

The background is a dark blue gradient with abstract geometric shapes and lines. A large, stylized fish silhouette is on the left, composed of various shades of blue and white. A bright yellow curved line and a blue line with dots intersect near the fish's tail. The text is positioned in the upper right and middle right areas.

Tesis Doctoral
2025

**DESARROLLO DE PROTEÍNAS
NANOESTRUCTURADAS COMO PLATAFORMA
INMUNOESTIMULANTE FRENTE A
PISCIRICKETTSIA SALMONIS
EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO**

DANIELA LÓPEZ

A small, white, four-pointed star icon is located in the bottom right corner of the page.



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO



UNIVERSIDAD TÉCNICA
FEDERICO SANTA MARÍA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**DESARROLLO DE PROTEÍNAS NANOESTRUCTURADAS COMO
PLATAFORMA INMUNOESTIMULANTE FRENTE A
PISCIRICKETTSIA SALMONIS EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO**

Estudiante:

Daniela López

Profesores Guía:

Dr. José Gallardo Matus

Dr. Luis Mercado

Valparaíso, 14 de octubre de 2025



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): ☐ Memoria o trabajo de título ☒ Tesis de Postgrado

Título del trabajo:

DESARROLLO DE PROTEÍNAS NANOESTRUCTURADAS COMO PLATAFORMA INMUNOESTIMULANTE
FRENTE A *PISCIRICKETTSIA SALMONIS* EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO

Nombre del candidato(a):

Daniela Valentina López Pérez

Carrera / Grado:

Doctorado en Biotecnología / Dr. Biotecnología

Campus: Casa Central Departamento: Biología

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, José A. Gallardo Matus, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

X El trabajo **NO contiene** información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

☐ El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (**embargo**) por (**marcar una opción**):

☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 2 años ☐ 3 años ☐ 5 años ☐ 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):



4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis: José A. Gallardo Matus

J. A. Gallardo

Fecha: 02/09/2026 **Firma:**

Estudiante o Candidato(a): Daniela V. López P

[Signature]

Fecha: 02/09/2026 **Firma:**

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

Dedicatoria

Este trabajo de tesis doctoral ha representado uno de los mayores desafíos, tanto académicos como personales, que he emprendido. Estas páginas son el reflejo de cinco años de esfuerzo constante y dedicación, superando obstáculos que exigieron decisiones determinantes para asegurar la solidez científica de esta investigación. Sin duda, el reto más significativo ha sido recorrer este camino lejos de casa. Por ello, dedico este logro a quienes han sido mi sostén inquebrantable durante estos años de crecimiento y transformación. Estos son mi familia de sangre, en especial, mi mamá, mi papá, mis hermanos, mi tía, mi prima y mi abuela que está en el cielo. Mi otra familia, mis amigos, la familia que elegí, y que siempre han estado ahí para recibirme cuando libro mis batallas y han celebrado conmigo cada triunfo, por pequeño que fuera.

Ustedes han sido mi refugio emocional y mi motivación más profunda. Sin su apoyo incondicional, este sueño no habría sido posible.

A todos, les agradezco con el corazón y les dedico, con amor, este logro.

RESUMEN

En Chile la producción intensiva de salmón del Atlántico impacta negativamente el sistema inmune de los peces y aumenta la vulnerabilidad a infecciones como la Piscirickettsiosis. Esta enfermedad bacteriana alcanza mortalidades cercanas al 50 % y genera pérdidas de aproximadamente USD 700 millones anuales. Pese a invertir más de USD 200 millones en antibióticos y vacunas, el 90 % de las 400 t de antimicrobianos utilizados en la acuicultura chilena, se destinan a esta enfermedad sin lograr un control efectivo, lo que evidencia la necesidad de alternativas más sostenibles. En este contexto, los péptidos antimicrobianos (AMPs) surgen como candidatos prometedores debido a su acción directa sobre patógenos y su capacidad inmunomoduladora, aunque su uso práctico ha sido limitado por problemas de estabilidad y susceptibilidad a degradación. El objetivo de esta tesis fue desarrollar cuerpos de inclusión (IBs) basados en AMPs como plataforma inmunoestimulante frente a la *Piscirickettsia salmonis* en salmón del Atlántico. La metodología contempló la producción de estos IBs empleando la cepa *E. coli* BL21 pLysS, los cuales se purificaron mediante lavados con soluciones enzimáticas y tampones de lisis, se cuantificaron mediante Western blot, y se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM). Se llevaron a cabo análisis de toxicidad e internalización en células RTS-11, para luego evaluar el potencial de los IBs para estimular el sistema inmune, mediante ensayos de expresión de genes asociados a la respuesta inflamatoria (*il-8*, *il-10*, *il-1 β* , *tnf- α* , *iNOS*) tanto en células (dosis 5-20 μ g/mL) como en peces (dosis 5 mg/kg). Así mismo se llevaron a cabo ensayos de infección *in vitro* con *P. salmonis*, y pruebas de actividad antimicrobiana frente a *P. salmonis*. De forma complementaria se comparó la producción de IBs de la citocina modelo IL-1 β en matraz y biorreactor para evaluar escalabilidad. Los AMPs se produjeron exitosamente en forma de IBs, representaron aproximadamente el 70 % del total de proteínas a las 5 h de producción, y el rendimiento superó los 30 mg/L, a las 3 h. Asimismo, los IBs demostraron ser estables frente a condiciones térmicas y de pH gastrointestinal simulado. El modelo complementario de escalamiento en biorreactor fue satisfactorio, obteniendo aproximadamente el doble de rendimiento respecto al matraz. Los IBs demostraron citotoxicidad menor al 10 % en el modelo celular, y modularon la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias (*il-8*, *il-10* e *il-1 β*), sugiriendo un perfil regulador a las 12 h postratamiento. Durante los ensayos *in vivo*, se incrementó la expresión del gen *il-1 β* a las 6 y 12 h para catelicidina y hepcidina respectivamente. En células infectadas no hubo modulación significativa de la respuesta génica, no obstante, la exposición directa de *P. salmonis* a los IBs redujo su supervivencia en al menos un 50 %, hasta los 12 días. Finalmente, los ensayos *in vitro* sugieren una tendencia a mayor efectividad del producto obtenido en biorreactor. En conclusión, se desarrolló una plataforma biotecnológica basada en IBs para la producción de catelicidina y hepcidina de salmón del Atlántico, con potencial de escalamiento industrial. Se comprobó que estos IBs basados en AMP modulan la respuesta inmune del hospedador y disminuyen significativamente la supervivencia de *P. salmonis*. Su estabilidad en condiciones gastrointestinales simuladas respalda su potencial administración oral. Aunque se requiere profundizar en los mecanismos de acción, y confirmar eficacia en desafíos *in vivo*, los IBs evaluados en este estudio tienen potencial para ser una alternativa biotecnológica inmunoterapéutica complementaria a las estrategias de control y manejo de la Piscirickettsiosis.

Agradecimientos

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso por otorgarme el honor de pertenecer al Doctorado en Biotecnología. A mi tutor, José A. Gallardo Matus por presentarme la oportunidad de formar parte del equipo de Laboratorio de Genética y Genómica Aplicada, y llevar a cabo un trabajo de envergadura. Agradezco a la Dra. Débora Torrealba, quien ha dirigido la línea de investigación de proteínas nanoestructuradas, y es pionera de su aplicabilidad en Chile, también ha sido parte importante de mi formación como científico. Agradezco al Prof. Luis Mercado, y su equipo de trabajo, quienes desde el laboratorio de inmunología de peces siempre estuvieron dispuestos a colaborar en el desarrollo de esta investigación. También agradezco a la Dra. Elena García Fruitós y Anna Arís del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA), quienes me recibieron en su laboratorio, y me ayudaron a completar mis objetivos de investigación, siempre con la mejor disposición, y con mucha empatía. También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio quienes siempre estuvieron dispuestos a brindarme apoyo, y con quienes conté para poder seguir adelante. A todos quienes estuvieron dispuestos a tenderme la mano.

Finalmente agradezco al universo por haberme puesto en este camino, en el cual aprendí y me desarrollé como investigador y como persona.

INDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
2. Revisión Bibliográfica	4
2.1 La Piscirickettsiosis: Un Problema de la Industria Acuícola Chilena	4
2.2 Biología y patogénesis de la <i>Piscirickettsia salmonis</i>.....	5
2.3 Sistema Inmune de los Peces Teleósteos	7
Macrófagos	9
Neutrófilos.....	10
Células Dendríticas (DC)	10
Células asesinas naturales (NK)	10
Linfocitos	11
Citocinas	12
Péptidos Antimicrobianos (AMPs)	14
Sistema de complemento	19
Inmunoglobulinas.....	19
2.4 Inmunomoduladores	20
2.4.1 AMPs Como Inmunomoduladores	22
2.5 Proteínas Nanoestructuradas	23
2.5.1 Formación de las proteínas nanoestructuradas	23
2.5.1.1 Factores que afectan el rendimiento y calidad de los IBs.....	25
2.5.2 Uso de las proteínas nanoestructuradas.....	27
3. Hipótesis y Objetivo	30

3.1	Hipótesis	30
3.2	Objetivos General y Específicos	30
3.2.1	Objetivo General.....	30
3.2.2	Objetivos Específicos	30
4.	Materiales y Métodos.....	31
4.1	Objetivo 1: Producir y caracterizar proteínas nanoestructuradas de salmón del Atlántico con potencial inmunoestimulante en <i>Escherichia coli</i>.....	31
4.1.1	Selección de proteínas, diseño de constructo y cepas transformante.....	31
4.1.2	Cinética de producción de proteínas recombinantes	32
4.1.3	Producción, purificación y cuantificación de los IBs.....	33
4.1.4	Caracterización Microscópica	34
4.1.5	Determinación de la resistencia de los IBs ante condiciones solubilizantes	34
4.2	Objetivo 2: Analizar la capacidad de las proteínas nanoestructuradas para estimular el sistema inmune del salmón del Atlántico	35
4.2.1	Evaluación de la citotoxicidad de los AMPs en células RTS-11	35
4.2.2	Determinación de la capacidad de las células RTS-11 para fagocitar los AMPs	35
4.2.3	Evaluación de la capacidad de los AMPs para modular el sistema inmune en células RTS-11	36
4.2.3.1	Evaluación temporal del efecto de los AMPs para modular el sistema inmune en células RTS-11.....	37
4.2.4	Análisis de expresión de genes del sistema inmune por qPCR.....	37
4.2.5	Evaluación de la respuesta inmune mediada por los AMPs en el salmón del Atlántico	38
4.2.6	Evaluación de la biodistribución de IBst a órganos del sistema inmune en el salmón del Atlántico	39

4.3	Objetivo 3. Evaluar la eficacia de las proteínas nanoestructuradas para el control de <i>P. salmonis</i> y su potencial para ser administradas por vía oral.	40
4.3.1	Evaluación de la eficacia de los AMPs para modular las respuestas inmunológicas de <i>P. salmonis</i> en células RTS-11	40
4.3.2	Evaluación de la eficacia de los AMPs para el control de <i>P. salmonis</i>	41
4.3.3	Determinación de la estabilidad de los AMPs	41
5.	Resultados	43
5.1	Objetivo 1: Producir y caracterizar proteínas nanoestructuradas de salmón del Atlántico con potencial inmunoestimulante en <i>Escherichia coli</i>.	43
5.1.1	Selección de proteínas, diseño de constructo y cepas transformante	43
5.1.2	Cinética de producción de proteínas recombinantes	44
5.1.3	Producción, purificación y cuantificación de los IBs	45
5.1.4	Caracterización Microscópica	45
5.1.5	Determinación de la resistencia de los IBs ante condiciones solubilizantes	46
5.2	Objetivo 2: Analizar la capacidad de las proteínas nanoestructuradas para estimular el sistema inmune del salmón del Atlántico	49
5.2.1	Evaluación de la citotoxicidad de los AMPs en células RTS-11	49
5.2.2	Determinación de la capacidad de las células RTS-11 para fagocitar los AMPs	50
5.2.3	Evaluación de la capacidad de los AMPs para modular el sistema inmune en células RTS-11	51
5.2.3.1	Evaluación temporal del efecto de los AMPs para modular el sistema inmune en células RTS-11	53
5.2.4	Evaluación de la respuesta inmune mediada por los AMPs en el salmón del Atlántico	56
5.2.4.1	Análisis de expresión génica	56
5.2.4.2	Cuantificación de TNF- α en plasma	58

5.2.5	Evaluación de la biodistribución de IBst a órganos del sistema inmune en el salmón del Atlántico	59
5.3	Objetivo 3. Evaluar la eficacia de las proteínas nanoestructuradas para el control de <i>P. salmonis</i> y su potencial para ser administradas por vía oral.	60
5.3.1	Evaluación de la eficacia de los AMPs para modular las respuestas inmunológicas de <i>P. salmonis</i> en células RTS-11	60
5.3.2	Evaluación de la eficacia de los AMPs para el control de <i>P. salmonis</i>	65
5.3.3	Determinación de la estabilidad de los AMPs	67
6.	Discusión	68
6.1	Objetivo 1: Producir y caracterizar proteínas nanoestructuradas de salmón del Atlántico con potencial inmunoestimulante en <i>Escherichia coli</i>	68
6.2	Objetivo 2: Analizar la capacidad de las proteínas nanoestructuradas para estimular el sistema inmune del salmón del Atlántico	71
6.3	Objetivo 3. Evaluar la eficacia de las proteínas nanoestructuradas para el control de <i>P. salmonis</i> y su potencial para ser administradas por vía oral.	79
7.	Conclusiones	84
8.	Recomendaciones	86
9.	Nomenclaturas	88
10.	Bibliografía	89
11.	Apéndices	116
11.1	Cálculo de fracción proteica	116
11.2	Primers utilizados para los análisis de expresión génica	116
11.3	Cálculo de Livak	116
11.4	Cálculo de Supervivencia de <i>P. salmonis</i>	117

11.5	Resultados de fagocitosis en células RTS-11	117
11.6	Resultados de expresión génica de IL-10 e IL-12.....	118
11.7	Evaluación de la eficacia de los AMPs para el control de <i>P. salmonis</i> a los 12 días	121
11.8	Evaluación de la eficacia de los AMPs para el control de otros patógenos...	122
11.9	Evaluación comparativa de la producción y eficacia inmunoestimulante de los IBs producidos en biorreactor y matraz Erlenmeyer	128
11.10	Librerías de R empleadas	132

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de los componentes del sistema inmune de peces teleósteos.....	8
Figura 2. Representación esquemática de los órganos linfoides de peces teleósteos.	8
Figura 3. Modelo general del mecanismo antimicrobiano de los AMPs.....	15
Figura 4. Esquema general de formación de los cuerpos de inclusión. La producción de proteínas recombinantes, en matraz o biorreactor a temperaturas desde los 37 °C, a 250 rpm, en sistemas heterólogos, favorece el plegamiento de diferentes conformaciones proteicas, las cuales forman IBs por la acción de chaperonas.....	24
Figura 5. Cinética de producción de proteína soluble (blanco), e IBs (gris), para (A) Cat y (B) Hep, fracciones colectadas a las 1, 3 y 5 h postinducción.	45
Figura 6. Microscopía por FESEM a 10,000 KX de (A) Cat y (B) Hep producidos en matraz a 37 °C, 250 rpm. Imágenes FESEM a 50,000 KX muestran en detalle la morfología de agregados individuales de Cat (C) y Hep (D). Distribución de tamaño de (E) Cat y (F) Hep. 46	
Figura 7. Resistencia de (A) Cat, (B) Hep y (C) iRFP, expuestos a urea (0-8 M), durante 3 y 24 h.	47
Figura 8. Resistencia de (A) Cat, (B) Hep y (C) iRFP, expuestos a proteinasa K durante 240 min a concentraciones de 6 y 60 µg/mL.....	48
Figura 9. Viabilidad celular de RTS-11 expuesta a (A) Cat, (B) Hep y (C) iRFP, en un rango de concentraciones (2, 10, y 20 µg/mL), a las 6 y 24 h postratamiento.....	49
Figura 10. Inmunofluorescencia de células RTS-11 tratadas con 20 µg/mL de Cat y Hep durante 4 h. Control: sin tratamiento. Núcleos teñidos con DAPI (azul) e IBs teñidos con Atto 488 (verde), merge: composición de la imagen.....	50
Figura 11. Porcentaje de células RTS-11 fagocíticas tratadas con 20 µg/mL de Cat y Hep durante 4 h. Control: PBS 1X. * p < 0,05, *** p< 0,001.....	51
Figura 12. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con catelicidina Cat (5, 10 y 20 µg/mL) durante 12 h. Genes evaluados: (A) il-1β, (B) tnf-α, (C) il-8, (D) il-10 (E) iNOS. Los valores se expresan como Log ₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una	

duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$). 52

Figura 13. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con Hep (5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$) durante 12 h. Genes evaluados: (A) *il-1 β* , (B) *tnf- α* , (C) *il-8*, (D) *il-10* (E) *iNOS*. Los valores se expresan como Log_2 Fold Change (escala lineal simétrica, donde $+1$ indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$). 53

Figura 14. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con Cat a 10 $\mu\text{g/mL}$ durante 4, 12 y 24 h. Genes evaluados: (A) *il-1 β* , (B) *tnf- α* , (C) *iNOS*, (D) *il-10*. Los valores se expresan como Log_2 Fold Change (escala lineal simétrica, donde $+1$ indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$). 54

Figura 15. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con Hep a 10 $\mu\text{g/mL}$ durante 4, 12 y 24 h. Genes evaluados: (A) *il-1 β* , (B) *tnf- α* , (C) *iNOS*, (D) *il-10*. Los valores se expresan como Log_2 Fold Change (escala lineal simétrica, donde $+1$ indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$). 55

Figura 16. Expresión relativa de los genes *il-6* y *cox-2*, en células RTS-11 tratadas con Cat (A y B) y Hep (C y D) a 10 $\mu\text{g/mL}$ durante 4 y 24 h. Los valores se expresan como Log_2 Fold Change (escala lineal simétrica, donde $+1$ indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$). 56

Figura 17 Expresión génica relativa del riñón anterior de salmón del Atlántico tratados con Cat 5 mg/kg durante 6, 12 y 24 h. Genes evaluados: (A) *il-1 β* , (B) *tnf- α* , (C) *il-8*, (D) *il-10*. Los valores se expresan como Log_2 Fold Change (escala lineal simétrica, donde $+1$ indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$). 57

Figura 18. Expresión génica relativa del riñón anterior de salmón del Atlántico tratados con Hep a 5 mg/kg durante 6, 12 y 24 h. Genes evaluados: (A) *il-1 β* , (B) *tnf- α* , (C) *il-8*, (D) *il-10*. Los valores se expresan como Log_2 Fold Change (escala lineal simétrica, donde $+1$ indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$). 58

Figura 19. Concentración en plasma de TNF- α de salmón del Atlántico tratados con (A) Cat y (B) Hep a 5 mg/kg durante 6, 12 y 24 h. Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).....	59
Figura 20. Biodistribución de Cat a riñón anterior (A) y bazo (B) de salmón del Atlántico a 24, 48 y 72 h. Control = PBS 1X. (C) Riñón anterior vs. Bazo. Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).....	60
Figura 21. Análisis de expresión génica de células RTS-11 tratadas con Cat a 20 μ g/mL durante 4 h e infectadas con <i>P. salmonis</i> (MOI 1) durante 24 h. Genes evaluados: (A) <i>tnf-α</i> , (B) <i>il-12</i> , (C) <i>ifn-γ</i> , (D) <i>il-10</i> , (E) <i>iNOS</i> . Control = PBS 1X. Cat = células tratadas, pero no infectadas, Cat + <i>P. salmonis</i> = células tratadas e infectadas. <i>P. salmonis</i> = Células no tratadas e infectadas. Los valores se expresan como Log ₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).....	61
Figura 22. Análisis de expresión génica de células RTS-11 tratadas con Cat a 20 μ g/mLpre y posinfección. Genes evaluados: (A) <i>tnf-α</i> , (B) <i>il-12</i> , (C) <i>ifn-γ</i> , (D) <i>il-10</i> , (E) <i>iNOS</i> . Control = PBS 1X. Cat = células tratadas, pero no infectadas, Cat + <i>P. salmonis</i> = células tratadas e infectadas. <i>P. salmonis</i> = Células no tratadas e infectadas. Los valores se expresan como Log ₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).	63
Figura 23. Expresión génica relativa de células SHK-1 tratadas con Cat a 20 μ g/mL durante 24 h, e infectadas con <i>P. salmonis</i> (MOI 10) durante 24 h. Genes evaluados: (A) <i>il1-β</i> , (B) <i>tnf-α</i> , (C) <i>il-8</i> , (D) <i>il-10</i> , (E) <i>iNOS</i> . Control = PBS 1X. Los valores se expresan como Log ₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).	64
Figura 24. Expresión génica relativa de células SHK-1 tratadas con Hep a 20 μ g/mL durante 24 h, e infectadas con <i>P. salmonis</i> (MOI 10) durante 24 h. Genes evaluados: (A) <i>il1-β</i> , (B) <i>tnf-α</i> , (C) <i>il-8</i> , (D) <i>il-10</i> , (E) <i>iNOS</i> . Control = PBS 1X. Los valores se expresan como Log ₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).	65

Figura 25. Porcentaje de supervivencia de <i>P. salmonis</i> tras exposición a (A) Cat por 6 h, (B) Cat por 24 h, (C) Hep por 6 h, (D) Hep por 24 h.	66
Figura 26. Expresión génica relativa de (A) <i>il-10</i> y (B) <i>il-8</i> , de células RTS-11 tratadas con Cat a 20 µg/mL durante 24 h. Cat Liof = Cat liofilizada, Cat pH = Cat sometida a pH 2 y pH 8, Cat Temp = catelicidina sometida a 100°C durante 30 min.	67
Figura 27. Citometría de flujo de células RTS-11 tratadas con proteínas nanoestructuradas marcadas con Atto 488 (A) Cat a 20 µg/mL o (B) Hep a 20 µg/mL durante 4 h.....	118
Figura 28. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con IL-10 a concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL durante 12 h. Genes evaluados: (A) <i>il-1β</i> , (B) <i>tnf-α</i> , (C) <i>il-8</i> , (D) <i>il-10</i> , (E) <i>iNOS</i> . Control = PBS 1X. Los valores se expresan como Log ₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí (p > 0,05).	119
Figura 29. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con IL-12 a concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL durante 12 h. Genes evaluados: (A) <i>il-1β</i> , (B) <i>tnf-α</i> , (C) <i>il-8</i> , (D) <i>il-10</i> , (E) <i>iNOS</i> . Los valores se expresan como Log ₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí (p > 0,05).	121
Figura 30. Porcentaje de supervivencia de <i>P. salmonis</i> tras exposición a (A) Cat y (B) Hep a los 12 días.	122
Figura 31. Porcentaje de supervivencia de <i>F. psychrophilum</i> . tras exposición a (A) Cat durante 6 h, (B) Cat durante 24 h, (C) Hep durante 6 h, (D) Hep durante 24 h.	123
Figura 32. Porcentaje de supervivencia de <i>T. dicentarchi</i> , tras exposición a IBs de (A) Cat durante 6 h, (B) Cat durante 24 h, (C) Hep durante 6 h, (D) Hep durante 24 h.	124
Figura 33. Porcentaje de supervivencia de MSSA tras exposición a (A) Cat y (B) Hep. <i>P. aeruginosa</i> tras exposición (C) Cat y (D) Hep.	125
Figura 34. Efecto de los IBs y proteína soluble (SF) en la supervivencia de MSSA tras exposición a (A) Cat, (B) Hep y de <i>P. aeruginosa</i> tras exposición a (C) Cat, (D) Hep.	127
Figura 35. Supervivencia (%) de (A) MRSE, y (B) KPC tras exposición a IBs y proteína soluble (SF) de Cat.	128

Figura 36. Supervivencia (%) de (A) MRSE, y (B) KPC tras exposición a Cat.....	128
Figura 37. Microscopía de IL-1 β en forma de proteínas nanoestructuradas producidas en matraces Erlenmeyer (A) y en biorreactor (B). Fuente: (Torrealba et al., 2024)	131
Figura 38. Análisis de expresión génica de células RTS-11 tratadas con IL-1 β durante 4, 12 y 24 h. Genes evaluados: (A) il-1 β , (B) tn α , (C) il-6, (D) cox-2, (E) il-10, (F) iNOS. R= biorreactor. M= matraz. Los valores se expresan como Log ₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí (p > 0,05).....	132

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. IBs empleados en modelos animales de acuicultura y ganadería.	29
Tabla 5.1 Orden de los constructos y secuencias aminoacídicas de los componentes para la expresión de Cat y Hep en forma de proteínas nanoestructurada.....	43
Tabla 5.2. Comparación de parámetros fisicoquímicos de Cat y Hep respecto a la fusión con la secuencia KSI.	44
Tabla 6.1 Resumen sistemático del efecto biológico inducido por Cat y Hep sobre la respuesta inmune de células RTS-11 a las 12 h postratamiento	76
Tabla 6.2 Resumen comparativo de la expresión génica in vitro e in vivo tras el tratamiento con AMPs.....	77
Tabla 11.1 Secuencia nucleotídica de los primers de Salmo salar empleados para los análisis de expresión génica.....	116
Tabla 11.2. Resumen comparativo de la producción de IL-1 β en matraces y biorreactor....	130

1. Introducción

La acuicultura representa una proporción cada vez más significativa de la producción mundial de alimentos, al año se producen aproximadamente 94 millones de toneladas, proporcionando alrededor del 51 % del suministro mundial de productos del mar, con un valor estimado de USD 296 mil millones (FAO, 2024). Para Chile, el surgimiento y desarrollo de la industria salmonicultora, después de 35 años, se ha convertido en uno de los principales sectores exportadores y un importante contribuyente al desarrollo regional (Mardones et al., 2018). Entre las especies más cultivadas destaca el Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), de los cuales, en 2024 se cosecharon 328,2 t en agua de mar (Sernapesca, 2024). Para el máximo aprovechamiento de los espacios, los peces permanecen confinados en jaulas bajo condiciones de estrés, lo que suele asociarse con una disminución de la respuesta inmune (Valenzuela-Aviles et al., 2022). Por este motivo, estos peces de cría, son dianas vulnerables a infecciones por patógenos presentes en el agua donde son criados, cuya transmisión se facilita a través de varias vías, incluyendo, el contacto estrecho, y corrientes de agua (Uma, 2025; Valenzuela-Aviles et al., 2022). En consecuencia, el manejo efectivo de las enfermedades infecciosas en la salmonicultura chilena es fundamental para garantizar una producción sostenible (Uma, 2025).

Una de las infecciones más frecuentes en la salmonicultura de Chile es la *Piscirickettsiosis*, cuyo agente etiológico es la *Piscirickettsia salmonis*, una bacteria Gram negativa, intracelular facultativa, que puede ser replicada y propagada en diversos tipos celulares, incluidos los macrófagos (Rozas & Enríquez, 2014). Las mortalidades por esta enfermedad representan una pérdida de 31,3 t de salmón del Atlántico, generando importantes pérdidas económicas lo cual impacta significativamente a la industria salmonera (Sernapesca, 2025a). El control de la *Piscirickettsiosis* ha sido un desafío complejo, ya que el patógeno modula las respuestas del sistema inmune, deprimiendo la inmunidad innata y evadiendo la adaptativa (Rozas-Serri, 2022). Históricamente, su manejo ha dependido del uso masivo de antimicrobianos de lenta degradación; por ejemplo, entre 2000 y 2020, Chile utilizó aproximadamente 997 t de quinolonas, 3,051 t de tetraciclinas y 4,375 t de florfenicol (F. C. Cabello et al., 2023; F. C. Cabello & Godfrey, 2019; Sernapesca, 2025a). En Noruega, en cambio, solo se utilizaron 0,548 t de estos medicamentos en la producción de alrededor de 1,2 millones de t de salmón, unas 685 veces menos por millón de toneladas de pescado producidas (F. Cabello et al., 2025). Aunque existen vacunas comerciales, su eficacia es limitada debido a factores genéticos, ambientales y funcionales que dificultan la inmunización efectiva contra *P. salmonis* (Figueroa et al., 2022; Valenzuela-Aviles et al., 2022). Por lo tanto, el crecimiento sostenible de la salmonicultura chilena dependerá de comprender a fondo la patogénesis de *P. salmonis* y

desarrollar estrategias efectivas para prevenir y tratar la enfermedad sin depender del uso intensivo de antimicrobianos (F. Cabello et al., 2025).

En el campo de la investigación para el control de patógenos, los péptidos antimicrobianos (AMPs) han recibido una atención cada vez mayor debido a sus mecanismos de acción únicos sobre un amplio espectro de bacterias, en comparación con las de los antibióticos tradicionales (S. Ji et al., 2024). Los AMPs actúan sobre las membranas celulares bacterianas, alterando la integridad, y también son conocidos por sus funciones inmunorreguladoras, tales como reclutar y activar las células inmunitarias (Rima et al., 2021; Xuan et al., 2023). A pesar del alto potencial e interés, la FDA (Food and Drug Administration) ha aprobado solo unos pocos AMPs para uso clínico en humanos (daptomicinas, polimixinas, bacitracinas, entre otros) y otros aún están en ensayos preclínicos o clínicos (por ejemplo: LL-37, buforin II, Melittina, entre otros) (Bucataru & Ciobanasu, 2024). El estudio de los AMPs en bovinos ha sido de gran interés, y se han reportado al menos 38 de estos péptidos incluyendo β -defensinas bovinas (TAP, LAP, DEFB1, DEFB3, DEFB4 y DEFB5, DEFB10) y las catelicidinas (CATHL 1–7, Bactenecinas, Indolicidina Bovina y Péptidos Antimicrobianos Mieloides (BMAPs) (Benincasa et al., 2003; Hsu et al., 2005; Sirsat et al., 2024). En la acuicultura, los AMPs se han estudiado como aditivos para piensos y fármacos terapéuticos y, a través de la ingeniería genética, proporcionan una alternativa potencial a los antibióticos y apoyan la salud y la productividad de las especies cultivadas (Rodrigues et al., 2025). Sin embargo, entre las limitaciones de su comercialización, o uso, se encuentra en primer lugar, el mecanismo de acción, el cual para muchos no está completamente descifrado, pueden generar toxicidad, son poco estables, susceptibles a la degradación por proteasas y sensibles a los componentes séricos, la sal y las variaciones de pH (Bucataru & Ciobanasu, 2024; Rodrigues et al., 2025). Una manera de soslayar estas limitaciones es mediante el uso de cuerpos de inclusión (IBs), que han demostrado un enorme potencial para la administración de moléculas biológicas, incluyendo los AMPs (Villaverde, 2012).

Los IBs son agregados proteicos, insolubles, que se forman durante la producción de proteínas recombinantes (García Fruitós & Arís Giralt, 2022). Desde una perspectiva biofísica, se describen como nanomateriales proteicos o proteínas nanoestructuradas, con tamaños que oscilan entre 50 y 800 nm, conformados por un centro de proteína bioactiva, rodeado de proteínas en conformación β -amiloide, que le otorga resistencia a la degradación proteolítica, y estabilidad mecánica (M. M. Carrió & Villaverde, 2003; Gifre-Renom et al., 2020). Se producen en altas cantidades mediante procesos económicamente asequibles, ya que hasta el 80 % de las proteínas recombinantes sobreexpresadas en *Escherichia coli* forman IBs, lo que los convierte en una excelente plataforma para la producción de proteínas recombinantes

(Singhvi et al., 2020). Aunque el componente principal de los IBs es la proteína recombinante, también contienen cantidades variables de otras moléculas de la cepa bacteriana empleada para la producción, como ADN, ARN y componentes de la pared celular, incluidos Lipopolisacáridos (LPS) y Peptidoglucanos (PGN), capaces de inducir la respuesta inmunitaria (Torrealba, Parra, et al., 2016). Esta característica le otorga potencial inmunomodulador intrínseco, que, en conjunto con su estabilidad física, los convierten a los IBs en una potencial plataforma para la producción de AMPs recombinantes, como solución biotecnológica, en sintonía con alternativas sostenibles en acuicultura.

Teniendo en cuenta las propiedades únicas de los IBs como sistemas de administración de proteínas recombinantes y su potencial inmunoestimulante, el objetivo de esta tesis es desarrollar proteínas nanoestructuradas como inmunoestimulantes para la prevención de la Piscirickettsiosis en salmón del Atlántico. Este trabajo busca aprovechar la capacidad de estas nanoestructuras para administrar moléculas bioactivas basadas en AMPs, con el fin de generar una respuesta inmune protectora frente a *P. salmonis*. A través de este enfoque, se pretende ofrecer una alternativa sostenible a los tratamientos antimicrobianos convencionales, contribuyendo al manejo sostenible y responsable de la salmonicultura en Chile.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 La Piscirickettsiosis: Un Problema de la Industria Acuícola Chilena

La línea costera de Chile, especialmente alrededor de Puerto Montt y la Isla de Chiloé en la región X, incluyendo las regiones XI y XII, ofrece sitios resguardados con temperaturas de agua y salinidad ideales para la producción acuícola (Bjørndal, 2002). La producción acuícola chilena depende en gran medida del cultivo de salmónidos (salmón y trucha), en 2025 el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) fue la principal especie cultivada, representando el 52,3 % de la producción total, seguido del salmón del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) con el 11 %, y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con el 4 % (SUBPESCA, 2025). Las exportaciones pesqueras y acuícolas acumuladas a octubre del año 2024 alcanzaron un volumen de 1.492,5 t, que sumaron una valoración total de USD 7.275,5 millones, del cual el 73,3% correspondió a salmónidos, el 15,4% a otros peces, seguido por el grupo de moluscos (6,2%), algas (2,9%), crustáceos y otros (1,0%) del valor total de las exportaciones (Morera et al., 2021; SUBPESCA, 2025).

Chile es el segundo mayor productor de salmón del Atlántico en el mundo, cosechando un volumen de 498,6 mil t en el primer semestre del 2025 (Morera et al., 2021; SUBPESCA, 2025). Sin embargo, uno de los principales problemas en las granjas acuícolas de salmónidos chilenos son las pérdidas productivas debidas a enfermedades infecciosas. Datos de Servicio Nacional de Pesca de Chile (SERNAPESCA), en el 2024 evidenció un 22,1 % de mortalidad del salmón del Atlántico relacionada con enfermedades infecciosas, siendo la causa más importante la Piscirickettsiosis que causa el 43,1 % de estas muertes, seguida por Tenacibaculosis a la que se le asocia el 29,4 % (Sernapesca, 2025a). Debido a la alta tasa de mortalidad, la Piscirickettsiosis, es una de las amenazas más importantes para la sustentabilidad de la industria salmonera chilena (Rozas & Enríquez, 2014). Genera enormes pérdidas anuales que superan los USD 700 millones (Flores-Kossack et al., 2020; Pontigo et al., 2021), debido no solo a la mortalidad, sino también a los costos asociados al uso de antibióticos, vacunas y otras medidas para su prevención y control (Maisey et al., 2017).

A pesar de las diversas estrategias preventivas adoptadas por la industria salmonera chilena, como el uso de antimicrobianos y la vacunación, ninguna parece ser suficiente para erradicar o controlar de forma efectiva esta enfermedad (Mardones et al., 2018; Valenzuela-Aviles et al., 2022). Una de las principales estrategias de control es el uso de antibióticos, durante el año 2024 el total de antimicrobianos utilizados en la industria del salmón correspondió a 415,4 t de principio activo, y el 97,51 % del total de antibióticos administrados se empleó para el control de la Piscirickettsiosis, destacando el florfenicol como el antibiótico más común (Sernapesca,

2025b). Sin embargo, la naturaleza intracelular de la bacteria dificulta su adecuado tratamiento con antibióticos, ya que estos, al tener que atravesar la membrana celular, reducen su efecto al poseer una baja eficiencia de retención intracelular (Abed & Couvreur, 2014). Además, el florfenicol actúa bloqueando la formación de proteínas por acción directa sobre los ribosomas, inhibiendo la replicación de la bacteria, por lo que el efecto es sólo bacteriostático y no bactericida, lo que limita su eficacia en la eliminación de la bacteria (Schlünzen et al., 2001; Schwarz et al., 2004). La alta cantidad de antibióticos empleados ejerce presión selectiva sobre el patógeno, mejorando su resiliencia, dando lugar a la aparición de aislados con una susceptibilidad ligeramente reducida, lo que lleva a la aparición de bacterias resistentes (Avendaño-Herrera, 2021; X. Guo et al., 2024).

A pesar que la vacunación, también representa una estrategia de control importante para la Piscirickettsiosis, su eficacia suele ser limitada, especialmente cuando se aplica a peces que no son completamente inmunocompetentes (Pérez-Sánchez et al., 2018; Rozas-Serri et al., 2024). Actualmente 33 vacunas contra la Piscirickettsiosis que cumplen con todos los requisitos regulatorios y experimentales establecidos por SERNAPESCA, y están disponibles comercialmente. Incluyendo vacunas monovalentes y multivalentes, vacunas preparadas con antígenos de bacterias *P. salmonis* muertas o proteínas recombinantes (Blueguard ISA®, Aquavac Saristin 2®, Providean Aquatec Sea Lice®), vacunas de ADN y una vacuna viva atenuada (LiVac®) (Flores-Kossack et al., 2020). Sin embargo, existen varios problemas relacionados con la eficiencia de la vacuna, particularmente en relación con las condiciones de campo y la falta de protección durante todo el ciclo de vida de la producción de peces (Mardones et al., 2018). Sin embargo, existe evidencia de que hasta el 80 % de los peces vacunados aún pueden verse afectadas por la enfermedad clínica, y se han obtenido resultados inconsistentes en cuanto a la reducción de la mortalidad o el retraso del brote de la enfermedad, por lo que actualmente existe un consenso respecto de que la efectividad de las vacunas autorizadas es ineficaz y variable (Figueroa et al., 2022; Mardones et al., 2018). La falta de eficacia de las vacunas comerciales se atribuye en gran medida a la capacidad del patógeno para modular y comprometer la respuesta celular del huésped, lo que limita la estimulación adecuada de la inmunidad celular, y deja en entredicho el mecanismo mediante el cual se lograría una protección efectiva por esta vía (Figueroa et al., 2022; Rozas-Serri, 2022; Valenzuela-Aviles et al., 2022).

2.2 Biología y patogénesis de la *Piscirickettsia salmonis*

P. salmonis, el agente etiológico que causa la Piscirickettsiosis, es una bacteria Gram-negativa intracelular, clasificada como Gamma-proteobacteria y es una de las pocas especies que

pertenecen a la familia Piscirickettsiaceae (Fryer & Hedrick, 2003; F. Gómez et al., 2009). La bacteria se caracteriza por ser no motil, no encapsulada, pleomórfica pero generalmente cocoide con un tamaño variable entre 0,5 y 1,5 μm de diámetro (F. Gómez et al., 2009). Estudios de genómica comparativa han identificado la existencia de dos genogrupos epidemiológicamente relevantes en Chile, el LF-89 y EM-90 (Isla et al., 2021). Estos grupos genéticos causan diferentes niveles de morbilidad debido a diferentes factores de virulencia, las tasas de supervivencia del salmón del Atlántico durante la infección con LF-89 puede llegar a ser del 60 %, mientras que los peces infectados con EM-90 muestran una tasa de supervivencia del 30 %, bajo condiciones controladas (Carril, Morales-Lange, et al., 2024; Carril, Winther-Larsen, et al., 2024; Rozas-Serri et al., 2017).

P. salmonis se transmite a través de la piel, branquias y epitelio intestinal, pudiendo inducir una epizootia en los confines cerrados dedicados a la cría del salmón, predominantemente en agua salada (Mauel & Miller, 2002; Rozas & Enríquez, 2014). Causa infección sistémica, que afecta predominantemente al hígado, los riñones y el bazo (Wilhelm et al., 2006). La patología macroscópica se caracteriza por manchas hemorrágicas en la piel, decoloración blanquecina con pérdida de escamas y endurecimiento, y en estadios más avanzados, ulceración y oscurecimiento (P. A. Smith et al., 1999). La fase pre-clínica, clínica y post-clínica ocurren entre los días 1–13, 14–28 y 29–45, respectivamente, período posterior al cual al menos el 5 % de la población bacteriana permanece de forma silente en el organismo (Fryer & Hedrick, 2003).

Diversas condiciones favorecen la proliferación descontrolada de *P. salmonis*, incluida la edad, la calidad de los smolts, el microbioma, el sexo, la inmunosupresión, alta densidad en las jaulas, nutrición deficiente, estrés, y temperatura (F. C. Cabello et al., 2020). Una vez dentro del huésped, las células del sistema inmune innato del huésped, especialmente macrófagos, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) probablemente de la flagelina de *P. salmonis*, mediante los receptores tipo Toll (TLR), especialmente el TLR5, y desencadena la activación de la vía dependiente de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), lo que lleva a la activación de receptor asociado a interleucina 1/4 (IRAK-1/4) y factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF-6) y da como resultado la activación del factor nuclear kB (NF- kB), que induce la expresión de citocinas proinflamatorias (Gewirtz et al., 2001; Muñoz-Flores et al., 2022; Rozas-Serri, 2022). Durante el proceso de infección, los macrófagos fagocitan la bacteria, la cual induce cambios en el citoesqueleto de forma progresiva hasta las 48 h posinfección, para formar vacuolas que contienen *P. salmonis* (PCV) (Ramírez et al., 2015). Las PCV actúan como centros de replicación y protección del patógeno, desde los cuales este también induce la apoptosis de

los macrófagos a través de la activación de la caspasa-3 (McCarthy et al., 2008; Rojas et al., 2010).

La clave para la supervivencia intracelular de *P. salmonis*, reside en su capacidad para bloquear la degradación lisosomal, mediante un sistema de secreción Dot/Icm que inhibe específicamente la fusión fagosoma-lisosoma, asegurando un ambiente propicio para su replicación (F. A. Gómez et al., 2013). El sistema Dot/Icm exporta más de 300 proteínas efectoras a las células huésped, las que modulan la biología celular del huésped, incluida su modificación de histonas, transcriptoma, proteoma y tráfico de vesículas (Kubori & Nagai, 2016). De hecho, se ha demostrado que *P. salmonis* puede manipular las respuestas inflamatorias del huésped, de forma que favorece las respuestas antiinflamatorias asociadas con la Interleucina 10 (IL-10) y disminuye las respuestas proinflamatorias asociadas con la Interleucina 12 (IL-12), para promover la replicación bacteriana intracelular (Álvarez et al., 2016). Además, *P. salmonis* modula la evasión del sistema inmune adaptativo, por sobreexpresión de CD4 y subexpresión de CD8, durante la fase tardía de la infección (Rozas-Serri, Peña, & Maldonado, 2018). Finalmente, *P. salmonis*, induce la transcripción del gen *foxp3* lo que promueve la diferenciación de células T reguladoras (Treg) que constituyen un linaje antiinflamatorio específico de diferenciación de linfocitos T CD4 (Khantakova et al., 2022; Morales-Lange et al., 2021). En conjunto, estos mecanismos de evasión e inmunomodulación constituyen una sofisticada estrategia de supervivencia intracelular.

2.3 Sistema Inmune de los Peces Teleósteos

Fisiológicamente, el sistema inmune de los peces, es similar al de los vertebrados superiores. Está conformado por una vasta red de órganos, células, proteínas y sustancias químicas, que constituyen dos mecanismos inmunológicos, innato (inespecífico) y adaptativo (específico) (Figura 1), lo cuales trabajan en conjunto para proteger al organismo contra patógenos invasores como virus, bacterias, hongos y parásitos (J. Cao et al., 2023; Mokhtar et al., 2023). En cuanto a la estructura anatómica (Figura 2), el riñón anterior, el timo y el bazo son los principales órganos del sistema inmune (Bjørngen & Koppang, 2021). El timo tiene como función crear un nicho que albergue células T en desarrollo; El riñón anterior alberga células B y T y los macrófagos; El bazo se considera el órgano linfoide secundario primordial, y en el cual se generan respuestas inmunitarias adaptativas (Bjørngen & Koppang, 2021; Flajnik, 2018). Además, se han descrito tejidos linfoides asociados a la mucosa (MALT), que incluye el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), el tejido linfoide asociado a la piel (SALT) y el tejido linfoide asociado a las branquias (GiALT) (Salinas et al., 2011). Estos MALT representan centros específicos de tejidos a partir de los cuales el sistema inmunológico regula los

microorganismos ambientales a través de efectores inmunes innatos y adaptativos (Bledsoe et al., 2022).

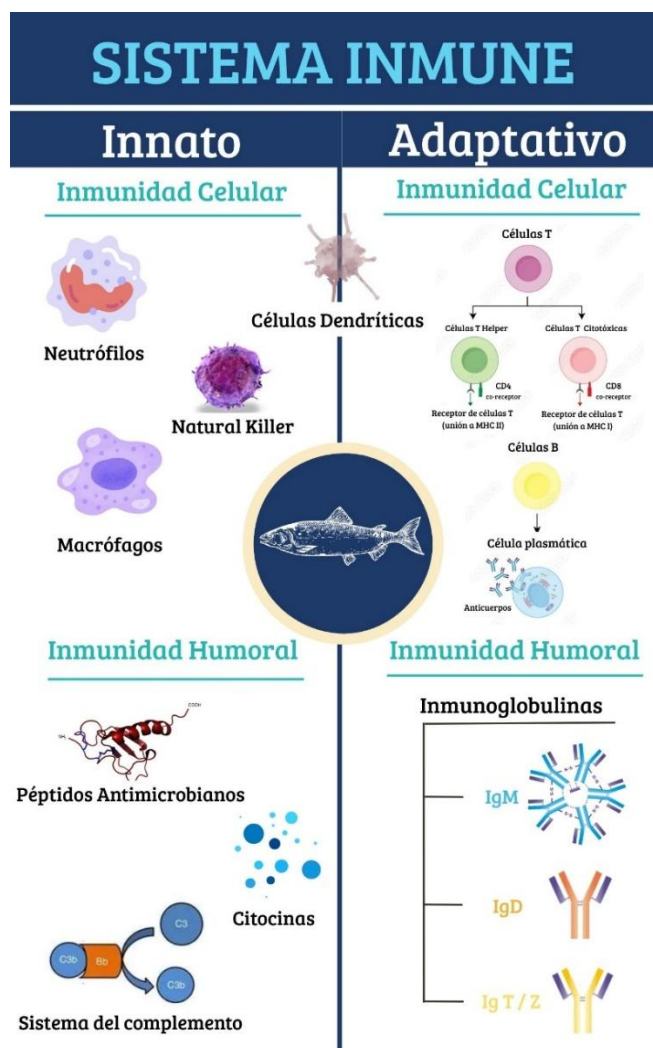


Figura 1. Esquema general de los componentes del sistema inmune de peces teleósteos (Elaboración propia).

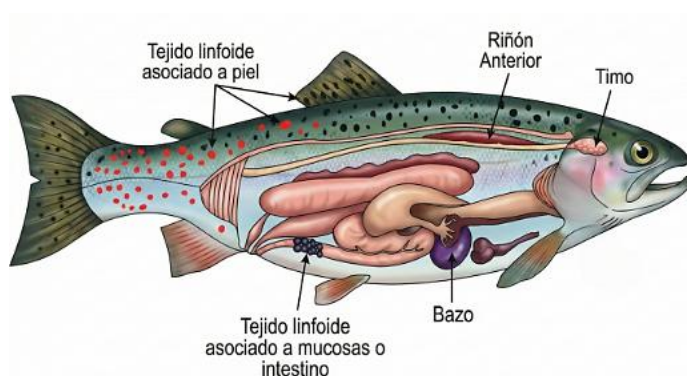


Figura 2. Representación esquemática de los órganos linfoides de peces teleósteos (Elaboración propia).

La inmunidad innata se induce rápidamente después de la infección y se caracteriza por una ausencia de memoria inmunológica, no es específica del antígeno y está modulada por moléculas codificadas por genes de la línea germinal (Collet, 2014). Los componentes del sistema inmunológico innato incluyen barreras físicas como la piel, procesos celulares como la fagocitosis y componentes humorales como proteínas solubles (Riera Romo et al., 2016). Por su parte el sistema inmune adaptativo, es altamente específico para un antígeno en particular y puede proporcionar inmunidad a largo plazo (Kordon et al., 2021). Los componentes específicos del sistema inmunológico adaptativo, incluye las inmunoglobulinas (Igs), los receptores de células T (TCR) y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Flajnik, 2018; Kordon et al., 2021).

Así mismo, tanto el sistema inmune innato como el adaptativo poseen un **componente celular**, el cual está conformado por células inmunitarias, que, en los peces no son muy diferentes de las que se encuentran en los mamíferos (Mokhtar et al., 2023). Las células inmunitarias en los teleósteos incluyen células asesinas naturales, células citotóxicas no específicas, macrófagos, leucocitos granulares, trombocitos, monocitos, células dendríticas, linfocitos, mastocitos y gránulos eosinófilos. Además, los peces también poseen células de rodlet y centros de melanoma (Mokhtar et al., 2023). A continuación, se describen algunas de estas células:

Macrófagos: forman parte de la defensa celular de primera línea contra la infección bacteriana, se especializan en fagocitosis, destrucción de microorganismos extraños y presentación de antígenos, producen citocinas u otros factores solubles para estimular el sistema inmunitario adaptativo (Gordon, 2007; Gordon & Taylor, 2005; Kum, 2011). Los macrófagos poseen muchos receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que permiten a estas células detectar PAMPs, lo que desencadenará la fagocitosis del patógeno (Mogensen, 2009). Luego, los macrófagos pueden eliminar rápidamente al patógeno mediante la producción de intermediarios reactivos tóxicos y la acidificación fagolisosomal (Grayfer et al., 2018). Además de su función antimicrobiana, estas células también pueden presentar antígenos a las células T, y, dependiendo de los estímulos circundantes, pueden orquestar la respuesta inmune adecuada a través de la secreción de citocinas (Grayfer et al., 2018). Finalmente, una vez que ha cesado una reacción inmune, los macrófagos fagocitan los desechos celulares para mantener la homeostasis tisular (Wynn et al., 2013). Es decir, los macrófagos tienen una naturaleza dinámica y heterogénea y se pueden activar por diferentes vías, en un proceso denominado polarización (Wynn et al., 2013; D. Zhou et al., 2014). Los macrófagos se pueden polarizar en dos tipos, M1 o M2, ambos presentan distintos patrones fenotípicos y propiedades funcionales, y la polarización depende del tipo de vía que activa al

macrófago (Forlenza et al., 2011; G. Liu & Yang, 2013). La vía de activación clásica (M1) conduce a un fenotipo inflamatorio típico con la producción de citocinas proinflamatorias, por ejemplo: Interleucina 1 β (IL1 β), Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), Interferón gamma (IFN γ). Por su parte, los macrófagos M2 producen altos niveles de citocinas antiinflamatorias, como IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), están involucrados en la reparación y remodelación de tejidos, y juegan un papel importante en la supresión de la respuesta inmune (G. Liu & Yang, 2013). Existen diferentes subtipos de macrófagos M2, que se diferencian según el estímulo inductor específico y su rol homeostático; en salmones se han identificado tres variantes principales: M2a, activados por interleucina 4 (IL-4) e interleucina 13 (IL-13), M2b, inducidos por la combinación de ligandos de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y M2c, cuya polarización es gatillada por señales desactivadoras como la interleucina 10 (IL-10), y el TGF- β (Amici et al., 2017; Vergadi et al., 2017; D. Zhou et al., 2014).

Neutrófilos: son las células más abundantes entre los granulocitos y monocitos en la sangre, muestran migración activa y actividad fagocítica, y en peces salmónidos, a diferencia de otros peces, son polinucleares (Ghorai & Priyam, 2018). Estas células expresan la quimiocina proinflamatoria 8 (IL-8), la cual se induce en respuesta a diversos estímulos, como infecciones por bacterias, virus, estrés celular y proteínas proinflamatorias como el Factor de Necrosis TNF- α , y la Interleucina 1 β (IL-1 β) (P. Santana et al., 2012). La función principal de la IL-8 es quimiotáctica, es decir induce el reclutamiento de otros neutrófilos y células inmunitarias al sitio de la infección (P. A. Santana et al., 2018).

Células Dendríticas (DC): estas células se han encontrado en branquias, intestino, piel y ovarios, se caracterizan por sus cuerpos celulares pequeños con muchos procesos citoplasmáticos (dendritas), y son capaces de iniciar respuestas inmunes innatas y adquiridas (Mokhtar et al., 2023; Sayed et al., 2022). Tienen actividad fagocítica, y son activadas por ligandos TLR, son potentes inductores del IFN tipo I y son importantes como células presentadoras de antígenos (Ghorai & Priyam, 2018). Con la ayuda de los receptores MHC de clase 2 (MHC II), estas células entregan los antígenos procesados a los linfocitos T, desencadenando la respuesta adquirida mediada por células (Mokhtar et al., 2023).

Células asesinas naturales (NK): contribuyen de manera importante a la inmunidad innata al destruir las células infectadas por virus a través de una lisis osmótica y apoptosis mediada por granzima, además el IFN- α/β , y otras citocinas innatas, como la IL-12 regulan su actividad (Biron et al., 1999). Existe una retroalimentación positiva entre las células NK y los macrófagos. Las células NK activan a los macrófagos induciéndolos a producir IFN tipo I, IL-12 e IL-18.

Estas citocinas inducen a las células NK a producir IFN tipo II, el principal regulador Th1, lo que convierte a estas células en el puente clave entre la inmunidad innata y adaptativa a los virus (Pirhonen et al., 1999).

Linfocitos: son células del sistema inmune adaptativo, incluyen células B y T. Las **células T** expresan un receptor (TCR), que en el salmón del Atlántico incluye las cadenas α , β , γ , and δ , las cuales determinan el mecanismo de la célula T, mientras las células T- $\gamma\delta$ reconocen antígenos directamente, las células T- $\alpha\beta$ reconocen péptidos de antígenos mediante la unión al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Kordon et al., 2021). Según su función, las células T- $\alpha\beta$ pueden ser citotóxicas CD8⁺ y células T cooperadoras CD4⁺ (Th) (Kordon et al., 2021).

Las células T CD8⁺ se activan por péptidos derivados de antígenos intracelulares y presentados por moléculas del MHC clase I (MHC I), y su función es eliminar células huésped infectadas (Kordon et al., 2021). Por otro lado, las células T cooperadoras CD4⁺ son estimuladas por péptidos derivados de antígenos extracelulares y presentados por moléculas del MHC II, y regulan las respuestas de otros leucocitos (Andersen et al., 2006; Banchereau & Steinman, 1998; Kordon et al., 2019).

De igual forma, los **linfocitos B** son células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales, producen anticuerpos (inmunoglobulinas, Igs, IgM, IgD e IgT) frente a antígenos y median la inmunidad humoral, además son los responsables de la memoria inmunológica al diferenciarse en células B de memoria (Mokhtar et al., 2023; Tafalla, 2025). Estas reconocen al antígeno mediante su unión al receptor de células B (BCR), posteriormente, el antígeno es procesado y entregado a las células T auxiliares (Th) por MHC II en la superficie de las células B, lo que permite la activación y diferenciación de las células B vírgenes (Mokhtar et al., 2023). Las células B activadas pueden diferenciarse en células B de memoria, que son detectables a partir de la semana 7 posinfección y circulan por todo el cuerpo, incluso después de 6 meses después de la infección, en el salmón del Atlántico se han detectado anticuerpos específicos de antígenos durante 80 semanas después de la inmunización (Chan et al., 2024; Mechlaoui et al., 2025).

Otro componente importante del sistema inmune innato y adaptativo es el **componente humoral**, estas son respuesta mediadas por macromoléculas producidas por células y liberadas en los fluidos extracelulares después de la infección por un patógeno. Algunos de los componentes humorales más estudiados en los peces incluyen el sistema del complemento, la lisozima, los AMPs y las proteínas de fase aguda (N. C. Smith et al., 2019). A continuación, se describen algunas de las respuestas humorales del sistema inmune:

Citocinas: son proteínas secretadas en respuesta a los estímulos inmunológicos, y una vez liberadas, ejercen sus efectos uniéndose a receptores específicos en la membrana celular, lo que desencadena múltiples vías de señalización intracelular (Mokhtar et al., 2023). Esta señalización induce, estimula o suprime en cascada la expresión de genes regulados en el núcleo, desencadenando así la respuesta inmune (J. F. Cao et al., 2025; Mokhtar et al., 2023).

La familia de interleucinas (IL), es el grupo grande de citocinas, se puede clasificar en:

- **La familia IL-1:** citocina proinflamatoria de la inmunidad innata, incluye IL-1 β e IL-18 (Ogryzko et al., 2014; Secombes et al., 2011). La IL-1 β induce la inflamación como respuesta a la infección, para ello se une al receptor de IL-1 β , y estimula la producción de otras citocinas (cascada de citocinas), como la interleucina 8 (IL-8), la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y más de sí misma (Frenette et al., 2023). Por su parte, IL-18 está regulada positivamente en respuesta a infecciones bacterianas y promueve la expresión de IFN- γ , mejora la inducción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) en fagocitos y activa directamente células T CD8⁺, por lo que cumple un rol importante en la respuesta inmunitarias (C. Yu et al., 2024; Yuan et al., 2026).
- **La familia IL-2:** citocina inmunomoduladora esencial que promueve la proliferación, activación y diferenciación de las células T (Sogo et al., 2009). Incluye IL-2, IL-4/13, IL-7, IL-15 e IL-21 (J. F. Cao et al., 2025).
- **La familia IL-6:** citocina altamente pleiotrópica, es producida por un grupo diverso de células, incluyendo linfocitos T, macrófagos, fibroblastos, neuronas, células endoteliales y gliales, para favorecer los procesos inflamatorios, en respuesta a estímulos proveniente de productos microbianos, IL-1 β o TNF- α , lo que conduce a la atracción de neutrófilos, monocitos y macrófagos, además induce a la proliferación y diferenciación de las células T así como la expresión de IgM por las células B. (J. F. Cao et al., 2025; Scheller et al., 2011; Zhao et al., 2024).
- **La familia IL-10:** citocina antiinflamatoria y supresora de la respuesta inmune, cumple un rol esencial en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y en la limitación de respuestas robustas para evitar daños colaterales al cuerpo durante una infección (Grayfer et al., 2011). Es decir, actúa como un mecanismo intrínseco para limitar la inflamación excesiva en el teleosteo después de la estimulación inmunológica (Chakkalakal et al., 2025). La IL-10 actúa inhibiendo la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-6 y la IL-1 β , además, en especies como la carpa y la tilapia, se ha observado que inactiva neutrófilos y macrófagos y reduce la proliferación de células T (J. F. Cao et al., 2025; K. Li et al., 2023; Reyes-cerpa et al.,

2013; Sakai & Tomoya, 2021). Otras citocinas antiinflamatorias conocidas en peces teleósteos son, el TGF- β , el cual puede inhibir la expresión y secreción de la citocina proinflamatoria IL-1 β ; Interleucina-11 (IL-11), que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos que han sido estimulados por bacterias o sus componentes; Interleucina-35 (IL-35), involucradas en la inhibición de la proliferación de células T y la inhibición del desarrollo y diferenciación de células Th17 (K. Li et al., 2023; J. Zhang et al., 2019).

- **La familia IL-12:** citocina heterodimérica compuesta por subunidades p35 y p40 que induce la diferenciación de las células auxiliares Th1 y estimula la producción de IFN- γ por parte de las células T y las células NK (Huang et al., 2000). Aunque son pocos los estudios sobre la caracterización y función de la familia IL-12 en peces, hasta la fecha se han identificado cuatro miembros de la familia IL-12: IL-12 (p35/p40), IL-23 (p19/p40), IL-27 (p28/EBI3), IL-35 (p35/EBI3) e IL-39 (p19/EBI3) (J. F. Cao et al., 2025).
- **La familia IL-17:** son citocinas proinflamatorias producidas principalmente por células Th17, en peces muestran una regulación positiva en los tejidos inmunológicos y mucosos ante el desafío bacteriano (González-Fernández et al., 2024). Sus funciones en la respuesta inmunológica hacia patógenos están dadas por su unión a los receptores de IL-17 (IL-17R), los principales leucocitos que expresan estos receptores son: los neutrófilos (IL-17RA); células Treg y Th2 (IL-17RB); monocitos y células dendríticas (IL-17RC); basófilos (IL-17RD y) IL-17RB (González-Fernández et al., 2024). Se han encontrado en peces teleósteos IL-17A / F1, IL-17A / F2, IL-17A / F3, IL-17C, IL-17D y IL-17N (J. F. Cao et al., 2025).

Otra familia relevante de citocinas es la **B-Jellyroll**, o también conocida como superfamilia de factores de necrosis tumoral (TNF), cumplen un rol fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria y la comprenden tres miembros principales: TNF- α (TNF- α tipo I o II en el salmón del Atlántico), linfotoxina (LT) - α (también llamada TNF- β) y LT- β (Zou & Secombes, 2016). Tanto el TNF- α como el LT- α se liberan como homotrímeros que interactúan con los receptores en las células diana, mientras que LT- β forma un complejo LT- α / LT- β unido a la membrana (Zou & Secombes, 2016). En salmónidos, TNF- α desencadena la expresión de una serie de genes inmunes asociados con la inflamación, incluidos *il-1 β* , *il-8*, *il-17c*, *tnf- α* y *cox-2*, activa la vía de señalización NF- κ B, mejora la actividad fagocítica de los leucocitos, y promueve la supervivencia de los macrófagos mediante una mayor generación de especies oxidativas reactivas (ROS) mediante la inactivación de las fosfatasa, permitiendo la fosforilación de NF- κ B (Blaser et al., 2016; Zou & Secombes, 2016).

Los interferones (IFN) son citocinas que tienen un papel clave en la regulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, tienen actividad antiviral y modulan las respuestas inmunes (Martin et al., 2007). Hasta la fecha solo se han identificado los tipos I (IFN α y β) y II en peces (IFN- γ), y recientemente se han encontrado evidencias de IFN tipo IV (IFN-u) (B. Li et al., 2024; Martin et al., 2007). Los IFN, al igual que otras citocinas, una vez que se secretan, necesitan interactuar con los receptores en la superficie celular para iniciar respuestas intracelulares, IFNI: IFNAR1 e IFNAR2; IFNII: IFNGR1 e IFNGR2, IFNIV: IFNUR1 e IL-10R2 (S. N. Chen et al., 2022; B. Li et al., 2024).

Una vez que el IFN se une a su receptor específico, activa la vía JAK-STAT, lo que provoca la fosforilación y dimerización de proteínas STAT (principalmente STAT1 y STAT2) (Gan et al., 2020). Cuando la **vía de señalización es mediada por el IFNI (IFN α y β)**, la unión al receptor, forma un complejo asociado con el factor regulador del interferón 9 (IRF9), dando lugar a un factor génico 3 estimulado por IFN (ISGF3). ISGF3 transloca al núcleo donde se une a los elementos de respuesta estimulados por IFN (ISREs) en los promotores de genes, lo que conduce a la transcripción de genes estimulados por IFN (ISG) (Lukhele et al., 2019). Por otra parte, los JAKs pueden fosforilar e iniciar la formación de complejos STAT fosforilados de los homodímeros STAT1 y STAT3, donde el homodímero STAT1 se asocia con una respuesta proinflamatoria, mediada por la unión a secuencias activadas por gamma (GAS), y el homodímero STAT3 inhibe indirectamente la expresión génica inflamatoria, restringiendo las respuestas proinflamatorias (Ivashkiv & Donlin, 2014). Por el contrario, en la **vía mediada por el IFN-II (IFN- γ)**, los STAT1 fosforilados forman homodímeros (STAT1-STAT1), conocidos como factor de unión a GAS (GAF). Este homodímero GAF se transloca al núcleo, pero en lugar de unirse a elementos ISRE, se une a GAS (Gan et al., 2020). La activación de genes a través de elementos GAS conduce a una respuesta más especializada en inmunomodulación, que incluye la potenciación de la presentación de antígenos a través de la regulación del MHC y la activación de funciones efectoras en macrófagos, conectando así de manera más directa la inmunidad innata con la adaptativa (Gan et al., 2020).

Péptidos Antimicrobianos (AMPs): son parte de la respuesta inmune innata, se localizan en aquellas partes de los animales que tienen más probabilidades de entrar en contacto con patógenos del medio ambiente, como la piel, ojos, y las superficies epiteliales (Hancock & Scott, 2000). Se pueden producir a nivel constitutivo, pero también se pueden inducir en respuesta a patógenos (Katzenback, 2015). En general, la longitud de los AMPs es de 12 a 50 aminoácidos, sin embargo, en salmónidos varían de 11 a 79 aminoácidos (Brunner et al., 2020). Un factor clave que influye directamente en la actividad antimicrobiana de los AMPs es

la carga positiva, que en salmónidos, oscila entre 0 y 30, en conjunto con la hidrofobicidad, que suele oscilar entre el 8 y el 22 %, aunque teóricamente puede llegar a contener hasta 50 % de residuos hidrófobos (alanina, valina, prolina, leucina, tirosina, lisina, metionina, triptófano) (Brunner et al., 2020; Hancock & Scott, 2000). La tercera propiedad común de los AMPs es la anfipatía, que se refiere a la abundancia relativa de residuos o dominios de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos dentro de un péptido (Akhavan-Bahabadi et al., 2024). Los AMPs catiónicos suelen exhibir un equilibrio entre los residuos de aminoácidos hidrofóbicos y cargados positivamente que les permite adoptar una conformación anfipática, esto facilita la interacción con superficies cargadas negativamente y la inserción en membranas bacterianas, mientras mayor sea el potencial mayor será la atracción electrostática (Figura 3) (Bechinger & Gorr, 2017).

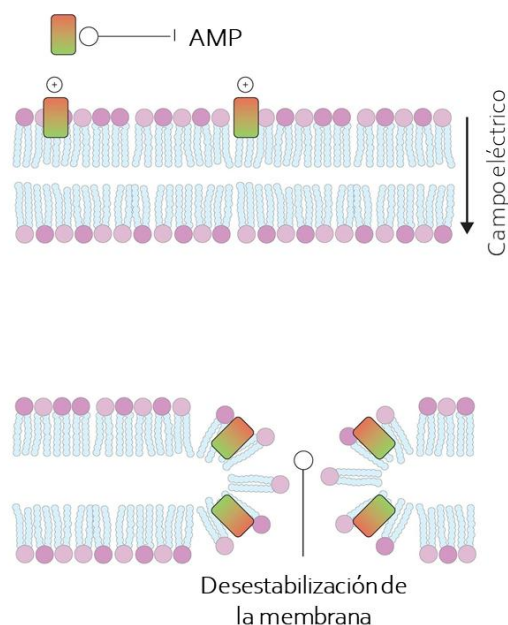


Figura 3. Modelo general del mecanismo antimicrobiano de los AMPs.

Los AMPs se consideran la herramienta más poderosa contra los patógenos de los peces. Actúan de dos formas: eliminando al patógeno directamente al intervenir en la estructura de la membrana y modulando la respuesta inmune (Akhavan-Bahabadi et al., 2024). En cuanto a la acción directa sobre el patógeno, los AMPs tienen un amplio espectro de actividad lítica; su adsorción en las membranas está impulsada por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, e induce cambios estructurales tanto en el péptido como en la membrana lipídica (Sani & Separovic, 2016). Los mecanismos de permeabilización de membranas, es decir, la acción de formación de poros y superficies, se puede clasificar en: poros toroidales, duela de barril, y modelo de alfombra (Pandidan & Mechler, 2021).

- **Mecanismo de poros toroidales:** es uno de los mecanismos de disrupción de la membrana mejor caracterizados. Los AMPs se unen en la región del grupo de cabeza polar de los lípidos, separando los grupos de cabeza e induciendo una deformación de curvatura positiva (Kabelka & Vácha, 2021; Shai, 1999). Esto da como resultado un poro revestido por ambos AMPs. Al interrumpir la curvatura de la bicapa y formar un toroide, los péptidos insertados causarían permeabilización o desintegración de la membrana (Pandidan & Mechler, 2021).
- **Modelo de poro de duela de barril:** en este modelo, los AMPs se colocan en un anillo similar a un barril alrededor de un poro acuoso (Kumari & Booth, 2022). La cara hidrofóbica del AMP apunta hacia afuera del poro para que esté en contacto con las cadenas lipídicas de acilo de la membrana, mientras que las caras hidrofílicas del AMP forman el revestimiento interno del poro (Kumari & Booth, 2022).
- **Modelo de alfombra:** en este modelo los AMPs se adhieren paralelos a la superficie de la membrana, luego el péptido obtiene un pliegue helicoidal en la superficie de la membrana de manera que las cargas positivas de los aminoácidos interactúan con la cabeza de los lípidos cargados negativamente o las moléculas de agua, cubriendo la superficie de la membrana en forma de alfombra (Pandidan & Mechler, 2021). Los péptidos rotan, y conducen la reorientación de los residuos de péptidos hidrofóbicos, hacia la región central de la membrana hidrofóbica, y finalmente rompen la membrana (Pandidan & Mechler, 2021).

Los AMPs, cuentan con otros mecanismos junto con la penetración de membranas y la formación de poros, es decir, un solo péptido puede actuar a través de varios mecanismos dependiendo de la estructura del péptido (ya que requieren motivos estructurales específicos principalmente de prolina), la proporción péptido-lípidos y las propiedades de la membrana lipídica (Bechinger & Gorr, 2017; Cheng-Foh et al., 2017). En consecuencia, no alteran la membrana, pueden atravesarla y alcanzar objetivos intracelulares e interrumpir procesos celulares (Kumari & Booth, 2022). Los AMPs de acción intracelular, pueden interactuar directamente con el ADN o el ARN (por ejemplo: catelicidinas, y β -defensinas) interfiriendo así con sus procesos de replicación; intervenir en el plegamiento de proteínas (por ejemplo: la pirrocoricina y la apidaecina que inhiben las chaperonas DnaK y el GroEL); inhibir proteasas (por ejemplo la histatina); también pueden bloquear la síntesis de la pared celular (por ejemplo: mersacidina, que bloquea el paso de transglucosilación en la biosíntesis de la pared celular) (Cheng-Foh et al., 2017; Kumari & Booth, 2022; Pandidan & Mechler, 2021).

Además de la actividad antimicrobiana, los AMPs modulan la inmunidad, al estimular la respuesta inmune para prevenir infecciones y, al mismo tiempo, suprimir otras respuestas

proinflamatorias para evitar la inflamación incontrolada (Auvynet & Rosenstein, 2009). El papel de los AMPs en el proceso inmunológico es extremadamente complejo. Mantienen el equilibrio dinámico del microambiente inmunológico mediante la regulación de la sección de citocinas, como interleucinas, TNF, IFN, quimiocinas y actividades de células inmunes como células dendríticas, monocitos, macrófagos, mastocitos, granulocitos y linfocitos (Q. Y. Zhang et al., 2021). Estos péptidos, incluyendo catelicidinas, hepcidinas, β -defensinas y NK-lisinas, regulan los receptores de la superficie celular, como los receptores de citocinas, los receptores de quimiocinas y los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), incluidos los receptores de péptidos de formilo (FPR), los TLR, y varias vías de señalización intracelular como el NF- κ B, la quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares (ERK1/2), p38, la quinasa activada por mitógenos de la quinasa N-terminal JUN (JNK), la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), y la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) (Q. Y. Zhang et al., 2021).

Hasta la fecha, se han identificado más de 90 AMPs de peces, los cuales se pueden dividir en cinco familias principales según su estructura: catelicidinas, hepcidinas, β -defensinas, piscidinas, y péptidos derivados de histonas y (Katzenback, 2015).

- **Catelicidinas:** en salmónidos se han descrito dos genes distintos de catelicidina, que exhiben patrones de expresión diferenciales. CATH_1 es indetectable en tejidos sanos, mientras que CATH_2 se expresa constitutivamente en múltiples órganos, con la excepción del hígado (Chang et al., 2005, 2006). Se forman a partir de una secuencia amino-terminal homóloga y una secuencia carboxi-terminal extremadamente diversa, la cual comprende un sitio de escisión QKIRTRR para elastasa y una secuencia madura de catelicidina única (Katzenback, 2015; Valero et al., 2020). Catelicidina madura tiene una extensión de 47-69 péptidos de aminoácidos y presenta una carga general de +8 a +17 en condiciones fisiológicas (pH 7) (Chang et al., 2005, 2006; Maier et al., 2008; Scocchi et al., 2009). Tienen acción contra una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, (por ejemplo, *Yersinia ruckeri*, *Escherichia coli*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas aeruginosa*), y pueden ser inducida por PAPMs, a través de TLR u otros PRR (Broekman et al., 2013). Las catelicidinas, al igual que otros AMPs, ejercen sus efectos antimicrobianos al alterar las membranas bacterianas, lo que lleva a la lisis celular y la muerte (Zhu et al., 2025). Se expresan como respuesta a citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-6, alcanzando un máximo de expresión a las 24 h, además tienen efecto inmunomodulador, favoreciendo el incremento de IL-8 (Bridle et al., 2011; Katzenback, 2015).
- **Hepcidinas:** es un grupo de péptidos ricos en cisteína, que, en su naturaleza como AMP, muestra una separación espacial de sus cadenas laterales hidrofílicas con carga positiva

de las hidrofóbicas (Asmamaw, 2016). La función más conocida, es regular negativamente la liberación de hierro de los macrófagos, lo que resulta en una reducción de las reservas de hierro corporal (Fleming, 2008; M. Liu et al., 2022). Hecpídina se une a la ferroportina (FPN1) presente en la superficie celular, induce la fosforilación de aminoácidos ubicados en un bucle intracelular de FPN1, desencadenando la internalización del complejo hecpídina-FPN1, lo que lleva a la ubiquitinización de FPN1 y la degradación lisosomal de ambas proteínas (Fleming, 2008). Los peces teleósteos presentan dos tipos de hecpídina: hamp1 presenta una función inhibitoria conservada sobre la ferroportina, mientras que hamp2 realiza principalmente funciones antimicrobianas (Neves et al., 2015, 2017). La hamp1 se regula al alza en presencia de *P. salmonis*, debido a que la secuencia QSH en el N-terminal puede estar asociada con interacciones con transportadores de hierro y la regulación de la absorción de este, inhibiendo así el crecimiento de patógenos intracelulares (Álvarez et al., 2022; Díaz et al., 2021).

- **β-Defensinas:** son AMPs catiónicos ricos en cisteína y componentes integrales del sistema inmunológico innato, que se expresan principalmente en los tejidos inmunológicos y mucosos, incluidos el intestino, las branquias, los riñones, el bazo, la piel y el hígado, aunque se distribuye ampliamente a casi todos los tejidos con excepción del cerebro. (Harte et al., 2020; Katzenback, 2015). Tienen tres puentes disulfuro conservados (C1-C5, C2-C4 y C3-C6) que mantienen una estructura de plegamiento bien conservada (Harte et al., 2020). Aunque la expresión de β-defensinas parece ser constitutiva, se modula en respuesta a inductores como LPS, ADN bacteriano, oligodesoxinucleótidos CpG no metilados, y β-glucano, así como patógenos que incluyen bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y virus (M. Guo et al., 2012; Katzenback, 2015). Además, activan otras respuestas inmunitarias innatas, como la expresión de la proteína Mx1 ligada a GTP inducida por interferón, que incrementa el IFN, la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1β, y estimula la fagocitosis en leucocitos del riñón anterior (M. Guo et al., 2012; Ruangsri et al., 2013).
- **Piscidinas:** familia de AMPs que se encuentran en los teleósteos, caracterizadas por ser péptidos catiónicos lineales α-helicoidal con actividad de amplio espectro contra bacterias, hongos e incluso virus (Fernandes et al., 2010). Se presenta como diferentes isómeros, en varias especies de peces, desde la piscidina 1 hasta la 7, aunque son estructuralmente similares, son funcionalmente diferentes (Raju et al., 2021). Se regula al alza en respuesta a PAMPs, a través de PRR, mediante la acción de una cascada de señalización intracelular que incluye MyD88, receptores TLR, TRAF6, IRAK1 e IKK (Campoverde et al., 2017). La cascada de señalización ayuda en la activación de NF-κB que se transloca al núcleo, donde los AMPs y las moléculas efectoras se activan transcripcionalmente (Campoverde et al.,

2017). Esta vía activa la expresión tanto de genes proinflamatorios como IL-1 β , COX1 y TNF- α , así como de genes antiinflamatorios, por ejemplo IL-10 (Raju et al., 2021).

- **„Péptidos derivados de histonas (HDAP):** son fragmentos de péptidos de >10 kDa generados a partir de la escisión proteolítica de histonas H1 y H2A, se encuentran en la piel y el moco (Katzenback, 2015). Los estudios sobre péptidos derivados de histonas de peces han revelado que pueden producirse en respuesta al daño epidérmico, LPS o ciertas bacterias Gram negativas, y tienen actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de bacterias Gram positivas y Gram negativas, parásitos y hongos (Katzenback, 2015). La ausencia de péptidos señal y la plausible localización nuclear del péptido son rasgos característicos de los HDAP. Además, presentan una alta proporción de aminoácidos básicos como lisina y arginina, y disruptores de hélice, como la prolina, características comunes en las señales de localización nuclear (Lanford y Butel 1984).

Sistema de complemento: es un conjunto de más de 30 proteínas plasmáticas y componentes celulares, que actúan cooperativamente para mediar los mecanismos de defensa, incluida la eliminación de patógenos a través de la opsonización, la fagocitosis y la promoción de la respuesta inflamatoria (Bavia et al., 2022; N. C. Smith et al., 2019). Estas proteínas pueden activarse por tres vías: la vía clásica, que se activa de forma específica cuando un anticuerpo (IgM o IgG unido a un antígeno) es reconocido por la proteína componente del complemento 1q (C1q). La vía de la lectina, que se activa de forma innata cuando proteínas plasmáticas se unen directamente a patrones de carbohidratos típicos de la superficie de los patógenos; y la vía alternativa, que se activa de forma innata y espontánea cuando la proteína componente del complemento 3 (C3), se une directamente y se activa en superficies extrañas, sin necesidad de anticuerpos ni lectinas (Nonaka & Smith, 2000). Una vez activado, el sistema del complemento es capaz de desempeñar importantes funciones inmunológicas como la opsonización, lisis, inflamación y modulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Bavia et al., 2022).

Inmunoglobulinas: forman parte del componente humoral del sistema inmune adaptativo. Son glicoproteínas de reconocimiento altamente especializadas que pueden reconocer una gran variedad de antígenos de bacterias, virus y otros organismos causantes de enfermedades y reclutar otras células y moléculas para destruir estos patógenos (Salinas et al., 2011). Se secretan en los principales tejidos linfoides asociados a la mucosa en los teleósteos son el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), el tejido linfoide asociado a las branquias (GIALT), el tejido linfoide asociado a la piel (SALT) y el tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT). (Bilal et al., 2021). Se componen de dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas también, que proporcionan dos sitios de unión al antígeno por los dominios

variables aminoterminales (V) de las cadenas H y L (Salinas et al., 2011). Las formas secretadas de teleósteos son IgM, IgD e IgT / Z (Y. Yu et al., 2020). Aunque, las células B se dividen en tres subpoblaciones principales según la expresión de los receptores de células B: células B IgM + (IgM + / IgD + / IgT -), células B IgD + (IgM - / IgD + / IgT -) y células B IgT + (IgM - / IgD - / IgT +) (Bilal et al., 2021). La IgM tiene funciones tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, ya que activa el sistema del complemento, la opsonización, la aglutinación para la fagocitosis, la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos y la eliminación de patógenos (Bilal et al., 2021).

Desde una perspectiva general resumida, la respuesta principal del organismo ante un patógeno, es función del sistema inmune innato, que, en el caso específico del componente celular, reconoce tempranamente a los patógenos y activa las respuestas proinflamatorias por secreción de citocinas. Tras el reconocimiento de PAMPs, por parte de los PRR, y los TLR, se activa vías de señalización intracelular, que pueden ser dependientes o independientes de la proteína adaptadora MyD88, y desencadena la sobreexpresión de diversos genes implicados en la inmunidad innata (por ejemplo: *il-12*, *tnf-α*, *tlr1*, *c3*, *il-1β*) (Rozas-Serri, Peña, & Maldonado, 2018). Como resultado, se induce la producción de citocinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β, IL-12, IL-8, IL-6 e IFN, algunas de las cuales median la activación de la respuesta del sistema inmune adaptativo, reclutando así linfocitos T colaboradores (Th), linfocitos T citotóxicos, y linfocitos B (anticuerpos), dependiendo del patógeno (Martínez et al., 2018). Para el control de patógenos intracelulares, como *P. salmonis*, la IL-12 promueve la diferenciación de linfocitos Th1 y estimula la secreción de IFN-γ. Esta citocina regula a su vez la proliferación de otros linfocitos Th, y la maduración de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺). Aunque *P. salmonis* es capaz de modular y evadir este mecanismo de respuesta (Rozas-Serri, 2022).

2.4 Inmunomoduladores

Los inmunomoduladores son sustancias naturales o sintéticas que modulan o modifican la respuesta inmunitaria (Y. Sharma et al., 2024). Estos pueden ser de acción específica, como por ejemplo las vacunas cuya acción está dirigida a antígenos específicos, o pueden presentar acción inespecífica, actuando como estimuladores o supresores de la respuesta inmune, sin dirigir la actividad de las células estimuladas hacia un antígeno específico, alterando la respuesta del sistema inmunitario al aumentarla (inmunoestimulador) o disminuirla (inmunosupresor) (Y. Sharma et al., 2024). Los inmunomoduladores influyen en las células, creando mediadores solubles como las citocinas (Y. Sharma et al., 2024). Por ello, en la inmunoterapia, el sistema inmunitario está designado para ayudar a eliminar infecciones, basado en los mecanismos celulares involucrados en la infección (Parra et al., 2020; Y.

Sharma et al., 2024). Entre estos se encuentran respuestas como proliferación de linfocitos, incremento de la expresión de citocinas, inducción de IFN y otros agentes inmunológicos, de forma tal que el patógeno capaz de evadir la protección, encuentre una alta resistencia al ataque en el organismo (Palstra et al., 2018).

Diversos metabolitos secundarios derivados de plantas en productos naturales son capaces de modular varios componentes del sistema inmunológico innato y adquirido (P. Sharma et al., 2017). Por ejemplo, las algas marinas pueden representar inmunoestimulantes con actividad antibacteriana, que podrían usarse como componentes de alimentos para peces que promueven la salud, ofreciendo así una alternativa para el uso de antibióticos (Bansemir et al., 2006). Generalmente, los inmunoestimulantes actúan fomentando los mecanismos fagocíticos y bacterianos de destrucción de macrófagos, vías del complemento, linfocitos y células citotóxicas innatas para lograr una mayor inmunidad (Gupta et al., 2021). Otro ejemplo son los β -glucanos, estos polisacáridos complejos provenientes de muchas fuentes naturales, como la avena, la cebada, las levaduras, los hongos y las algas, tienen propiedades inmunomoduladoras, induciendo una protección inespecífica contra las infecciones y el estrés, regulan la inflamación, la activación de la fagocitosis, la estimulación de citocinas y lisozimas, la respuesta pro- y antioxidante (Pogue et al., 2021).

Los inmunomoduladores son cada vez más usados en la acuicultura, como aditivos funcionales, que mejoran la inmunidad, la salud intestinal y la resistencia a patógenos, que a su vez promueven una acuicultura sostenible (Abdul Kari, 2025). Entre los más comunes se encuentran los probióticos (por ejemplo, *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus* spp.), prebióticos (por ejemplo, inulina y fructo-oligosacáridos (FOS)), fitoquímicos (por ejemplo, flavonoides, aceites esenciales y saponinas) y compuestos de origen marino (por ejemplo algas, omega 3 y ácidos grasos) (Abdul Kari, 2025). Cada uno actúa de forma distinta, aunque en general proporciona ventajas integrales a las especies acuáticas al modular las respuestas inmunitarias (Abdul Kari, 2025). Algunas marcas registradas con productos que se distribuyen en el mercado son: Biogen®, contiene cepas bacterianas; Pronifer®, contiene bacterias ácido-lácticas; VaxSap®, extracto de Quillaja saponaria; SelenoExcell®, seleno-levadura; AquaStar®, probiótico multiespecie; EM® producto, contiene bacterias lácticas, fotótrofas y levaduras; MicroPan®, complejo de bacterias fermentativas y enzimas; Fishery Prime™, mezcla especial de microbios probióticos. Han logrado controlar con éxito patógenos en peces y camarones como: *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, *Vibrio anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Streptococcus* spp. Por lo que su aplicación ha sido importante para controlar enfermedades en la acuicultura (Wu et al., 2019).

2.4.1 AMPs Como Inmunomoduladores

Más allá de los inmunomoduladores antes mencionados, la búsqueda de nuevas alternativas continúa, impulsada por la necesidad de moléculas con mayor potencia y menor riesgo de generar resistencia (Rossolini et al., 2014). En este contexto, los AMPs se perfilan como candidatos de excepcional promesa, ya que suprimen el crecimiento de patógenos, con una muy baja probabilidad de que su aplicación extensiva produzca genes resistentes en las bacteria, y además fortalecen las funciones inmunológicas del huésped (Hancock & Scott, 2000). Aunque existe un interés creciente en el potencial de los AMPs para reemplazar parcial o completamente los antibióticos, los mecanismos potenciales de los AMPs con respecto a la inmunología del huésped, no están claros (Lyu et al., 2023). Además, la aplicación de AMPs en la práctica está severamente limitada debido a su pequeña escala de producción, como proteína recombinante y alto costo de purificación, sin dejar de lado, que la estabilidad de los AMPs *in vivo* es generalmente baja, porque son fácilmente degradados por las enzimas digestivas endógenas del huésped (Lyu et al., 2023).

Diferentes estrategias se han explorado para superar los inconvenientes descritos anteriormente, la encapsulación en nanocarriers emerge como la más prometedora (Rima et al., 2021). Estos sistemas de administración consisten en partículas nanométricas (1-1000 nm) compuestas de biomateriales poliméricos como alginato o carbono que protegen físicamente a las proteínas recombinantes de la degradación por proteasas, mejorando así su estabilidad *in vivo* (Giri et al., 2021). De hecho, se ha demostrado que la encapsulación del AMP IK8, con nanovarillas de oro en hidrogeles de polietilenglicol, protegió el AMP de la proteólisis y proporcionó una liberación desencadenada de la molécula terapéutica (Moorcroft et al., 2020). Una ventaja clave de los nanocarriers es que pueden diseñarse con ligandos que los dirigen a células específicas, maximizando su acción terapéutica y controlando su destino biológico (Angulo et al., 2021). Entre las diversas plataformas, las nanoestructuras proteicas destacan por su complejidad y sofisticación, poseen propiedades únicas, como un alto reconocimiento molecular, actividad catalítica específica, biodegradables, no tóxicos y biofuncionales, lo que los convierte en un formato terapéutico ideal y sostenible para su aplicación en acuicultura (Hernandez-Garcia, 2021; F. Li et al., 2020; Rüdiger et al., 2018). No obstante, a pesar de que la producción de AMPs recombinantes en el laboratorio mitiga parcialmente el problema, los altos costos asociados a los procesos de síntesis y purificación siguen representando una limitante significativa para su escalamiento comercial (Rima et al., 2021).

2.5 Proteínas Nanoestructuradas

2.5.1 Formación de las proteínas nanoestructuradas

Las proteínas nanoestructuradas o IBs, se forman en bacterias recombinantes, inmediatamente después de la inducción de la expresión génica, como consecuencia de la sobreexpresión de genes heterólogos, en especial bajo condiciones de estrés ambiental (M. M. Carrió & Villaverde, 2001a; De Marco et al., 2019; García-Fruitós et al., 2007; Rinas et al., 2017). Este escenario, produce un desbalance en la homeostasis proteica, la rápida asociación y deposición de las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas, ocurre a una velocidad que excede la capacidad de las chaperonas para plegarlas y de las proteasas para degradar los agregados, formando nanoestructuras o agregados proteicos insolubles, que se localizan especialmente en los polos de las células bacterianas (De Marco et al., 2019; Rinas et al., 2017). Bajo una alta tasa de traducción las proteínas se pliegan de forma tal, que las cadenas laterales hidrófobas como los donantes/aceptores de enlaces de hidrógeno de la columna vertebral, están expuestos al solvente y pueden interactuar, ya sea intramolecularmente para guiar a la proteína hacia la estructura funcional o intermolecularmente para formar especies agregadas (de Groot et al., 2009). Los contactos intermoleculares específicos, cuya formación está fuertemente influenciada por el entorno local de la proteína, pueden dar lugar a la formación una fibrilación ordenada (β -amiloide) (García-Fruitós et al., 2011). La condensación de parches hidrofóbicos disponibles por la proteína diana mal plegada, interactúa con una capa externa hecha de proteína transportadora hidrófila altamente soluble formando un núcleo (Figura 4) (De Marco et al., 2019). Como resultado de esto, los IBs se forman como partículas proteicas esféricas o ligeramente ovaladas con tamaños que varían entre 50 y 700 nm, altamente enriquecidas con la proteína recombinante y que también contienen cantidades menores de proteínas celulares (principalmente chaperonas), trazas de ácidos nucleicos y otros componentes celulares (Villaverde, 2012).

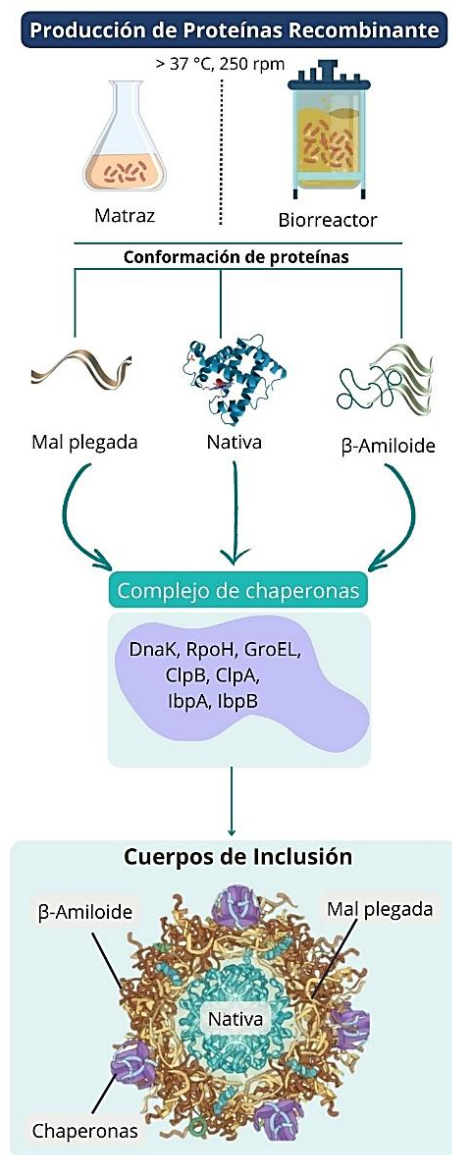


Figura 4. Esquema general de formación de los cuerpos de inclusión. La producción de proteínas recombinantes, en matraz o biorreactor a temperaturas desde los 37 °C, a 250 rpm, en sistemas heterólogos, favorece el plegamiento de diferentes conformaciones proteicas, las cuales forman IBs por la acción de chaperonas.

El proceso de formación de los IBs es dinámico, ya que está sometido a una sofisticada red de control de calidad de proteínas, que es una colección de chaperonas y proteasas que ayuda con el repliegue de proteínas mal plegadas, protege de la agregación irreversible, o, eventualmente, las marca para su degradación (Christensen et al., 2022). Algunas chaperonas clave, son DnaK, DnaJ, GrpE, ClpB, GroEL y GroES, que pueden, por ejemplo, unirse a tramos hidrofóbicos de aproximadamente cinco residuos de largo, que quedan expuestos al plegarse incorrectamente (Christensen et al., 2022; De Marco et al., 2019). Una parte importante de la proteína eliminada de los IBs sufre un ataque proteolítico y se degrada, mientras que una fracción alcanza una forma completamente funcional (M. M. Carrió & Villaverde, 2003). La

agregación de proteínas como IBs, sería entonces, el resultado de la incapacidad de las chaperonas y proteasas para procesar grandes cantidades de proteína mal plegada, y pueden llegar a representar hasta el 50 % o más de la producción total de proteínas (M. M. Carrió & Villaverde, 2001b).

2.5.1.1 Factores que afectan el rendimiento y calidad de los IBs

Varios parámetros afectan el rendimiento y la calidad de los IBs, tales como: el vector de expresión, la temperatura, el medio de crecimiento, la cantidad de inductor, el tiempo de inducción y el tiempo de cosecha (Rani et al., 2023).

Vector de expresión: el vector de expresión, es un factor clave en el rendimiento de la producción de IBs, por ejemplo, sistemas fuertes como el promotor T7 inducidos con IPTG favorecen una alta tasa de transcripción que supera la capacidad de plegamiento de la célula, promoviendo la agregación (Rani et al., 2024). Además de este promotor, se utilizan muchos promotores variables, incluidos el promotor araBAD (inducido por arabinosa) y el sistema promotor rhamBAD (inducido por ramnosa), aunque exhiben tasas transcripcionales basales más bajas, lo que resulta en una reducción de la formación de IBs y una mayor fracción soluble de proteínas en comparación con el sistema promotor T7 (Rani et al., 2024). La elección del vector de expresión también debe considerar la cepa bacteriana que se empleará como sistema para la expresión, la cual deben ser particularmente cepas diseñadas para favorecer la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma como *E. coli* SHuffle, para favorecer la propensión a la agregación (Rani et al., 2024)

Temperatura: por ejemplo, se ha demostrado que una temperatura más baja durante la inducción (16–25 °C) puede aumentar el rendimiento final de proteína soluble, por lo que se asume que una velocidad de traducción más lenta podría favorecer el plegamiento correcto de la proteína, además los IBs formados a altas temperaturas son más estables frente a la proteólisis que los formados a baja temperatura (Vera et al., 2007).

pH: un pH no controlado, aumenta un 28 % aproximadamente la formación de IBs, en comparación con un pH controlado (7,0). Bajo la hipótesis de que la alcalinización del medio de cultivo puede causar pequeños cambios citoplasmáticos, que forman ambientes que favorecen la acumulación y precipitación de proteínas huésped y recombinantes, cuyos puntos isoeléctricos son similares al pH citoplasmático perturbado. Además, proteínas de estrés como las codificadas por *ibpB*, *lon*, *dnaJ*, *dnaK*, *clpB*, *clpX* y *grpE*, entre otras, podrían estar implicadas en el mantenimiento de la proteostasis (homeostasis del plegamiento de proteínas),

como respuesta a la producción de proteínas recombinantes y a los cambios externos del pH. (Castellanos-Mendoza et al., 2014).

Medio de cultivo y la estrategia de alimentación: impactan directamente, ya que componentes como micronutrientes específicos (magnesio, hierro) y aditivos como glicina o sorbitol pueden modular el estrés celular y el rendimiento de proteínas recombinantes, se han empleado comúnmente Luria Broth (LB), Terrific Broth (TB), Super Broth (SB), medio de autoinducción, y otros (Rani et al., 2024; Studier, 2005). No obstante, los medios definidos suelen ser comúnmente empleados para la producción de productos farmacéuticos proteicos a escala industrial, incluyendo IBs (Hoffmann et al., 2004; Kopp et al., 2019). Dado que la composición del medio influye en la producción de proteínas recombinante, es necesario optimizarlo previo al escalamiento, con el objetivo de reducir el coste total del producto, aumentar los rendimientos, y mejorar la precisión metabólica (Hoffmann et al., 2004; Kopp et al., 2019; Schmidt, 2005).

El sistema de expresión más ampliamente utilizado para la producción de IBs y de proteínas recombinantes en general es *E. coli* (Garcia Fruitós & Arís Giralt, 2022). Su popularidad está relacionada con la facilidad de manejo, el costo reducido, el alto rendimiento y la posibilidad de optimizar los procesos posteriores mediante procesos de escalado accesibles (Garcia Fruitós & Arís Giralt, 2022). Sin embargo, por la presencia de endotoxinas bacterianas en las proteínas provenientes de *E. coli*, se está convirtiendo en una preocupación importante para las agencias reguladoras, además, el proceso de eliminación de endotoxinas no solo tiene costos asociados importantes, sino que también presenta el riesgo de destruir el plegamiento y la función de las proteínas, siendo un paso que debe evitarse, especialmente para aquellas proteínas que son difíciles de purificar, como las proteínas nanoestructuradas (M. Carrió et al., 2005; Parlane et al., 2011). Por este motivo, se han desarrollado sistemas de expresión alternativos, siendo las Bacterias Ácido Lácticas (por ejemplo, *Bacillus subtilis* y *Lactococcus lactis*), clasificadas como Generalmente Reconocidas Como Seguras (GRAS) (Garcia Fruitós & Arís Giralt, 2022).

Los IBs pueden ser recuperados mediante procesos de purificación que incluyen centrifugación y lavados en tampones que contienen sales y otros solventes, como surfactantes (Palmer & Wingfield, 2012). Aunque es necesario considerar que se deben encontrar las condiciones óptimas para cada proteína, ya que estas son susceptibles a alteraciones químicas y físicas que conducen a la pérdida de actividad (Garcia Fruitós & Arís Giralt, 2022). En general se lisan las células, se eliminan los componentes de la pared celular y la membrana, los agregados se lavan con tampones, y también pueden ser solubilizados mediante la adición de solubilizantes

proteicos como urea 8M, o HCl (Garcia Fruitós & Arís Giralt, 2022). La adición de algunos tags, como la Histidina (HHHHHH), etiqueta de epítipo FLAG (DDYKDDDK) o c-Myc (KLISEEDL), en el extremo C de las proteínas de fusión permiten visualizar la expresión mediante Western blot (Garcia Fruitós & Arís Giralt, 2022). También se han desarrollado algunos portadores de fusión como N pro y la isomerasa de ketosteroide (KSI) para inducir deliberadamente la formación de IBs que de otro modo se expresarían de manera soluble, otras etiquetas de fusión son un péptido α -helicoidal 18A (EWLKAFYEKVLKELKELF), un péptido β -lámina ELK16 (LELELKLKLELELKLK), y pequeños péptidos tipo surfactante (L6KD, L6K2, DKL6), que pueden inducir la formación de agregados de proteínas altamente activos en *E. coli* (Garcia Fruitós & Arís Giralt, 2022).

Versiones truncadas de la proteína diana, otras proteínas codificadas por plásmidos, y proteínas de la célula huésped, incluidas las chaperonas, pueden quedar atrapadas dentro o asociadas a los IBs bacterianos (Villaverde et al., 2012). En su mayoría, la mayoría de los contaminantes derivados de la célula huésped y los plásmidos (por ejemplo, ADN plásmido, lípidos, componentes de membrana) en las preparaciones de IBs reflejan una adsorción y coprecipitación inespecíficas de restos celulares durante la purificación de IBs (Rinas & Bailey, 1992). La mayoría de estos contaminantes pueden eliminarse mediante procedimientos de purificación exhaustivos, que permiten obtener estas partículas relativamente libres de restos celulares contaminantes, y especialmente de bacterias vivas que escapan de la lisis celular (Villaverde et al., 2012).

2.5.2 Uso de las proteínas nanoestructuradas

Las proteínas nanoestructuradas tienen características únicas que pueden explotarse para la investigación médica y las aplicaciones biotecnológicas. En primer lugar, son mecánica y químicamente estables, además de ser biofuncionales, lo que constituye la base de sus aplicaciones emergentes como biomaterial en medicina (De Marco et al., 2019; Rinas et al., 2017; Singh et al., 2020). En segundo lugar, la propensión de los IBs a agregarse homogéneamente con una alta densidad presenta una oportunidad para el aislamiento rápido de proteínas expresadas (Ramón et al., 2014). Por lo cual, las aplicaciones industriales de las proteínas IBs han cobrado impulso con los avances tecnológicos actuales y los esfuerzos de investigación invertidos en los últimos años, incrementando su interés en el uso, exploración y posterior adaptación de IBs como materiales funcionales nanoestructurados (Bhatwa et al., 2021).

La estructura de β -amiloide de los IBs, proporciona un estado muy estable y altamente compactado desde el cual puede tener lugar la liberación controlada de proteína recombinante funcional *in vivo*, así como en condiciones suaves (no desnaturalizantes) *in vitro* (Maji et al., 2009). Esta característica, que recuerda a un sistema de administración de fármacos, condujo al concepto de las "nanopíldoras", es decir, nanopartículas que pueden liberar proteínas con efectos terapéuticos directamente desde el interior de las células, que no muestran ningún signo de toxicidad (Vázquez et al., 2012; Villaverde, 2012).

Las proteínas liberadas por los IBs penetran en las células expuestas y actúan desde adentro, además de acumularse en el medio y actuar extracelularmente (De Marco et al., 2019). En este sentido, los IBs libres interactúan estrechamente con la membrana celular, a través de filopodios emitidos por células que promueven la internalización de IBs por micropinocitosis (De Marco et al., 2019). Aunque parte del IBs se degrada en los lisosomas, cantidades significativas de IBs aún son detectables intracelularmente por inmunohistoquímica (De Marco et al., 2019). De este modo, los IBs actúan como vehículos eficaces para la entrega intracelular de proteínas, permitiendo que estas ejerzan su actividad tanto en el espacio intracelular como en el medio extracelular.

Los IBs catalíticamente activos, se han utilizado para sintetizar precursores clave de importantes fármacos. Por ejemplo, IBs catalíticamente activos de la aldolasa del ácido siálico (SAA), precursor del fármaco antivirótico Relenza®, expresados en células de *E. coli* BL21 (DE3) mostraron la misma actividad que la enzima SAA soluble, mientras que los IBs catalíticos liofilizados mostraron el 93 % de la actividad original (Nahálka et al., 2008). Otros IBs, como citocinas (por ejemplo, IL1 β , IL6, IL8, Tnf- α) tanto de peces como de especies relevantes en ganadería, y proteínas de patógenos (por ejemplo, proteínas de la cápside de virus) han demostrado modular la expresión de genes asociados a respuestas del sistema inmune innato y adaptativo al ser administrado de forma oral, intraperitoneal, o incluso como solución nasal (Tabla 2.1) (Gifre-Renom et al., 2020; Montesino et al., 2019; Rojas-Peña et al., 2022; Thwaite et al., 2018; Torrealba, Seras-Franzoso, Mamat, Wilke, Villaverde, Roher, & Garcia-Fruitos, 2016; Wang et al., 2022; Wedrychowicz et al., 2007). Estos hallazgos respaldan el uso de los IBs no solo como sistemas de administración, sino también como biocatalizadores y moduladores inmunitarios estables y funcionales.

Aunque no se puede anticipar cómo los usos potenciales de los IBs en medicamentos emergentes estarán limitados por restricciones regulatorias, son una herramienta para desarrollo y, posible incorporación de medicamentos nuevos (Villaverde et al., 2012). Con base en la evidencia, la producción de moléculas como AMPs en forma de IBs, se presenta como

una estrategia novedosa y eficaz para fortalecer o modular el sistema inmune de salmones expuestos a *P. salmonis*, con la ventaja adicional de no generar resistencia bacteriana. La capacidad de los IBs para proteger las proteínas de la degradación, facilitar su internalización celular y liberar gradualmente moléculas bioactivas, sumada a la factibilidad de producir AMPs recombinantes de forma económica en sistemas bacterianos, consolida a esta plataforma como una alternativa prometedora frente a los esquemas tradicionales de inmunoestimulación. Por lo tanto, explorar el diseño y aplicación de AMPs vehiculizados en IBs representa una solución técnica y económicamente viable y una oportunidad estratégica para avanzar hacia una acuicultura más sostenible y resiliente.

Tabla 2.1. IBs empleados en modelos animales de acuicultura y ganadería.

Proteína IB	Modelo animal	Afección	Estrategia de Administración	Dosis	Marcador molecular		Referencia
					Expresión génica (RNA)	Proteína en plasma	
MMP9	<i>Bos taurus</i>	mastitis	Infusión por glándulas mamarias	0,012-12 mg	NA	↑Lactoferrin, ↑BSA	(Gifre-Renom et al., 2020)
MMP9	<i>Bos taurus</i>	mastitis	Infusión por glándulas mamarias	12 mg	NA	↑Lactoferrin, ↑BSA	(Parés et al., 2021)
CPFhW	<i>Bos taurus</i> , <i>Ovis aries</i>	Fasciola hepática	Suspensión nasal	300 µg	NA	↑GGT, ↑IgG, ↓IgA	(Wedrychowicz et al., 2007)
IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α	<i>Sus domesticus</i>	Inmunosupresión	Oral	20 µg/kg	(n.s.) <i>tnf-α</i> , (n.s.) <i>cd44</i> , (n.s.) <i>bd1</i> , (n.s.) <i>bd2</i> , (n.s.) <i>il-6</i>	(n.s.) IL-8, (n.s.) IL-10, (n.s.) IL-6, (n.s.) TNF-α	(López-Cano, Bach, et al., 2022)
OMP1c, OMP2c, INVAsc	<i>Sus domesticus</i>	Lawsonia intracellularis	Inyección intramuscular	100-200 µg/mL	NA	↑IgG	(Salazar et al., 2021)
OMP1c, OMP2c, INVAsc	<i>Sus domesticus</i> , <i>Mus musculus</i>	Lawsonia intracellularis	Inyección intramuscular	5-200 µg/mL	↑ <i>il-12</i> , ↑ <i>oas2</i> , ↑ <i>cd4</i>	↑CD4+, ↑IgG	(Montesino et al., 2019)
OmpK-GST OmpK-MBP	<i>Mus musculus</i>	<i>Vibrio</i> sp.	Inyección subcutánea	80 - 40 µg/mL	NA	↑IgG	(W. Wang et al., 2021)
CP-VNNV	<i>Solea senegalensis</i>	Nervous necrosis virus	Inyección intraperitoneal	50-500 µg	↑ <i>arg2</i> , ↓ <i>igt</i> , ↓ <i>cd8</i> , ↑ <i>cd4</i> , ↑ <i>igm</i>	↑IgM	(Thwaite et al., 2020)
VP1	<i>Danio rerio</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inyección intraperitoneal	5,5mg/kg	↑ <i>tnf-α</i> , (n.s.) <i>il6</i> , ↑ <i>il-1b</i> , ↑ <i>il-8</i> , ↑ <i>cox2</i> , (n.s.) <i>camp1</i> , (n.s.) <i>socs3</i> , ↑ <i>mmp9</i>	NA	(Torrealba, Seras-Franzoso, Mamat, Wilke, Villaverde, Roher, & Garcia-Fruitos, 2016)
TNF-α	<i>Danio rerio</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>	Intubación	10-20 µg	↑ <i>il-1b</i> , ↑ <i>il-6</i> , ↑ <i>il-10</i> , (n.s.) <i>il-22</i> , ↑ <i>cox2</i> , (n.s.) <i>c3</i> , ↑ <i>mmp9</i> , ↑ <i>ttr5</i>	NA	(J. Ji et al., 2019)
GP-SVCV, GP-SVCV-IFN	<i>Danio rerio</i>	Spring viremia of carp virus	Inyección intraperitoneal	10 µg	↑ <i>tnf-α</i> , ↑ <i>il-1b</i> , ↑ <i>il-10</i> , ↑ <i>vig1</i> , ↑ <i>mx</i> , ↑ <i>lmp2</i> , ↑ <i>irf1</i> , ↑ <i>ccl4</i> , ↑ <i>ifngr1</i> , ↑ <i>prf19b</i> , ↑ <i>gzma</i>	NA	(Rojas-Peña et al., 2022)
FhSAP2	<i>Mus musculus</i>	Fasciola hepática	Inyección subcutánea	20 µg	NA	(n.s.) IFNγ, ↓IL-4, ↑TNF-α, ↑IgG1, ↑IgG2a	(Rivera & Espino, 2016)

NA: No Aplica. IBs derivados del hospedador: MMP9 (metaloproteínasa de matriz-9), IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α. IBs derivados del patógeno: CPFhW (cisteína proteinasa de *Fasciola hepática*), OMP1c/OMP2c (proteína de membrana externa 1 o 2 de *Lawsonia intracellularis*), INVAsc (invasina, proteína de secreción de *L. intracellularis*), OmpK (proteína de membrana externa K de *Vibrio* sp.), OmpK-GST (OmpK fusionada con la etiqueta glutathione S-transferase), OmpK-MBP (OmpK fusionada con la proteína de unión a maltosa), CO-VNNV (proteína de la cápside del betanodavirus ibérico), VP1 (proteína de la cápside del virus de la fiebre aftosa), GP-SVCV (glicoproteína G del virus de la septicemia hemorrágica primaveral de la carpa), GP-SVCV-IFN (GP-SVCV unido a interferón gamma), FhSAP2 (saposina-2 de *F. hepática*).

3. Hipótesis y Objetivo

3.1 Hipótesis

Péptidos antimicrobianos del salmón del Atlántico producidos como proteínas nanoestructuradas son una plataforma biológica capaz de incrementar la respuesta inmune innata y antagonizar la supervivencia de *Piscirickettsia salmonis*.

3.2 Objetivos General y Específicos

3.2.1 Objetivo General

Desarrollar péptidos antimicrobianos en forma de proteínas nanoestructuradas como plataforma inmunoestimulante frente a *Piscirickettsia salmonis* en salmón del Atlántico.

3.2.2 Objetivos Específicos

1. Producir y caracterizar proteínas nanoestructuradas de salmón del Atlántico con potencial inmunoestimulante en *Escherichia coli*.
2. Analizar la capacidad de las proteínas nanoestructuradas para estimular el sistema inmune del salmón del Atlántico.
3. Evaluar la eficacia de las proteínas nanoestructuradas para el control de *P. salmonis* y su potencial para ser administradas por vía oral.

4. Materiales y Métodos

4.1 Objetivo 1: Producir y caracterizar proteínas nanoestructuradas de salmón del Atlántico con potencial inmunoestimulante en *Escherichia coli*

4.1.1 Selección de proteínas, diseño de constructo y cepas transformante

Se seleccionaron dos AMPs del salmón del Atlántico, cuyos estudios han demostrado que presentan múltiples propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras, por un lado, catelicidina 2 (Cat; Uniprot Q49TU5). Catelicidina aumenta la lisis de bacterias intracelulares como *Listeria monocytogenes*, y en especial catelicidina 2 se regula al alza durante los procesos infecciosos y presenta un potente rol inmunoestimulante (Duarte-Mata & Salinas-Carmona, 2023; Guerra et al., 2024). Por otra parte, se seleccionó hepcidina 1 (Hep; Uniprot B5X878). Hepcidina 1 se ha demostrado que se regula al alza durante la infección por *P. salmonis*, inhibiendo su crecimiento *in vitro*, y cumple un rol en la modulación del sistema inmune de los salmones favoreciendo las señales proinflamatorias (Álvarez et al., 2022; Asmamaw, 2016). La secuencia de ambos AMPs se modificaron mediante la adición de una secuencia ketosteroid isomerase (KSI) de *Pseudomonas putida* en el extremo N-terminal, la cual favorece la formación de IBs (Garcia Fruitós & Arís Giralt, 2022).

Una vez seleccionadas las secuencias, se evaluaron las características fisicoquímicas, incluyendo peso molecular (PM), índice alifático e índice de inestabilidad, mediante la herramienta ProtParam de Expasy (<https://www.expasy.org/>), también se determinó la solubilidad mediante DeepSoluE (<http://39.100.246.211:10505/DeepSoluE/result.html>). Adicionalmente, se seleccionó como la proteína fluorescente del infrarrojo cercano (iRFP) como control de IB no inmunogénico. Esta pertenece a nueva generación de proteínas fluorescentes, que tienen una alta demanda para técnicas de imagen de cuerpo entero, debido a la reducción de la autofluorescencia, la dispersión de baja luz (Filonov et al., 2011; Shcherbakova et al., 2015; Shcherbo et al., 2010). En comparación con proteínas similares a GFP de rojo lejano, la iRFP tiene una relación señal-fondo sustancialmente mayor en un modelo murino debido a sus espectros desplazados por el infrarrojo (Filonov et al., 2011; Shcherbakova et al., 2015; Shcherbo et al., 2010). En acuicultura se ha empleado para cuantificar el comportamiento alimentario de peces, y se ha empleado como control no inmunogenico de IBs (Torrealba, Seras-Franzoso, Mamat, Wilke, Villaverde, Roher, & Garcia-Fruitós, 2016; C. Zhou et al., 2017).

A todas las proteínas seleccionadas se les añadió una cola de seis histidinas (H6), otorgada por el C-terminal para su posterior identificación (His-tag). Las secuencias codificantes se

optimizaron para su expresión en *E. coli* y se sintetizaron en el plásmido pET-22b(+) (AmpR) (Novagen, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), el cual es inducible por Isopropil-beta-D-tiogalactósido (IPTG). Este proceso de optimización fue realizado por GenScript Biotech Corp (Hong Kong, China). Posteriormente, el plásmido se transformó en la cepa *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pLysS (CmR) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo el protocolo de la casa comercial. La transformación se verificó mediante PCR y los clones positivos se preservaron a -80°C en medio LB con glicerol al 12 %.

4.1.2 Cinética de producción de proteínas recombinantes

La producción de los IBs, se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Producción de Rumiantes del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA, España). Para ello, duplicados de un cultivo over night (ON) de la cepa transformada de *E. coli* se ajustó a una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) inicial de 0,05-0,1 en matraces de 2 L conteniendo 500 mL de medio Luria Bertani (LB) (Merck, Darmstadt, Germany) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina (VWR International LLC, Radnor, Pennsylvania, USA). Se incubó a 37°C con agitación constante a 250 rpm (Shaking incubator, BIOBASE, BJPX-200B). Se monitoreó la OD_{600} cada 30 minutos y, los cultivos se indujeron con 1 mM de IPTG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) cuando alcanzaron una $OD_{600} = 0,5$.

Se determinó la cinética de producción de las proteínas recombinantes solubles e IBs, para ello, se tomaron 25 mL de muestra durante la producción a 1, 3 y 5 h postinducción. Las células obtenidas en cada tiempo se recuperaron mediante centrifugación a 6.000 ×g, 15 min, 4°C y se resuspendieron en 500 µL de una solución estéril de PBS 1X (NaCl 137 mM (Merck, Darmstadt, Germany), KCl 2,7 mM (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), Na₂HPO₄ 10mM (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), KH₂PO₄ 1,8 mM (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania)) y phenylmethanesulfonyl fluoride 1 mM (PMSF, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany, Mannheim, Germany). Las muestras fueron sonicadas en dos rondas (1,30 min, 10 %) (Branson SFX550 Sonifier, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA), se centrifugó a 15.000 ×g, 15 min 4 °C y se separó la proteína soluble (sobrenadante) y los IBs (pellet). Ambas fracciones fueron analizadas por Western blot utilizando un anticuerpo anti-His-tag (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). Las señales obtenidas se cuantificaron mediante el software ImageJ v1.5 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), y se estimó la proporción relativa de cada fracción proteica en base a su intensidad de banda. Para cada tiempo, se consideró el 100 % como la suma de la señal de las fracciones soluble e insoluble. A partir de ello, el porcentaje de cada fracción se calculó como el cociente entre la intensidad de dicha fracción y el total de ambas, expresado como porcentaje (Apéndice 11.1).

Los gráficos de las proporciones proteicas en cada tiempo se hicieron en R (v. 2025.5.1.513; todas las librerías empleadas en esta tesis se encuentran en el Apéndice 11.1011.10)

4.1.3 Producción, purificación y cuantificación de los IBs

Para la producción de los IBs, cultivos ON de la cepa transformada de cultivaron bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente (OD_{600} inicial = 0,05, medio LB, 37°C, 250 rpm), se añadió IPTG 1mM cuando el cultivo alcanzó una OD_{600} = 0,5 y se continuó durante 3 h. Luego las células se recuperaron por centrifugación 6.000 ×g, 15 min, 4°C. El pellet de 1 L de producción se resuspendió en 600 mL de PBS 1X, y la ruptura celular se llevó a cabo con disruptor celular a 20 Kpsi (Constant system, KT1). Inmediatamente se añadió PMSF 1mM y lisozima 0,01 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), se incubó a 37°C, 2 h a 250 rpm. Se añadió triton X-100 al 4 % (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), durante 1 h a 250 rpm; en este punto se realizó un control de esterilidad en placas LB, y en caso de existir células viables, se llevaron a cabo ciclos de congelación y descongelación. Luego se añadió NP-40 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), y se incubó 1 h a 4 °C en agitación; se agregó DNasa I a 0,6 µg/mL (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) y $MgSO_4$ a 0,6 µg/mL (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) y se dejó actuar durante 1 h a 37°C, 250 rpm. El pellet fue recuperado por centrifugación a 6.000 ×g, 30 min, y se resuspendió en 100 mL de tampón de lisis (NaCl 0,1 M (Merck, Darmstadt, Germany), Tris 50mM (VRW chemicals), EDTA 1mM (Merck, Darmstadt, Germany), Triton X-100 0,5 %). Tras otro ciclo de centrifugación el pellet fue resuspendido en 10 mL de PBS 1X para el lavado final, y se recuperó por centrifugación a 15.000 ×g, 15 min, 4 °C, este se mantuvo a -80°C hasta su uso.

Finalmente, se determinó la integridad de los IBs mediante SDS-PAGE, y se cuantificaron por Western blot utilizando un anticuerpo anti-His-tag. La concentración de proteína se obtuvo mediante el software ImageJ, a partir de una curva estándar realizada con la fracción de la proteína recombinante soluble producida. Cabe destacar que esta técnica es semicuantitativa, por tanto, no refleja exactitud la concentración.

La proteína soluble se produjo bajo las mismas condiciones de los IBs. Para su purificación, los pellets de cultivos de 500 mL se resuspendieron en 120 mL de Tampón de Unión (20 mM Tris, 500 mM, NaCl, 20 mM Imidazol (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany)) y se lisaron utilizando un disruptor celular a 20 Kpsi (Constant system, KT1). El lisado se mantuvo en hielo y se añadió 1 mM de PMSF. El sobrenadante se recuperó por centrifugación a 15.000 ×g durante 45 min a 4 °C. Inmediatamente se añadieron $MgCl_2$ 0,6 mM y DNasa 0,6 mM, y la muestra se incubó durante 15 min a temperatura ambiente con agitación continua. Luego, se

filtró a través de una membrana PVDF de 0,22 μm (Whatman, Merck, Darmstadt, Germany) utilizando una bomba de vacío. Finalmente, la purificación se realizó mediante cromatografía líquida automatizada (AKTA™) usando una columna HisTrap™ HP de 1 mL (GE Healthcare AB, Uppsala, Sweden) a un caudal de 0,5 mL/min, integrada con el software Unicorn. Las fracciones recuperadas, correspondientes a la proteína se dializaron toda la noche en 2 L de ácido acético al 0,01 %. Se realizó una segunda diálisis durante 2 h en 2 L frescos de ácido acético al 0,01 %. La fracción soluble se recuperó por centrifugación a 15.000 $\times g$ a 4 °C, y el sobrenadante se recogió y almacenó a -80 °C. La cuantificación de esta fracción se realizó con un fluorómetro Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.1.4 Caracterización Microscópica

La estructura física de los IBs se analizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM, Zeiss, Oberkochen, Alemania), mediante un acuerdo de colaboración con el IRTA, España. Para ellos, las muestras se diluyeron en agua ultrapura (1:50) y se sometieron a baño ultrasónico durante 1 min. Posteriormente, se depositaron 10 μL en chips de silicio dejándolos secar al aire durante la noche a temperatura ambiente. Para la obtención de imágenes las muestras fueron metalizadas y observadas bajo voltaje de aceleración (EHT) 3,00 kV, distancia de trabajo (WD) 5,1 mm y aumentos acordes a la muestra (5.000 – 10.000 X).

Para el análisis morfométrico, se midieron al menos 200 partículas por muestra utilizando el software ImageJ. Los datos obtenidos se emplearon para generar gráficos de distribución de tamaño mediante R (v. 2025.5.1.513). La normalidad de la distribución de tamaños fue evaluada aplicando el test de Shapiro–Wilk ($\alpha = 0,05$).

4.1.5 Determinación de la resistencia de los IBs ante condiciones solubilizantes

Para evaluar la resistencia estructural y a la acción proteolítica sobre los IBs, se ajustaron a una $\text{OD}_{350} \approx 1.0$ en PBS 1X. Se incubaron con una batería de urea (0–8 M) (PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania), en agitación orbital constante de 100 rpm (Allsheng OS-200), a temperatura ambiente, se monitoreó la OD a las 3 y 24 h. Por otra parte, se determinó la resistencia a proteasas al ser incubados con proteinasa K a 6 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), a 37°C, acorde a las indicaciones del fabricante, se midió la OD cada 10-20 minutos. Una vez estabilizada la OD se añadieron 60 $\mu\text{g/mL}$ para digestión completa.

Empleando R (v. 2025.5.1.513) se aplicó el test no paramétrico de Kruskal–Wallis para determinar diferencia entre los grupos, además el Conover-Iman test en caso de obtener

diferencia estadísticamente significativa, el test de Wilcoxon se empleó para determinar si existía diferencia con el tratamiento de proteinasa K.

4.2 Objetivo 2: Analizar la capacidad de las proteínas nanoestructuradas para estimular el sistema inmune del salmón del Atlántico

4.2.1 Evaluación de la citotoxicidad de los AMPs en células RTS-11

Se determinó la citotoxicidad de los IBs en la línea celular RTS-11 (macrófagos y monocitos de trucha arcoíris) proporcionada por el Laboratorio de Inmunología de Peces del Instituto de Biología de la PUCV, con el fin de definir un rango de dosis que no afectara negativamente los modelos biológicos empleados en futuros experimentos. Para ello, las células se cultivaron en medio Leibovitz (L-15, Merck, Darmstadt, Germany), suplementado con 10 % Suero Fetal Bovino (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a una densidad de 1×10^6 células/pozo y se mantuvieron a 18°C durante 24 horas. Posteriormente, se probaron tres concentraciones de IBs (2, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$), el control negativo correspondió a PBS 1X. Tras 6 y 24 h de exposición, la viabilidad celular se evaluó mediante tinción con azul de tripano 0,4 % (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y conteo en cámara de Neubauer por triplicado.

Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis para determinar diferencias significativas entre la viabilidad celular a las concentraciones evaluadas a las 6 y 24 h, empleando R (v. 2025.5.1.513).

4.2.2 Determinación de la capacidad de las células RTS-11 para fagocitar los AMPs

Se comprobó que los IBs pueden ser fagocitados por las células RTS-11 mediante ensayos de inmunofluorescencia y citometría de flujo. Para visualizar los IBs, se marcaron con Atto 488-NHS éster (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) a una proporción molar 1:2 (proteína: marcador fluorescente) siguiendo las instrucciones del fabricante. En ambos ensayos, se estimularon células RTS-11 en medio L-15 suplementado con FBS al 2 % a una densidad de 5×10^5 células/pozo, con 20 $\mu\text{g/mL}$ de Cat o Hep, durante 4 h, el control negativo correspondió a PBS 1X; se consideró triplicado de cada tratamiento.

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células se lavaron tres veces con PBS 1X y se fijaron con paraformaldehído al 4 % (PFA, Merck, Darmstadt, Germany) durante 15 min a -20°C. Posteriormente, se lavó nuevamente con PBS 1X, se dejó secar y se añadió solución de bloqueo (0,3 % triton X-100, 3 % BSA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en

PBS 1X), luego de 1 h se lavó con PBS 1X y finalmente el núcleo celular se tiñó con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durante 3 min. Las muestras se montaron con medio de montaje Fluoromount-G™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y se observaron mediante microscopía de epifluorescencia (Leica) acoplado al software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (Leica, Wetzlar, Alemania).

Para el análisis por citometría de flujo, tras la incubación con los cuerpos de inclusión, se recuperaron tanto las células no adherentes como las adherentes. Las células no adherentes se recolectaron retirando el medio de cultivo, mientras que las adherentes se trataron con 25 µL de tripsina (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). La suspensión celular se centrifugó a 200 ×g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se añadió 500 µL de tripsina diluida previamente en PBS 1X hasta una concentración final de 1 mg/mL. A continuación, se incorporó 1 mL de medio L-15 suplementado con 2 % de FBS, se centrifugó nuevamente a 200 ×g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Finalmente, las células se resuspendieron en 300 µL de PBS 1X. Las mediciones, para determinar el porcentaje de células fluorescentes positivas (marcadas con Atto-488), se realizaron utilizando un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Brea, USA.), acoplado al software CytExpert 1.2.

Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis para determinar diferencias significativas entre el control y cada uno de los AMPs marcados con Atto detectados en las células RTS-11. Se empleó el Conover Test como prueba posterior en caso de existir diferencia significativa entre los grupos ($p < 0,05$), esta prueba utiliza la distribución t de Student en lugar de la distribución normal, lo que proporciona mayor precisión en comparaciones por pares, cuando el número de muestras es pequeño. Todos los análisis se realizaron con el software R (v. 2025.5.1.513).

4.2.3 Evaluación de la capacidad de los AMPs para modular el sistema inmune en células RTS-11

Para evaluar si los IBs podían modular respuestas inmunitarias, células RTS-11, se cultivaron en medio L-15 suplementado con FBS al 10 %, a una densidad de 1×10^6 células/pozo, y mantenidas a 18 °C durante 24 h. Luego fueron estimuladas con diferentes concentraciones de IBs (5, 10 y 20 µg/mL), se empleó como control positivo LPS 10 µg/mL, iRFP 10 µg/mL como control de IBs, y PBS 1X como control negativo; se consideró cada tratamiento por triplicado. Tras 12 h de estimulación, se evaluó la expresión génica de los marcadores inmunológicos proinflamatorios: *tnf-α*, *il-1-β*, *iNOS*, e *il-8* asociados a la activación de la

respuesta inmune innata y al reclutamiento de células efectoras, y del marcador antiinflamatorio *il-10*, mediante qPCR.

4.2.3.1 Evaluación temporal del efecto de los AMPs para modular el sistema inmune en células RTS-11

Para comprobar si hay una tendencia temporal a la respuesta inmunitaria mediada por los IBs, células RTS-11, se cultivaron en medio L-15 suplementado con FBS al 10 %, a una densidad de 1×10^6 células/pozo, y mantenidas a 18 °C durante 24 h. Luego fueron estimuladas con la 10 µg/mL de Cat o Hep, por ser la dosis intermedia. Como control positivo se empleó LPS 10 µg/mL, iRFP 10 µg/mL como control de IB, y PBS 1X como control negativo; se consideró cada tratamiento por triplicado. Tras 4, 12 y 24 h de estimulación, se evaluó la expresión génica de los marcadores inmunológicos *tnf-α*, *il-1-β*, *il-10*, e *iNOS*, mediante qPCR.

4.2.4 Análisis de expresión de genes del sistema inmune por qPCR

Con el fin de analizar el efecto inmunomodulador de los cuerpos de inclusión sobre las células RTS-11, se evaluó la expresión de genes representativos de la respuesta inmune mediante qPCR. El ARN total de las células fue extraído usando TRI Reagent™ Solution (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) según las indicaciones del fabricante. Las células no adherentes (monocitos) se recuperaron del medio de cultivo por centrifugación a $3.500 \times g$, 5 min, a 4 °C y luego se añadieron al pozo con células adherentes (macrófagos) que contenía TRI Reagent. La concentración de ARN se midió con NanoDrop™ device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La integridad de las bandas 18S y 28S del rRNA se evaluó en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con SBYR-safe DNA gel stain (Invitrogen). La síntesis de ADNc se realizó con 250 ng de ARN total empleando para ello RevertAid kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, la qPCR se llevó a cabo con SYBR Green (KAPA SYBR® FAST, Merck, Darmstadt, Germany) en el termociclador de PCR en tiempo real AriaMX (Agilent), por duplicado. La expresión de los genes se normalizó con el gen constitutivo factor de elongación 1 alfa (*ef1α*), el cual ha demostrado ser estable entre individuos, entre tejidos como bazo y riñón, y leucocitos, incluso durante procesos infecciosos, y fue validado empleando el gen de referencia β-actina reportado en la publicación derivada de este trabajo (Ingerslev et al., 2006; Olsvik et al., 2005; Talbot et al., 2021; Torrealba et al., 2024). El resultado final fue calculado como la expresión relativa, calculada por el método del Livak (Livak & Schmittgen, 2001) (Apéndice 11.2 y 11.3).

Para todos los ensayos de expresión génica, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis para determinar diferencias significativas entre los grupos, y se empleó el Conover Test como prueba posterior en caso de existir diferencia significativa entre los grupos ($p < 0,05$), empleando el software R (v. 2025.5.1.513).

4.2.5 Evaluación de la respuesta inmune mediada por los AMPs en el salmón del Atlántico

Este ensayo se llevó a cabo en las instalaciones de TEKbios (Puerto Montt, Chile), durante septiembre del 2023, bajo la aprobación de comité de bioética y bioseguridad de la PUCV (BIOEPUCV-BA648-2023). Se utilizaron 240 peces de salmón del Atlántico (*S. salar*, cepa FANAD, proporcionada por Camanchaca) un peso promedio de $167,55 \pm 40,33$ g, distribuidos en estanques por duplicado ($n = 40$ peces por estanque, densidad: 13 ± 3 kg/m³) para cada uno de los tratamientos (Cat y Hep), el control negativo correspondió a PBS (HyClone, Cytiva), y el control de IB no inmunogénico correspondió a iRFP. Los peces se aclimataron durante dos semanas en agua salada a una temperatura de 11 ± 1 °C, oxígeno $9,5 \pm 1$ mg/L, se mantuvieron en sistema a flujo abierto, con 24 h luz y se alimentaron diariamente al 1 % de su peso corporal con un alimento comercial sin inmunoestimulantes (Orbit Intro). Los animales se anestesiaron antes de cada proceso de manipulación (AQUÍ-S; 25 mL/100 mL de agua) y la eutanasia se realizó mediante sobredosis de anestesia.

Los peces anestesiados recibieron una única dosis de 300 µL de IBs (Cat o Hep) a 5 mg/kg, por vía intraperitoneal, 300 µL de PBS, o 300 µL de iRFP a 5 mg/kg. Diez peces al azar fueron sacrificados a las 0, 6, 12 y 24 h postratamiento, y se extirpó el riñón anterior, el cual fue conservado en RNAlater a -20 °C, para el análisis de expresión de los genes inmunológicos: *il-8*, *il-1 β* , *tnf- α* e *il-10*. Paralelamente, en cada tiempo se extrajeron muestras de sangre, que fueron centrifugadas a 1.000 $\times$ g por 10 min para la obtención de suero, el cual fue analizado por ELISA para la cuantificación de la proteína TNF- α .

Para el análisis de expresión génica, se empleó 3 mm de tamaño del tejido, los cuales se homogeneizaron en 700 µL TRI Reagent™ Solution, con 3 esferas de metal de 2,4 mm (Bead media Omnia International), en dos a tres ciclos de 35 seg a 5,5 m/s (Fast Prep-24 MP Biomedicals, Irvine, California, USA), los tejidos se dejaron enfriar en hielo entre cada ciclo. El tejido homogeneizado se traspasó a un tubo eppendorf nuevo y se continuó con el método descrito en el punto 4.2.4.

La cuantificación de TNF- α por ELISA se realizó en el laboratorio de Inmunología de Peces, del Instituto de Biología de la PUCV. Para ello se realizó una cuantificación de proteínas totales

con el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Luego 15 ng/μL se bloqueó con BSA al 5 % en PBS, las placas se incubaron durante 90 min a 37 °C con 40 ng/ μL del anti-epítipo de TNF, y luego, durante 60 min con 1:20000 de anticuerpo comercial anti-cabra IgG-HRP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Después de los lavados, las placas se incubaron durante 30 min con TMB (Life Technologies, USA) y se midió con un lector ELISA a 450 nm (Versa max, microplate reader). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los análisis estadísticos, se hicieron empleando el software R (v. 2025.5.1.513). Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis para determinar diferencias significativas entre los grupos, y se empleó el Conover Test como prueba posterior en caso de existir diferencia significativa entre los grupos ($p < 0,05$).

4.2.6 Evaluación de la biodistribución de IBst a órganos del sistema inmune en el salmón del Atlántico

Este ensayo se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Acuicultura Sustentable (CIAS-PUCV), durante junio 2025. Para este estudio, los peces se mantuvieron en un sistema de recirculación acuícola que constaba de nueve estanques, cada uno con un volumen útil de 500 L, una tasa de recambio de agua de 1,8 veces por hora (1,8 r/h) y una densidad de cultivo final de 17 kg/m³. Los peces fueron alimentados diariamente con una ración correspondiente al 1 % de su peso corporal con un alimento comercial.

Para determinar si los IBs se distribuyen hacia órganos linfoides, se utilizaron 18 ejemplares de salmón del Atlántico smoltificado de un peso promedio de 180 ± 2 g, provenientes de un centro de cultivo en la Región de Los Lagos. A cada pez se le administró, por vía intraperitoneal, una dosis de 300 μL de catelicidina a 4 mg/kg, previamente marcada con Atto 488. Se realizaron muestreos a las 24, 48 y 72 h posinyección, recolectando bazo y riñón anterior. Los órganos fueron lavados con PBS 1X, y las células fueron disgregadas mediante un tamiz celular de 100 μm. Posteriormente, se ajustó el volumen final a 4 mL utilizando medio L-15 suplementado con 2 % de FBS y 7 mM de EDTA. Para realizar un choque osmótico, se añadieron 36 mL de agua ultrapura durante 15 segundos, seguido de la adición de 4 mL de PBS 10X, y se incubó la mezcla en hielo durante 10 minutos. Luego, las muestras se filtraron nuevamente a través de un tamiz celular, y las células fueron recuperadas por centrifugación a $600 \times g$ durante 7 minutos a 12 °C. El pellet celular se resuspendió en 5 mL de medio L-15 suplementado con 2 % de FBS. Finalmente, las suspensiones celulares fueron analizadas por

citometría de flujo, en la cual, se determinó como P1 la población de células mieloides (monocitos, macrófagos, y otros granulocitos).

Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis para determinar diferencias significativas entre los grupos, y se empleó el Conover Test como prueba posterior en caso de existir diferencia significativa entre los grupos ($p < 0,05$), empleando el software R (v. 2025.5.1.513),

4.3 Objetivo 3. Evaluar la eficacia de las proteínas nanoestructuradas para el control de *P. salmonis* y su potencial para ser administradas por vía oral.

4.3.1 Evaluación de la eficacia de los AMPs para modular las respuestas inmunológicas de *P. salmonis* en células RTS-11

Este experimento tuvo como propósito determinar si los IBs podían conferir un efecto profiláctico y regular la respuesta inmune de las células RTS-11 durante una infección *in vitro* con *P. salmonis*. Para ello, una densidad celular de 1×10^6 de la línea RTS-11, en medio L-15 suplementado con FBS al 10 % se estimularon con Cat a 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 4 h a 18°C. Posteriormente las células fueron infectadas con 1×10^6 de *P. salmonis* LF-89 (MOI 1) durante 24 h a 18°C, se consideraron los siguientes controles: sólo catelicidina, PBS 1X, y *P. salmonis* sin tratamiento. Una vez transcurrido el tiempo de infección, las células fueron recuperadas, para el análisis de expresión de los genes *tnf- α* , interferón gamma (*ifn- γ*), *il-10*, *il-12*, e *iNOS*.

Con el fin de determinar si la exposición repetida al inmunoestimulante podía potenciar o restaurar la respuesta inmune tras la infección, se realizó una segunda estimulación con Cat a 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 4 h posinfección. Esta estrategia permitió evaluar si los IBs no sólo inducen un efecto profiláctico, sino también si son capaces de reforzar la activación inmunitaria una vez que las células han sido desafiadas por el patógeno.

Por otra parte, se analizó la respuesta inmunogénica de las células SHK-1 (riñón anterior de salmón del Atlántico) en ADL Diagnostic Chile. Debido a la importancia de la diversidad celular en la evaluación de las respuestas inmunitarias. Mientras que, RTS-11 es una línea celular de monocitos y macrófaga derivada del bazo de trucha arcoíris, la SHK-1 se deriva de leucocitos renales de cabeza de salmón atlántico que exhiben características similares a macrófagos. Por ende, pueden presentar diferencias en los niveles relativos de expresión de ciertos genes proinflamatorios, incluyendo *il1- β* , *il-8* e *il-6*, que suelen ser mayor en la línea celular RTS-11, debido a que la abundancia de macrófagos, se relaciona con mayor disponibilidad de receptores de membrana. Si bien, en los ensayos para evaluar inmunoestimulantes lo idóneo es validar los resultados obtenidos de líneas celulares, con cultivos primarios, la línea SHK-1

al ser derivada de riñón de salmón del atlántico, puede brindar una perspectiva aproximada del modelo de estudio (Salinas-Parra et al., 2025).

Para evaluar la respuesta inmunogénica en células SHK-1, una densidad celular de 1×10^5 , en medio L-15 suplementado con FBS al 2 % fueron tratadas con 20 $\mu\text{g/mL}$ de Hep o Cat durante 24 h a 18°C , y luego infectadas con *P. salmonis* (MOI 10) por 24 h adicionales. Se incluyó el control iRFP a 10 $\mu\text{g/mL}$ y el control negativo PBS 1X. Finalmente, se analizó la expresión génica de *tnf- α* , *il-1 β* , *il-10*, *il-8* e *iNOS*.

4.3.2 Evaluación de la eficacia de los AMPs para el control de *P. salmonis*

Se evaluó la eficacia de los AMPs al ser añadidos directamente sobre *P. salmonis*. Para ello, cultivos frescos de *P. salmonis* LF-89 se ajustaron a una OD_{600} de 1×10^8 , en solución ringer (B.Braun, Chile), y se añadieron los IBs diferentes concentraciones (0,1, 1, 5, 10, y 20 μM). Se consideró como control iRFP a 10 $\mu\text{g/mL}$ y como control negativo solución ringer, cada tratamiento se hizo por triplicado. Se incubó a 18°C y se midió OD_{600} a las 6 y 24 h. Finalmente, se calculó el porcentaje de supervivencia bacteriana, calculando la razón entre el tratamiento y el control (Apéndice 11.4).

4.3.3 Determinación de la estabilidad de los AMPs

Como parte de la caracterización de los IBs, y para prospectar su potencial uso como fármacos orales, se evaluó la estabilidad de Cat bajo las siguientes condiciones:

Temperatura: se evaluó la resistencia térmica incubando los IBs a 1 mg/mL en PBS 1X, a 100°C (Labnet, AccuBlock, Digital Bry Bath) durante 30 minutos.

pH: los IBs se resuspendieron en PBS 1X pH 2,5 (HCl, Fermont, México, pH metro Orion Star A111, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durante 3 h, 4°C con agitación orbital constante de 100 rpm, se recuperaron por centrifugación a $10.000 \times g$, 5 min, y se incubaron en PBS 1X pH 8 (NaOH, Bioquímica.Cl, Chile) durante 6 h, 4°C . El control correspondió a PBS 1X pH 7 en las mismas condiciones.

Liofilización: los IBs se liofilizaron (Telstar, Lyo Quest) bajo las siguientes condiciones: Congelación: -80°C durante 24 h. Secado primario: A presión reducida (0,1–0,01 mbar) y temperatura de -50°C durante 48 h. Secado secundario: Incremento gradual a 25°C durante 12 h para eliminar trazas de agua.

La funcionalidad de los AMPs sometidos a estas condiciones, se evaluó en células RTS-11 (1×10^6 células/mL), tratadas con 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h a 18°C. Como marcadores de respuesta inmune, se analizó la expresión de los genes *il-8* e *il-10* mediante qPCR.

5. Resultados

5.1 Objetivo 1: Producir y caracterizar proteínas nanoestructuradas de salmón del Atlántico con potencial inmunoestimulante en *Escherichia coli*

5.1.1 Selección de proteínas, diseño de constructo y cepas transformante

Se seleccionó Cat y Hep, como potenciales proteínas moduladoras del sistema inmune, a las cuales se adicionó una secuencia KSI, para promover la formación de IBs (Garcia Fruitós & Arís Giralt, 2022). Se fusionó a la secuencia de los AMPs mediante un linker (GGGSGGS), seguidos inmediatamente de la secuencia His.tag (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Orden de los constructos y secuencias aminoacídicas de los componentes para la expresión de Cat y Hep en forma de proteínas nanoestructurada.

Orden de las secuencias	KSI – Linker – [Hep/Cat] – His-tag
KSI	NTPEHMTAVVQRYVAALNAGDLGIVALFADDAT VEDPVGSEPRSGTAAIREFYANSLKLPLAVELTQ EVRAVANEAAFAFTVSFEYQGRKTVVAPIDHFRF NGAGKVVSMRALFGEKNIHAGAS
Linker	GGGSGGS
Hep	QSHLSLCRWCCNCCHNKGCGFCKKF
Cat	QKIRTRRGKPSGGSRGSKMGSKDSKGGWRGRP GSGSRPGFGSSIAGASGRDQGGTRNA
His-tag	HHHHHH

La fusión de Cat (PM teórico: 5,846 kDa) y Hep (PM teórico: 2,881 kDa) con la secuencia KSI modificó sus propiedades fisicoquímicas. Estos cambios incluyeron el peso molecular, la estabilidad, la hidrofobicidad y el índice alifático (Tabla 5.2). La secuencia KSI aporta un PM de 13,35 kDa, por lo que Cat tuvo un PM final de 20,46471 kDa y Hep de 17,4997 kDa. Además, se observó una notable mejora en la estabilidad, con reducciones en el índice de inestabilidad desde 46,20 a 29,95 en el caso de Cat y desde 77,52 a 31,99 para Hep, valores que se consideran estables. El índice alifático incrementó de 18,62 a 60,82 para Cat y de 31,220 a 71,29 para Hep. La hidrofobicidad (GRAVY) impactó más a Cat, que pasó de -1,378 considerado como hidrofílico a -0,478 (hidrofóbico) y en Hep de 0,028 a -0,103. Ambas proteínas mostraron una alta probabilidad de insolubilidad cuando se incluyó la secuencia KSI (Cat: 0,1643; Hep: 0,1305), en contraste, en ausencia de esta secuencia, la predicción indicó una mayor tendencia a la solubilidad (Cat: 0,7832; Hep: 0,5442). La proteína control iRFP tuvo

un PM teórico de 35,4 kDa, índice de inestabilidad 47,74, índice alifático de 97,92 y un valor GRAVY de -0,031

Tabla 5.2. Comparación de parámetros fisicoquímicos de Cat y Hep respecto a la fusión con la secuencia KSI.

Propiedad	Cat	Cat-KSI	Hep	Hep-KSI	iRFP
Peso molecular (kDa)	5,846	20,46471	2,881	17,4997	35,4
Punto isoeléctrico (pI)	12,31	10,12	8,53	6,88	5,96
Aminoácidos con carga negativa (Asp + Glu)	2	17	0	15	38
Aminoácidos con carga positiva (Arg + Lys)	14	25	3	14	29
Índice de inestabilidad	46,20	29,95	77,52	31,99	47,74
Índice alifático	18,62	60,82	31,220	71,29	97,92
GRAVY (hidrofobicidad)	-1,378	-0,478	0,028	-0,103	-0,031
Probabilidad de insolubilidad (0–1)	0,7832	0,1643	0,5442	0,1305	0,8846

5.1.2 Cinética de producción de proteínas recombinantes

Se determinó la proporción de la fracción proteica soluble e IBs, ambas fracciones producidas en matraces Erlenmeyer, y colectadas a las 1, 3 y 5 h postinducción, considerando como 100 % de producción la cantidad total obtenida en cada tiempo de muestreo (

Figura 5). En el caso de Cat, la distribución de ambas fracciones proteicas, a 1 h postinducción, fue aproximadamente equitativa, y la proporción en IBs incrementó progresivamente representando el 75,5 % a las 5 h. Hep mostró una tendencia inicial similar, con distribución equilibrada a 1 h y un 76,4 % en IBs a las 5 h, aunque a las 3 h la fracción insoluble representó el 84,8 % del total de la producción, sugiriendo variabilidad en la dinámica de agregación según la proteína.

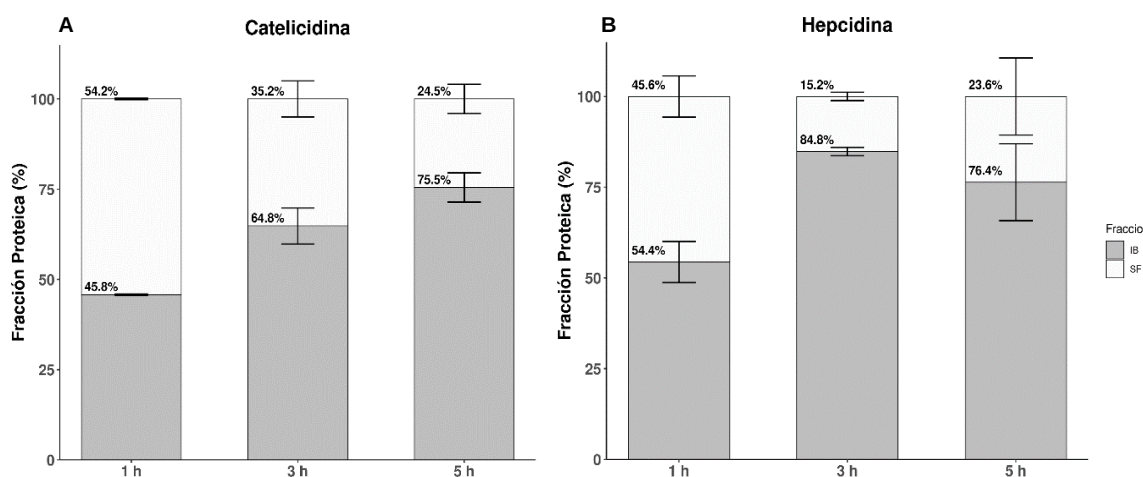


Figura 5. Cinética de producción de proteína soluble (blanco), e IBs (gris), para (A) Cat y (B) Hep, fracciones colectadas a las 1, 3 y 5 h postinducción.

5.1.3 Producción, purificación y cuantificación de los IBs

Los IBs producidos durante 3 h se cuantificaron mediante western blot, empleando una curva de proteína soluble (Cat), previamente purificada y cuantificada. A las 3 h, la cuantificación total de Cat fue de 42 mg/L en la fracción soluble y 84 mg/L en los IBs, mientras que para Hep, la fracción soluble contenía 2,08 mg/L y la fracción de IBs 36 mg/mL.

5.1.4 Caracterización Microscópica

Los IBs obtenidos a las 3 h postinducción se analizaron mediante FESEM (Figura 6). Morfológicamente, presentaron una superficie rugosa con forma redondeada u ovalada. Cat mostró una mayor tendencia a la compactación, formando estructuras aglutinadas con apariencia pegajosa. El tamaño promedio de los IBs de Cat fue de 0,329 μm (SD = 0,107), y la prueba de Shapiro-Wilk indicó una distribución no normal ($p = 0,0023$). En contraste, los IBs de Hep aparecieron menos compactos en comparación con los de Cat, aunque con una morfología general similar. El tamaño promedio de partícula para Hep fue de 0,484 μm (SD = 0,122), y presentaron una distribución normal (Shapiro-Wilk $p = 0,3934$). Cabe destacar que, en ningún caso, fue posible confirmar la presencia de IBs completamente individuales, en su lugar, se observó una clara tendencia a la agregación, formando conglomerados de partículas más grandes.

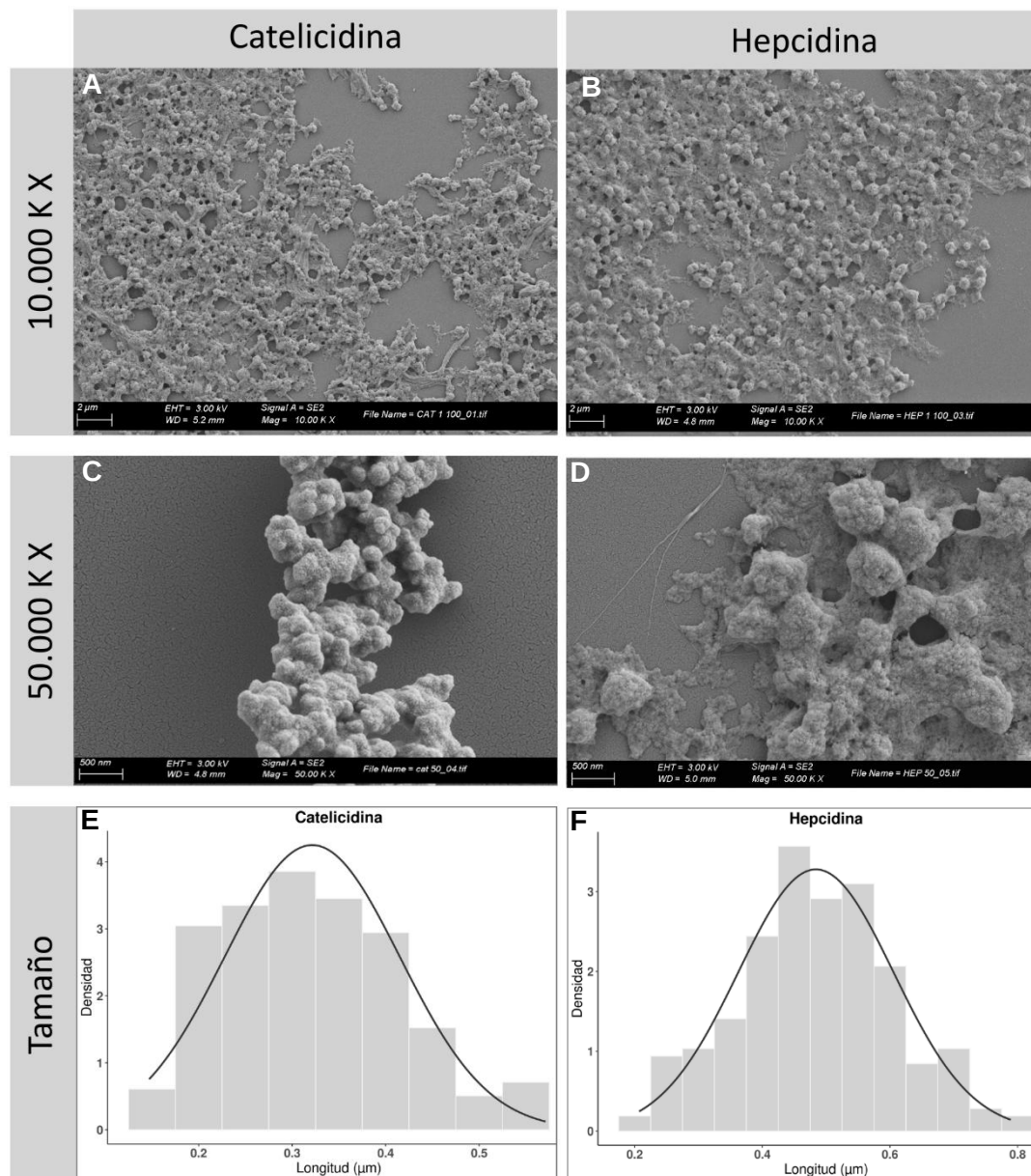


Figura 6. Microscopía por FESEM a 10,000 KX de (A) Cat y (B) Hep producidos en matraz a 37 °C, 250 rpm. Imágenes FESEM a 50,000 KX muestran en detalle la morfología de agregados individuales de Cat (C) y Hep (D). Distribución de tamaño de (E) Cat y (F) Hep.

5.1.5 Determinación de la resistencia de los IBs ante condiciones solubilizantes

Se determinó la resistencia de los IBs de Cat y Hep ante agentes caotrópicos, para ello se expusieron a una batería de urea (0-8 M), y se determinó la turbidez mediante absorbancia a 350 nm a las 3 y 24 h, se incluyó iRFP como control de IBs. El análisis post hoc de Conover, reveló que la concentración de urea solubiliza significativamente los IBs. Para Cat, se observaron diferencias significativas entre concentraciones bajas (0 M, 2 M, 3 M) y altas (5 M, 6 M, 7 M, 8 M), destacando una mejora progresiva en la solubilidad a medida que aumenta la concentración (Figura 7 A). En particular, la solubilidad a 8 M fue significativamente mayor (p

$< 0,001$), y no se observaron diferencias significativas entre algunas concentraciones intermedias (4 y 6 M). Estos resultados indican que para los IBs de Cat, la urea tiene un efecto dependiente de la concentración, aunque la solubilidad es más evidente a concentraciones superiores a 4 M.

Para Hep se observaron diferencias significativas únicamente a 8 M ($p < 0,05$), sin diferencias claras entre las demás concentraciones (Figura 7 B). Esto que sugiere que Hep es más resistente que Cat. Por su parte, iRFP, utilizada como control de IBs, también respondió a la urea con un patrón significativo en varias comparaciones intermedias, entre 3 y 5 M ($p < 0,01$), aunque es más claro después de los 7 M (Figura 7 C). A pesar de no se observó un patrón definido y único para todos los IBs, los porcentajes de solubilidad alcanzados fueron similares, aproximadamente 20 % a las 24 h con urea 8 M, mientras que a las 3 h se obtuvo un promedio de solubilización del 57 %. Tras aplicar el test de Wilcoxon para evaluar el impacto del tiempo en la solubilidad, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. No obstante, se observa una tendencia que sugiere que el tiempo podría favorecer la solubilización de los IBs.

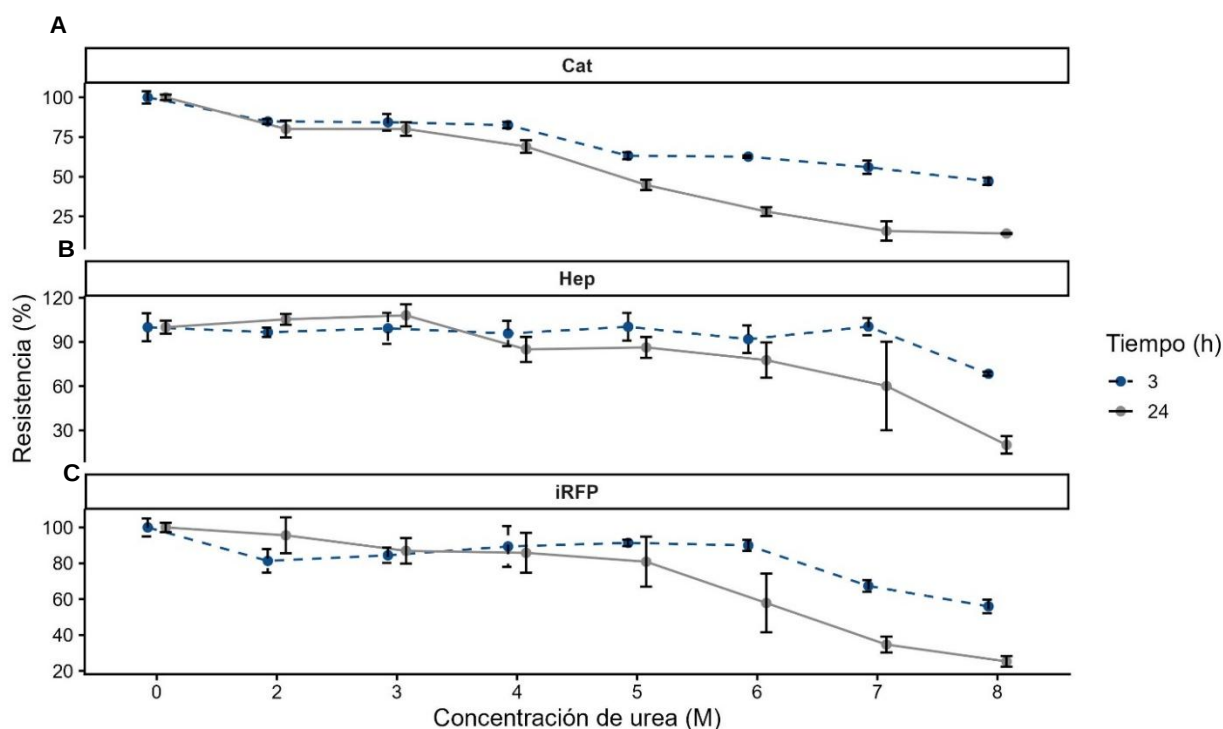


Figura 7. Resistencia de (A) Cat, (B) Hep y (C) iRFP, expuestos a urea (0-8 M), durante 3 y 24 h.

Para determinar la resistencia de los IBs a la acción proteolítica, estos fueron expuestos a proteinasa K a 6 $\mu\text{g/mL}$, y una vez estabilizada la OD 350nm, se incrementó la concentración final a 60 $\mu\text{g/mL}$. En este ensayo, los IBs de Cat resultaron más resistentes a la digestión enzimática, ya que fue significativa a partir de los 180 minutos ($p < 0,001$), coincidiendo con el

aumento de la concentración (Figura 8 A). A los 240 min, alcanzó un 65 % de digestión total (35 % de IBs remanentes), sin diferencias significativas entre 180 y 240 min, lo que indica que la digestión se concentró en los minutos posteriores al aumento en la concentración.

Por otro lado, Hep presentó una digestión significativa a la menor concentración de proteinasa K, observándose diferencias significativas a los 100 minutos ($p < 0,01$). Posteriormente, tras el aumento en la concentración de la enzima, no se observaron diferencias marcadas respecto al nivel de digestión alcanzado en los primeros 100 minutos (Figura 8 B). A los 240 minutos, se observó un 71 % de digestión total, o 29 % de IBs remanentes. Al comparar con la proteína control iRFP, se observó una digestión progresiva desde los primeros 100 minutos ($p < 0,001$), alcanzando una primera digestión máxima a los 140 minutos ($p < 0,01$) (Figura 8 C). Luego del aumento en la concentración, se detectaron nuevas diferencias significativas desde los 160 minutos ($p < 0,01$), indicando una digestión continua hasta los 240 minutos. El porcentaje final de IBs remanentes fue cercano al 35 %, similar al observado para Cat. Aunque las cinéticas de digestión fueron diferentes, los tres IBs alcanzaron porcentajes similares de digestión total (aprox. 65 %).

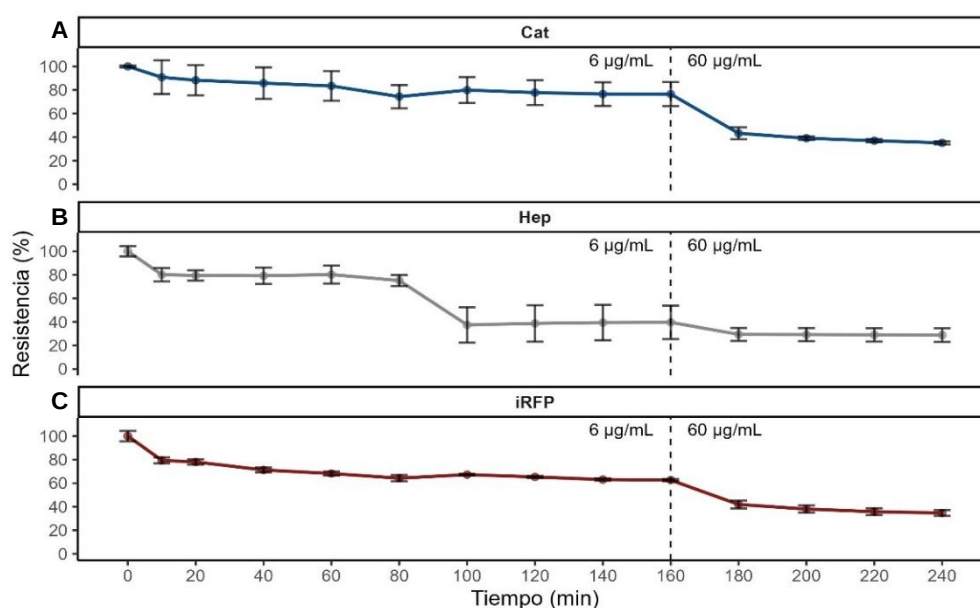


Figura 8. Resistencia de (A) Cat, (B) Hep y (C) iRFP, expuestos a proteinasa K durante 240 min a concentraciones de 6 y 60 µg/mL.

5.2 Objetivo 2: Analizar la capacidad de las proteínas nanoestructuradas para estimular el sistema inmune del salmón del Atlántico

Una vez obtenidos y caracterizados los AMPs en forma de IBs, se procedió a evaluar su capacidad inmunoestimulante mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Para ello, previamente se demostró que los IBs no eran tóxicos a nivel celular, y que además, pueden interactuar directamente con las células mediante ensayos de fagocitosis.

5.2.1 Evaluación de la citotoxicidad de los AMPs en células RTS-11

Se evaluó la citotoxicidad de los AMPs, así como del iRFP, mediante el ensayo de viabilidad celular con azul de tripán en células RTS-11. Las células fueron expuestas a concentraciones de 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$ de cada IB durante 6 y 24 h. En todos los casos, las células mantuvieron una viabilidad celular superior al 90 % (Figura 9), demostrando baja citotoxicidad en este modelo celular. El análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis, reveló que no existen diferencias significativas entre los grupos tratados ($p > 0,05$).

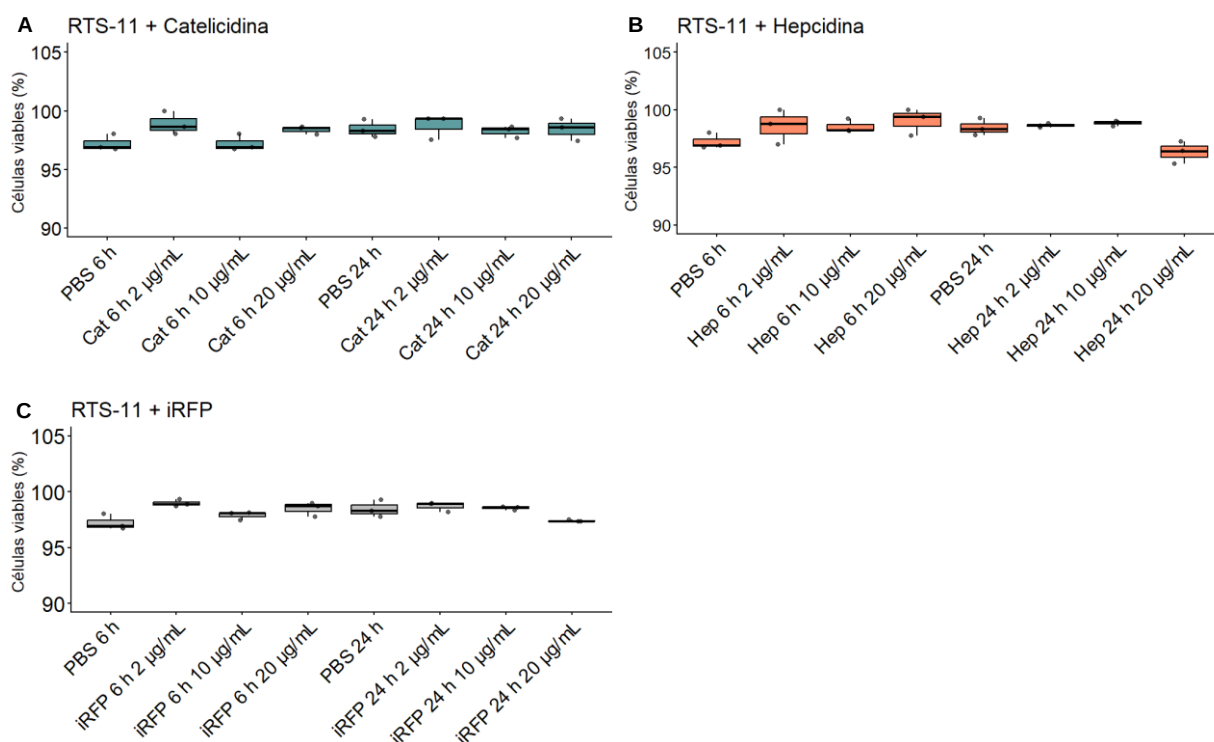


Figura 9. Viabilidad celular de RTS-11 expuesta a (A) Cat, (B) Hep y (C) iRFP, en un rango de concentraciones (2, 10, y 20 $\mu\text{g/mL}$), a las 6 y 24 h postratamiento.

5.2.2 Determinación de la capacidad de las células RTS-11 para fagocitar los AMPs

Para evaluar la capacidad de internalización de los IBs por parte de células del sistema inmune, se realizaron ensayos de fagocitosis en la línea celular RTS-11. Las células fueron expuestas durante 4 h a 20 $\mu\text{g/mL}$ de Cat o Hep previamente marcados con el fluoróforo Atto 488. La localización intracelular de los IBs se visualizó por microscopía de fluorescencia, y mediante citometría de flujo se cuantificó la proporción de células fagocíticas. Las imágenes microscópicas (Figura 10) mostraron que ambos péptidos fluorescentes se localizaban predominantemente en el citoplasma adyacente al núcleo, lo que sugiere una eficiente internalización celular.

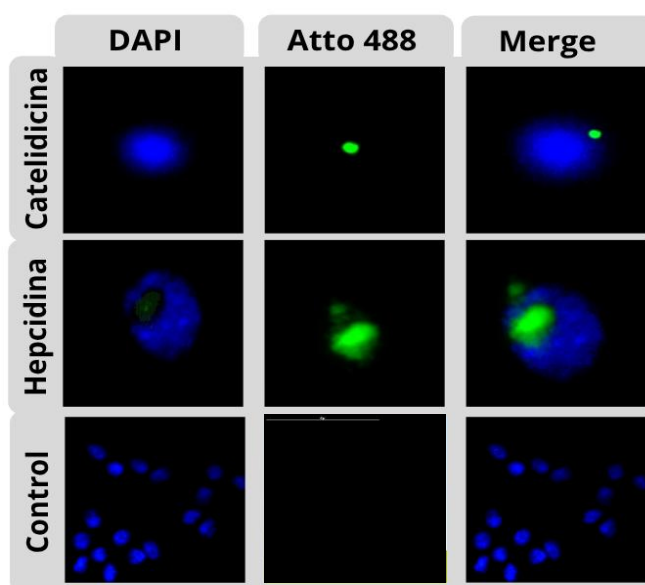


Figura 10. Inmunofluorescencia de células RTS-11 tratadas con 20 $\mu\text{g/mL}$ de Cat y Hep durante 4 h. Control: sin tratamiento. Núcleos teñidos con DAPI (azul) e IBs teñidos con Atto 488 (verde), merge: composición de la imagen.

Los resultados descritos anteriormente, se confirmaron mediante citometría de flujo (Figura 11 y Apéndice 11.5). Cat mostró un porcentaje de fagocitosis del 68,5 %, mientras que Hep alcanzó apenas un 11,2 % bajo las mismas condiciones. El análisis estadístico, confirmó diferencias significativas de ambos AMPs ($p < 0,05$) tanto frente al control sin tratamiento, como entre los tratamientos ($p = 0,0156$). Estos resultados indican que Cat es significativamente más susceptible a la fagocitosis por macrófagos que Hep.

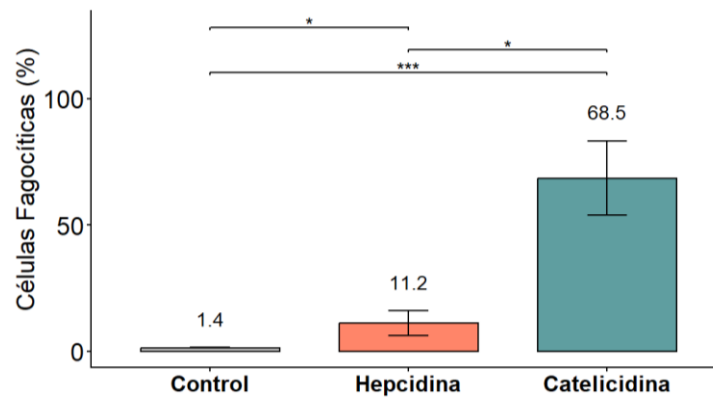


Figura 11. Porcentaje de células RTS-11 fagocíticas tratadas con 20 µg/mL de Cat y Hep durante 4 h. Control: PBS 1X. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

5.2.3 Evaluación de la capacidad de los AMPs para modular el sistema inmune en células RTS-11

Se evaluó la expresión de los genes *il-8*, *il-10*, *tnf-α*, *iNOS* e *il-1β*, en células RTS-11 tratadas con Cat y Hep a concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL durante 12 h. Se incluyeron PBS (control negativo), LPS (control positivo) e iRFP (control de IBs). El tratamiento con Cat produjo diferencias significativas para todos los genes evaluados, a excepción de *iNOS* ($p = 0,08$). Para este AMP la expresión de *il-1β* fue significativamente mayor con 20 µg/mL de Cat ($p = 0,021$), mostrando diferencia significativa respecto a 10 µg/mL ($p = 0,044$), pero no a 5 µg/mL (Figura 12 A). Mientras que la expresión del gen *tnf-α*, se ve regulada significativamente a la baja a 10 µg/mL ($p = 0,0002$), aunque las concentraciones de 5 y 20 µg/mL no presentaron cambios significativos respecto al control (Figura 12 B). La expresión de gen *il-8*, fue significativa al alza para las concentraciones 5 y 20 µg/mL ($p < 0,05$) (Figura 12 C). Por su parte, el gen *il-10* presentó un incremento significativo en su expresión a 20 µg/mL ($p = 0,003$), la cual fue estadísticamente superior respecto a 10 µg/mL ($p = 0,0004$), aunque sin diferencia respecto a 5 µg/mL (Figura 12 D). El gen *iNOS* presentó una tendencia general a la disminución para todas las dosis, sin alcanzar significancia estadística (Figura 12 E). Estos resultados indican que la concentración 20 µg/mL de Cat promueve la sobreexpresión de *il-8*, *il-10* e *il-1β*, mientras que la concentración de 10 µg/mL disminuye la expresión de *tnf-α*. No se observó una respuesta incremental estricta respecto a la dosis, ya que 5 y 20 µg/mL no presentaron diferencias significativas en ningún caso.

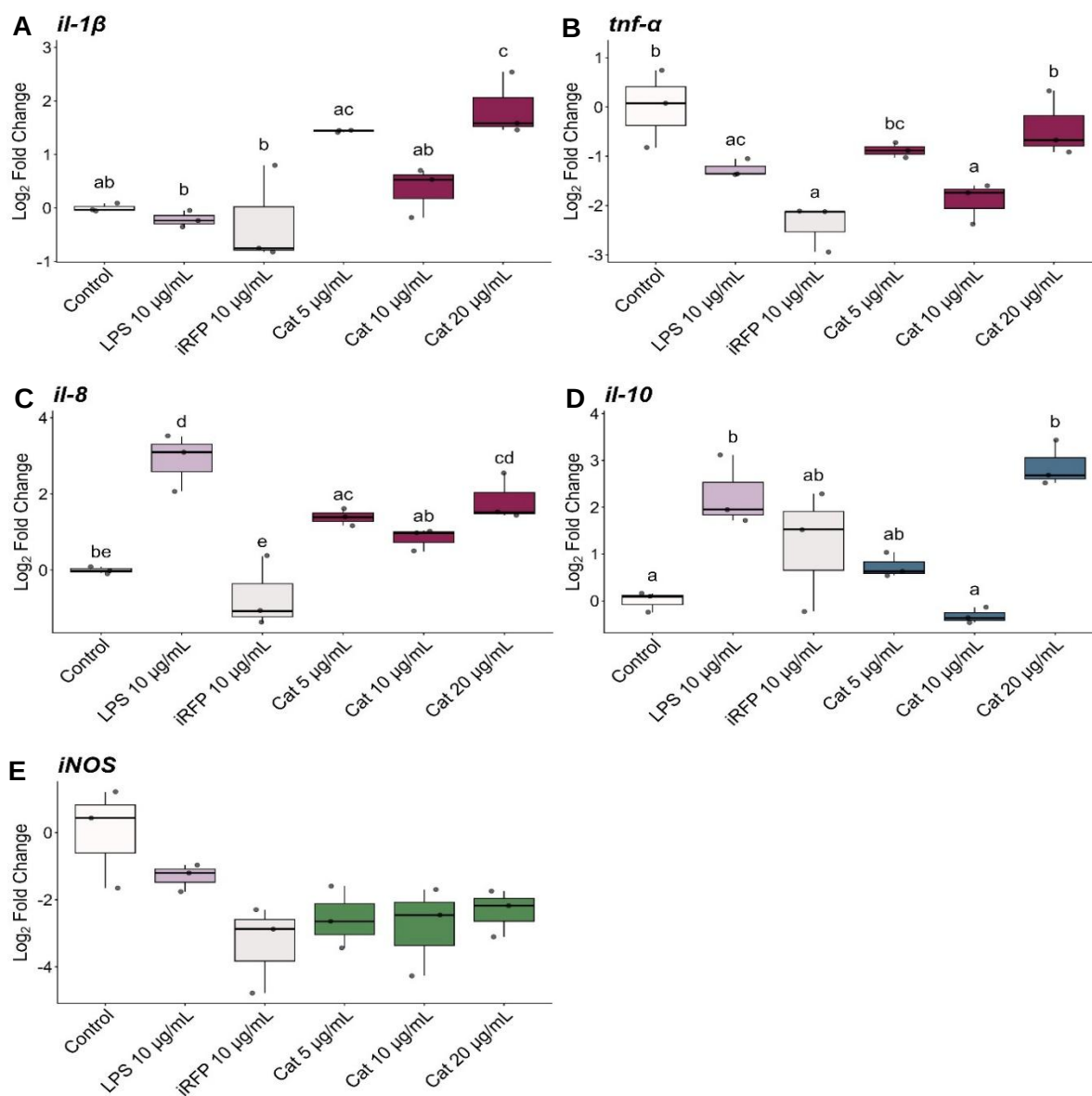


Figura 12. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con catellicidina Cat (5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$) durante 12 h. Genes evaluados: (A) *il-1β*, (B) *tnf-α*, (C) *il-8*, (D) *il-10* (E) *iNOS*. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

En cuanto a Hep, se evidenciaron diferencias significativas en la expresión génica de *il-8*, *tnf-α* e *iNOS* ($p < 0,05$), y ninguna concentración indujo cambios significativos en la expresión del gen *il-10* ni *il-1β* respecto al control (Figura 13 A y D). No obstante, el gen *il-8*, mostró una expresión significativa al alza en células tratadas con 5 y 20 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Figura 13 C). Mientras que, la expresión de *tnf-α* presentó una tendencia a disminuir con dosis 5-20 $\mu\text{g/mL}$, pero solo la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ mostró una diferencia significativa respecto al control ($p = 0,0060$) (Figura 13 B). La expresión de *iNOS*, disminuyó significativamente a 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0133$), aunque este efecto también se observó con iRFP, que también difirió

significativamente del control ($p = 0,0177$) lo que indica que podría no estar asociado directamente a la acción de Hep (Figura 13 E).

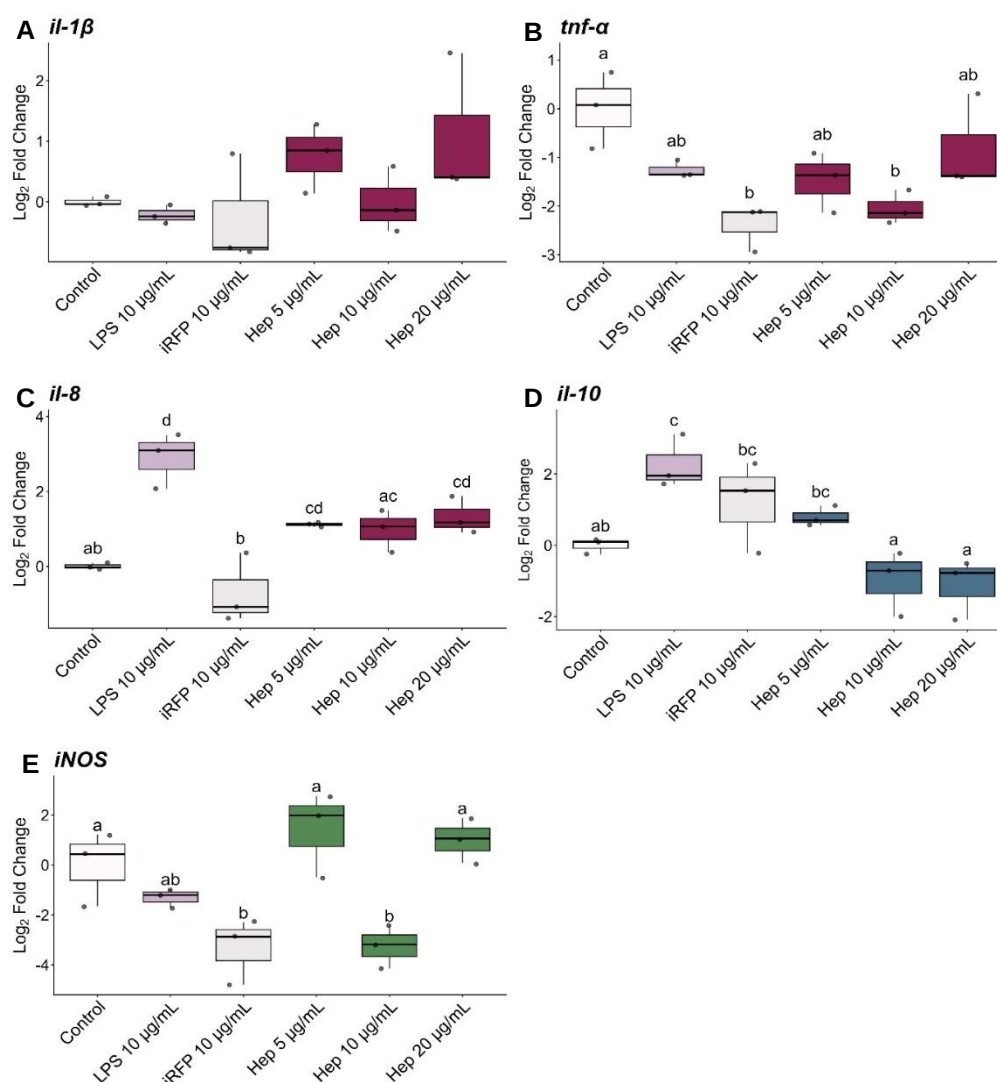


Figura 13. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con Hep (5, 10 y 20 µg/mL) durante 12 h. Genes evaluados: (A) *il-1β*, (B) *tnf-α*, (C) *il-8*, (D) *il-10* (E) *iNOS*. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

5.2.3.1 Evaluación temporal del efecto de los AMPs para modular el sistema inmune en células RTS-11

Con el objetivo de entender la dinámica temporal de la expresión génica, células RTS-11 fueron tratadas con las dosis intermedia 10 µg/mL de cada AMP durante 4, 12 y 24 h, y se evaluó la cinética de expresión de los genes evaluados anteriormente, asociados a la respuesta inmune, *il-10*, *tnf-α*, *iNOS*, e *il-1β*. Cat mostró diferencias temporales significativas (Kruskal-Wallis test $p < 0,05$), para los genes *tnf-α*, e *iNOS* (Figura 14). La expresión del gen

iNOS, disminuyó significativamente a las 12 h, respecto de las 4 y 24 h ($p = 0,009$ y $p = 0,035$ respectivamente), pese a esta diferencia temporal, no se evidenció diferencia respecto al control en ningún tiempo evaluado (Figura 14 C). La expresión del gen *tnf- α* (Figura 14 B), difirió significativamente al alza entre las 12 y las 24 h ($p < 0,0001$), aunque no del control a ninguno de los tiempos evaluados. Para el gen *il-10*, no se observó diferencia temporal significativa (Figura 14 D), y aunque el gen *il-1 β* no presentó cambios significativos entre los tiempos, se observó una tendencia al aumento de la expresión a las 24 h (Figura 14 A).

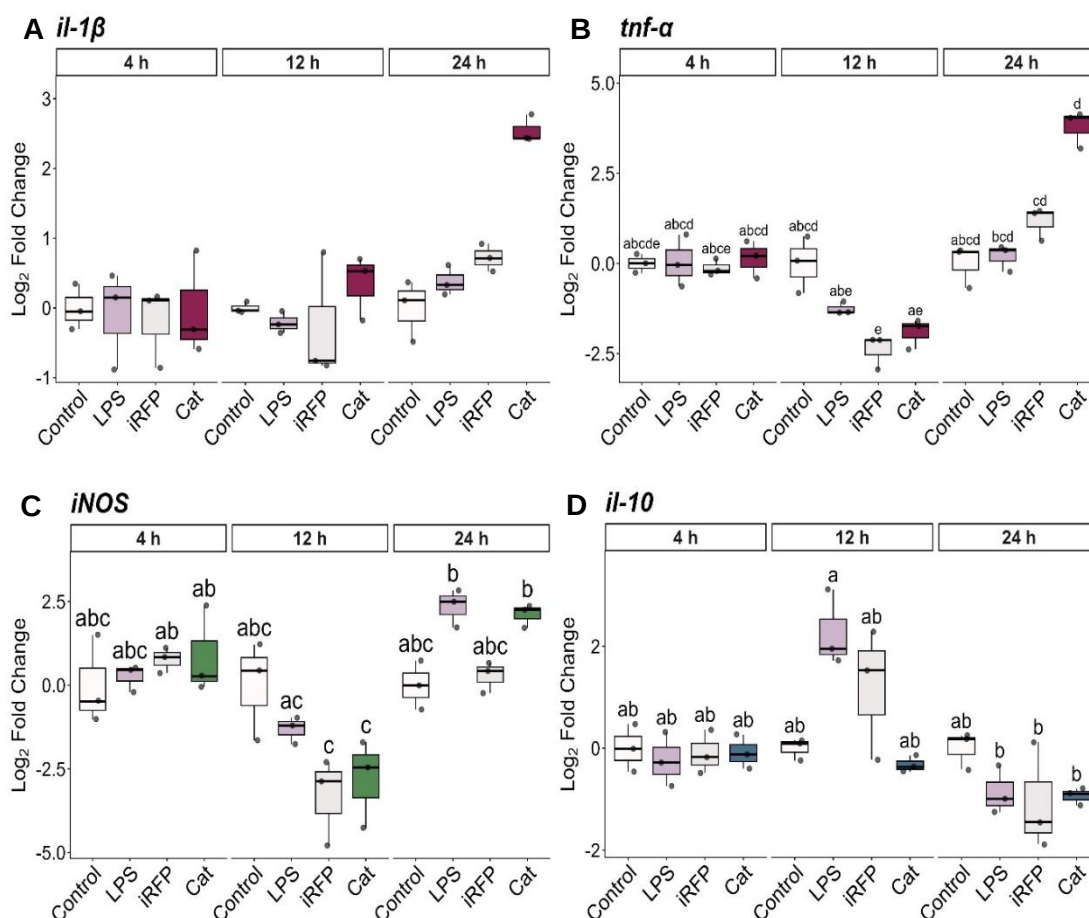


Figura 14. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con Cat a 10 µg/mL durante 4, 12 y 24 h. Genes evaluados: (A) *il-1 β* , (B) *tnf- α* , (C) *iNOS*, (D) *il-10*. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

Por su parte el tratamiento con Hep, disminuyó significativamente la expresión el gen *tnf- α* a las 12 h respecto de las 4 y 24 h ($p = 0,007$) (Figura 15 B). A pesar de que los genes *iNOS* e *il-1 β* no arrojaron diferencia significativa en los tiempos evaluados (Figura 15 A y D), se observó una tendencia en la disminución de la expresión de *iNOS* a las 12 h (Figura 15 C), mientras que la expresión del gen *il-1 β* se mantiene casi constante hasta las 24 h, tiempo en

el cual tiende a incrementar su expresión. El gen *il-10* no presentó cambios significativos en su expresión entre los tiempos (Figura 15 E).

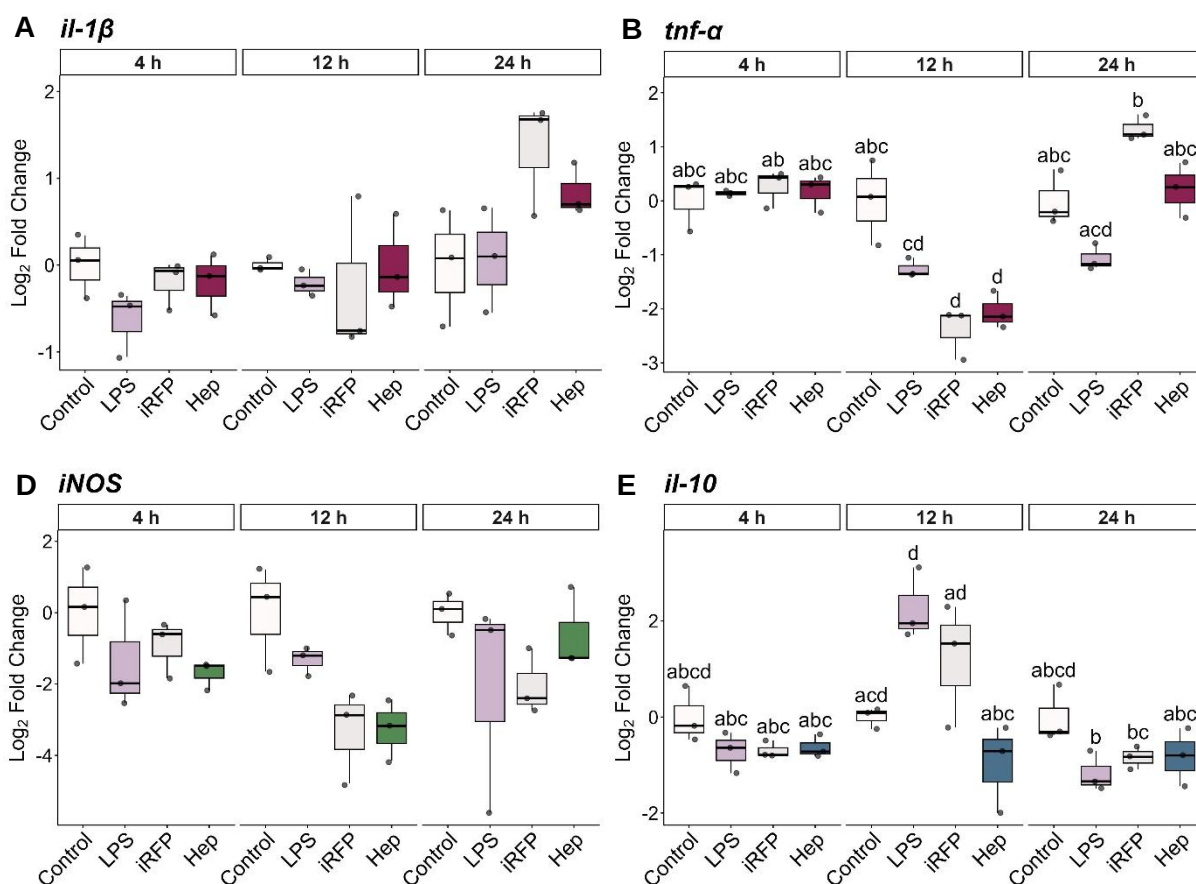


Figura 15. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con Hep a 10 μ g/mL durante 4, 12 y 24 h. Genes evaluados: (A) *il-1β*, (B) *tnf-α*, (C) *iNOS*, (D) *il-10*. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

También, se evaluó la expresión de los genes *il-6* y *cox-2*, ambos indicadores de respuestas inflamatorias del sistema inmune innato, a las 4 y 24 h tras el tratamiento con 10 μ g/mL de AMPs. Las células tratadas con Cat presentaron una disminución de la expresión de *il-6* a las 24 h respecto al control ($p = 0,03$), sin diferencia temporal de la expresión (Figura 16 A), aunque este hecho también se observó en célula tratadas con iRFP. Este AMP, tendió a incrementar la expresión del gen *cox-2* a las 24 h, sin diferencia temporal de la expresión (Figura 16 B). Por el contrario, Hep no indujo ningún cambio significativo en los genes *il-6* y *cox-2* (Figura 16 C y D).

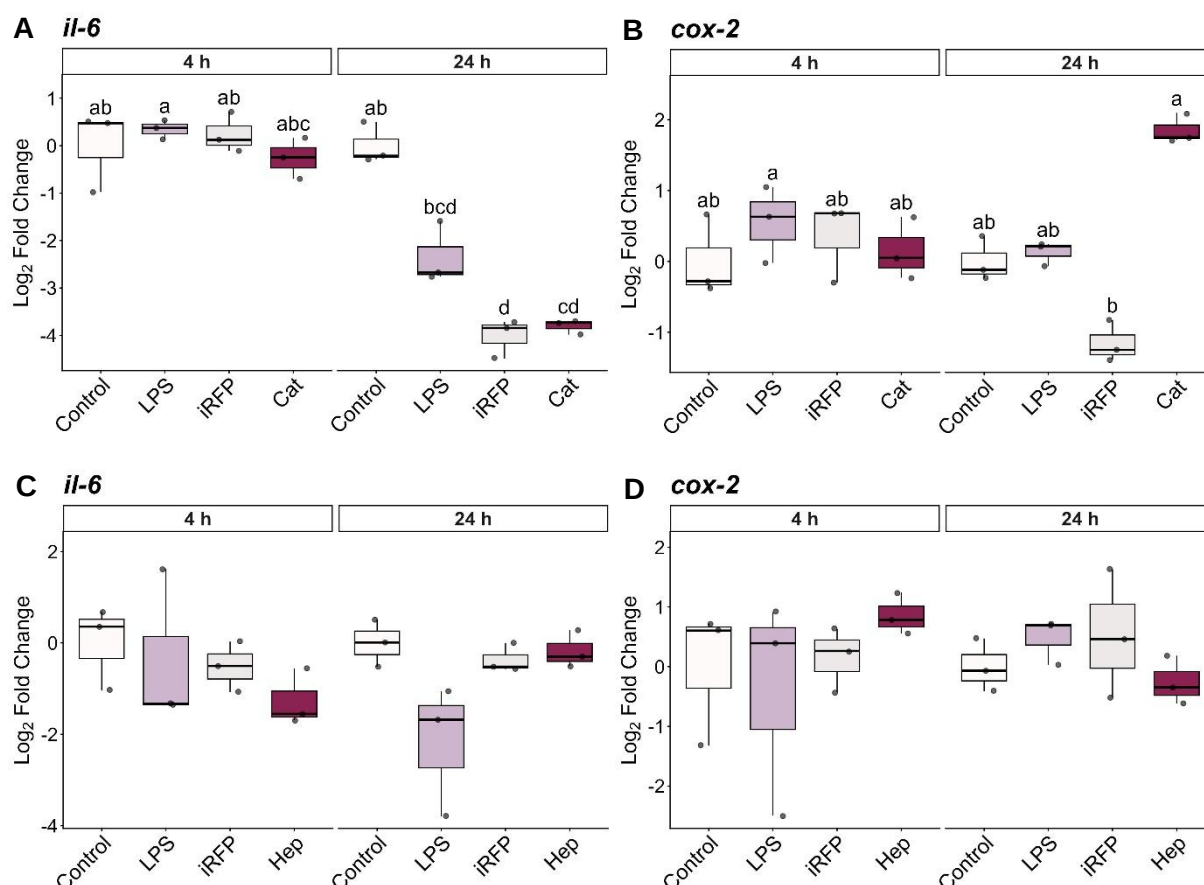


Figura 16. Expresión relativa de los genes *il-6* y *cox-2*, en células RTS-11 tratadas con Cat (A y B) y Hep (C y D) a 10 µg/mL durante 4 y 24 h. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

5.2.4 Evaluación de la respuesta inmune mediada por los AMPs en el salmón del Atlántico

El ensayo *in vivo* con *S. salar* se realizó utilizando estanques individuales por duplicado para cada tratamiento (Cat y Hep), además del control negativo (PBS) y el control no inmunogénico (iRFP). No se obtuvieron resultados para el tratamiento con iRFP debido a la mortalidad total registrada en los estanques de este grupo. La proteína iRFP se utiliza ampliamente en biología como marcador fluorescente no tóxico, por lo que se desconocen los motivos que provocaron el deceso de los peces, podría asociarse a una contaminación provenientes de agentes externos al iRFP.

5.2.4.1 Análisis de expresión génica

Peces tratados con 5 mg/kg de Cat o Hep mostraron una modulación en la expresión de los genes proinflamatorios *il-1β*, *il-8*, y el gen antiinflamatorio *il-10* en riñón anterior, con variaciones dependientes tanto del tiempo como del tratamiento. En el caso de Cat, el gen *il-*

1β (Figura 17 A) incrementó significativamente su expresión a las 6 h ($p = 0,03$) y disminuyó significativamente a las 24 h ($p = 0,004$). Mientras que, el gen *il-8* presentó una expresión al alza significativa a las 12 h respecto al control 0 h ($p = 0,005$), aunque sin diferencias frente al control PBS (Figura 17 C). Los genes *tnf-α* e *il-10*, no mostraron diferencia significativa en sus niveles de expresión (Figura 17 B y D)

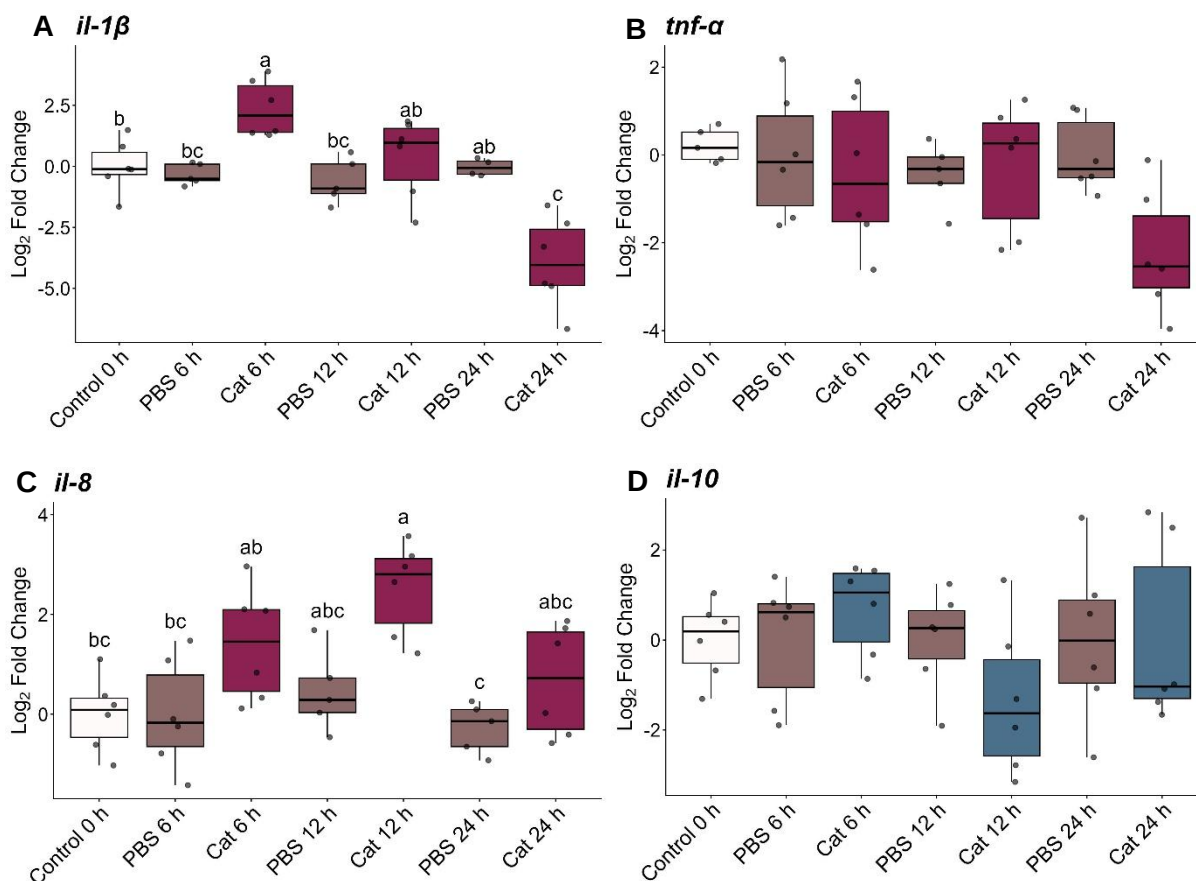


Figura 17 Expresión génica relativa del riñón anterior de salmón del Atlántico tratados con Cat 5 mg/kg durante 6, 12 y 24 h. Genes evaluados: (A) *il-1β*, (B) *tnf-α*, (C) *il-8*, (D) *il-10*. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

El tratamiento con Hep indujo significativamente la expresión del gen *il-1β* a las 12 h respecto a los controles de 0 h y PBS ($p < 0,005$) (Figura 18 A), mientras que a las 24 h se observó una disminución significativa de la expresión de este gen ($p < 0,005$). El gen *il-8* se expresó significativamente al alza a las 12 h ($p = 0,004$) respecto al control 0 h, pero no se observó una diferencia significativa respecto a PBS (Figura 18 C). Para el gen *il-10*, se observó una diferencia temporal de la expresión entre las 12 h y las 24 h ($p = 0,012$), pero el tratamiento no indujo la respuesta significativa en la expresión respecto a la condición inicial, ni respecto al control PBS (Figura 18 D). La expresión de *tnf-α* no presentó diferencias estadísticamente

significativas temporales o en su expresión respecto al grupo control, aunque se observó una tendencia a la baja a las 24 h (Figura 18 B).

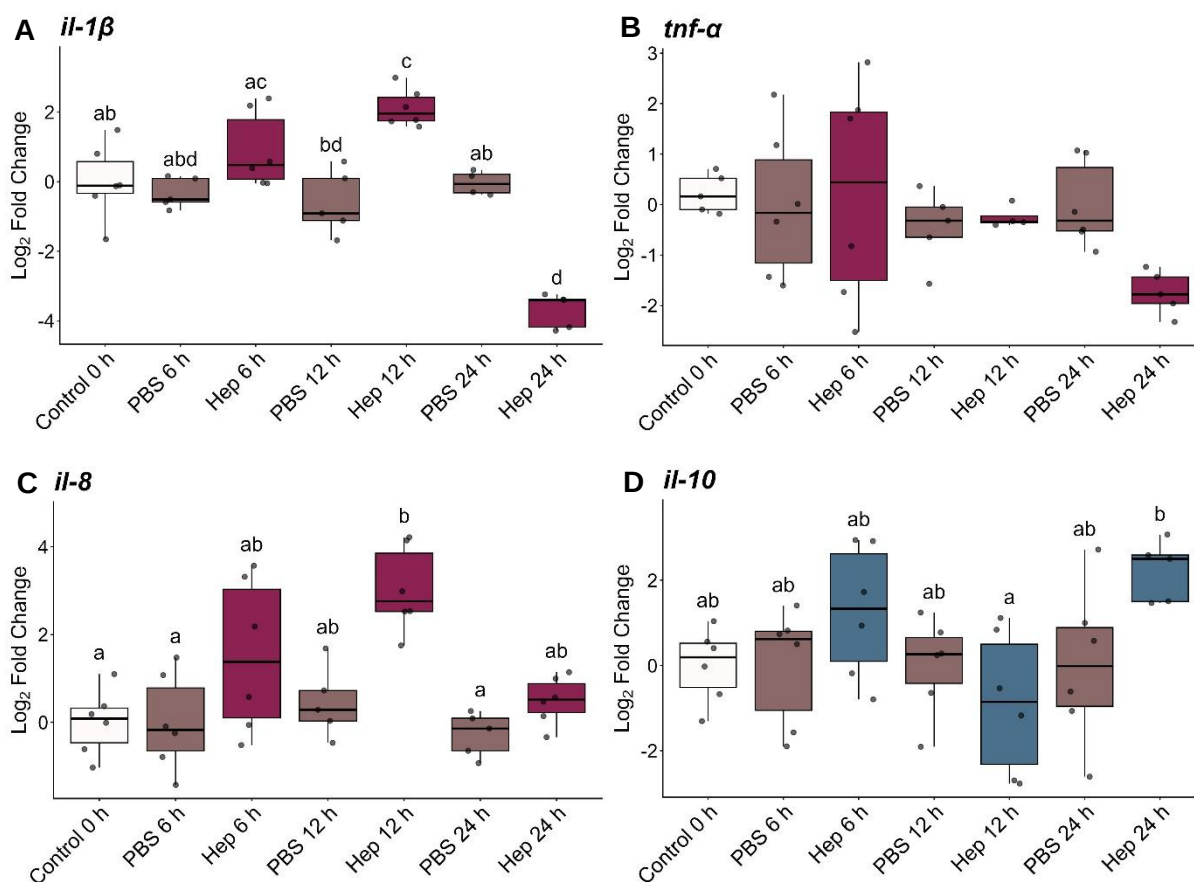


Figura 18. Expresión génica relativa del riñón anterior de salmón del Atlántico tratados con Hep a 5 mg/kg durante 6, 12 y 24 h. Genes evaluados: (A) *il-1β*, (B) *tnf-α*, (C) *il-8*, (D) *il-10*. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

5.2.4.2 Cuantificación de TNF-α en plasma

Se determinó la concentración de la proteína TNF-α en plasma, como marcador inflamatorio funcional (circulando en sangre) y no sólo transcripcional, en diferentes tiempos (6, 12 y 24 h), en peces tratados con Cat y Hep. El tratamiento con Cat no se presentó diferencias significativas frente al control PBS en ningún tiempo evaluado. Sin embargo, se detectó un incremento significativo en los niveles de TNF-α en los peces tratados a las 12 y 24 h, respecto a los peces control 0 h ($p < 0,05$) (Figura 19 A). En peces tratados con Hep, no se encontraron diferencias significativas respecto a los controles 0 h o PBS en los tiempos evaluados, sólo fue posible determinar, una disminución temporal entre las 6 y 12 h ($p = 0,039$) (Figura 19 B)

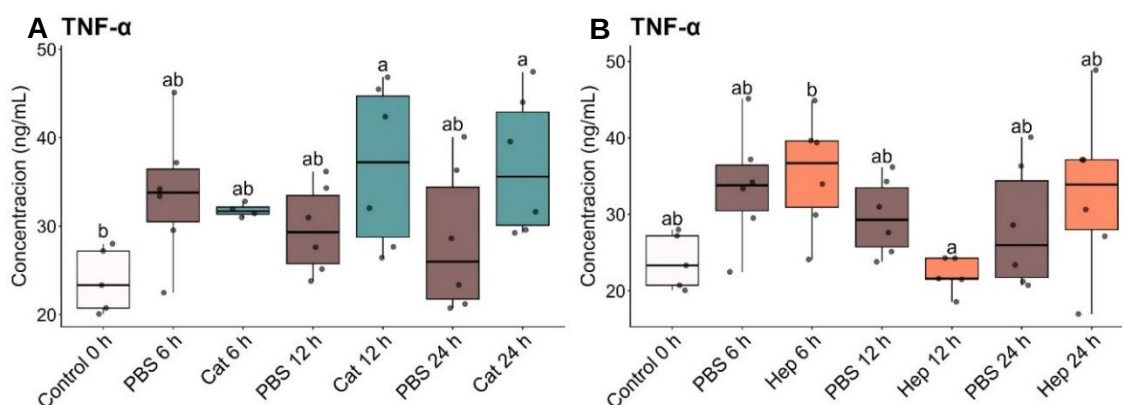


Figura 19. Concentración en plasma de TNF- α de salmón del Atlántico tratados con (A) Cat y (B) Hep a 5 mg/kg durante 6, 12 y 24 h. Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

5.2.5 Evaluación de la biodistribución de IBst a órganos del sistema inmune en el salmón del Atlántico

Dado que Cat, presentó una mayor fagocitosis en los ensayos *in vitro* con células RTS-11, se evaluó la biodistribución de esta proteína nanoestructurada previamente marcada con Atto 488, a órganos linfoides (riñón anterior y bazo) de salmón del Atlántico, tras su administración intraperitoneal, mediante citometría de flujo. Se registraron más de 100.000 eventos por muestra en cada uno de los tiempos de muestreo 24, 48 y 72 h posinyección. Se obtuvo un porcentaje promedio de células mieloides de $15,5 \% \pm 6,14 \%$ en el bazo y de $43,92 \% \pm 7,18 \%$ en el riñón anterior.

En el riñón anterior, la proporción de células fluorescentes fue significativamente mayor respecto al control ($p < 0,05$), con un máximo a las 24 h (5,8 %) (Figura 20 A). En contraste, en el bazo se observó una tendencia opuesta, registrando el máximo a las 72 h (21,7 %), el cual fue significativamente mayor respecto al control ($p < 0,05$) (Figura 20 B). Este valor también representó la única diferencia en el análisis comparativo entre ambos órganos ($p = 0,0044$) (Figura 20 C).

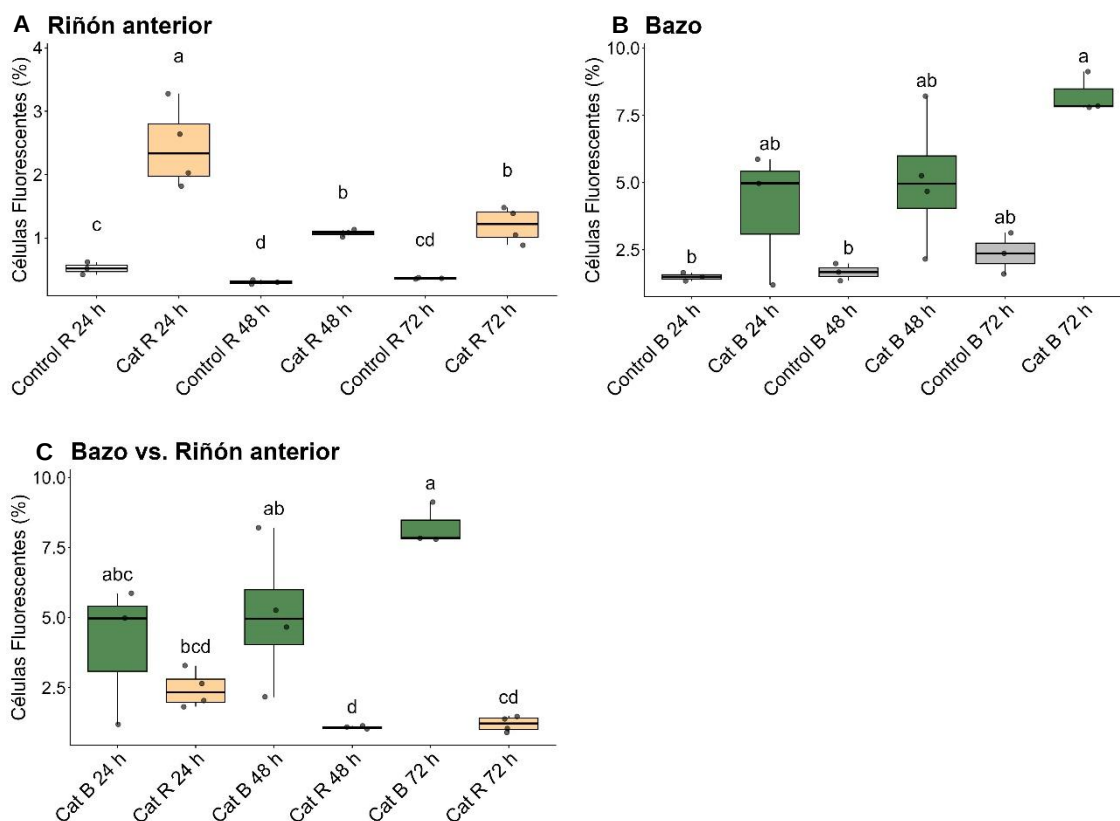


Figura 20. Biodistribución de Cat a riñón anterior (A) y bazo (B) de salmón del Atlántico a 24, 48 y 72 h. Control = PBS 1X. (C) Riñón anterior vs. Bazo. Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

5.3 Objetivo 3. Evaluar la eficacia de las proteínas nanoestructuradas para el control de *P. salmonis* y su potencial para ser administradas por vía oral.

5.3.1 Evaluación de la eficacia de los AMPs para modular las respuestas inmunológicas de *P. salmonis* en células RTS-11

Con el fin de evaluar el efecto inmunomodulador de Cat frente a un modelo de infección *in vitro* con *P. salmonis*, se aplicó una dosis de 20 $\mu\text{g/mL}$ a células RTS-11 durante 4 h, la cual en ensayos previos estimuló los genes *il-8*, *il-10* e *il-1 β* . Posteriormente estas células fueron infectadas con *P. salmonis* (MOI 1). Se analizó la expresión de genes relevantes en la respuesta inmunitaria a esta bacteria como *ifn- γ* , *il-12*, *il-10*, *tnf- α* e *iNOS*. A pesar de que se reguló al alza la expresión de los genes *tnf- α* , *il-10* e *iNOS*, en ningún caso se observó diferencias significativas entre las células infectadas con o sin tratamiento (Figura 21 A, D y E). Los genes *ifn- γ* e *il-12* no mostraron cambios significativos entre ninguno de los grupos (Figura 21 B y C).

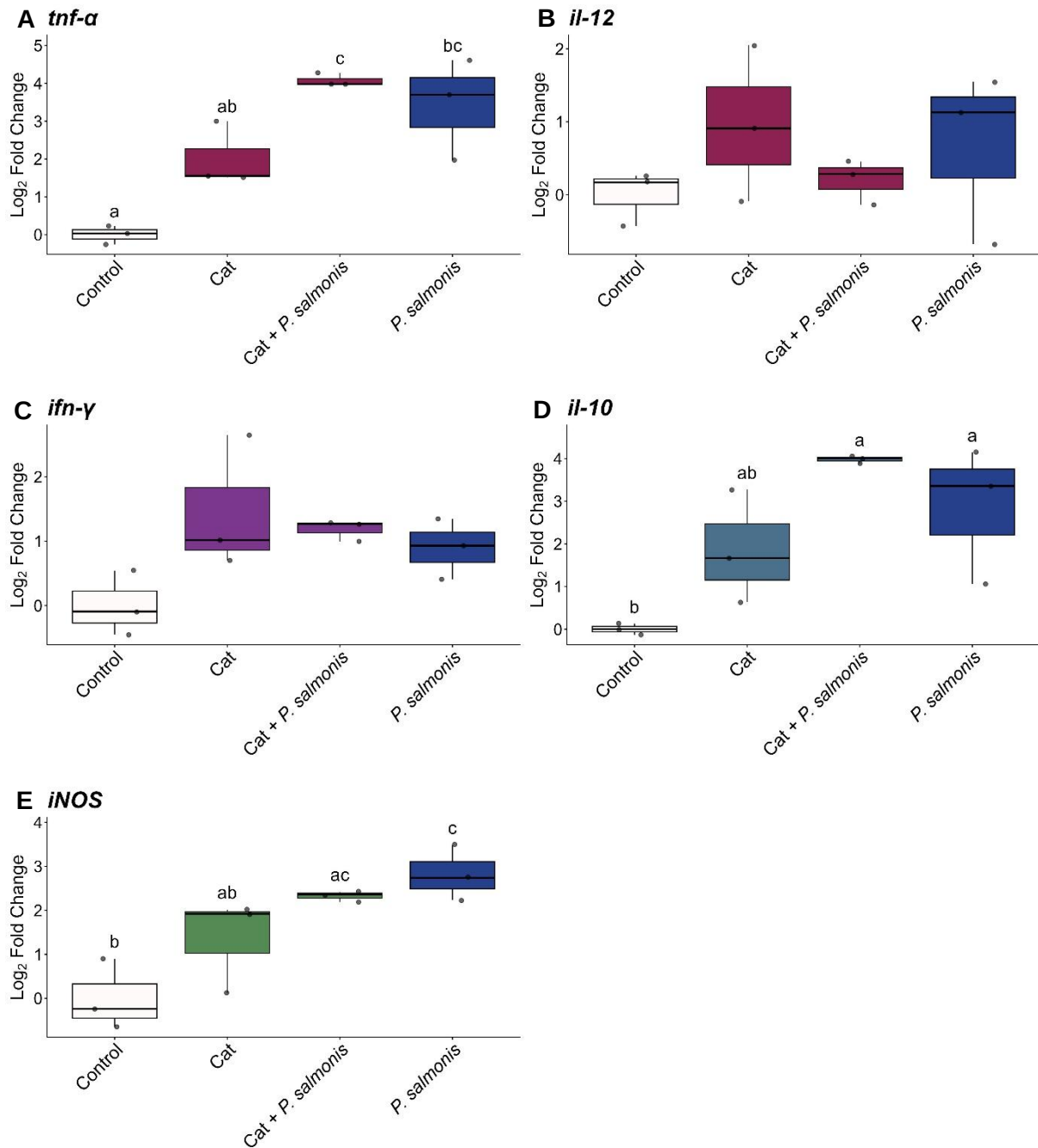


Figura 21. Análisis de expresión génica de células RTS-11 tratadas con Cat a 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 4 h e infectadas con *P. salmonis* (MOI 1) durante 24 h. Genes evaluados: (A) *tnf-α*, (B) *il-12*, (C) *ifn-γ*, (D) *il-10*, (E) *iNOS*. Control = PBS 1X. Cat = células tratadas, pero no infectadas, Cat + *P. salmonis* = células tratadas e infectadas. *P. salmonis* = Células no tratadas e infectadas. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

Dado que, en el experimento previo, el tratamiento con Cat antes de la infección no mostró un efecto claro sobre la modulación génica frente a *P. salmonis*, se planteó una segunda estrategia experimental para evaluar su efecto posinfección. En este nuevo enfoque, las células RTS-11 fueron inicialmente tratadas con Cat a 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 4 h, luego infectadas

con *P. salmonis* (MOI 1), y tras 24 h de infección, se reaplicó el tratamiento durante 4 h adicionales. Se evaluaron los mismos genes inmunológicos que en el ensayo anterior (*ifn-γ*, *il-12*, *il-10*, *tnf-α* e *iNOS*), con el objetivo de comparar los efectos del tratamiento pre y posinfección.

En este esquema, únicamente los genes *tnf-α* e *iNOS* mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$), mientras que *il-10*, *il-12* e *ifn-γ* no presentaron cambios significativos en su expresión (Figura 22). En el caso de *tnf-α*, las células infectadas, tanto tratadas como no tratadas, incrementaron significativamente la expresión de este gen respecto al control no infectado ($p = 0,0232$ y $p = 0,0175$, respectivamente) (Figura 22 A). Mientras que, la expresión de *iNOS* disminuyó significativamente en las células infectadas y tratadas con Cat, respecto a las células infectadas sin tratamiento ($p = 0,0124$) (Figura 22 E).

El experimento se replicó en la línea celular SHK-1 para validar los efectos inmunomoduladores observados en RTS-11, evaluando la acción de Cat y Hep frente a *P. salmonis*. Las células fueron tratadas con 20 µg/mL de cada péptido durante 24 h y luego infectadas con *P. salmonis* (MOI 10) por 24 h adicionales. Se incluyó iRFP como control de proteína en IBs sin efecto inmunomodulador conocido, para discriminar los efectos del carrier. Se analizaron los genes *tnf-α*, *il-1β*, *il-10*, *il-8* e *iNOS*. Los AMPs no indujeron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de los genes evaluados, entre las células infectadas con y sin tratamiento (Figura 23 y Figura 24), aunque llama la atención el alza del gen *il-8* en células tratadas con iRFP e infectadas con *P. salmonis* (Figura 24 C).

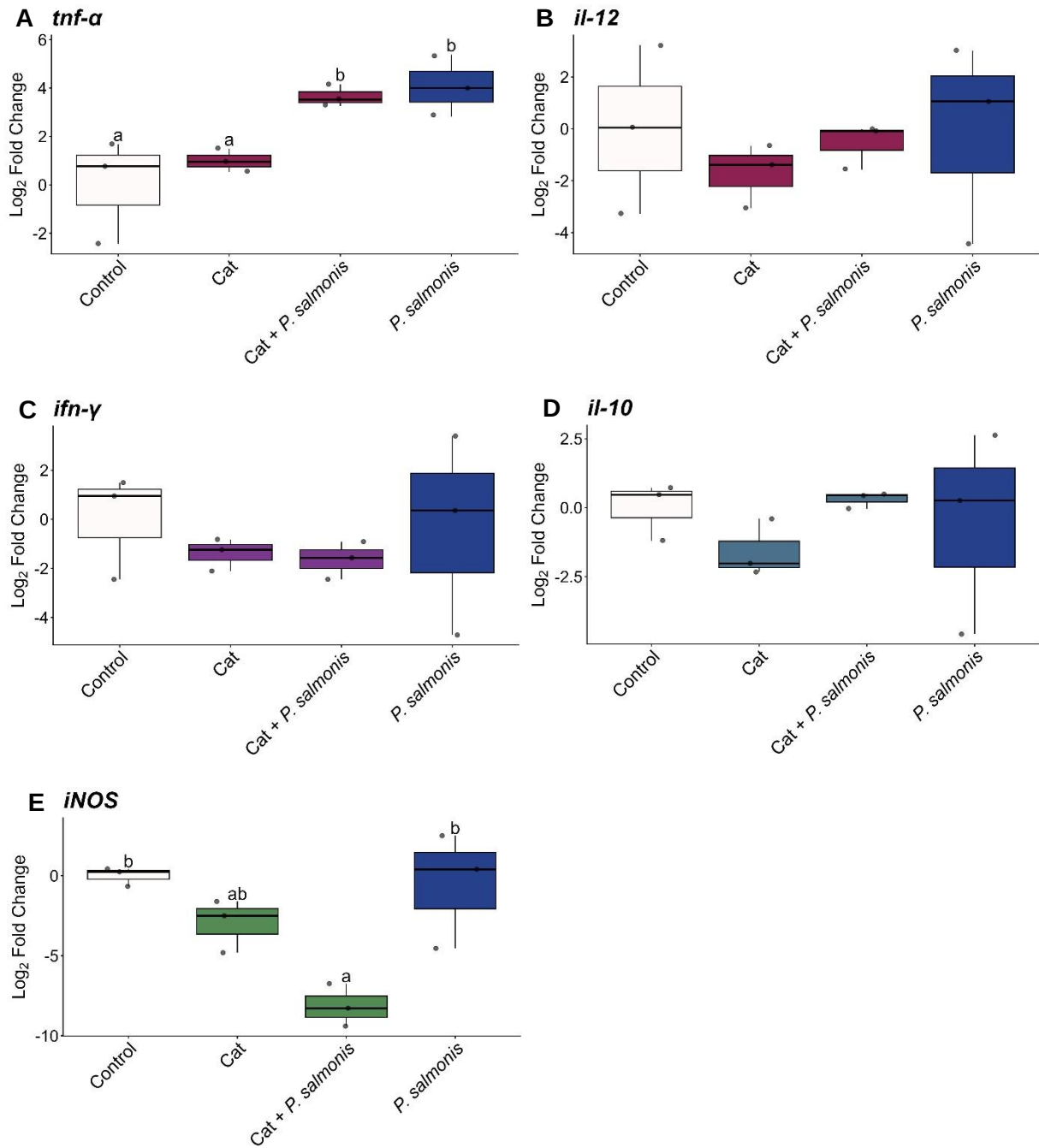


Figura 22. Análisis de expresión génica de células RTS-11 tratadas con Cat a 20 µg/mLpre y posinfección. Genes evaluados: (A) *tnf-α*, (B) *il-12*, (C) *ifn-γ*, (D) *il-10*, (E) *iNOS*. Control = PBS 1X. Cat = células tratadas, pero no infectadas, Cat + *P. salmonis* = células tratadas e infectadas. *P. salmonis* = Células no tratadas e infectadas. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

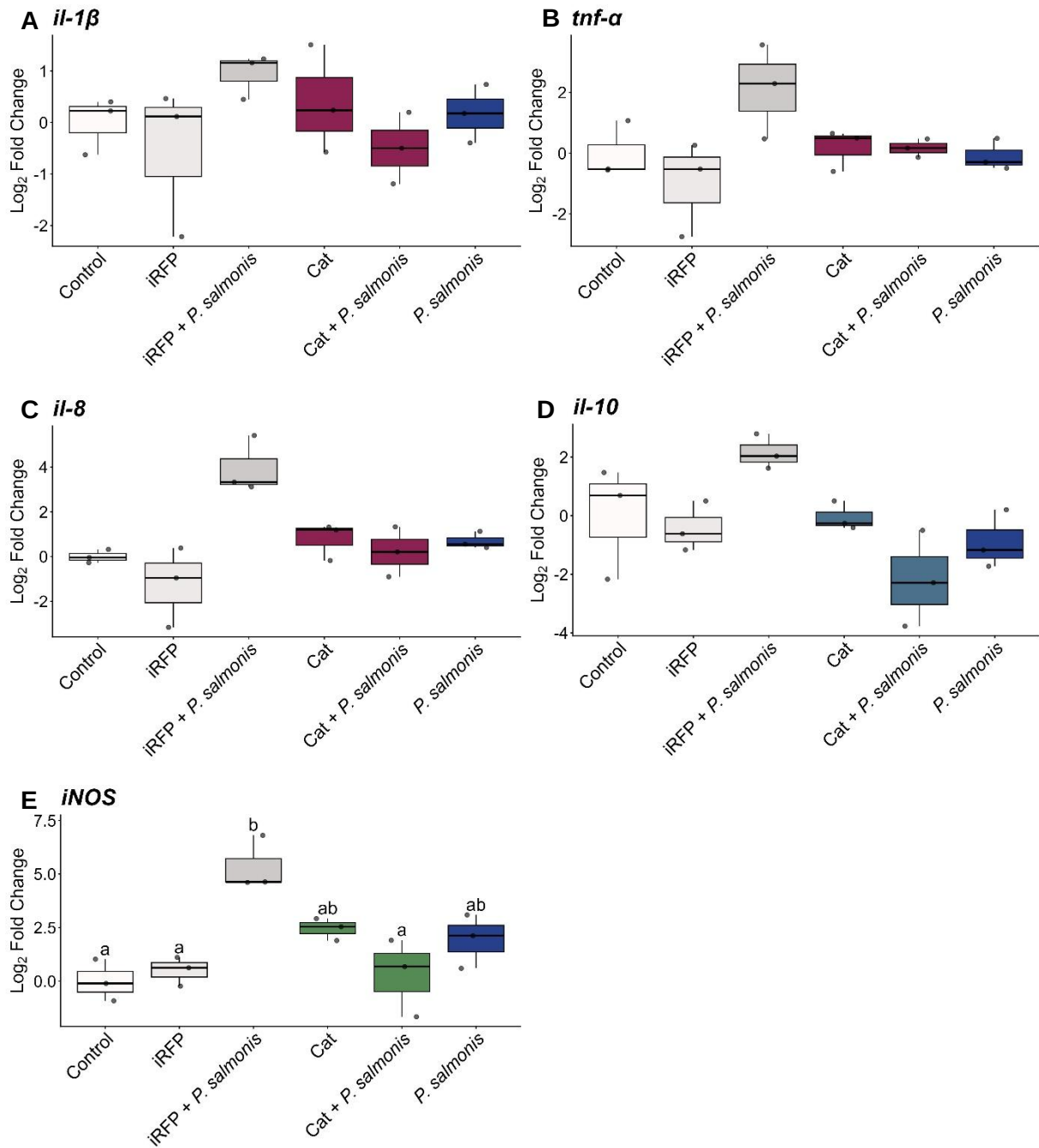


Figura 23. Expresión génica relativa de células SHK-1 tratadas con Cat a 20 µg/mL durante 24 h, e infectadas con *P. salmonis* (MOI 10) durante 24 h. Genes evaluados: (A) *il1-β*, (B) *tnf-α*, (C) *il-8*, (D) *il-10*, (E) *iNOS*. Control = PBS 1X. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

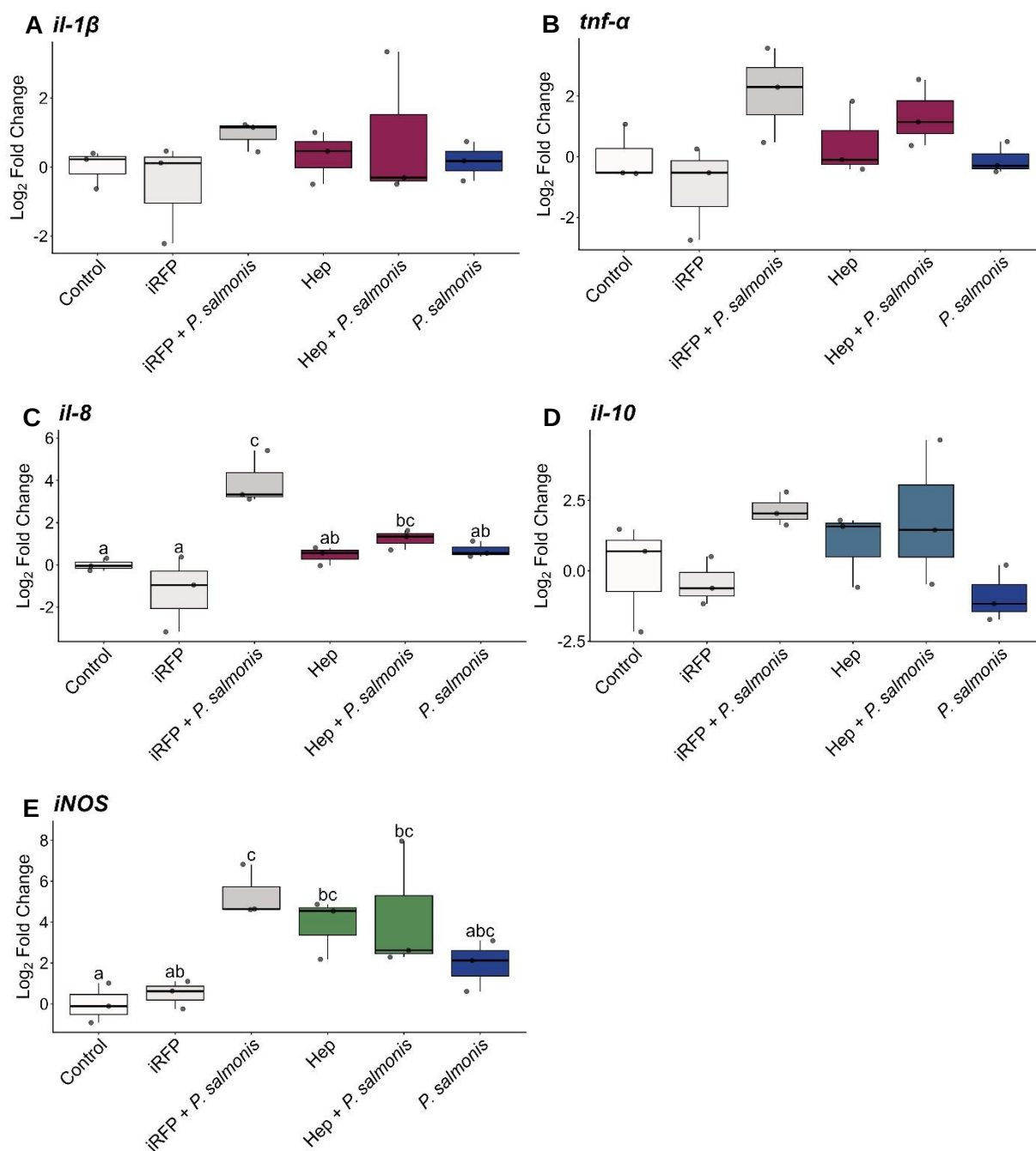


Figura 24. Expresión génica relativa de células SHK-1 tratadas con Hep a 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h, e infectadas con *P. salmonis* (MOI 10) durante 24 h. Genes evaluados: (A) *il1-β*, (B) *tnf-α*, (C) *il-8*, (D) *il-10*, (E) *iNOS*. Control = PBS 1X. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

5.3.2 Evaluación de la eficacia de los AMPs para el control de *P. salmonis*

Con el objetivo de evaluar la eficacia de los AMPs como tratamiento directo sobre *P. salmonis*, se probaron diferentes concentraciones del tratamiento (0,1 – 20 μM), y se evaluó el efecto a las 6 y 24 h. Se incluyó como control de IBs iRFP, y como control negativo solución ringer. El

análisis de Kruskal-Wallis realizado por patógeno y tratamiento reveló diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,01$).

Cat tuvo efecto sobre *P. salmonis* a 5 y 20 μM ($p < 0,01$), sin diferencia significativa entre las concentraciones, observándose un 43,3 y 40,6 % de supervivencia bacteriana respectivamente. Este efecto sólo se observó a las 6 h, ya que a las 24 h ninguna concentración disminuyó significativamente la supervivencia respecto al control (Figura 25 A y B). Aunque el grupo control iRFP, tuvo efecto entre 0,1 y 5 μM , a las 6 h ($p < 0,001$), y entre 0,1 y 1 μM a las 24 h. Por su parte, Hep a 20 μM no tuvo efecto significativo sobre la disminución de la supervivencia de *P. salmonis*, pero si todas las concentraciones inferiores ($p < 0,05$), alcanzando una supervivencia máxima de 40,0 % a 5 μM a las 6 h y 32 % a las 24 h, sin embargo, sigue una tendencia similar al iRFP (Figura 25 C y D). A los 12 días, *P. salmonis*, tratadas con Cat presenta un promedio de supervivencia del 45 %, mientras que con Hep del 57 % (Apéndice 11.7)

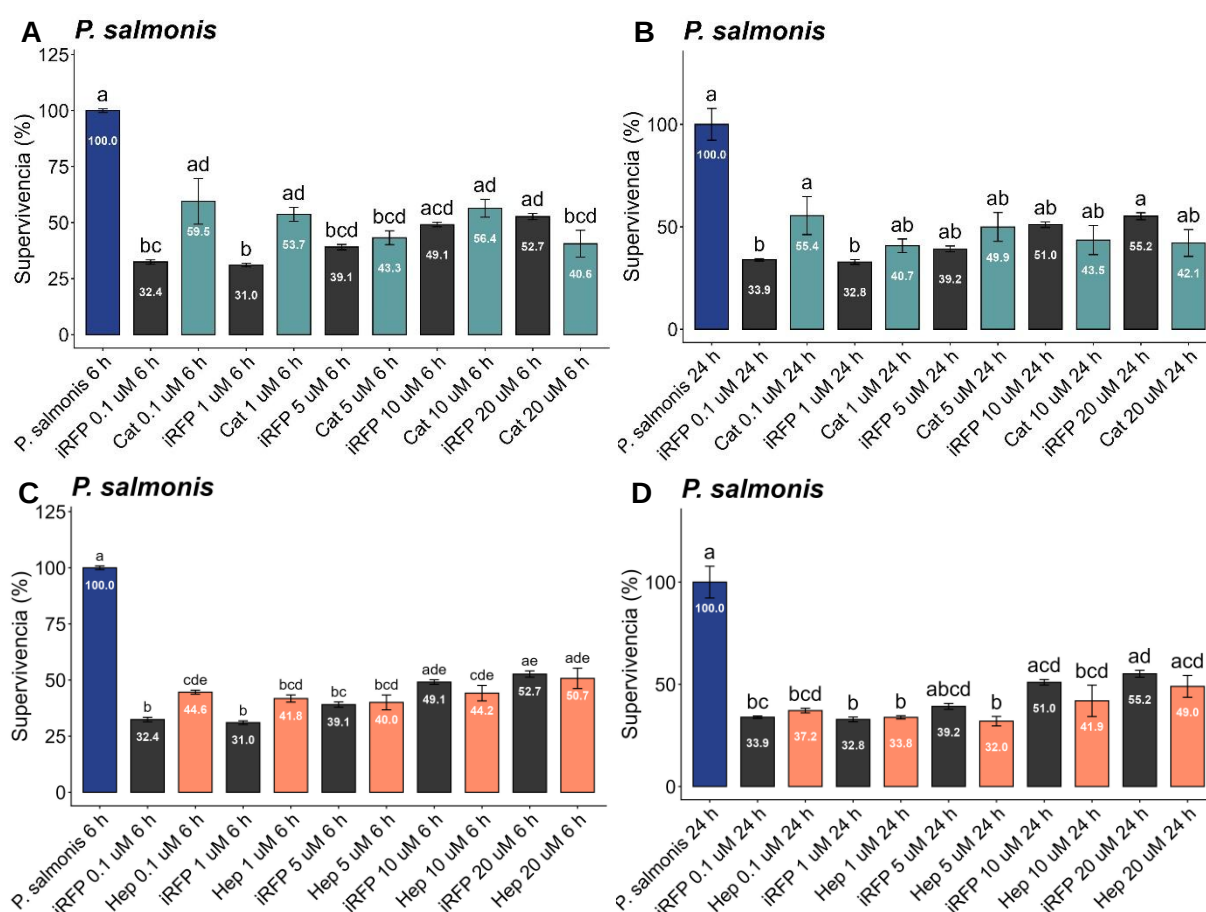


Figura 25. Porcentaje de supervivencia de *P. salmonis* tras exposición a (A) Cat por 6 h, (B) Cat por 24 h, (C) Hep por 6 h, (D) Hep por 24 h.

5.3.3 Determinación de la estabilidad de los AMPs

Para determinar si los AMPs en formato de IBs son potencialmente administrables por vía oral, se sometieron a las condiciones de pH (2 y 10) que emulan el tracto digestivo para asegurar la resistencia de la molécula. Adicionalmente, con el objetivo de establecer su explotación industrial y la estabilidad del producto final, se determinó su efectividad posterior a someterse a la liofilización (presentación para almacenamiento) y a temperaturas de 100°C (simulando la resistencia al proceso de extrusión). Para todos estos ensayos de estabilidad, se seleccionó Cat a 20 µg/mL, en células RTS-11 y se cuantificó la expresión del gen proinflamatorio *il-8* y antiinflamatorio *il-10* a las 24 h, se consideró como control negativo PBS.

Los IBs liofilizados disminuyeron significativamente la expresión del gen *il-10* ($p = 0,0231$), mientras que la temperatura de 100°C, favoreció la expresión del mismo respecto a otras condiciones ($p < 0,05$), aunque sin diferencia significativa respecto al control negativo (Figura 26 A). Al evaluar la expresión del gen *il-8*, se observó un incremento significativo de la expresión en el grupo sometido a alta temperatura ($p = 0,0342$) (Figura 26 B). Por su parte, los IBs sometidos a pH gastrointestinal simulado, no afectaron significativamente la expresión de *il-10* e *il-8*, aunque, se observó una tendencia a la baja en la expresión de ambos genes.

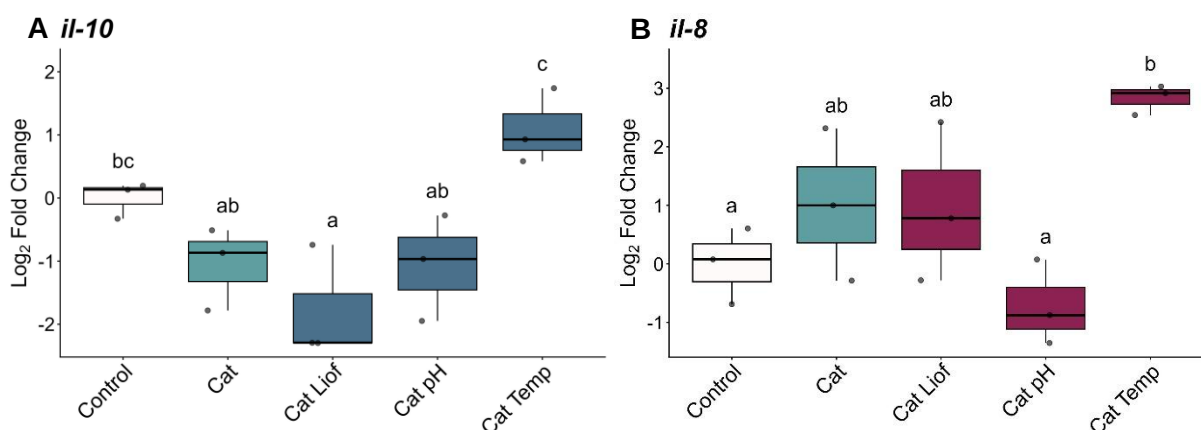


Figura 26. Expresión génica relativa de (A) *il-10* y (B) *il-8*, de células RTS-11 tratadas con Cat a 20 µg/mL durante 24 h. Cat Liof = Cat liofilizada, Cat pH = Cat sometida a pH 2 y pH 8, Cat Temp = catelicidina sometida a 100°C durante 30 min.

El diseño original de esta tesis contemplaba el escalamiento en biorreactor de las plataformas basadas en Cat y Hep. No obstante, debido a limitaciones en los tiempos de optimización de los rendimientos de expresión para dichos péptidos, se optó por evaluar la viabilidad tecnológica y el comportamiento de la plataforma de IBs, empleando la citocina IL-1β de salmón del Atlántico como proteína modelo previamente caracterizada en el Laboratorio de Genética y Genómica Aplicada (ver Apéndice 11.9).

6. Discusión

6.1 Objetivo 1: Producir y caracterizar proteínas nanoestructuradas de salmón del Atlántico con potencial inmunoestimulante en *Escherichia coli*

Los AMPs cumplen un rol esencial en la defensa molecular del hospedador, no solo por su actividad directa contra patógenos, sino también por su capacidad de modular la inmunidad innata a través de la interacción con receptores de membrana y la activación de respuestas celulares tempranas (Katzenback, 2015; Masso-Silva & Diamond, 2014). Sin embargo, su producción en sistemas bacterianos representa un desafío técnico, principalmente por su toxicidad en las células hospedadoras, debido a sus propiedades catiónicas, además su pequeño tamaño, los hace susceptibles a la degradación proteolítica (Y. Li, 2011). La fusión de AMPs con dominios estructurales es una estrategia ampliamente utilizada para mejorar estabilidad, solubilidad o promover agregación en sistemas recombinantes (Y. Li, 2011; Miao et al., 2024).

En este contexto, KSI, una proteína de 14 kDa altamente hidrofóbica, se ha utilizado para dirigir proteínas hacia IBs y proteger al hospedador del efecto bactericida de los péptidos (P. M. Hwang et al., 2014; Kuliopulos & Walsh, 1994; Rodríguez et al., 2014). La incorporación de esta secuencia a Cat y Hep provocó cambios fisicoquímicos importantes, tales como, el aumento del peso molecular, disminución del 35,2 % y 58,7 % en los índices de inestabilidad de Cat y Hep respectivamente. Aumento del 65,3 % de hidrofobicidad para Cat, mientras Hep, mantuvo valores cercanos a la neutralidad hidrofóbica. Además, la probabilidad de insolubilidad, aumentó 83,6 % para Cat y 86,9 % para Hep. Coherente con reportes que demuestran que KSI puede duplicar la estabilidad de las proteínas fusionadas (Mehri et al., 2021), los resultados demuestran que, la KSI podría actuar como un dominio de agregación, y por tanto, como un estabilizador estructural.

Las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de cada proteínas (secuencia, carga neta, hidrofobicidad), condicionan el patrón de agregación (Ramón et al., 2014). La agregación en forma de IBs, puede representar alrededor del 40-50 % de las proteínas recombinantes totales (Idicula-Thomas & Balaji, 2007; Kumar, 2011). Esto coincide con nuestras propias observaciones, los IBs para ambos AMPs a las 5 h, representan más del 70 % de las proteínas totales. Esta proporción, se debe a que, la cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS permite un control más estricto de la expresión de proteínas para la expresión de proteínas tóxicas, pero también promueve la agregación cuando las tasas de traducción sobrepasan la capacidad de plegamiento celular (Agilent Technologies, 2010; López-Cano et al., 2022). Esto, junto con las

condiciones de cultivo (37 °C, 250 rpm), y la secuencia KSI, favorecen la acumulación de IBs, en más del 50 % del total de proteínas recombinantes producidas.

La cinética de expresión evidenció que Cat y Hep se acumularon preferentemente en IBs desde las 3 h. Cabe destacar que la agregación no es uniforme ni constante, estudios han reportado una variabilidad significativa incluso para una misma proteínas, ya que los IBs bacterianos son estructuras dinámicas que resultan de un desequilibrio entre la agregación y los procesos de solubilización (M. M. Carrió & Villaverde, 2001a). Los resultados de la cinética demuestran que la formación de IBs no solo está determinada por la eficiencia del sistema de expresión, sino también por las características propias de cada proteína y su interacción dinámica con el entorno celular.

Cabe destacar que la cuantificación de los IBs mediante Western blot, utilizando como referencia la fracción soluble purificada, constituye una estimación indirecta, por lo tanto, conlleva un margen de incertidumbre. No obstante, la variabilidad experimental de la cuantificación entre viales del mismo lote no supera el 10%, además, el $R^2 > 0,98$ de la curva de calibración valida la relación entre la carga de la muestra y la intensidad de la banda, permitiendo determinar el rango lineal de detección del ensayo (Arakawa et al., 2025; Pillai-kastoori et al., 2020). La cuantificación por Western blot resulta mejor que los ensayos colorimétricos clásicos como BCA o Bradford, porque los IBs purificados a partir de *E. coli* no son agregados homogéneos de la proteína de interés, sino que retienen de forma variable proteínas de la célula hospedera (Baltà-Foix et al., 2024). En consecuencia, la cuantificación mediante técnicas como el ensayo de BCA resultaría imprecisa al medir el contenido proteico total del agregado, generando una sobreestimación sistemática de la concentración real del AMP, aunque podría usarse de forma complementaria al Western blot. Además, para escala industrial la cuantificación podría hacerse siguiendo la patente EP2174140B1, esta metodología consiste brevemente en la estimación de la concentración proteica mediante el peso seco de los agregados tras una calibración por HPLC, eliminando la dependencia de anticuerpos.

La composición química de los AMPs, la cepa utilizada y las condiciones del cultivo, y el tiempo de producción, no solo influye en la eficiencia de formación de IBs durante la producción, sino también en su morfología.(Masso-Silva & Diamond, 2014; Upadhyay et al., 2012). Cat posee una mayor hidrofobicidad y un contenido más elevado de residuos básicos, lo que favorece interacciones hidrofóbicas y electrostáticas fuertes entre proteínas parcialmente plegadas, promoviendo la formación de núcleos de agregación estables y compactos (Ferenczy & Kellermayer, 2022). En contraste, Hep, presenta un perfil más hidrofílico, y un menor contenido

de residuos básicos, lo que podría reducir su propensión a interacciones fuertes y permitir una agregación menos densa. Estas variables dan lugar a las diferencias en forma y tamaño de los IBs, aunque estos en general, se han descrito como partículas pseudo-esféricas, que oscilan entre aproximadamente 50 y 500 nm (García-Fruitós et al., 2009; Margreiter et al., 2008; Masso-Silva & Diamond, 2014).

Se demostró que los IBs presentan diferencias en su resistencia tanto a agentes caotrópicos como la urea, como a la degradación proteolítica. Si bien Cat alcanza, al menos, el 50 % de solubilización a urea 5 M, Hep lo alcanza a valores mucho mayores (aproximadamente 7 M). Esto demuestra que, la resistencia de los IBs es variable, implicando diferencias estructurales entre Cat y Hep. La urea a altas concentraciones (6-8M), se ha empleado ampliamente para solubilizar los IBs, y da cuenta de la estructura de los mismos, porque su acción desestabiliza tanto las interacciones hidrofóbicas como los puentes de hidrógeno que mantienen a las proteínas agregadas (Baltà-Foix et al., 2024; Carr et al., 2013). De esta manera, una menor concentración de urea requerida para solubilizar refleja una organización menos estable del agregado, mientras que una mayor concentración indica una red de interacciones más fuerte y compacta. Así, las diferencias observadas entre Cat y Hep sugieren que cada proteína forma IBs con distinta composición estructural y grado de compactación, lo que repercute directamente en su resistencia frente a agentes caotrópicos.

Cuando los IBs son expuestos a la proteinasa K, Hep es menos resistente a bajas concentraciones que Cat. La digestión depende de la heterogeneidad entre las diferentes conformaciones proteicas presentes en el IB (Singh et al., 2020). En este sentido, la estructura β -amiloide, en general suele ser más resistentes que las proteínas en conformación nativa (Bocharova et al., 2006; Kushnirov et al., 2020). En otras palabras, un IB con mayor contenido de proteína en conformación nativa es más inestable, que las conformaciones plegados parcial o incorrectamente (Bakholdina et al., 2021). Por lo tanto, la mayor resistencia a la proteólisis de Cat, podría ser indicativo de que presenta una mayor proporción de estructuras β -amiloide, en comparación de Hep, lo cual impacta en la actividad del IB (Pernel et al., 2006). Esto coincide con los análisis bioinformáticos, que demuestran que Cat tiene un GRAVY mayor respecto a Hep. De hecho, se acepta ampliamente que la capacidad de autoensamblarse en estructuras similares a amiloides es una propiedad inherente de las proteínas (Chiti & Dobson, 2009). Sin embargo, varía drásticamente dependiendo de las características intrínsecas de las cadenas polipeptídicas y de las condiciones ambientales, por ejemplo: pH, temperatura, estrés celular, disponibilidad de oxígeno, entre otros (Garcia Fruitós & Arís Giralt, 2022; Villar-Piqué & Ventura, 2014).

Aunque la propensión a la insolubilidad, y por tanto a la agregación de una proteína, se puede predecir mediante algoritmos bioinformáticos, la proporción exacta de estructuras β -amiloides respecto a la fracción correctamente plegada, es variable (García Fruitós & Arís Giralt, 2022; Villar-Piqué & Ventura, 2014). Para determinar este porcentaje con precisión, se recurre a métodos semicuantitativos como la tinción con rojo Congo, y fluorescencia con tioflavina (ThT), que aprovechan la capacidad de estas moléculas para unirse específicamente a las hendiduras hidrofóbicas de las láminas β -amiloides (Singh et al., 2020; Upadhyay et al., 2012). Otro método comúnmente empleado es la espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), que permite una cuantificación directa al detectar las vibraciones de los enlaces de la estructura principal de la proteína (región de la amida I), donde las estructuras de agregados amiloides absorben de manera característica en longitudes de onda específicas (De Marco et al., 2019; Upadhyay et al., 2012). Estos se emplean para complementar los ensayos de urea y proteinasa K, para determinar de forma más precisa la proporción entre β -amiloide y proteína en forma nativa.

6.2 Objetivo 2: Analizar la capacidad de las proteínas nanoestructuradas para estimular el sistema inmune del salmón del Atlántico

Los IBs bacterianos pueden liberar cantidades sustanciales de proteína recombinante funcional *in vivo*, así como en condiciones no desnaturizantes *in vitro*, característica deseada en su uso como portadores de enzimas o nanomateriales (Ramón et al., 2014). Aunque, un aspecto de cuidado en el uso de IBs es la presencia de cantidades indeterminadas de moléculas remanentes de la cepa de producción bacteriana, tales como ADN bacteriano, ARN y componentes de la pared celular, incluidos LPS y PGN, que para productos farmacológicos son considerados contaminantes celulares, porque puede aumentar los riesgos de inmunogenicidad (Liu et al., 1997; Torrealba, Seras-Franzoso, et al., 2016; Mohamad Alias et al., 2025). Por lo tanto, evaluar si estos pueden generar toxicidad que conlleve con la muerte celular es un paso importante.

En nuestro estudio, se demostró que los IBs no afectaron la viabilidad de las células RTS-11, manteniendo más del 90 % de células viables. Estos hallazgos son consistentes con otros estudios que han demostrado la ausencia de citotoxicidad, muerte celular, apoptosis, necrosis, estrés oxidativo y genotoxicidad inducida por IBs, posicionándolos como una plataforma segura de biomateriales (Barguilla et al., 2022). Por otra parte, estudios han vinculado la alteración de la integridad de las membranas celulares, con la acción de proteínas mal plegadas, formadoras de poros, o patrones de agregación fibrilar, que puede conducir a la muerte celular (Bucciantini et al., 2004; González-Montalbán et al., 2006). La alta viabilidad

celular observada con nuestros IBs sugiere que no adoptan conformaciones fibrilares tóxicas o que su patrón de agregación no compromete la integridad de la membrana celular.

Se demostró que los IBs pueden ser reconocidos e internalizados por las células RTS- 11, hito fundamental para su potencial terapéutico (Gustafson et al., 2015). Las células incorporaron ambos AMPs a 20 µg/mL, con una clara ventaja de Cat (68,5 %) frente a Hep (11,2 %). Otros estudios, han demostrado que alrededor del 70 % de macrófagos de trucha (RT-HKM) tratados con IBs a 40 µg/mL, son positivos para la captación de IBs, con una clara correlación lineal entre el tiempo y los valores de internalización (Torrealba, Seras-Franzoso, Mamat, Wilke, Villaverde, Roher, & Garcia-Fruitós, 2016).

Las características fisicoquímicas de las moléculas, tales como el tamaño, la hidrofobicidad y la carga superficial positiva, modulan la eficiencia de la fagocitosis y a su vez potencian los efectos inflamatorios locales por incremento de efectores, tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) (Alqahtani et al., 2020; Gustafson et al., 2015; Lafuente et al., 2020). En este contexto, las propiedades fisicoquímicas de Cat, tales como, carga positiva neta, punto isoeléctrico alcalino, y menor tamaño respecto a Hep, favorecen la interacción electrostática con la membrana de los macrófagos y su consecuente internalización (Swami & Shahiwala, 2013). Mientras que Hep, al presentar una carga casi neutra (14 residuos básicos frente a 15 ácidos), un pI cercano a la neutralidad (6,88) y un tamaño mayor (0,484 µm), podría restringir su eficiencia endocítica (Swami & Shahiwala, 2013).

Esto denota la importancia de la ingeniería de proteínas recombinantes terapéuticas, orientadas a mejorar el diseño estructural y funcional de proteínas recombinantes (Shad et al., 2025). Por ejemplo, una estrategia emergente, es la modificación en la carga, ya que las proteínas positivamente supercargadas pueden ser absorbidas en grandes cantidades en las células, lo que las hace útiles para aplicaciones donde se desea la entrega intracelular (Ebrahimi & Samanta, 2023). De este modo, la manipulación racional de la estructura y carga proteica permite alinear el desarrollo de estos biomateriales con los principios de Calidad por Diseño (QbD), una metodología sistemática requerida y reconocida por agencias regulatorias como la FDA y la UE para garantizar la potencia, seguridad y reproducibilidad de los bioterapéuticos (Shin & Landauer, 2023).

En el contexto de los agregados proteicos, la mayor compactación y carga positiva de Cat podrían facilitar el arrastre de restos proteicos o material genético residual de *E. coli*, como se ha documentado para ADN bacteriano o proteínas de membrana (Brandenburg et al., 2003; Schromm et al., 1996). Dosis moderadas de LPS pueden inducir la activación de macrófagos en especies como *O. mykiss* y *S. salar* promoviendo un efecto proinflamatorio, mediante la

expresión génica de *il1-β*, *il-8* y *tlr5* (Nualart et al., 2023; Pietretti & Wiegertjes, 2014; Sukhovskaya et al., 2025; Swain et al., 2008), Por lo tanto, la contribución del LPS como componente endotóxico remanente, en el efecto inmunomodulador observado no puede ser descartada por completo.

Como se ha mencionado anteriormente, los AMPs son componentes cruciales de la inmunidad innata de los teleósteos, mejorando las respuestas de defensa, e interviniendo en la expresión de factores inflamatorios como las citocinas *il-8*, *la il-1β* y *tnf-α*, y se están considerando como posibles terapias alternativas contra patógenos (Rashidian et al., 2021; Rima et al., 2021). Además de esto, los IBs poseen propiedades inmunoestimulantes intrínsecas, porque en su estructura, los restos de otras moléculas provenientes de la *E. coli* que promueven las respuestas proinflamatorias, al activar el factor nuclear kappa-ligera cadena potenciador de células B activadas (NFκB) mediada por respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) (S. Liu et al., 1997; Schetters et al., 2020; Torrealba, Seras-Franzoso, Mamat, Wilke, Villaverde, Roher, & Garcia-Fruitós, 2016).

En el presente estudio, Cat a 20 µg/mL (1 µM) indujo la expresión de los genes *il-8*, *il-1β*, e *il-10*, a las 12 h y disminuyó la expresión de *tnf-α*. Este patrón de regulación sugiere que Cat a esta concentración, podría estar promoviendo una respuesta inmune balanceada, donde se estimula la quimiotaxis y la activación celular a través de IL-8 e IL-1β, mientras se atenúa la inflamación exacerbada mediante la supresión de TNF-α y la inducción de IL-10. Se ha reportado que Cat induce de la expresión de quimiocinas, la polarización de los macrófagos, la influencia en la fagocitosis, y la regulación de la activación de TLR tanto extracelular como intracelular (De Yang et al., 2000; Scheenstra et al., 2020). En el salmón del Atlántico específicamente, se ha demostrado que Cat regula significativamente al alza la expresión de *il-8* en leucocitos de sangre periférica (PBL), a las 5-8 h después de la estimulación a concentraciones de 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, aunque el aumento de la expresión es transitoria, regresando a niveles basales a las 16 h en PCL estimulados con catelicidina 2 (Bridle et al., 2011). Si bien, se podría incrementar la dosis de IBs, para ser equiparable a la de otros estudios, los resultados revelan que, a la mitad de la dosis reportada por otros autores, se alcanza un efecto inmunomodulador.

Las catelicidinas tienen un efecto asociado con la inducción selectiva de quimioquinas, el reclutamiento subsecuente de monocitos y macrófagos, ejerciendo actividades inmunomoduladoras (Van Dijk et al., 2016). Como ya se ha discutido, induce selectivamente la transcripción de *il-8*, aunque también tiene la capacidad de inhibir significativamente la transcripción de los genes *tnf-α*, e *il-6* del pez cebra y otros modelos animales (C. Chen et al.,

2019; Van Dijk et al., 2016). En consonancia con lo anterior, Cat disminuyó significativamente la expresión *tnf-α* a las 12 h, e *il-6* a las 24 h, a dosis de 10 µg/mL (0,5 µM). El perfil antiinflamatorio se ve favorecido con el incremento de la expresión de *il-10*, a las 12 h a dosis de 20 µg/mL (1 µM), mucho menor a la dosis de 5 µM reportada por otros autores, para la sobreexpresión de este gen posterior a las 3 h de tratamiento (Peng et al., 2020).

Por otra parte, en relación a la regulación de la expresión el gen *cox-2*, e *iNOS*, Cat parece comportarse de manera similar a otras moléculas que promueven las respuestas antiinflamatorias. La disminución de *il-6*, y el incremento de *il-10*, indican supresión de las potenciales respuestas inflamatorias, en las que se suprime la actividad de NF-κB, que es un factor importante en la regulación transcripcional de genes proinflamatorios, como *il-6*, *NO*, *iNOS* y *cox-2* (J. H. Hwang et al., 2016; Wang T et al., 2016; Ryu et al., 2015; Salvado et al., 2013). Por lo tanto, Cat presenta una modulación clara sobre los genes relacionados a la inflamación, tanto proinflamatorios como antiinflamatorios, por lo cual su función se puede atribuir al mantenimiento del equilibrio homeostático en la respuesta inmune.

Las hepcidinas de los teleósteos, además de tener propiedades reguladoras del hierro y antimicrobianas, han demostrado propiedades inmunomoduladoras. En nuestro estudio los resultados muestran una tendencia similar a la proteína control iRFP a dosis de 10 µg/mL (0,5 µM), por lo que no se puede descartar la influencia de algunas moléculas presentes en ambos IBs, probablemente provenientes de *E. coli*. El alza en la expresión del gen *il-8*, y supresión de *tnf-α* e *iNOS* a las 12 h, indican que hay un reclutamiento activo de neutrófilos, mientras se suprimen ciertos mediadores inflamatorios. Autores han reportado que células RTS-11 tratadas con Hep a 10 µM, expresan la citocina proinflamatoria TNF-α a las 6 h, mientras que a las 12 h, no hay expresión significativa de esta citocina (Álvarez et al., 2022; Gao et al., 2024). Por lo tanto, en concordancia con nuestros resultados, las respuestas inflamatorias mediadas por Hep ocurren entre las 4 y 12 h postratamiento.

Además de lo anterior, estudios demuestran que macrófagos tratados con Hep a 16 µg/mL, durante 1 h, reducen la inducción de TNF-α, IL-1α, IL-8, y IL-6, sugiriendo que Hep tiene un efecto antiinflamatorio (Dan et al., 2017). Esto promueve la polarización de los macrófagos al tipo M2, con lo cual disminuye la translocación nuclear de NF-κB, la liberación de citocinas proinflamatorias y la formación de NO, y por ende la subexpresión de *iNOS* (Agoro et al., 2018). La expresión de *cox-2*, también dependiente de las vías inflamatorias, por tanto la inactividad de estas rutas pueden verse reflejado en su expresión (Soares & Hamza, 2016).

En concordancia con lo anterior, se ha demostrado que macrófagos incubados con Hep, son capaces de regular los efectos inflamatorios provocados por moléculas proinflamatorias,

mediados por SOCS3, una proteína que modula la actividad de las citocinas inflamatorias (Alexander & Hilton, 2004; De Domenico et al., 2010; Yoshimura et al., 2004). En base a esto, si bien la expresión de citocinas proinflamatorias inducidas por Hep, se pudo haber dado en tiempos no evaluados, las endotoxinas presentes en el IB, podrían haber aminorado su expresión. En este caso, la modulación de Hep como IBs depende de la sinergia entre el LPS u otros posibles PAMPs presentes, y el efecto intrínseco de Hep.

A pesar de que Hep presenta un perfil proinflamatorio restringido, con una regulación negativa de *iNOS*, el alza en la expresión de *il-8*, indica que esta quimioquina se expresa por mecanismos alternativos al dependiente de NF- κ B. Esto incluye la activación de ROS y MAPK (p38/ERK), que estabilizan el ARNm de IL-8 independientemente de NF- κ B/*iNOS* (Lee et al., 2007; X. Li et al., 2023). Esto sugiere que Hep, ejerce su efecto inmunomodulador mediante la activación preferencial de vías de señalización no dependientes de *iNOS* para la expresión de *il-8*, lo que debe ser explorado en futuros estudios.

La Tabla 6.1 presenta un análisis sistemático de la especificidad biológica y el perfil transcripcional inducido por los IBs de Cat y Hep en la línea celular RTS-11 tras 12 h de estímulo. De manera general, los genes *tnf- α* , *il-10* e *iNOS* exhibieron respuestas no específicas al AMP, sugiriendo una activación basal modulada por el sistema. No obstante, se evidenciaron respuestas específicas de Cat y Hep. Por un lado, los IBs de Cat gatillaron la regulación al alza de *il-1 β* e *il-8*, perfilándose hacia una respuesta de tipo proinflamatoria. Mientras que, los IBs de Hep indujeron la expresión de *il-8*. Estos resultados sugieren que, si bien ambos AMPs convergen en la activación de *il-8* como un mediador quimiotáctico específico, Cat promueve un escenario inflamatorio. Es imperativo destacar que, aunque existieron respuestas no específicas, que podrían ser atribuibles a la presencia de PAMPs residuales del sistema de expresión heterólogo atrapados covalentemente en la matriz proteica, estos componentes contribuyen de manera sinérgica al perfil inmunogénico global del IB actuando como un adyuvante intrínseco. Sin embargo, de cara a su escalamiento e inocuidad comercial, es fundamental profundizar en la estandarización de los procesos de purificación para establecer los límites óptimos de esterilidad y apirogenicidad que garanticen un equilibrio reproducible entre la adyuvancia basal y la seguridad biológica de la plataforma.

Tabla 6.1 Resumen sistemático del efecto biológico inducido por Cat y Hep sobre la respuesta inmune de células RTS-11 a las 12 h postratamiento

Marcador	Cat			Hep		
	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
<i>il-1β</i>	ns	ns	Específico	ns	ns	ns
<i>il-8</i>	Específico	ns	Específico	Específico	ns	Específico
<i>tnf-α</i>	ns	No Específico	ns	ns	No Específico	ns
<i>il-10</i>	ns	ns	No Específico	ns	ns	ns
<i>iNOS</i>	ns	ns	ns	ns	No Específico	ns
<i>il-6*</i>	NA	No Específico	NA	NA	ns	NA
<i>cox-2*</i>	NA	ns	NA	NA	ns	NA

NA: No Aplica; ns: sin diferencia significativa respecto al control; Específico: diferencia significativa respecto al iRFP ($p < 0,05$), efecto atribuible al AMP; No Específico: sin diferencia significativa respecto al iRFP ($p > 0,05$), efecto no atribuible estrictamente al AMP; *: efecto observado a las 4 o 24 h.

Con el propósito de determinar si el uso directo de citocinas recombinantes ofrecía una ventaja inmunomoduladora superior frente a los AMPs, se compararon las respuestas inmunológicas de las citocinas IL-10 e IL-12 (Apéndice 11.6). Para ambas se observó un patrón similar de subexpresión de los genes *il-8*, *tnf-α*, e *iNOS*, con diferencia en las dosis efectoras. Mientras IL-10 tiene un efecto más marcado a dosis más altas (10 a 20 µg/mL), IL-12 tiene efecto a dosis más bajas (5 µg/mL). Aunque ambas desempeñan funciones inmunorreguladoras muy importantes en la defensa del huésped, y la homeostasis inmunitaria los resultados asociados a respuestas antiinflamatorias, lo que justificó la decisión de proseguir con los AMPs como plataforma biotecnológica inmunoestimulante, con especial atención a Cat.

Los ensayos para evaluar el efecto inmunomodulador en *S. salar*, a diferentes tiempos (6, 12, y 24 h) con dosis de 5 mg/kg, demostraron que, ambos AMPs indujeron la expresión de *il-8* a las 12 h, y la disminución de *il-1β* a las 24 h, aunque este último gen tuvo un incremento en su expresión a las 6 h para Cat, y a las 12 h para Hep. En peces se ha demostrado que Cat promueve el procesamiento y la liberación de IL-1β a través de la activación directa del receptor P2X7R, aunque su efecto es transitorio y dependiente del tiempo y la dosis (Haugland et al., 2014; C.-H. Li et al., 2015). Este receptor se expresa en mayores cantidades en órganos y células del sistema inmune como macrófagos, y monocitos, presenta un dominio de unión con lípidos, y proteínas, y regula las respuestas proinflamatorias, a través de la secreción de citocinas IL-18 e IL-1β (Chiao et al., 2013; Denlinger et al., 2001). La IL-1β también es una de las principales citocinas detectada en el riñón anterior de lubinas, tratadas con Hep a 0,2 mg/kg durante 3 días (Álvarez et al., 2022). La regulación al alza de *il-1β* e *il-8*, sugiere una sinergia entre ambos genes. De hecho, se ha reportado que en los tejidos sanos del pez cebra, la IL-8

es apenas perceptible, pero su expresión puede ser inducida rápidamente de 10 a 100 veces por diferentes inductores, como por ejemplo: IL-1 β (Abdelkhalek et al., 2009; Alejo & Tafalla, 2011; Torrealba, Parra, et al., 2016). Los patrones de expresión génica observados tras la administración de los IBs, sugieren que pueden inducir respuestas proinflamatorias transitorias en el salmón del Atlántico, que permanecen por más tiempo para Cat.

La complejidad de los sistemas vivos matiza los efectos inmunomoduladores observados en el ensayo *in vitro*. Al comparar los resultados *in vitro* e *in vivo* (Tabla 6.2), se observa una consistencia notable en el comportamiento de *il-8*, que alcanza su máxima expresión en ambos modelos alrededor de las 12 h. Asimismo, en ambos sistemas se detecta una represión de *tnf- α* bajo ciertas condiciones. Sin embargo, el gen *il-1 β* muestra un comportamiento inverso, mientras en el sistema *in vitro* Cat induce su expresión, en el sistema *in vivo* esta es reprimida a las 24 h. Esta diferencia podría deberse a mecanismos de regulación inmunológica sistémica que no se observan en un modelo celular.

Tabla 6.2 Resumen comparativo de la expresión génica *in vitro* e *in vivo* tras el tratamiento con AMPs.

Marcador	Cat (<i>in vitro</i>)	Cat (<i>in vivo</i>)	Hep (<i>in vitro</i>)	Hep (<i>in vivo</i>)
<i>il-1β</i>	↑ 20 μ g/mL	↑ 6 h, ↓ 24 h	ns	↑ 12 h ↓ 24 h
<i>il-8</i>	↑ 5 y 20 μ g/mL	↑ 12 h	↑ 5 μ g/mL	↑ 12 h
<i>tnf-α</i>	↓ 10 μ g/mL	↓ 24 h (ns)	↓ 10 μ g/mL	ns
<i>il-10</i>	↑ 20 μ g/mL	↑ 24 h (ns)	ns	ns
<i>iNOS</i>	↓ 10 μ g/mL (ns)	NA	↓ 10 μ g/mL	NA
<i>il-6*</i>	↓ 24 h	NA	ns	NA
<i>cox-2*</i>	↑ 24 h (ns)	NA	↑ 4 h (ns)	NA

NA: No Aplica; ns: no significativo; * Dosis 10 μ g/mL a las 4 y 24 h.

En los ensayos *in vivo*, no se observó una regulación significativa de otros genes evaluados como *tnf- α* e *il-10*, en los tiempos considerados (6, 12 y 24 h). Esta ausencia de respuesta podría deberse a la dosis, tiempos de respuesta, o a la complejidad de las respuestas inmunes. Sin embargo, es importante reconciliar estos datos con la cuantificación en plasma de TNF- α . Cat indujo un aumento significativo de la proteína TNF- α a partir de las 12 h respecto al grupo sin tratamiento, y aunque no difiere del control PBS, hay una tendencia al alza en peces tratados. Si bien, este resultado no debe interpretarse como una respuesta inmune concluyente, puede ser reflejo de la tendencia a la mayor fagocitosis de Cat, observada en los ensayos *in vitro*, ya que la internalización del tratamiento puede desencadenar una activación inmune, que se refleja en la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α (Chou et al., 2017; Garcia et al., 2020; Kobayashi, 2010; Kusaka et al., 2014; Murugan et al., 2015). De hecho, estudios han reportado una correlación positiva entre TNF- α , y las catelicidina 1 y 2 en macrófagos de riñón anterior de trucha arcoíris (Hong et al., 2013).

Por su mayor propensión a la fagocitosis, Cat se administró por vía intraperitoneal para evaluar si los IBs son capaces de alcanzar órganos linfoides de interés, como el riñón anterior y el bazo. En el riñón anterior, la mayor proporción de IBs (5,8 %) se detectó a las 24 h posinyección, aunque estudios han demostrado que la cantidad de nanopartículas fagocitadas en el riñón anterior es menor a las 24 h que a las 6 h (Folgueira et al., 2015). También se ha reportado que, una capacidad fagocítica total del salmón en leucocitos de sangre periférica y leucocitos de riñón anterior es de aproximadamente 28 % y 12 %, respectivamente, y puede observarse desde las 3 h (Øverland et al., 2010). Dado que no se evaluaron tiempos anteriores a las 24 h, no se descarta la idea de que el riñón anterior pueda haber alcanzado niveles mayores de captación en las primeras horas posinyección.

Por su parte, el bazo mostró un mayor porcentaje de captación de los IBs (21,7 %) a las 72h, denotando un 18,4 % más de células marcadas que el riñón anterior. En concordancia con este resultado (Torrealba, Parra, et al., 2016), demostraron que en el pez cebra, los IBs administrados por vía intraperitoneal, son distribuidos al bazo y riñón anterior, este último con porcentajes de células positivas más bajos ($78 \pm 7,5$ % en el bazo, y $22,9 \pm 2,4$ % en el riñón anterior, a las 48 h), con disminución en el tiempo en ambos casos. Es necesario resaltar que, en teleósteos, los macrófagos muestran diferencias funcionales significativas bajo la influencia de diferentes microambientes. Esta diferencia se puede observar en monocitos y macrófagos de diferentes tejidos incluyendo: riñón, bazo o sangre (Forlenza et al., 2011). Por ello, es necesario evitar extrapolar las capacidades fagocíticas de estas células entre diferentes tejidos.

Esta diferencia puede explicarse por la distinta composición celular de cada órgano. El bazo de salmón se compone principalmente de células B (46,8 %), células T (16,7 %), y en menor proporción granulocitos (4,6 %) mientras que el riñón anterior tiene una mayor proporción de estos (51 %) (Andresen et al., 2024; Sun et al., 2024). Lo cual coincide con nuestras propias observaciones de citometría, en el bazo (4,51 % de granulocitos) y el riñón anterior (44 % de granulocitos). Al analizar el porcentaje total de células marcadas, se detectó un 1,1 % en el riñón anterior y un 1,6 % en el bazo. Este hallazgo sugiere que, a pesar de la diferencia significativa a las 72 h, el bazo no necesariamente tiene un porcentaje total de células marcadas significativamente mayor que el riñón. La percepción de una mayor captación en el bazo, especialmente en la población de granulocitos, parece ser una proporción mayor respecto a la célula parental específica, es decir, el porcentaje de una subpoblación que contiene IBs, en lugar del porcentaje de todas las células del órgano.

Finalmente, la dinámica temporal de la biodistribución de las nanopartículas en los peces es muy rápida. Se ha documentado que en tan solo 6 h, moléculas grandes ($> 4 \mu\text{m}$) pueden migrar desde los pliegues peritoneales hacia las áreas vascularizadas, y a las 24 h, la señal de los IBs administrados por vía oral ya no es detectable en el intestino (Folgueira et al., 2015; J. Ji et al., 2019). En este sentido, la evaluación de tiempos inferiores a 24 h es una limitación en este estudio, por lo cual es necesario incluirlos, así como incrementar el número de peces por tiempo (al menos 10), para tener una perspectiva más amplia en cuanto a la dinámica temporal de la biodistribución de estas nanopartículas.

6.3 Objetivo 3. Evaluar la eficacia de las proteínas nanoestructuradas para el control de *P. salmonis* y su potencial para ser administradas por vía oral.

Nos interesamos en saber, si los efectos inmunomoduladores de Cat eran suficientes para contrarrestar los efectos ocasionados por *P. salmonis* en células RTS-11. Se sabe que *P. salmonis* modula la señalización celular para inactivar la respuesta antimicrobiana del huésped, y se ha demostrado que en células RTS-11 es capaz de regular al alza IL-10, mientras que la expresión de *il-12* no se altera (Álvarez et al., 2016). Además, los genes *tnf- α* e *il-8* también son marcadores de la infección temprana (24 h) por *P. salmonis* en otros modelos celulares, tales como SHK-1, ASK y ZKPCC, mientras que el *ifn- γ* parece estar más relacionado a la respuesta tardía de la infección (5 días) (Ortiz-Severín et al., 2021). En nuestros resultados, en las células RTS-11 infectada con *P. salmonis*, se incrementó la expresión de los genes *il-10*, *tnf- α* , e *iNOS*.

No se observó efecto sobre la regulación de la expresión de los genes relacionados a la infección tras el tratamiento previo con Cat a $5 \mu\text{g/mL}$ durante 4 h, por lo tanto, este esquema no logró establecer un nivel protector suficiente para inhibir la internalización de *P. salmonis*. Esta estrategia experimental, que pretendía solapar la cinética transcripcional del inmunomodulador con el periodo de infección bacteriana, sugiere que dicha ventana temporal genera un desfase cinético que compromete la traducción efectiva de las señales de la célula hospedera. Además, se ha observado, en otros estudios que pese a que existe una tendencia hacia una menor viabilidad de bacterias intracelulares, en células tratadas con catelicidina, esta, por sí sola, tiene una efectividad limitada para eliminar patógenos intracelulares (Pashaie et al., 2025a). No obstante, tras una segunda estimulación con Cat, posterior a las 24 h de infección, disminuyó significativamente la expresión del gen *iNOS*, en las células tratadas respecto a las células infectadas. Este resultado, en contraste con la observación de un leve incremento en la media en la expresión del gen *il-10*, en el primer esquema experimental, sugieren un efecto antiinflamatorio directo de Cat sobre el proceso infeccioso inducido por *P.*

salmonis. Aunque este efecto modulador favorece la sobrevivencia de las células hospederas durante los procesos inflamatorios agudos, no resulta antagónico a la supervivencia de la bacteria (Rozas-Serri, 2022).

Este fenómeno inmunorregulador de catelicidina se ha reportado en otros estudios, demostrando la capacidad de este AMP para modular los procesos inflamatorios durante la infección bacteriana, mostrando potencial para su desarrollo como agentes antiinfecciosos y/o antiinflamatorios (He et al., 2023). En este rol, el péptido se caracteriza por la disminución de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) y aumentó de citocinas antiinflamatorias (IL-10) durante la etapa aguda de la infección, probablemente mediado por la inhibición de la vía MAPK (JNK1/2 y ERK1/2), y la supresión de la vía de señalización NF- κ B al impedir la translocación nuclear de las subunidades NF- κ B, promoviendo así la polarización de los macrófagos a M2 (Fang et al., 2023; He et al., 2023). Dado que la expresión de *iNOS* es una respuesta clave provocada por la bacteria, la capacidad de Cat para inhibir la sobreexpresión de este gen y reducir los niveles de NO, indica que, lejos de amplificar la inflamación, Cat actúa mitigándola. Este mecanismo de control inflamatorio es consistente con estudios previos realizados en células estimuladas con LPS durante 24 h, donde se ha observado incluso la supresión completa de NO a dosis de 5 μ M, siendo de hecho el efector más susceptible a la regulación por parte de Catelicidina (Aktan, 2004; Ciornei et al., 2003; Pashaie et al., 2025b; Van Dijk et al., 2016). En nuestro modelo, esta alta susceptibilidad de *iNOS* a la regulación por Cat sugiere que el péptido cumple un rol en la resolución del estrés inflamatorio.

En las células SHK-1, los tiempos de estimulación no indujeron cambios en las respuestas de expresión para ninguno de los genes evaluado. Aunque el tratamiento con el IB no inmunogénico (iRFP), promovió la expresión de *il-8* en células infectadas. Por lo cual se puede intuir que algún componente en este IB, favorece el efecto inflamatorio durante la infección con *P. salmonis*, hecho que se puede contrastar con otros estudios, donde el tratamiento con LPS y flagelina, ha demostrado que disminuye la citotoxicidad de *P. salmonis* (Muñoz-Flores et al., 2022). Esto abre la puerta a explorar rutas de señalización relacionadas al efecto de PAMPs sobre el control de *P. salmonis*, así como el diseño de IB, como mecanismo de entrega de estas moléculas.

Cuando los IBs son agregados directamente a suspensiones bacterianas de *P. salmonis*, el efecto es notable con dosis desde los 0,1 μ M a las 6 h, para ambos AMPs, incluso es evidente en el control no inmunogénico, lo cual denota que hay un efecto del IB sobre la membrana celular de estos patógenos. En general los AMPs, al estar cargados positivamente, reconocen las membranas cargadas negativamente de los microorganismos, y se unen en el área

hidrofóbica de la membrana lipídica, lo que provocará inestabilidad de la membrana y la muerte celular (Joo et al., 2016). No obstante, la actividad de los IBs parece ser más compleja, ya que pueden tener superficies hidrofóbicas significativas expuestas, lo que permite que los polipéptidos activos queden atrapados en la superficie, que en conjunto con los AMPs pueden establecer un efecto sinérgico entre la carga positiva y la hidrofobicidad, potenciando el efecto antimicrobiano (Fink, 1998; García-Fruitós et al., 2007; Z. Li et al., 2025).

P. salmonis es un patógeno Gram negativo, por ende, posee una estructura y composición en su membrana que las hace menos permeables a los compuestos hidrofóbicos (Doyle, 2000). Por lo cual podemos atribuir el efecto observado a la interacción entre los IBs, y la membrana celular, y no a la internalización del mismo. Esta interacción, está dada por parches hidrofóbicos de los IBs, que se unen a la membrana celular y la desestabilizan (de Groot et al., 2009). Aunque algunas nanopartículas puedan difundir al interior de las células y ocasionar daños a nivel de la maquinaria enzimática, esto no es medible mediante OD, por lo cual sería necesario profundizar el efecto mediante otros métodos.

Se ha demostrado que las catelicidinas de *S. salar* controlan patógenos marinos como *Vibrio anguillarum*, y *Yersinia ruckeri*, a dosis de entre 40-80 μM (Bridle et al., 2011). Mientras, que hepcidinas de *O. mykiss* tienen efecto sobre *P. salmonis* a 10 μM (Álvarez et al., 2014). En ambos casos, los AMPs han sido solubles, con supervivencias variables entre 50 y 20 %, lo que demuestra que los IBs tienen actividad comparable a los péptidos solubles, a dosis menores (Cat a 5 μM y Hep a 0,1 μM).

Llama la atención que patógenos marinos como: *Vibrio anguillaru*, y *Yersinia ruckeri*, son más susceptibles a las catelicidinas de mamíferos (Bridle et al., 2011). De hecho, los AMPs de invertebrados marinos introducidos en los mamíferos pueden desempeñar un papel crucial en la mediación de la interacción entre los sistemas inmunológicos innato y adquirido, por lo cual están siendo explorados ampliamente para el control de infecciones y tratamientos alternativos en medicina humana y veterinaria (Guryanova et al., 2023). En este estudio demostramos que los AMPs en formato de IBs, tienen un potente efecto sobre patógenos de interés agrícola (Apéndice 11.8). Esto significa que, no sólo son capaces de estimular las vías de la inmunidad innata, sino de que también tienen un efecto directo sobre los patógenos, pudiendo obtenerse un efecto protector por ambas vías durante el proceso infeccioso.

Para determinar si los IBs de Cat pueden potencialmente ser administrados por vía oral, se emularon las condiciones de pH del tracto gastrointestinal, así como altas temperatura (para tolerar procesos de extrusión) y liofilización (como presentación final). Se evaluó la eficacia

posterior, mediante análisis de expresión de los genes *il-10* e *il-8*. En las condiciones de pH y liofilización, no se alteró significativamente la expresión de estos genes, mientras que la temperatura favoreció el incremento de la expresión en ambos genes. Esto se debe a que, el aumento de la temperatura, aumenta la entalpía, implicando que el aumento del movimiento térmico, supera las interacciones estabilizadoras de la proteína (como los enlaces de hidrógeno y las atracciones de van der Waals) que mantienen su conformación (Durell & Ben-Naim, 2021). Además, se ha demostrado que, en ciertas condiciones controladas, el aumento de la temperatura puede inducir una reorganización estructural que expone preferencialmente grupos hidrofílicos, facilitando la formación de nuevos enlaces de hidrógeno intramoleculares o con el solvente (Durell & Ben-Naim, 2021). Es decir que el incremento de la temperatura afecta directamente las interacciones moleculares de las proteínas, estableciendo nuevos arreglos entre las regiones hidrofílicas e hidrofóbicas (Durell & Ben-Naim, 2021). De hecho, estudios han demostrado que los AMPs en forma de IBs sometidos a temperaturas de 37°C logra solubilizar la proteína, y favorece la actividad de IL-8 e IL-10 (Baltà-Foix et al., 2024).

La evaluación de la resistencia a pH en los nanomateriales basados en proteínas para la administración de fármacos, es importante, ya que por encima del punto isoeléctrico (pI) las interacciones hidrofóbicas en la proteína se reducen (Tarhini et al., 2017). Esto significa que, las variaciones del pH del tracto digestivo pueden alterar las interacciones moleculares dentro del IB, aunque en el caso de Cat, su pI es de 10,12, por lo cual puede soportar bien las variaciones de pH del tracto digestivo. Para el salmón del Atlántico, el pH del estómago varía entre 2,0 y 7,0, mientras que la actividad proteolítica total intestinal óptima varía entre 7,0 y 12,5 (Krogdahl et al., 2015).

Por otra parte, bajar la temperatura debería resultar en una estabilización creciente de la estructura nativa (Durell & Ben-Naim, 2021). La congelación es el primer paso de la liofilización, la cual ha surgido como una solución potencial para superar la estabilidad de las nanopartículas, ofreciendo una solución a las inestabilidades tanto innatas como externas que surgen durante el uso de nanopartículas (Gatto & Najahi-Missaoui, 2023). Aunque esta técnica no está exenta de posibles efectos que pueden resultar adversos para algunas nanopartículas, por ejemplo partículas pequeñas pueden agregarse entre sí para alcanzar un estado termodinámico más favorable (Pal et al., 2011). Además la liofilización también puede afectar la carga superficial, por lo cual los agregados pueden adquirir conformaciones diferentes (Abdelwahed et al., 2006). En nuestro estudio los IBs liofilizados se comportaron de forma similar al tratamiento no liofilizado, e incluso se ha demostrado que este proceso no afecta su capacidad de proteger a los peces durante procesos de infección (Torrealba, Parra, et al., 2016).

Finalmente, como actividad complementaria se produjo IL-1 β en biorreactor (Apéndice 11.9), y se comparó la eficacia de estos IBs entre la producción en biorreactor y matraz. La producción en biorreactor fue considerablemente menor que la producción en matraz. Esto se debe a que, en los matraces, no hay control de pH ni de oxígeno, a medida que el pH disminuye, incrementa el número de IBs por células, respecto a los que se producirían bajo condiciones controladas de pH (Castellanos-Mendoza et al., 2014; Strandberg & Enfors, 1991). El pH también impacta directamente en el tamaño de los IBs, bajo condiciones no controladas los agregados tienen un mayor tamaño que los que se producen con pH controlado, los cuales tienden a ser más pequeños (Castellanos-Mendoza et al., 2014).

Los IBs obtenidos en ambos sistemas fueron capaces de inducir la expresión de respuestas proinflamatorias mediadas por los genes *il-1 β* y *tnf- α* , con una tendencia a un mayor efecto con los IBs generados en biorreactor. Dado que el tamaño es una de las diferencias notables entre ambos tipos de producciones, el efecto se puede atribuir a esta característica, ya que la absorción por la ruta fagocítica se rige por las características fisicoquímicas de las nanopartículas, incluidos el tamaño, la forma y las propiedades de la superficie (Hillaireau & Couvreur, 2009). En este sentido, IBs más pequeños presentan una mayor relación superficie/volumen, lo que puede favorecer su interacción con receptores celulares y su posterior internalización.

Además, se confirmó que la IL-1 β contenida en los IBs es biológicamente activa, y promueve una vía de autoinducción que autores han reportado que puede ser dependiente de la dosis (Hong et al., 2001; Peddie et al., 2001). Estos resultados evidencian que los IBs no solo representan una forma estable y escalable de producir proteínas recombinantes, sino que además conservan funcionalidad biológica suficiente para activar respuestas inmunes específicas.

7. Conclusiones

Este estudio demuestra que es factible producir 2 tipos de AMPs, catelicidina y hepcidina de salmón del Atlántico, en forma de proteínas nanoestructuradas o IBs mediante la expresión en *E. coli*, utilizando la secuencia KSI para favorecer su formación. Se lograron rendimientos, superiores a 30 mg/L, y los IBs representaron aproximadamente el 70 % de las proteínas totales a las 5 h de producción.

Las células RTS-11 son capaces de fagocitar ambos AMPs, aunque con un claro favorecimiento de Catelicidina (68,5 %) en comparación a Hepcidina (11,2 %). Estas diferencias podrían asociarse los modos de interacción con las células. Además, se demostró, que Catelicidina administrada a *S. salar*, puede ser distribuida y alcanzar tejidos linfoides primarios (riñón anterior) y secundario (bazo), este último con tendencia incremental, alcanzando el máximo de células positiva a las 72 h.

Ambos AMPs modularon positivamente la expresión de genes relacionados a las respuestas inflamatorias y antiinflamatorias en condiciones estériles (sin patógenos). En el sistema *in vitro*, Catelicidina promovió una respuesta moduladora clara, caracterizada por la inducción al alza de los genes *il-1 β* , *il-8* (citocinas proinflamatorias) y de *il-10* (citocina antiinflamatoria), especialmente a concentraciones de 20 μ g/mL, también suprimió la expresión de las citocinas proinflamatorias *tnf- α* e *il-6* a las 24 h, a dosis de 10 μ g/mL. En este mismo modelo, Hepcidina, favoreció la expresión significativa de *il-8*, relacionado al reclutamiento de macrófagos y suprimió significativamente la expresión de *tnf- α* e *iNOS* a bajas concentraciones (5-10 μ g/mL), relacionado a un perfil de tipo antiinflamatorio.

En el modelo *in vivo*, ambos AMPs tuvieron la tendencia a la respuesta proinflamatoria transitoria, destacando el alza de la expresión de *il-1 β* postratamiento a las 6 h con Catelicidina y 12 h con Hepcidina, y supresión de su expresión a las 24 h para ambos AMPs. De lo cual se puede concluir que Catelicidina promueve una respuesta proinflamatoria más rápida y sostenida que Hepcidina en el salmón del Atlántico.

Cuando Catelicidina es aplicada, previo o posterior a la infección con *P. salmonis*, no hay un efecto biológico medible que indique control del patógeno en RTS-11 o SHK-1. Además, el efecto modulador de Catelicidina parece favorecer la expresión de genes antiinflamatorios durante la infección, lo que favorecería la supervivencia de *P. salmonis*. Aunque si es evidente que hay un efecto de ambos AMPs, cuando son añadidos directamente a *P. salmonis* logrando

reducir hasta un 60 % la supervivencia bacteriana, a concentraciones menores a 20 μM para Catelicidina, y 10 μM para Hecpidina.

Los IBs mantuvieron su funcionalidad tras ser sometidos a condiciones de liofilización, temperaturas elevadas y pH gástrico simulado. Resulta destacable, la mejora en la eficacia de IBs sometidos a 100 °C en el modelo celular. Además, los IBs en biorreactor presentan una eficacia con tendencia mejora respecto al efecto inmunomodulador *in vitro*.

Resumiendo, se desarrolló una plataforma biotecnológica basada en proteínas nanoestructuradas bioactivas, y potencialmente escalables, de catelicidina y hepcidina de salmón del Atlántico. Ambos presentan actividad bactericida directa sobre *P. salmonis* y fueron capaces de modular la respuesta inmune innata (*in vitro* e *in vivo*), pero no se demostró un efecto protector relacionado a la modulación de la respuesta inflamatoria durante desafíos celulares con *P. salmonis*.

8. Recomendaciones

Validar la cuantificación por Western blot con la proteína soluble de concentración conocida, además, explorar otros protocolos de cuantificación como BCA, con previa desnaturalización de los IBs mediante agente caotrópicos o siguiendo la patente EP2174140B1. Además, en futuros ensayos se deben explorar otros controles para separar efecto AMP/KSI/IB/endotoxina.

Es necesario replantear las estrategias de determinación de la eficacia de los IBs para el control de *P. salmonis*, debido a que la determinación de la expresión génica no es determinante para la expresión de efectores que participen en la supervivencia celular. En este sentido, es inminente medir directamente la supervivencia bacteriana intracelular mediante el conteo colonia (UFC) en células infectadas tratadas y no tratadas.

Para dar continuidad a los hallazgos de esta investigación y avanzar hacia aplicaciones prácticas, es fundamental determinar la capacidad protectora real de la plataforma frente a un desafío de infección en *S. salar*. Esta etapa requiere la definición previa de la dosis letal 50 (LD50) de *P. salmonis* en el hospedador para asegurar un modelo de desafío controlado. Sobre esta base, se diseñarán protocolos de inmunización que contrasten la eficacia de la vía de administración intraperitoneal frente a la administración oral, empleando frecuencias acordes a las empleadas en los centros acuícolas, y dosis escaladas a partir de los hallazgos *in vitro*. La evaluación del efecto protector incluirá marcadores como la mortalidad acumulada, y la carga bacteriana por qPCR.

Para la administración por vía oral como la estrategia de administración más viable para la industria, es fundamental esclarecer el mecanismo de absorción de los cuerpos de inclusión a nivel de la mucosa intestinal del salmón. Por lo tanto, futuros ensayos deben orientarse a determinar cómo estas proteínas nanoestructuradas atraviesan la barrera epitelial digestiva y son capturadas por las células del sistema inmune.

Asimismo, es prioritario establecer ventanas temporales óptimas para los ensayos de biodistribución. Esto permitirá establecer con precisión la cinética de transporte sistémico hacia los órganos linfoides diana (bazo y riñón anterior) y establecer el tiempo de permanencia del bioproducto en el organismo.

Para potenciar las características intrínsecas de las proteínas nanoestructuradas, se es necesario la optimización de su arquitectura molecular. Esto implica incorporar análisis

comparativos con otras etiquetas de fusión y sistemas de expresión validados a nivel industrial, así como establecer criterios claros de hidrofobicidad y carga.

Con el propósito de establecer la eficacia relativa de esta plataforma frente a los estándares actuales de la acuicultura, es prioritario evaluar el rendimiento inmunogénico de los IBs en contraste con adyuvantes de amplio uso comercial, tales como los extractos de Quillaja saponaria. Esto permitirá determinar si los IBs ofrecen ventajas competitivas en términos de efectividad y costo-beneficio respecto a los esquemas de estimulación inmunológica ya establecidos. En esta misma línea de ideas, es necesario contrastar el efecto biológico de los IBs frente a las versiones solubles de Cat y Hep, y refinar los perfiles de dosis-respuesta mediante la evaluación de cinéticas tempranas a intervalos inferiores a las 6 h postratamiento.

Considerando que los ensayos de escalamiento en biorreactor se validaron mediante una citocina modelo, una perspectiva clave para la transferencia tecnológica consiste en optimizar los parámetros operativos específicamente para la producción de IBs de Cat y Hep. Esta etapa debe complementarse con la estandarización de métodos de purificación de bajo costo que prescindan de reactivos de grado analítico, permitiendo proyectar un análisis de costo-beneficio realista. Esto es un requisito indispensable para demostrar la viabilidad financiera de la plataforma y su competitividad frente a las terapias antimicrobianas tradicionales, lo cual debe incluir con estudios de estabilidad acelerada bajo diversas condiciones de humedad y temperatura, asegurando una vida útil compatible con las cadenas de distribución acuícola. Asimismo, para la aplicación industrial es necesario establecer rigurosos criterios de la esterilidad, apirogenicidad y seguridad microbiológica (incluyendo evaluación de endotoxinas) del producto final tras los procesos de purificación.

9. Nomenclaturas

IB: Cuerpo de Inclusión
IBs: Cuerpos de Inclusión
AMP: Péptido Antimicrobiano
AMPs: Péptidos Antimicrobianos
LPS: Lipopolisacáridos
PGN: Peptidoglicanos
PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PRR: Receptores de Reconocimiento de Patrones
TLR: Receptores Tipo Toll
TCR: Receptor de Células T
MHC: Complejo Mayor De Histocompatibilidad
APC: Célula Presentadora de Antígeno
Th: Célula T Colaboradora
GRAS: Generalmente Reconocidas como Seguras
Ig: Inmunoglobulina
IL: Interleucina
Cat: Catelicidina
Hep: Hecidina
IFN: Interferón
KSI: ketosteroid isomerase
iRFP: Proteína Fluorescente del Infrarrojo Cercano
RTS-11: Bazo de trucha arco iris 11 (Rainbow Trout Spleen 11); Línea celular de monocitos / macrófagos, desarrollada a partir del bazo de la trucha arco iris
SHK-1: Riñón Anterior de Salmón-1 (Salmon Head Kidney-1)
FESEM: Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo
qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real
ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
MOI: Multiplicidad de Infección
PBS: Solución Salina Tamponada con Fosfato
pI: Punto Isoeléctrico
GRAVY: Índice de Hidrofobicidad (Grand Average of Hydropathy)
TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa
iNOS: Óxido Nítrico Sintasa Inducible
COX-2: Ciclooxygenasa-2
IFN: Interferón
His: Histidina
KPC: *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemasa
MRSE: *Staphylococcus epidermidis* Resistente a Meticilina
MSSA: *Staphylococcus aureus* Sensible a Meticilina
AmpR: Resistencia a ampicilina
CmR: Resistencia a cloranfenicol

10. Bibliografía

- Abdelkhalek, N. K., Komiya, A., Kato-Unoki, Y., Somamoto, T., & Nakao, M. (2009). Molecular evidence for the existence of two distinct IL-8 lineages of teleost CXC-chemokines. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(6), 763–767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.004>
- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688–1713. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>
- Abdul Kari, Z. (2025). Nutritional immunomodulation in aquaculture: functional nutrients, stress resilience, and sustainable health strategies. In *Aquaculture International* (Vol. 33, Issue 6). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s10499-025-02122-5>
- Abed, N., & Couvreur, P. (2014). Nanocarriers for antibiotics: A promising solution to treat intracellular bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(6), 485–496. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.009>
- Agilent Technologies. (2010). BL21(DE3) Competent Cells, BL21(DE3)pLysS Competent Cells and BL21 Competent Cells: Instruction Manual. *Agilent Technologies*, 21, 1–11. <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/200133.pdf%0Ahttp://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/200133.pdf>
- Agoro, R., Taleb, M., Quesniaux, V. F. J., & Mura, C. (2018). Cell iron status influences macrophage polarization. *PLoS ONE*, 13(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196921>
- Akhavan-Bahabadi, M., Shekarbi, S. P. H., Sharifinia, M., & Khanjani, M. H. (2024). Exploring Fish Antimicrobial Peptides (Amps): Classification, Biological Activities, and Mechanisms of Action. In *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* (Vol. 30, Issue 6). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10989-024-10656-0>
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 75(6), 639–653. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042>
- Alejo, A., & Tafalla, C. (2011). Chemokines in teleost fish species. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1215–1222. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.011>
- Alexander, W. S., & Hilton, D. J. (2004). The Role of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins in Regulation of the Immune Response. *Annual Review of Immunology*, 22(Volume 22, 2004), 503–529. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.091003.090312>
- Alqahtani, M. S., Syed, R., & Alshehri, M. (2020). Size-Dependent Phagocytic Uptake and Immunogenicity of Gliadin Nanoparticles. *Polymers*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/polym12112576>
- Álvarez, C. A., Gomez, F. A., Mercado, L., Ramírez, R., & Marshall, S. H. (2016). *Piscirickettsia salmonis* imbalances the innate immune response to succeed in a productive infection in a salmonid cell line model. *PLoS ONE*, 11(10), 1–14.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163943>

- Álvarez, C. A., Guzmán, F., Cárdenas, C., Marshall, S. H., & Mercado, L. (2014). Antimicrobial activity of trout hepcidin. *Fish and Shellfish Immunology*, 41(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.013>
- Álvarez, C. A., Santana, P. A., Salinas-Parra, N., Beltrán, D., Guzmán, F., Vega, B., Acosta, F., & Mercado, L. (2022). Immune Modulation Ability of Hepcidin from Teleost Fish. *Animals*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/ani12121586>
- Amici, S. A., Dong, J., & Guerau-de-Arellano, M. (2017). Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01520>
- Andersen, M. H., Schrama, D., thor Straten, P., & Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(1), 32–41. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700001>
- Angulo, C., Tello-Olea, M., Reyes-Becerril, M., Monreal-Escalante, E., Hernández-Adame, L., Angulo, M., & Mazon-Suastegui, J. M. (2021). Developing oral nanovaccines for fish: a modern trend to fight infectious diseases. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1172–1192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12518>
- Arakawa, T., Akuta, T., Ejima, D., & Tsumoto, K. (2025). Solubilization and refolding of inclusion bodies by detergents. *Protein Expression and Purification*, 236(June), 106791. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2025.106791>
- Asmamaw, B. (2016). Hepcidin and Its Roles in Fishes. *The Journal of Zoo Studies*, 3(3), 1–10.
- Auvynet, C., & Rosenstein, Y. (2009). Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS Journal*, 276(22), 6497–6508. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07360.x>
- Avendaño-Herrera, R. (2021). Salmon aquaculture, *Piscirickettsia salmonis* virulence, and one health: Dealing with harmful synergies between heavy antimicrobial use and piscine and human health comment on Cabello and Godfrey (2019). *Aquaculture*, 532(May 2020). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736062>
- Bakholdina, S. I., Stenkova, A. M., Bystritskaya, E. P., Sidorin, E. V, Kim, N. Y., Menchinskaya, E. S., Gorpenchenko, T. Y., Aminin, D. L., Shved, N. A., & Solov'eva, T. F. (2021). Studies on the Structure and Properties of Membrane Phospholipase A1 Inclusion Bodies Formed at Low Growth Temperatures Using GFP Fusion Strategy. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 13). <https://doi.org/10.3390/molecules26133936>
- Baltà-Foix, R., Garcia-Fruitós, E., & Arís, A. (2024). Time to consider ruling out inclusion bodies denaturing protocols for spontaneous solubilization of biologically active proteins. *Scientific Reports*, 14(1), 26061. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77899-1>
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., & Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated

- seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252(1), 79–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.051>
- Barguilla, I., Unzueta, U., Carratalá, J. V., Cano-Garrido, O., Villaverde, A., Hernández, A., & Ferrer-Miralles, N. (2022). Toxicity Profiling of Bacterial Inclusion Bodies in Human Caco-2 Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10(April), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.842256>
- Bavia, L., Santiesteban-Lores, L. E., Carneiro, M. C., & Prodocimo, M. M. (2022). Advances in the complement system of a teleost fish, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 123(February), 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.02.013>
- Bechinger, B., & Gorr, S. U. (2017). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research*, 96(3), 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- Benincasa, M., Skerlavaj, B., Gennaro, R., Pellegrini, A., & Zanetti, M. (2003). In vitro and in vivo antimicrobial activity of two α -helical cathelicidin peptides and of their synthetic analogs. *Peptides*, 24(11), 1723–1731. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.07.025>
- Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X. Z., & Zhou, T. (2021). Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>
- Bilal, S., Etayo, A., & Hordvik, I. (2021). Immunoglobulins in teleosts. *Immunogenetics*, 73(1), 65–77. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01195-1>
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., & Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*, 17, 189–220. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.189>
- Bjørgen, H., & Koppang, E. O. (2021). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Immunogenetics*, 73(1), 53–63. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01196-0>
- Bjørndal, T. (2002). The competitiveness of the Chilean salmon aquaculture industry. *Aquaculture Economics and Management*, 6(1–2), 97–116. <https://doi.org/10.1080/13657300209380306>
- Blaser, H., Dostert, C., Mak, T. W., & Brenner, D. (2016). Review TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends in Cell Biology*, 26(4), 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.12.002>
- Bledsoe, J. W., Pietrak, M. R., Burr, G. S., Peterson, B. C., & Small, B. C. (2022). Functional feeds marginally alter immune expression and microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar*) gut, gill, and skin mucosa though evidence of tissue-specific signatures and host–microbe coadaptation remain. *Animal Microbiome*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s42523-022-00173-0>
- Bocharova, O. V, Makarava, N., Breydo, L., Anderson, M., Salnikov, V. V, & Baskakov, I. V. (2006). Annealing Prion Protein Amyloid Fibrils at High Temperature Results in Extension

- of a Proteinase K-resistant Core *. *Journal of Biological Chemistry*, 281(4), 2373–2379. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510840200>
- Brandenburg, K., Andrä, J., Müller, M., Koch, M. H. J., & Garidel, P. (2003). Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. *Carbohydrate Research*, 338(23), 2477–2489. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.08.008>
- Bridle, A., Nosworthy, E., Polinski, M., & Nowak, B. (2011). Evidence of an Antimicrobial-Immunomodulatory Role of Atlantic Salmon Cathelicidins during Infection with *Yersinia ruckeri*. *PLOS ONE*, 6(8), e23417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023417>
- Broekman, D. C., Guðmundsson, G. H., & Maier, V. H. (2013). Differential regulation of cathelicidin in salmon and cod. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(2), 532–538. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.005>
- Brunner, S. R., Varga, J. F. A., & Dixon, B. (2020). Antimicrobial peptides of salmonid fish: From form to function. *Biology*, 9(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/biology9080233>
- Bucataru, C., & Ciobanasu, C. (2024). Antimicrobial peptides: Opportunities and challenges in overcoming resistance. *Microbiological Research*, 286, 127822. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127822>
- Bucciantini, M., Calloni, G., Chiti, F., Formigli, L., Nosi, D., Dobson, C. M., & Stefani, M. (2004). Prefibrillar Amyloid Protein Aggregates Share Common Features of Cytotoxicity *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31374–31382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400348200>
- Cabello, F. C., & Godfrey, H. P. (2019). Salmon aquaculture, *Piscirickettsia salmonis* virulence, and One Health: Dealing with harmful synergies between heavy antimicrobial use and piscine and human health. *Aquaculture*, 507, 451–456. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.048>
- Cabello, F. C., Millanao, A., & Godfrey, H. P. (2020). *Response Framework To Look Beyond Smoke and Mirrors*. 11.
- Cabello, F. C., Millanao, A. R., Lozano-Muñoz, I., & Godfrey, H. P. (2023). Misunderstandings and misinterpretations: Antimicrobial use and resistance in salmon aquaculture. *Environmental Microbiology Reports*, 15(4), 245–253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1758-2229.13147>
- Cabello, F., Millanao, A., & Godfrey, H. (2025). *Piscirickettsia salmonis* pathogenicity: using the damage-response framework to look beyond smoke and mirrors. *MBio*, 16(4), e03821-24. <https://doi.org/10.1128/mbio.03821-24>
- Campoverde, C., Milne, D. J., Estévez, A., Duncan, N., Secombes, C. J., & Andree, K. B. (2017). Ontogeny and modulation after PAMPs stimulation of β -defensin, hepcidin, and piscidin antimicrobial peptides in meagre (*Argyrosomus regius*). *Fish & Shellfish Immunology*, 69, 200–210. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.026>
- Cao, J. F., Yang, G. J., Zhang, Y. A., & Chen, J. (2025). Contribution of interleukins in the regulation of teleost fish immunity: A review from the perspective of regulating macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*, 158(January), 110173. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2025.110173>

- Cao, J., Xu, H., Yu, Y., & Xu, Z. (2023). Regulatory roles of cytokines in T and B lymphocytes-mediated immunity in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104621>
- Carr, J. K., Buchanan, L. E., Schmidt, J. R., Zanni, M. T., & Skinner, J. L. (2013). Structure and dynamics of urea/water mixtures investigated by vibrational spectroscopy and molecular dynamics simulation. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(42), 13291–13300. <https://doi.org/10.1021/jp4037217>
- Carril, G., Morales-Lange, B., Løvoll, M., Inami, M., Winther-Larsen, H. C., Øverland, M., & Sørsum, H. (2024). Salmonid Rickettsial Septicemia (SRS) disease dynamics and Atlantic salmon immune response to *Piscirickettsia salmonis* LF-89 and EM-90 co-infection. *Veterinary Research*, 55(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s13567-024-01356-0>
- Carril, G., Winther-Larsen, H. C., Løvoll, M., & Sørsum, H. (2024). Differential Transcriptomic Profile of *Piscirickettsia salmonis* LF-89 and EM-90 During an In Vivo Spatial Separation Co-Culture in Atlantic Salmon. In *Microorganisms* (Vol. 12, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122480>
- Carrió, M., González-Montalbán, N., Vera, A., Villaverde, A., & Ventura, S. (2005). Amyloid-like Properties of Bacterial Inclusion Bodies. *Journal of Molecular Biology*, 347(5), 1025–1037. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.030>
- Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2001a). Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Letters*, 489(1), 29–33. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02073-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02073-7)
- Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2001b). Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Letters*, 489(1), 29–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02073-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02073-7)
- Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2003). Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Letters*, 537(1), 215–221. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00126-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00126-1)
- Castellanos-Mendoza, A., Castro-Acosta, R. M., Olvera, A., Zavala, G., Mendoza-Vera, M., García-Hernández, E., Alagón, A., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2014). Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 137. <https://doi.org/10.1186/preaccept-1104793932132453>
- Chakkalakal, G. J., Gopakumar, S. T., Sharma, S. R. K., Raveendranathan, D. N., Jagannivasan, A., Nair, A. V., Ramachandran, V., & Achamveetil, G. (2025). Molecular features and expression kinetics of interleukin-10 gene from the marine teleost, Snubnose pompano (*Trachinotus blochii*). *Molecular Biology Reports*, 52(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-10180-w>
- Chan, J. T. H., Picard-Sánchez, A., Dedić, N., Majstorović, J., Rebl, A., Holzer, A. S., & Korytář, T. (2024). Immunological memory in a teleost fish: common carp IgM+ B cells differentiate into memory and plasma cells. *Frontiers in Immunology*, 15(December), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1493840>
- Chang, C.-I., Pleguezuelos, O., Zhang, Y.-A., Zou, J., & Secombes, C. J. (2005). Identification of a novel cathelicidin gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infection and*

Immunity, 73(8), 5053–5064. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.5053-5064.2005>

- Chang, C.-I., Zhang, Y.-A., Zou, J., Nie, P., & Secombes, C. J. (2006). Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 185–195. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.185-195.2006>
- Chen, C., Wang, A., Zhang, F., Zhang, M., Yang, H., Li, J., Su, P., Chen, Y., Yu, H., & Wang, Y. (2019). The protective effect of fish-derived cathelicidins on bacterial infections in zebrafish, *Danio rerio*. *Fish and Shellfish Immunology*, 92(June), 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.029>
- Chen, S. N., Gan, Z., Hou, J., Yang, Y. C., Huang, L., Huang, B., Wang, S., & Nie, P. (2022). Identification and establishment of type IV interferon and the characterization of interferon- γ including its class II cytokine receptors IFN- γ R1 and IL-10R2. *Nature Communications*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28645-6>
- Cheng-Foh, L., Chee-Mun, F., & Devi, S. S. (2017). Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), 10.1128/aac.02340-16. <https://doi.org/10.1128/aac.02340-16>
- Chiao, C.-W., da Silva-Santos, J. E., Giachini, F. R., Tostes, R. C., Su, M.-J., & Webb, R. C. (2013). P2X7 receptor activation contributes to an initial upstream mechanism of lipopolysaccharide-induced vascular dysfunction. *Clinical Science*, 125(3), 131–141. <https://doi.org/10.1042/CS20120479>
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2009). Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nature Chemical Biology*, 5(1), 15–22. <https://doi.org/10.1038/nchembio.131>
- Chou, C.-C., Chen, W., Hung, Y., & Mou, C.-Y. (2017). Molecular Elucidation of Biological Response to Mesoporous Silica Nanoparticles in Vitro and in Vivo. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(27), 22235–22251. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b05359>
- Christensen, S., Rämisch, S., & André, I. (2022). DnaK response to expression of protein mutants is dependent on translation rate and stability. *Communications Biology*, 5(1), 597. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03542-2>
- Ciornei, C. D., Egesten, A., & Bodelsson, M. (2003). Effects of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release from rat aorta in vitro. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 47(2), 213–220. <https://doi.org/10.1034/j.1399-6576.2003.00045.x>
- Collet, B. (2014). Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(2), 160–173. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.017>
- Dan, L., Zhen-Shun, G., Wan, M., Hai-Tao, X., Yun-Qing, L., Yi-Zhen, W., & Hua-Hua, D. (2017). Synthetic Porcine Hepcidin Exhibits Different Roles in Escherichia coli and Salmonella Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(10), 10.1128/aac.02638-16. <https://doi.org/10.1128/aac.02638-16>
- De Domenico, I., Zhang, T. Y., Koenig, C. L., Branch, R. W., London, N., Lo, E., Daynes, R. A., Kushner, J. P., Li, D., Ward, D. M., & Kaplan, J. (2010). Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in

- mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(7), 2395–2405. <https://doi.org/10.1172/JCI42011>
- de Groot, N. S., Sabate, R., & Ventura, S. (2009). Amyloids in bacterial inclusion bodies. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(8), 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.03.009>
- De Marco, A., Ferrer-Miralles, N., Garcia-Fruitós, E., Mitraki, A., Peternel, S., Rinas, U., Trujillo-Roldán, M. A., Valdez-Cruz, N. A., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2019). Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(1), 53–72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy038>
- De Yang, B., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., & Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1069–1074. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1069>
- Denlinger, L. C., Fiset, P. L., Sommer, J. A., Watters, J. J., Prabhu, U., Dubyak, G. R., Proctor, R. A., & Bertics, P. J. (2001). Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(4), 1871–1876. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1871>
- Díaz, R., Troncoso, J., Jakob, E., & Skugor, S. (2021). “ Limiting access to iron decreases infection of Atlantic salmon SHK-1 cells with bacterium *Piscirickettsia salmonis* .” *BMC Veterinary Research*, 17(155), 1–11.
- Doyle, R. J. (2000). Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes and Infection*, 2(4), 391–400. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00328-2)
- Duarte-Mata, D. I., & Salinas-Carmona, M. C. (2023). Antimicrobial peptides’ immune modulation role in intracellular bacterial infection. *Frontiers in Immunology, Volume 14-2023*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1119574>
- Durell, S. R., & Ben-Naim, A. (2021). Temperature Dependence of Hydrophobic and Hydrophilic Forces and Interactions. *Journal of Physical Chemistry B*, 125(48), 13137–13146. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c07802>
- Ebrahimi, S. B., & Samanta, D. (2023). Engineering protein-based therapeutics through structural and chemical design. *Nature Communications*, 14(1), 2411. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38039-x>
- Fang, X., Nong, K., Wang, Z., Jin, Y., Gao, F., Zeng, Q., Wang, X., & Zhang, H. (2023). Human cathelicidin LL-37 exerts amelioration effects against EHEC O157:H7 infection regarding inflammation, enteric dysbacteriosis, and impairment of gut barrier function. *Peptides*, 159, 170903. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170903>
- FAO. (2024). *The State of World Fisheries and Aquaculture. Blue Transformation in action*.
- Ferenczy, G. G., & Kellermayer, M. (2022). Contribution of hydrophobic interactions to protein mechanical stability. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 1946–1956. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.04.025>

- Fernandes, J. M. O., Ruangsri, J., & Kiron, V. (2010). Atlantic Cod Piscidin and Its Diversification through Positive Selection. *PLOS ONE*, 5(3), e9501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009501>
- Figuerola, C., Torrealba, D., Morales-Lange, B., Mercado, L., Dixon, B., Conejeros, P., Silva, G., Soto, C., & Gallardo, J. A. (2022). Commercial Vaccines Do Not Confer Protection against Two Genogroups of *Piscirickettsia salmonis*, LF-89 and EM-90, in Atlantic Salmon. *Biology*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/biology11070993>
- Filonov, G. S., Piatkevich, K. D., Ting, L.-M., Zhang, J., Kim, K., & Verkhusha, V. V. (2011). Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. *Nature Biotechnology*, 29(8), 757–761. <https://doi.org/10.1038/nbt.1918>
- Fink, A. L. (1998). Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and Design*, 3(1), R9–R23. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(98\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(98)00002-9)
- Flajnik, M. F. (2018). A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 18(7), 438–453. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0003-9>
- Fleming, M. D. (2008). The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 151–158. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.151>
- Flores-Kossack, C., Montero, R., Köllner, B., & Maisey, K. (2020). Chilean aquaculture and the new challenges: Pathogens, immune response, vaccination and fish diversification. *Fish and Shellfish Immunology*, 98(December 2019), 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.093>
- Folgueira, I., Noia, M., Blanco-Abad, V., Mallo, N., Leiro, J., & Lamas, J. (2015). Particle size and traffic of phagocytes between the turbot peritoneal cavity and lymphoid organs. *Fish & Shellfish Immunology*, 44(2), 652–661. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.034>
- Forlenza, M., Fink, I. R., Raes, G., & Wiegertjes, G. F. (2011). Heterogeneity of macrophage activation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1246–1255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.008>
- Frenette, A. P., Rodríguez-Ramos, T., Zanuzzo, F., Ramsay, D., Semple, S. L., Soullière, C., Rodríguez-Cornejo, T., Heath, G., McKenzie, E., Iwanczyk, J., Bruder, M., Aucoin, M. G., Gamperl, A. K., & Dixon, B. (2023). Expression of Interleukin-1 β protein in vitro, ex vivo and in vivo salmonid models. *Developmental and Comparative Immunology*, 147(May). <https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.104767>
- Fryer, J. ., & Hedrick, R. . (2003). *Piscirickettsia salmonis*: A Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of Fish Diseases*, 251–262.
- Gan, Z., Chen, S. N., Huang, B., Zou, J., & Nie, P. (2020). Fish type I and type II interferons: composition, receptor usage, production and function. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 773–804. <https://doi.org/10.1111/raq.12349>
- Gao, J., Zhao, J., Guo, N., Tola, T., Xue, W., Cai, K., Yao, X., & Hu, M. (2024). Hepcidin defense patterns in intestine of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) against *Aeromonas hydrophila*

infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 155, 110003.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.110003>

- García-Fruitós, E., Arís, A., & Villaverde, A. (2007). Localization of functional polypeptides in bacterial inclusion bodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 289–294. <https://doi.org/10.1128/AEM.01952-06>
- García-Fruitós, E., Rodríguez-Carmona, E., Díez-Gil, C., Ferraz, R. M., Vázquez, E., Corchero, J. L., Cano-Sarabia, M., Ratera, I., Ventosa, N., Veciana, J., & Villaverde, A. (2009). Surface cell growth engineering assisted by a novel bacterial nanomaterial. *Advanced Materials*, 21(42), 4249–4253. <https://doi.org/10.1002/adma.200900283>
- García-Fruitós, E., Sabate, R., De Groot, N. S., Villaverde, A., & Ventura, S. (2011). Biological role of bacterial inclusion bodies: A model for amyloid aggregation. *FEBS Journal*, 278(14), 2419–2427. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08165.x>
- García-Fruitós, E., & Arís Giralt, A. (2022). *Insoluble Proteins* (2nd ed.). Humana New York, NY. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1859-2>
- García, G., Kim, M.-H., Morikis, V. A., & Simon, S. I. (2020). Neutrophil Inflammatory Response Is Downregulated by Uptake of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Therapeutics. *Frontiers in Immunology*, Volume 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.571489>
- Gatto, M. S., & Najahi-Missaoui, W. (2023). Lyophilization of Nanoparticles, Does It Really Work? Overview of the Current Status and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18). <https://doi.org/10.3390/ijms241814041>
- Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., & Madara, J. L. (2001). Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression1. *The Journal of Immunology*, 167(4), 1882–1885. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1882>
- Ghorai, S. M., & Priyam, M. (2018). Reptilia: Cellular immunity in reptiles: Perspective on elements of evolution. In *Advances in Comparative Immunology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0>
- Gifre-Renom, L., Carratalá, J. V., Parés, S., Sánchez-García, L., Ferrer-Miralles, N., Villaverde, A., Bach, A., García-Fruitós, E., & Arís, A. (2020). Potential of MMP-9 based nanoparticles at optimizing the cow dry period: pulling apart the effects of MMP-9 and nanoparticles. *Scientific Reports*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67176-2>
- Giri, S. S., Kim, S. G., Kang, J. W., Kim, S. W., Kwon, J., Lee, S. Bin, Jung, W. J., & Park, S. C. (2021). Applications of carbon nanotubes and polymeric micro-/nanoparticles in fish vaccine delivery: progress and future perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 13(4), 1844–1863. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12547>
- Gómez, F. A., Tobar, J. A., Henríquez, V., Sola, M., Altamirano, C., & Marshall, S. H. (2013). Evidence of the Presence of a Functional Dot/Icm Type IV-B Secretion System in the Fish Bacterial Pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054934>
- Gómez, F., Henríquez, V., & Marshall, S. (2009). Additional evidence of the facultative intracellular nature of the fish bacterial *Evidencia adicional de la naturaleza intracelular*

facultativa del patógeno bacteriano de peces *Piscirickettsia salmonis*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 267(41), 261–267.

- González-Fernández, C., García-Álvarez, M. A., & Cuesta, A. (2024). Identification and functional characterization of fish IL-17 receptors suggest important roles in the response to nodavirus infection. *Marine Life Science and Technology*, 6(2), 252–265. <https://doi.org/10.1007/s42995-024-00225-1>
- González-Montalbán, N., Villaverde, A., & Aris, A. (2006). Cellular toxicity triggered by bacterial inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*, 5(1), P9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-S1-P9>
- Gordon, S. (2007). The macrophage: Past, present and future. *European Journal of Immunology*, 37(SUPPL. 1), 9–17. <https://doi.org/10.1002/eji.200737638>
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5(12), 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
- Grayfer, L., Hodgkinson, J. W., Hitchen, S. J., & Belosevic, M. (2011). Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) interleukin-10. *Molecular Immunology*, 48(4), 563–571. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.10.013>
- Grayfer, L., Kerimoglu, B., Yaparla, A., Hodgkinson, J. W., Xie, J., & Belosevic, M. (2018). Mechanisms of fish macrophage antimicrobial immunity. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01105>
- Guerra, M. E. S., Vieira, B., Calazans, A. P. C. T., Destro, G. V., Melo, K., Rodrigues, E., Waz, N. T., Girardello, R., Darrieux, M., & Converso, T. R. (2024). Recent advances in the therapeutic potential of cathelicidins. *Frontiers in Microbiology, Volume 15-2024*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1405760>
- Guo, M., Wei, J., Huang, X., Huang, Y., & Qin, Q. (2012). Antiviral effects of β -defensin derived from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology*, 32(5), 828–838. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.02.005>
- Guo, X., Chen, H., Tong, Y., Wu, X., Tang, C., Qin, X., Guo, J., Li, P., Wang, Z., Liu, W., & Mo, J. (2024). A review on the antibiotic florfenicol: Occurrence, environmental fate, effects, and health risks. *Environmental Research*, 244(October 2023), 117934. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117934>
- Gupta, A., Gupta, S. K., Priyam, M., Siddik, M. A. B., Kumar, N., Mishra, P. K., Gupta, K. K., Sarkar, B., Sharma, T. R., & Pattanayak, A. (2021). Immunomodulation by dietary supplements: A preventive health strategy for sustainable aquaculture of tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Reviews in Aquaculture*, 13(4), 2364–2394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12581>
- Guryanova, S. V., Balandin, S. V., Belogurova-Ovchinnikova, O. Y., & Ovchinnikova, T. V. (2023). Marine Invertebrate Antimicrobial Peptides and Their Potential as Novel Peptide Antibiotics. In *Marine Drugs* (Vol. 21, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/md21100503>
- Gustafson, H. H., Holt-Casper, D., Grainger, D. W., & Ghandehari, H. (2015). Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today*, 10(4), 487–510.

<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.06.006>

- Hancock, R. E. W., & Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 8856–8861. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8856>
- Harte, A., Tian, G., Xu, Q., Secombes, C. J., & Wang, T. (2020). Five subfamilies of β -defensin genes are present in salmonids: Evolutionary insights and expression analysis in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Developmental & Comparative Immunology*, 104, 103560. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103560>
- Haugland, G. T., Rønneseth, A., & Wergeland, H. I. (2014). Flow cytometry analyses of phagocytic and respiratory burst activities and cytochemical characterization of leucocytes isolated from wrasse (*Labrus bergylta* A.). *Fish & Shellfish Immunology*, 39(1), 51–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.023>
- He, Y., Shen, Y., Feng, X., Ruan, S., Zhao, Y., Mu, L., Wu, J., & Yang, H. (2023). Tree Frog-Derived Cathelicidin Protects Mice against Bacterial Infection through Its Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activities and Regulatory Effect on Phagocytes. *ACS Infectious Diseases*, 9(11), 2252–2268. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00316>
- Hernandez-Garcia, A. (2021). Strategies to Build Hybrid Protein–DNA Nanostructures. In *Nanomaterials* (Vol. 11, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/nano11051332>
- Hillaireau, H., & Couvreur, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(17), 2873–2896. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0053-z>
- Hoffmann, F., Heuvel, J. van den, Zidek, N., & Rinas, U. (2004). Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(3), 235–241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.011>
- Hong, S., Li, R., Xu, Q., Secombes, C. J., & Wang, T. (2013). Two Types of TNF- α Exist in Teleost Fish: Phylogeny, Expression, and Bioactivity Analysis of Type-II TNF- α 3 in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Immunology*, 191(12), 5959–5972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301584>
- Hong, S., Zou, J., Crampe, M., Peddie, S., Scapigliati, G., Bols, N., Cunningham, C., & Secombes, C. J. (2001). The production and bioactivity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 β . *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(1–2), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00328-2)
- Hsu, C.-H., Chen, C., Jou, M.-L., Lee, A. Y.-L., Lin, Y.-C., Yu, Y.-P., Huang, W.-T., & Wu, S.-H. (2005). Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. *Nucleic Acids Research*, 33(13), 4053–4064. <https://doi.org/10.1093/nar/gki725>
- Huang, D., Cancilla, M. R., & Morahan, G. (2000). Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. *Genes & Immunity*, 1(8), 515–520. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363720>

- Hwang, J. H., Kim, K. J., Ryu, S. J., & Lee, B. Y. (2016). Caffeine prevents LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells and zebrafish. *Chemico-Biological Interactions*, 248, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.01.020>
- Hwang, P. M., Pan, J. S., & Sykes, B. D. (2014). Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 588(2), 247–252. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.09.028>
- Idicula-Thomas, S., & Balaji, P. V. (2007). Protein aggregation: A perspective from amyloid and inclusion-body formation. *Current Science*, 92(6), 758–767.
- Ingerslev, H.-C., Pettersen, E. F., Jakobsen, R. A., Petersen, C. B., & Wergeland, H. I. (2006). Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Immunology*, 43(8), 1194–1201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.07.009>
- Isla, A., Martinez-Hernandez, J. E., Levipan, H. A., Haussmann, D., Figueroa, J., Rauch, M. C., Maracaja-Coutinho, V., & Yañez, A. (2021). Development of a Multiplex PCR Assay for Genotyping the Fish Pathogen *Piscirickettsia salmonis* Through Comparative Genomics. *Frontiers in Microbiology*, 12(June), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673216>
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Ji, J., Torrealba, D., Thwaite, R., Gomez, A. C., Parra, D., & Roher, N. (2019). Nanostructured TNF α protein targets the zebrafish (*Danio rerio*) immune system through mucosal surfaces and improves the survival after *Mycobacterium marinum* lethal infection. *Aquaculture*, 510(May), 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.050>
- Ji, S., An, F., Zhang, T., Lou, M., Guo, J., Liu, K., Zhu, Y., Wu, J., & Wu, R. (2024). Antimicrobial peptides: An alternative to traditional antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 265, 116072. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.116072>
- Joo, H.-S., Fu, C.-I., & Otto, M. (2016). Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695), 20150292. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0292>
- Kabelka, I., & Vácha, R. (2021). Advances in Molecular Understanding of α -Helical Membrane-Active Peptides. *Accounts of Chemical Research*, 54(9), 2196–2204. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00047>
- Katzenback, B. A. (2015). Antimicrobial peptides as mediators of innate immunity in teleosts. *Biology*, 4(4), 607–639. <https://doi.org/10.3390/biology4040607>
- Khantakova, J. N., Bulygin, A. S., & Sennikov, S. V. (2022). The Regulatory-T-Cell Memory Phenotype: What We Know. *Cells*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/cells11101687>
- Kobayashi, Y. (2010). The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(6), 1157–1162. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310149>
- Kopp, J., Kolkmann, A.-M., Veleenturf, P. G., Spadiut, O., Herwig, C., & Slouka, C. (2019). Boosting Recombinant Inclusion Body Production—From Classical Fed-Batch Approach

to Continuous Cultivation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Volume 7-2019. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00297>

- Kordon, A. O., Abdelhamed, H., Ahmed, H., Baumgartner, W., Karsi, A., & Pinchuk, L. M. (2019). Assessment of the live attenuated and wild-type *edwardsiella ictaluri*-induced immune gene expression and langerhans-like cell profiles in the immune-related organs of catfish. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00392>
- Kordon, A. O., Pinchuk, L., & Karsi, A. (2021). Adaptive Immune System in Fish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(4). <https://doi.org/10.4194/TRJFAS20235>
- Krogdahl, Å., Sundby, A., & Holm, H. (2015). Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Enzyme pH optima, chyme pH, and enzyme activities. *Aquaculture*, 449, 27–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.032>
- Kubori, T., & Nagai, H. (2016). The Type IVB secretion system: an enigmatic chimera. *Current Opinion in Microbiology*, 29, 22–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.10.001>
- Kuliopulos, A., & Walsh, C. T. (1994). Production, Purification, and Cleavage of Tandem Repeats of Recombinant Peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 116(11), 4599–4607. <https://doi.org/10.1021/ja00090a008>
- Kum, C. (2011). *The Immune System Drugs in Fish: Immune Function, Immunoassay, Drugs* (F. Aral & Z. Dogu (eds.)). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/26869>
- Kumar, D. (2011). Protein Refolding/Renaturation. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00136-7>
- Kumari, S., & Booth, V. (2022). Antimicrobial Peptide Mechanisms Studied by Whole-Cell Deuterium NMR. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052740>
- Kusaka, T., Nakayama, M., Nakamura, K., Ishimiya, M., Furusawa, E., & Ogasawara, K. (2014). Effect of Silica Particle Size on Macrophage Inflammatory Responses. *PLOS ONE*, 9(3), e92634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092634>
- Kushnirov, V. V., Dergalev, A. A., & Alexandrov, A. I. (2020). Proteinase K resistant cores of prions and amyloids. *Prion*, 14(1), 11–19. <https://doi.org/10.1080/19336896.2019.1704612>
- Lafuente, E. M., Niedergang, F., & Rosales, C. (2020). Editorial: Phagocytosis: Molecular Mechanisms and Physiological Implications. *Frontiers in Immunology*, 11(September), 10–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.586918>
- Lee, H.-J., Lee, J., Lee, S.-K., Lee, S.-K., & Kim, E.-C. (2007). Differential regulation of iron chelator-induced IL-8 synthesis via MAP kinase and NF-κB in immortalized and malignant oral keratinocytes. *BMC Cancer*, 7(1), 176. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-176>
- Li, B., Liu, Z., Chen, S. N., Wang, K. L., Deng, Y. H., Pang, A. N., Liu, L. H., Zhang, S., Tian, J. Y., Ren, L., & Nie, P. (2024). Identification and function of type IV IFN in a cyprinid fish,

- the blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture*, 593, 741316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741316>
- Li, C.-H., Lu, X.-J., Li, M.-Y., & Chen, J. (2015). Cathelicidin modulates the function of monocytes/macrophages via the P2X7 receptor in a teleost, *Plecoglossus altivelis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 47(2), 878–885. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.031>
- Li, F., Wang, D., Zhou, J., Men, D., & Zhan, X.-E. (2020). Design and biosynthesis of functional protein nanostructures. *Science China Life Sciences*, 63(8), 1142–1158. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-1641-6>
- Li, K., Wei, X., & Yang, J. (2023). Cytokine networks that suppress fish cellular immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 147(May), 104769. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.104769>
- Li, X., Jiang, B., Zhang, Z., Huang, M., Feng, J., Huang, Y., Amoah, K., Huang, Y., & Jian, J. (2023). Interleukin-8 involved in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) against bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 141, 109004. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.109004>
- Li, Y. (2011). Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. *Protein Expression and Purification*, 80(2), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.001>
- Li, Z., Lin, S., Zhu, M., Liu, X., & Huang, X. (2025). Enhanced Antibacterial Activity of Hydrophobic Modified Lysozyme Against Gram-Negative Bacteria Without Accumulated Resistance. In *Molecules* (Vol. 30, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/molecules30020232>
- Liu, G., & Yang, H. (2013). Modulation of macrophage activation and programming in immunity. *Journal of Cellular Physiology*, 228(3), 502–512. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcp.24157>
- Liu, M., Hu, R., Li, W., Yang, W., Xu, Q., & Chen, L. (2022). Identification of Antibacterial Activity of Hepcidin From Antarctic Notothenioid Fish. *Frontiers in Microbiology*, 13(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.834477>
- Liu, S., Tobias, R., McClure, S., Styba, G., Shi, Q., & Jackowski, G. (1997). Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clinical Biochemistry*, 30(6), 455–463. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(97\)00049-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(97)00049-0)
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López-Cano, A., Martínez-Miguel, M., Guasch, J., Ratera, I., Arís, A., & Garcia-Fruitós, E. (2022). Exploring the impact of the recombinant *Escherichia coli* strain on defensins antimicrobial activity: BL21 versus Origami strain. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01803-7>
- Lukhele, S., Boukhaled, G. M., & Brooks, D. G. (2019). Type I interferon signaling, regulation and gene stimulation in chronic virus infection. *Seminars in Immunology*, 43, 101277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.05.001>

- Lyu, Z., Yang, P., Lei, J., & Zhao, J. (2023). Biological Function of Antimicrobial Peptides on Suppressing Pathogens and Improving Host Immunity. *Antibiotics*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061037>
- Maier, V. H., Dorn, K. V, Gudmundsdottir, B. K., & Gudmundsson, G. H. (2008). Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. *Molecular Immunology*, 45(14), 3723–3730. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.06.002>
- Maisey, K., Montero, R., & Christodoulides, M. (2017). Vaccines for piscirickettsiosis (salmonid rickettsial septicaemia, SRS): the Chile perspective. *Expert Review of Vaccines*, 16(3), 215–228. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1244483>
- Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A., Singru, P. S., Nilsson, K. P. R., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W., & Riek, R. (2009). Functional Amyloids As Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science*, 325(5938), 328–332. <https://doi.org/10.1126/science.1173155>
- Mardones, F. O., Paredes, F., Medina, M., Tello, A., Valdivia, V., Ibarra, R., Correa, J., & Gelcich, S. (2018). Identification of research gaps for highly infectious diseases in aquaculture: The case of the endemic *Piscirickettsia salmonis* in the Chilean salmon farming industry. *Aquaculture*, 482(January 2017), 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.048>
- Margreiter, G., Messner, P., Caldwell, K. D., & Bayer, K. (2008). Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation. *Journal of Biotechnology*, 138(3), 67–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1995>
- Martin, S. A. M., Taggart, J. B., Seear, P., Bron, J. E., Talbot, R., Teale, A. J., Sweeney, G. E., Høyheim, B., Houlihan, D. F., Tocher, D. R., Zou, J., & Secombes, C. J. (2007). Interferon type I and type II responses in an Atlantic salmon (*Salmo salar*) SHK-1 cell line by the salmon TRAITS/SGP microarray. *Physiological Genomics*, 32(1), 33–44. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00064.2007>
- Martínez, D., Díaz-Ibarrola, D., Vargas-Lagos, C., Oyarzún, R., Pontigo, J. P., Muñoz, J. L. P., Yáñez, A. J., & Vargas-Chacoff, L. (2018). Immunological response of the Sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus* injected with two strains of *Piscirickettsia salmonis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 75, 139–148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.012>
- Masso-Silva, J. A., & Diamond, G. (2014). Antimicrobial Peptides from Fish. *Pharmaceuticals*, 7(3), 265–310. <https://doi.org/10.3390/ph7030265>
- Mauel, M. J., & Miller, D. L. (2002). Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: a review. *Veterinary Microbiology*, 87(4), 279–289. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00085-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00085-8)
- McCarthy, Ú. M., Bron, J. E., Brown, L., Pourahmad, F., Bricknell, I. R., Thompson, K. D., Adams, A., & Ellis, A. E. (2008). Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(5), 477–484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.005>

- Mechlaoui, M., Nordstrand, E., Strandskog, G., Jensen, I., & Seternes, T. (2025). Vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) maintain a specific antibody response throughout the seasonal fluctuations of a full commercial production cycle in sea: a case study. *Aquaculture*, 595(P1), 741536. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741536>
- Mehri, N., Jamshidizad, A., Ghanei, Z., Karkhane, A. A., & Shamsara, M. (2021). Optimizing the Expression and Solubilization of an E. coli-Produced Leukemia Inhibitory Factor for Anti-LIF Antibody Production and Use Thereof for Contraception in Mice. *Molecular Biotechnology*, 63(12), 1169–1182. <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00369-w>
- Miao, H., Wang, L., Wu, Q., & Huang, Z. (2024). Antimicrobial Peptides: Mechanism, Expressions, and Optimization Strategies. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 857–872. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10391-4>
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Mohamad Alias, N. N., Beng Ong, E. B., & Liew, M. W. O. (2025). Removal and monitoring of residual nucleic acids from core streptavidin inclusion bodies for increased refolding yield. *Protein Expression and Purification*, 225, 106591. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106591>
- Mokhtar, D. M., Zacccone, G., Alesci, A., Kuciel, M., Hussein, M. T., & Sayed, R. K. A. (2023). Main Components of Fish Immunity: An Overview of the Fish Immune System. *Fishes*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/fishes8020093>
- Montesino, R., Gutiérrez, N., Camacho, F., Farnós, O., Andrades, S., González, A., Acosta, J., Cortez-San Martín, M., Sánchez, O., Ruiz, A., & Toledo, J. R. (2019). Multi-antigenic recombinant subunit vaccine against *Lawsonia intracellularis*: The etiological agent of porcine proliferative enteropathy. *Vaccine*, 37(10), 1340–1349. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.029>
- Moorcroft, S. C. T., Roach, L., Jayne, D. G., Ong, Z. Y., & Evans, S. D. (2020). Nanoparticle-Loaded Hydrogel for the Light-Activated Release and Photothermal Enhancement of Antimicrobial Peptides. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(22), 24544–24554. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b22587>
- Morales-Lange, B., Nombela, I., Ortega-Villaizán, M. D. M., Imarai, M., Schmitt, P., & Mercado, L. (2021). Induction of foxp3 during the crosstalk between antigen presenting like-cells mhci+ cd83+ and splenocytes cd4+ igm- in rainbow trout. *Biology*, 10(4), 1–11. <https://doi.org/10.3390/biology10040324>
- Morera, F. J., Castro-Guarda, M., Nualart, D., Espinosa, G., Muñoz, J. L., & Vargas-Chacoff, L. (2021). The biological basis of smoltification in Atlantic salmon. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 53(1), 73–82. <https://doi.org/10.4067/S0719-81322021000100073>
- Muñoz-Flores, C., Astuya-Villalón, A., Romero, A., Acosta, J., & Toledo, J. R. (2022). Salmonid MyD88 is a key adapter protein that activates innate effector mechanisms through the TLR5M/TLR5S signaling pathway and protects against *Piscirickettsia salmonis* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 121, 387–394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.030>

- Murugan, K., Choonara, Y. E., Kumar, P., Bijukumar, D., du Toit, L. C., & Pillay, V. (2015). Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2191–2206. <https://doi.org/10.2147/IJN.S75615>
- Nahálka, J., Vikartovská, A., & Hrabárová, E. (2008). A crosslinked inclusion body process for sialic acid synthesis. *Journal of Biotechnology*, 134(1), 146–153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.01.014>
- Neves, J. V., Caldas, C., Vieira, I., Ramos, M. F., & Rodrigues, P. N. S. (2015). Multiple Hepcidins in a Teleost Fish, *Dicentrarchus labrax*: Different Hepcidins for Different Roles. *The Journal of Immunology*, 195(6), 2696–2709. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501153>
- Neves, J. V., Ramos, M. F., Moreira, A. C., Silva, T., Gomes, M. S., & Rodrigues, P. N. S. (2017). Hamp1 but not Hamp2 regulates ferroportin in fish with two functionally distinct hepcidin types. *Scientific Reports*, 7(1), 14793. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14933-5>
- Nonaka, M., & Smith, S. L. (2000). Complement system of bony and cartilaginous fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(3), 215–228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fsim.1999.0252>
- Nualart, D. P., Dann, F., Oyarzún-Salazar, R., Morera, F. J., & Vargas-Chacoff, L. (2023). Immune Transcriptional Response in Head Kidney Primary Cell Cultures Isolated from the Three Most Important Species in Chilean Salmonids Aquaculture. In *Biology* (Vol. 12, Issue 7, p. 924). <https://doi.org/10.3390/biology12070924>
- Ogryzko, N. V., Renshaw, S. A., & Wilson, H. L. (2014). The IL-1 family in fish: Swimming through the muddy waters of inflammasome evolution. *Developmental & Comparative Immunology*, 46(1), 53–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.008>
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Jordal, A. O., Nilsen, T. O., & Hordvik, I. (2005). *Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon*. 9, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-6-21>
- Ortiz-Severín, J., Tandberg, J. I., Winther-Larsen, H. C., Chávez, F. P., & Cambiazo, V. (2021). Comparative Analysis of Salmon Cell Lines and Zebrafish Primary Cell Cultures Infection with the Fish Pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Microorganisms*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122516>
- Øverland, H. S., Pettersen, E. F., Rønneseth, A., & Wergeland, H. I. (2010). Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 28(1), 193–204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.10.021>
- Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., & Manavalan, R. (2011). 2011-JAPS-1(6)-228.pdf. 01(06), 228–234.
- Palmer, I., & Wingfield, P. T. (2012). Preparation and extraction of insoluble (Inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*, 1(SUPPL.70), 1–25. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0603s70>

- Palstra, A. P., Kals, J., Garcia, A. B., Dirks, R. P., & Poelman, M. (2018). Immunomodulatory effects of dietary seaweeds in LPS challenged Atlantic Salmon *Salmo salar* as determined by deep RNA sequencing of the head kidney transcriptome. *Frontiers in Physiology*, 9(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00625>
- Pandidan, S., & Mechler, A. (2021). Latest developments on the mechanism of action of membrane disrupting peptides. *Biophysics Reports*, 7(3), 173–184. <https://doi.org/10.52601/bpr.2021.200037>
- Parlane, N., Katrin, G., Lee, J., Buddle, B., Michel, D., & Rehm, B. H. (2011). Production of a Particulate Hepatitis C Vaccine Candidate by an Engineered *Lactococcus lactis* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(24), 8516–8522. <https://doi.org/10.1128/AEM.06420-11>
- Parra, M., Espinoza, D., Valdes, N., Vargas, R., Gonzalez, A., Modak, B., & Tello, M. (2020). Microbiota modulates the immunomodulatory effects of filifolinone on atlantic salmon. *Microorganisms*, 8(9), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091320>
- Pashaie, F., Benne, N., Holzapfel, P. I. P., Veenendaal, T., Bikker, F. J., Heesterbeek, D. A. C., Broere, F., & Veldhuizen, E. J. A. (2025a). Microbial Pathogenesis PMAP-37: A versatile cathelicidin for neutralizing bacteria and viruses. *Microbial Pathogenesis*, 204(January), 107568. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107568>
- Pashaie, F., Benne, N., Holzapfel, P. I. P., Veenendaal, T., Bikker, F. J., Heesterbeek, D. A. C., Broere, F., & Veldhuizen, E. J. A. (2025b). PMAP-37: A versatile cathelicidin for neutralizing bacteria and viruses. *Microbial Pathogenesis*, 204, 107568. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107568>
- Peddie, S., Zou, J., Cunningham, C., & Secombes, C. J. (2001). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 β and derived peptides induce migration of head-kidney leucocytes in vitro. *Fish and Shellfish Immunology*, 11(8), 697–709. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0348>
- Peng, L., Scheenstra, M. R., van Harten, R. M., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. A. (2020). The immunomodulatory effect of cathelicidin-B1 on chicken macrophages. *Veterinary Research*, 51(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00849-y>
- Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., & Balcázar, J. L. (2018). Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. *Trends in Microbiology*, 26(11), 896–903. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>
- Peternel, Š., Bele, M., Gaberc-Porekar, V., & Menart, V. (2006). Nonclassical inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 5(1), P23. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-S1-P23>
- Pietretti, D., & Wiegertjes, G. F. (2014). Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: Indications from infection studies. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(2), 205–222. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.010>
- Pillai-kastoori, L., Schutz-geschwender, A. R., & Harford, J. A. (2020). A systematic approach to quantitative Western blot analysis. 593(August 2019). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113608>

- Pogue, R., Murphy, E. J., Fehrenbach, G. W., Rezoagli, E., & Rowan, N. J. (2021). Exploiting immunomodulatory properties of β -glucans derived from natural products for improving health and sustainability in aquaculture-farmed organisms: Concise review of existing knowledge, innovation and future opportunities. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 21, 100248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100248>
- Pontigo, J. P., Espinoza, C., Hernandez, M., Nourdin, G., Oliver, C., Avendaño-Herrera, R., Figueroa, J., Rauch, C., Troncoso, J. M., Vargas-Chacoff, L., & Yáñez, A. J. (2021). Protein-Based Vaccine Protect Against *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Immunology*, 12(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.602689>
- Raju, S. V., Sarkar, P., Kumar, P., & Arockiaraj, J. (2021). Piscidin, Fish Antimicrobial Peptide: Structure, Classification, Properties, Mechanism, Gene Regulation and Therapeutical Importance. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 91–107. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10068-w>
- Ramírez, R., Gómez, F. A., & Marshall, S. H. (2015). The infection process of *Piscirickettsia salmonis* in fish macrophages is dependent upon interaction with host-cell clathrin and actin. *FEMS Microbiology Letters*, 362(1). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu012>
- Ramón, A., Señorale-Pose, M., & Marín, M. (2014). Inclusion bodies: Not that bad... *Frontiers in Microbiology*, 5(FEB), 2010–2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00056>
- Rani, A. K., Katiyar, R., & Rathore, A. S. (2024). Bioprocessing of inclusion bodies from *E. coli* to produce bioactive recombinant proteins. *Biochemical Engineering Journal*, 203(December 2023), 109188. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109188>
- Rani, A. K., Naira, V. R., & Rathore, A. S. (2023). *Method for Inclusion Bodies Production via E. coli Host System: rGCSF as Model Biotherapeutic Protein BT - Inclusion Bodies: Methods and Protocols* (J. Kopp & O. Spadiut (eds.); pp. 249–256). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2930-7_18
- Rashidian, G., Moosazadeh Moghaddam, M., Mirnejad, R., & Mohammadi Azad, Z. (2021). Supplementation of zebrafish (*Danio rerio*) diet using a short antimicrobial peptide: Evaluation of growth performance, immunomodulatory function, antioxidant activity, and disease resistance. *Fish & Shellfish Immunology*, 119, 42–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.09.035>
- Reyes-cerpa, S., Maisey, K., Reyes-lópez, F., Toro-ascuy, D., Sandino, A. M., & Imarai, M. (2013). Fish Cytokines and Immune Response. *INTECH*, 3–58.
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology*, 148(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Rima, M., Rima, M., Fajloun, Z., Sabatier, J.-M., Bechinger, B., & Naas, T. (2021). Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. In *Antibiotics* (Vol. 10, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091095>
- Rinas, U., & Bailey, J. E. (1992). Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 609–614. <https://doi.org/10.1007/BF00240735>

- Rinas, U., Garcia-Fruitós, E., Corchero, J. L., Vázquez, E., Seras-Franzoso, J., & Villaverde, A. (2017). Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(9), 726–737. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.005>
- Rodrigues, T., Guardiola, F. A., Almeida, D., & Antunes, A. (2025). Aquatic Invertebrate Antimicrobial Peptides in the Fight Against Aquaculture Pathogens. In *Microorganisms* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms13010156>
- Rodríguez, V., Asenjo, J. A., & Andrews, B. A. (2014). Design and implementation of a high yield production system for recombinant expression of peptides. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-65>
- Rojas-Peña, M., Aceituno, P., Salvador, M. E., Garcia-Ordoñez, M., Teles, M., Ortega-Villaizan, M. del M., Perez, L., & Roher, N. (2022). How modular protein nanoparticles may expand the ability of subunit anti-viral vaccines: The spring viremia carp virus (SVCV) case. *Fish and Shellfish Immunology*, 131(October), 1051–1062. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.10.067>
- Rojas, V., Galanti, N., Bols, N., Jiménez, V., Paredes, R., & Marshall, S. (2010). Piscirickettsia salmonis induces apoptosis in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(2), 468–476. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.22560>
- Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P., & Pollini, S. (2014). Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 56–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.006>
- Rozas-Serri, M. (2022). Why Does Piscirickettsia salmonis Break the Immunological Paradigm in Farmed Salmon? Biological Context to Understand the Relative Control of Piscirickettsiosis. *Frontiers in Immunology*, 13(March), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.856896>
- Rozas-Serri, M., Ildefonso, R., Peña, A., Enríquez, R., Barrientos, S., & Maldonado, L. (2017). Comparative pathogenesis of piscirickettsiosis in Atlantic salmon (Salmo salar L.) post-smolt experimentally challenged with LF-89-like and EM-90-like Piscirickettsia salmonis isolates. *Journal of Fish Diseases*, 40(10), 1451–1472. <https://doi.org/10.1111/jfd.12671>
- Rozas-Serri, M., Kani, T., Jaramillo, V., Correa, R., Ildefonso, R., Rabascall, C., Barrientos, S., Coñuecar, D., & Peña, A. (2024). Current vaccination strategy against Piscirickettsia salmonis in Chile based only on the EM-90 genogroup shows incomplete cross-protection for the LF-89 genogroup. *Fish & Shellfish Immunology*, 154, 109893. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109893>
- Rozas-Serri, M., Peña, A., Arriagada, G., Enríquez, R., & Maldonado, L. (2018). Comparison of gene expression in post-smolt Atlantic salmon challenged by LF-89-like and EM-90-like Piscirickettsia salmonis isolates reveals differences in the immune response associated with pathogenicity. *Journal of Fish Diseases*, 41(3), 539–552. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfd.12756>
- Rozas-Serri, M., Peña, A., & Maldonado, L. (2018). Transcriptomic profiles of post-smolt Atlantic salmon challenged with Piscirickettsia salmonis reveal a strategy to evade the adaptive immune response and modify cell-autonomous immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 81, 348–362.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.12.023>

- Rozas, M., & Enríquez, R. (2014). Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: A review. *Journal of Fish Diseases*, 37(3), 163–188. <https://doi.org/10.1111/jfd.12211>
- Ruangsri, J., Kitani, Y., Kiron, V., Lokesh, J., Brinchmann, M. F., Karlsen, B. O., & Fernandes, J. M. O. (2013). A Novel Beta-Defensin Antimicrobial Peptide in Atlantic Cod with Stimulatory Effect on Phagocytic Activity. *PLOS ONE*, 8(4), e62302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062302>
- Rüdiger, A. A., Brassat, K., Lindner, J. K. N., Bremser, W., & Strube, O. I. (2018). Easily Accessible Protein Nanostructures via Enzyme Mediated Addressing. *Langmuir*, 34(14), 4264–4270. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04089>
- Ryu, S. J., Choi, H. S., Yoon, K. Y., Lee, O. H., Kim, K. J., & Lee, B. Y. (2015). Oleuropein suppresses LPS-induced inflammatory responses in RAW 264.7 Cell and zebrafish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 2098–2105. <https://doi.org/10.1021/jf505894b>
- Sakai, M., & Tomoya, H. (2021). Fish cytokines: current research and applications. *Fisheries Science*, 87(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01476-4>
- Salinas-Parra, N., Torrealba, D., Ahumada, A., Figueroa, C., & Gallardo-Matus, J. (2025). Cell lines and primary cultures uses for vaccine development for bacterial pathogens of fish: a systematic review. *Fish & Shellfish Immunology*, 166, 110625. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2025.110625>
- Salinas, I., Zhang, Y.-A., & Sunyer, J. O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1346–1365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.009>
- Salvado, M. D., Di Gennaro, A., Lindbom, L., Agerberth, B., & Haeggström, J. Z. (2013). Cathelicidin LL-37 Induces Angiogenesis via PGE2–EP3 Signaling in Endothelial Cells, In Vivo Inhibition by Aspirin. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(8), 1965–1972. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301851>
- Sani, M. A., & Separovic, F. (2016). How Membrane-Active Peptides Get into Lipid Membranes. *Accounts of Chemical Research*, 49(6), 1130–1138. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00074>
- Santana, P. A., Salinas, N., Álvarez, C. A., Mercado, L. A., & Guzmán, F. (2018). Alpha-helical domain from IL-8 of salmonids: Mechanism of action and identification of a novel antimicrobial function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(4), 803–809. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.061>
- Santana, P., Claudia, P., Edgar, N., Fanny, G., José, G., & Luis, M. (2012). Anti-peptide antibodies: A tool for detecting IL-8 in salmonids. *Journal of Biotechnology*, 15(5). <https://doi.org/10.2225/vol15-issue5-fulltext-15>
- Sayed, R. K. A., Zacccone, G., Capillo, G., Albano, M., & Mokhtar, D. M. (2022). Structural and Functional Aspects of the Spleen in Molly Fish *Poecilia sphenops* (Valenciennes, 1846): Synergistic Interactions of Stem Cells, Neurons, and Immune Cells. In *Biology* (Vol. 11, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/biology11050779>

- Scheenstra, M. R., van Harten, R. M., Veldhuizen, E. J. A., Haagsman, H. P., & Coorens, M. (2020). Cathelicidins Modulate TLR-Activation and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 11(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01137>
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(5), 878–888. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>
- Schettters, S. T. T., Jong, W. S. P., Kruijssen, L. J. W., van den Berg van Saparoea, H. B., Engels, S., Unger, W. W. J., Houben, D., den Haan, J. M. M., Luirink, J., & Kooyk, Y. van. (2020). Bacterial inclusion bodies function as vehicles for dendritic cell-mediated T cell responses. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(4), 415–417. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0298-x>
- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., & Franceschi, F. (2001). Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature*, 413(6858), 814–821. <https://doi.org/10.1038/35101544>
- Schmidt, F. R. (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4), 425–435. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0003-0>
- Schromm, A. B., Brandenburg, K., Rietschel, E. T., Flad, H.-D., Carroll, S. F., & Seydel, U. (1996). Lipopolysaccharide-binding protein mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Letters*, 399(3), 267–271. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01338-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01338-5)
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., & Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(5), 519–542. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
- Scocchi, M., Pallavicini, A., Salgaro, R., Bociek, K., & Gennaro, R. (2009). The salmonid cathelicidins: A gene family with highly varied C-terminal antimicrobial domains. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 152(4), 376–381. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.01.003>
- Secombes, C. J., Wang, T., & Bird, S. (2011). The interleukins of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1336–1345. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.05.001>
- Sernapesca. (2024). *Chile, desembarque total por especie y región*. <https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fwww.sernapesca.cl%2Fapp%2Fuploads%2F2025%2F05%2FDesembarque-total-por-region-2024.xlsx&wdOrigin=BROWSELINK>
- Sernapesca. (2025a). *Informe con antecedentes sanitarios de agua dulce y de mar, Año 2024* (pp. 1–59).
- Sernapesca. (2025b). *INFORME SOBRE USO DE ANTIMICROBIANOS EN LA SALMONICULTURA NACIONAL*.

- Shad, M., Liaqat, A., Nazir, A., Hussain, N., & Yaqoob, K. (2025). Exploration of Comprehensive Structural and Functional Potential of Recombinant Proteins Using Cutting-Edge Bioinformatics Tools. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 197, 7015–7043. <https://doi.org/10.1007/s12010-025-05366-2>
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462(1), 55–70. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00200-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00200-X)
- Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Gupta, G., & Chaudhary, A. (2017). Immunomodulators: Role of medicinal plants in immune system. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 7(6), 552–556. <https://doi.org/10.5455/njppp.2017.7.0203808032017>
- Sharma, Y., Arora, M., & Bala, K. (2024). The potential of immunomodulators in shaping the future of healthcare. *Discover Medicine*, 1(1), 37. <https://doi.org/10.1007/s44337-024-00029-3>
- Shcherbakova, D. M., Baloban, M., & Verkhusha, V. V. (2015). Near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 27, 52–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.005>
- Shcherbo, D., Shemiakina, I. I., Ryabova, A. V., Luker, K. E., Schmidt, B. T., Souslova, E. A., Gorodnicheva, T. V., Strukova, L., Shidlovskiy, K. M., Britanova, O. V., Zaisky, A. G., Lukyanov, K. A., Loschenov, V. B., Luker, G. D., & Chudakov, D. M. (2010). Near-infrared fluorescent proteins. *Nature Methods*, 7(10), 827–829. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1501>
- Shin, Y. D., & Landauer, K. (2023). *Manufacturing of Recombinant Proteins Using Quality by Design (QbD) Methodology: Current Trend and Challenges BT - Biopharmaceutical Manufacturing: Progress, Trends and Challenges* (R. Pörtner (ed.); pp. 279–296). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-45669-5_9
- Singh, A., Upadhyay, V., Singh, A., & Panda, A. K. (2020). Structure-Function Relationship of Inclusion Bodies of a Multimeric Protein. *Frontiers in Microbiology*, 11(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00876>
- Singhvi, P., Saneja, A., Srichandan, S., & Panda, A. K. (2020). Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. *Trends in Biotechnology*, 38(5), 474–486. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.011>
- Sirsat, S. D., Shubhangi, S., Domple, V. D., Saini, L. K., & Raut, L. S. (2024). Applications of Antimicrobial peptides in Veterinary Medicine. *Indian Farmer*, 11(9), 386–390. <https://archives.tpnsindia.org/index.php/sipn/article/view/8043>
- Smith, N. C., Rise, M. L., & Christian, S. L. (2019). A Comparison of the Innate and Adaptive Immune Systems in Cartilaginous Fish, Ray-Finned Fish, and Lobe-Finned Fish. *Frontiers in Immunology*, 10(October). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02292>
- Smith, P. A., Pizarro, P., Ojeda, P., Contreras, J., Oyanedel, S., & Larenas, J. (1999). Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37(3), 165–172. <https://doi.org/10.3354/dao037165>

- Soares, M. P., & Hamza, I. (2016). Macrophages and Iron Metabolism. *Immunity*, 44(3), 492–504. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.016>
- Sogo, T., Kawahara, M., Ueda, H., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H., & Nagamune, T. (2009). T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. *Cytokine*, 46(1), 127–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.12.020>
- Strandberg, L., & Enfors, S. O. (1991). Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1669–1674. <https://doi.org/10.1128/aem.57.6.1669-1674.1991>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- SUBPESCA. (2025). *Informe Sectorial De Pesca Y Acuicultura*.
- Sukhovskaya, I. V, Tsekova, A. A., Kantserova, N. P., Balan, O. V, Kuchko, T. Y., Matrosova, S. V, Belyaev, A. N., & Lysenko, L. A. (2025). LPS-Induced Inflammation and Preconditioning in Rainbow Trout: Markers of Innate Immunity and Oxidative Stress. In *Animals* (Vol. 15, Issue 24, p. 3589). <https://doi.org/10.3390/ani15243589>
- Swain, P., Nayak, S. K., Nanda, P. K., & Dash, S. (2008). Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(3), 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.04.009>
- Swami, R., & Shahiwala, A. (2013). Impact of physiochemical properties on pharmacokinetics of protein therapeutics. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 38(4), 231–239. <https://doi.org/10.1007/s13318-013-0126-0>
- Tafalla, C. (2025). Understanding fish B cell responses to combat infectious diseases. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 45(1), 1–11.
- Talbot, A., Gargan, L., Moran, G., Prudent, L., O'Connor, I., Mirimin, L., Carlsson, J., & MacCarthy, E. (2021). Investigation of the transcriptomic response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) gill exposed to *Paramoeba perurans* during early onset of disease. *Scientific Reports*, 11(1), 20682. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99996-1>
- Tarhini, M., Greige-Gerges, H., & Elaissari, A. (2017). Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. *International Journal of Pharmaceutics*, 522(1–2), 172–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.067>
- Thwaite, R., Ji, J., Torrealba, D., Coll, J., Sabés, M., Villaverde, A., & Roher, N. (2018). Protein nanoparticles made of recombinant viral antigens: A promising biomaterial for oral delivery of Fish Prophylactics. *Frontiers in Immunology*, 9(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01652>
- Torrealba, D., López, D., Zelada, P., Salinas-Parra, N., Valenzuela-Avilés, P., Garcia-Fruitós, E., Arís, A., Mercado, L., Altamirano, C., & Gallardo-Matus, J. (2024). Immunomodulation Evidence of Nanostructured Recombinant Proteins in Salmonid Cells. *Animals*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/ani14060844>
- Torrealba, D., Parra, D., Seras-Franzoso, J., Vallejos-Vidal, E., Yero, D., Gibert, I., Villaverde,

- A., Garcia-Fruitós, E., & Roher, N. (2016). Nanostructured recombinant cytokines: A highly stable alternative to short-lived prophylactics. *Biomaterials*, 107, 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.08.043>
- Torrealba, D., Seras-Franzoso, J., Mamat, U., Wilke, K., Villaverde, A., Roher, N., & Garcia-Fruitós, E. (2016). Complex particulate biomaterials as immunostimulant-delivery platforms. *PLoS ONE*, 11(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164073>
- Torrealba, D., Seras-Franzoso, J., Mamat, U., Wilke, K., Villaverde, A., Roher, N., & Garcia-Fruitós, E. (2016). Complex Particulate Biomaterials as Immunostimulant-Delivery Platforms. *PLOS ONE*, 11(10), e0164073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164073>
- Uma, A. (2025). *Pathogen and Disease Transmission in Aquatic Animals BT - Management of Fish Diseases* (S. K. Mallik, N. Shahi, & P. K. Pandey (eds.); pp. 19–55). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-96-0270-4_2
- Upadhyay, A. K., Murmu, A., Singh, A., & Panda, A. K. (2012). Kinetics of Inclusion Body Formation and Its Correlation with the Characteristics of Protein Aggregates in *Escherichia coli*. *PLOS ONE*, 7(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033951>
- Valenzuela-Aviles, P., Torrealba, D., Figueroa, C., Mercado, L., Dixon, B., Conejeros, P., & Gallardo-Matus, J. (2022). Why vaccines fail against *Piscirickettsiosis* in farmed salmon and trout and how to avoid it: A review. *Frontiers in Immunology*, 13(November), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1019404>
- Valero, Y., Saraiva-Fraga, M., Costas, B., & Guardiola, F. A. (2020). Antimicrobial peptides from fish: beyond the fight against pathogens. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 224–253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12314>
- Van Dijk, A., Van Eldik, M., Veldhuizen, E. J. A., Tjeerdsma-Van Bokhoven, H. L. M., De Zoete, M. R., Bikker, F. J., & Haagsman, H. P. (2016). Immunomodulatory and anti-inflammatory activities of chicken cathelicidin-2 derived peptides. *PLoS ONE*, 11(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147919>
- Vázquez, E., Corchero, J. L., Burgueño, J. F., Seras-Franzoso, J., Kosoy, A., Bosser, R., Mendoza, R., Martínez-Láinez, J. M., Rinas, U., Fernández, E., Ruiz-Avila, L., García-Fruitós, E., & Villaverde, A. (2012). Functional Inclusion Bodies Produced in Bacteria as Naturally Occurring Nanopills for Advanced Cell Therapies. *Advanced Materials*, 24(13), 1742–1747. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.201104330>
- Vera, A., González-Montalbán, N., Arís, A., & Villaverde, A. (2007). The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(6), 1101–1106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.21218>
- Vergadi, E., Ieronymaki, E., Lyroni, K., Vaporidi, K., & Tsatsanis, C. (2017). Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *The Journal of Immunology*, 198(3), 1006–1014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601515>
- Villar-Piqué, A., & Ventura, S. (2014). INCLUSION BODIES IN THE STUDY OF AMYLOID AGGREGATION. In S. Doglia & M. Lotti (Eds.), *Protein Aggregation in Bacteria: Functional and Structural Properties of Inclusion Bodies in Bacterial Cells* (1st ed., pp. 93–116). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118845363.ch4>

- Villaverde, A. (2012). Bacterial inclusion bodies: An emerging platform for drug delivery and cell therapy. *Nanomedicine*, 7(9), 1277–1279. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.100>
- Villaverde, A., García-Fruitós, E., Rinas, U., Seras-Franzoso, J., Kosoy, A., Corchero, J. L., & Vazquez, E. (2012). Packaging protein drugs as bacterial inclusion bodies for therapeutic applications. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 76. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-76>
- Wang, wen bin, Liu, lei, Guo, shan shan, Yuan, qian yun, Lu, shuai chen, Shu, liu quan, & Pan, saikun. (2022). Recombinant expression and immunogenicity evaluation of a TonB-dependent receptor of *Vibrio parahaemolyticus*. *Protein Expression and Purification*, 197(February), 106111. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106111>
- Wang T, Mai K, & Ai Q. (2016). A Review of Cyclooxygenase-2 Role in Fish. *Austin J Nutr Metab*, 3(1), 1–6.
- Wedrychowicz, H., Kesik, M., Kaliniak, M., Kozak-Cieszczyk, M., Jedlina-Panasiuk, L., Jaros, S., & Plucienniczak, A. (2007). Vaccine potential of inclusion bodies containing cysteine proteinase of *Fasciola hepatica* in calves and lambs experimentally challenged with metacercariae of the fluke. *Veterinary Parasitology*, 147(1–2), 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.023>
- Wilhelm, V., Miquel, A., Burzio, L. O., Roseblatt, M., Engel, E., Valenzuela, S., Parada, G., & Valenzuela, P. D. T. (2006). A vaccine against the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* based on recombinant proteins. *Vaccine*, 24(23), 5083–5091. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.03.027>
- Wu, C., Dai, Y., Yuan, G., Su, J., & Liu, X. (2019). Immunomodulatory effects and induction of apoptosis by different molecular weight chitosan oligosaccharides in head kidney macrophages from blunt snout bream (*megalobrama amblycephala*). *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00869>
- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), 445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Xuan, J., Feng, W., Wang, J., Wang, R., Zhang, B., Bo, L., Chen, Z.-S., Yang, H., & Sun, L. (2023). Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. *Drug Resistance Updates*, 68. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.100954>
- Yoshimura, A., Ohishi, H. M. M., Aki, D., & Hanada, T. (2004). Regulation of TLR signaling and inflammation by SOCS family proteins. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(3), 422–427. <https://doi.org/10.1189/jlb.0403194>
- Yu, C., Xu, H., Jiang, S., & Sun, L. (2024). IL-18 signaling is regulated by caspase 6/8 and IL-18BP in turbot (*Scophthalmus maximus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 278, 135015. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135015>
- Yu, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, L., & Xu, Z. (2020). Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish. *Frontiers in Immunology*, 11(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.567941>
- Yuan, L., Xu, H., & Jiang, S. (2026). Caspase-mediated interleukin-18 maturation promotes

membrane-associated unconventional secretion and signal transduction in a teleost fish. *Marine Life Science & Technology*, 8(1), 82–95. <https://doi.org/10.1007/s42995-025-00335-4>

- Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, C., Deng, H., & Si, C. (2019). *Interleukin-35 in immune-related diseases : protection or destruction*. 13–20. <https://doi.org/10.1111/imm.13044>
- Zhang, Q. Y., Yan, Z. Bin, Meng, Y. M., Hong, X. Y., Shao, G., Ma, J. J., Cheng, X. R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C. Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>
- Zhao, Y., Xu, S., & Lu, W. (2024). Interleukin-6 receptor (IL-6R) is involved in the innate immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to resist pathogens. *Aquaculture*, 588(March), 740860. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740860>
- Zhou, C., Zhang, B., Lin, K., Xu, D., Chen, C., Yang, X., & Sun, C. (2017). Near-infrared imaging to quantify the feeding behavior of fish in aquaculture. *Computers and Electronics in Agriculture*, 135, 233–241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.02.013>
- Zhou, D., Huang, C., Lin, Z., Zhan, S., Kong, L., Fang, C., & Li, J. (2014). Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cellular Signalling*, 26(2), 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.004>
- Zhu, M., Yang, Y., Huang, B., & Huang, W. (2025). A mini-review on cathelicidin in fish: Gene expression, immune function, and evolutionary insights. *Fish & Shellfish Immunology*, 165, 110463. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2025.110463>
- Zou, J., & Secombes, C. J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/biology5020023>

11. Apéndices

11.1 Cálculo de fracción proteica

$$total\ proteína = FS + IB$$

$$Fracción\ proteica = \frac{(FS\ o\ IB)}{total\ proteína} \times 100$$

FS = fracción soluble; IB = fracción insoluble o cuerpos de inclusión

11.2 Primers utilizados para los análisis de expresión génica

Tabla 11.1 Secuencia nucleotídica de los primers de *Salmo salar* empleados para los análisis de expresión génica

Gen	Secuencia 5'-3'	Tamaño del Producto (pb)	Tm (°C)	Número de acceso (NCBI)
<i>elf-1α</i> (Referencia)	Fw: CAAAGCCCTGAAGTCTGGAG Rv: GACTTGGTCACCTTGCCAGT	189	60	NM_001141909.1
<i>tnf-α</i>	Fw: GCAGCCATCCATTTAGAGGGTGAA Rv: CTAAACGAAGCCTGGCTGTAAACG	170	60 60	DQ787157.1
<i>il-10</i>	Fw: ATGAGGCTAATGACGAGCTGGAGA Rv: GGTGTAGAATGCCTTCGTCCAACA	54	60 60	XM_045705802.1
<i>iNOS</i>	Fw: AGCACCTTTGGAATGGAGACT Rv: TGCACAGAACTGTGGGTACATC	138	60 60	XM_035787944.2
<i>il-1β</i>	Fw: GTCACATTGCCAACCTCATCATCG Rw: GTTGAGCAGGTCCTTGTCCTTGA	95	60 60	NM_001123582.1
<i>cox-2</i>	Fw: CAGTGCTCCCAGATGCCAAG Rv: GCGAAGAAGGCGAACATGAG	100	60 60	XM_014139742.2
<i>il-8</i>	Fw: TGTCGCTGCATTGAGACGGA Rv: AGCGCTGACATCCAGACAAATC	147	60 60	NM_001140710.3
<i>il-6</i>	Fw: AGTTTCAGAAGCCCGTGGAAGA Rv: GGGGAGTAGGGTTGATTGAGGGTA	197	60 60	XM_014143031.2

Fw: sentido; Rv: antisentido. Tm: temperatura de alineamiento

11.3 Cálculo de Livak

El método de Livak, es ampliamente utilizado para analizar datos de PCR cuantitativa en tiempo real. Este método permite calcular la expresión relativa de un gen diana en comparación con un grupo control, utilizando un gen de referencia para la normalización. En este estudio, los resultados fueron expresados como el logaritmo en base 2 del valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\log_2$ fold change), con el fin de obtener una distribución más simétrica de los datos

y facilitar el análisis estadístico de las diferencias en la expresión génica. El procedimiento seguido fue el siguiente:

1. **Cálculo del ΔCt :** Para cada muestra, se restó el valor de Ct del gen de referencia al Ct del gen diana:

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen diana}) - Ct(\text{gen de referencia})$$

2. **Cálculo del $\Delta\Delta Ct$:** Se calculó el valor promedio de ΔCt correspondiente al grupo control (muestras sin tratamiento o condición basal) y luego se obtuvo la diferencia entre el ΔCt de cada muestra experimental y el promedio del ΔCt del grupo control:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{muestra}) - \Delta Ct(\text{promedio control})$$

3. **Cálculo del cambio relativo de expresión:**

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4. **Transformación logarítmica:** Con el fin de representar los resultados en escala lineal y facilitar su interpretación, se aplicó el logaritmo en base 2:

$$\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct})$$

De este modo, los valores positivos representan sobreexpresión del gen diana en relación con el control, mientras que los valores negativos indican represión de la expresión.

11.4 Cálculo de Supervivencia de *P. salmonis*

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{Muestra} - \text{blanco}}{\text{Control} - \text{blanco}} * 100$$

11.5 Resultados de fagocitosis en células RTS-11

En la Figura 27 se presentan los histogramas correspondientes al análisis por citometría de flujo, empleado con el propósito de evaluar la capacidad fagocítica de la línea celular RTS-11 frente a Cat y Hep, utilizando una dosis de 20 $\mu\text{g/mL}$ durante un periodo de incubación de 4 h.

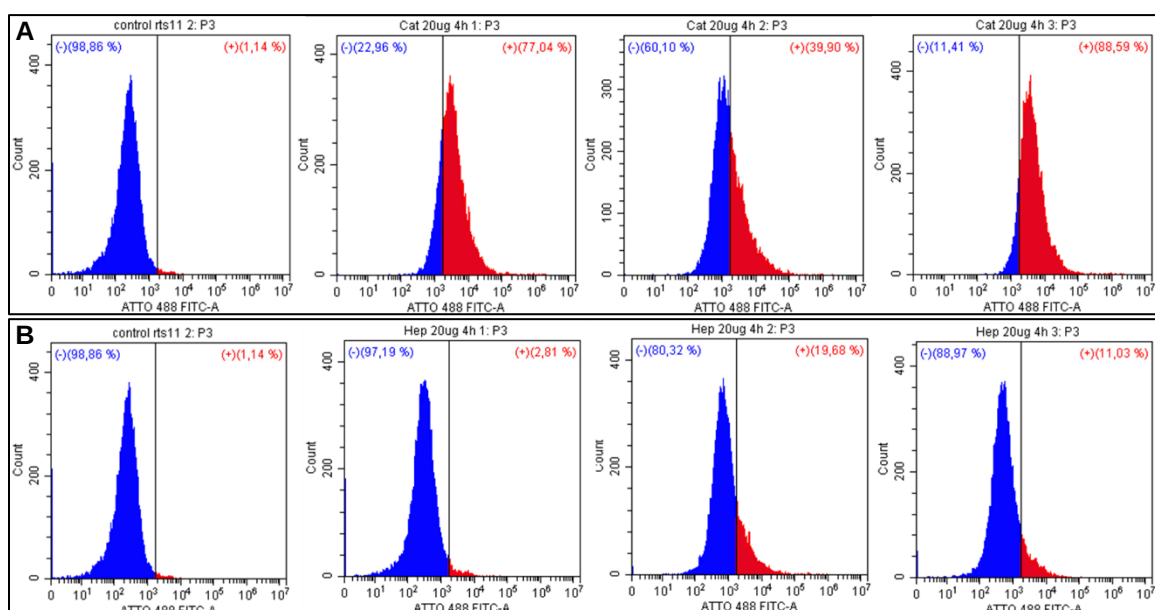


Figura 27. Citometría de flujo de células RTS-11 tratadas con proteínas nanoestructuradas marcadas con Atto 488 (A) Cat a 20 µg/mL o (B) Hep a 20 µg/mL durante 4 h.

11.6 Resultados de expresión génica de IL-10 e IL-12

De forma comparativa se determinó la eficacia de la IL-10 (UNIPROT: A0A1S3LFA1) e IL-12 subunidad Beta (UNIPROT: B5XDJ5) para estimular los genes evaluados anteriormente por los AMPs. El tratamiento con la interleucina antiinflamatoria IL-10 generó una modulación significativa de los genes proinflamatorios *tnf-α*, *il-8* e *iNOS* ($p < 0,05$). El gen *il-8* mostró una disminución significativa de su expresión a concentraciones de 10 y 20 µg/mL ($p = 0,0066$ y $p = 0,0257$, respectivamente), sin diferencia estadística entre estas dos concentraciones (Figura 28 C). Cabe destacar que sólo la concentración de IL-10 a 10 µg/mL mostró una diferencia significativa respecto al control iRFP ($p = 0,0340$), sugiriendo un efecto atribuible a la proteína. En el caso del gen *tnf-α*, se observó una disminución significativa de la expresión desde los 5 µg/mL y consistente hasta los 20 µg/mL ($p < 0,001$), con una tendencia creciente (Figura 28 B). El gen *iNOS* reprimió significativamente su expresión a 20 µg/mL ($p = 0,0079$) (Figura 28 D). Respecto a los genes *il-10* e *il-1β*, no se observaron diferencias significativas respecto al control (Figura 28 E y A).

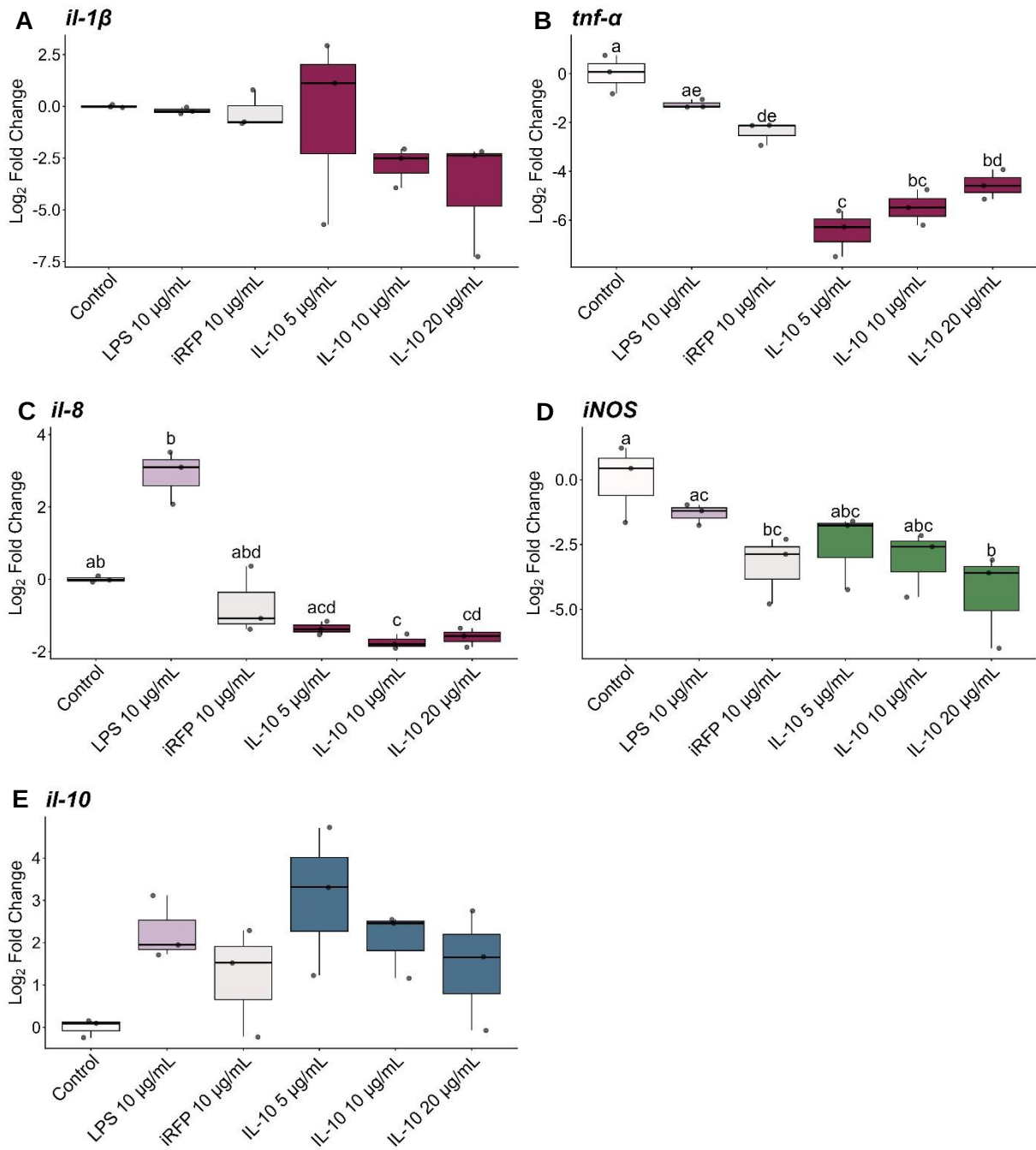


Figura 28. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con IL-10 a concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 12 h. Genes evaluados: (A) *il-1β*, (B) *tnf-α*, (C) *il-8*, (D) *il-10*, (E) *iNOS*. Control = PBS 1X. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

El tratamiento con la proteína proinflamatoria IL-12 en células RTS-11 moduló significativamente la expresión de los genes *tnf-α*, *il-8* e *iNOS* ($p < 0,05$), evidenciando un efecto dependiente de la dosis (Figura 29). En el caso de *il-8*, se observó una disminución significativa en la expresión a la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,047$) (Figura 29 C). El gen

tnf- α mostró una represión marcada desde a 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0012$), la cual se mantuvo de forma consistente hasta los 20 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 29 B). Si bien iRFP también indujo una disminución significativa de este gen ($p = 0,046$), la dosis de 20 $\mu\text{g/mL}$ de presentó una diferencia significativa respecto al control iRFP ($p = 0,034$), lo que sugiere un efecto propio de la proteína a concentraciones más altas. La expresión del gen *iNOS* se redujo significativamente con IL-12 a 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,00304$) (Figura 29 E). Los genes *il-10* e *il-1 β* no mostraron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 29 A y B).

La proteína IL-12 mostró un patrón de respuesta más consistente y proporcional a la dosis administrada, tanto en la supresión como en la posible inducción de algunos genes, lo que sugiere un efecto regulado y dosis-dependiente sobre la expresión génica en este modelo celular. También es notable que la proteína disminuye la expresión de los genes proinflamatorios, y aunque no es significativo, aumenta la expresión del gen antiinflamatorio *il-10*, efecto que parece responder a la regulación de las respuestas inflamatorias, mediadas por IL-12.

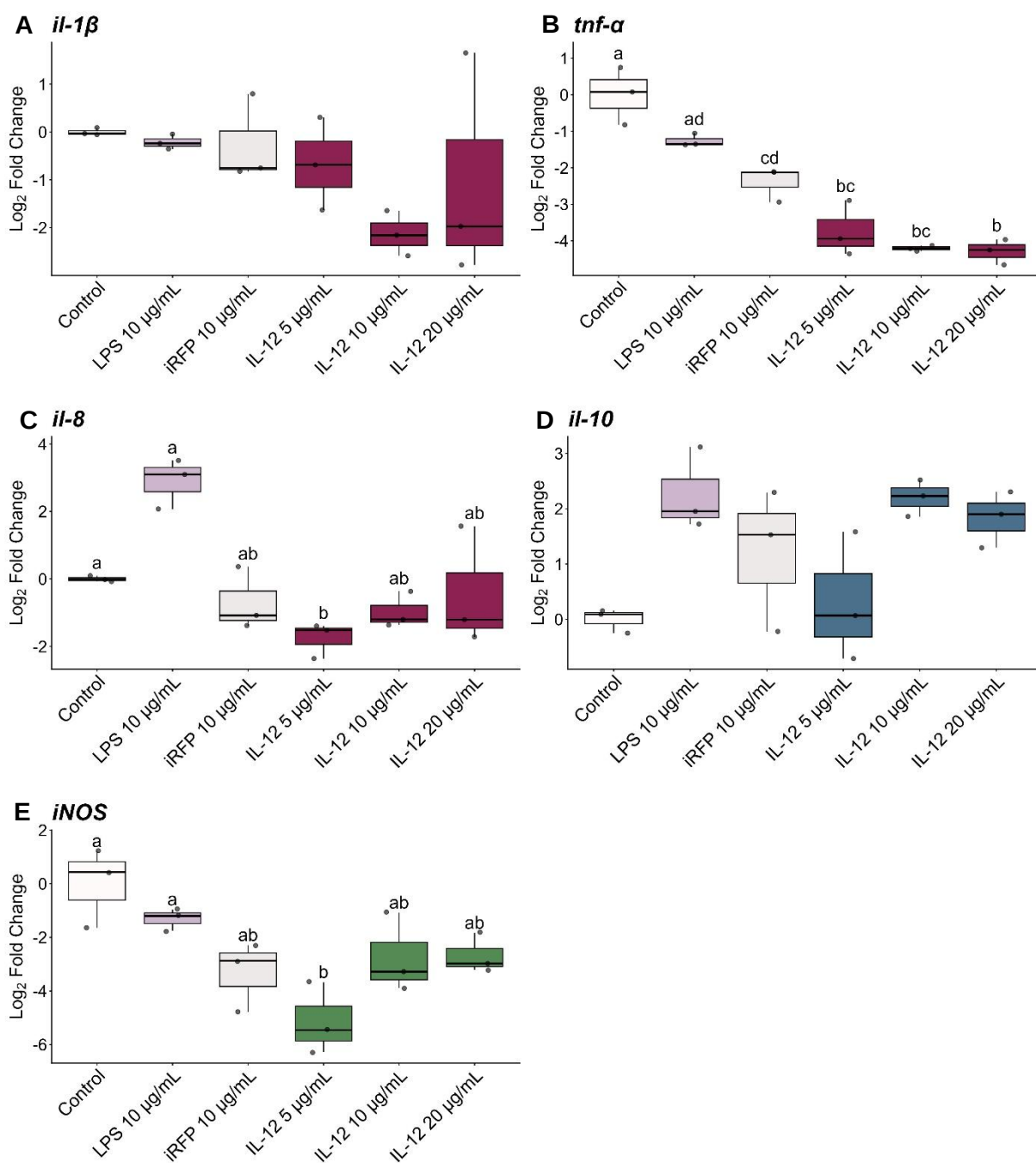


Figura 29. Expresión génica relativa de células RTS-11 tratadas con IL-12 a concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 12 h. Genes evaluados: (A) *il-1β*, (B) *tnf-α*, (C) *il-8*, (D) *il-10*, (E) *iNOS*. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

11.7 Evaluación de la eficacia de los AMPs para el control de *P. salmonis* a los 12 días

Se determinó la capacidad de los AMPs de afectar la viabilidad de *P. salmonis* durante un ensayo de 12 días, en medio IFOP, a una densidad de cultivo de 1×10^6 , en un rango de concentraciones del tratamiento desde 2 mM hasta 0,002 mM. Cat disminuyó

significativamente la supervivencia bacteriana, hasta un 31,4 % a 2 mM ($p < 0,01$) (Figura 30 A), con una tendencia creciente a favor de la supervivencia bacteriana, respecto a la dosis. Por su parte Hep, a los 12 días, redujo hasta un 45 % la supervivencia de *P. almonis* a una dosis de 0,02 mM ($p < 0,001$) (Figura 30 B)

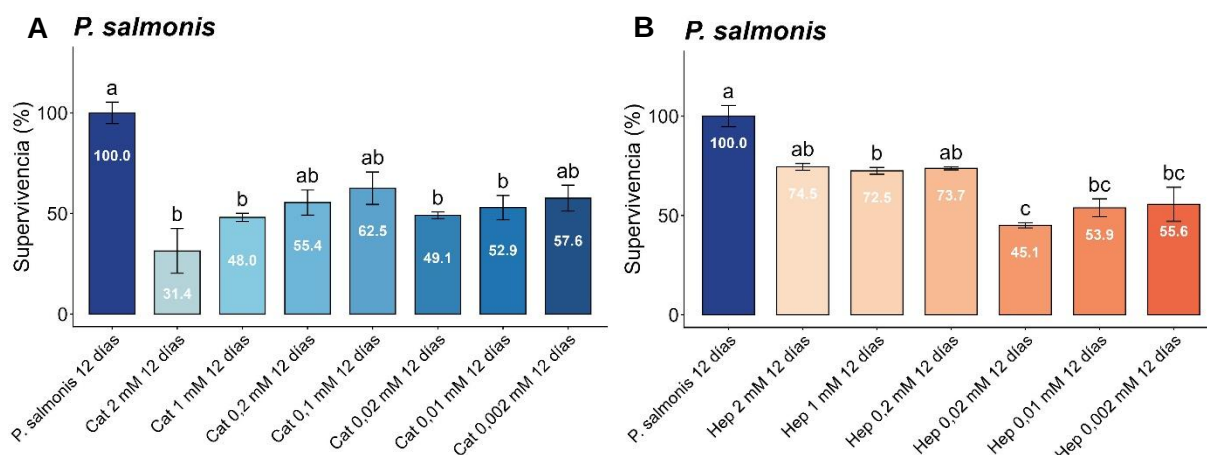


Figura 30. Porcentaje de supervivencia de *P. salmonis* tras exposición a (A) Cat y (B) Hep a los 12 días.

11.8 Evaluación de la eficacia de los AMPs para el control de otros patógenos

Se evaluó la eficacia de los IBs sobre *Flavobacterium psychrophilum*, y *Tenacibalum dicentrarchi*, del mismo modo que para *P. salmonis*. Las cepas a una densidad de 1×10^8 , permanecieron en ringer, a 18 °C, se añadió el tratamiento en un rango de dosis desde 0,1 hasta 20 μ M y se midió la OD correspondiente a las 6 y 24 h. En el caso de *F. psychrophilum*., Cat a las 6 h, a todas las concentraciones evaluadas (0,1 a 20 μ M), redujo significativamente la supervivencia bacteriana, con un promedio de 47 %, siendo una disminución significativa respecto al control ($p < 0,01$), sin diferencias significativas entre las concentraciones (Figura 31 A). En este tiempo, la proteína control iRFP también mostró efecto sobre este patógeno, a concentraciones de 0,1 y 1 μ M, reduciendo la supervivencia bacteriana hasta un 42 % en comparación con el control ($p < 0,001$). A las 24 h, el promedio de supervivencia con Cat, fue de 48 %, indicando que hay una prevalencia al menos hasta las 24 h (Figura 31 A y B).

En cuanto al tratamiento con Hep, *F. psychrophilum*, a las 6 h mostró una supervivencia promedio de 49 %, entre las dosis efectivas, siendo la dosis 1 μ M, la única que no tuvo efecto significativo (Figura 31 C y D). Esta molécula, sólo difiere de iRFP a 20 μ M ($p = 0,0477$) concentraciones a las cuales el efecto de Hep muestra aproximadamente 45 % de supervivencia bacteriana, mientras el iRFP se mantiene alrededor del 70 %. A las 24 h, el promedio del 49 % supervivencia se mantiene.

El efecto de ambos péptidos parece estar influenciado por componentes del IB, aunque existe una evidente participación de las moléculas tanto Cat como Hep más notable a los 20 μM . Un análisis llevado a cabo en medio de cultivo, hasta los 4 días, indica que no hay efecto en ese tiempo para ninguno de los AMPs (resultados no mostrados), lo cual podría apuntar a un efecto bacteriostático y no bactericida.

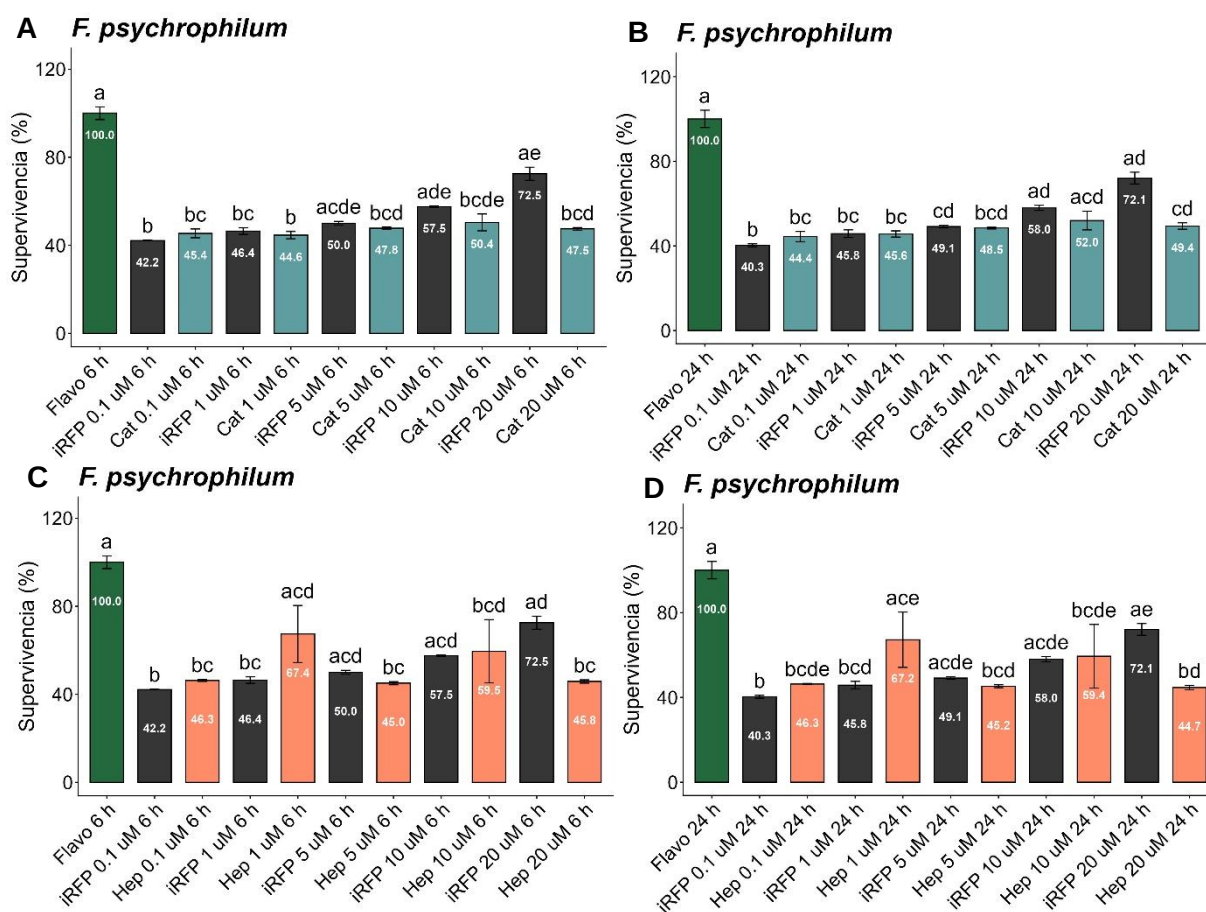


Figura 31. Porcentaje de supervivencia de *F. psychrophilum*. tras exposición a (A) Cat durante 6 h, (B) Cat durante 24 h, (C) Hep durante 6 h, (D) Hep durante 24 h.

Al evaluar el efecto de Cat sobre *T. dicentrarchi*, se observa que a las 6 h redujo la supervivencia bacteriana a un promedio de 42 %, para concentraciones superiores a 5 μM ($p < 0,01$) (Figura 32 A). Mientras que, a las 24 h solo las dosis 5 y 10 μM , son efectivas, con una supervivencia máxima de 42 % (Figura 32 B). El control, iRFP también afectó la supervivencia bacteriana, reduciéndola a menos del 50 % a concentraciones de 0,1 a 5 μM , a las 6 h ($p < 0,05$), sin diferencias significativas entre estos grupos. El efecto de Cat se ve favorecido a 20 μM respecto del iRFP, ($p = 0,0149$), pero no a otras concentraciones, en las que el efecto es similar, esto es observable a las 6 h, mas no a las 24 h.

Por su parte, Hep a 20 μM , disminuyó la supervivencia de *T. dicentrarchi*, al 29 % a las 6 h ($p < 0,001$), sin embargo, a concentraciones $\leq 10 \mu\text{M}$, no hubo diferencias significativas en la supervivencia bacteriana (Figura 32 C y D). A las 24 h, el efecto se extendió a concentraciones más bajas, 5 μM redujo significativamente la supervivencia bacteriana ($p = 0,002$), sugiriendo un efecto dependiente del tiempo.

Estos resultados sugieren que al igual que para *T. dicentrarchi*, ambos AMPs son favorable a 20 μM y el efecto se observa desde las 6 h, aunque, a los 4 día, la supervivencia se incrementa a un 80 % (data no mostrada).

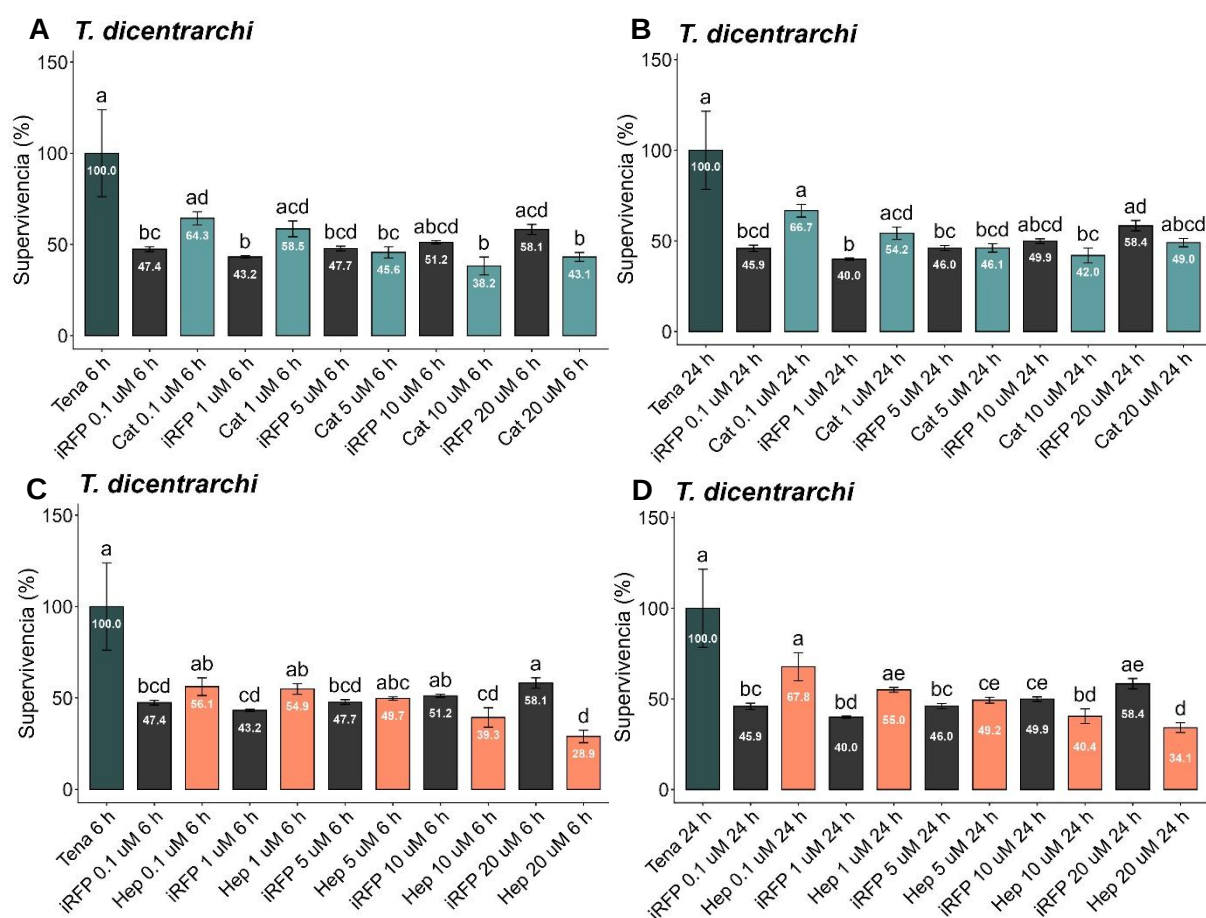


Figura 32. Porcentaje de supervivencia de *T. dicentrarchi*, tras exposición a IBs de (A) Cat durante 6 h, (B) Cat durante 24 h, (C) Hep durante 6 h, (D) Hep durante 24 h.

Además, se evaluó la eficacia de los AMPs en formato soluble y como IBs, frente a patógenos de interés agrícola: *Staphylococcus aureus* Sensible a Metilina (MSSA), *Staphylococcus epidermidis* Resistente a Metilina (MRSE), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) y *Pseudomonas aeruginosa*. La eficacia antimicrobiana de estos patógenos se evaluó empleando el kit BacTiter-Glo™ en el Laboratorio de Rumiantes del IRTA. Los inóculos se trataron con cinco concentraciones de IBs (0,1; 1; 5; 10 y 20 μM), incluyendo un control (iRFP),

mientras que para la proteína soluble solo se probaron las tres primeras concentraciones. Tras 4 h de incubación a 37 °C, se midió la luminiscencia con un luminómetro LumiStar™ (software Omega).

Respecto a MSSA, Hep no afectó significativamente la supervivencia bacteriana a ninguna dosis evaluada, mientras que Cat redujo la supervivencia en un 50 % ($p < 0,01$), sin diferencias significativas entre las concentraciones (Figura 33 A y B). El control iRFP no mostró efecto antibacteriano, al contrario, favoreció el crecimiento a 5 y 10 μM , confirmando que la actividad observada es atribuible específicamente a Cat.

Por su parte, Hep hasta un 25 % la supervivencia de *P. aeruginosa* ($p < 0,05$) a 0,1 y 1 μM , aunque paradójicamente aumentó el crecimiento hasta 3 veces a concentraciones superiores (Figura 33 D). Este comportamiento también se observó con el control iRFP, que disminuyó la supervivencia a un 45 % a 1 μM ($p < 0,001$), sin diferencias estadísticas frente a Hep en esta dosis. Por el contrario, Cat demostró una actividad antibacteriana consistente, reduciendo la supervivencia de *P. aeruginosa* a menos del 25 % entre 1 y 10 μM ($p < 0,001$), efecto no observado en iRFP, y aunque todas las dosis redujeron significativamente la supervivencia, estas resultaron significativamente mayor que otras evaluadas, lo que sugiere un rango óptimo de concentración para esta molécula (Figura 33 C).

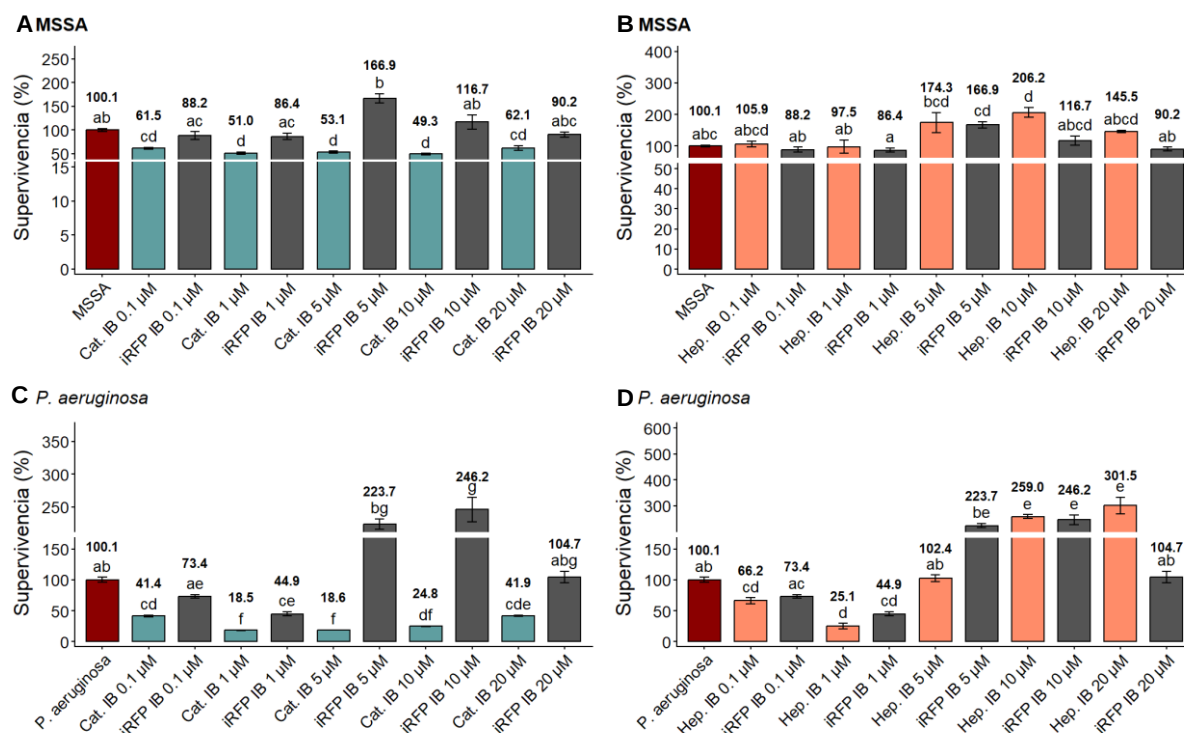


Figura 33. Porcentaje de supervivencia de MSSA tras exposición a (A) Cat y (B) Hep. *P. aeruginosa* tras exposición (C) Cat y (D) Hep.

En una segunda serie de ensayos, se comparó directamente la eficacia de las proteínas en su forma soluble e IBs, a concentraciones de 0,1 a 5 μ M. Para la cepa MSSA, se observó una marcada reducción en la supervivencia bacteriana tras el tratamiento con Cat soluble a 1 μ M, alcanzando un 13 % de supervivencia ($p < 0,001$) (Figura 34 A). Esta formulación fue significativamente más efectiva que los IBs a la misma concentración ($p = 0,0162$). A 5 μ M, la fracción soluble también redujo la supervivencia a 21,3 %, aunque no mostró diferencias significativas respecto a la dosis de 1 μ M ni frente a los IBs. En el caso de Hep, la fracción soluble a 5 μ M redujo la supervivencia a 34,8 % ($p = 0,0154$), sin diferencias estadísticas respecto a los IBs o la dosis de 1 μ M (Figura 34 B).

En contraste, para *P. aeruginosa*, Cat soluble e IBs redujeron significativamente la supervivencia a todas las dosis evaluadas, sin embargo, los IBs redujeron significativamente la supervivencia en comparación con sus equivalentes solubles ($p < 0,05$), siendo especialmente efectivos a 1 y 5 μ M (Figura 34 C). En el caso de Hep, a 0,1 μ M los IBs respecto a la proteína soluble disminuyeron significativamente la supervivencia (hasta un 25,1%) ($p < 0,001$) (Figura 34 D). En cuanto a Hep soluble, solo la dosis de 1 μ M redujo significativamente la supervivencia bacteriana respecto al control ($p < 0,001$), aunque el efecto es menor en comparación con los IBs ($p = 0,0064$).

El rol de los AMPs en la disminución de la supervivencia de MSSA y *P. aeruginosa* es evidente. Aunque iRFP mostró cierta actividad, como en el caso de la concentración de 1 μ M que reduce la supervivencia de *P. aeruginosa* al 45 % (Figura 34 C), los AMPs demostraron una mayor eficacia, en especial la dosis de 1 μ M que resultó favorable frente a MSSA y *P. aeruginosa*, para la cual los IBs superaron en desempeño a sus formas solubles.

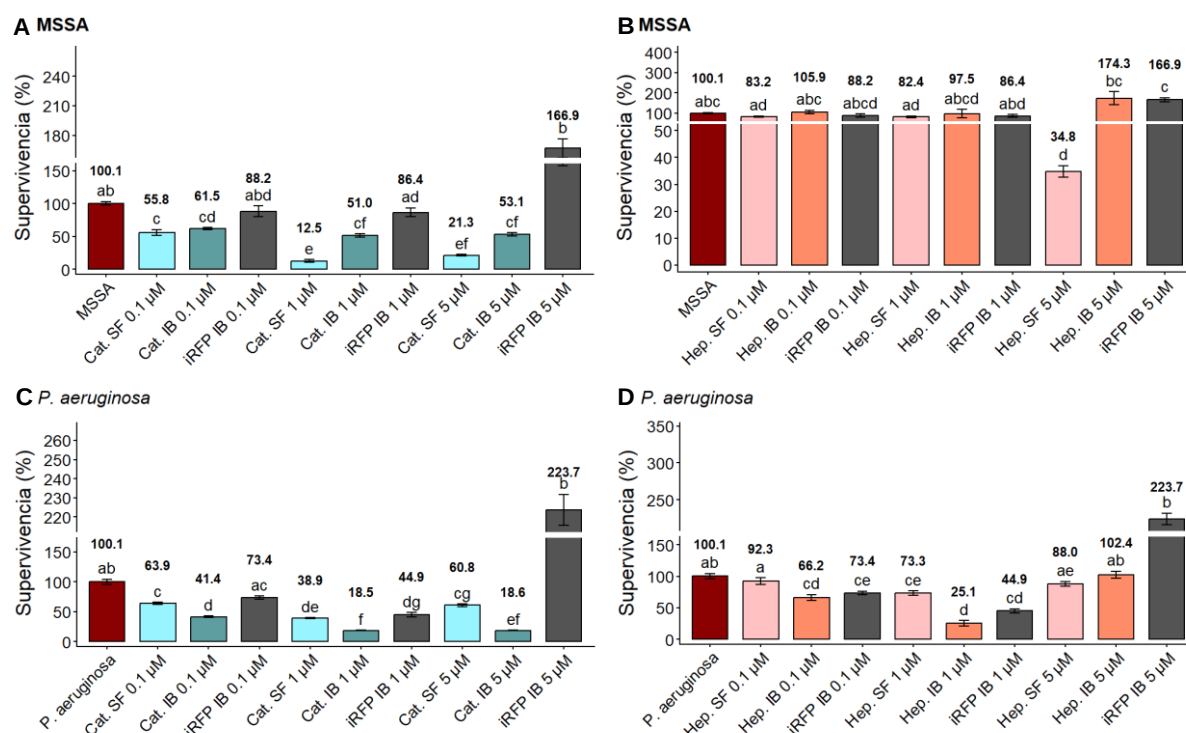


Figura 34. Efecto de los IBs y proteína soluble (SF) en la supervivencia de MSSA tras exposición a (A) Cat, (B) Hep y de *P. aeruginosa* tras exposición a (C) Cat, (D) Hep.

Con el objetivo de determinar si eficacia antimicrobiana observada de IBs frente a *P. aeruginosa* se debía a su clasificación como bacteria Gram negativa o si era un efecto dependiente de la cepa, se replicaron los ensayos utilizando Cat, e iRFP como control, frente a una cepa Gram positiva (*S. epidermidis* resistente a meticilina, MRSE) y una Gram negativa (*K. pneumoniae* productora de carbapenemasa, KPC).

Los resultados mostraron que en el caso de MRSE, los IBs redujeron la supervivencia bacteriana a todas las concentraciones evaluadas, siendo la máxima 13,1%, mientras la fracción soluble sólo disminuyó hasta 68,2% a 1 μ M, estableciendo una clara ventaja de los IBs (Figura 35 A). En cuanto a iRFP, también redujo significativamente la supervivencia a todas las concentraciones evaluadas ($p < 0,001$), aunque el efecto ejercido por Cat es mayor a 0,1 μ M ($p < 0,001$).

En el caso de KPC, los IBs de Cat presentaron mejor actividad que la forma soluble a dosis de 0,1 y 1 μ M ($p < 0,001$) y comparable a dosis de 5 μ M (Figura 35 B). El control iRFP mostró una reducción de la supervivencia a 1 μ M ($p < 0,001$), sin diferencia estadística respecto a Cat, aunque en esta última se observa una disminución de un 34 % más respecto al iRFP. Además, el iRFP a 5 μ M, promovió la supervivencia bacteriana al 213,6 %, mientras que Cat redujo la supervivencia a un 16,2 %, por lo tanto, es notable el efecto de Cat a esta concentración.

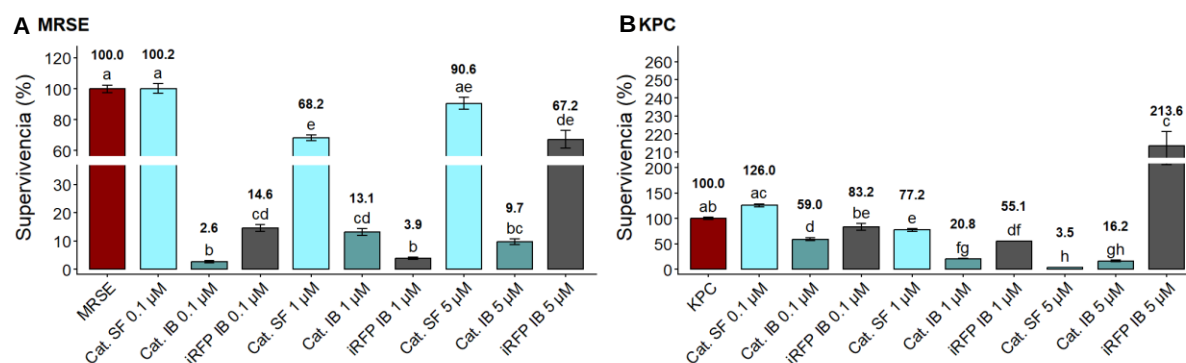


Figura 35. Supervivencia (%) de (A) MRSE, y (B) KPC tras exposición a IBs y proteína soluble (SF) de Cat.

Al evaluar el efecto de los IBs en un rango de dosis más amplio (0,1 a 20 µM) frente a MRSE, se observa que la dosis más baja es la más efectiva, aunque todas las concentraciones reducen significativamente la supervivencia bacteriana ($p < 0,01$) (Figura 36 A). Al comparar Cat con iRFP, este último muestra actividad entre 0,1 y 1 µM, pero a dosis superiores favorece la supervivencia, lo que resalta la eficacia de Cat en el control bacteriano. Un patrón similar se evidencia en la cepa KPC, para la cual Cat disminuye significativamente la supervivencia entre 1 y 20 µM ($p < 0,05$), sin diferencias significativas entre estas concentraciones, mientras que iRFP favorece la supervivencia a partir de 5 µM (Figura 36 B). Estos resultados indican que Cat en formato de IBs tiene actividad antimicrobiana consistente frente a las cepas evaluadas incluso dosis bajas ($< 5 \mu\text{M}$).

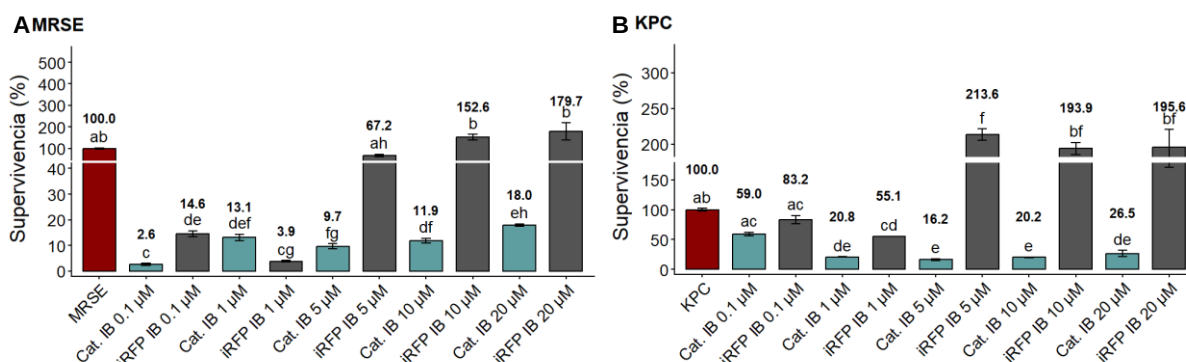


Figura 36. Supervivencia (%) de (A) MRSE, y (B) KPC tras exposición a Cat.

11.9 Evaluación comparativa de la producción y eficacia inmunoestimulante de los IBs producidos en biorreactor y matraz Erlenmeyer

Dado que la capacidad de producción a escala es el principal paso para la aplicación industrial de cualquier fármaco, se consideró relevante incluir un análisis preliminar del escalamiento de IBs en biorreactor. La caracterización del escalamiento de los IBs en biorreactor, se llevó a

cabo en el Laboratorio de Tecnología en Cultivos Celulares de la Escuela de Ingeniería Bioquímica. Se compararon los resultados de cultivo entre matraces Erlenmeyer y un biorreactor de tanque agitado (New Brunswick Bioflo 115, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Para esto, se emplearon clones transformados de *E. coli* Rosetta-gami (DE3) (Novagen, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), que contenían el plásmido pET28a (Novagen, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) con la secuencia codificante para Interleucina-1 β (IL-1 β , (GenBank, NM001124347), incluyendo el His-Tag (proporcionados por el Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular del Instituto de Biología de la PUCV).

Se cultivaron en un biorreactor New Brunswick Bioflo 115 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con un volumen de trabajo de 1,5 L, a 500 rpm, 1 vvm. 37 °C. Los cultivos no inducidos se realizaron sin control de pH, pero se monitorizaron en tiempo real mediante un sensor Mettler Toledo (Mettler Toledo, Columbus, OH, EE. UU.). La metodología de los cultivos en biorreactor fue similar a la empleada en matraces, excepto por la regulación del pH, que se mantuvo en 7,0. La inducción se realizó a una OD_{600nm} de 0,5 con IPTG 1mM, y la producción de proteína recombinante se extendió 3 h postinducción. Se realizó una segunda serie de producción en triplicado en el biorreactor, induciendo a una OD_{600nm} de 1,0.

Posterior a la producción, los IBs tanto de matraces Erlenmeyer como de biorreactor se purificaron como se describió previamente (4.1.3). Se comparó la funcionalidad de ambas producciones, mediante ensayos por triplicado de eficacia de células RTS-11 a una densidad de 1×10^6 células por pozo, en medio L-15 suplementado con FBS al 10 %, las cuales fueron tratadas con 10 μ g/mL de IL-1 β durante, 4, 12 y 24 h, y se consideró como control negativo PBS. Se determinó la expresión relativa de los genes proinflamatorios; *il-6*, *cox-2*, *iNOS*, *il-1 β* , y *tnf- α* , y el gen antiinflamatorio *il.10*, mediante qPCR.

Los perfiles de crecimiento en matraz biorreactor fueron similares, lo que descartó un efecto del escalamiento de producción sobre el crecimiento de la cepa de *E. coli* Rosetta-gami (DE3). Se detectaron concentraciones de biomasa similares en matraces y biorreactores ($1,78 \pm 0,16$ y $1,59 \pm 0,22$ g/L, respectivamente); sin embargo, en el biorreactor hubo un ligero aumento del 13 % en la tasa de crecimiento específico ($0,63 \pm 0,03$ y $0,72 \pm 0,02$ h⁻¹, respectivamente; $p < 0,05$). En los cultivos inducidos, se observó una drástica disminución del crecimiento celular, alcanzando solo el 30 % de la biomasa máxima obtenida sin inducción, tanto en matraz como en biorreactor ($0,50 \pm 0,04$ vs. $1,78 \pm 0,16$ g/L, $p = 0,0001$, y $0,48 \pm 0,01$ vs. $1,59 \pm 0,22$ g/L, $p < 0,001$). No hubo diferencias significativas entre la biomasa máxima alcanzada con inducción en matraces y biorreactores.

Respecto a la concentración de IL-1 β como IBs tras 3 h de inducción en las dos escalas de producción, se observó una disminución del 63 % en la producción en el biorreactor respecto a los matraces ($39 \pm 1,15$ y $14,5 \pm 4,08$ mg/L, $p < 0,001$). En términos de producción neta, el mayor volumen de cultivo en biorreactores permitió generar una masa total similar a la de los matraces ($19,5 \pm 0,58$ y $21,75 \pm 6,12$ mg/lote, respectivamente). Al inducir en la mitad de la fase exponencial (0,44 g/L o 1,0 U/A), se recuperó el perfil de crecimiento sin inducción (biomasa: $1,51 \pm 0,18$ g/L), y la producción de IL-1 β aumentó a $71,8 \pm 5,2$ mg/L, cinco veces más que con inducción a 3 h en biorreactor y 85 % más que la obtenida en matraces.

A partir de este escalamiento, el procesamiento de muestras, purificación y la evaluación de la expresión de genes asociados por qPCR para enlazar funcionalmente este modelo con los sistemas Cat y Hep fueron ejecutados por la autora de esta tesis. Cabe destacar que el esfuerzo conjunto de esta sección experimental contribuyó directamente al desarrollo de la publicación (Torrealba et al., 2024). La Tabla 11.2 resume de forma comparativa los resultados mencionados anteriormente.

Tabla 11.2. Resumen comparativo de la producción de IL-1 β en matraces y biorreactor.

Parámetro	Matraz Erlenmeyer	Biorreactor
Volumen de Cultivo	500 mL	1,5 L
Biomasa Máxima (Sin Inducción)	$1,78 \pm 0,16$ g/L	$1,59 \pm 0,22$ g/L
Tasa de Crecimiento Específico (μ)	$0,63 \pm 0,03$ h ⁻¹	$0,72 \pm 0,02$ h ⁻¹
Biomasa Máxima (inducción a 0,5 U/A)	$0,50 \pm 0,04$ g/L	$0,48 \pm 0,01$ g/L
Concentración de IL-1β (3 h Inducción)	$39 \pm 1,15$ mg/L	$14,5 \pm 4,08$ mg/L
Producción Neta Total (por lote)	$19,5 \pm 0,58$ mg/lote	$21,75 \pm 6,12$ mg/lote
Biomasa Máxima (inducción a 1,0 U/A)	NA	$1,51 \pm 0,18$ g/L
Concentración de IL-1β (inducción a 1,0)	NA	$71,8 \pm 5,2$ mg/L

NA: No Aplica

Los IBs obtenidos tanto en matraces como en biorreactor se visualizaron mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM). Ambos mostraron morfologías similares (forma redondeada y superficie irregular), pero con diferencias significativas en tamaño: 540 ± 129 nm en matraces vs. 427 ± 134 nm en biorreactores ($p < 0,0001$) (Figura 37).

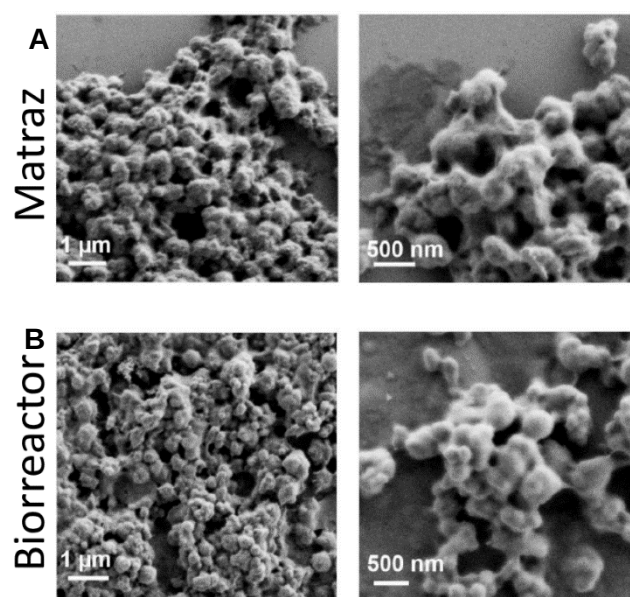


Figura 37. Microscopía de IL-1 β en forma de proteínas nanoestructuradas producidas en matraces Erlenmeyer (A) y en biorreactor (B). Fuente: (Torrealba et al., 2024)

La eficacia de los IBs obtenidos en biorreactor se comparó con los obtenidos en matraces, mediante ensayos en células RTS-11 a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, durante 4, 12 y 24 h. Se emplearon LPS como control positivo, iRFP como control no inmunogénico y PBS como control negativo. Se evaluó la expresión de los genes *cox-2*, *tnf- α* , *il-1 β* , *iNOS*, e *il-6*.

En cuanto al gen *il-10*, no se observó diferencia significativa en su expresión respecto del grupo control, aunque disminuyó significativamente en las células tratadas con IBs provenientes del biorreactor (IB-B) a las 24 h respecto a los tiempos anteriores (4 y 12 h) (Figura 38 E). El gen *cox-2* presentó un alza significativa en la expresión a las 4 h ($p = 0,0042$) en las células tratadas con IB-B respecto a las tratadas con IBs producidos en matraz (IB-M), aunque en ningún tiempo se registró diferencia significativa respecto al control (Figura 38 D). La expresión del gen *il-1 β* aumentó significativamente a las 12 h, con los IB-B respecto del control ($p = 0,0017$), sin diferencia significativa respecto a los IB-M (Figura 38 A). Se observó que para el gen *tnf- α* , el tratamiento con IB-B favorece su expresión a las 12 h respecto al control ($p = 0,0359$), sin diferencia significativa respecto a los IB-M (Figura 38 B). Los genes *il-6* e *iNOS*, no presentaron diferencia significativa en su expresión entre los IB-B e IB-M, ni respecto al grupo control (Figura 38 C y F).

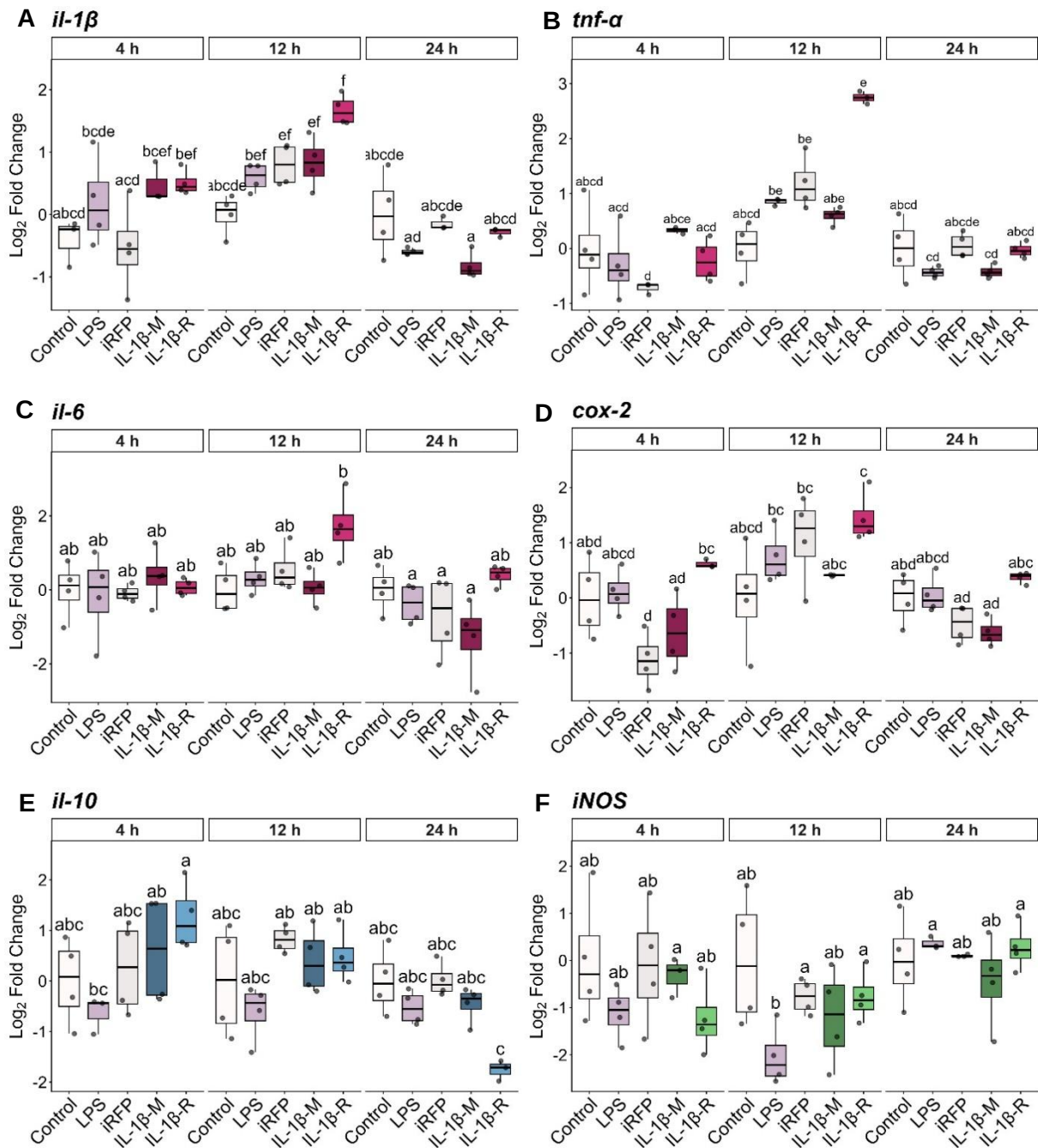


Figura 38. Análisis de expresión génica de células RTS-11 tratadas con IL-1 β durante 4, 12 y 24 h. Genes evaluados: (A) *il-1 β* , (B) *tnfr- α* , (C) *il-6*, (D) *cox-2*, (E) *il-10*, (F) *iNOS*. R= biorreactor. M= matraz. Los valores se expresan como Log₂ Fold Change (escala lineal simétrica, donde +1 indica una duplicación y -1 una reducción a la mitad). Tratamientos que comparten la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

11.10 Librerías de R empleadas

```
library("xfun")
```

Xie Y (2025). `_xfun`: Supporting Functions for Packages Maintained by 'Yihui Xie'. doi:10.32614/CRAN.package.xfun <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.xfun>>, R package version 0.52, <<https://CRAN.R-project.org/package=xfun>>.

```
library("readxl")
```

Wickham H, Bryan J (2025). `_readxl`: Read Excel Files. doi:10.32614/CRAN.package.readxl <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.readxl>>, R package version 1.4.5, <<https://CRAN.R-project.org/package=readxl>>.

```
library("readr")
```

Wickham H, Hester J, Bryan J (2024). `_readr`: Read Rectangular Text Data. doi:10.32614/CRAN.package.readr <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.readr>>, R package version 2.1.5, <<https://CRAN.R-project.org/package=readr>>.

```
library("survival")
```

Therneau T (2024). `_A Package for Survival Analysis in R`. R package version 3.8-3, <<https://CRAN.R-project.org/package=survival>>.

```
library("ggplot2")
```

H. Wickham. `ggplot2`: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.

```
library("survminer")
```

Kassambara A, Kosinski M, Biecek P (2025). `_survminer`: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. doi:10.32614/CRAN.package.survminer <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.survminer>>, R package version 0.5.1, <<https://CRAN.R-project.org/package=survminer>>.

```
library("dplyr")
```

Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D (2023). `_dplyr`: A Grammar of Data Manipulation. doi:10.32614/CRAN.package.dplyr <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.dplyr>>, R package version 1.1.4, <<https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>>.

```
library("tidyr")
```

Wickham H, Vaughan D, Girlich M (2024). `_tidyr`: Tidy Messy Data. doi:10.32614/CRAN.package.tidyr <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.tidyr>>, R package version 1.3.1, <<https://CRAN.R-project.org/package=tidyr>>.

```
library("psych")
```

William Revelle (2025). `_psych`: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research. Northwestern University, Evanston, Illinois. R package version 2.5.6, <<https://CRAN.R-project.org/package=psych>>.

```
library("lmttest")
```

Achim Zeileis, Torsten Hothorn (2002). Diagnostic Checking in Regression Relationships. R News 2(3), 7-10. URL <https://CRAN.R-project.org/doc/Rnews/>

```
library("knitr")
```

Xie Y (2025). `_knitr: A General-Purpose Package for Dynamic Report Generation in R_`. R package version 1.50, <<https://yihui.org/knitr/>>.

Yihui Xie (2015) Dynamic Documents with R and knitr. 2nd edition. Chapman and Hall/CRC. ISBN 978-1498716963

Yihui Xie (2014) knitr: A Comprehensive Tool for Reproducible Research in R. In Victoria Stodden, Friedrich Leisch and Roger D. Peng, editors, Implementing Reproducible Computational Research. Chapman and Hall/CRC. ISBN 978-1466561595

```
library("car")
```

Fox J, Weisberg S (2019). `_An R Companion to Applied Regression_`, Third edition. Sage, Thousand Oaks CA. <<https://www.john-fox.ca/Companion/>>.

```
library("stats")
```

R Core Team (2025). `_R: A Language and Environment for Statistical Computing_`. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.

```
library("multcompView")
```

Graves S, Piepho H, Dorai-Raj LSwhfS (2024). `_multcompView: Visualizations of Paired Comparisons_`. doi:10.32614/CRAN.package.multcompView <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.multcompView>>, R package version 0.1-10, <<https://CRAN.R-project.org/package=multcompView>>.

```
library("grid")
```

R Core Team (2025). `_R: A Language and Environment for Statistical Computing_`. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.

```
library("gridExtra")
```

Auguie B (2017). `_gridExtra: Miscellaneous Functions for "Grid" Graphics_`. doi:10.32614/CRAN.package.gridExtra <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.gridExtra>>, R package version 2.3, <<https://CRAN.R-project.org/package=gridExtra>>.

```
library("cowplot")
```

Wilke C (2024). `_cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for 'ggplot2'_`. doi:10.32614/CRAN.package.cowplot <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.cowplot>>, R package version 1.1.3, <<https://CRAN.R-project.org/package=cowplot>>.

```
library("onewaytests")
```

Dag O, Dolgun A, Konar N (2018). "onewaytests: An R Package for One-Way Tests in Independent Groups Designs." *The R Journal*, *10*(1), 175-199. doi:10.32614/RJ-2018-022 <<https://doi.org/10.32614/RJ-2018-022>>.

```
library("nlme")
```

Pinheiro J, Bates D, R Core Team (2025). *_nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models_*. doi:10.32614/CRAN.package.nlme <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.nlme>>, R package version 3.1-168, <<https://CRAN.R-project.org/package=nlme>>.

Pinheiro JC, Bates DM (2000). *_Mixed-Effects Models in S and S-PLUS_*. Springer, New York. doi:10.1007/b98882 <<https://doi.org/10.1007/b98882>>.

```
library("lsmeans")
```

Russell V. Lenth (2016). Least-Squares Means: The R Package lsmeans. *Journal of Statistical Software*, 69(1), 1-33. doi:10.18637/jss.v069.i01

```
library("coefplot")
```

Lander JP (2022). *_coefplot: Plots Coefficients from Fitted Models_*. doi:10.32614/CRAN.package.coefplot <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.coefplot>>, R package version 1.2.8, <<https://CRAN.R-project.org/package=coefplot>>.

```
library("corrplot")
```

Taiyun Wei and Viliam Simko (2024). R package 'corrplot':## Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.95). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>

```
library("lme4")
```

Douglas Bates, Martin Maechler, Ben Bolker, Steve Walker (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.

```
library("ggpubr")
```

Kassambara A (2025). *_ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots_*. doi:10.32614/CRAN.package.ggpubr <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ggpubr>>, R package version 0.6.1, <<https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>>.

```
library("rstatix")
```

Kassambara A (2023). *_rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests_*. doi:10.32614/CRAN.package.rstatix <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.rstatix>>, R package version 0.7.2, <<https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>>.

```
library("pander")#library(FSA) #perform Dunn's Test with Bonferroni correction for p-values
```

Daróczi G, Tsegelskyi R (2025). *_pander: An R 'Pandoc' Writer_*. doi:10.32614/CRAN.package.pander <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.pander>>, R package version 0.6.6, <<https://CRAN.R-project.org/package=pander>>.

```
library("tidyverse")
```

Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, Golemund G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Pedersen TL, Miller E, Bache SM, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel DP, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H (2019). "Welcome to the tidyverse." *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. doi:10.21105/joss.01686 <<https://doi.org/10.21105/joss.01686>>.

```
library("openxlsx") # permite leer excel
```

Schauberger P, Walker A (2025). *_openxlsx: Read, Write and Edit xlsx Files_*. doi:10.32614/CRAN.package.openxlsx <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.openxlsx>>, R package version 4.2.8, <<https://CRAN.R-project.org/package=openxlsx>>.

```
library("rcompanion")
```

Mangiafico, Salvatore S. (2025). *rcompanion: Functions to Support Extension Education Program Evaluation*. version 2.5.0. Rutgers Cooperative Extension. New Brunswick, New Jersey. <https://CRAN.R-project.org/package=rcompanion>

```
library("kableExtra")
```

Zhu H (2024). *_kableExtra: Construct Complex Table with 'kable' and Pipe Syntax_*. doi:10.32614/CRAN.package.kableExtra <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.kableExtra>>, R package version 1.4.0, <<https://CRAN.R-project.org/package=kableExtra>>.

```
library("conover.test")
```

Dinno A (2024). *_conover.test: Conover-Iman Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums_*. doi:10.32614/CRAN.package.conover.test <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.conover.test>>, R package version 1.1.6, <<https://CRAN.R-project.org/package=conover.test>>.

```
library ("PMCMRplus")
```

Pohlert T (2024). *_PMCMRplus: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Extended_*. doi:10.32614/CRAN.package.PMCMRplus <<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.PMCMRplus>>, R package version 1.9.12, <<https://CRAN.R-project.org/package=PMCMRplus>>.