–801, 2006.
- [92] C. A. Power, R. J. F. Markham, y A. W. Donald. **Uptake and Tissue Distribution of Liposomes after Intraperitoneal Administration to Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson): a preliminary report.** *J. Fish Dis.*, vol. 13, pp. 329–332, 1990.

- [93] A. Zapata, B. Diez, T. Cejalvo, C. Gutiérrez-De Frías, y A. Cortés. **Ontogeny of the immune system of fish.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 126–136, 2006.
- [94] C. Agius y R. J. Roberts. **Melano-macrophage centres and their role in fish pathology.** *J. Fish. Dis.*, vol. 26, no. 9, pp. 499–509, 2003.
- [95] A. Ruyra, M. Cano-Sarabia, P. García-Valtananen, D. Yero, I. Gibert, S. A. Mackenzie, A. Estepa, D. Maspoch, y N. Roher. **Targeting and stimulation of the zebrafish (*Danio rerio*) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes.** *Vaccine*, vol. 32, no. 31, pp. 3955–62, 2014.
- [96] D. B. Iliev, H. Thim, L. Lagos, R. Olsen, y J. B. Jørgensen. **Homing of antigen-presenting cells in head kidney and spleen - salmon head kidney hosts diverse APC types.** *Front. Immunol.*, vol. 4, no. Junio, pp. 1–13, 2013.
- [97] L. Ribas y F. Piferrer. **The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research.** *Rev. Aquac.*, vol. 6, no. 4, pp. 209–240, 2014.
- [98] G. J. Lieschke y P. D. Currie. **Animal models of human disease: zebrafish swim into view.** *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, no. 5, pp. 353–367, 2007.
- [99] J. Ablain y L. I. Zon. **Of fish and men: Using zebrafish to fight human diseases.** *Trends Cell Biol.*, vol. 23, no. 12, pp. 584–586, 2013.
- [100] C. Sullivan y C. H. Kim. **Zebrafish as a model for infectious disease and immune function.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 25, no. 4, pp. 341–350, 2008.
- [101] B. Novoa y A. Figueras. **Zebrafish: Model for the Study of Inflammation and the Innate Immune Response to Infectious Diseases Beatriz.** *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 946, pp. 253–75, 2012.
- [102] B. Novoa, A. Romero, V. Mulero, I. Rodríguez, I. Fernández, y A. Figueras. **Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of vaccination against viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV).** *Vaccine*, vol. 24, no. 31–32, pp. 5806–5816, 2006.
- [103] S. E. LaPatra, L. Barone, G. R. Jones, y L. I. Zon. **Effects of infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus infection on hematopoietic precursors of the zebrafish.** *Blood Cells. Mol. Dis.*, vol. 26, pp. 445–452, 2000.
- [104] M. Ludwig, N. Palha, C. Torhy, V. Briolat, E. Colucci-Guyon, M. Brémont, P. Herbomel, P. Boudinot, y J. P. Levraud. **Whole-body analysis of a viral infection: Vascular endothelium is a primary target of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in zebrafish larvae.** *PLoS Pathog.*, vol. 7, no. 2, 2011.
- [105] L. Cantas, P. J. Midtlyng, y H. Sørum. **Impact of antibiotic treatments on the expression of the R plasmid tra genes and on the host innate immune activity during pRAS1 bearing *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish (*Danio rerio*).** *BMC Microbiol.*, vol. 12, no. 1, p. 37, 2012.

- [106] I. Rojo, O. M. de Llárduya, A. Estonba, y M. A. Pardo. **Innate immune gene expression in individual zebrafish after *Listonella anguillarum* inoculation.** *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 23, no. 6, pp. 1285–1293, 2007.
- [107] B. Lin, S. Chen, Z. Cao, Y. Lin, D. Mo, H. Zhang, J. Gu, M. Dong, Z. Liu, y A. Xu. **Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: Striking similarities and obvious differences with mammals.** *Mol. Immunol.*, vol. 44, no. 4, pp. 295–301, 2007.
- [108] M. G. Prouty, N. E. Correa, L. P. Barker, P. Jagadeeswaran, y K. E. Klose. **Zebrafish-*Mycobacterium marinum* model for mycobacterial pathogenesis.** *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 225, no. 2, pp. 177–182, 2003.
- [109] J. D. Miller y M. N. Neely. **Zebrafish as a model host for streptococcal pathogenesis.** *Acta Trop.*, vol. 91, no. 1, pp. 53–68, 2004.
- [110] M. E. Pressley, P. E. Phelan, P. Eckhard Witten, M. T. Mellon, y C. H. Kim. **Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish.** *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 29, no. 6, pp. 501–513, 2005.
- [111] F. M. Rollwagen y S. Baqar. **Oral cytokine administration.** *Trends Immunol. Today*, vol. 17, no. 12, pp. 548–550, 1996.
- [112] R. S. Kornbluth y G. W. Stone. **Immunostimulatory combinations: designing the next generation of vaccine adjuvants.** *J. Leukoc. Biol.*, vol. 80, no. 5, pp. 1084–1102, 2006.
- [113] J. K. Lunney. **Cytokines orchestrating the immune response.** *Rev. Sci. Tech.*, vol. 17, no. 1, pp. 84–94, 1998.
- [114] A. Villaverde, E. García-Fruitós, U. Rinas, J. Seras-Franzoso, A. Kosoy, J. L. Corchero, y E. Vazquez. **Packaging protein drugs as bacterial inclusion bodies for therapeutic applications.** *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, p. 76, 2012.
- [115] C. Díez-Gil, S. Krabbenborg, E. García-Fruitós, E. Vazquez, E. Rodríguez-Carmona, I. Ratera, N. Ventosa, J. Seras-Franzoso, O. Cano-Garrido, N. Ferrer-Miralles, A. Villaverde, y J. Veciana. **The nanoscale properties of bacterial inclusion bodies and their effect on mammalian cell proliferation.** *Biomaterials*, vol. 31, no. 22, pp. 5805–12, 2010.
- [116] D. Parra, F. E. Reyes-Lopez, y L. Tort. **Mucosal Immunity and B Cells in Teleosts: Effect of Vaccination and Stress.** *Front. Immunol.*, vol. 6, no. Julio, pp. 1–12, 2015.
- [117] S. Yasumoto, Y. Kuzuya, M. Yasuda, T. Yoshimura, y T. Miyazaki. **Oral immunization of common carp with a liposome vaccine fusing Koi Herpesvirus antigen.** *Fish Pathol.*, vol. 41, no. 4, pp. 141–145, 2006.
- [118] M. Adomako, S. St-Hilaire, Y. Zheng, J. Eley, R. D. Marcum, W. Sealey, B. C. Donahower, S. Lapatra, y P. P. Sheridan. **Oral DNA vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against infectious haematopoietic necrosis virus using PLGA [Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid)] nanoparticles.** *J. Fish Dis.*, vol. 35, no. 3, pp. 203–214, 2012.

- [119] Y. Chen, X. Zhu, Y. Yang, D. Han, J. Jin, y S. Xie. **Effect of dietary chitosan on growth performance, haematology, immune response, intestine morphology, intestine microbiota and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)**. *Aquac. Nutr.*, vol. 20, no. 5, pp. 532–546, 2014.
- [120] A. Alishahi, A. Mirvaghefi, M. R. Tehrani, H. Farahmand, S. Koshio, F. A. Dorkoosh, y M. Z. Elsabee. **Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, no. 1, pp. 142–146, 2011.
- [121] B. N. Fredriksen y J. Grip. **PLGA/PLA micro- and nanoparticle formulations serve as antigen depots and induce elevated humoral responses after immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)**. *Vaccine*, vol. 30, no. 3, pp. 656–667, 2012.
- [122] N. A. Ballesteros, R. Castro, B. Abos, S. S. Rodríguez Saint-Jean, S. I. Pérez-Prieto, y C. Tafalla. **The Pyloric Caeca Area Is a Major Site for IgM+ and IgT+ B Cell Recruitment in Response to Oral Vaccination in Rainbow Trout**. *PLoS One*, vol. 8, no. 6, 2013.
- [123] Food and Agriculture Organization of the United. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**, 2014.
- [124] I. Sommerset, B. Krossøy, E. Biering, y P. Frost. **Vaccines for fish in aquaculture**. *Expert Rev. Vaccines*, vol. 4, no. 1, pp. 89–101, 2005.

Información suplementaria

The image features a minimalist design. The upper portion is a clean white space containing the text 'Información suplementaria' in a simple, sans-serif font. Below this, a large, dark grey area with a complex, layered texture dominates the lower two-thirds of the frame. This dark area is defined by a large, white, curved shape that arches across the top, creating a sense of depth and movement. The texture within the dark area consists of various shades of grey, some circular patterns, and a grainy, almost marbled appearance.

Anexo 1

El receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7
($\alpha 7$ AChR) modula la respuesta frente a
poly (I:C) en macrófagos de trucha:
estudio del reflejo inflamatorio
en teleósteos

Gen	Nombre del cebador	Secuencia	Número de acceso
Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$	om_ $\alpha 7$ ACh_degenerado	For_CAGATCATGGAYGTGGATGARAAGAA Rev_CGCTTCATMCGYAGGCCACC	KT634308
Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$	om_ $\alpha 7$ ACh_RACE 5'	GSP1_GGATTTTCAGAAGAGAGGGTGACAG GSP2_ATGCAGCTTTTGTACCTT	KT634308
Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$	om_ $\alpha 7$ ACh_RACE 3'	GSP1_CCGCCTCCAAGGACTTCTTC	KT634308
Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$	om_ $\alpha 7$ ACh	For_GTGGCTTCGAGAGTATCTCCC Rev_GTTGGACATGTACCCGGAGA	KT634308
Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$	om_ $\alpha 7$ ACh_Exón1	For_ATGCAGCTTTTGTATACC Rev_CAGTCTGATGCAGATCATGGATGTG	KT634308
Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$	om_ $\alpha 7$ ACh_Exón9	For_GGAGAGTGATGACCCAGAGC Rev_CGATGGTGAGATGATGTTG	KT634308
Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 9$ I	om_ $\alpha 9$ ACh_I	For_CACTGGCCCAAGGTAICTCAT Rev_TGCTGATAGTCCAGCTCCT	AY037940.1
Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 9$ II	om_ $\alpha 9$ ACh_II	For_CCCTGACTGTCTCCAGCTC Rev_CTCTGGTGATGTGGTGTGG	AY611482.1
Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 9$ III	om_ $\alpha 9$ ACh_III	For_CCCTGCATGATGATCTCCTT Rev_CAAGGACTCCCCATTACAT	AY611483.1
Factor de elongación 1 α	om_EF1	For_CAAGGATATCCGTCGTGGCA Rev_ACAGCGAAGCAAGGAGG	NM_001124339.1
Interleuquina 1 β	om_IL-1 β	For_GGAGGCGAGCAGTACCACAAA Rev_CCGATTTGGAGCAGGACAGG	NM_001124347.2
Interleuquina 6	om_IL-6	For_TTTCAGAAGCCCGTGAAGAGA Rev_TCTTTGACCAGCCATATCAGCA	NM_001124657.1
Factor de necrosis tumoral α	om_TNF α	For_CGCTGACACAGTGCAGTGGA Rev_TCCCGATGGAGTCCGAATA	NM_001124357.1
Metaloproteínasa de la matriz 9	om_MMP9	For_TTCCAATCAAGGGCAACTC Rev_TCAGCCCCACAGTTAAGAG	NM_001124370.1
Supresor de la señalización de citoquinas 3	om_SOCS3	For_AACAACACAAGATATCAAGCTCAAG Rev_GAAGGCTCTGTAACGGTGAGGCAG	AM748723.1
Quimioquina (C-C motivo) ligando 4	om_CCL4	For_GTGCCATCACTTTTACC Rev_ACATTTCTTCGGTCCGCTTG	NM_001123618.1
Interferón α	om_IFN α	For_GCCAGTCTTTTCCCAAC Rev_CCTCTCAGGTTTATGGCAGGT	NM_0001124531.1
Resistencia a Mixovirus	om_Mx	For_ATGCCACCTTACAGGAGATGAT Rev_TGCAGCTGGGAAGCAAATCC	NM_001171901.1
CC quimioquina 6	om_CK6	For_CGAATCTGCTGACTTCC Rev_TGGTGAGTTGTGACCATTGA	CA355962.1
Viperina	om_VIG	For_CAGTTCAGTGGCTTTGACGA Rev_ACAAACGCCCTCAAGGTATGG	AF076620
Receptor de tipo Toll 3	om_TLR3	For_ACGGCTCAACCTGAATATGG Rev_GCTCTCCAGTGCCTTAGTG	DQ459470
Melanoma asociada a diferenciación	om_MDA5	For_TTTGTGCTGAGCATCTACGG Rev_TTAATGATGGCTCCTCGTC	FN396357
Receptor de tipo Toll 8 β	om_TLR8 β	For_CATGCAATGTCACCATAGCC Rev_CACAACCTGTGAAGCCAGA	GQ422120.1
Catelicidina 1	om_CAMP1	For_GGCTGACCTTCCCATACAG Rev_CAGGTTGTGCTTGCCTCC	NM_001124480.1

Tabla 1. Cebadores específicos de trucha arcoíris para la clonación del receptor $\alpha 7$ nACh, Q-PCR y RT-PCR.

Nomenclatura de los cebadores degenerados: Y: C + T; R: A + G y M: A + C.

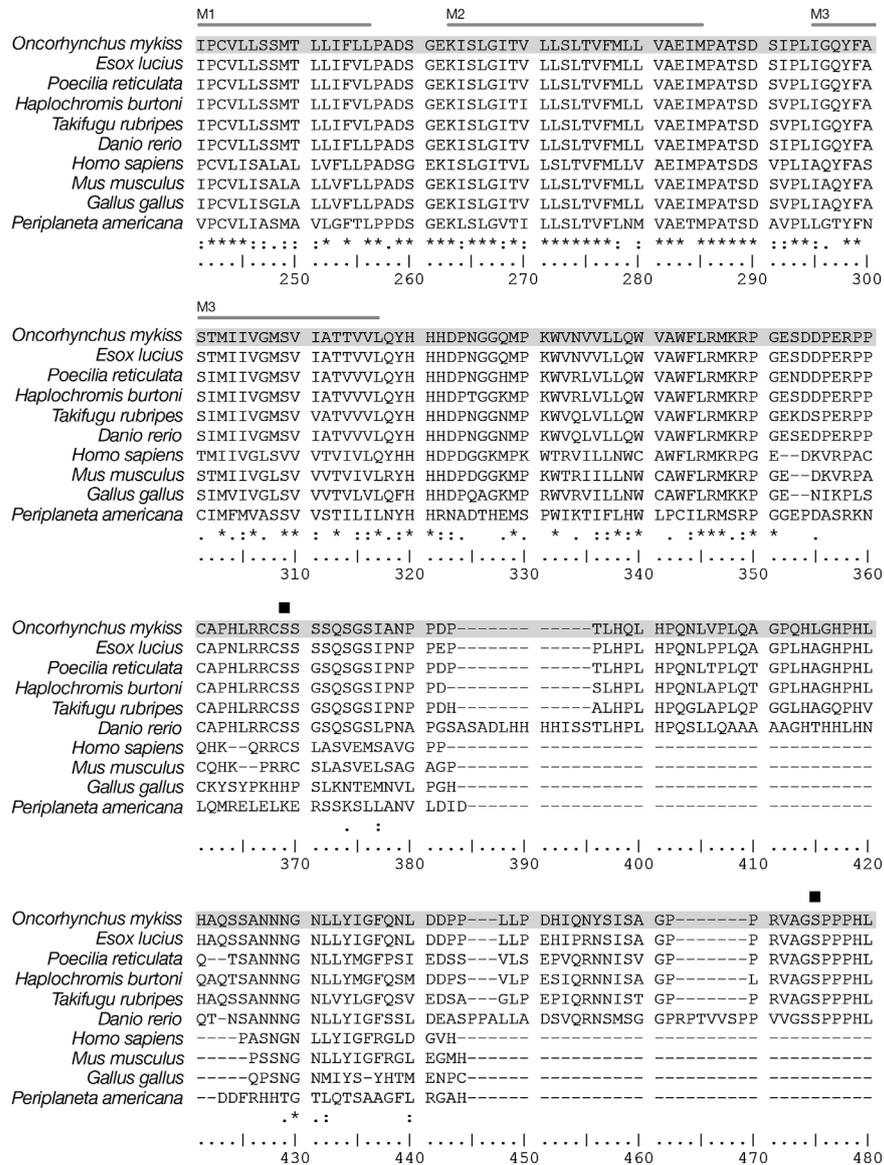


Figura 1 (continuación). Alineación de las secuencias de proteínas del receptor $\alpha 7nACh$ de diferentes especies.

En la alineación se representan los aminoácidos totalmente conservados (★) y los sitios putativos de fosforilación (■). Las líneas indican la continuación de la región transmembrana M1 y las regiones M2 y M3. Las áreas sombreadas de la secuencia del receptor $\alpha 7nACh$ de *O. mykiss* muestran la región transmembrana de canales iónicos (en color gris claro).

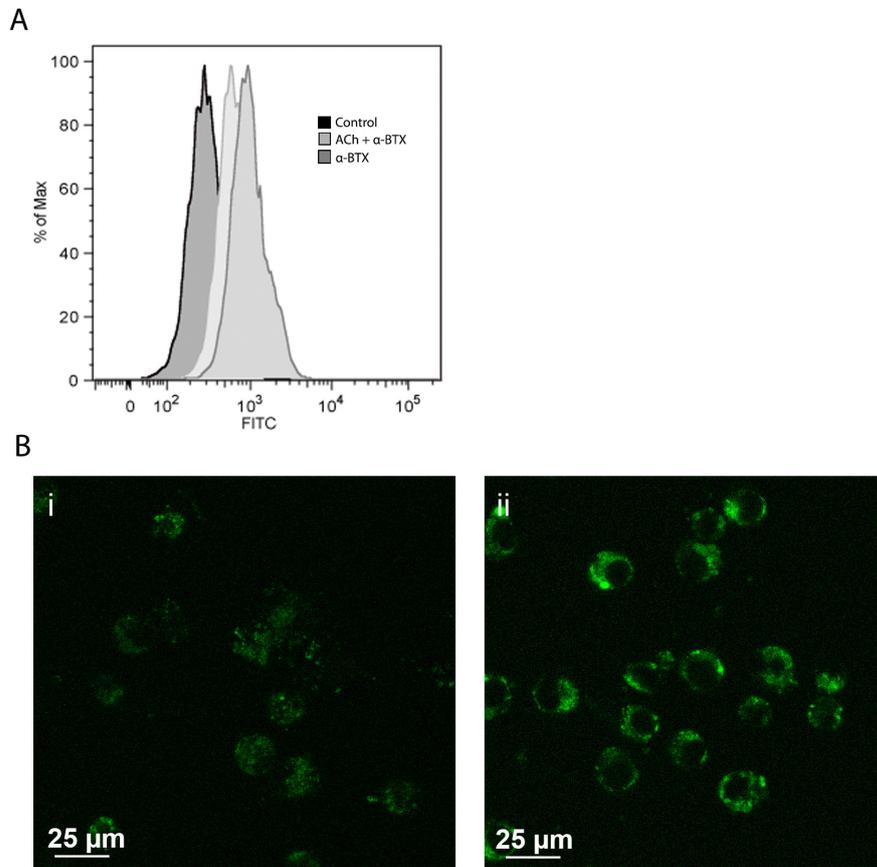


Figura 2. Unión de la α -BTX en macrófagos de ratón.

A) Gráfico representativo de citometría de flujo de la unión de la α -BTX por macrófagos de ratón (J774A.1). Las células fueron incubadas con $100 \mu\text{M}$ de ACh durante 20 min previo a la adición de $1,5 \mu\text{g/ml}$ α -BTX-FITC durante 1 h. **B)** Imágenes de microscopia confocal de la unión de α -BTX en la membrana de macrófagos de ratón. Las células fueron incubadas con $1,5 \mu\text{g/ml}$ de α -BTX-FITC durante 1 h. **(i)** Células control, **(ii)** Células con α -BTX-FITC.

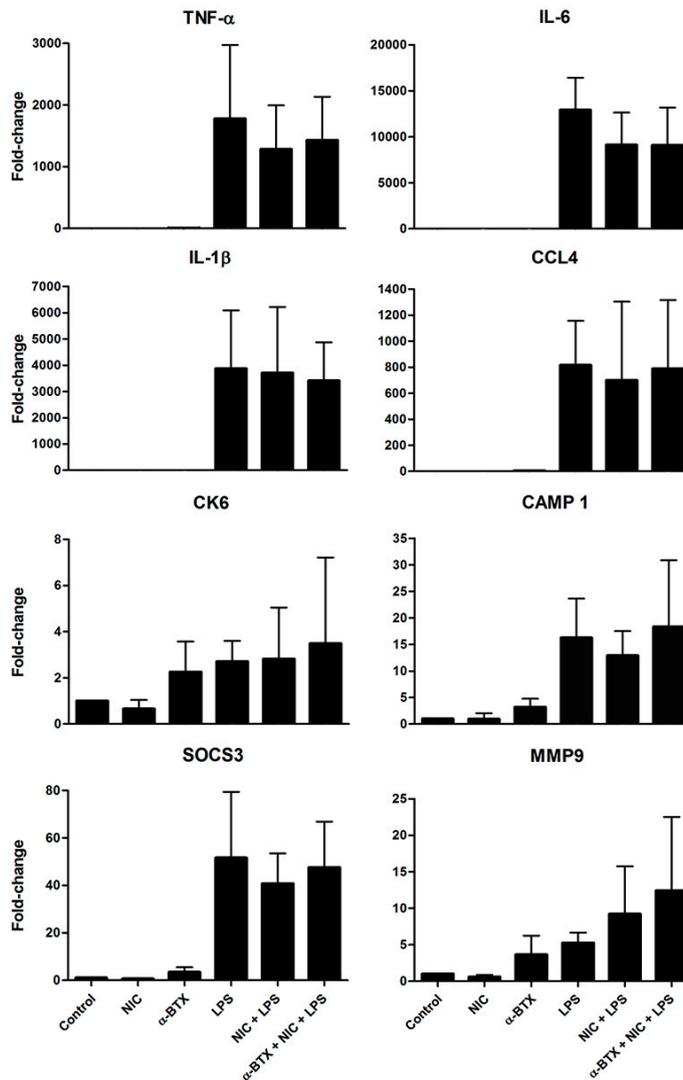


Figura 3. **Análisis de expresión génica en células HKM estimuladas con NIC y α -BTX previo a la estimulación con LPS.**

Las células fueron cultivadas con 1,5 μ g/ml de α -BTX durante 30 min, posteriormente se agregó 100 μ M de NIC durante 20 min y finalmente se añadió 10 μ g/ml de LPS durante 12 h. La expresión génica fue analizada a través de Q-PCR. Los valores representan el promedio y la desviación estándar (n = 4). Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey, respecto al control: *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.

Anexo 2

Nanopartículas proteicas como
plataforma de entrega de
inmunoestimulantes para peces



Gen	Nombre del cebador	Secuencia	Número de acceso
Factor de elongación 1 α	om_EF1	For_CAAGGATATCCGTCGTGGCA Rev_ACAGCGAAACGACCAAGAGG	NM_001124339.1
Factor de necrosis tumoral α	om_TNF- α	For_CGCTGACACAGTGCACTGGA Rev_TCCCGATGGAGTCCGAATA	NM_001124357.1
Interleuquina 1 β	om_IL-1 β	For_GGAGGCAGCAGCTACCACAAA Rev_CCGATTTGGAGCAGGACAGG	NM_001124347.2
Interleuquina 8	om_IL-8	For_AGAATGTCAGCCAGCCTTGT Rev_TCTCAGACTCATCCCCTCAGT	AJ279069
Ciclooxigenasa 2	om_COX-2	For_TACCAAGCAGATCGCTGGAC Rev_GCGTATGGCTTCATGGAGAA	NM_001124348.1
Metaloproteinasa de la matriz 9	om_MMP9	For_TTCCAATTCAAGGGCAACTC Rev_TCAGCCCCACAGTTAAGAG	NM_001124370.1
Supresor de la señalización de citoquinas 3	om_SOCS3	For_AACAACACAAGATATCAAGCTCAAG Rev_GAAGTCTTGTAACGGTGAGGCAG	AM748723.1

Tabla 1. **Cebadores específicos de trucha arcoíris para Q-PCR.**

Anexo 3

Citoquinas recombinantes
nanoestructuradas como candidatas para
inmunoestimulantes de peces



Gen	Nombre del cebador	Secuencias	Número de acceso
Factor de elongación 1 α	om_EF1	For_CAAGGATATCCGTCGTGGCA Rev_ACAGCGAAACGACCAAGAGG	NM_001124339.1
Factor de necrosis tumoral α	om_TNF α	For_CGCTGACACAGTGCAGTGGGA Rev_TCCCCGATGGAGTCCGAATA	NM_001124357.1
Interleuquina 6	om_IL-6	For_TTTCAGAAGCCCGTGGAAAGAGA Rev_TCTTTGACCAGCCCTAATCAGCA	NM_001124657.1
Interleuquina 1 β	om_IL-1 β	For_GGAGGCAGCAGCTACCACAAA Rev_CCGATTTGGAGCAGGACAGG	NM_001124347.2
Interleuquina 8	om_IL-8	For_AGAATGTCAGCCAGCCTTGT Rev_TCTCAGACTCATCCCTCAGT	AJ279069
Ciclooxigenasa 2	om_COX-2	For_TACCAAGCAGATCGCTGGAC Rev_GCGTATGGCTTCATGGAGAA	NM_001124348.1
Supresor de la señalización de citoquinas 3	om_SOCS3	For_AACAACACAAGATATCAAGTCAAG Rev_GAAGGTCTTGTACGGTGAGGCAG	AM748723.1
Metaloproteinas de la matriz 9	om_MMP9	For_TTCCAATTC AAGGGCAACTC Rev_TCAGCCCCACAGTTAAGAG	NM_001124370.1
Catelicidina 1	om_CAMP1	For_GGCTGACCTTCCCACATACAG Rev_CAGGTTGTTGCTTGCTCC	NM_001124480.1
Cluster de diferenciación 4	om_CD4	For_CATTAGCCTGGTGGTCAAT Rev_CCCTTTCTTTGACAGGGAGA	AY973028
Cluster de diferenciación 8 alpha	om_CD8 α	For_ACACCAATGACCACAACCATAGAG Rev_GGGTCCACCTTTCCCACTTT	AF178054
Cluster de diferenciación 11b	om_CD11b	For_CCATAGACAAACATTGGCAGTAGA Rev_TGCTAAATAACCAACACACACA	AM713180.2
Cluster de diferenciación 209	om_CD209	For_ATGGAGGAGGTAGAGAACTATACC Rev_CGTCTAGCCGAATGGCATCCAT	NM_001124633.1
Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I	om_MHCI	For_CCCAGTGGAGTCATGGTGTT Rev_ACTGTCAGGTGGTGCTTTT	AB012064.1

Tabla 1. **Cebadores específicos de trucha arcoíris para la clonación de CCL4 y Q-PCR.**

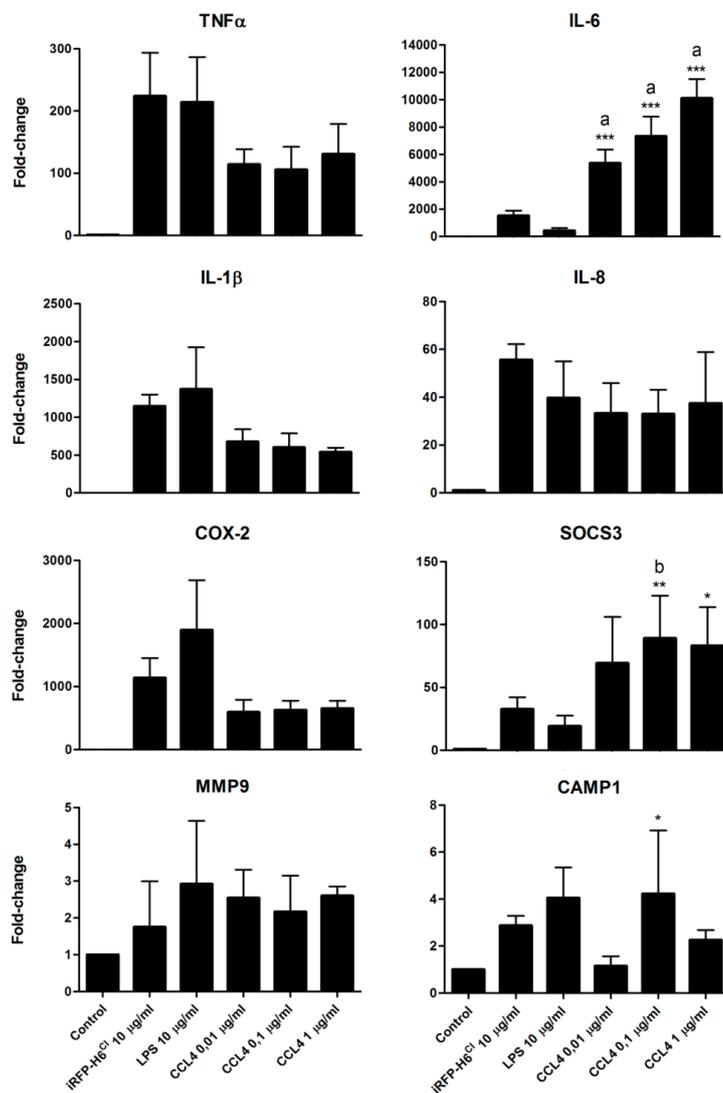


Figura 1. Análisis de expresión génica en células HKM estimuladas con iRFP-H6^{Cl}, LPS y CCL4^{Cl}.

Las células fueron cultivadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de iRFP-H6^{Cl}, 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS y 0,01, 0,1 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de CCL4^{Cl} durante 12 h. La expresión génica fue analizada a través de Q-PCR. Los valores representan el promedio y la desviación estándar ($n = 4$). Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, respecto al LPS: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ y a iRFP-H6^{Cl}: a, $p < 0,001$, b, $p < 0,05$.

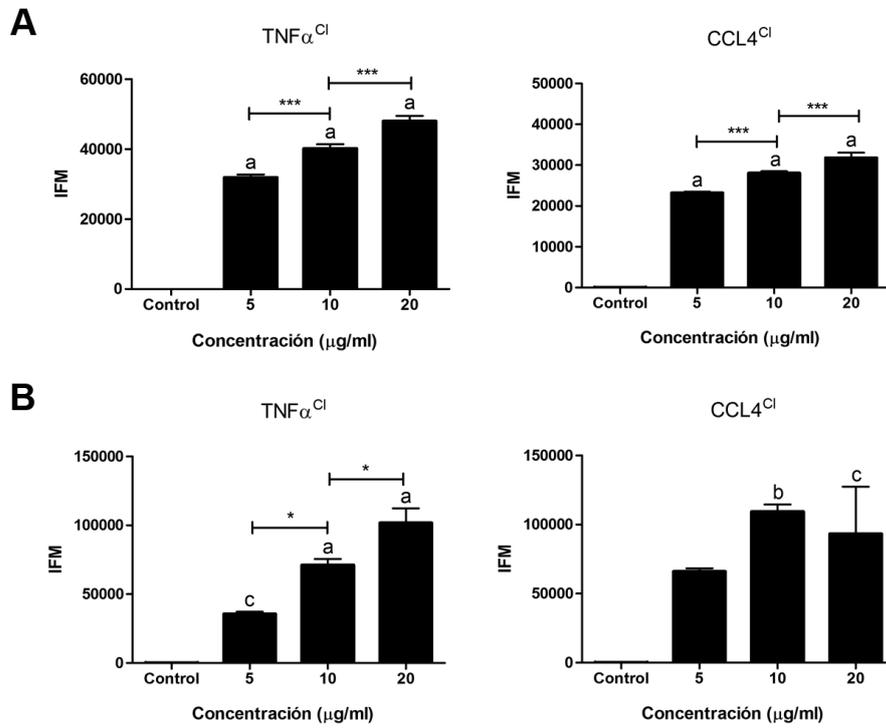


Figura 2. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de los ensayos de fagocitosis de los cuerpos de inclusión.

Dosis respuesta en **A)** ZFL y **B)** HKM. Las células fueron incubadas con 5 a 20 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{TNF}\alpha^{Cl}$ y CCL4^{Cl} durante 12 h. Los datos representan el promedio y la desviación estándar ($n = 3$). Las diferencias fueron analizadas por ANOVA de una vía y luego con el test de Tukey, respecto al control: **a**, $p < 0,0001$, **b**, $p < 0,01$, **c**, $p < 0,05$, entre dosis: *******, $p < 0,0001$, ******, $p < 0,01$, *****, $p < 0,05$.

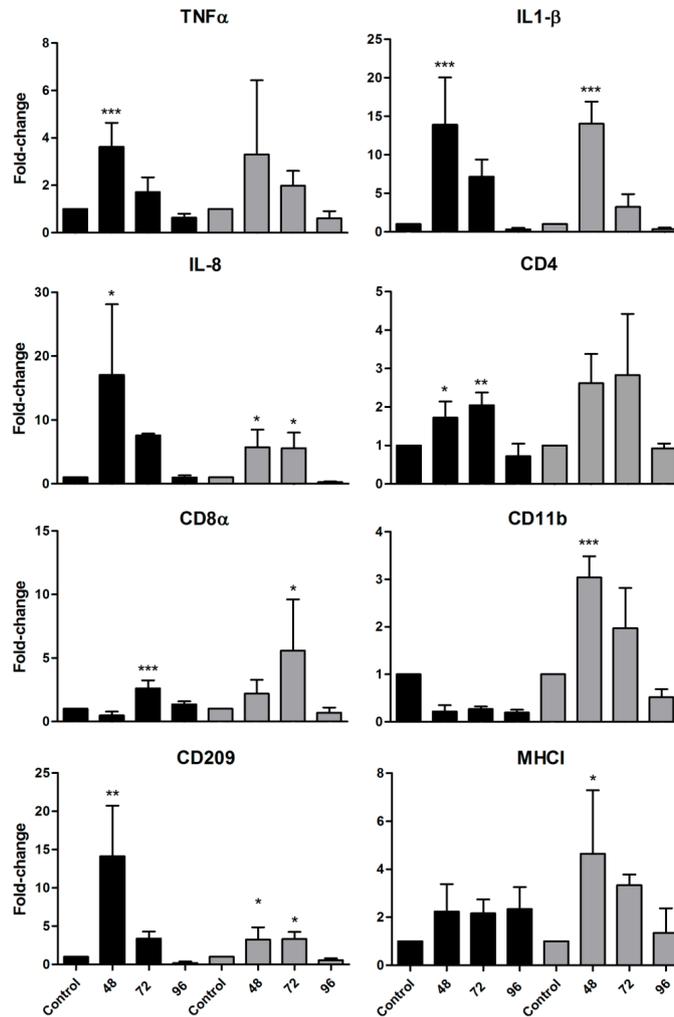


Figura 3. Análisis de expresión génica en bazo y riñón anterior después de una estimulación *in vivo* con TNF α^{Cl} .

Truchas arcoíris fueron inyectadas i.p. con TNF α^{Cl} y luego de 48, 72 y 96 h después de la inyección fueron diseccionados el bazo (barras negras) y el riñón anterior (barras grises). La expresión génica fue analizada a través de Q-PCR. Los valores representan el promedio y la desviación estándar (n = 4). Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando ANOVA de una vía seguido del test de Tukey, respecto al control: *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

A

CI	Dosis (μg)	RPS (%)
$\text{TNF}\alpha^{\text{CI}}$	150	65
CCL4^{CI}	75	91
$\text{iRFP-H6}^{\text{CI}}$	150	48

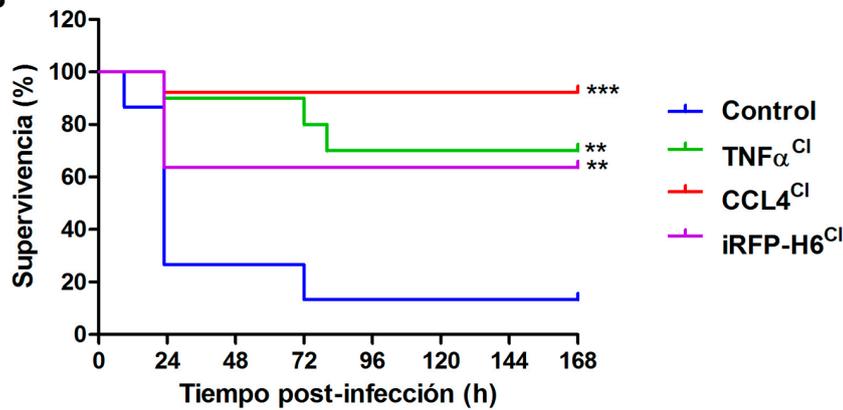
B

Figura 4. **Supervivencia del pez cebra después de una inyección i.p. de $\text{TNF}\alpha^{\text{CI}}$, CCL4^{CI} e $\text{iRFP-H6}^{\text{CI}}$ y posterior desafío con *P. aeruginosa*.**

A) Porcentaje de supervivencia relativo (RPS). B) El pez cebra fue inyectado i.p. con $\text{TNF}\alpha^{\text{CI}}$, CCL4^{CI} e $\text{iRFP-H6}^{\text{CI}}$ y desafiado con *P. aeruginosa* PAO1 (LD_{50}) (4×10^7 ufc/dosis) ($n = 15$). Las dosis de $\text{TNF}\alpha^{\text{CI}}$ e $\text{iRFP-H6}^{\text{CI}}$ fueron de 150 μg y de 75 μg para CCL4^{CI} . Peces no tratados fueron inyectados con PAO1 (LD_{50}) y usados como control de mortalidad. Las diferencias significativas fueron analizadas utilizando la prueba Log-rank:

** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

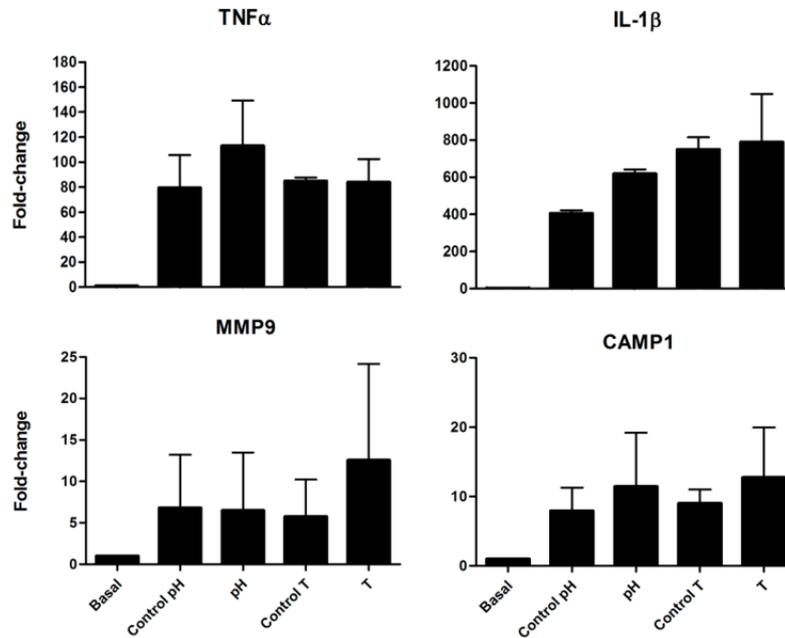


Figura 5. Análisis de expresión génica en células HKM estimuladas con TNF α ^{Cl}, incubadas en condiciones extremas de pH y temperatura.

Las células fueron cultivadas con 10 μ g/ml de TNF α ^{Cl} con diferentes tratamientos: pH (pH 2,5 durante 3 h y luego pH 8 durante 6 h), control de pH (PBS), temperatura (100 °C durante 30 s) y control de temperatura (PBS). La expresión génica fue analizada a través de Q-PCR. Los valores representan el promedio y la desviación estándar (n = 4). Las diferencias significativas fueron analizadas usando ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.