



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

**Producción y caracterización de cuerpos de
inclusión recombinantes para ser usados como
antígenos en un prototipo de vacuna contra
*Piscirickettsia salmonis***

Tesis presentada para la obtención de grado Académico

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

Paula Valenzuela Avilés

Director tesis: Dr. José Gallardo Matus

Codirector tesis: Luis Mercado Vianco

Septiembre – 2025

CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía: Memoria o trabajo de título Tesis de Postgrado

Título del trabajo: Producción y caracterización de cuerpos de inclusión recombinantes para ser usados como antígenos en un prototipo de vacuna contra *Piscirikettsia salmonis*

Nombre del candidato(a): Paula Florencia Valenzuela Avilés

Carrera / Grado: Doctor en Biotecnología

Campus: Curauma

Departamento: Biología

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, José 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

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

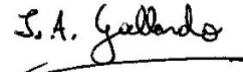
Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: 02-12-2025

Firma:



Estudiante o Candidato(a):

Fecha: 02-12-2025

Firma:



COMISIÓN EVALUADORA INTEGRADA POR

Dra. Paulina Smith.

Dra. Claudia Altamirano Gómez.

Dra. Verónica Cambiazo.

Dra. Debora Torrealba.

Dedicatoria

A mi familia, especialmente a Olivia por ser mi refugio, luz y fortaleza en los momentos más desafiantes, por su amor incondicional y por creer en mí incluso cuando yo dudaba.

A mis padres, quienes con su esfuerzo y dedicación me enseñaron el valor del trabajo duro y la importancia de nunca rendirse.

Y, finalmente, a mí mismo, por no desistir, por superar cada obstáculo y levantarme.

Resumen

Piscirickettsia salmonis es el agente etiológico de la Piscirickettsiosis, una de las enfermedades más graves y perjudiciales que afecta a la industria salmonera chilena. Para el control profiláctico de esta enfermedad actualmente existen 26 vacunas con registro provisional de uso en salmónidos. Sin embargo, ninguna vacuna ha demostrado poder controlar totalmente los brotes epidémicos en condiciones de campo. Varios investigadores han revelado la presencia de dos genogrupos predominantes en las granjas de cultivo del sur de Chile, denominados LF-89 y EM-90; los que presentan una distribución espacio-temporal variable durante los últimos años. Evidencias recientes sugieren que los mecanismos biológicos de ambos genogrupos podrían interactuar de manera sinérgica durante la infección, indicando la posibilidad de que ocurran coinfecciones en las granjas actuales. Este escenario complica aún más la eficacia de las vacunas, ya que muchas de ellas están diseñadas para actuar únicamente contra un genogrupo predominante. Por lo tanto, surge la necesidad de encontrar métodos profilácticos alternativos para garantizar y contribuir a la sostenibilidad de la industria salmónica chilena. Un nuevo método profiláctico propuesto en esta tesis son el uso de nanoproteínas (NPs) con características de cuerpos de inclusión recombinantes para ser usados como antígenos en un prototipo de vacuna contra *P. salmonis*. Las nanoproteínas producidas como cuerpos de inclusión son agregados de proteínas solubles e insolubles de carácter amiloides, por lo que no necesitan de encapsulación, su producción es escalable, son liofilizables, y son altamente estables a condiciones adversas de temperatura y pH.

En este proyecto de tesis se plantea evaluar la capacidad de algunas nanoproteínas como cuerpos de inclusión de proteínas antigénicas de *P. salmonis* para inducir una respuesta adaptativa en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y su potencial uso como inmunógenos en un prototipo de vacuna. Para alcanzar este objetivo, se diseñaron tres secuencias antigénicas con características quiméricas de los genogrupos LF-89 y EM-90 de *P. salmonis*, las que se produjeron como cuerpos de inclusión recombinantes en *E. coli* BL21(DE3). Los prototipos fueron denominados para propósitos de su protección comercial como: SkipZ, PulseJ y HopQ. Luego, se cuantificaron y caracterizaron los tres prototipos mediante técnicas como western blot. La captación y la actividad inmunoestimuladora de los prototipos fueron evaluadas en macrófagos de salmón mediante ensayos *in vitro*. Posteriormente, se vacunaron juveniles de salmón y se analizaron los efectos de los prototipos SkipZ y HopQ a nivel de expresión génica (qPCR) y producción de inmunoglobulinas (ELISA).

Los tres prototipos alcanzaron eficiencias de producción de 57 mg/L para PulseJ, 40 mg/L para SkipZ y 26,8 mg/L para HopQ. Estos fueron endocitados por macrófagos de trucha arcoíris (RTS-11) con eficiencias de internalización del 5% para SkipZ, 26% para PulseJ y 54% para HopQ. En los ensayos *in vitro*, se observó una activación tanto a nivel transcripcional como traduccional de moléculas asociadas con la presentación de antígenos y marcadores proinflamatorios, destacándose la capacidad de activación de HopQ y SkipZ a dosis de 20 y 5 µg/mL. En los ensayos *in vivo*, ambos prototipos vacunales a dosis de 0,5 mg/kg de pez para SkipZ y de 2 mg/kg de pez para HopQ, generaron una activación robusta de la respuesta Th1, con un aumento exacerbado de la expresión de IFN-γ e IL-12. Este fuerte incremento podría estar suprimiendo la diferenciación de linfocitos CD8+, lo que reduciría la efectividad de la respuesta inmunitaria celular para la total eliminación del patógeno, ya que fomenta la homeostasis en los peces durante una inflamación exacerbada

a consecuencia de las vacunas. Además, no se detectó un cambio significativo en la respuesta Th2, lo que sugiere que la respuesta humoral no fue predominantemente activada.

En conclusión, los prototipos de vacuna basados en secuencias antigénicas de *Piscirickettsia salmonis* y producidos como cuerpos de inclusión quiméricos demostraron ser potentes inmunógenos capaces de inducir una respuesta inmune adaptativa robusta en el salmón del Atlántico, destacándose la activación de la respuesta Th1 por parte de HopQ y SkipZ. Sin embargo, se requieren más estudios para evaluar su efecto protector en ensayos de desafío con el patógeno, incluyendo ambos genogrupos, y determinar su efectividad a largo plazo.

Abstract

Piscirickettsia salmonis is the etiological agent of Piscirickettsiosis, one of the most severe and detrimental diseases affecting the Chilean salmon farming industry. Currently, there are 26 vaccines with provisional registration available for prophylactic use in salmonids. However, none have proven effective in fully controlling epidemic outbreaks under field conditions. Several researchers have identified two predominant genogroups along the Chilean coast, designated as LF-89 and EM-90, which exhibit a variable spatiotemporal distribution in southern Chilean salmon farms in recent years. Recent evidence suggests that the biological mechanisms of both genogroups may interact synergistically during infection, indicating the potential for co-infections in contemporary farms. This scenario further complicates vaccine efficacy, as many are designed to target only a predominant genogroup. Thus, the need arises to identify alternative prophylactic methods to ensure and contribute to the sustainability of the Chilean salmon farming industry.

A novel prophylactic approach proposed in this thesis involves the use of recombinant nanoproteins, also known as inclusion bodies, with antigenic functions against Piscirickettsiosis. These inclusion bodies are aggregates of soluble and insoluble proteins with amyloid characteristics, eliminating the need for encapsulation. They are scalable, lyophilizable, and highly stable under adverse temperature and pH conditions.

This thesis aims to evaluate the ability of certain antigenic protein inclusion bodies from *P. salmonis* to induce an adaptive immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their potential use as immunogens in a vaccine prototype. To achieve this objective, three antigenic sequences with chimeric characteristics from the LF-89 and EM-90 genogroups of *P. salmonis* were designed and produced as recombinant inclusion bodies in *E. coli* BL21(DE3). The prototypes were designated for commercial protection purposes as SkipZ, PulseJ, and HopQ. These prototypes were quantified and characterized using techniques such as Western blot. Their uptake and immunostimulatory activity were evaluated in salmon macrophages through in vitro assays. Subsequently, juvenile salmon were vaccinated, and the effects of the SkipZ and HopQ prototypes were analyzed in terms of gene expression (qPCR) and immunoglobulin production (ELISA).

The three prototypes achieved production efficiencies of 57 mg/L for PulseJ, 40 mg/L for SkipZ, and 26,8 mg/L for HopQ. These prototypes were internalized by salmon macrophages

(RTS-11) with uptake efficiencies of 5% for SkipZ, 26% for PulseJ, and 54% for HopQ. *In vitro* assays showed activation at both transcriptional and translational levels of molecules associated with antigen presentation and pro-inflammatory markers, with notable activation capacities observed for HopQ and SkipZ at 20 µg/mL and 5 µg/mL, respectively. *In vivo* assays revealed that both vaccine prototypes, administered at doses of 0.5 mg/kg of fish for SkipZ and 2 mg/kg of fish for HopQ, robustly activated the Th1 response, with a marked increase in IFN-γ and IL-12 expression. This strong upregulation might suppress CD8+ lymphocyte differentiation, potentially reducing the effectiveness of the cellular immune response in fully eliminating the pathogen. However, this effect may contribute to maintaining homeostasis in fish during the exacerbated inflammation induced by the vaccines. Moreover, no significant change was observed in the Th2 response, suggesting that the humoral response was not predominantly activated.

In conclusion, the vaccine prototypes based on antigenic sequences of *Piscirickettsia salmonis* and produced as chimeric inclusion bodies demonstrated potent immunogenicity, capable of inducing a robust adaptive immune response in Atlantic salmon. The activation of the Th1 response by HopQ and SkipZ was particularly noteworthy. However, further studies are needed to evaluate their protective effects in challenge trials with the pathogen, including both genogroups, and to determine their long-term effectiveness.

Agradecimientos

La culminación de este trabajo doctoral no habría sido posible sin el apoyo incondicional, la guía generosa y la compañía de muchas personas a lo largo de estos años.

En primer lugar, agradezco sinceramente a mis directores de tesis. Al Dr. José Gallardo Matus, por su orientación constante y por creer en este proyecto desde sus inicios. A la Dra. Débora Torrealba, por confiar en mí, generar oportunidades de investigación aplicada y acompañarme con claridad y compromiso; sin su guía, este trabajo habría sido mucho más complejo y solitario.

A mis compañeros Daniela López, Dr. Nicolás Salinas y Jaqueline Flores, gracias por estar presentes en los días más difíciles del doctorado, por compartir generosamente sus conocimientos y, sobre todo, por su valiosa amistad.

A mi codirector, el Dr. Luis Mercado Vianco, y muy especialmente a su equipo de laboratorio: Felipe Ramírez y Musso, les agradezco profundamente su apoyo incondicional en cada etapa del proceso. Su acompañamiento y disposición fueron fundamentales para mi desarrollo como investigadora.

Agradezco especialmente a mi familia, por ser mi mayor sostén emocional: a mis padres, por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia; y a mis hermanos, por su apoyo constante, incluso en la distancia. A Olivia por acompañarme durante todos los días con su luz y ser mi motivo de crecimiento y perseverancia y a Jaime por siempre apoyarme en todas las decisiones, días de trabajo y entregarme su templanza para mejorar como profesional y mamá.

Agradezco al Programa de Doctorado en Biotecnología de la PUCV y la UTFSM, por brindarme un espacio de crecimiento académico y personal, así como a todos los profesores que aportaron a mi formación con generosidad y excelencia.

A mis amigos, gracias por su compañía, por escucharme en los momentos de duda y celebrar conmigo cada pequeño logro.

Finalmente, me agradezco a mí misma por no rendirme, por confiar en mi pasión por la ciencia, y por transformar cada obstáculo en un peldaño hacia este gran objetivo cumplido.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE TABLAS	14
ÍNDICE FIGURAS	15
CAPITULO 1	
1. INTRODUCCIÓN	18
CAPITULO 2	
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA	21
CAPITULO 3	
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
3.1 Hipótesis de la tesis	42
3.2 Objetivo general	42
3.3 Objetivos específicos	42
CAPITULO 4	
4. MATERIALES Y MÉTODOS	43
4.1 Materiales	43
4.1.1 Materiales biológicos	43
4.1.1.1 Animales de experimentación	43
4.1.1.2 Bacterias	43
4.1.2 Reactivos	43
4.1.2.1 Soluciones y tampones	44
4.1.2.2 Medios de cultivos	44
4.1.2.3 Kits comerciales	45
4.1.2.4 Anticuerpos	45
4.1.2.5 Programas informáticos	45
4.1.2.6 Instrumentos	47
4.2 Métodos	47
	11

4.2.1	Diseño de secuencias aminoacídicas multi-epitope	47
4.2.1.1	Proteínas con potencial antigénico	47
4.2.1.2	Predicción de multi-epitopes con potencial antigénico	49
4.2.1.3	Construcción de vacunas multi-epitopes	50
4.2.2	Producción de secuencias antigenicas	51
4.2.2.1	Producción de las NPs en sistemas heterólogos	51
4.2.2.2.	Purificación de las NPs	52
4.2.2.3.	Detección y cuantificación	52
4.2.3	Endocitosis de las NPs	53
4.2.3.1	Citometría de flujo	53
4.2.4	Evaluación de dosis respuesta mediante ensayo <i>in vitro</i>	53
4.2.4.1	Inducción de células RTS-11 con las NPs	53
4.2.4.2	Extracción de RNA	54
4.2.4.2	Síntesis de cadena complementaria de ADN (ADNc)	55
4.2.4.3	Análisis por (qPCR)	55
4.2.4.4	Inmunofluorescencia con anticuerpos	55
4.2.5	Evaluación de vacunación en <i>Salmo salar</i>	57
4.2.5.1	Declaración ética	57
4.2.5.2	Población de peces desafiados	57
4.2.5.3	Vacunación de dos NPs en juveniles <i>Salmo salar</i>	58
4.2.5.4	Análisis por qPCR	59
4.2.5.5	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)	60
4.2.6	Análisis estadísticos	61

CAPITULO 5

5. RESULTADOS

5.1	Primera generación de nanoproteínas quiméricas	63
-----	--	----

5.2 Caracterización de antígenos proteicos	65
5.3 Endocitosis de los NPs en línea celular RTS-11	68
5.4 Análisis de expresión de genes en línea celular RTS-11 estimuladas con NPs	69
5.5 Presentación de antígenos inducidos por NPs en línea celular RTS-11	73
5.6 Modulación de la respuesta inmune evaluada en bioensayo	75
5.6.1 Vacuna HopQ	75
5.6.1.1 Análisis de Inmunoglobulinas	81
5.6.2 Vacuna SkipZ	82
5.6.2.1 Análisis de Inmunoglobulinas	88
CAPITULO 6	
6. DISCUSION	90
6.1 Diseño de nanoproteínas quiméricas y su potencial antigénico para el desarrollo de vacunas contra Piscirickettsiosis	90
6.2. Capacidad de respuesta de las NPs se relaciona con el nivel de captación por parte de células de macrófago de peces	91
6.3 Respuesta de la capacidad inmunomoduladora de las nanoproteinas a nivel <i>in vitro</i>	92
6.4 Respuesta de la capacidad inmunomoduladora de las nanoproteinas a nivel <i>in vivo</i>	94
CAPITULO 7	
7. CONCLUSIONES	100
CAPITULO 8	
8. RECOMENDACIONES	101
NOMENCLATURA	102
REFERENCIAS	103

APENDICES	121
FINANCIAMIENTO Y COLABORACIONES	133
PRODUCTOS	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de péptidos antigénicos (por marcador).	57
Tabla 2. Lista de partidores utilizados para la expresión de genes.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Índice de Consumo de Antimicrobianos (ICA, %) y cantidad total de antimicrobianos administrados (toneladas) en la salmicultura chilena entre 2014 y 2024. Fuente: SERNAPESCA (2024). 29
- Figura 2. Factores extrínsecos e intrínsecos que disminuyen la eficacia de la vacuna contra *Piscirickettsia salmonis* en cultivos de salmón y trucha chilenos (Valenzuela-Avilés et al., 2022). 30
- Figura 3. Variabilidad en la eficacia de las vacunas contra *Piscirickettsia salmonis* en salmones del Atlántico, evidenciando diferencias en la protección conferida entre individuos vacunados. Reproducido de Valenzuela-Avilés et al. (2022). 34
- Figura 4. Representación esquemática del ensayo de vacunación. 58
- Figura 5. Representación esquemática del diagrama de construcción de los prototipos de vacunas. A) Selección de genogrupos. B) Selección de proteínas con potencial antigénico. C) Predicción de péptidos con potencial antigénico. D) Construcción de proteínas con características químicas. 64
- Figura 6. Representación esquemática de cuatro secuencias aminoacídicas quiméricas, designadas: Hoptech, SkipZ, PulseJ y HopQ. Los cuatro constructos están formados desde el extremo N al C-terminal de secuencias de péptidos con potencial antigénico que provienen de: membrana externa, sistema de secreción, quinasas, chaperonas, flagelinas, glucoproteína lisosomal, citoesqueleto, transferasas y ribosomal de los dos genogrupos preponderantes de *P. salmonis*. Todos los constructos presentan una etiqueta H6 en el extremo C-terminal para la posterior purificación. 65
- Figura 7. Perfil de crecimiento de *Escherichia coli* BL21 (DE3) no inducidos e inducido por IPTG. (A) SkipZ con inducción a las 3 horas iniciado el cultivo. (B) PulseJ con inducción a las 2 horas iniciado el cultivo. (C) HopQ con inducción a las 2 horas iniciado el cultivo y (D) Hoptech con inducción a las 3 horas iniciado el cultivo. 66
- Figura 8. Cuantificación y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) teñido con Coomassie de los constructos SkipZ, Hoptech, PulseJ and HopQ. (A) SDS-PAGE teñido con Coomassie de las fracciones soluble e insoluble de las 4 nanoproteínas. (B) NPs semi cuantificadas por western blot. Las cuatro proteínas fueron calculadas desde una curva estándar de una proteína con concentración conocida y fueron detectadas utilizando ChemiDoc Imaging System. Los rangos de la curva estándar van desde los 8 to 1 ug. 68
- Figura 9. Porcentaje de células fluorescentes a consecuencia de la adición de 20 ug/mL de cada NPs conjugado con el fluoróforo Atto 488 determinado por citometría de flujo a las 4 h post adición. El porcentaje de fluorescencia determina la capacidad de las células RTS-11 de captar las nanoproteínas. . 69
- Figura 10. Análisis de expresión diferencial de genes de la respuesta inmune en la línea celular RST-11 que fue estimulada con el prototipo SkipZ a diferentes concentraciones (5, 10 y 20 µg/mL) durante 12 horas. Se utilizaron como controles la estimulación con agua, control positivo con LPS (10 µg/mL) y el control sin relevancia inmunológica iRFP (10 µg/mL). Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con * $p < 0.05$. 71
- Figura 11. Análisis de la expresión diferencial de genes de la respuesta inmune en la línea celular RST-11 que fue estimulada con el prototipo PulseJ en diferentes concentraciones (5, 10 y 20 µg/mL) durante 12 horas. Se utilizaron como controles la estimulación con agua, control positivo con LPS (10 µg/mL) y el control sin relevancia inmunológica iRFP (10 µg/mL). Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con * $p < 0.05$. 72

- Figura 12. Análisis de la expresión diferencial de genes de la respuesta inmune en la línea celular RST-11 que fue estimulada con el prototipo HopQ en diferentes concentraciones (5, 10 y 20 µg/mL) durante 12 horas. Se utilizaron como controles la estimulación con agua, control positivo con LPS (10 µg/mL) y el control sin relevancia inmunológica iRFP (10 µg/mL). Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con * $p < 0.05$. 73
- Figura 13. Análisis de la expresión de proteínas por inmunofluorescencia de los 3 cuerpos de inclusión propuestos en la línea celular RST-11 estimulada durante 12 horas con 5 µg/mL de SkipZ, 10 µg/mL de PulseJ y 20 µg/mL de HopQ. A) Expresión del anticuerpo MHC-II. B) Expresión del anticuerpo CD83. C) Expresión del anticuerpo CD86. Como controles se utilizaron el control negativo (con agua) y el control sin relevancia inmunológica iRFP (10 µg/mL). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ. 74
- Figura 14. Análisis de componentes principales (PCA) de las variables inmunológicas por grupos post-vacunación con HopQ. Dim1 (24.7%) y Dim2 (21.4%) explican un 46.1% de la variabilidad total. Los colores de las flechas indican el nivel de contribución de cada gen, desde bajo (azul) hasta alto (rojo). 76
- Figura 15. Análisis de expresión diferencial de genes relacionados a la respuesta inflamatoria primaria 1 día post vacunación. Se observan cambios significativos en la expresión de los genes *il-1β*, *tnf-α*, *il-8*, *il-12* e *il-10*. Los datos muestran los cambios en la expresión génica en Log fold change comparados con el día 0. Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con (*) para $p < 0.05$ y con (**) para $p < 0.01$. 79
- Figura 16. Análisis de expresión de genes inmunológicos en diferentes días post-vacunación (días 0, 7, y 14). Los genes analizados están involucrados en la activación de células T, presentación de antígenos, producción de citocinas proinflamatorias, y la regulación de la respuesta inmune, incluyen *cd83*, *cd80/cd86*, *mhc-ii*, *il-12*, *ifn-γ*, *inos*, y *foxp3*. Los datos muestran el Log fold change en la expresión génica en relación con el día 0. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (**) para $p < 0.01$ y (*) para $p < 0.05$. 80
- Figura 17. Análisis de la expresión de diversos genes inmunológicos en diferentes días post-vacunación (días 0, 7, y 14). Los genes evaluados están relacionados con funciones clave del sistema inmune, activación de células T, diferenciación de subtipos celulares y la respuesta de células B, incluyen *mhc-i*, *cd8*, *tbet*, *eomes*, *cd4*, *il4/13*, *gata3*, e *igm*. Los datos muestran los cambios en la expresión génica en Log fold change comparados con el día 0. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con (**) $p < 0.01$. 81
- Figura 18. Producción de Inmunoglobulinas (Ig) en peces vacunados con la vacuna HopQ a los 1, 7 y 14 días post-vacunación, medida mediante ELISA. La densidad óptica (OD) a 450 nm no refleja diferencias significativas en los niveles de Ig a lo largo del tiempo evaluado al compararlo al control tiempo 0 (sin vacuna), según el análisis de varianza de una vía (ANOVA). 82
- Figura 19. Análisis de componentes principales (PCA) para las variables génicas de los grupos tratados con la vacuna SkipZ. El gráfico de contribución de variables muestra cómo cada gen contribuye a la variabilidad total (Dim1: 41.3%, Dim2: 14.4%). Los colores de las flechas indican el nivel de contribución de cada gen, desde bajo (azul) hasta alto (rojo). 84
- Figura 20. Expresión génica de *il-1b*, *tnf-α*, *il-8*, *il-12* e *il-10* al día 1 post-vacunación comparado con el día 0. La expresión se midió por qPCR y se normalizó con genes de referencia, se presentan como Log fold change. No se observan cambios significativos en los niveles de expresión de estos genes en el día 1. 86
- Figura 21. Cambio en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune inflamatoria y presentación de antígenos (*il-12*, *ifn-γ*, *cd80/cd86*, *cd83* e *inos*) en días 0, 7 y 14 post-vacunación. La expresión se midió por qPCR y se normalizó con genes de referencia. Se indican diferencias estadísticamente significativas (**) $p < 0.01$. 87

- Figura 22. Cambio en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune adaptativa de tipo Th1 y Th2 (*cd8*, *tbet*, *eomes*, *mhc-ii*, *cd4*, *il4/13*, *gata3*, *igm*) en días 0, 7 y 14 post-vacunación. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los días post-vacunación (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$. 88
- Figura 23. Producción de Ig totales en peces vacunados con la vacuna SkipZ a los 1, 7 y 14 días post-vacunación, medida mediante ELISA. La densidad óptica (OD) a 450 nm no refleja cambios significativos en la cantidad de anticuerpos presentes en las muestras en los diferentes días de análisis, según el análisis de varianza de una vía (ANOVA). 89
- Figura 24. Esquema del procesamiento antigénico y activación de linfocitos T CD8+ y diferenciación hacia el perfil Th1, inducido por la internalización de proteínas de *Piscirickettsia salmonis* en células presentadoras de antígenos (APCs). La imagen ha sido adaptada Rozas-Serri et al. (2022). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.856896> 99

1. Introducción

Chile se ha consolidado en los últimos años como un referente mundial en la exportación de salmónidos. El método de cultivo más utilizado combina sistemas de recirculación en tierra durante las primeras etapas de desarrollo y posterior engorda en jaulas, en lagos o mar abierto. Esta última fase se ha convertido en un punto crítico debido a las importantes pérdidas económicas causadas por diversas enfermedades infecciosas (Evensen, 2016; Jakob et al., 2014). La alta densidad de peces en jaulas favorece la rápida propagación de patógenos marinos, lo que permite que los brotes se extiendan entre diferentes centros de cultivo. Este escenario refuerza la necesidad de implementar estrategias profilácticas eficientes y sostenibles para controlar enfermedades persistentes y emergentes, reduciendo así su impacto económico en el mercado nacional.

En Chile, la Piscirickettsiosis o septicemia por rickettsiosis de los salmónidos (SRS) es la principal enfermedad sistémica que afecta gravemente a múltiples órganos y tejidos de salmónes de cultivo; generando mortalidades anuales del 52,2% dentro de las reportadas como mortalidades infecciosas para el año 2023 (SERNAPESCA, 2023), generando bajos rendimientos a la cosecha con relación a número de peces smolt sembrado. El impacto económico de *P. salmonis* se ve en etapas tardías de engorda cerca del periodo de cosechas con pérdidas económicas que alcanzan los US\$700 millones anuales (Caruffo et al., 2021; Maisey et al., 2017). Además, el uso de antibióticos para controlar esta enfermedad es considerado en los mercados internacionales una desventaja lo que en su conjunto, hace menos competitivo al salmón chileno en comparación con el salmón silvestre o con nuestro competidor más cercano Noruega.

Aunque las vacunas se han considerado cruciales para el desarrollo del cultivo de salmón en todo el mundo (Somerset et al., 2005), no han tenido éxito para erradicar la Piscirickettsiosis en Chile, por razones que son ampliamente debatidas (Rozas-Serri, et al. 2022, Valenzuela-Avilés et al., 2022). En Chile, existen alrededor de 17 vacunas con registro provisional autorizadas para su comercialización contra la Piscirickettsiosis (SAG, 2022). Si bien la evidencia de efectividad en campo es limitada, existe consenso en la industria de que la protección a largo plazo de la vacunación es baja (Rozas-Serri et al., 2023; Tobar et al., 2015; Valenzuela-Avilés et al., 2022). Las vacunas actuales contra *Piscirickettsia salmonis* presentan una eficacia limitada en condiciones de campo debido a factores intrínsecos,

como la alta variabilidad genética heredable de los peces, que influye en la respuesta inmune, y a factores extrínsecos, como la temperatura, salinidad, coinfecciones y presión ambiental. Además, la diversidad y virulencia de los distintos aislados y genogrupos, que no siempre se consideran en el diseño de las vacunas, han cobrado creciente relevancia y dificultan el control efectivo de la enfermedad (Figuroa et al., 2017; Figuroa et al., 2020; Valenzuela-Avilés et al., 2022)

Con respecto al último factor, la virulencia entre los distintos genogrupos, el análisis pan genómicos han demostrado que *P. salmonis* presenta a nivel nacional, una clara división de dos genogrupos preponderantes, LF-89 y EM-90 (Aravena et al., 2020; Nourdin-Galindo et al., 2017; Ramírez et al., 2015; Saavedra et al., 2017). Estos genogrupos presentan una distribución espacio-temporal variable en las granjas de cultivo de las costas del sur de Chile; Aunque ambos genogrupos son patógenos, el nivel de virulencia es diferente. Esto podría explicarse porque a nivel de composición funcional del genoma central, la cepa EM-90 presenta factores de virulencia específicos relacionados con adherencia, colonización, factores de invasión y endotoxinas que no presenta LF-89 (Nourdin-Galindo et al., 2017; Ortiz-Severin et al., 2019; Ramírez et al., 2015). Entre los años 2010 y 2014 se demostró una mayor prevalencia de LF-89, pasando a un cambio de tendencia de genogrupo a EM-90 en los años 2015 a 2019 (Carril, 2023 Oct 25; Rozas-Serri et al., 2018; Saavedra et al., 2017). En consecuencia, en los últimos años la industria ha modificado sus estándares de producción de vacunas, optando por formular vacunas desarrolladas a partir del genogrupo EM-90 (Rozas-Serri et al., 2023). Este cambio en la fabricación de vacunas estaría aumentando nuevamente la incidencia y casos positivos del genogrupo LF-89. Adicionalmente, cada vez se reúne más evidencia de que es posible que los mecanismos biológicos de ambos genogrupos modulen sinérgicamente la interacción con el huésped, por lo que las coinfecciones podrían estar presentes en la actualidad en las granjas de cultivo (Carril, 2023 Oct 25; Rozas-Serri et al., 2023). Bajo este contexto, se ha propuesto que la vigilancia a nivel de genogrupos es fundamental para establecer mejores estrategias de vacunación contra SRS (Rozas-Serri et al., 2023).

Todos estos antecedentes apuntan a la incorporación de nuevas tecnologías profilácticas que incorporen como elemento diferenciador el uso de antígenos quiméricos que permitan ser utilizados contra los dos genogrupos más prevalentes en Chile. Los cuerpos de inclusión (CI), también denominados nanoproteínas (NP), representan una estrategia innovadora para el desarrollo de prototipos vacunales contra *Piscirickettsia salmonis* (Torrealba, López et al.,

2024). Estas estructuras proteicas agregadas conservan parcialmente la actividad biológica de la proteína de interés, lo que permite inducir una activación prolongada y específica del sistema inmune. Además, su diseño multiepitópico ofrece la ventaja de abarcar simultáneamente ambos genogrupos predominantes de *P. salmonis* (LF-89 y EM-90), aumentando el potencial de generar una respuesta inmune eficaz frente a coinfecciones.

En comparación con las vacunas tradicionales, los CI presentan características técnicas altamente ventajosas, como producción escalable, bajo costo, estabilidad mecánica y resistencia a condiciones adversas, posicionándolos como candidatos atractivos para enfrentar los brotes persistentes en la salmonicultura chilena.

En base a lo expuesto con anterioridad, es que se genera la siguiente hipótesis de la tesis doctoral: Las proteínas antigénicas quiméricas de *P. salmonis* en cuerpos de inclusión inducen una respuesta inmune adaptativa en Salmón del Atlántico, permitiendo su uso como inmunógenos en un prototipo de vacuna contra este patógeno. Para responder esta hipótesis se plantea el siguiente objetivo: Evaluar la capacidad de los cuerpos de inclusión como inmunógenos para potenciar la respuesta inmune del salmón del Atlántico. Este objetivo se llevó a cabo cumpliendo los siguientes objetivos específicos: 1) Producir y caracterizar cuerpos de inclusión de proteínas de *P. salmonis* en *Escherichia coli*. 2) Evaluar *in vitro* la endocitosis y la capacidad inmunoestimuladora de los cuerpos de inclusión en macrófagos de trucha Arcoíris. 3) Demostrar que los cuerpos de inclusión como inmunógeno generan una respuesta inmune adaptativa en juveniles de salmón del Atlántico.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Producción y cultivo de salmónidos en Chile

La acuicultura se ha convertido en una fuente esencial de proteínas para el consumo humano (Pradeepkiran, 2019). Los salmónidos están entre las especies de interés, en el que aproximadamente el 80% de la cosecha mundial de salmón es de cultivo. La mayor parte del salmón cultivado proviene de Noruega, Chile, Escocia y Canadá. El método de cultivo más utilizado para producir salmón comienza con un sistema de recirculación de agua dulce en tierra en las primeras etapas del desarrollo de los peces, y luego se traslada a jaulas en lagos o en alta mar. Esta última etapa de producción es la que presenta un mayor riesgo de contraer enfermedades infecciosas (SERNAPESCA, 2023). La conectividad hidrodinámica entre las granjas de cultivo permite una transmisión más rápida y cubre mayores distancias, de modo que cuando ocurre un brote en un centro aguas arriba, la enfermedad se propaga a las granjas aguas abajo a través de las corrientes oceánicas, lo que conlleva graves pérdidas económicas (Evensen, 2016; Jakob et al., 2014; Labra et al., 2020). Por lo tanto, controlar las enfermedades infecciosas en la industria acuícola se ha convertido en una preocupación significativa y un desafío continuo para reducir su impacto (Perez-Sanchez et al., 2018).

En los últimos años, Chile se ha convertido en un referente mundial en la exportación de salmónidos, en el que las especies más cultivadas son el Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con un 65% de la producción, el Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) con un 29% y la Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con un 6% (SERNAPESCA, 2023). Las cosechas totales de estos salmónidos durante 2024 alcanzaron las 782.000 toneladas, lo que representa un valor comercial de US\$ 6.361 millones (Consejo del salmón, 2024). Uno de los patógenos más devastadores en la industria acuícola es *Piscirickettsia salmonis*, un patógeno intracelular que causa la Piscirickettsiosis a veces llamada septicemia rickettsial del salmón (SRS). Esta enfermedad sistémica afecta gravemente a múltiples órganos y tejidos de salmónidos silvestres y cultivados. La Piscirickettsiosis ha estado infectando al salmón chileno durante casi 40 años, causando mortalidades superiores al 60% de la producción de Salmón Coho en Chile (Jakob et al., 2014; SERNAPESCA, 2023; Valenzuela-Miranda & Gallardo-Escarate, 2018).

2.2 Piscirickettsiosis: etiología y patogénesis

Piscirickettsia salmonis es una bacteria intracelular facultativa, inmóvil, no encapsulada, pleomórfica, generalmente cocoide, que se encuentra en pares o estructuras en forma de anillo con un diámetro de aproximadamente 0.5-1.5 μm (Gómez et al., 2013; Rojas et al., 2008). *P. salmonis* se clasifica dentro de la clase de las γ -proteobacterias y el orden Thiotrichales (Rojas et al., 2008). La infección por *Piscirickettsia salmonis* se caracteriza por la utilización de sofisticados mecanismos de evasión inmunológica que dificultan la eliminación bacteriana por parte de las células fagocíticas del hospedador. Uno de los principales mecanismos de virulencia descritos es la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, proceso esencial para la degradación bacteriana en el interior de los macrófagos [Ramírez et al., 2015]. Para lograr esta interrupción en el tráfico vesicular, *P. salmonis* induce una reorganización del citoesqueleto de la célula huésped, alterando tanto las fibras de actina como los microtúbulos que constituyen el andamiaje intracelular [Ramírez et al., 2015]. Estudios realizados en líneas celulares SHK-1, RTS-11 y ASK demostraron que la bacteria desorganiza significativamente estas estructuras, generando un colapso citoplasmático que desvía las vesículas de su ruta normal, modifica la arquitectura interna de la célula y limita el transporte de los fagosomas hacia los lisosomas [Ramírez et al., 2015].

La reorganización del citoesqueleto de actina es un mecanismo ampliamente utilizado por otros patógenos intracelulares, pues permite a las bacterias persistir protegidas en el citosol y evita que las vesículas cargadas con péptidos antimicrobianos alcancen los compartimentos fago-lisosomales [Dramsí et al., 1998]. En el caso de *P. salmonis*, esta desestabilización controlada del citoesqueleto no solo impide la destrucción bacteriana, sino que además favorece la generación de un nicho intracelular estable, optimizando las condiciones para la replicación bacteriana y contribuyendo al establecimiento de infecciones crónicas.

Adicionalmente, evidencias recientes sugieren que *P. salmonis* utiliza un sistema de secreción tipo IV funcionalmente similar al Dot/Icm descrito en *Legionella pneumophila* y *Coxiella burnetii* [Gómez et al., 2013; Labra et al., 2016]. La activación de este sistema contribuye de forma sinérgica a la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, promoviendo así la replicación intracelular de la bacteria dentro de los macrófagos del hospedador.

Complementariamente, *P. salmonis* modula la respuesta inmune del hospedador mediante la inducción de una sobreexpresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10, la cual regula negativamente efectores antimicrobianos como la hepcidina, creando un microambiente intracelular favorable para su supervivencia y multiplicación [Álvarez et al., 2014; Álvarez et al., 2016].

Otro mecanismo patogénico desarrollado por bacterias Gram-negativas se basa en la secreción de material insoluble a través de la formación de vesículas de membrana externa (OMV) (Oliver et al., 2017). Las OMV se componen principalmente de proteínas de la membrana externa (OMP), lipopolisacáridos (LPS), fosfolípidos, proteínas periplásmicas, toxinas y otros. Estos factores de virulencia se pueden administrar al citoplasma de la célula huésped mediante la fusión con la membrana plasmática o mediante la internalización a través de vías endocíticas (Bomberger et al., 2009; Tandberg et al., 2017). Se ha determinado con éxito que *P. salmonis* libera de forma constitutiva vesículas de la membrana externa (OMV), que han sido implicadas en la liberación de factores de virulencia que desempeñan diversas funciones en la patogénesis bacteriana, como invasión, adherencia, resistencia a los antibióticos, daño de la célula huésped, inmunomodulación y formación de biopelículas (Oliver et al., 2017). Este antecedente ha sido evaluado en ensayos de infección *in vitro* en células CHSE-214, donde fue posible determinar el efecto citopático de las células, provocado por las OMV purificadas, indicando que podrían ser un vehículo para la entrega de moléculas efectoras a las células hospedadoras (Oliver et al., 2016). Entre los elementos claves de las OMV se encuentra el lipopolisacárido (LPS), el cual parece tener una estructura atípica con cadenas O-antígeno truncadas, lo que podría facilitar la evasión del sistema inmunológico innato y promover la supervivencia en condiciones intracelulares, facilitando la integridad celular, la adhesión, la evasión de los mecanismos de defensa del huésped y el reconocimiento por el sistema inmunológico (Herrera, Olavarría et al. 2022)

En el contexto de la formación de biopelículas, se conoce como un mecanismo utilizado por grupos de bacterias para sobrevivir y persistir frente a factores estresantes como los antimicrobianos y desinfectantes. La producción de biofilm está organizada por una comunidad de microorganismos cooperantes, regulada por la disponibilidad de nutrientes y factores ambientales como osmolaridad, pH, temperatura, contenido de oxígeno y hierro (Chen et al., 2020; Santibanez et al., 2020). *P. salmonis* produce biopelículas como estrategia de resistencia y persistencia frente a estímulos ambientales estresantes o para sobrevivir en el medio marino (Lozano, Diaz et al. 2017). La biopelícula se produciría

directamente o mediante agregados similares a biopelículas que se depositarían sobre la piel, los huevos u otros componentes del pescado. Su producción también se ha relacionado con bancos de semillas ambientales que permitirían la diseminación de nuevos fenotipos virulentos y estructuras virulentas de *P. salmonis*, como vesículas de membrana (Larenas et al., 2003; Smith et al., 2015; Zhang et al., 2019). Recientemente, se ha planteado la hipótesis de que la formación de biopelículas genera tolerancia de patógenos a las diversas moléculas biológicamente activas presentes en la mucosa de la piel de los peces (Levipan et al., 2020), estando esta última involucrada en la modulación ejercida como mecanismo de defensa de la respuesta inmune innata. Por tanto, la biopelícula producida por *P. salmonis* podría considerarse un factor de virulencia relevante.

Además, se ha observado que el patógeno intracelular provocaría la represión de la maquinaria de traducción en los peces, siendo una estrategia sofisticada que permite, por un lado, controlar para optimizar la traducción de proteínas del patógeno y, por otro lado, suprimir la traducción de proteínas involucradas en la respuesta inmune innata de los peces (Pulgar et al., 2015).

Por tanto, el desarrollo de plasticidad metabólica en ambientes con recursos limitados sería uno de los mecanismos cruciales para la supervivencia y desarrollo de virulencia en la bacteria (Valenzuela-Miranda & Gallardo-Escarate, 2018). La secuenciación de *P. salmonis* reveló que es capaz de desarrollar mecanismos de adquisición de hierro controlados por la disponibilidad de hierro del medio ambiente. Los genes involucrados en la adquisición de hierro del ambiente podrían actuar como un factor de virulencia, detectando fluctuaciones de hierro y respondiendo de manera adaptativa a la deficiencia y el exceso de hierro (Pulgar et al., 2015). Existe una regulación moderada entre los sistemas de adquisición y desintoxicación en la bacteria (Pulgar et al., 2015). Todo este trasfondo converge en la hipótesis de que *P. salmonis* estaría modulando selectivamente la señalización de vías alternativas sinérgicas de la respuesta inmune del huésped, lo que le daría éxito en su infección y mantenimiento dentro de la célula.

2.3 Sistema inmune en teleósteos

En teleósteos, estudios a nivel molecular han demostrado que los genes relacionados con la inmunidad presentes en los vertebrados superiores se conservan mayoritariamente; sin embargo, queda mucho trabajo por dilucidar (Dezfuli et al., 2023). La falta de conocimiento a

nivel funcional impacta directamente en el desarrollo de vacunas para enfermedades como la Piscirickettsiosis ya que no existe evidencia concluyente de que las vacunas comerciales disponibles contra este *P. salmonis* logren levantar una respuesta inmune potente en el tiempo (Happold et al., 2020; Rozas-Serri et al., 2019; Vargas et al., 2021).

Hasta la fecha se sabe que en los teleósteos existe una respuesta inmune innata que engloba mecanismos de defensa inespecíficos que no dependen de encuentros previos con el patógeno, proporcionando la primera línea de defensa que constituye la base de la respuesta inmune. Los teleósteos presentan la mayoría de los componentes descritos en el sistema inmune innato de mamíferos, siendo algunos de estos más diversos, por ejemplo, las lectinas, el sistema del complemento y los receptores de células natural killer (NK) (Dezfuli et al., 2023). La barrera epitelial y mucosa de la piel, branquias y tracto digestivo son una barrera importante ya que los protege frente a enfermedades como la Piscirickettsiosis. Esto se debe a que la mucosa del pez brinda protección física y mecánica con diversas moléculas como péptidos antimicrobianos, factores del complemento e inmunoglobulinas (Salinas, 2015). Los componentes celulares del sistema inmunológico innato son macrófagos, monocitos, neutrófilos y células dendríticas (Sepulcre et al., 2009; Wittamer et al., 2011; Wu et al., 2020) que reconocen patógenos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Los PRR reconocen las estructuras patógenas conservadas, como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

Por otro lado, el sistema inmunológico adaptativo es estimulado por la exposición a un antígeno que le permitiría desarrollar una selección clonal de varios linfocitos, aumentando en magnitud y acelerando la capacidad defensiva con cada exposición sucesiva a este antígeno particular. En los teleósteos, las células dendríticas, los macrófagos, los monocitos, los neutrófilos y los linfocitos B se han identificado como células presentadoras de antígeno (APC). Las APC a través de sus receptores de reconocimientos de patrones (PRR), reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de los diferentes patógenos. Una vez reconocidas, las APC que transportan el antígeno migran al riñón anterior y al bazo, estando estos órganos linfoides secundarios involucrados en la presentación de antígenos y siendo responsables de iniciar la respuesta inmune adaptativa (Martinez et al., 2018; Mulero et al., 2007). Estudios en pez cebra y trucha arcoíris han identificado que las APC presentan una alta expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) y factores coestimuladores como el cluster de diferenciación 80 y 86 (CD80/CD86) que participan en la estimulación y activación de la

respuesta inmune adaptativa (Bassity & Clark, 2012; Lugo-Villarino et al., 2010). Las moléculas CD80 / 86 son glicoproteínas de membrana de tipo I expresadas en la superficie de las APC, lo que permite la generación de una señal coestimuladora que activa los receptores de superficie de las células T (TCR) (Liu et al., 2022) Otro marcador de superficie celular relevante es CD83, una proteína de membrana integral perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas que actúa como una proteína inmunorreguladora, entregando señales coestimuladoras a los linfocitos T nativos que estimulan su proliferación (Morales-Lange et al., 2021; Prechtel & Steinkasserer, 2007). En este contexto, las células T que presentan receptores de superficie (receptor de células T, TCR) participan activamente en la captación del antígeno que presentan las APC (Husson et al., 2011). Una vez que se estimulan las células T, la liberación de citocinas orquesta las respuestas inmunes de otras células inmunitarias que permitirían la diferenciación de los linfocitos T nativos en varias subpoblaciones de células. Los cuales, identificados funcionalmente en vertebrados superiores, corresponden a las subpoblaciones de linfocitos T Helper 1 (Th1) importante para la inmunidad mediada por células; T helper 2 (Th2) mediador de la respuesta humoral; T reguladores (Tregs) ligado a la regulación o supresión de las respuestas inmunes para prevenir el daño inmunológico y T helper 17 (Th17) ligado a las respuestas proinflamatorias y para mejorar la respuesta a bacterias extracelulares (Morales-Lange et al., 2021; Naito et al., 2011).

Las subpoblaciones Th1 de linfocitos citotóxicos CD8+ participan en la eliminación directa de células infectadas o anormales liberando moléculas para inducir la apoptosis. Las células diana se identifican mostrando fragmentos anormales de proteínas o patógenos en asociación con moléculas MHC-I. Por lo tanto, el sistema inmunológico del huésped sería capaz de protegerse contra patógenos intracelulares, como *P. salmonis* (Tian et al., 2022) . Por otro lado, las subpoblaciones Th2 de linfocitos CD4+ o células T auxiliares producen citocinas que activan las células inmunes que participan en las respuestas humorales y mediadas por células. Una característica de las células T colaboradoras es que expresan una glicoproteína de superficie CD4, lo que les confiere especificidad en la interacción celular con el marcador de superficie MHC-II. En los peces teleósteos, se han demostrado muchos ortólogos que representan diferentes subconjuntos de células T colaboradoras y sus factores de transcripción (Laing & Hansen, 2011). La respuesta inmune humoral (subpoblaciones Th2) mediada por anticuerpos produce inmunoglobulinas (Ig) que pueden reconocer antígenos microbianos, neutralizar su infectividad y ayudar a su eliminación. Hasta la fecha, se han identificado tres clases de Ig en teleósteos. Estos son IgM e IgD que exhiben

características de vertebrados, como afinidad intrínseca por antígenos y alta afinidad funcional; La IgM es la más abundante dentro de los teleósteos y es producida por células plasmáticas y plasmoblastos ubicados en el riñón anterior (Zhang et al., 2010), después de las inmunizaciones de refuerzo, los teleósteos muestran un aumento sustancial en los títulos de IgM (Tobar et al., 2015). Otra clase de Ig en los teleósteos es la IgT / Z (de Teleost / Zebrafish), que es específica de los peces y se informa en la mucosa, la piel y los intestinos (Parra et al., 2015). Se ha podido detectar que las bacterias presentes en los intestinos de los peces están cubiertas por IgT, siendo medibles en grandes cantidades principalmente en el intestino, mientras que la respuesta de IgM se detecta solo en el suero (Zhang et al., 2010).

Bajo esta perspectiva, independiente de las diferencias filogenéticas, los esquemas utilizados por los vertebrados superiores operan bajo principios conservados, involucrando comparaciones con peces teleósteos, de los cuales se pueden extraer principios generales del diseño de la respuesta inmune adaptativa. Esta comparación nos permitiría comprender y mejorar los métodos profilácticos para combatir patógenos intracelulares como *P. salmonis*. Esto conduciría al desarrollo de vacunas que levanten una respuesta inmune humoral y mediada por células exacerbada a lo largo del tiempo, protegiendo a los teleósteos no solo de los ataques de patógenos como *P. salmonis*, sino también de las coinfecciones con ambos genogrupos de la bacteria que impactan directamente en el sistema inmunológico de los peces.

2.4 Estrategias de prevención y control de la Piscirickettsiosis

Desde el primer brote severo de *Piscirickettsia salmonis* en Chile en 1989, que provocó la muerte de más de un millón de peces, la Piscirickettsiosis (SRS) se ha consolidado como uno de los principales desafíos sanitarios de la salmonicultura nacional. A lo largo de los años, se han implementado diversas estrategias de control, incluyendo diagnósticos oportunos, manejo del estrés, uso de vacunas e inmunoestimulantes, aplicación de antibióticos y, más recientemente, programas de cría selectiva de peces resistentes (Correa et al., 2015; Evensen, 2016; Figueroa et al., 2020). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, la enfermedad continúa generando elevadas pérdidas productivas y económicas. En 2012, el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) implementó un programa nacional de vigilancia y control enfocado en la detección temprana del patógeno y la aplicación de

medidas graduales para contener los brotes, lo que ha permitido dimensionar la magnitud del problema.

La vacunación constituye la estrategia profiláctica más utilizada para prevenir los brotes de *P. salmonis*, con la disponibilidad de 17 vacunas comerciales autorizadas por el SAG (SAG., 2024). Estas presentan una alta diversidad en cuanto a formulación: existen vacunas monovalentes y pentavalentes, de tipo bacterina, subunidades o bacterias vivas atenuadas, con variación en las cepas de *P. salmonis* utilizadas y en los adyuvantes incorporados. En los últimos años, la salmonicultura chilena ha mantenido un uso masivo de vacunas para el control de la Piscirickettsiosis, destinando una parte importante de las dosis administradas a la prevención de esta enfermedad, reflejando su relevancia sanitaria en la industria. Sin embargo, estudios de campo han demostrado que la eficacia de las vacunas disponibles contra *Piscirickettsia salmonis* es altamente variable, reflejando un desempeño inconsistente entre distintas condiciones productivas y epidemiológicas (Happold et al., 2020). Esta variabilidad en la protección sugiere que las vacunas actuales no confieren una inmunidad robusta frente a la elevada diversidad genética de *P. salmonis*, marcada por la coexistencia de dos genogrupos principales, LF-89 y EM-90, los cuales presentan diferencias significativas en su virulencia y en la respuesta inmune que inducen en el hospedero (Rozas-Serri et al., 2024; Rozas-Serri et al., 2023)

Como consecuencia de estas limitaciones, la salmonicultura chilena mantiene una alta dependencia del uso de antibióticos para el control de la Piscirickettsiosis. En 2024, se utilizaron 451 toneladas de compuestos antimicrobianos activos (SERNAPESCA, 2024). Al relacionar el uso de antimicrobianos con la biomasa total cosechada, se determinó un Índice de Consumo de Antimicrobianos (ICA) de 0,034%, equivalente a un uso promedio de 340 gramos de principio activo por tonelada producida. Este valor contrasta notablemente con lo observado en la acuicultura noruega, donde el uso de antibióticos es considerablemente menor, evidenciando diferencias sustanciales en las estrategias de manejo sanitario entre ambas industrias (Millar et al., 2018).

Esta diferencia refleja que, a pesar del elevado número de dosis vacunales aplicadas, persisten tres problemas críticos: la alta prevalencia de la enfermedad, las elevadas tasas de mortalidad asociadas y el excesivo uso de antimicrobianos. Esto no solo incrementa los costos productivos y los riesgos de resistencia antimicrobiana, sino que también genera

preocupación por la bioacumulación de residuos de antibióticos en el ambiente (Cabello et al., 2013).

Estos antecedentes ponen en evidencia la ineficiencia relativa de las estrategias actuales de control y resaltan la necesidad urgente de desarrollar nuevas soluciones vacunales más efectivas, capaces de cubrir la diversidad de genogrupos presentes y reducir la dependencia de tratamientos antimicrobianos. De esta forma, se podrían abordar las brechas existentes en la prevención y contribuir a la sustentabilidad productiva y sanitaria de la salmonicultura chilena (Rozas & Enríquez, 2014; Valenzuela-Avilés et al., 2022).

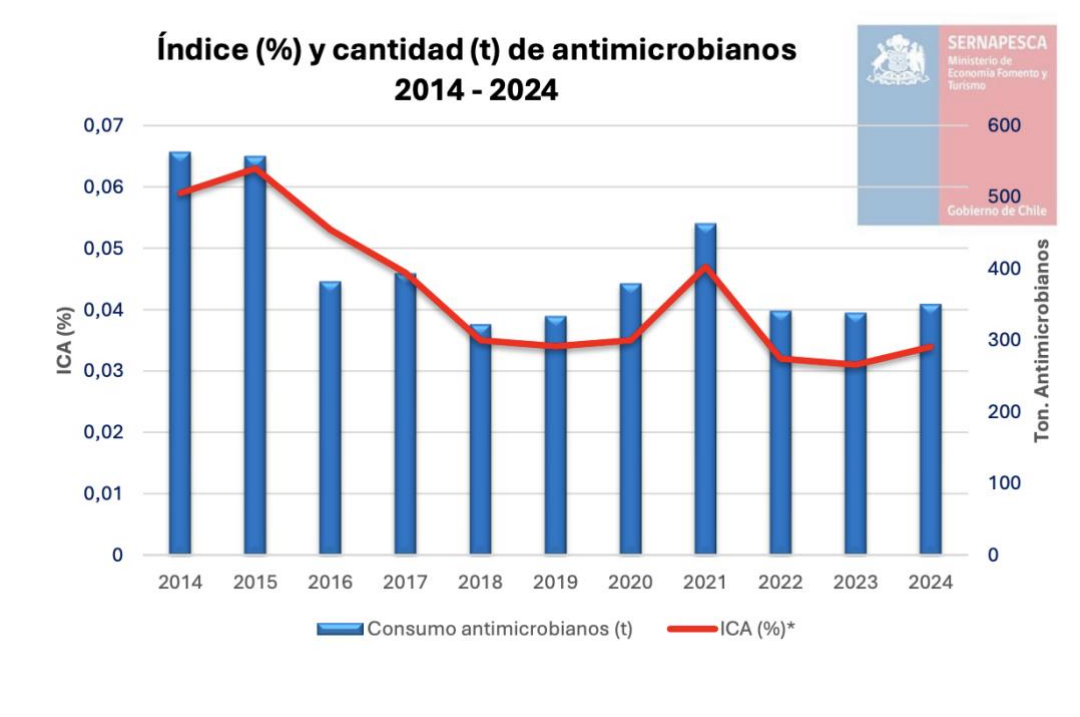


Figura 1. Índice de Consumo de Antimicrobianos (ICA, %) y cantidad total de antimicrobianos administrados (toneladas) en la salmonicultura chilena entre 2014 y 2024. Fuente: SERNAPESCA (2024).

2.5 Factores intrínsecos que influyen en la eficacia de las vacunas

Los factores intrínsecos corresponden a características propias del hospedero que modulan la eficacia de las vacunas, tales como la genética del pez y el patógeno, el tiempo productivo

del pez, el estado fisiológico de los peces, la condición inmunológica global. Estos elementos determinan la capacidad individual de los peces para generar respuestas inmunes robustas tras la vacunación, por lo que la interacción entre estos parámetros es clave para comprender los resultados variables observados en la protección conferida por las vacunas (Figura 3).

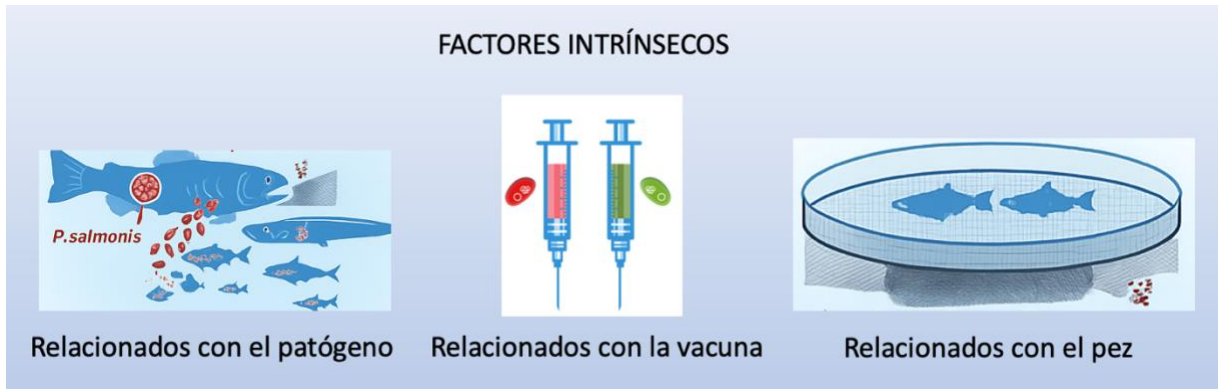


Figura 2. Factores intrínsecos que afectan la eficacia de las vacunas contra *Piscirickettsia salmonis* en salmonicultura.

2.5.1 Factores relacionados con el pez

La variabilidad genética de los peces influye directamente en la resistencia natural y en la eficacia de la inmunización, generando diferencias significativas tanto entre especies como entre familias dentro de una misma especie (Figuroa et al., 2020; Long et al., 2021; Barría et al., 2019). Mientras algunos individuos desarrollan una protección sólida tras la vacunación, otros muestran baja respuesta inmune, lo que aumenta su susceptibilidad (Figura 3).

Por otro lado, la diversidad genética de *P. salmonis* y su capacidad para evadir las defensas del hospedador dificultan el diseño de vacunas universales y eficaces. Además, las vacunas pueden presentar baja inmunogenicidad o desajustes con las cepas circulantes, reduciendo su efectividad. Los peces también cuentan con mecanismos adicionales de defensa, como la privación de hierro para limitar el crecimiento bacteriano (Pulgar et al., 2015), la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y la activación de genes asociados a la resistencia, como receptores de interleucinas y fucosiltransferasas (Correa et al., 2015). Asimismo, las

trampas extracelulares formadas por ADN, histonas y péptidos antimicrobianos actúan capturando *P. salmonis* y controlando su propagación (Alarcón et al., 2021).

En conjunto, estos factores reflejan la complejidad biológica que influye en la eficacia de las vacunas y subrayan la necesidad de considerar simultáneamente la genética del hospedador, la variabilidad del patógeno y las características de la vacuna para diseñar estrategias de control más efectivas contra la Piscirickettsiosis.

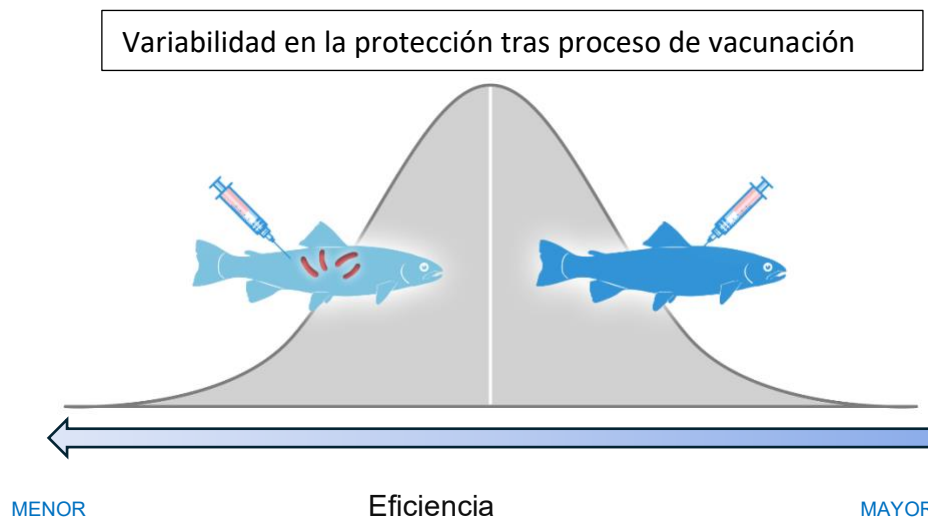


Figura 3.. Variabilidad en la eficacia de las vacunas contra *Piscirickettsia salmonis* en salmones del Atlántico, evidenciando diferencias en la protección conferida entre individuos vacunados.

2.5.2 Factores relacionados con el patógeno

El primer aislamiento de *P. salmonis* se llevó a cabo en el sur de Chile hace más de 20 años, y el primer borrador del genoma secuenciado de la cepa *P. salmonis* LF-89 (VR-1361) se publicó en 2013 (Eppinger et al., 2013). Sin embargo, fue en 2015 cuando se secuenció completamente su genoma, reportando 3.2 Mb y cuatro plásmidos de tamaño medio-grande. Actualmente, se ha demostrado que *P. salmonis* presenta una alta variabilidad genética con al menos 3 genogrupos principales: LF, EM y NC, siendo este último aun no caracterizado (Schober et al., 2023). La clasificación de los genogrupos se basó principalmente en la distribución geográfica, la susceptibilidad antimicrobiana y la especificidad del huésped (Schober et al., 2023; Nourdin-Galindo et al., 2017; Ramírez et al., 2015). Aunque todos los

genogrupos son patogénicos, el nivel de virulencia es diferente. Esto podría explicarse por la alta diversidad de transposasas impulsa la adquisición de genes, modificación antigénica y pseudogenización, lo que conlleva a generar genogrupos con diferencias en factores de superficie, como antígenos y sistemas de secreción tipo IVB, que contribuyen a variaciones en la virulencia y evasión inmunitaria (Schober et al., 2023).

Los últimos informes emitidos revelan la como la alternancia de los grupos más caracterizados (LF-89 Y EM-90), varia en el tiempo, siendo preponderante LF-89 entre los años 2010 y 2014, a una dominancia de EM-90 el año 2015 (Aravena et al., 2020; Saavedra et al., 2017). El plan de vigilancia y control de SRS emitido por SERNAPESCA (SERNAPESCA, 2013), no incorpora la detección de genogrupos de *P. salmonis*, ya que se enfoca en la detección temprana del patógeno, seguimiento de las granjas infectadas y medidas de control durante el progreso de la enfermedad. Rozas-Serri et al., 2023, demostró la coinfección compleja de ambos genogrupos en las granjas de cultivo chilenas, preponderando la tasa de positividad para el año 2020 y 2021 del genogrupo LF-89. Es por esta razón, que el conocimiento de la dinámica espacio temporal de ambos genogrupos de *P. salmonis* es fundamental para diseñar una adecuada estrategia de vacunación para combatir los brotes de SRS.

2.5.3 Factores relacionados con la vacuna

El desarrollo de vacunas eficientes contra *P. salmonis* se ha visto obstaculizado durante 30 años debido al escaso conocimiento sobre la interacción patógeno-hospedador, las limitaciones de las células de memoria de los peces y los mecanismos utilizados por las bacterias intracelulares para evitar la activación de las células CD8+ (Pontigo et al., 2021; Rozas-Serri, 2022). Además, no hay evidencia que indique que las vacunas activan las respuestas inmunes mediadas por células necesarias para controlar los patógenos intracelulares (Munang'andu, 2018; Rozas-Serri, 2022). Un conocimiento más profundo del sistema inmunológico de los salmónidos y una mejor comprensión de los mecanismos inmunológicos involucrados en la interacción hospedador-patógeno y los genes relacionados con la variación genética en peces vacunados son esenciales para el uso correcto y el desarrollo de vacunas más eficientes contra *P. salmonis*.

La respuesta inmune de la vacuna generalmente se caracteriza por la cantidad de anticuerpos generados. Sin embargo, otros actores deben ser activados para iniciar una respuesta inmune relevante que evite o controle la infección por *Piscirickettsia* en los salmónidos. Un estudio de Vargas y colaboradores informa que la inmunización del salmón del Atlántico con una vacuna comercial viva induce una regulación al alza a corto plazo (5 dpv) de la respuesta inmune mediada por células, modulada por la regulación al alza de *ifn-a*, *ifn-g*, *cd4* y *cd8a*, pero una respuesta decreciente a los 15 y 45 dpv en condiciones de campo (Vargas et al., 2021). Otro estudio evaluó una bacterina de células completas inactivadas de *P. salmonis* en condiciones controladas en salmón del Atlántico (Rozas-Serri et al., 2019); la vacuna experimental indujo una regulación al alza de mediadores de la inmunidad innata y genes de citocinas proinflamatorias que disminuyen con el tiempo, como *ifn-g*, *tnf-a*, *il-1b*, *il-10*, *il-12b*, y la regulación al alza de genes de inmunidad mediada por células y humoral, como *mhc-I*, *mhc-II* y *cd4*. Sin embargo, la vacuna produjo la regulación a la baja de *cd8b* e *igm* después de 7 dpv, apoyando la respuesta de las células T CD4+ pero no indujo una respuesta inmune mediada por células T CD8+ ni una respuesta humoral (Rozas-Serri et al., 2019).

Estudios previos han demostrado que los antígenos de *P. salmonis* pueden activar la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, las vacunas comerciales solo logran una respuesta humoral y no celular (Figueroa et al., 2022). Este problema ha impulsado el desarrollo de vacunas experimentales diseñadas para mejorar la inmunidad mediada por células y aumentar la eficiencia en condiciones de campo. Pontigo et al., (2021) desarrollaron un prototipo de vacuna que incluye proteínas antigénicas de *P. salmonis*, logrando un RPS de 89.6% tres meses después de la inoculación. Asimismo, se han estudiado proteínas recombinantes quiméricas relacionadas con el metabolismo del hierro como antígenos, mejorando la respuesta inmune en peces infectados con más de un patógeno (Valenzuela-Muñoz et al., 2021). González-Stegmaier et al. (2021) propusieron el uso de flagelinas recombinantes como inmunoestimulantes junto con vacunas comerciales, mejorando la producción de IgM. Adicionalmente, Caruffo et al., (2021) desarrollaron una vacuna basada en proteoliposomas, obteniendo un RPS cercano al 46%, con capacidad de inducir anticuerpos específicos (IgM) y una respuesta inmune celular mediada. Por otro lado, Sotomayor-Gerding et al. (2020) diseñaron una vacuna oral basada en antígenos encapsulados en alginato, que indujo una respuesta adaptativa a 840 días grado. Además,

se ha mejorado la producción de vacunas mediante un medio de cultivo optimizado para *P. salmonis* (Fuentealba et al., 2020).

2.6 Uso de vacunas de proteínas recombinantes para la prevención de enfermedades de peces

Bajo la creciente demanda de recursos acuícolas a nivel mundial, la biotecnología juega un rol fundamental en la expansión y crecimiento económico mediante el empleo de tecnologías como la genómica y tecnología de proteínas recombinantes. Estas tecnologías impactan en el progreso de métodos vanguardistas para la identificación y tratamiento de enfermedades, así como el desarrollo de nuevos métodos profilácticos para generar menores tasas de mortalidad en conjunto con una mayor productividad (Melamed et al., 2002). En la actualidad, el mercado de las proteínas recombinantes ofrece una gran variedad de oportunidades para un amplio abanico de aplicaciones, revolucionando el campo biotecnológico (Walsh, 2010). La aplicación de proteínas recombinantes en la acuicultura va desde la producción de proteínas reguladoras del crecimiento (Chan et al., 2003), hormonas (Gu et al., 2000) y enzimas con diversas actividades (Aoki et al., 2003). Otra de las áreas en expansión del uso de las proteínas recombinantes, ha sido la prevención de enfermedades a través del empleo de vacunas de origen recombinante.

Para la producción de proteínas recombinantes se necesita sistemas de expresión conformado por un organismo hospedero, junto a un vector o fragmentos de ADN que presenten los elementos genéticos básicos para lograr transcribir y sintetizar la proteína de interés; además del constructo génico recombinante que uno desea expresar (Guerrero-Olazarán et al., 2004). La elección de un sistema de expresión adecuado para la síntesis de proteínas heterólogas debe tener en consideración el origen biológico y las propiedades químicas y biológicas de la proteína de interés, así como el bioproceso que se utilizará para producirla y su posterior aplicación. Por lo que es fundamental conocer las propiedades de las diferentes cepas de los organismos hospedero, con vistas a seleccionar la más adecuada para la expresión de la proteína recombinante. El origen biológico de la proteína es relevante para la elección del sistema de expresión, ya que generalmente se utilizan sistemas eucariotas o levaduras si la proteína eucariota debe ser glicosilada o producir modificaciones post-traduccionales; esto en base a la incapacidad de las bacterias de producir las

glicosilaciones necesarias para la funcionalidad de proteínas eucariotas (Ohtake & Arakawa, 2013). Al mismo tiempo, se ha explorado el uso de microalgas genéticamente modificadas como vehículos para vacunas recombinantes en acuicultura. Por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardtii* ha sido utilizada para expresar genes antigénicos, ofreciendo una plataforma potencial para el desarrollo de vacunas orales destinadas a la prevención de enfermedades en peces (Ma et al, 2020). *Escherichia coli* sigue siendo uno de los sistemas de producción de proteínas más popular tanto a nivel académico como industrial (Walsh, 2010); debido a las innumerables ventajas productivas como por ejemplo: alta densidad de cultivo, bajo costo al cultivar, amplia comprensión de su biología, genoma conocido que posibilita una fácil modificación genética lo que permite la incorporación de una gran variedad de vectores de expresión con rendimiento comercial, facilitando su producción a gran escala (Garcia-Fruitos et al., 2012). Además de poseer una gran eficiencia transcripcional y traduccional, otorgando estabilidad de las moléculas ante un ambiente proteolítico (Garcia-Fruitos et al., 2012).

El uso de vacunas basadas en proteínas recombinantes han demostrado ser una estrategia prometedora en la prevención de enfermedades en peces. Un ejemplo reciente es el estudio de Harshitha et al. (2024), en el cual se evaluó una vacuna oral basada en la proteína de membrana externa A (OmpA) de *Aeromonas hydrophila*, encapsulada en nanopartículas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). La administración de esta vacuna en peces cebras (*Danio rerio*) resultó en una supervivencia relativa del 77,7% tras el desafío con *A. hydrophila*, además de una significativa sobrerregulación de genes inmunitarios en los peces vacunados. Otro avance notable es el uso de proteínas de membrana externa (OMPs) en el diseño de vacunas para peces. Estas proteínas, conservadas entre diferentes serotipos de bacterias Gram-negativas, han sido empleadas en vacunas de subunidades, proteínas recombinantes y vacunas de ADN, mostrando eficacia en la protección contra patógenos bacterianos en acuicultura, ya que las OMPs son esenciales para mantener la integridad y la permeabilidad selectiva de la membrana bacteriana, y desempeñan un papel clave en las respuestas adaptativas de las bacterias, como la captación de solutos, la adquisición de hierro, la resistencia a antimicrobianos (Maiti et al., 2020).

2.7 Generación de Nanoproteínas (NPs) con características de cuerpos de inclusión (CI) y su uso en la prevención de enfermedades de peces

Recientes estudios han demostrado que es factible la combinación de varios péptidos en un único polipéptido antimicrobiano e inmunomodulador recombinante. En este contexto, López-

Cano et al. (2023) diseñaron y evaluaron una serie de proteínas multidominio basadas en péptidos antimicrobianos de defensa del huésped (HDPs). Las secuencias peptídicas utilizadas en su diseño provienen de defensinas humanas, como HD5 y H β D3, además de catelicidina LL-37 y péptidos antimicrobianos linguales (LAP). Estos péptidos se expresaron de manera recombinante en *Escherichia coli* y se probaron contra patógenos humanos relevantes, demostrando una alta eficacia antimicrobiana y capacidad de erradicación de biopelículas. Sin embargo, la versatilidad del diseño multidominio, el papel que desempeña cada dominio y cómo la edición de las secuencias de los diferentes dominios afecta la actividad final de la proteína depende de la secuencia genética a incorporar. Bajo este contexto, para esta tesis doctoral, la generación de cuerpos de inclusión (CI) producidos a partir de proteínas recombinantes son denominados nanoproteínas (NPs), debido a su tamaño nanométrico y su capacidad para actuar como inmunomoduladores efectivos. Aunque los CI se forman naturalmente como agregados insolubles, se propone aprovechar sus propiedades estructurales y su capacidad para interactuar con el sistema inmune, convirtiéndolos en nanoproteínas.

Las Nanoproteínas (NPs) con características de cuerpos de inclusión activos (CI) son un andamio de proteínas solubles e insolubles altamente enriquecidas por una sola especie de proteína quimérica que presenta distintos grados de empaquetamiento producidas durante el proceso de producción de proteínas recombinantes (Lugo-Villarino et al., 2010) y dependiendo de las condiciones de producción, pueden contener cantidades variables de la proteína de interés en su estructura secundaria (de Marco, 2013; Gupta & Shukla, 2016; Seras-Franzoso et al., 2016). Se organizan en redes fibrilares porosas que otorgan estabilidad mecánica, en que se incrustan las proteínas en sus diferentes estados de plegamiento (Cano-Garrido et al., 2013; Georgiou & Valax, 1999; Gupta & Shukla, 2016). Dentro de los factores que incrementan la formación de NPs se encuentran las condiciones de cultivo, ya que las fluctuaciones de temperatura y variaciones en el pH generan estrés en las cepas hospederas, impactando en la formación de proteínas recombinantes incorrectamente plegadas. El plegado incompleto puede ser causado por la sobrecarga de la maquinaria de plegado debido a altas concentraciones de proteína de interés recombinante en la producción (Bhatwa et al., 2021). Las modificaciones postraduccionales incorrectas o ausentes también pueden conducir a errores de plegamiento y agregación de proteínas. Sin embargo, enfoques para el replegado y resolubilización son muy laboriosos y con procesos

engorrosos (Bhatwa et al., 2021). Otro de los factores que impactan en la formación, son las características fisicoquímicas y estructurales propias de la proteína de expresión; estas características incluyen el peso molecular, el número de residuos hidrófobos contiguos y regiones de baja complejidad; por lo general, las proteínas con mayor peso molecular presentan mayor número de compuestos intermediarios de plegamiento que aumentan la probabilidad de agregación (Gonzalez-Montalban et al., 2007). Este andamio de proteínas oscila entre diámetros de nano y micro que se acumulan en las células bacterianas, luego de la expresión del gen recombinante que codifica para la proteína (Pesarrodonna et al., 2019). Tras la etapa de purificación, las NPs con características de cuerpos de inclusión se mantienen como biomateriales mecánicamente estables, fáciles de manipular en las distintas plataformas e interfases (García-Fruitos et al., 2009). Se ha logrado identificar que los cuerpos de inclusión formados con proteínas terapéuticamente relevantes, tienden a replegarse y penetrar las células de mamíferos a través de macropinocitosis (Seras-Franzoso et al., 2016); la captación celular de cuerpos de inclusión puede ser de manera individual o agrupada en tamaños variables. Aunque una fracción de las partículas penetrantes son conducidas a degradación lisosomal, cantidades biológicamente significativas son liberadas al citosol (Seras-Franzoso et al., 2016). El proceso de liberación mediante el escape endosomal, es fundamental para evitar la marcada degradación lisosomal y, por ende, permitiría alcanzar mayores concentraciones de proteínas en los comportamientos subcelulares objetivos bajo condiciones adecuadas (Seras-Franzoso et al., 2013; Seras-Franzoso et al., 2016; Vázquez et al., 2012). Aunque el mecanismo por el cual la proteína funcional se disocia de la superficie del andamio de los cuerpos de inclusión aún no está claro, se ofrecen ciertas pistas con respecto al proceso de liberación. Se ha observado que la deposición de proteínas funcionales resulta ser un proceso muy controlado por numerosas chaperonas y proteasas (Martínez-Alonso et al., 2009; Seras-Franzoso et al., 2016), que podrían provocar una liberación lenta de la proteína funcional desde los CI anclados a la membrana (Vázquez et al., 2012). Sumando a todo esto, se ha demostrado que en *in vivo*, semejando un contexto real donde existe un ambiente proteolítico y entorno hostil que impacta en la estabilidad de las proteínas; los cuerpos de inclusión respondieron con un tiempo de tratamiento mucho mayor, apuntando a una lenta liberación bajo condiciones fisiológicas adecuadas, ya que los andamios amiloide que contienen a las proteínas de interés pertenecen sin cambios, lo que otorga una alta estabilidad mecánica y biológica por parte de los cuerpos de inclusión (Gifre-Renom et al., 2020; Martínez-Alonso et al., 2009; Unzueta et al., 2018).

Aunque el principal componente en los cuerpos de inclusión es la proteína recombinante diseñada (entre un 70% y 95%) (Qi et al., 2019) también presenta trazas de moléculas como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglucanos (PNG), ácidos nucleicos y componentes ribosómicos de la cepa productora. Una de las características de los LPS es que mejora la respuesta no específica en peces y por sí solo actúa como potenciador inmunológico contra varios de los principales patógenos de peces, tales como *Edwardsiella ictaluri*, *Vibrio anguillarum*, *V. salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas bestiarum* (Selvaraj et al., 2006). El aumento de la resistencia contra algunos patógenos observada después de la administración LPS y betaglucanos en peces, se encuentra mediada por la modulación de las defensas del huésped al aumentar los leucocitos totales (Selvaraj et al., 2005) y parámetros inmunológicos como la actividad de destrucción bacteriana, la fagocitosis (Dautremepuits et al., 2006; Solem et al., 1995) y también activación de linfocitos (células B) que producen anticuerpos específicos en peces (Selvaraj et al., 2005). La aplicación de la endotoxina o LPS ha sido utilizada como adyuvante de vacunas de bacterinas, para aumentar la respuesta inmune y protección en los peces (Figueras et al., 1998), ya que a pesar de ser una endotoxina, los peces presentan un nivel de tolerancia hacia estas moléculas superior a los de humanos y aves (mamíferos su nivel de tolerancia es de picogramos y el peces alcanza los microgramos); esto hace que los peces presenten tolerancia a shock séptico mediado por la endotoxina (Bui et al., 2013; Selvaraj et al., 2005). Por lo que es posible obtener efecto protector de las trazas arrastradas de la bacteria hospedera en la que se sobreexpresa la proteína de interés, permitiendo combinar diferentes propiedades en una sola partícula, siendo una característica deseada que permitiría mejorar la respuesta inmune (Liovic et al., 2012). En este sentido, las nanoproteínas con características de cuerpo de inclusión, se han adaptado como una nanopíldora “todo en una”, en base a su penetrabilidad celular natural, arrastre de trazas inmunoestimulantes de la bacteria productora y la liberación sostenida de la proteína en el citosol de las células captadoras.

2.8 Nanoproteínas (NPs) como vacunas e inmunoestimulantes para peces

Se ha demostrado la versatilidad y el enorme potencial de los cuerpos de inclusión (CI) como nuevos biomateriales en la biotecnología moderna. Estas estructuras, tradicionalmente consideradas subproductos de la expresión recombinante, hoy son reconocidas por sus

propiedades únicas, como su alta estabilidad mecánica, resistencia a la degradación y capacidad para proteger epítopos antigénicos, lo que permite su aprovechamiento como plataformas de administración de antígenos en vacunas. Hasta donde se conoce, este sería uno de los primeros estudios que explora la producción de proteínas recombinantes con potencial antigénico en forma de cuerpo de inclusión, conceptualizadas aquí como nanoproteínas (NPs) debido a su tamaño nanométrico y a su doble función como vehículos y antígenos.

Un ejemplo del potencial de estas estructuras lo demuestra Roca-Pinilla (2020) en el diseño de moléculas basadas en péptidos antimicrobianos (AMPs) que, al combinarse en proteínas multidominio, mantienen su estabilidad, carecen de toxicidad y permiten fusionar actividades inmunomoduladoras complementarias, evitando el uso de proteínas transportadoras irrelevantes que encarecen y dificultan la escalabilidad de procesos vacunales. Bajo esta lógica, Torrealba et al. (2016) desarrollaron citoquinas nanoproteína en forma de CI como inmunoestimulantes para peces, demostrando que estas estructuras permiten conservar la funcionalidad de moléculas naturalmente inestables. La administración de estas nanopartículas en pez cebra (*Danio rerio*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) indujo la expresión de citoquinas proinflamatorias, aumentó la activación de macrófagos y generó protección significativa frente a desafíos letales con *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium marinum*. De forma similar, Ji et al. (2019) confirmaron que cuerpos de inclusión cargados con proteínas inmunorrelevantes prolongan la persistencia antigénica y potencian las respuestas inmunes adaptativas.

Esta evidencia abrió paso al diseño de vacunas basadas en cuerpos de inclusión para patógenos virales de peces. Por ejemplo, Thwaite et al. (2018) desarrollaron proteínas recombinantes de la cápside del virus de la necrosis nerviosa (NNV), que, al administrarse en *Solea senegalensis*, generaron anticuerpos específicos y aumentaron la expresión de genes asociados a la inmunidad adaptativa. Estos antecedentes avalan la hipótesis de que las nanoproteínas derivadas de cuerpos de inclusión potencian la respuesta inmunológica al proteger la integridad de los epítopos antigénicos, garantizar su liberación sostenida y favorecer su captación por células presentadoras de antígeno, como macrófagos y células dendríticas.

2.9 Vacunología inversa

La vacunología inversa ha emergido como una estrategia complementaria para acelerar el desarrollo de prototipos vacunales multiepitópicos. Esta disciplina, propuesta inicialmente por Rino Rappuoli en 2000 (Rappuoli, 2020) para el diseño de vacunas contra *Neisseria meningitidis*, ha revolucionado el paradigma clásico al permitir la identificación de antígenos sin necesidad de cultivar el patógeno. Mediante el análisis bioinformático de genomas completos, la vacunología inversa facilita la detección de epítomos antigénicos conservados entre diferentes genogrupos, seleccionando secuencias con alto potencial antigénico.

El caso más emblemático es la vacuna Bexsero, la primera aprobada contra meningococo B y desarrollada íntegramente a partir de este enfoque genómico (Delany et al., 2013). Este antecedente marcó un cambio en la manera de concebir las vacunas, al validar que la selección racional de antígenos mediante herramientas bioinformáticas podía derivar en un producto licenciado y aplicado masivamente en salud pública.

Actualmente, la vacunología inversa transita entre la investigación básica y el desarrollo aplicado. Desde la inmunoinformática, se identifican proteínas conservadas, se predicen epítomos y se modelan proteínas quiméricas; y en paralelo, se han obtenido vacunas experimentales con resultados positivos en peces y mamíferos (Pumchan et al., 2020; Liu et al., 2024). Aunque pocos productos veterinarios han alcanzado aún el licenciamiento, los resultados experimentales muestran que este enfoque supera limitaciones de vacunas clásicas, especialmente frente a patógenos con alta variabilidad genética como *P. salmonis*.

A nivel internacional, la OMS y la EMA han reconocido a la vacunología inversa como un enfoque válido en la innovación de vacunas racionales basadas en epítomos (Delany et al., 2013). En Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) regula el registro de productos biológicos inmunológicos, y ya contempla tecnologías basadas en genómica y proteómica como sustento científico para la seguridad y eficacia de vacunas. Esto asegura la compatibilidad del desarrollo propuesto con marcos regulatorios nacionales e internacionales, facilitando su futura transferencia al sector productivo.

En medicina veterinaria, los avances también son significativos. En porcinos, se ha demostrado que una vacuna multiepitópica recombinante contra *Streptococcus suis* logró inducir protección cruzada frente a múltiples serotipos, reduciendo la mortalidad y la carga bacteriana (Liu et al., 2024). En acuicultura, revisiones destacan que *Streptococcus agalactiae* es uno de los principales patógenos en tilapia a nivel mundial, asociado a

mortalidades masivas y pérdidas productivas, ha motivado un fuerte interés en vacunas elaboradas mediante vacunología inversa (Abdallah et al., 2024). Pumchan et al. (2020) diseñaron una vacuna quimérica multiepitópica contra *Streptococcus agalactiae* en tilapia, que alcanzó tasas de supervivencia relativa de 57–76%, confirmando la aplicabilidad de esta estrategia vacunal en peces.

La integración de ambas aproximaciones, el uso de nanoproteínas con características de cuerpos de inclusión y el diseño racional basado en vacunología reversa representa una estrategia de vanguardia para el desarrollo de vacunas innovadoras en salmonicultura. Esta combinación permite aprovechar la estabilidad estructural, la liberación controlada y la capacidad inmunoestimulante natural de los CI, junto con identificar epítomos altamente conservados y relevantes, acelerando así la generación de prototipos multiepitópicos dirigidos contra patógenos complejos como *Piscirickettsia salmonis*, con potencial para inducir respuestas inmunes más robustas, duraderas y específicas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Las proteínas quiméricas derivadas de *Piscirickettsia salmonis*, formuladas en forma de nanoproteínas, inducen una respuesta inmune adaptativa en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) permitiendo su uso como inmunógenos en un prototipo de vacuna contra este patógeno.

3.2 Objetivo general

Evaluar la capacidad de nanoproteínas quiméricas como inmunógenos para potenciar la respuesta inmune del salmón del Atlántico.

3.3 Objetivos específicos

- Diseño, producción y caracterización de nanoproteínas quiméricas de *P. salmonis* en *Escherichia coli*.
- Evaluar *in vitro* la endocitosis y la capacidad inmunoestimuladora de las nanoproteínas quiméricas en macrófagos del Salmón del Atlántico.
- Demostrar que las nanoproteínas quiméricas como inmunógeno generan una respuesta inmune adaptativa en juveniles de salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales.

4.1.1 Material biológico.

4.1.1.1 Animales de experimentación.

El trabajo con animales realizado durante el desarrollo de esta tesis doctoral fue aprobado bajo la regulación del Comité de Bioética de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (código BIOEPUCV-BA-575-2022), el cual certificó que los protocolos experimentales que incluyen el uso de animales cumplen con los estándares bioéticos internacionales establecidos.

Con el objetivo de evaluar los prototipos de vacuna basados en nanoproteínas quiméricas de *P. salmonis*, los ensayos serán realizados bajo condiciones controladas en un centro de experimentación equipado con un sistema de recirculación abierta perteneciente a la empresa TeKbios, en Aingo Puerto Montt. Se trabajó con muestras de riñón anterior, bazo y suero de *Salmo salar* provenientes de la Compañía Pesquera Camanchaca S.A y ubicados en la región de los Lagos (Chile).

4.1.1.2 Bacterias

Para la producción y purificación de los 4 nanoproteínas recombinante se trabajó con *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) y *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) pLYss transformada con el vector *pET22b (ampR)* que contenía la secuencia nucleotídica multi-epitopes diseñadas desde proteínas con potencial antigénico de *P. salmonis*. Las cepas y los clones se mantuvieron almacenada a -80°C en el Laboratorio de Genética y Genómica Aplicada de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

4.1.2 Reactivos

4.1.2.1 Soluciones y tampones

- Phosphate-Buffered Saline (PBS 1x): 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl pH 7,2.
- Tampón de lisis: Tris 20 mM, NaCl 100 mM, Tritón X-100 0,05% y cocktail inhibidor de proteasas.
- Buffer de purificación: NaCl 1 M; EDTA 0,1 M; Tris 1 M.
- Tampón de carga 2x: 0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% v/v Glicerol, 0,2 M DTT, 0,02% azul de bromofenol pH 6,8.
- Tampón de corrida: 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,04% SDS.
- Tampón de transferencia: 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,04% SDS 20% Metanol.
- Solución de tinción de geles: 50% v/v Metanol, 0,05 p/v Azul de Coomassie R-250 (BioRad), 10% v/v Ácido acético y 40% v/v Agua destilada.
- Solución de destinción: 7% v/v Ácido acético, 5% v/v Metanol y 88% v/v Agua destilada.
- Solución de revelado ELISA: 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB). Thermo Fisher.
- Solución de buffer bicarbonato (500 mM Na⁺, 166 mM CO₃H⁻, 333 mM CL⁻):
- Atto 488: Tincion de NPs para determinar fagocitosis. Thermo Fisher.
- CFSE-cell Tracker. Carboxyfluorescein succinimidyl ester. Thermo Fisher.
- Dapi. Tinción nuclear. Thermo Fisher.
- Medio de montaje para fluorescencia. Vectashield.

5.6.2.1 Medios de cultivo.

- La línea celular RTS-11 (Rainbow Trout Spleen-11) se mantuvo en medio Leibovitz 15 (L15, Merck) suplementado con 30%, 10% y 2% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina), según requisito de experimentos.
- Para la producción de las NPs, las bacterias *E. coli* BL21 (DE3) se cultivaron en medio Luria Bertani (Thermo Fisher) suplementado con ampicilina a 50 µg mL.

5.6.2.1 Kits comerciales.

- Kit para cuantificación de proteínas totales por ácido bicinconínico (BCA), Pierce-Thermo Fisher.
- Kit de transcriptasa inversa RevertAid, M-MuLV Reverse Transcriptase, Thermo Fisher.
- Kit de PCR en tiempo real, PCR KAPA SYBR® FAST, Merck.
- Kit de revelado de inmunoblotting: Westar Supernova. Cyanagen.

4.1.2.4 Anticuerpos.

- Anticuerpo cabra anti-MHC-II de ratón conjugado con Alexa-flúor 488. Thermo Fisher.
- Anticuerpo cabra anti-raton IgG (H+L). Thermo Fisher
- Anticuerpo anti-His. Thermo Fisher.
- Anticuerpo anti-mouse conjugado con peróxidasa de rábano. Thermo Fisher.

4.1.2.5 Programas informáticos.

- RASTtk: Anotación de *P. salmonis*. <https://rast.nmpdr.org/>
- BLAST: alineamiento con secuencias antigénicas. SEED-Viewer xpresi 2.0. <https://rast.nmpdr.org/>
- VaxiJen v2.0: Propiedad antigénica de proteínas. (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>)
- ProtParam: características fisicoquímicas de las proteínas. Expasy. <https://web.expasy.org/protparam/>

- Protter: localización subcelular. Expasy. <http://wlab.ethz.ch/protter/start/>
- Phyre2: modelamiento tridimensional de proteínas por homología. Structural Bioinformatics Group. <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>
- Swiss PDB Viewer: visualizador de Modelamiento tridimensional de proteínas. Swiss Institute of Bioinformatics. <https://swissmodel>
- ITASSER . <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>
- RAPTORX. <http://raptorx.uchicago.edu/>
- QMEAN: grado de homología. Expasy. <https://swissmodel.expasy.org/qmean/>
- RANKPEP: predicciones de los epítomos de MHC de clase I. <http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html>
- BCPREDS: predicción de epítomos lineales de células B. <https://webs.iitd.edu.in/raghava/bcepred/index.html>
- ToxinPreD: predecir el nivel de toxicidad. <https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred2/index.html>
- PyMOL: localización de las secuencias peptídicas predichas dentro de las proteínas candidatas. <https://pymol.org/2/>
- QUARK: análisis y modelado de proteínas predichas. <https://zhanggroup.org/QUARK/>
- GRAVY: suma de valores de hidropatía de todos los aminoácidos dividida por la longitud de la secuencia. <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>
- OligoAnalyzer Tool: diseño y análisis de partidores. Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest?returnurl=%2FPrimerQuest%2F>
- PrimerQuest Tool: diseño y análisis de partidores. Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest?returnurl=%2FPrimerQuest%2F>
- MxPro: análisis de datos de PCR en tiempo real. Agilent.
- ProtScale: visualizador de propiedades físico-químicas de proteínas. ExPASy, Swiss Institute of Bioinformatics. <http://expasy.org/cgi-bin/protpram>
- BlastP: alineamiento de secuencias de aminoácidos. National Center for Biotechnology Information. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- ClustalO: alineamiento múltiple de secuencias. European Bioinformatics Institute. <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/>

- Gen synthesis: clonamiento en pET22b. GenScript. <https://www.genscript.com/customer/login?return=%2Fcustomer%2Forders%3Fsrc%3Demailship>
- ImageJ. Procesamiento de imágenes. National Institutes of Health.
- Leica LAF AF lite. Procesamiento de imágenes. Leica Microsystems.
- FlowJo vX 0.7. Análisis de datos de citometría de flujo. Becton, Dickinson and Company.
- software ImageJ X (Instituto Nacional de Salud)
- software R (R Core Team (2020)).

4.1.2.6 Instrumentos.

- Lector de placas VersaMax Microplate Reader. Molecular Device.
- NanoDrop 2000. NanoDrop.
- Termociclador tiempo real AriaMX. Agilent.
- Microscopio Binocular Zeiss, modelo Primo Star Pack 1.
- Cabina de flujo laminar. LabTech.
- Citómetro de flujo Gallios Flow Cytometer. Beckman Coulter.
- Sonicador Vibra-Cell VCX 500. Sonics.
- Sistema de electroforesis vertical. BioRad.
- Sistema de transferencia húmeda. BioRad.
- Incubadora celular LSI-3016R0 (Labtech)
- pHmetro EZDO PL600.
- Centrifuga Multipropósito. LABGZ1580R000. Labtech Gyrozen,
- ChemiDoc Imaging Systems. Bio-Rad
- FESEM Merlin (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

4.2 Métodos.

4.2.1 Diseño de secuencias aminoacídicas multi-epitopes

4.2.1.1 Proteínas con potencial antigénico

Selección de proteínas candidatas. Mediante el servidor RAST (Aziz et al., 2008) con el esquema de anotación RASTtk (Brettin et al., 2015), se anotó el conjunto de genes del genoma de *P. salmonis* que codifican para proteínas con una posible actividad antigénica. Desde el enfoque de proteómica sustractiva y de acuerdo con antecedentes bibliográficos, se seleccionaron proteínas de *P. salmonis* que declararon un potencial antigénico predicho para el desarrollo de vacunas. Para este propósito, en primera instancia se utilizó la herramienta BLAST de la plataforma SEED Viewer xpresi 2.0 (Overbeek et al., 2014) en el servidor RAST (Aziz et al., 2008), que permitió realizar una búsqueda de secuencias correspondientes a dichas proteínas para ejecutar un alineamiento con los genogrupos de *P. salmonis*: cepa LF-89 ATCC VR 1361 y de la cepa EM-90. Una vez realizado el BLAST se seleccionaron, de los genomas evaluados, solo aquellas secuencias con un e-value igual a 0.0 o lo más cercano posible a dicho valor, que además tuviera una amplia cobertura, de más del 90%, y cuya función predicha fuera similar a la de las secuencias empleadas como referencia.

Caracterización de proteínas candidatas. La propiedad antigénica de todas las proteínas seleccionadas se determinó utilizando el servidor web VaxiJen v2.0 (Doytchinova & Flower, 2007). Se consideró un umbral $\geq 0,5$ para clasificar a las proteínas con potencial antigénico. Para conocer características de las proteínas seleccionadas se empleó la herramienta ProtParam (Gasteiger et al., 2003) de la plataforma ExPasy, para conocer las características fisicoquímicas de las proteínas como punto isoeléctrico, peso molecular, índice teórico y la herramienta Protter (Omasits et al., 2014) para predecir la localización subcelular, está se refiere a la predicción del compartimento celular en el que es probable que se ubiquen las proteínas seleccionadas. En este estudio, las proteínas de la membrana externa, sistemas de secreción, kinasas, chaperonas, flagelinas, glicoproteínas lisosomales, citoesqueletos, transferasas y ribosomales se seleccionaron específicamente para el mapeo de epítomos. El mapeo de epítomos implica la identificación y mapeo de epítomos antigénicos dentro de una secuencia de proteínas, que son regiones que pueden provocar una respuesta inmune específica.

Mapeo de epítomos. Las proteínas predichas con potencial antigénico fueron modeladas en su estructura 3D por homología empleando las plataformas Phyre2 (Kelley et al., 2015); SwissModel (Waterhouse et al., 2018) ; ITASSER (Yang & Zhang, 2015) y RaptorX (Källberg et al., 2012). Estos servidores permiten generar modelos con distintos grados de similitud, por lo que se realiza una comparación de los 4 modelos predichos por los servidores para

elegir el modelo con mayor grado de homología. El grado de homología se determinó con la herramienta QMEAN (Benkert et al., 2009) de la plataforma SwissModel, que permite evaluar la calidad de los modelos proteicos considerando la puntuación Z o Z-Score, valor que indica la calidad general del modelo y mide la desviación de la energía total de la estructura con respecto a una distribución de energía derivada de conformaciones aleatorias (Wiederstein & Sippl, 2007), lo que nos da una idea del potencial que tiene el modelo evaluado de ser semejante a la proteína original.

4.2.1.2 Predicción de multi-epitopes con potencial antigénico

Predicción del epítipo del MHC de clase I de células T. La identificación de epítipos antigénicos es esencial para comprender los mecanismos de la respuesta inmune y facilitar el diseño racional de vacunas. En particular, la activación de células T CD8+ mediante epítipos presentados por moléculas MHC-I permite inducir respuestas inmunitarias adaptativas robustas, promoviendo la eliminación rápida y eficaz de patógenos intracelulares como *Piscirickettsia salmonis* (Rozas- Serri et al. 2024). Para la identificación de epítipos se utilizaron como base las secuencias aminoacídicas de las proteínas candidatas. Las predicciones de los epítipos de MHC de clase I fueron realizadas por el servidor RANKPEP (Reche et al., 2002), que utiliza matrices de puntuación específicas de posición (PSSM) o perfiles de un conjunto de péptidos alineados que se sabe que se unen a una molécula de MHC determinada como predictor de la unión del péptido MHC. Los ligandos MHC-I son de longitud corta (8-11), ya que están restringidos en el surco de unión del péptido MHC-I, con sus extremos N- y C-terminales conectados por una red de enlaces de hidrógeno a residuos conservados de la molécula MHC-I. Por tanto, los péptidos unidos al mismo MHC-I pueden diferir en uno o dos aminoácidos. Del servidor Rankpep se seleccionaron aquellos posibles epítipos que presentaban un puntaje óptimo >20%.

Predicción del epítipo de células B. La predicción de epítipos lineales de células B para proteínas se logró utilizando el servidor en línea BCPREDS (Saha & Raghava, 2004). El objetivo de la predicción del epítipo de células B se base en propiedades fisicoquímicas de un conjunto de datos no redundantes. El conjunto de datos consta de 1029 epítipos de células B obtenidos de la base de datos Bcipep y el mismo número de no epítipos obtenidos aleatoriamente de la base de datos Swiss-Prot. La precisión de predicción para modelos

basados en la combinación de cuatro propiedades de aminoácidos (hidrofilicidad, flexibilidad, polaridad y superficie expuesta) alcanza un 58,70 %.

Predicción de multi-epítomos. Una vez que se tuvo la lista de posibles epítomos de ambas plataformas (Rankpep y BCPREDS) se procedió a realizar un análisis visual comparativo para identificar secuencias aminoacídicas coincidentes en ambas listas, es decir, que hubiesen sido mostrados como posibles epítomos por ambas plataformas. Posteriormente, mediante el servidor VaxiJen 2.0(Doytchinova & Flower, 2007), se determinó el nivel antigénico predicho de las secuencias concordantes seleccionadas con anterioridad.

Predicción de inmunogenicidad de clase I. El complejo epítomo / MHC debe tener la capacidad de ser reconocidos por las células T y evocar una respuesta inmunológica. Por lo tanto, hemos utilizado la herramienta de predicción de inmunogenicidad MHC I utilizando el servidor IEDB (Calis et al., 2013). IEDB predice parámetros predeterminados como: 1) las posiciones P4-6 de un péptido presentado, las que son más importantes para la inmunogenicidad que otros aminoácidos. 2) Predicción de cadenas laterales grandes y aromáticas de aminoácidos que se encuentran asociados con la inmunogenicidad. Por lo que de acuerdo con estos parámetros se seleccionaron los epítomos que, según la predicción de inmunogenicidad, entregó valores positivos.

ToxinPred. Herramienta de servidor en línea que analiza las propiedades fisicoquímicas de los epítomos para predecir el nivel de toxicidad(Gupta et al., 2013). Confirma que las respuestas inmunitarias específicas que se inducen en las células del huésped se dirigirán solo a las bacterias en lugar de al tejido del huésped. Los parámetros se establecieron por defecto.

4.2.1.3 Construcción de la vacuna multi-epitope

Para construir la nueva vacuna multi-epitope con un alto grado de inmunogenicidad y baja toxicidad, se manejaron diferentes combinaciones de construcciones de secuencias. Durante la construcción de esta quimera, se visualizó utilizando el servidor PyMOL (Schrodinger, 2015), la localización de las secuencias peptídicas predichas dentro de las proteínas multiepitope creada, ya que debían cumplir con la cualidad de encontrarse presente en la superficie de las proteínas quiméricas, lo que les da una mayor probabilidad de ser

secuencias antigénicas detectadas. Siendo este filtro el último para la selección definitiva de los epítomos. Se consideró además la estructura proteica a la que pertenecía el epítomo, es decir, si se encontraba en una alfa hélice, una beta plegada o un loop. Las secuencias químicas se unieron con la ayuda del conector aminoacídico o enlazador GGS que otorga una amplia flexibilidad a la estructura proteica, permitiendo mejor exposición de epítomos (Solanki & Tiwari, 2018).

Modelamiento y caracterización de epítomos. Una vez creada la secuencia de la proteína química, esta se ingresó en el servidor QUARK de Zhang Lab en la Universidad de Michigan, para su análisis y modelado (Xu & Zhang, 2012). La misma secuencia se ingresó en la plataforma ToxinPred (Gupta et al., 2013), empleando los parámetros por defecto, con el fin de predecir la toxicidad del péptido químico creado. Adicionalmente, se verificó el nivel de antigenicidad de la secuencia aminoacídica mediante el servidor VaxiJen v2.0 (Doytchinova & Flower, 2007), comprobando de esta manera el potencial antigénico posible de las proteínas multiepítomos. El programa SOLpro (Magnan et al., 2009), predice la propensión de la estructura primaria de la secuencia química a ser soluble/insoluble tras la sobreexpresión en *E. coli*. Para este propósito SOLpro emplea una arquitectura de máquina de vector de soporte (SVM) de dos etapas basada en múltiples representaciones de la secuencia del aminoácido primario.

Predicción de diversas propiedades fisicoquímicas. Las secuencias de las quimeras se caracterizaron funcionalmente utilizando el servidor Expasy ProtParam (<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>) (Gasteiger et al., 2003). Este servidor se utiliza ampliamente para determinar las características fisicoquímicas como el número de aminoácidos, el peso molecular, los valores de PI teórico, vida media estimada, índice alifático y valores de GRAVY de hidropaticidad que se utilizara para representar el valor de hidrofobicidad de un péptido, que calcula la suma de valores de hidropatía de todos los aminoácidos dividida por la longitud de la secuencia; GRAVY se calculó utilizando los valores de hidropatía de Kyte y Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982). Valores positivos de GRAVY (>0,2), que indican el nivel de hidrofobicidad de la proteína son de interés.

4.2.2 Producción de secuencias antigénicas

4.2.2.1 Producción de las NPs en sistemas heterólogos

Todos los constructos diseñados se enlazaron en el extremo C-terminal a una cola de 6 histidina (H6)-tag para la posterior purificación de proteínas. Los codones de las secuencias fueron optimizados para sobreexpresarlas en *Escherichia coli* por GenScript (Hong Kong, China) clonadas en pET22b (ampR). La producción consistió en que las bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas por shock térmico con pET22b (ampR) que presenta las secuencias nucleotídicas quimérica de los 4 constructos a sobreexpresar. Una vez transformado, *E. coli* BL21 se cultivó en 125 mL con medio Luria Bertani (LB) suplementado con ampicilina 50 µg/mL (Winkler Ltda., Santiago, Chile), aeróbicamente a 37 °C con agitación constante (250 rpm) en el incubador Labtech LSI-3016R0 (Labtech, Namyangju, Korea), Al alcanzar OD_{600nm} entre 0,5 y 0,9 se indujo con 1 mM IPTG (Merck, Darmstadt, Germany), durante 3 horas.

4.2.2.2 Purificación de las NPs

El cultivo fue centrifugado a 6.000 xg a 4°C por 15 min, el sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendido en el 10% del volumen final de buffer de lisis (50 mM TrisHCL (pH 8.1), 100 mM NaCl and 1mM EDTA) para guardarlo a -80°C o/n. Al descongelar las células a temperatura ambiente, se añadió 0,1 mg/mL de lisozima (Winkler Ltda, Santiago, Chile), y 0.5 mM de phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania) por 2 horas a 37°C con 250 rpm. Luego, la mezcla fue puesta en hielo y sonicada 3 min (10 sec on, 10 sec off at 30% amplitude; Ultrasonic processor GE505) para luego agregar Triton X-100 (0.2% (v/v); Winkler Ltda, Santiago, Chile, en agitación vigorosa a temperatura ambiente por 1 hora y dejar a -80°C o/n. Para continuar, en DNA fue removido con Dnasa 1 µg/mL (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania) y MgSO₄ 1 µg/mL (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania) at 37°C for 1 h at 250 rpm. Luego, las nanoproteinas fueron colectadas por centrifugación (15,000 xg, 15 min, 4°C) y el sobrenadante fue utilizado como control de fracción soluble. Después, las nanoproteinas se resuspendieron en buffer de lisis y Triton X-100 (0.2% (v/v) (Winkler Ltda, Santiago, Chile), seguido por el control de esterilidad sin antibióticos: se cultivaron 100 µL de suspensión en placas de agar LB a 37°C durante 3 días, si se observaba crecimiento bacteriano, se efectuaba varios ciclos de congelación/descongelación hasta que no se detectaron bacterias viables. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 4°C por 15 min a 15,000 xg, y los pellets fueron guardados a -80°C hasta su análisis.

4.2.2.3 Detección y cuantificación

La pureza y cuantificación fue evaluado por Western Blot y ensayo de Coomassie de la misma manera que López-Cano (López-Cano et al., 2022). Brevemente, las muestras de nanoproteínas solubles e insolubles fueron resuspendidas en Laemmli loading buffer (100 mM Tris, 8% glycerol, 55 mM SDS, 4% β -mercaptoethanol, and 1.6% urea) y calentadas a 95°C por 10 y 45 min, desnaturalizando completamente las proteínas. Para continuar con el análisis por electroforesis (SDS-PAGE). Las bandas de proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF y se bloquearon con albumina de suero bovino (BSA) al 5% en buffer TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20) por 1 hora. Luego, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-His (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a una dilución de 1:2000 a 4°C o/n, seguido de 3 lavados con el buffer TBST. Finalmente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón IgG (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a una dilución de 1:5000 por 1 hora a RT y lavado 3 veces. Las bandas de las proteínas fueron reveladas en el ChemiDoc Imaging Systems Bio-Rad system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y cuantificadas con ImageJ software.

4.2.3 Endocitosis de las NPs

4.2.3.1 Citometría de flujo

Se realizó un análisis cuantitativo por citometría de flujo para determinar el porcentaje de eficiencia de la capacidad fagocítica por parte de las células RTS-11. Se utilizó una concentración de 20 μ g/mL de NPs durante un periodo de incubación de 3-4 horas a 16°C en un medio mínimo con 2% FBS. Tras el tratamiento, las células fueron sometidas a un proceso de tripsinización con tripsina a 1 mg/mL (Gibco) para eliminar cualquier NPs adherida a la superficie celular. Posteriormente, las células fueron centrifugadas, resuspendidas en PBS, y se analizaron mediante un citómetro de flujo Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter), procesando un total de 10,000 eventos por muestra. Se utilizaron 3 replicas técnicas para cada nanoproteína.

4.2.4 Evaluación de dosis respuesta mediante ensayo *in vitro*

4.2.4.1 Inducción de células RTS-11 con NPs

Para determinar la dosis en que las NPs logran levantar una respuesta en células presentadoras de antígenos, se realizó el siguiente ensayo *in vitro*:

La línea de monocitos/macrófagos RTS11 de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se cultivó a 18 °C en medio L-15 de Leibovitz (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) suplementado con suero bovino fetal al 15 % (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^6 células por pocillo. Los cultivos celulares fueron estimulados durante 12 horas con distintas dosis de las nanoproteínas quiméricas para evaluar la dosis respuesta mediante la expresión de genes involucrados en la presentación de antígenos a través de qPCR. Para este propósito, los cultivos celulares de RST-11 fueron estimulados con las nanoproteínas SkipZ, PulseJ, HopQ a 5, 10 y 20 µg/mL. Como control positivo se incluyó 10 µg/mL LPS (lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4; Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA), como control de las nanoproteínas iRFP (10 µg/mL) y como control negativo fue sin estimulación. Debido a la nula cuantificación de la nanoproteína Hoptech, se descartó de futuros análisis. Cada tratamiento se realizó por triplicado en tres replicas biológicas.

4.2.4.2 Extracción de RNA

El total de RNA de cada placa inducida con las respectivas dosis, fue extraído con TRIzol® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones de manufacturación, y cuantificado utilizando NanoDrop™ device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El protocolo consistió en remover el medio de cultivo y centrifugar las muestras por 5 minutos a 500 x g a 4°C. Luego de remover el sobrenadante, se agregó 500 µL de trizol a la placa y se incorporó al tubo centrifugado. Este, fue vortexeado y se le agregó 125 µL de cloroformo. Posterior a agitar por 10 segundos, se dejó reposar cada tubo por 15 minutos. Pasado este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 13.000 x g por 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa a nuevo tubo. Luego se agregó 250 µL de isopropanol y 0,5 µL glucógeno (Thermo Fisher) para congelar a -80°C durante 1 hora. Pasado el tiempo se descongela a temperatura ambiente y se centrifuga a 13.000 x g por 10 minutos a 4°C. El

pellet con RNA se agrega 500 μL de etanol al 75% y centrifuga a 13.000 x g por 10 minutos a 4°C. Para finalizar se solubilizó en ARN en 30 μL agua DEPC. Todas las muestras fueron purificadas mediante el método de acetato de sodio. El ARN total se cuantificó espectrofotométricamente con NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific). La integridad del ARN también se verificó mediante gel de agarosa al 1%. Solo se consideraron aquellas muestras con una relación 260:280 mayor a 1.8 y con integridad sin signos aparentes de degradación. Las muestras de ARN total (1 μg) fueron tratadas con Dnasa I 1 unidad/ μL (Thermo Scientific).

4.2.4.3 Síntesis de cadena complementaria de ADN (ADNc)

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se ocupó 1 μg RNA por muestra, 50 ng de oligo-dt, 1 mM dNTP, 1 U Rnasin y 200 U M-MLV retro-transcriptasa en el tampón de transcriptasa inversa. Esta mezcla fue agitada y posteriormente incubada 60 minutos a 42°C.

4.2.4.4 Análisis por qPCR

La expresión de genes del sistema inmune fue analizada mediante qPCR usando un termociclador AriaMX (Agilent, Santa Clara, CA, USA). 5 μL de SYBR Green (KAPA SYBR® FAST, Merck, Darmstadt, Alemania), 0,2 μM de cada partidor por marcador (Tabla 1), 10 ng de ADNc diluido en agua ultrapura estéril (1:5) para cada muestra. Las condiciones de ciclo térmico fueron las siguientes: activación inicial a 95°C durante 3 min; luego la amplificación de cDNA durante 40 ciclos de [30 s de denaturalización a 95°C, 30 s de hibridación a 60°C, y 30 s de elongación a 72°C], y cada muestra se realizó por duplicado. Los resultados de PCR cuantitativa, determinados en expresión relativa se calcularon utilizando el Método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ de Livak (Livak y Schmittgen, 2001). Se utilizaron los valores del ciclo de cuantificación (Cq) del gen del Factor de Elongación 1-alfa (*elf- α*) para normalizar los valores Cq medidos de los genes blanco. La hipótesis nula afirma que $\Delta\Delta\text{ct}$ es igual a 0.

4.2.4.5 Inmunofluorescencia con anticuerpos

Para comprobar como la estimulación con las NPs logra activar las APC a nivel proteico, se realizó la siguiente inmunofluorescencia: Las células RST-11 fueron estimuladas con las mismas nanoproteínas durante 12 horas, a distintas concentraciones que demostraron una respuesta en el análisis de expresión relativa: SkipZ a 5 µg/mL, 10 µg/mL para PulseJ y HopQ a 20 µg/mL. Luego, las células adherentes fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1X por 10 min a RT, y permeabilizadas y bloqueadas con 3% BSA con 0.3% Tritón en 1X TBS durante 30 min a RT; en seguida, para evitar la autofluorescencia se utilizó la solución quenching (50 mM ammonium chloride) por 10 min. A continuación, las células fueron incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos monoclonales CD80/86, CD83 y MHC-II (1:200) sintetizados contra péptidos antigénicos del Salmon del atlántico en ratones CF-1, según Morales-Lange et al 2021⁵³ (Tabla 2). Las muestras fueron lavadas con TBS 1X con 0,02% Tween-20 e incubados con el anticuerpo secundaria comercial Alexa fluortm 488 goat anti-mouse IgG, (Invitrogen, Thermo Scientific) diluido 1:700 por 90 min en oscuridad a RT. La tinción nuclear fue realizada con DAPI (Vector Laboratories) para microscopia de fluorescencia convencional, siguiendo las instrucciones de fabricante. La captura de las imágenes se realizó en un microscopio de fluorescencia Leica CTR5000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Tabla 1. Lista de péptidos antigénicos (por marcador).

Molécula	Secuencia peptídica	N° de referencia	Referencia
CD80/86	TCSSDNGYPRRDVEW	P780	GB: CAQ51440.1
CD83	CAVDSGRYKCLLAAPV	P2103	GB: ABC68619.1
	C		
MHC-II	PPHSSIYPRDDVDLG--- TLICHVGFHPAPVR	p1427/1428	GB: CAD27720.1

GB: Base de datos GenBank, National Center for Biotechnology Information. Obtenidos desde Morales-Lange 2021

4.2.5 Evaluación de vacunación en *Salmo salar*

4.2.5.1 Declaración ética

El trabajo con animales del proyecto de tesis se realizó bajo la orientación del Consejo Canadiense para el Cuidado de Animales en cuanto al cuidado y uso de animales experimentales. Los animales fueron alimentados diariamente *ad libitum* con una dieta comercial (Orbit Intro_P_4). Para reducir el estrés durante el manejo, la vacunación se realizó en peces sedados con BZ-20 (20% Benzocaína, 15 mL/100L de agua, Veterquímica). Para el muestreo, los peces fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico.

4.2.5.2 Población de peces desafiados

El ensayo de vacunación se realizó con 100 peces provenientes de una población domesticada de salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Los peces tuvieron un peso medio de $164,6 \pm 6,5$ gramos y una longitud media de 24,3 cm. El ensayo se realizó en el mes de septiembre de 2023 en el centro de experimentación TeKBios de la empresa ADL, Puerto Montt. Los peces se cultivaron a una densidad de $11,84 \text{ kg/m}^3$ y con los siguientes parámetros ambientales: temperatura de $10,9^\circ \text{C} \pm 0,2$, oxígeno $9,5 \pm 1,1 \text{ mg/L}$ y salinidad de $32 \pm 0 \text{ ppt}$.

4.2.5.3 Vacunación de dos NPs en juveniles *Salmo salar*

Mediante inyección intraperitoneal (IP) se monitoreo la acción de dos NPs como posibles activadores del sistema inmune. Se utilizarán un total de 190 peces distribuidos en 6 estanques (n=30 peces por estanque de 540 Litros), separados por réplicas por tratamiento. Los tratamientos efectuados fueron los siguiente: 10 peces que no fueron inyectados y fueron utilizados como control sin estimulo; 60 peces fueron inyectados con PBS 1X como control positivo de vacunación; 60 peces inyectados con la Skip a 0,5 mg/kg de pez y 60 salmónidos inyectados intraperitonealmente con HopQ a 2 mg/kg de pez, los que se dividieron en 2 estanques por tratamiento. Una vez superada la etapa de aclimatización de 14 días, al grupo control (antes de la vacunación) se les extrajo el riñón anterior y suero para futuros análisis de expresión de genes y medición cuantitativa de inmunoglobulinas por ELISA. Luego, todos los peces restantes, fueron vacunados con sus respectivos tratamientos. Al transcurrir, 1, 7 y 14 días post vacunación (dpv), los salmones fueron sistemáticamente muestreados para futuros análisis; y al igual que tiempo 0, fueron tomadas muestras de riñón anterior y suero de cada animal (Figura 7).

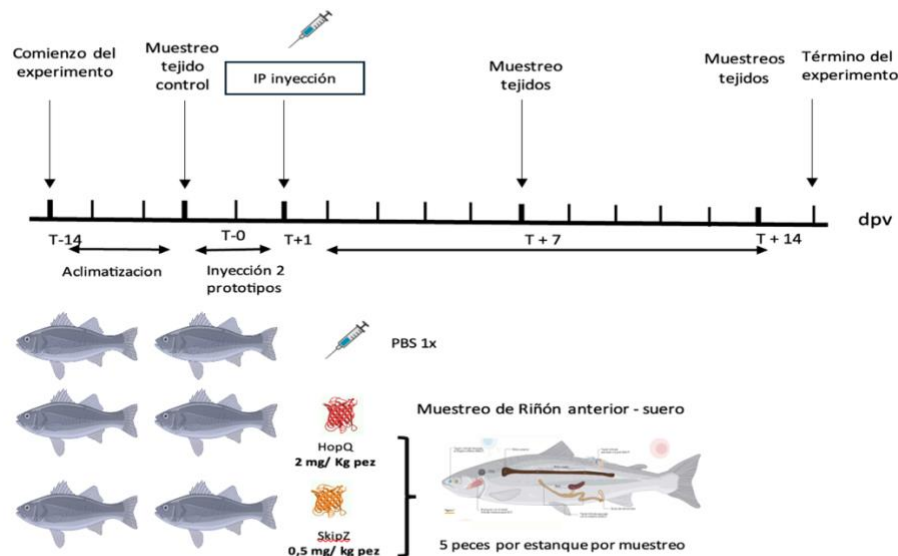


Figura 4. Representación esquemática del ensayo de vacunación *in vivo*.

4.2.5.4 Análisis de expresión génica por qPCR

Con el protocolo mencionado anteriormente (objetivo 2, análisis por qPCR) se evaluó la capacidad inmunoestimuladora de las nanoproteínas producidos, a través de la evaluación de genes implicadas en la respuesta inmune contra antígenos (Tabla 3). Esto se realizó en muestras de riñón anterior a los 0,1, 7 y 14 días post-vacunación.

Tabla 2. Lista de partidores utilizados para la expresión de genes.

Gen	Numero acceso	Partidor	Secuencia
elf1-α	NM_001141909.1	Forward	CAAAGCCCTGAAGTCTGGAG
		Reverse	GACTTGGTCACCTTGCCAGT
il-1β	NM_001123582.1	Forward	GTCACATTGCCAACCTCATCATCG
		Reverse	GTTGAGCAGGTCCTTGTCTTGA
tnf-α	DQ787157.1	Forward	GCAGCCATCCATTTAGAGGGTGAA
		Reverse	CTAAACGAAGCCTGGCTGTAAACG
il-8	NM_001140710.3	Forward	GCCCTCCTGACCATTACTGA
		Reverse	AAATCTCCTGACCGCTGTTG
cd80/cd86	CAQ51440.1	Forward	GATGTTGAGTGGAGCCTGAA
		Reverse	GACGACAGAGAACAGCATAGAG
mhc-ii	GB: CAD27720.1	Forward	AATCAGAGTGACCTGGTTGAG
		Reverse	GTGGGAGAGGAGCTGGTAGTA
cd4	NM_001123611.1	Forward	TGCATTGTTCATCTCTTCAACAGC
		Reverse	CCGTCCCAAGGTACCATAGTACCAA
igm	Y12457.1	Forward	TGAGGAGAAGTGTGGGCTACACT
		Reverse	TGTTAATGACCACTGAATGTGCAT
ifn-γ	NM_001123558.1	Forward	GTGAGCGGAGGGTGTGGATG
		Reverse	CAGGAAGTAGTGTCTTCTGGGTC
tbet	GU979861.1	Forward	GAAGTGAAGGAGGATGGTTCTG
		Reverse	GTGATGTCTGCGTTCTGATAGG
		Forward	TTGGCCTCCGTGAAAAATGC

il4/13	NM_001204895.1	Reverse	AAGTCTCCTCAGCTCCACCT
		Forward	CGACGATGTGGATGTACTGTTTA
gata3	EU418015.1	Reverse	TACTATGTGGAGGAGGTGGATAC
		Forward	TTGATAAGGGGGACAGTTTGGT
il-1240c	XM_045708946.1	Reverse	TTGTCTAAATCCTCAGCCTCGT
		Forward	CCAGCATAAGTGGTTCCAAGACCT
inos	XM_035787944.2	Reverse	CCAATCTCAGTGCCCATGTACCAG
		Forward	CAACGCCACAGGCAGTCA
mhc-i	XM_045709560.1	Reverse	CGGTAATCATTCTGAGCTGTGTTAC
		Forward	CTGCTACAGCTGTGCATCAATCAA
cd8	NM_001123583.1	Reverse	GCTGTGGTCATTGGTGTAGTC
		Forward	TATTGGTTCCATGGCTCTCC
eomes	NM_001204100.1	Reverse	ATCATCTCCGTCTGGAATCG
		Forward	AGACTGAGAGTGAGAGGTTGA
foxp3	HQ270469.1	Reverse	TAGAGCCGAGGTGAGAAAGA
		Forward	ATGAGGCTAATGACGAGCTGGAGA
il-10	XM_045705802.1	Reverse	GGTGTAGAATGCCTTCGTCCAACA
		Forward	GAAGTCAGTTTGTGGAGAGG
cd83	AY263794.1	Reverse	GGTGGTGCTATTAGGTGATG

GB: Base de datos GenBank, National Center for Biotechnology Information. RefSeq: NCBI Reference Sequence Database, National Center for Biotechnology Information.

4.2.5.5 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se analizaron muestras de suero de 0, 1, 7 y 14 días post-vacunación (dpv) mediante ELISA para determinar Inmunoglobulinas totales (Figueroa et al., 2020). Primero, en cada muestra de suero, se cuantificaron las proteínas totales utilizando el Kit de Ensayo de Proteínas BCA (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, para la IgM total, las muestras de suero se diluyeron (50 ng/μL, 1000 μL) en buffer de bicarbonato (bicarbonato de sodio, 0,1 M, pH 9.6) y se sembraron por duplicado en placas Nunc Maxisorp (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, se incubaron durante la noche a 4 °C,

las placas se lavaron 4 veces con TBS-T (TBS con Tween-20 al 0.1%) y se incubaron con solución de bloqueo (200 μ L por pocillo de leche al 5%.) durante 1 hora a 37 °C. Las placas se volvieron a lavar 4 veces con TBS-T y se incubaron (100 μ L por pocillo) con un anticuerpo primario (policlonal contra inmunoglobulinas) en dilución 1: 20.000 durante 90 minutos a 37 °C. El anticuerpo primario se lavó con TBS-T (5 veces), y las placas se incubaron (100 μ L por pocillo, 60 minutos a 37 °C) con el anticuerpo secundario (cabra anti-conejo IgG, conjugado con HRP) de Thermo Fisher Scientific (#31430) en dilución 1: 5.000. Finalmente, el anticuerpo secundario se lavó con TBS-T, y las placas se incubaron con tetrametilbenzidina (TMB) en solución única (Thermo Fisher Scientific) durante 5 minutos (en la oscuridad) a temperatura ambiente (100 μ L por pocillo). Todas las reacciones se detuvieron con 50 μ L de ácido sulfúrico (1 N), y las placas se leyeron a 450 nm en un lector de placas VersaMax Microplate Reader. Molecular Device.

4.2.6 Análisis estadísticos

Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para analizar el tamaño de las nanoproteínas entre los diferentes tratamientos.

Los resultados de la expresión de genes por qPCR se presentaron como medias \pm error estándar de la media (SEM) a partir de triplicados obtenidos de tres experimentos independientes ($n = 3$). Todos los datos se evaluaron previamente para verificar el cumplimiento de los supuestos de las pruebas paramétricas, incluyendo normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia. En caso de no cumplirse dichos supuestos, se aplicaron pruebas no paramétricas. Los datos de expresión génica fueron normalizados utilizando el gen de referencia *elf-1*, y posteriormente se calcularon los cambios en la expresión génica entre el control y los diferentes tratamientos, transformados al \log_2 Fold Change. El análisis estadístico de las diferencias en los niveles de expresión se realizó mediante la prueba de Wilcoxon, con niveles de significancia establecidos en $p < 0.05$ (*) y $p < 0.001$ (**). Todos los análisis estadísticos y gráficos fueron generados utilizando el software R core Team, 2021.

El análisis de componentes principales (PCA) se utilizó como herramienta estadística para reducir la dimensionalidad de los datos de expresión de genes desarrollada durante en

bioensayo con peces. El PCA se llevó a cabo para evaluar las relaciones entre las muestras de expresión génica y determinar las principales fuentes de variación en el conjunto de datos. Los datos fueron normalizados previamente para garantizar una contribución equitativa de cada variable. El PCA permitió reducir la dimensionalidad del conjunto de datos y generar un gráfico de dispersión bidimensional en el que las muestras se agruparon según su similitud estadística. Este análisis se realizó utilizando el software R core Team, 2021, y los componentes principales fueron seleccionados con base en el criterio de autovalores mayores a 1 (criterio de Kaiser). Las variables con mayores cargas en cada componente fueron interpretadas como los factores principales que explican la variabilidad observada en el sistema.

Para evaluar si existían diferencias significativas en la producción de inmunoglobulinas totales (Ig) en peces vacunados con la vacuna HopQ y SkipZ a los días 0, 1, 7 y 14 post-vacunación, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Este método estadístico permitió comparar las medias de los niveles de densidad óptica (OD a 450 nm) entre los distintos tiempos evaluados.

5 Resultados

5.1 Primera generación de nanoproteínas quiméricas

Se generaron cuatro secuencias aminoacídicas quiméricas con potencial antigénico, denominadas Hoptech, SkipZ, PulseJ y HopQ, dirigidas a los genogrupos más prevalentes de *Piscirickettsia salmonis* en Chile (LF-89 y EM-90). Estas secuencias fueron obtenidas mediante un enfoque de vacunología inversa, logrando integrar epítomos seleccionados de proteínas relevantes del patógeno.

Las proteínas parentales fueron previamente identificadas como antigénicas a través de herramientas bioinformáticas como VaxiJen, ProtParam y Proter, y sus modelos tridimensionales fueron generados y seleccionados en función de su calidad estructural (QMEAN) mediante plataformas como Phyre, RaptorX, I-Tasser y SwissModel. Posteriormente, se predijeron epítomos inmunogénicos de clase I y linfocitos B utilizando los software Rankpep y BcePred, considerando características fisicoquímicas como la flexibilidad, polaridad e hidrofobicidad. Asimismo, se descartaron secuencias potencialmente tóxicas o con baja antigenicidad. Finalmente, los dominios antigénicos seleccionados fueron integrados en constructos quiméricos mediante modelamiento estructural y simulación 3D con PyMol, generando secuencias con potencial funcional y estructural para su evaluación como vacunas. Los cuatro constructos presentan dominios recombinantes de interés inmunológico.

Cada secuencia aminoacídica fue conformada desde el extremo N al C-terminal de una combinación de secuencias peptídicas con potencial antigénico provenientes de: membrana externa, sistema de secreción, quinasas, chaperonas, flagelares, glicoproteína lisosomal, citoesquelética, transferasas y ribosomales de las cepas LF-89 y EM-90 (Figura 6). El diseño de Hoptech consistió en 182 residuos aminoácidos, incluyendo la etiqueta H6 en el extremo C terminal para su posterior purificación, de igual manera que todas las secuencias creadas. Lo que da como resultado una proteína madura de 18,47 KDa. Hoptech presento un potencial antigénico de 2, según el servidor VaxiJen v2.0 (Doytchinova & Flower, 2007); con un promedio de hidropaticidad de $-0,667$ (GRAVY)(Chang & Yang, 2013). El gran promedio de índice de hidropaticidad (GRAVY) es un parámetro que proporciona información sobre la hidrofobicidad o hidrofiliidad general de un péptido. Un valor GRAVY positivo normalmente

indica una mayor hidrofobicidad de la proteína, lo que sugiere que la proteína tiende a repeler el agua y es más probable que forme agregados insolubles en medio acuoso. La misma estrategia fue utilizada con SkipZ que presenta 194 residuos, lo que da una proteína madura de 19,53 KDa; con un potencial antigénico 2 según Vaxijen y GRAVY de $-0,374$. El constructo PulseJ presenta 176 residuos aminoacídicos, lo que otorga una proteína madura de 18,12 KDa, con un potencial antigénico según Vaxijen de 2 y un índice GRAVY de $-0,374$. Por último, HopQ presenta 178 residuos, dando una proteína madura de 17,5 KDa, con un potencial antigénico de 2,2 y un índice de GRAVY de $0,05$.

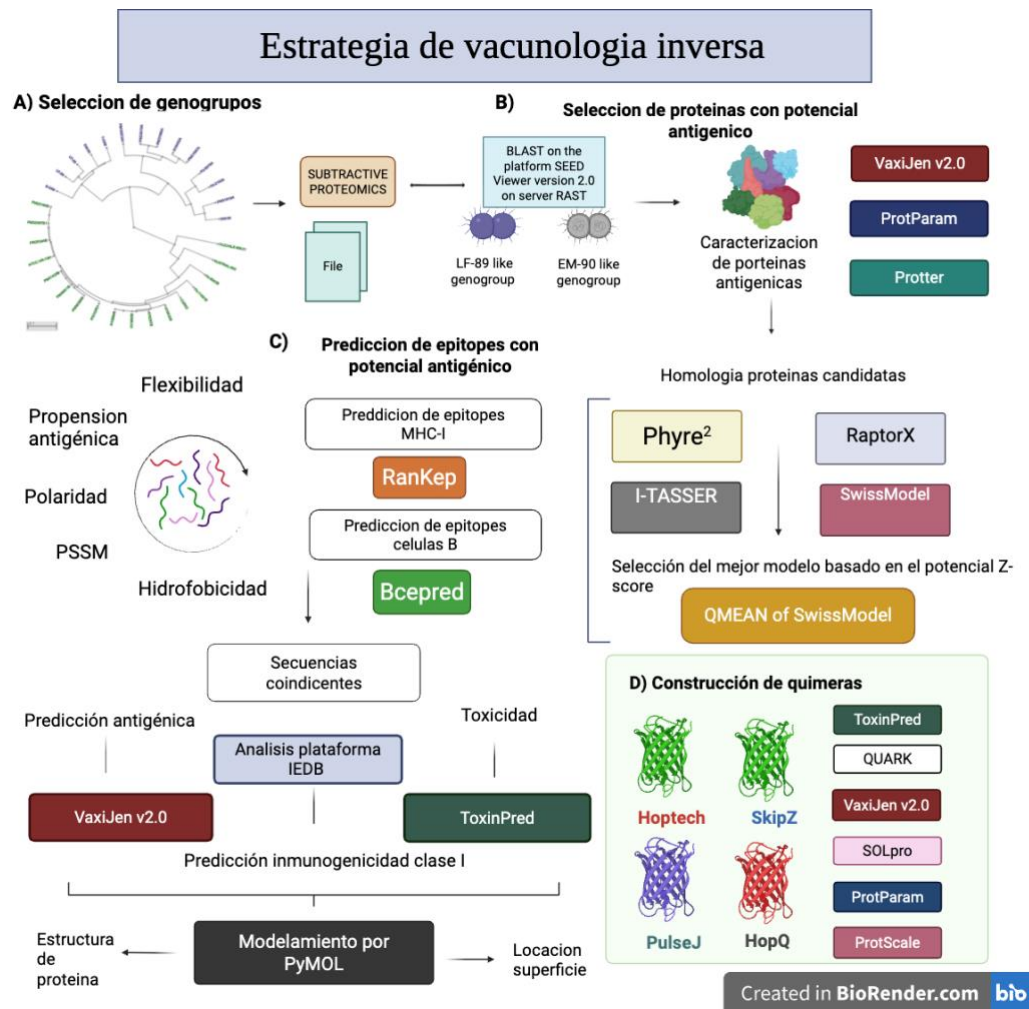


Figura 5. Representación esquemática del diagrama de construcción de los prototipos de vacunas. A) Selección de genogrupos. B) Selección de proteínas con potencial antigénico. C) Predicción de péptidos con potencial antigénico. D) Construcción de proteínas con características quiméricas.

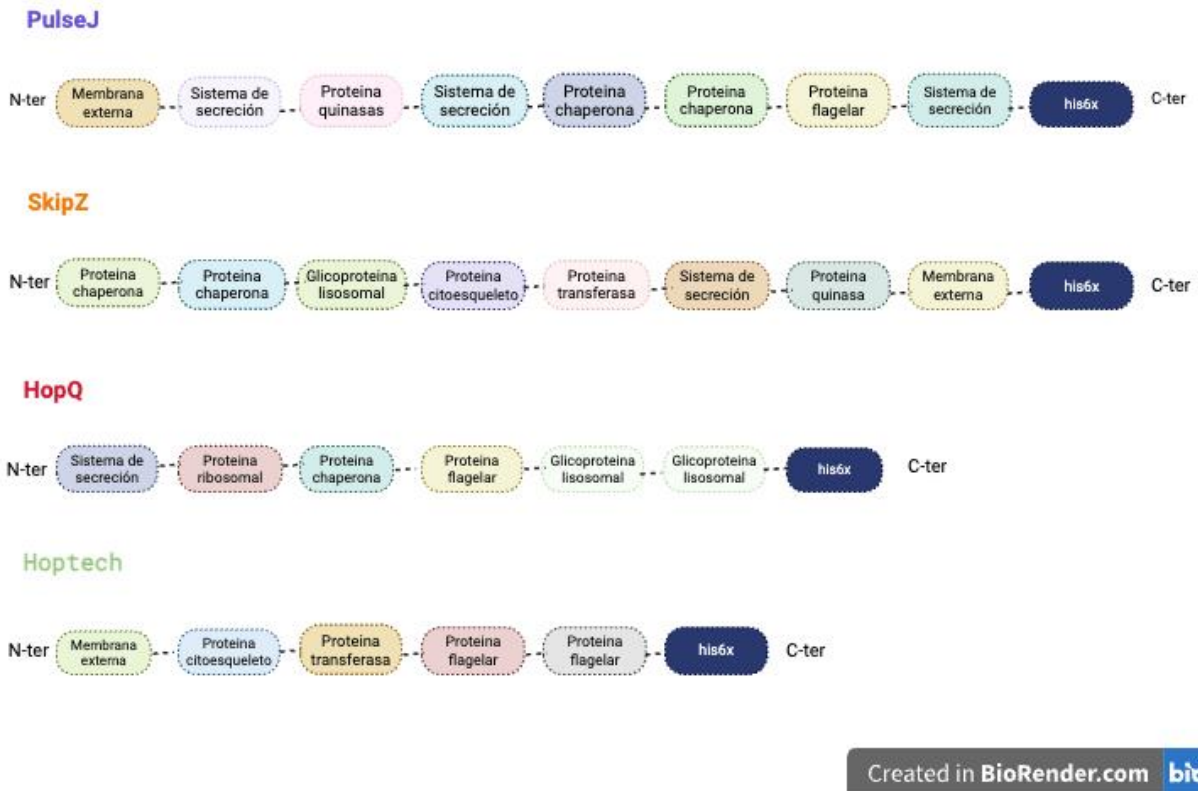
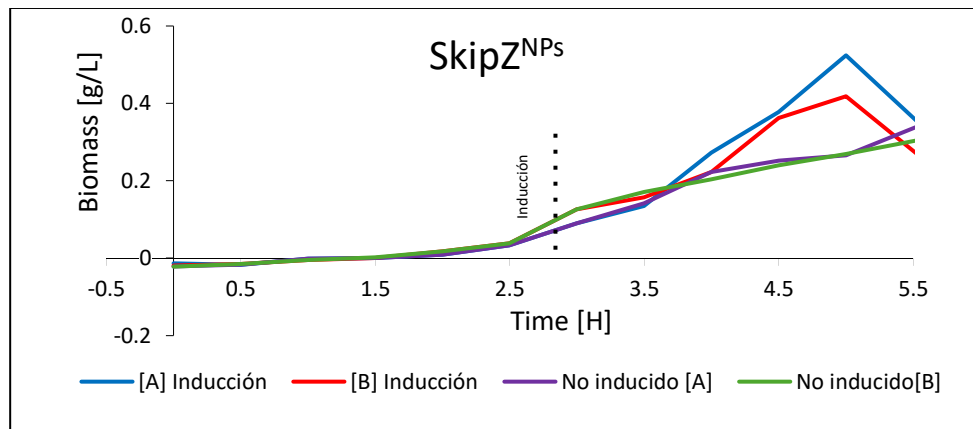


Figura 6. Representación esquemática de cuatro secuencias aminoacídicas quiméricas, designadas: Hoptech, SkipZ, PulseJ y HopQ. Los cuatro constructos están formados desde el extremo N al C-terminal de secuencias de péptidos con potencial antigénico que provienen de: membrana externa, sistema de secreción, quinasa, chaperonas, flagelinas, glucoproteína lisosomal, citoesqueleto, transferasas y ribosomal de los dos genogrupos preponderantes de *P. salmonis*. Todos los constructos presentan una etiqueta H6 en el extremo C-terminal para la posterior purificación.

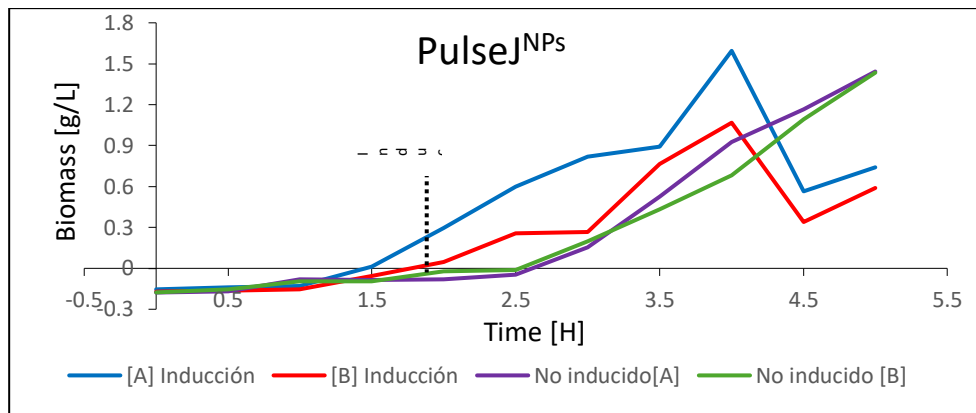
5.2 Caracterización de antígenos proteicos nanoestructurados

Para evaluar si la sobreexpresión de las proteínas multi-epitopes afectaban el crecimiento bacteriano, se realizó una curva de crecimiento en presencia del inductor (IPTG) y sin el inductor de las cuatro nanoproteínas diseñadas (SkipZ, PulseJ, HopQ y Hoptech) (Figura 7). Este análisis permitió caracterizar: 1) una posible toxicidad; 2) el punto óptimo de crecimiento y 3) metabolismo bacteriano, asegurando el máximo rendimiento estresor de producción de proteína durante la inducción con IPTG. Los resultados mostraron un comportamiento de crecimiento similar entre las cuatro nanoproteínas durante las fases log y estacionaria, lo que indica que la expresión de estas proteínas no afecta significativamente la viabilidad ni el

crecimiento bacteriano en las fases iniciales. Sin embargo, durante la fase logarítmica, las bacterias alcanzan su máximo crecimiento al inducir con 0,1 mM de IPTG a las entre las 4 y 5 horas. (Figura 10). Lo que nos determina el tiempo óptimo de inducción: A) SkipZ fue de 3 horas; B) Para PulseJ fue de 2 horas: C) Para HopQ fue de 2 horas y para D) Hoptech fue de 3 horas. Esto nos permitió mantener el ambiente estresor necesario para producir NPs con α A) ísticas de cuerpos de inclusión.



B)



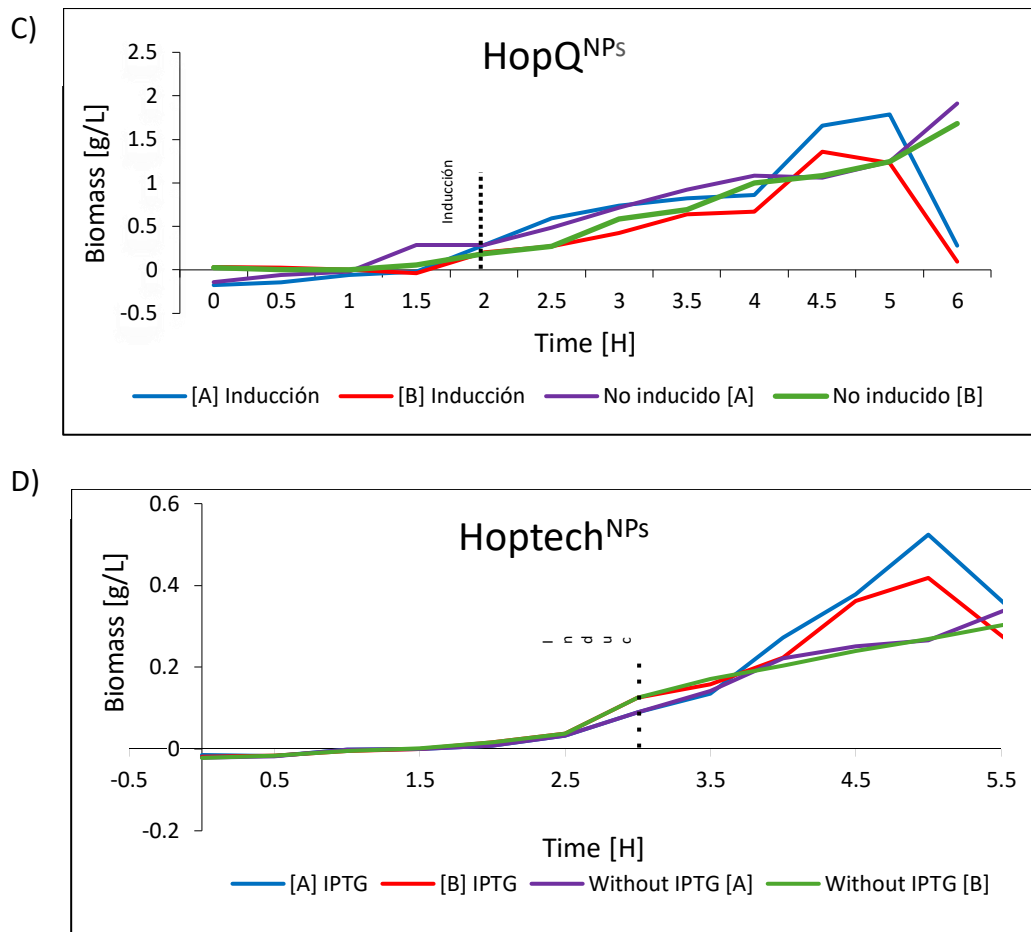


Figura 7. Perfil de crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) no inducidos e inducido por IPTG. (A) SkipZ con inducción a las 3 horas iniciado el cultivo. (B) PulseJ con inducción con IPTG a las 2 horas iniciado el cultivo. (C) HopQ con inducción a las 2 horas iniciado el cultivo y (D) Hoptech con inducción a las 3 horas iniciado el cultivo.

Posterior a la producción y purificación de las nanoproteínas, se cuantificaron mediante Western Blott. La cuantificación obtenida fueron variables: SkipZ a 40 mg/L; PulseJ a 57 mg/L y HopQ a 26,8 mg/L (Figura 8). Sin embargo, no se logró cuantificar Hoptech mediante western blot (Figura 11, sección B), por lo que se descartó para futuros experimentos. Esto se atribuye a la solubilidad de la nanoproteínas, que se concentra mayormente en la fracción soluble (Figura 8, sección A). La cuantificación de iRFP utilizado como control positivo obtuvo rango de 46,6 mg/L (Figura 8, sección B).

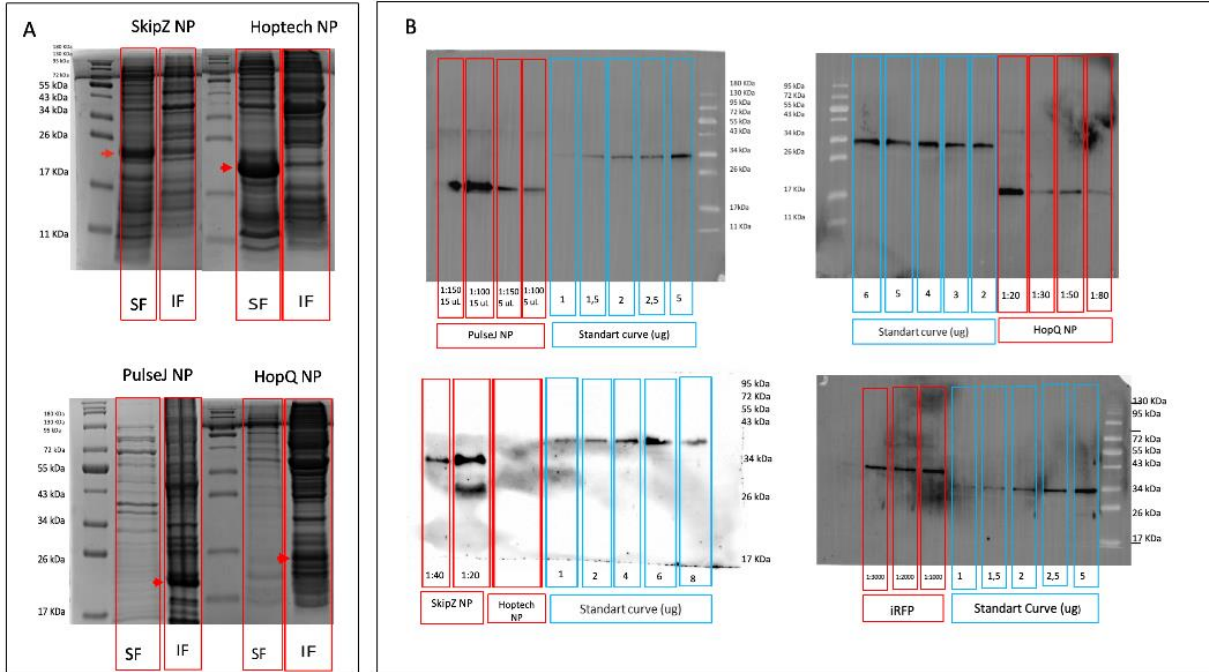


Figura 8. Cuantificación y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) teñido con Coomassie de los constructos SkipZ, Hoptech, PulseJ and HopQ. (A) SDS-PAGE teñido con Coomassie de las fracciones soluble e insoluble de las 4 nanoproteínas. (B) NPs semi cuantificadas por western blot. Las cuatro proteínas fueron calculadas desde una curva estándar de una proteína con concentración conocida y fueron detectadas utilizando ChemiDoc Imaging System. Los rangos de la curva estándar van desde los 8 to 1 μ g.

5.3 Endocitosis de los NPs en línea celular RST-11

Las nanoproteínas quiméricas fueron endocitadas por la línea de monocitos/macrófagos RTS11 de Trucha arcoíris. Mediante emisión de fluorescencia por citometría de flujo, se observó que la endocitosis de HopQ fue más eficiente que la observada para PulseJ y SkipZ, alcanzando aproximadamente un 54% de células fluorescentes a 20 μ g/mL en comparación a 26% de células fluorescentes generadas por PulseJ y el 5% por SkipZ a la misma concentración, durante 4 horas (Figura 9). La baja intensidad de fluorescencia observada en SkipZ no estuvo relacionada con la toxicidad o apoptosis, ya que la supervivencia celular fue 99,5% en todas las réplicas (datos apéndice 2).

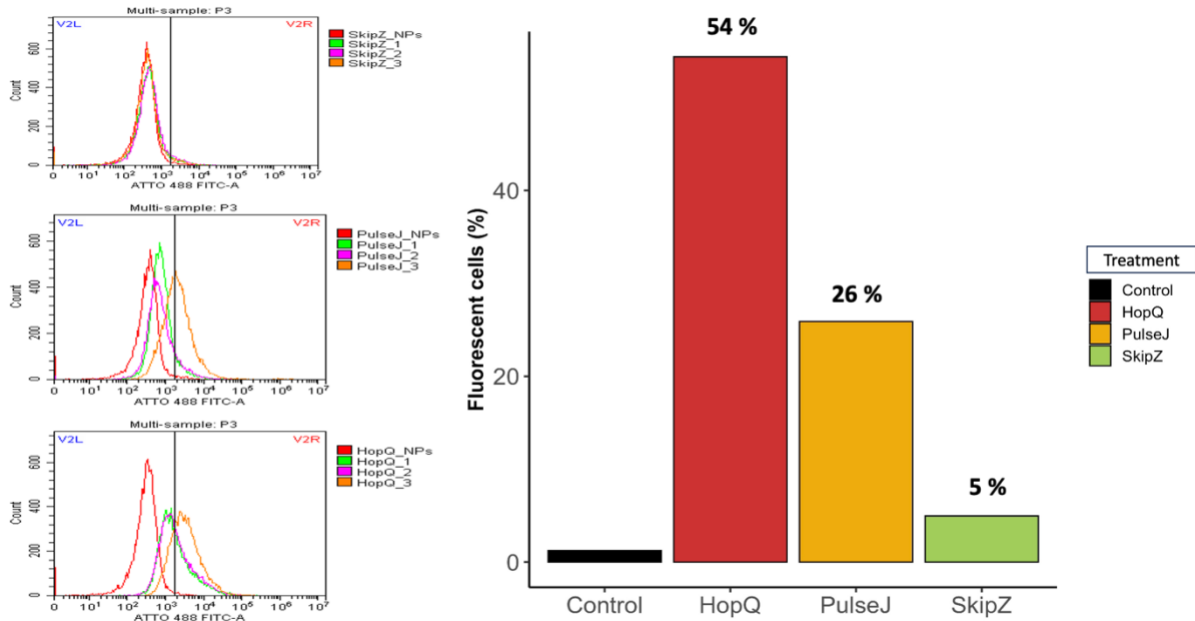


Figura 9. Porcentaje de células fluorescentes a consecuencia de la adición de 20 $\mu\text{g/mL}$ de cada NPs conjugado con el fluoróforo Atto 488 determinado por citometría de flujo a las 4 h post adición. El porcentaje de fluorescencia determina la capacidad de las células RTS-11 de captar las nanoproteínas.

5.4 Análisis de expresión de genes en línea celular RST-11 estimuladas con las NPs

El análisis de expresión diferencial de genes en la línea celular RTS-11, tras la inducción con nanopartículas quiméricas (NPs), mostró un efecto significativo en la presentación de antígenos y la respuesta inmunológica. Las células RTS-11 fueron tratadas con las tres nanoproteínas (SkipZ, PulseJ, HopQ) a concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ durante 12 horas. Como controles, se utilizaron células sin estimulación (control negativo), LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) como control positivo de la respuesta inmune innata, y nanoproteínas iRFP (10 $\mu\text{g/mL}$) como control de nanoproteínas sin relevancia inmunológica. Los resultados demostraron que la estimulación con SkipZ indujo un aumento significativo en la expresión de genes relacionados con la presentación de antígenos, como las moléculas co-estimuladoras *mhc-ii*, *cd80/86*, *cd83*, y citoquinas proinflamatorias como *il-1b* y *tnf- α* ($p < 0.05$) en todas las dosis de inducción, a excepción de 10 $\mu\text{g/mL}$ para *cd83* y *tnf- α* , no se observó diferencias significativas con respecto al control. Estos hallazgos sugieren que las SkipZ pueden potenciar la activación del sistema inmune en la línea celular RTS-11 (Figura

10). La Figura 11 presenta los resultados de expresión de genes en células RTS-11 estimuladas con PulseJ a diferentes concentraciones (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 12 horas. Al analizar la expresión de los genes *mhc-ii* y *cd86*, los resultados muestran que la estimulación con PulseJ a 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indujo un aumento significativo en la expresión de estos marcadores en comparación con los controles ($p < 0.05$). Mientras que para la expresión de *cd83* solo se observó un aumento significativo en la expresión a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de inducción, es más, a medida que aumenta la concentración de la NPs, la expresión del gen tiende a disminuir de manera significativa, hasta llegar a los 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$). El mismo comportamiento se observa en las citoquinas proinflamatorias *il-1 β* y *tnf- α* ; por lo que, a medida que aumenta la concentración (de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se produce una subexpresión progresiva de estos genes proinflamatorios. En contraste con los controles, LPS como inductor positivo muestra un aumento en la expresión de estas citoquinas, de igual manera, el control positivo sin relevancia inmunológica (iRFP) aumenta su expresión de manera significativa ($p < 0.05$) para ambas citoquinas. Un comportamiento similar al observado con SkipZ fue presentado por HopQ a las tres dosis implementadas (Figura 12). La expresión de *mhc-ii* y *cd86* mostró un aumento significativo a todas las concentraciones probadas; para *cd83*, se aprecia significancia solo a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pero si se compara entre las tres dosis, la inducción más fuerte se observó a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.05$). Al observar la expresión de *il-1 β* y *tnf- α* , si bien todas las dosis ejercieron un aumento de la expresión de manera significativa ($p < 0.05$), a 5 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ genera un mayor efecto en las citoquinas proinflamatorias. Estos resultados fueron suplementados a 24 horas de inducción. Sin embargo, no se logra apreciar un comportamiento a nivel biológico (datos apéndice 3).

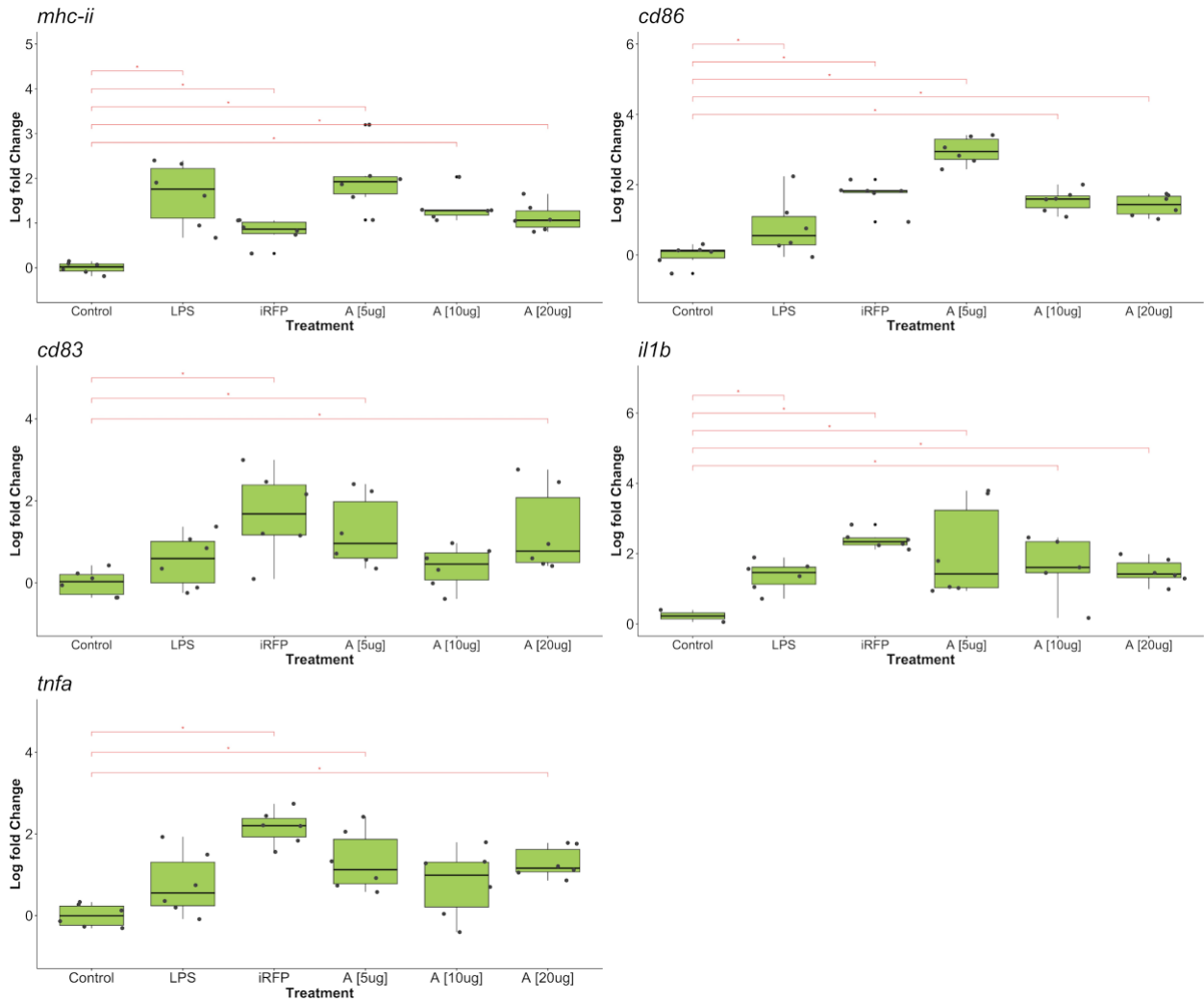


Figura 10. Análisis de expresión de genes de la respuesta inmune en la línea celular RST-11 que fue estimulada con el prototipo SkipZ a diferentes concentraciones (5, 10 y 20 µg/mL) durante 12 horas. Se utilizaron como controles la estimulación con agua, control positivo con LPS (10 µg/mL) y el control sin relevancia inmunológica iRFP (10 µg/mL). Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con * $p < 0.05$.

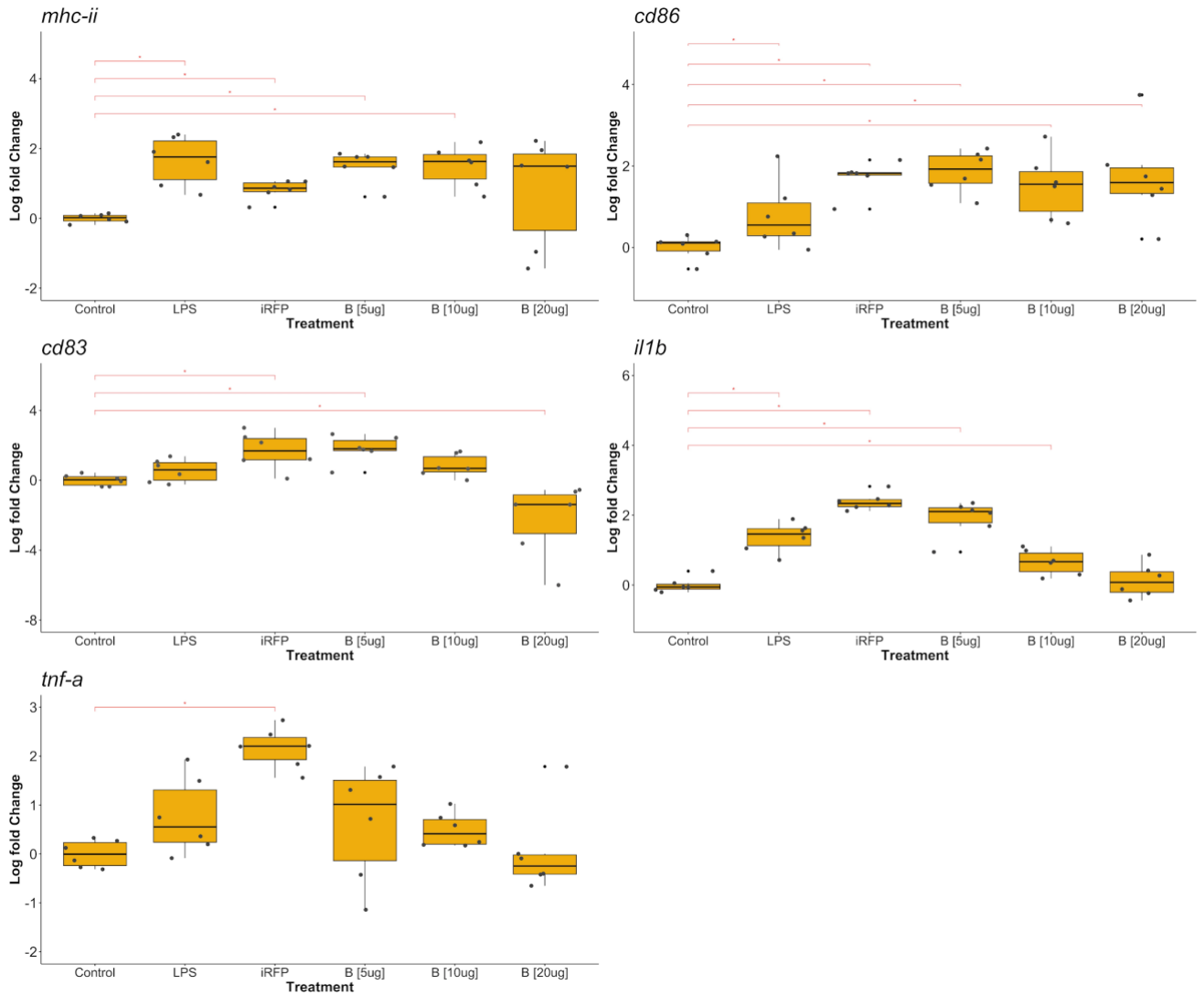


Figura 11. Análisis de la expresión de genes de la respuesta inmune en la línea celular RST-11 que fue estimulada con el prototipo PulseJ en diferentes concentraciones (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 12 horas. Se utilizaron como controles la estimulación con agua, control positivo con LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el control sin relevancia inmunológica iRFP (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con * $p < 0.05$.

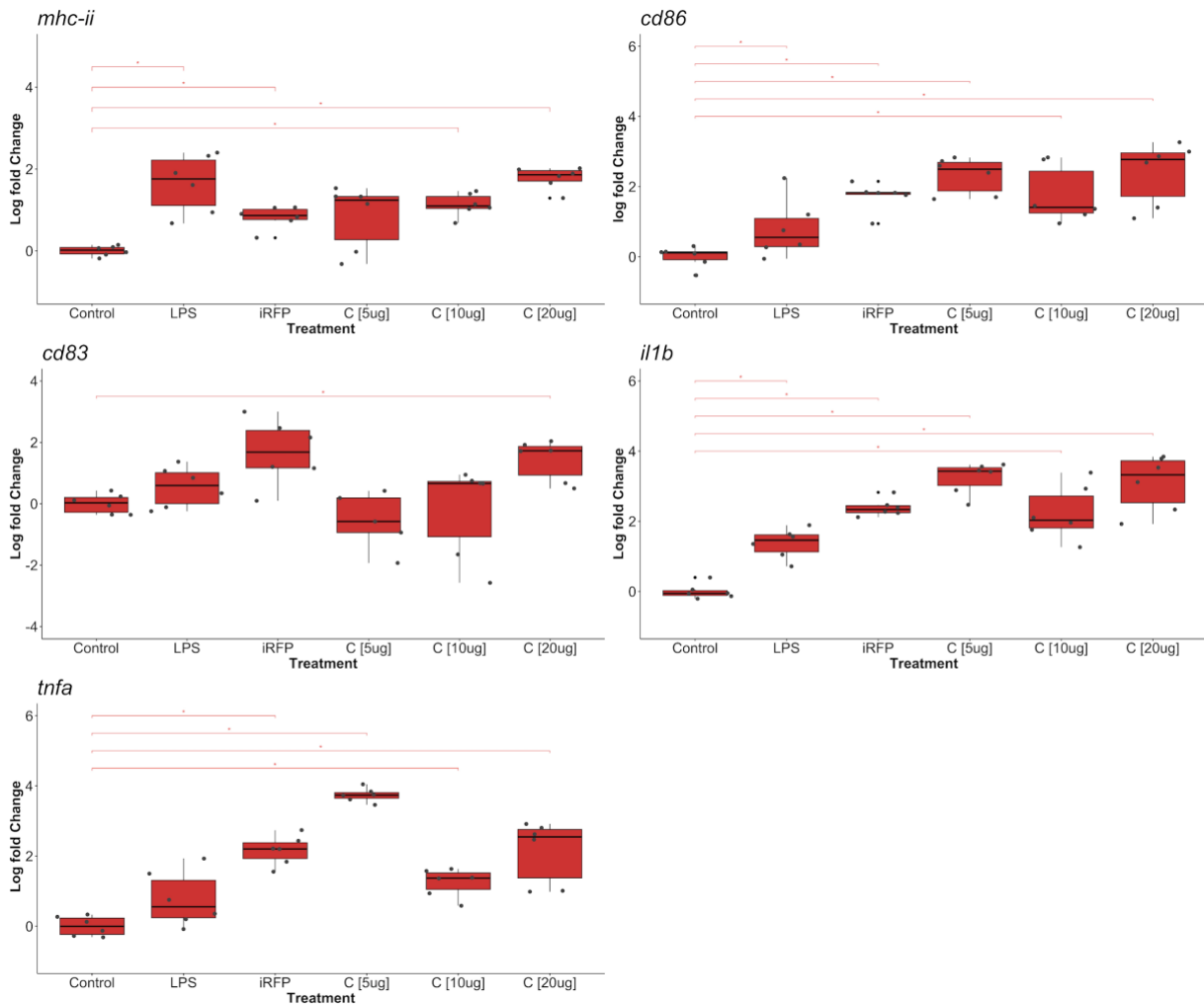


Figura 12. Análisis de la expresión de genes de la respuesta inmune en la línea celular RST-11 que fue estimulada con el prototipo HopQ en diferentes concentraciones (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 12 horas. Se utilizaron como controles la estimulación con agua, control positivo con LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el control sin relevancia inmunológica iRFP (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con * $p < 0.05$.

5.5 Presentación de antígenos inducido por NPs en línea celular RST-11

La estimulación con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SkipZ, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PulseJ y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HopQ en la línea celular RTS-11 resultó en una activación importante de los marcadores de superficie involucrados en la presentación de antígenos, como MHC-II, CD83 y CD80/86. Las imágenes de inmunofluorescencia (Figura 13) muestran que las tres nanoproteínas lograron activar los marcadores en las células RTS-11 a las 12 horas post-inducción. Lo que nos indicaría activación a nivel traduccional de marcadores de superficie en células inmunes

implicadas en el procesamiento y presentación de antígenos. En particular, HopQ a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostró una fuerte detección de MHC-II, CD83, y CD80/86 en comparación con los controles negativos y con el control positivo de nanoproteína iRFP, que no tiene relevancia inmunológica.

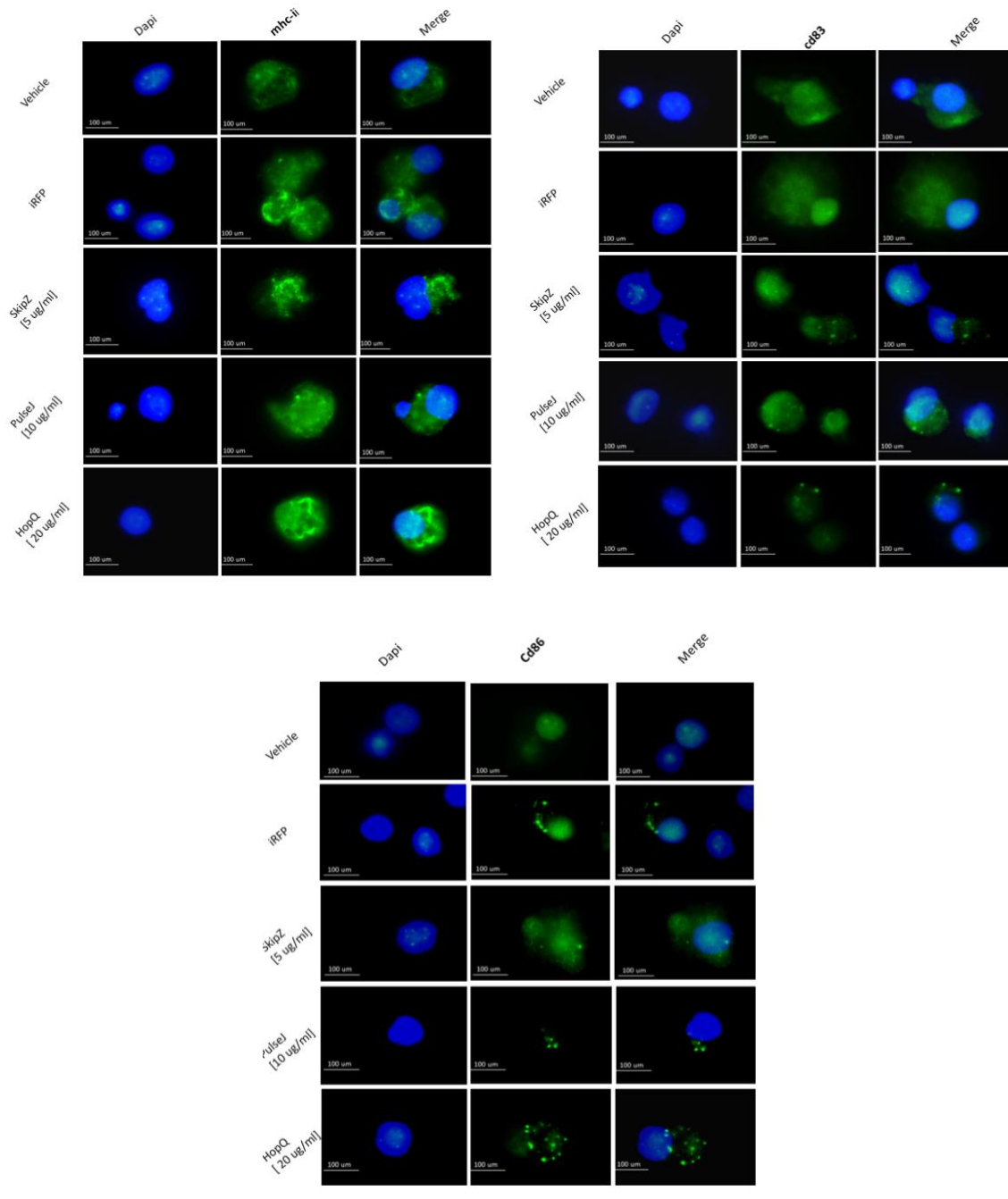


Figura 13. Análisis de la expresión de proteínas por inmunofluorescencia de las 3 nanoproteínas propuestas en la línea celular RST-11 estimulada durante 12 horas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SkipZ, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PulseJ y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HopQ. A) Expresión del anticuerpo

MHC-II. B) Expresión del anticuerpo CD83. C) Expresión del anticuerpo CD86. Como controles se utilizaron el control negativo (con agua) y el control sin relevancia inmunológica iRFP (10 µg/mL). Las imágenes fueron analizadas con ImageJ.

5.6 Modulación de la respuesta inmune evaluada en bioensayo

5.6.1 Vacuna HopQ

La complejidad de la respuesta inmune involucra en análisis de múltiples genes, por lo que su interpretación debe abarcar la interrelación entre las expresiones génicas. Es por este motivo, que el análisis de componentes principales (PCA) reduce la dimensionalidad de datos complejos y destaca patrones significativos, permitiendo identificar agrupamientos y/o correlaciones entre las expresiones genéticas que pueden no ser evidentes al examinar cada gen individualmente.

El análisis de componentes principales (PCA) destacó cómo los diferentes genes contribuyen a la variabilidad en la respuesta inmunitaria post-vacunación con el prototipo HopQ a una dosis de 2 mg/kg de pez. Los dos primeros componentes principales, Dim1 (24.7%) y Dim2 (21.4%), explican conjuntamente el 46.1 % de la variabilidad total. Los datos de PCA nos indican que las respuestas inmunológicas inducidas por la vacuna se distribuyen en varias dimensiones, agrupadas según los tiempos evaluados (días 0, 1, 7 y 14 post-vacunación), presentando diversas contribuciones (datos apéndice 4). En la Figura 14, se observa que los genes *il-10*, *il-12*, *il-8*, *tnf-α*, y *il-1β* están alineados principalmente con Dim1, lo que indica que son los mayores contribuyentes a la variabilidad observada en esta dimensión, estos genes se correlacionan entre sí, dado su orientación similar, sugiriendo una coactivación tras la vacunación, reflejando su importante papel en la respuesta inmunitaria temprana e inflamatoria. Por otro lado, genes como *foxp3*, *inos*, *cd83*, *cd86*, y *mhc-ii* contribuyen de manera significativa a Dim2, lo que sugiere que estos genes están influyendo en la variabilidad en las fases más avanzadas de la respuesta inmunitaria, estos genes presentan una alta correlación entre sí, apuntando a la misma dirección, lo que podría asociarse con la regulación de la respuesta adaptativa y la presentación de antígenos. Adicionalmente, los genes *mhc-i* y *tbet* se correlacionan moderadamente y de manera ortogonal a los genes Th2 (*il4-13* y *gata3*), lo que puede sugerir una resolución temporal diferenciada entre linfocitos citotóxicos y linfocitos auxiliares. Por último, con un eje negativo en Dim1 se ubican genes

como *ifn γ* , *cd4*, *cd8*, *igm*, *il-4/13*, y *gata3*, con menor contribución, lo cual indica una baja variación explicada por estos genes en este contexto. El gen *ifn- γ* , en particular, se orienta de forma opuesta a los genes proinflamatorios, sugiriendo una disociación o incluso inhibición relativa respecto a la respuesta inflamatoria mediada por *il-12* y *tnf-a*.

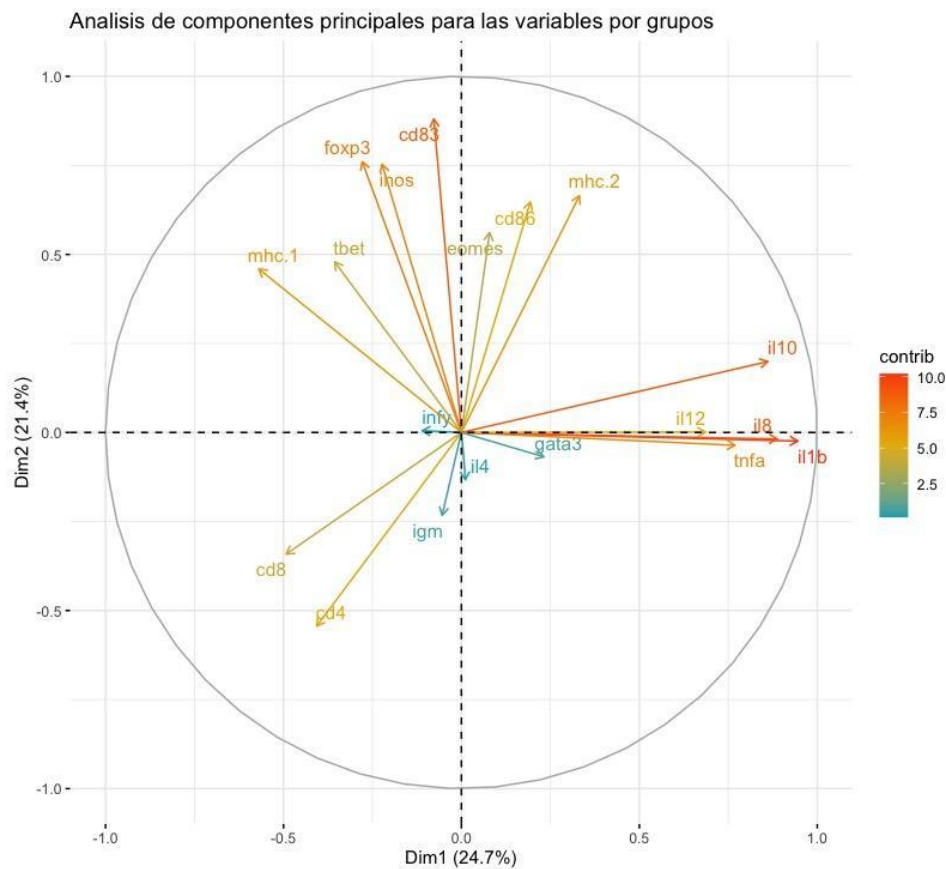


Figura 14. Análisis de componentes principales (PCA) de las variables inmunológicas por grupos post-vacunación con HopQ. Dim1 (24.7%) y Dim2 (21.4%) explican un 46.1% de la variabilidad total. Los colores de las flechas indican el nivel de contribución de cada gen, desde bajo (azul) hasta alto (rojo).

Adicional al análisis de componentes principales, es fundamental analizar la expresión génica específica, para comprender los cambios dinámicos y jerárquicos a lo largo del tiempo ejercido por la vacuna. Para ello, el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) permitió evaluar de

manera detallada, la dinámica de expresión de cada gen individualmente, permitiendo profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen a la respuesta inmunitaria en diferentes momentos post-vacunación. Este enfoque permite observar cómo varía la expresión de genes clave en distintos momentos post-vacunación, proporcionando una visión clara de las fases de activación, regulación y posible memoria inmunológica que se desarrollan a lo largo del tiempo. Los genes proinflamatorios *il1β*, *tnfα*, e *il-8* mostraron una sobreexpresión significativa al día 1 post-vacunación ($p < 0.01$), en comparación con el control no vacunado (día 0), lo que refleja un estado proinflamatorio de los peces 1 día posterior a la inyección. Las citoquinas *il-1β* e *il-8*, *tnf-a* e *il-12*, esencial para para la diferenciación de células T naive hacia perfil Th1, muestra cambios significativos 1 día post vacunación ($p < 0.01$). Por otra parte, la citoquina anti-inflamatoria (*il-10*), también mostró un aumento significativo al día 1 ($p < 0.01$) (Figura 15). La posición de todas las citoquinas en el PCA, cercana a Dim1, indica que es un contribuyente importante a la variabilidad observada, actuando como modulador de la inflamación. También se observaron cambios en la expresión de genes involucrados en células presentadoras de antígenos: el marcador *cd80/86*, moléculas coestimuladoras expresadas en la superficie de las APCs, que proporcionar señales coestimuladoras esenciales para la activación completa de las células T. El marcador presentó una sobreexpresión significativa al día 7 ($p < 0.01$). Por otro lado, la molécula presentadora de antígenos, *mhc-ii*, también se sobreexpresó significativamente a los 7 dpv ($p < 0.01$). Además, contribuyeron notablemente a Dim2 en el PCA. Por otro lado, *cd83*, un marcador de maduración de las APCs, demostró una disminución significativa al día 14 ($p < 0.01$). Esto puede indicar que, la maduración de las APCs (principalmente células dendríticas) ha disminuido pasado 14 días desde la vacunación, lo que sugiere que la fase de activación de las células T está concluyendo. La citoquina *il-12* demuestra un aumento progresivo como respuesta frente a la vacunación, sin embargo, solo es una tendencia de aumento de la expresión de la citoquina. Es importante visualizar el efecto de *ifn-γ* durante los 14 días analizados, el que aumenta de manera significativa al día 7 y 14 post vacuna ($p < 0.01$), siendo una citoquina importante en generar una respuesta contra *P. salmonis*. Si bien, *inos* registro un marcado aumento significativo a 7 dpv ($p < 0.01$), pasado 14 dpv disminuye significativamente ($p < 0.05$). Otro de los genes que demuestra una fuerte contribución en línea con Dim2 es *foxp3*, un marcador de células T reguladoras, el cual mostró una disminución significativa a los 7 y 14 días post-vacunación ($p < 0.01$) (Figura 16).

Asimismo, la expresión de genes involucrados en la activación de linfocitos Th1 y Th2, que contribuyen de menor manera al PCA, nos demuestran que a los 7 y 14 dpv, la molécula del

complejo mayor de histocompatibilidad clase I (*mhc-i*) fluctúa su expresión en el tiempo, pero no demuestra una activación por parte de la vacuna. El gen *cd8* genera una tendencia al alza moderada de la expresión a los 7 y 14 dpv en comparación al día 0, pero no de manera significativa. Estos resultados se complementan con la expresión *t-bet*, el factor de transcripción de células Th1, y *eomes*, relacionado con la diferenciación de células T CD8+, que mostraron una disminución significativa al día 7 y 14 ($p < 0.01$). Aunque ambos genes contribuyeron en menor medida al PCA, su regulación descendente es relevante, ya nos indica el comportamiento de la modulación de la respuesta celular. Adicionalmente, moléculas relacionadas con el perfil de diferenciación Th2 y la inmunidad humoral, *cd4*, *il-4/13*, *gata3*, *igm*, no mostraron cambios significativos en su expresión en ninguna de las fases post-vacunación, lo que sugiere que la vacuna no favorece la respuesta humoral. Su baja contribución en el PCA confirma esta observación (Figura 17). Cabe mencionar, que el apéndice 6 demuestra el mismo análisis de expresión de genes, agregando el comportamiento del control de inyección con pbs 1X. Los resultados muestran una expresión génica comparable entre los peces inyectados con HopQ y aquellos inyectados con pbs al día de la vacunación. No obstante, es importante destacar que la vacunación con HopQ evidenció una activación temprana diferencial significativa respecto al control, lo que no se observó en el grupo pbs. Adicionalmente, al analizar los días posteriores a la vacunación, se observó una diferencia marcada entre los tratamientos. A diferencia del grupo tratado con pbs, que mostró una menor expresión de los genes *il-12*, *ifn- γ* , *inos*, *mhc-I* y *cd4* en comparación con el grupo no vacunado (día 0) durante los días 7 y 14 post-inyección ($p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y 0.005), la inmunización con HopQ indujo una sobreexpresión significativa de estos mismos genes en los mismos periodos evaluados. Estos resultados sugieren que HopQ tiene la capacidad de activar tempranamente rutas inmunológicas asociadas a la respuesta celular, a diferencia del grupo tratado con pbs, en el cual se observó una supresión de dicha respuesta. Esto evidencia que los cambios en la expresión génica son atribuibles al efecto específico de la vacuna y no al vehículo ni al procedimiento de inyección

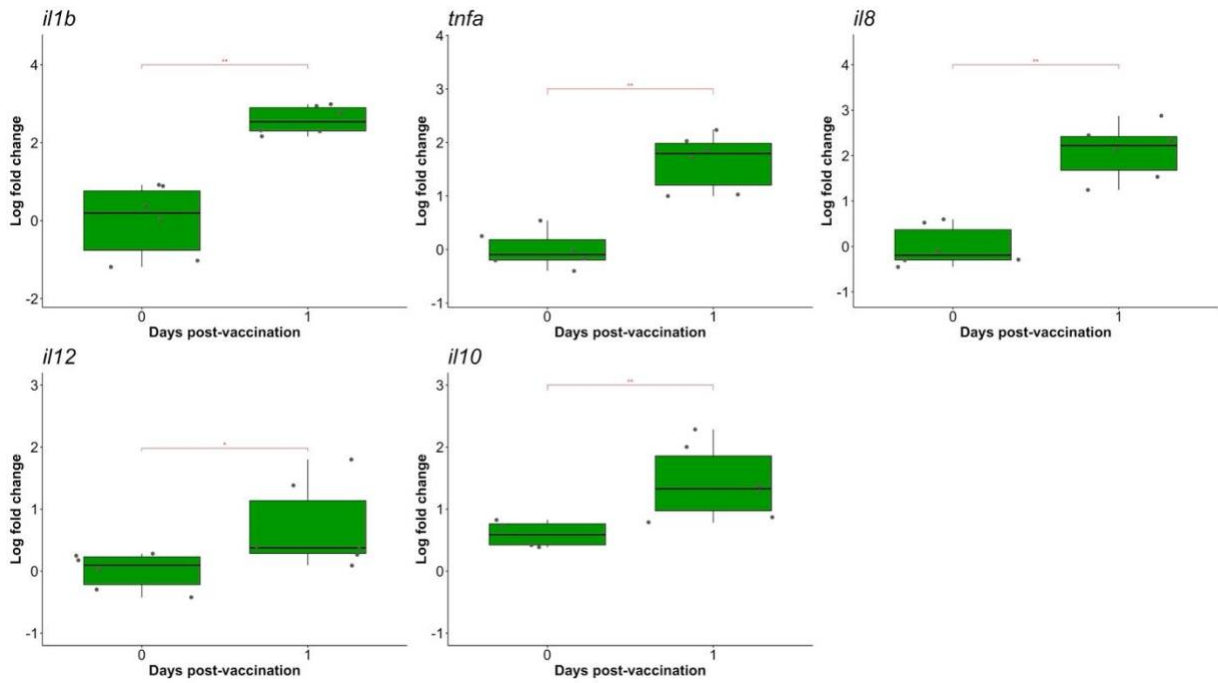


Figura 15. Análisis de expresión diferencial de genes relacionados a la respuesta inflamatoria primaria 1 día post vacunación. Se observan cambios significativos en la expresión de los genes *il-1B*, *tnf- α* , *il-8*, *il-12* e *il-10*. Los datos muestran los cambios en la expresión génica en Log fold change comparados con el día 0. Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con (*) para $p < 0.05$ y con (**) para $p < 0.01$.

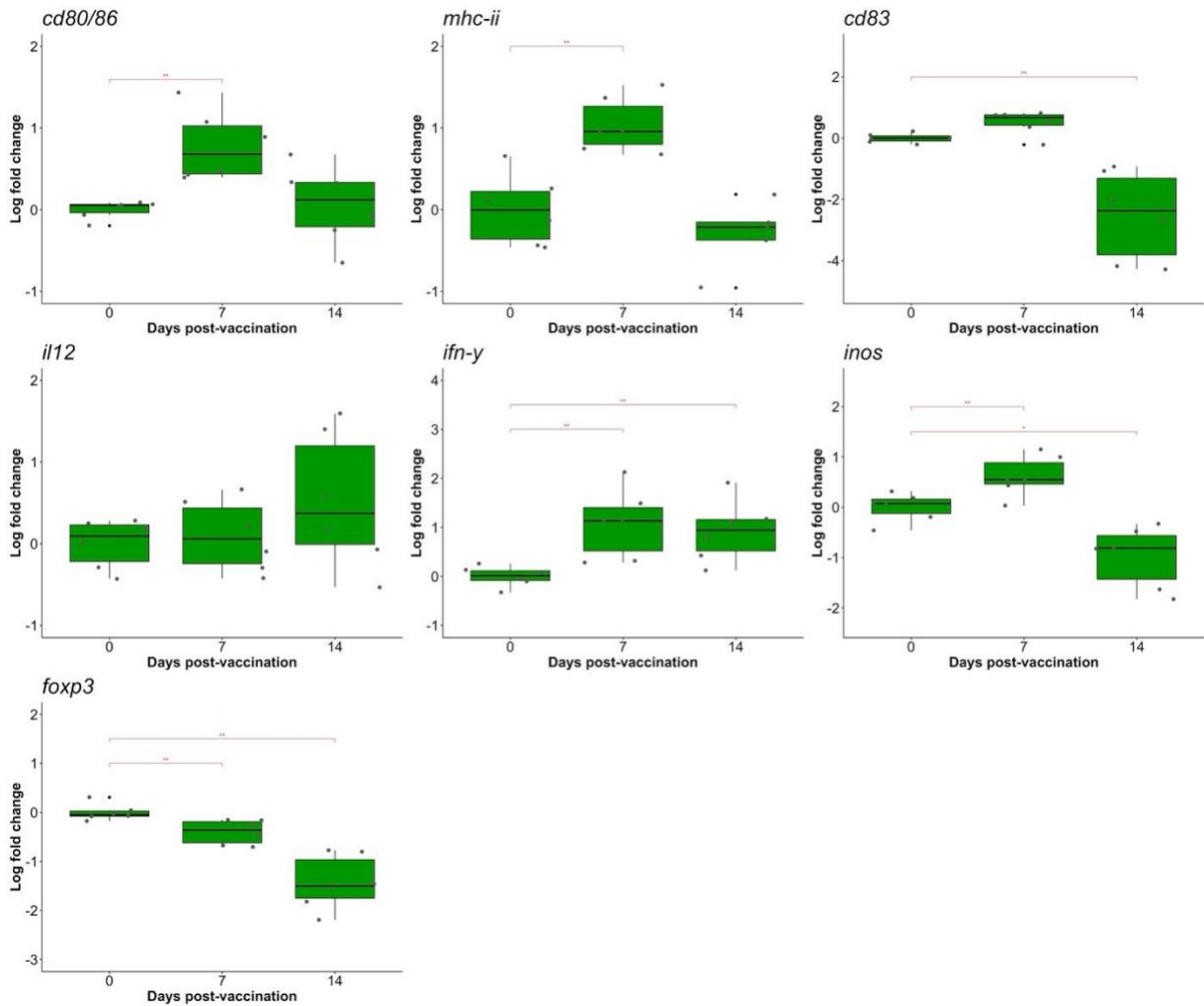


Figura 16. Análisis de expresión diferencial de genes inmunológicos en diferentes días post-vacunación (días 0, 7, y 14). Los genes analizados están involucrados en la activación de células T, presentación de antígenos, producción de citocinas proinflamatorias, y la regulación de la respuesta inmune, incluyen *cd83*, *cd80/cd86*, *mhc-ii*, *il-12*, *ifn-γ*, *inos*, y *foxp3*. Los datos muestran el Log fold change en la expresión génica en relación con el día 0. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (**) para $p < 0.01$ y (*) para $p < 0.05$.

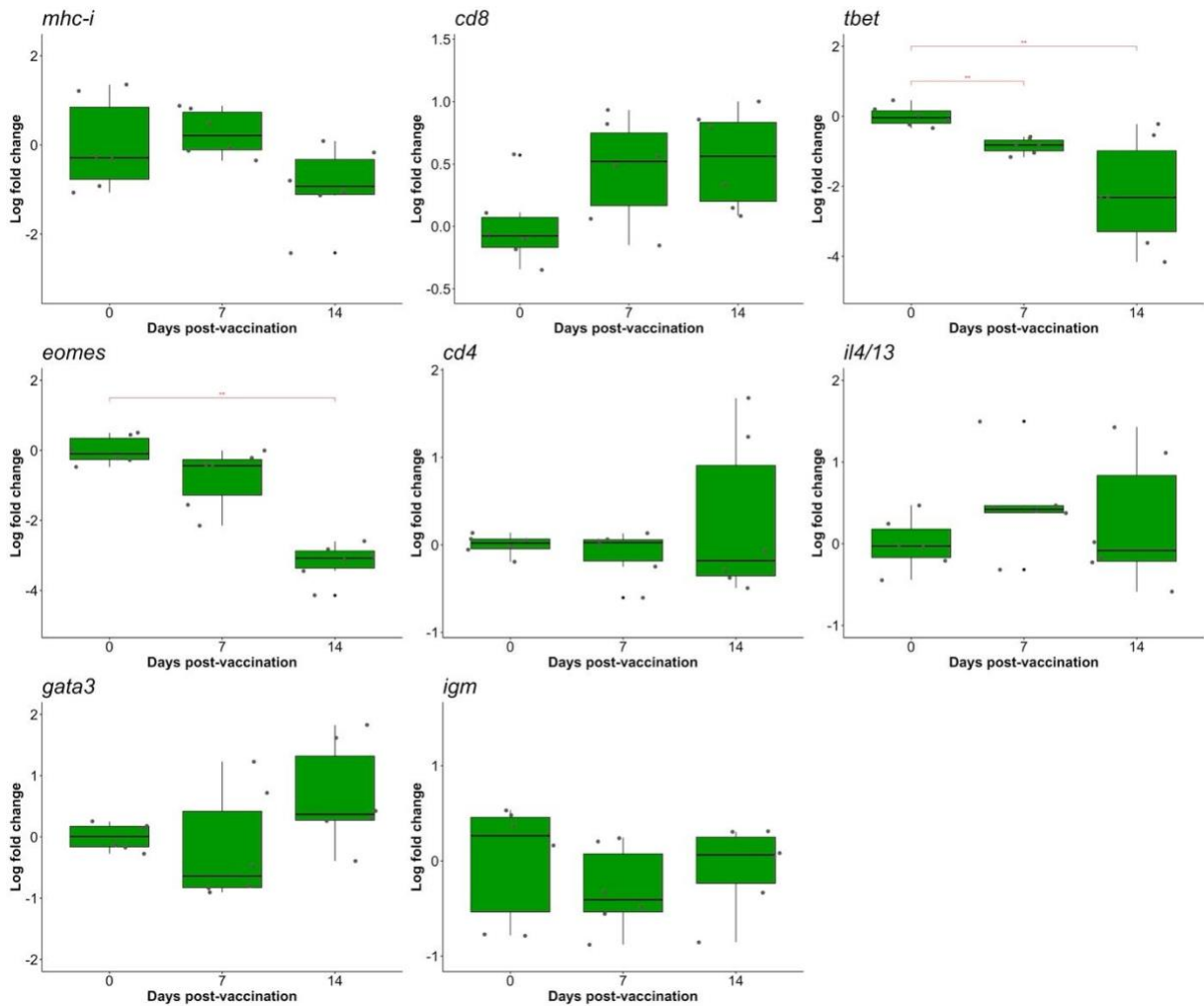


Figura 17. Análisis de la expresión diferencial de diversos genes inmunológicos en diferentes días post-vacunación (días 0, 7, y 14). Los genes evaluados están relacionados con funciones clave del sistema inmune, activación de células T, diferenciación de subtipos celulares y la respuesta de células B, incluyen *mhc-i*, *cd8*, *tbet*, *eomes*, *cd4*, *il4/13*, *gata3*, e *igm*. Los datos muestran los cambios en la expresión génica en Log fold change comparados con el día 0. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con (**) $p < 0.01$.

5.6.1.1 Análisis de Inmunoglobulinas

El análisis de la respuesta humoral en peces vacunados con la formulación HopQ mediante ELISA a los días 1, 7 y 14 post-vacunación no evidenció diferencias significativas en los niveles de inmunoglobulinas totales respecto al grupo control (día 0), según los valores de densidad óptica (OD) obtenidos a 450 nm (Figura 18). Si bien se observaron ligeras fluctuaciones en las medianas a lo largo del tiempo, especialmente en el día 7 se apreció

una mayor dispersión de datos, estas no fueron estadísticamente significativas según el análisis de varianza (ANOVA de una vía)

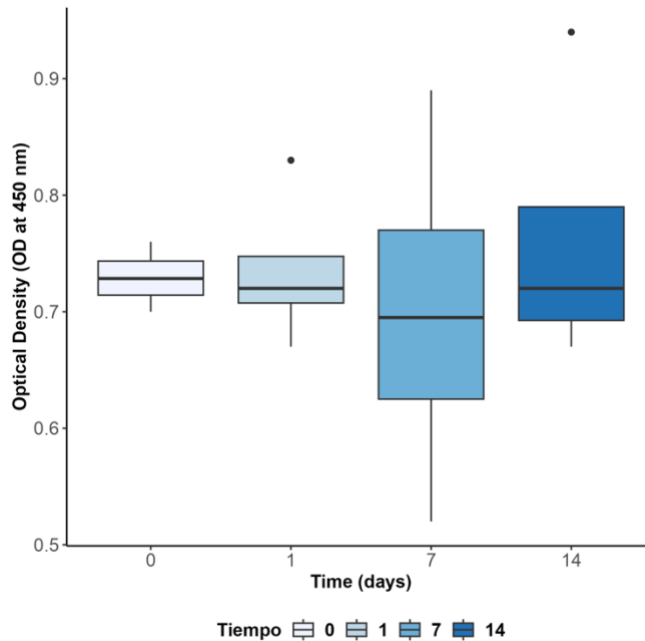


Figura 18. Producción de Inmunoglobulinas (Ig) en peces vacunados con la vacuna HopQ a los 1, 7 y 14 días post-vacunación, medida mediante ELISA. La densidad óptica (OD) a 450 nm no refleja diferencias significativas en los niveles de Ig a lo largo del tiempo evaluado al compararlo al control tiempo 0 (sin vacuna), según el análisis de varianza de una vía (ANOVA).

5.6.2 Vacuna SkipZ

El Análisis de Componentes Principales (PCA) se realizó para evaluar las muestras tratadas con la vacuna SkipZ a una dosis de 0.5 mg/kg de pez, considerando la expresión de 20 genes inmunológicos en diferentes momentos post-vacunación. El análisis explicó un 55.7% de la variabilidad total de los datos, con *Dim1* explicando el 41.3% y *Dim2* el 14.4% de la variabilidad. Los resultados del PCA muestran que las respuestas inmunológicas inducidas por la vacuna se distribuyen en distintas dimensiones, organizadas según los tiempos evaluados (días 0, 1, 7 y 14 post-vacunación), reflejando contribuciones diversas (datos apéndice 5).

En la Figura 19, se observa que la principal contribución al PCA se encuentra en los genes *il-12*, *il-4/13*, *cd80/86* e *ifn- γ* , los cuales contribuyen positivamente a Dim1. Esta agrupación indica una correlación positiva entre ellos y sugiere una fuerte activación sinérgica de la respuesta adaptativa tipo Th1, acompañada de componentes de tipo Th2.

En contraste, los genes *cd8*, *t-bet*, *cd4*, *cd83* y *eomes* muestran una mayor contribución a Dim2, lo cual sugiere que estas variables explican una porción distinta de la variabilidad observada, posiblemente asociada a mecanismos de diferenciación de linfocitos citotóxicos y cooperadores en etapas más tardías. Estos genes se proyectan en dirección opuesta a *ifn- γ* , lo que sugiere correlaciones negativas entre ellos. En particular, *cd8* se ubica en un cuadrante opuesto al de *ifn- γ* , lo que indica una fuerte correlación negativa. Esto podría interpretarse como un desacople funcional, donde el incremento en la expresión de *ifn- γ* no necesariamente se acompaña de una activación de *cd8*, a pesar de que ambos genes están implicados en la inmunidad celular. Asimismo, los factores de transcripción *t-bet* y *eomes*, comúnmente asociados a la diferenciación de linfocitos Th1 y CD8+, también presentan orientación opuesta a *ifn- γ* , lo cual refuerza la hipótesis de una inhibición relativa o disociación funcional. Es decir, mientras *ifn- γ* podría mantenerse activo como marcador de inmunidad celular, los programas de transcripción que promueven la expansión de células citotóxicas estarían relativamente suprimidos o no inducidos en esta fase. Por otro lado, genes como *inos*, *foxp3*, *tnf- α* y *gata3* muestran una contribución baja en ambos ejes, lo que indica una participación menos determinante en la variabilidad del sistema inmune bajo esta condición experimental. No obstante, su proximidad relativa en el plano sugiere una débil correlación entre ellos, posiblemente vinculada a funciones reguladoras o de resolución inmunológica.

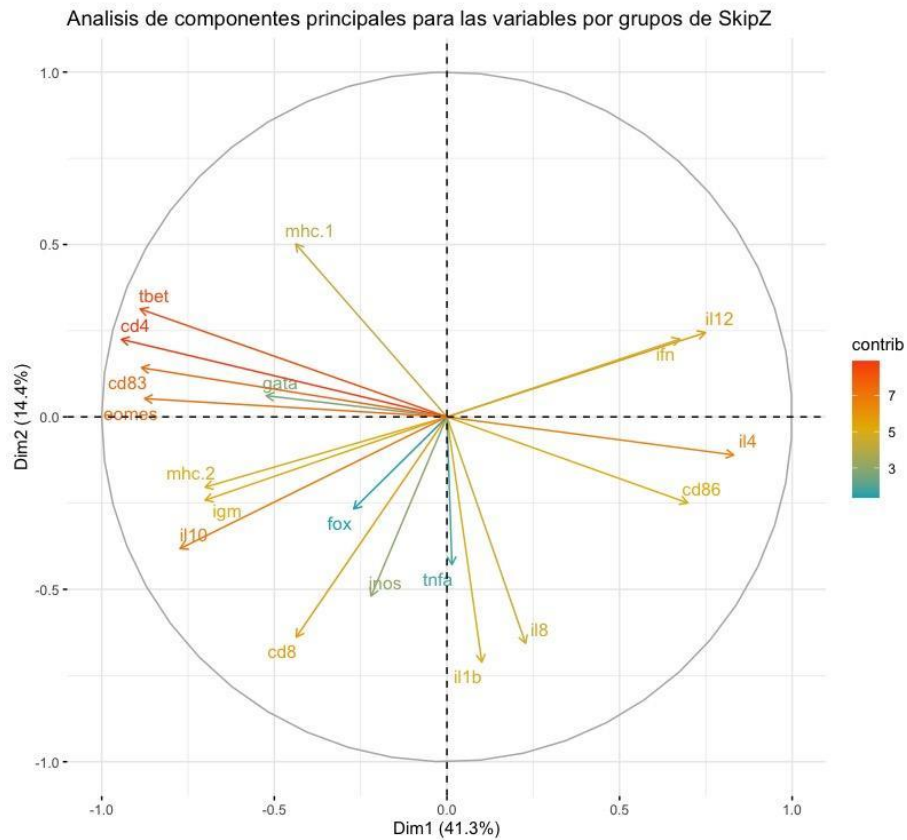


Figura 19. Análisis de componentes principales (PCA) para las variables génicas de los grupos tratados con la vacuna SkipZ. El gráfico de contribución de variables muestra cómo cada gen contribuye a la variabilidad total (Dim1: 41.3%, Dim2: 14.4%). Los colores de las flechas indican el nivel de contribución de cada gen, desde bajo (azul) hasta alto (rojo).

Al desglosar el comportamiento temporal de cada gen y enfocarnos en el análisis de expresión génica utilizando el método de Livak, se obtiene una interpretación más precisa y detallada del contexto inmunológico y de la jerarquía de la respuesta inmune. La figura 20 demuestra el comportamiento de la fase inicial de la respuesta inflamatoria, que a diferencia de HopQ, no presenta cambios en la expresión de genes proinflamatorios (*il-1 β* , *tnf- α* , *il-8*, *il-12*) y anti-inflamatorios (*il-10*). No obstante, si observamos el comportamiento de genes proinflamatorios a los 7 y 14 dpv, *il-12* mostró una sobreexpresión sostenida tanto a los días 7 como 14 ($p < 0.01$), indicando una activación prolongada de la respuesta Th1. La citocina clave para la activación de macrófagos y la inmunidad celular, *ifn- γ* , se sobreexpresó significativamente en estos mismos días ($p < 0.01$). El comportamiento de genes

relacionados a células presentadoras de antígenos como *cd80/86*, con alta contribución al PCA, presento una sobreexpresión significativamente a los 7 días post-vacunación ($p < 0.01$), lo que indica una activación robusta de las células presentadoras de antígenos. Sin embargo, *cd83*, un marcador de maduración de células dendríticas, generó una subexpresión significativa en los días 7 y 14 ($p < 0.01$), sugiriendo una disminución en la maduración dendrítica a medida que la respuesta adaptativa progresa. La modulación de inflamación representada por *inos*, un mediador clave en la producción de óxido nítrico e inflamación, mostró una subexpresión significativa a los 7 días post-vacunación ($p < 0.05$) (figura 21). La respuesta citotóxica demostrada por *cd8*, que presento una subexpresión significativamente a los 7 días post-vacunación ($p < 0.05$), indica una reducción en la activación de células T citotóxicas. De igual manera, los factores de transcripción *t-bet* y *eomes*, ambos esenciales para la diferenciación de células Th1 y CD8+ citotóxicas, mostraron una disminución en su expresión tanto a los 7 como a los 14 días post-vacunación ($p < 0.01$). Genes clave en la presentación antigénica a células T CD4+, *mhc-ii*, mostró una subexpresión al día 14 ($p < 0.05$), lo que indica que la fase de presentación antigénica está disminuyendo a medida que el sistema inmunológico prioriza la respuesta citotóxica y Th1. Adicionalmente, la subexpresión de *cd4* durante los 14 días ($p < 0.01$) apunta a una menor activación de células T helper. Por otro lado, se observa que *il4/13* se sobreexpresó de manera significativa a los 7 y 14 días ($p < 0.01$), lo que sugiere una activación fuerte de la respuesta Th2. Sin embargo, esto no se conduce con la expresión de *gata3* e *igm*; normalmente, se esperaría que aumentaran con una respuesta Th2, pero en este caso, la disminución observada sugiere que, aunque la señalización de *il-4/13* está activada, *gata3* puede estar regulado de manera diferente. El control inmunoregulador se mantiene estable durante los 14 días al no presentan variación en la expresión de *foxp3* (Figura 22). De igual manera que la vacuna HopQ, el apéndice 7 demuestra el efecto en la expresión de genes por la inyección con pbs 1x (control inyección). Se observa que pbs aumenta de manera significativa la expresión de *tnf-a* e *il-8* un día posterior a la vacunación al comparado con el control no vacunado (día 0), a diferencia del proceso de vacunación con SkipZ, que no genera diferencias significativa en este día post vacunación. Sin embargo, *il-1b*, *il-12* e *il10* no se reflejan cambios en la expresión génica con respecto a los no vacunados, tanto de los peces inyectados con pbs como con la vacuna SkipZ. En cuanto a los días 7 y 14, el comportamiento de los genes *il-12*, *inf-y*, *cd80/86* y *mhc-ii*, reflejan una actuación diferencial a los observado con la vacuna SkipZ, generando una disminución significativa ($p < 0,05$ y

0,01) con respecto al control (día 0), siendo incluso expresado de manera contraria a los observado con la vacuna SkipZ en los mismos días.

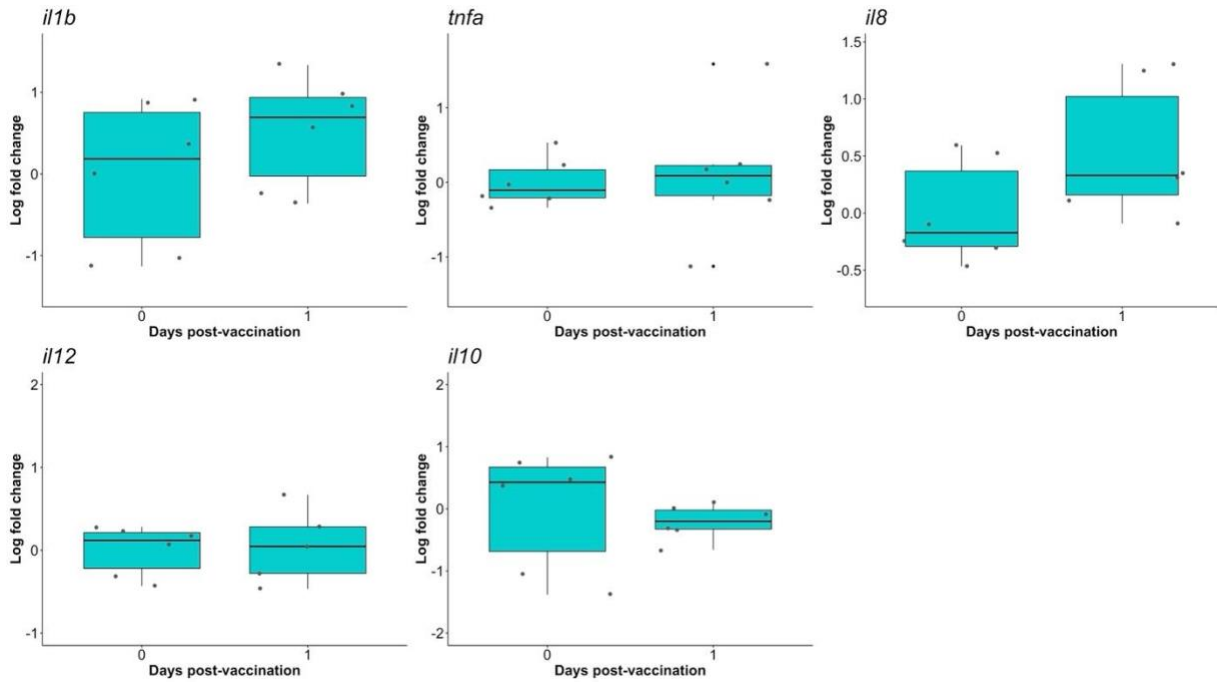


Figura 20. Expresión génica de *il1b*, *tnf- α* , *il8*, *il-12* e *il-10* al día 1 post-vacunación comparado con el día 0. La expresión se midió por qPCR y se normalizó con genes de referencia, se presentan como Log fold change. No se observan cambios significativos en los niveles de expresión de estos genes en el día 1.

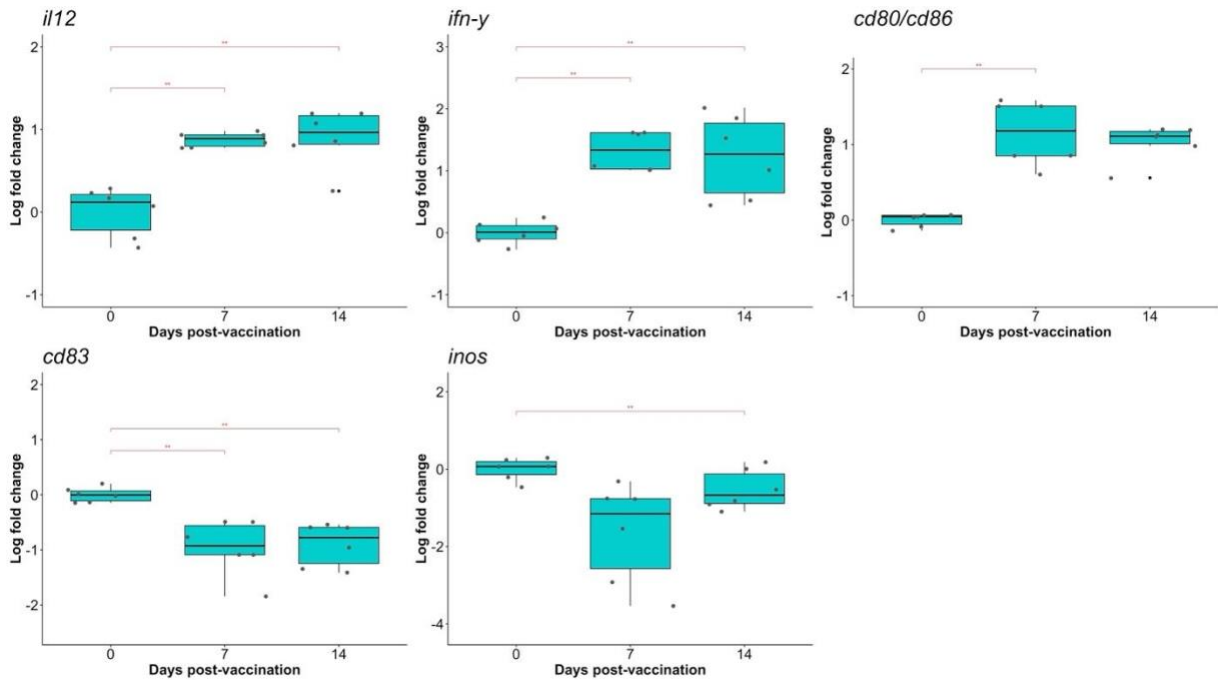


Figura 21. Cambio en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune inflamatoria y presentación de antígenos (*il-12*, *ifn-γ*, *cd80/cd86*, *cd83* e *inos*) en días 0, 7 y 14 post-vacunación. La expresión se midió por qPCR y se normalizó con genes de referencia. Se indican diferencias significativas (**) $p < 0.01$.

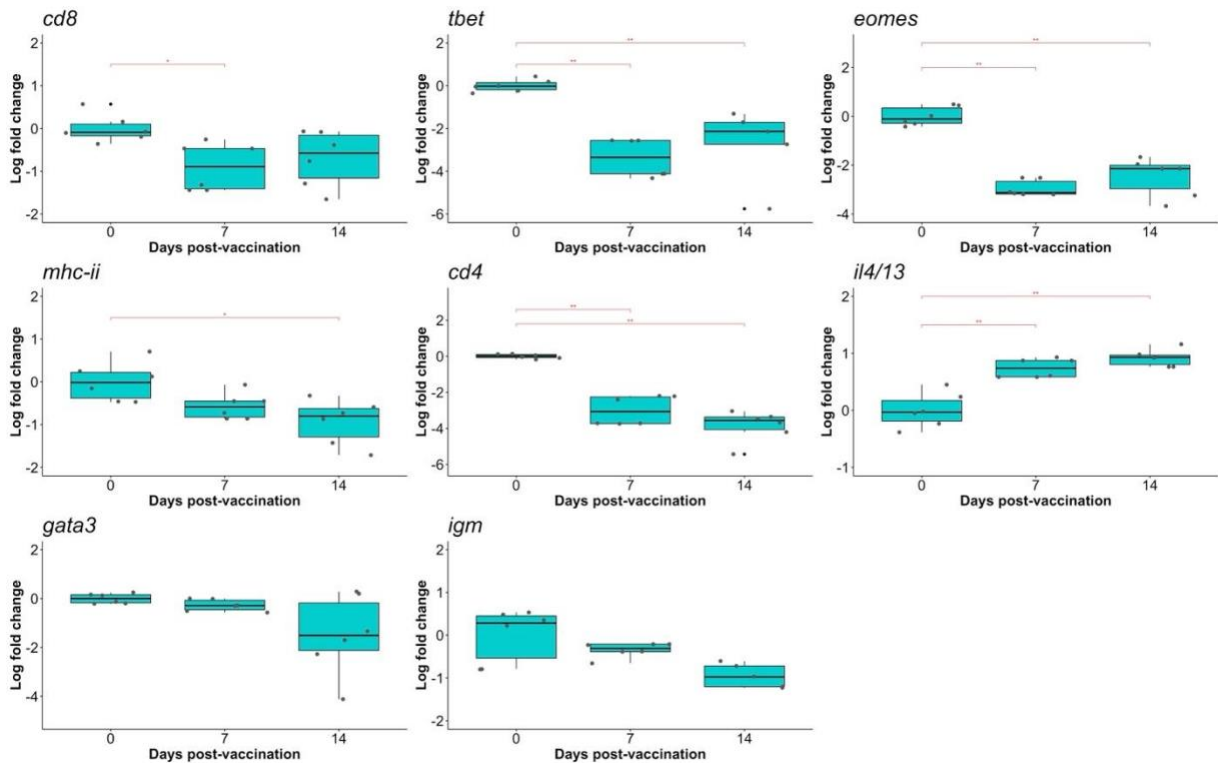


Figura 22. Cambio en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune adaptativa de tipo Th1 y Th2 (*cd8*, *tbet*, *eomes*, *mhc-ii*, *cd4*, *il4/13*, *gata3*, *igm*) en días 0, 7 y 14 post-vacunación. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los días post-vacunación (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$.

5.6.2.1 Análisis de Inmunoglobulinas

Los análisis de inmunoglobulinas a consecuencia de la vacuna SkipZ demuestran que, al día post-vacunación, no hubo cambios significativos en los niveles de Inmunoglobulinas, como era de esperar. A los 7 días post-vacunación, se observó un leve aumento en los niveles de Inmunoglobulinas, pero este cambio no fue estadísticamente significativo. A los 14 días post-vacunación, los niveles de Inmunoglobulinas no mostraron un incremento adicional, disminuyendo en densidad óptica (450) con respecto a día 7 e incluso más bajo que el control día 0. No se observan cambios estadísticos durante los 14 días analizados (Figura 23).

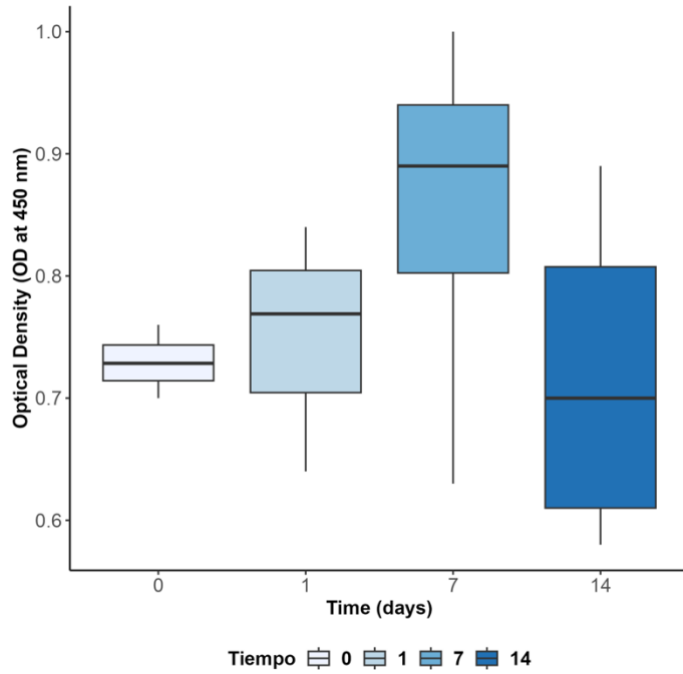


Figura 23. Producción de Ig totales en peces vacunados con la vacuna SkipZ a los 1, 7 y 14 días post-vacunación, medida mediante ELISA. La densidad óptica (OD) a 450 nm no refleja cambios significativos en la cantidad de anticuerpos presentes en las muestras en los diferentes días de análisis, según el análisis de varianza de una vía (ANOVA).

6 Discusión

6.1 Diseño de nanoproteínas quiméricas y su potencial antigénico para el desarrollo de vacunas contra *Piscirickettsiosis*.

Recientes estudios han demostrado que el enfoque de vacunología inversa permite identificar candidatos a vacunas y objetivos de fármacos (Alsowayeh & Albutti, 2022; Moxon et al., 2019; Solanki et al., 2019). En este contexto, en esta tesis se propuso la utilización de esta estrategia para la preselección de epítomos inmunogénicos de *Piscirickettsia salmonis* pertenecientes a los genogrupos LF-89 y EM-90, que podrían servir como blancos potenciales para el desarrollo de vacunas. Estas secuencias peptídicas con características de quiméricas tienen por función activar el sistema inmune de los peces, potenciando una respuesta de tipo celular a través de la activación de células presentadoras de antígenos (APCs) y linfocitos T de tipo Th1.

Esta estrategia se alinea con avances recientes en el desarrollo de vacunas subunitarias multiepitópicas en otras especies animales. Por ejemplo, Liu et al. (2024) diseñaron una vacuna subunitaria multiepitópica basada en epítomos inmunodominantes de *Streptococcus suis* capaces de inducir protección cruzada frente a múltiples serotipos en modelos murinos. Su diseño integró epítomos de células T y B altamente conservados entre cepas, fusionados con dominios adyuvantes y purificados como proteínas solubles, lo que resultó en una respuesta inmune robusta y una alta tasa de supervivencia. Similarmente, Puncham et al. (2020) desarrollaron una vacuna quimérica multiepitópica contra *Streptococcus agalactiae* en tilapia del Nilo, integrando epítomos de antígenos estructurales y de superficie en una sola proteína. Esta formulación demostró una activación significativa de IgM y genes asociados a respuesta inmune innata de la tilapia. Complementando estos hallazgos, el estudio de Roca-Pinilla et al. (2022) demostró que las proteínas recombinantes multidominio, que incorporan péptidos antimicrobianos de defensa del hospedero (HDPs) fusionados a proteínas fluorescentes como GFP, son capaces de generar una respuesta inmunitaria específica mediada por células presentadoras de antígenos (APCs) y linfocitos T.

6.2 Capacidad de respuesta de las NPs se relaciona con el nivel de endocitosis por parte de células de macrófago de peces.

Las nanoproteínas con características de cuerpos de inclusión (CI) presentan un comportamiento amiloidogénico, semejante al de amiloides funcionales naturales (Céspedes et al., 2016). Dicha red amiloide asegura un andamiaje fibroso estable, que confiere tanto estabilidad mecánica como alta porosidad, lo que les permite ser utilizadas como biomateriales funcionales. En este contexto, estudios previos han demostrado que las características de tamaño y superficie de los CI influyen directamente en su incorporación celular. Por ejemplo, partículas mayores a 4 μm presentan dificultades para llegar a órganos linfoides secundarios (Folgueira et al., 2015), mientras que nanopartículas más pequeñas tienen una mayor capacidad de internalización (Rojas-Peña et al., 2022). La evidencia de incorporación de CI por parte de células difiere de acuerdo con el tamaño de estas. En el caso de la línea celular RTS-11, derivada del bazo de trucha arcoíris, la cual exhibe características de monocitos/macrófagos y es comúnmente utilizada para estudiar respuestas inmunitarias en peces; la eficiencia de internalización fue inferior a la observada en otras líneas celulares, como las derivadas de pez cebra (ZFL) (Rojas-Peña et al., 2022) o las células humanas Hela (Roca-Pinilla et al. 2020). En resumen, en el estudio de (Rojas-Peña et al., 2022), evaluó la internalización de nanopartículas del antígeno G recombinante de Viremia primaveral de la carpa (SVCV) con el módulo de interferón gamma (SVCV-IFN) que mostró eficiencias del 100 y 90% en células ZFL. Por otra parte, (Vázquez et al., 2012), logró internalizar el 100% de los GFP dentro de las células Hela, en comparación a las 5, 26 y 56 % de internalización observada en esta tesis doctoral, utilizando RTS-11. Estas diferencias pueden explicarse por múltiples factores: tamaño celular, morfología de los cuerpos de inclusión formados, perfil de receptores de membrana y propiedades superficiales de cada nanoproteína. Si bien no se ha demostrado de forma directa cómo estas propiedades influyen en la internalización por células inmunes en peces, estudios previos indican que proteínas con mayor carácter hidrofóbico tienden a formar agregados de forma más temprana y estable, lo que podría condicionar cómo estos materiales son reconocidos e internalizados por las células del huésped (Wang et al., 2015; Gil-García et al., 2020). El perfil de reconocimiento por receptores celulares desempeña un papel clave en su inmunogenicidad. Torrealba et al. (2016) demostraron que los CI pueden internalizarse rápidamente en células inmunitarias mediante rutas de macropinocitosis. Esta vía de entrada permite que los CI accedan a compartimentos endosomales donde se localizan receptores

como TLR9, especializado en detectar ADN bacteriano con motivos CpG no metilado. La activación de TLR9 desencadena señales que culminan en la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-8 y COX-2, todas relevantes para una respuesta inmune innata efectiva en peces.

6.3 Capacidad inmunomoduladora de las nanoproteínas a nivel *in vitro*.

La capacidad inmunomoduladora de las nanoproteínas diseñadas en esta tesis se evidenció en la capacidad de inducir la expresión de genes clave involucrados en la presentación antigénica y coestimulación celular, como MHC-II, CD80/86 y CD83, en macrófagos derivados de la línea celular RTS-11. Estos genes son marcadores representativos de la activación de células presentadoras de antígeno (APCs) y su participación es crítica para el inicio de la respuesta inmune adaptativa en peces. El MHC-II, expresado principalmente en células dendríticas y linfocitos B, participa en la presentación de antígenos exógenos a linfocitos T CD4+, facilitando el reconocimiento y activación de células T colaboradoras (Xing et al., 2023). Por su parte, CD80/86, presente en la superficie de las APCs, entrega señales coestimuladoras esenciales que potencian la respuesta de linfocitos CD4+ y favorecen la polarización hacia respuestas de tipo Th1 o Th2 (Morales-Lange et al., 2021). Asimismo, CD83 es un marcador de maduración de APCs que actúa como proteína inmunorreguladora, estimulando la proliferación de células T vírgenes (Morales-Lange et al., 2021).

En el presente estudio, se observó que las nanoproteínas SkipZ y HopQ indujeron un aumento significativo en la expresión génica de *mhc-ii*, *cd80/86* y *cd83* en células RTS-11, siendo este efecto particularmente notorio con HopQ a 20 $\mu\text{g/mL}$ y SkipZ a 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ (figuras 10 y 12). Estos resultados indican que ambas nanoproteínas están siendo reconocidas como PAMPs por PRRs presentes en las APCs, lo que favorecería su maduración inmunológica. A partir de esta interacción se activarían rutas de señalización intracelular como MyD88/NF- κB o PI3K/Akt, desencadenando cascadas que culminan en la secreción de citoquinas proinflamatorias y la maduración de las APCs.

Por otro lado, PulseJ mostró una respuesta más heterogénea en la expresión génica de estas moléculas coestimuladoras, e incluso afectó significativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias (figura 11). Este comportamiento sugiere que algunas de las secuencias antigénicas incorporadas en PulseJ podrían tener un rol inmunomodulador limitado o incluso evasivo, posiblemente derivadas de proteínas de *P. salmonis* con bajo

potencial inmunoestimulante, lo que restringiría la capacidad de activación de APCs en esta línea celular RTS-11 y por ende, la inhibición de la cascada que activan citoquinas proinflamatorias.

Sin embargo, a nivel proteico, mediante inmunofluorescencia se constató la presencia detectada de los marcadores MHC-II, CD83 y CD80/86 en células RTS-11 estimuladas con las tres nanoproteínas, en comparación con el control negativo (agua). Esta detección indica que los eventos transcripcionales observados se podrían traducir en una activación funcional de las células presentadoras de antígenos (APCs), reflejando su capacidad de maduración y procesamiento antigénico.

Estos resultados son coherentes con lo reportado por Morales-Lange et al. (2021), quienes evidenciaron que el IFN- γ induce la sobreexpresión de estos marcadores inmunológicos en esplenocitos de salmón del Atlántico. Del mismo modo, Nombela et al. (2019) observaron que la exposición al VHSV en trucha arcoíris incrementa la expresión de MHC-I/II, CD83 y CD86, evidenciando una activación robusta del sistema inmune adaptativo. Asimismo, estímulos proinflamatorios como el LPS han sido asociados a una mayor expresión de estos marcadores a través de la activación de TLR4, resultando en una cascada señalizadora mediada por vías como PI3K/Akt y producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Sepulcre et al., 2009; Arranz et al., 2012; Lakho et al., 2020). En el presente estudio, el LPS fue usado como control positivo, generando una activación significativa de los mismos genes inmunitarios, lo que valida el modelo experimental.

En el estudio de (Puente-Marin et al., 2019) demostraron que los eritrocitos de trucha, a pesar de no ser fagocíticos, pueden internalizar cuerpos de inclusión y modular la expresión de genes inmunitarios. Por ejemplo, los cuerpos de inclusión de TNF α reducen la expresión de genes relacionados con la presentación de antígenos (como *cd83* y *mhcl*), mientras que los CI de la glicoproteína G del VHSV (Ibfrg16G-VHSV) activan genes involucrados en la respuesta antiviral, como *mx* y *mhcll*, y en la producción de citoquinas como *il6* y *il2*. Adicionalmente, Roca-Pinilla et al., (2022) demostraron que los HDPs estimulan la liberación de IL-1 β , TNF- α e IL-6, activando la respuesta inmune innata y favoreciendo la activación de linfocitos T. También se observó un aumento en la expresión de IL-10, lo que indica un control equilibrado de la inflamación para prevenir respuestas inmunes excesivas.

Estos antecedentes respaldan la hipótesis de que las nanoproteínas diseñadas en esta tesis, que incorporan secuencias antigénicas específicas del patógeno, pueden ser endocitadas por macrófagos en peces y desencadenar una respuesta inmune robusta. Este proceso implicaría la activación robusta de la presentación antigénica y la coestimulación necesaria para la activación de células T, particularmente linfocitos CD8+ y respuestas de tipo Th1. Estas respuestas son fundamentales para la producción de citoquinas como el IFN γ , que desempeña un papel clave en el control y la eliminación de *Piscirickettsia salmonis* (Serri et al., 2024).

6.4 Capacidad inmunomoduladora de las nanoproteínas a nivel *in vivo*

Grupos de estudios, sugieren que para eliminar patógenos intracelulares, es necesario activar una respuesta inmune de tipo celular mediada por linfocitos CD8+; y que esta regulación debe ser orquestada por linfocitos CD8+, la interleuquina 12 (IL-12) y el interferón gamma (IFN- γ) (Carril et al., 2024; Rozas-Serri et al., 2022; Rozas-Serri et al., 2024). En el caso del efecto modulador generado por la vacuna HopQ, se observa una respuesta proinflamatoria temprana significativa, observable un día después de la vacunación, con un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-12 en comparación al control (figura 18). Estas citoquinas son esenciales en la primera línea de defensa contra infecciones bacterianas. IL1 β y TNF α son conocidas por ser citoquinas pleiotrópicas clave es la respuesta temprana, secretadas cuando patógenos están circulando. Una función de IL-1 β es estimular el endotelio vascular y secretar IL-6, iniciando así la síntesis de proteínas y la respuesta de fase aguda (Pontigo et al., 2021). TNF- α , secretada por leucocitos, ejerce un mecanismo en la activación de los macrófagos, lo que resulta en estallidos respiratorios y fagocitosis (Hardie et al., 1994). Es más, TNF- α aumenta la fagocitosis y la quimiotaxis para inducir la expresión de IL-1 β e IL-8 (Whyte, 2007). IL-8, por su parte, es una quimioquina crucial en la atracción de neutrófilos y otros leucocitos al sitio de infección, lo que contribuye a una rápida respuesta inmunitaria, movilizandocélulas que pueden atacar y eliminar el patógeno. Además, IL-8 también interactúa con el receptor TLR5, lo que potencia la activación de otras citoquinas importantes, como IFN- γ (Rozas-Serri, 2022). Este comportamiento es comparable con lo observado durante infecciones por la cepa *P. salmonis* EM-90, en el cual también se observa un aumento en la expresión de estas citoquinas (Rozas-Serri et al., 2019). Esto sugiere que HopQ induce un perfil de respuesta que simula la inflamación generada por la infección bacteriana, lo cual es

prometedor en términos de activar una respuesta inmune hiperreactiva a una segunda estimulación por el mismo antígeno.

Por otra parte, HopQ también aumento fuertemente la expresión temprana de la citoquina antiinflamatoria, IL-10. Lo que nos indica que los salmones evitan respuestas exacerbadas y perjudiciales durante el proceso de vacunación, situación similar a la que ocurre durante las coinfecciones (Carril et al., 2024), siendo un efecto esperado durante el proceso de vacunación. Uno de los hallazgos más relevantes es la fuerte inducción de IFN- γ , una citoquina central en la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th1, que es fundamental para combatir infecciones intracelulares como las causadas por *P. salmonis*. El IFN- γ no solo potencia la actividad fagocítica de macrófagos y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como iNOS, sino que también tiene un efecto positivo en la expresión de genes relacionados con la activación de células T (Zhang et al., 2019). La sobreexpresión de iNOS observada a los 7 días post vacunación es consistente con la inducción de IFN- γ y subraya la importancia de esta molécula en la respuesta inmune antagónica hacia los patógenos intracelulares. iNOS cataliza la producción de óxido nítrico (NO), que es un agente antimicrobiano clave contra bacterias que residen dentro de las células del hospedador (Salim et al., 2016). Además, HopQ también moduló la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80/86, así como del MHC-II y CD83, que son cruciales para la presentación de antígenos y la activación de células T, sugiriendo un efecto ejercido por IFN- γ (Carril et al., 2024). Este aumento en la expresión de genes relacionados con la presentación de antígenos sugiere que HopQ no solo está activando una respuesta innata, sino también fomentando la presentación de antígenos a APC, siendo un paso de transición hacia una respuesta adaptativa, lo cual es crucial para generar memoria inmunológica y control a largo plazo del patógeno. Es interesante el comportamiento observado en la expresión de FOXP3 (factor de transcripción específico de la polarización de Treg), ya que demuestra un perfil asociado con inmunosupresión, lo que nos sugiere que se estaría potenciando la respuesta de tipo Th1.

En el ensayo *in vivo*, se observó un aumento en la expresión de IFN- γ durante los 14 días analizados en peces vacunados con SkipZ y HopQ. Aunque los efectos iniciales de IFN- γ fueron positivos en la modulación de la respuesta inmune, su producción prolongada podría estar generando una retroalimentación negativa. Este fenómeno podría limitar la activación eficiente de linfocitos citotóxicos CD8+, lo que comprometería la eficacia de la respuesta

inmunitaria adaptativa frente a la infección. Los genes T-BET y EOMES, ambos factores de transcripción esenciales para la diferenciación de linfocitos T CD8+ hacia un fenotipo citotóxico, disminuyen de manera significativa a medida que aumenta la producción de IFN- γ . Este fenómeno se ha observado tanto en la coinfección con los dos genogrupos de *P. salmonis* (Rozas-Serri et al., 2018; Szabo et al., 2000; Carril et al., 2024) como en los ensayos vacunales con HopQ. La reducción en la expresión de T-BET y EOMES, a pesar del aumento de IFN- γ , podría estar impidiendo la diferenciación efectiva de linfocitos T CD8+, lo que a su vez afecta la capacidad del sistema inmune para eliminar patógenos intracelulares. Esto es crítico, ya que los linfocitos T CD8+ juegan un papel central en la destrucción de células infectadas por medio de la liberación de perforina y granzimas, moléculas citotóxicas que inducen apoptosis en las células infectadas (Rozas-Serri et al., 2024).

Un aspecto notable de los resultados del ensayo *in vivo* con ambas vacunas es la falta de activación significativa de la respuesta inmune de tipo Th2, que está asociada con la producción de anticuerpos. Los análisis de inmunoglobulinas (Ig) no mostraron cambios significativos durante los 14 días posteriores a la vacunación de los dos prototipos, lo que sugiere que HopQ y SkipZ no inducen una respuesta humoral fuerte. Esto es coherente con la naturaleza intracelular de *P. salmonis*, que requiere una respuesta de tipo Th1 para ser controlada de manera eficaz (Carril et al., 2024). Sin embargo, esta observación también indica que la vacuna puede no ser suficiente para generar protección a largo plazo a través de la memoria inmunológica basada en anticuerpos, lo que podría limitar su efectividad en infecciones crónicas o recurrentes.

A diferencia de HopQ, la vacuna SkipZ no genera una respuesta inflamatoria inicial fuerte en el primer día post-vacunación, lo que sugiere una modulación más atenuada de la respuesta inmune. Este comportamiento refleja un posible reconocimiento inicial menos agresivo de la nanoproteína por parte de los macrófagos del riñón anterior. Lo que sugiere que SkipZ podría estar diseñando una respuesta más controlada o atenuada que no desencadene inflamación excesiva en las fases iniciales, lo que podría ser beneficioso para evitar daños colaterales en los tejidos del hospedador. A pesar de esto, para el día 7 y 14 post-vacunación (dpv), se observó un aumento significativo en la expresión de IL-12 e IFN- γ , lo que es clave para la polarización hacia una respuesta Th1, necesaria para combatir patógenos intracelulares como *P. salmonis* (Rozas-Serri et al., 2018; Rozas-Serri et al., 2024). IL-12, una citoquina esencial en la activación de la respuesta Th1, facilita la

producción de IFN- γ y la activación de linfocitos T CD8+ citotóxicos. Esto es fundamental para la eliminación de patógenos intracelulares, ya que IFN- γ también mejora la presentación de antígenos. Sin embargo, a pesar del incremento de IFN- γ , no se observó un aumento significativo en la expresión de marcadores de maduración de células dendríticas, como CD83, ni en la inducción de iNOS (figura 24), que es crucial para la producción de óxido nítrico (NO). La ausencia de este mecanismo sugiere que no se está eliminando el patógeno mediante la vía del NO, lo que puede limitar la efectividad de la respuesta inmunitaria en fases tempranas.

Otro aspecto clave es la supresión de los factores de transcripción T-BET y EOMES, ambos esenciales para la activación de linfocitos T CD8+ citotóxicos. La disminución de la expresión de estos genes, junto con la alta producción de IFN- γ , podría sugerir nuevamente un mecanismo de retroalimentación negativa que regula la inflamación excesiva (Szabo et al., 2000; Rozas-Serri et al., 2018)

En cuanto a la respuesta Th2, la vacuna SkipZ mostró una baja activación, lo que es coherente con la subexpresión de MHC-II y linfocitos T CD4+ en riñón anterior. Este comportamiento es comparable con lo observado en infecciones por *P. salmonis* y *R. salmoninarum*, donde la inhibición del MHC-II desvía la respuesta hacia la activación de linfocitos citotóxicos, exacerbando el daño tisular (Grayson et al., 2002; Rozas-Serri et al., 2018). La baja expresión de GATA3, un factor clave en la activación de la respuesta Th2 y la subsecuente activación de linfocitos B, y la limitada producción de Ig durante los 14 días del estudio confirman que la vacuna no induce una respuesta humoral fuerte.

Por otro lado, la activación de la respuesta Th2 fue mínima, sin embargo, la notable expresión de IL-4/13 sin un aumento concomitante de GATA3 sugiere que podría haber una regulación negativa de la diferenciación Th2 para evitar una activación excesiva de esta vía. Este control fino del sistema inmune parece ser crucial para evitar respuestas inflamatorias agudas o crónicas que podrían comprometer la homeostasis del hospedador, lo que pone de relieve la capacidad del sistema inmunitario del salmón para regular adecuadamente su respuesta ante la sobreproducción de citoquinas.

Bajo este contexto, uno de los principales desafíos identificados en este estudio fue la activación limitada de linfocitos CD8+ citotóxicos, células clave en la eliminación de infecciones intracelulares como las causadas por *Piscirickettsia salmonis*. Este hallazgo

sugiere la necesidad de optimizar las condiciones experimentales y los componentes de las formulaciones vacunales basadas en nanoproteínas (NPs). Futuras investigaciones deberían centrarse en ajustar las dosis de las NPs, ya que concentraciones subóptimas podrían no alcanzar la activación efectiva de los linfocitos CD8+. Además, la incorporación de adyuvantes más potentes podría potenciar significativamente esta respuesta. Adyuvantes como lipopolisacáridos (LPS), β -glucanos o combinaciones de inmunoestimulantes han mostrado su capacidad para aumentar la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-12, TNF α , IFN- γ) necesarias para la activación de linfocitos T CD8+ en peces teleósteos (Nombela et al., 2019; Sepulcre et al., 2020). La co-formulación de NPs con estos adyuvantes podría incrementar tanto la captación por células presentadoras de antígenos (APCs) como la activación subsiguiente de linfocitos CD8+.

Todos estos antecedentes sugieren que, para avanzar en una caracterización completa del contexto inmunológico inducido por las nanoproteínas (NPs), es esencial llevar a cabo estudios adicionales que evalúen su efectividad en ensayos de desafío frente a coinfecciones. Esto permitirá determinar si la inmunidad entrenada generada por estas vacunas es capaz de reducir significativamente la carga bacteriana y mejorar la coordinación inmunológica, promoviendo una respuesta más equilibrada y eficaz a largo plazo frente a ambos genogrupos del patógeno.

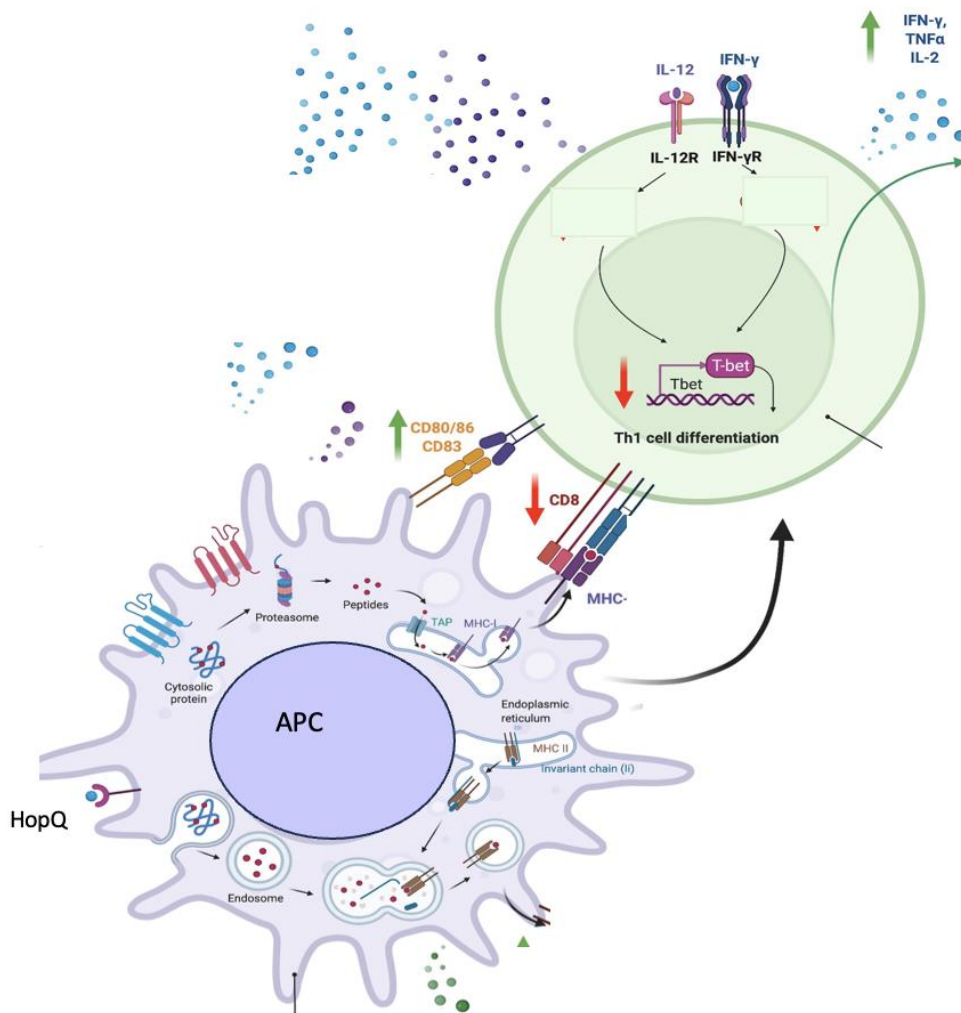


Figura 24. Esquema del procesamiento antigénico y activación de linfocitos T CD8+ y diferenciación hacia el perfil Th1, inducido por la internalización de proteínas de *Piscirickettsia salmonis* en células presentadoras de antígenos (APCs). La imagen ha sido adaptada Rozas-Serri et al. (2022). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.856896>

7 Conclusiones

Esta tesis doctoral demostró el potencial de las nanoproteínas multiepitópicas como una alternativa innovadora para el desarrollo de vacunas dirigidas contra *Piscirickettsia salmonis*, combinando estrategias de inmunología comparada y biotecnología estructural. Se diseñaron y produjeron cuatro nanoproteínas quiméricas (HopQ, SkipZ, Hoptech y PulseJ), generadas como nanoproteínas y evaluadas *in vitro* en macrófagos de salmón. Los resultados evidenciaron que SkipZ y HopQ inducen de manera consistente la activación de genes clave involucrados en la presentación antigénica y en la producción de citoquinas proinflamatorias sugiriendo su reconocimiento por PRRs y su capacidad para activar células presentadoras de antígenos y generar señales coestimuladoras. En contraste, PulseJ mostró un perfil más heterogéneo, posiblemente asociado a la naturaleza inmunomoduladora de los epítomos seleccionados.

Los resultados del ensayo *in vivo* evidencian que las nanoproteínas HopQ y SkipZ, como prototipos vacunales, son capaces de modular tempranamente la respuesta inmune de tipo celular en salmón del Atlántico, induciendo la expresión sostenida de citoquinas pleiotrópicas como IFN- γ e IL-12,. Este perfil es compatible con una respuesta Th1, clave para enfrentar patógenos intracelulares. Sin embargo, se observó una baja activación de linfocitos CD8+ y una escasa respuesta humoral, lo que sugiere que la inmunoestimulación inicial no fue suficiente para consolidar una respuesta adaptativa completa. Estos hallazgos reflejan que la vacunación con estas nanoproteínas, si bien activa componentes claves de la inmunidad y orquesta una respuesta proinflamatoria controlada, requiere optimización para inducir efectores celulares con mayor capacidad citotóxica y memoria inmunológica a largo plazo.

8 RECOMENDACIONES

Las recomendaciones para esta tesis doctoral podrían centrarse en varios aspectos clave que permitan avanzar en el desarrollo de vacunas más efectivas para el control de *Piscirickettsia salmonis* en salmones, basándose en los hallazgos actuales

- Exploración de nuevas formulaciones: A partir de los resultados obtenidos, sería interesante investigar la posibilidad de modificar las características estructurales y físicas de las nanoproteínas, como el tamaño y la hidrofobicidad, para mejorar su capacidad de captación celular por macrófagos.
- Evaluar la captación de las nanoproteínas en más de una línea celular, como macrófagos derivados del riñón anterior (HSK-1) o cultivo primario. Esto proporcionará una visión más completa de la interacción entre las nanoproteínas y el sistema inmune.
- Analizar la expresión de marcadores adicionales como MHC-I y moléculas coestimuladoras (CD40, CD86) para confirmar la activación completa de las células presentadoras de antígenos (APCs).
- Realiza pruebas específicas para evaluar la activación de linfocitos CD8+ y su capacidad de inducir apoptosis en células objetivo, utilizando marcadores como perforina y granzima B.
- Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en macrófagos, ya que esta es una respuesta clave frente a infecciones intracelulares.
- Evaluar la estabilidad de las nanoproteínas en condiciones simuladas de pH y temperatura para determinar su resistencia a ambientes fisiológicos y si liberan antígenos de manera controlada.
- Probar combinaciones de nanoproteínas con adyuvantes como oliosos para mejorar la captación y la activación de células inmunitarias.
- Aumentar el número de réplicas biológicas y técnicas para fortalecer la robustez estadística de los resultados.
- Explorar la eliminación de LPS presente como trazas de arrastres en la formulación, ya que su presencia complicaría la aprobación como producto biológico por parte de SAG.

NOMENCLATURA

ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario
ARN: Ácido Ribonucleico
Am: Ampicilina
BSA: Suero Albumino Bovino
CD80: Cúmulo de Diferenciación 80
CD80/86: Cúmulo de Diferenciación 80/86
CD83: Cúmulo de Diferenciación 83
CD86: Cúmulo de Diferenciación 86
Cq: Ciclo de cuantificación
Da: Dalton
CDs: Células Dendríticas
dNTP: Desoxirribonucleótidos Trifosfato
OD: Densidad Óptica
ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
FACS: Clasificación de células activadas por fluorescencia
Foxp3: Forkhead box P3
FSC-A: Forward Scatter-Área
Gata3: GATA Binding Protein 3
GB: Base de datos GenBank
HKL: Cultivo primario de Leucocitos de Riñón cefálico
HRP: Peróxidasa de Rábano
IFN γ : Interferón gamma
IgM: Inmunoglobulina de tipo G
IL-1 β : Interleuquina 1 beta
IL-8: Interleuquina 8
IL-10: Interleuquina 10
IL-12: Interleuquina 12
IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa: kilo Dalton

L15: Leibovitz L-15 Medio de cultivo
LB: Medio Luria Bertani
MHC I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I
MHC-II : Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II
Mφ: Macrófago
NF-kB Factor nuclear kappa beta
ng µL: nano gramo por microlitro
NK: Natural Killer
nm: nanómetro
PAMP's: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBS: Tampón Fosfato Salino
PCR: Reacción de la Polimerasa en Cadena
PPRs: Receptor de Reconocimiento de Patrones
RefSeq: Base de datos de Secuencias de Referencia
SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico
SERNAPESCA: Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura
SRS: Septicemia Rickettsial del Salmón
T-bet: T-box transcription factor
TCR: Receptor de Células T
Th1: Célula T colaboradora de tipo 1
Th2: Célula T colaboradora de tipo 2
Th17: Célula T colaboradora de tipo 17
TLR5: Receptor Tipo-toll 5
TNFα: Factor de Necrosis Tumoral alfa
Treg: Célula T reguladora

REFERENCIAS

- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 210-214. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>
- Aghaiypour, K., & Teymourpour, R. (2018). " High-level Expression of Tetanus Toxin Fragment C in Escherichia coli". In (Vol. 73 (1), pp. 27–38). *Archives of Razi Institute*.
- Alarcon, P., Espinosa, G., Millan, C., Saravia, J., Quinteros, V., Enriquez, R.,...Morera, F. J. (2021). Piscirickettsia salmonis-Triggered Extracellular Traps Formation as an Innate Immune Response of Atlantic Salmon-Derived Polymorphonuclear Neutrophils. *Biology-Basel*, 10(3), Article 206. <https://doi.org/10.3390/biology10030206>
- Alsowayeh, N., & Albutti, A. (2022). Designing a novel chimeric multi-epitope vaccine against Burkholderia pseudomallei, a causative agent of melioidosis. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.945938>
- Alvarez CA, Guzmán F, Cárdenas C, Marshall SH, Mercado L. Antimicrobial activity of trout hepcidin. *Fish Shellfish Immunol*. 2014;41: 93–101. pmid:24794583
- Alvarez, C. A., Gomez, F. A., Mercado, L., Ramirez, 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), Article e0163943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163943>
- Aoki, H., Ahsan, M. N., & Watabe, S. (2003). Heterologous expression in Pichia pastoris and single-step purification of a cysteine proteinase from northern shrimp. *Protein Expression and Purification*, 31(2), 213-221. [https://doi.org/10.1016/s1046-5928\(03\)00196-7](https://doi.org/10.1016/s1046-5928(03)00196-7)
- Aravena, P., Pulgar, R., Ortiz-Severín, J., Maza, F., Gaete, A., Martínez, S.,...Cambiázo, V. (2020). PCR-RFLP Detection and Genogroup Identification of Piscirickettsia salmonis in Field Samples. *Pathogens*, 9(5), 358. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050358>
- Arranz, A., Doxaki, C., Vergadi, E., Martinez De La Torre, Y., Vaporidi, K., Lagoudaki, E. D.,...Tsatsanis, C. (2012). Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), 9517-9522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119038109>
- Arriagada, G. (2019). Caligus rogercresseyi infestation is associated with Piscirickettsia salmonis attributed mortalities in farmed salmonids in Chile. In C. Hamilton-West (Ed.), (pp. 171:104771). *Prev Veterinary Med*.
- Assefa, A., & Abunna, F. (2018). Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. *Veterinary Medicine International*, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., Dejongh, M., Disz, T., Edwards, R. A.,...Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>

- Barria, A., Marín-Nahuelpi, R., Cáceres, P., López, M. E., Bassini, L. N., Lhorente, J. P., & Yáñez, J. M. (2019). Single-Step Genome-Wide Association Study for Resistance to *Piscirickettsia salmonis* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 9(11), 3833-3841. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400204>
- Bassity, E., & Clark, T. G. (2012). Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Plos One*, 7(3), Article e33196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033196>
- Benkert, P., Kunzli, M., & Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Research*, 37, W510-W514. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp322>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>
- Bill, R. M. (2015). Recombinant protein subunit vaccine synthesis in microbes: a role for yeast? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(3), 319-328. <https://doi.org/10.1111/jphp.12353>
- Bomberger, J. M., MacEachran, D. P., Coutermarsh, B. A., Ye, S. Y., O'Toole, G. A., & Stanton, B. A. (2009). Long-Distance Delivery of Bacterial Virulence Factors by *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Vesicles. *Plos Pathogens*, 5(4), Article e1000382. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000382>
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J.,...Xia, F. F. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5, Article 8365. <https://doi.org/10.1038/srep08365>
- Bui, T. B. H., Milla, S., Gillardin, V., Phuong, N. T., & Kestemont, P. (2013). In vivo effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on regulation of immune response and protein expression in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 34(1), 339-347. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.025>
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dolz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15(7), 1917-1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>
- Calis, J. J. A., Maybeno, M., Greenbaum, J. A., Weiskopf, D., De Silva, A. D., Sette, A.,...Peters, B. (2013). Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity. *PLoS Computational Biology*, 9(10), e1003266. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003266>
- Cano-Garrido, O., Rodriguez-Carmona, E., Diez-Gil, C., Vazquez, E., Elizondo, E., Cubarsi, R.,...Garcia-Fruitos, E. (2013). Supramolecular organization of protein-releasing functional amyloids solved in bacterial inclusion bodies. *Acta Biomaterialia*, 9(4), 6134-6142. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.033>
- Carril, G. (2023 Oct 25). Cohabitation of *Piscirickettsia salmonis* genogroups (LF-89 and EM-90): synergistic effect on growth dynamics. In M. L. a. H. S. Hanne C. Winther-Larsen (Ed.), (Vol. 13): *Frontiers in cellular and infection microbiology*.

- Caruffo, M., Vidal, S., Santis, L., Siel, D., Perez, O., Huenchullan, P. R., & Saenz, L. (2021). Effectiveness of a proteoliposome-based vaccine against salmonid rickettsial septicaemia in *Oncorhynchus mykiss*. *Veterinary Research*, 52(1), Article 111. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00982-2>
- Chan, Y. H., Cheng, C. H. K., & Chan, K. M. (2003). Recombinant goldfish growth hormones (gfGH-I and -II) expressed in *Escherichia coli* have similar biological activities. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 135(4), 613-624. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(03\)00143-0](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(03)00143-0)
- Chang, K. Y., & Yang, J.-R. (2013). Analysis and Prediction of Highly Effective Antiviral Peptides Based on Random Forests. *PLoS ONE*, 8(8), e70166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070166>
- Chen, T., Dong, G. F., Zhang, S. Q., Zhang, X. C., Zhao, Y. J., Cao, J. M., Wu, Q. (2020). Effects of iron on the growth, biofilm formation and virulence of *Klebsiella pneumoniae* causing liver abscess. *Bmc Microbiology*, 20(1), Article 36. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01727-5>
- Consejo nacional del salmón Chile. (2022). *Informe de Exportaciones de Salmón y Trucha, cierre año 2022*.
- Correa, K., Lhorente, J. P., Lopez, M. E., Bassini, L., Naswa, S., Deeb, N., Yanez, J. M. (2015). Genome-wide association analysis reveals loci associated with resistance against *Piscirickettsia salmonis* in two Atlantic salmon (*Salmo salar*) chromosomes. *Bmc Genomics*, 16, Article 854. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2038-7>
- Costello, M. J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology*, 22(10), 475-483. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.006>
- Céspedes, M. V., Fernández, Y., Unzueta, U., Mendoza, R., Seras-Franzoso, J., Sánchez-Chardi, A.,... Villaverde, A. (2016). Bacterial mimetics of endocrine secretory granules as immobilized in vivo depots for functional protein drugs. *Scientific Reports*, 6(1), 35765. <https://doi.org/10.1038/srep35765>
- Dalmo, R. A., Ingebrigtsen, K., & Bogwald, J. (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 20(4), 241-273. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00302.x>
- Dautremepuits, C., Fortier, M., Croisetiere, S., Belhumeur, P., & Fournier, A. (2006). Modulation of juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*) cellular immune system after *Aeromonas salmonicida* challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110(1-2), 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.09.008>
- Delany, I., Rappuoli, R., & Seib, K. L. (2013). Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(5), a012476. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012476>
- de Marco, A. (2013). Recombinant polypeptide production in *E. coli*: towards a rational approach to improve the yields of functional proteins. *Microbial Cell Factories*, 12, Article 101. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-101>
- de Marco, A., Ferrer-Miralles, N., Garcia-Fruitos, E., Mitraki, A., Peternel, S., Rinas, U.,... Villaverde, A. (2019). Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. *Fems Microbiology Reviews*, 43(1), 53-72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy038>

- Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2007). Vaxijen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *Bmc Bioinformatics*, 8, Article 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>
- Dramsi, S., & Cossart, P. (1998). Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annual review of cell and developmental biology*, 14, 137–166. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.137>
- Eppinger, M., McNair, K., Zogaj, X., Dinsdale, E. A., Edwards, R. A., & Klose, K. E. (2013). Draft Genome Sequence of the Fish Pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Genome Announcements*, 1(6), e00926-00913-e00926. <https://doi.org/10.1128/genomea.00926-13>
- Estevez, R. A., Mardones, F. O., Alamos, F., Arriagada, G., Carey, J., Corre, C.,...Geljich, S. (2019). Eliciting expert judgements to estimate risk and protective factors for *Piscirickettsiosis* in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, 507, 402-410. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.028>
- Evensen, O. (2016). Immunization Strategies against *Piscirickettsia salmonis* Infections: Review of Vaccination Approaches and Modalities and Their Associated Immune Response Profiles. *Frontiers in Immunology*, 7, Article 482. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00482>
- Figueroa, A., M. Santarém, M., & Novoa, B. (1998). Influence of the sequence of administration of β -glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64(1), 59-68. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(98\)00114-7](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(98)00114-7)
- Figueroa, C., Bustos, P., Torrealba, D., Dixon, B., Soto, C., Conejeros, P., & Gallardo, J. A. (2017). Coinfection takes its toll: Sea lice override the protective effects of vaccination against a bacterial pathogen in Atlantic salmon. *Scientific Reports*, 7, Article 17817. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18180-6>
- Figueroa, C., Veloso, P., Espin, L., Dixon, B., Torrealba, D., Elalfy, I. S.,...Gallardo, J. A. (2020). Host genetic variation explains reduced protection of commercial vaccines against *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon. *Scientific Reports*, 10(1), Article 18252. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70847-9>
- Fryer, J. L., & Hedrick, R. P. (2003). *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of Fish Diseases*, 26(5), 251-262. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00460.x>
- Fuentealba, P., Latorre, Y., González, E., Martínez, I., Soto, C., & Altamirano, C. (2020). Engineering a defined culture medium to grow *Piscirickettsia salmonis* for its use in vaccine formulations. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 47(3), 299–309. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02265-9>
- García-Fruitos, E., Rodríguez-Carmona, E., Díez-Gil, C., Ferraz, R. M., Vázquez, E., Corchero, J. L.,...Villaverde, A. (2009). Surface Cell Growth Engineering Assisted by a Novel Bacterial Nanomaterial. *Advanced Materials*, 21(42), 4249-+. <https://doi.org/10.1002/adma.200900283>
- García-Fruitos, E., Vázquez, E., Díez-Gil, C., Corchero, J. L., Seras-Franzoso, J., Ratera, I.,...Villaverde, A. (2012). Bacterial inclusion bodies: making gold from waste. *Trends in Biotechnology*, 30(2), 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.09.003>

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784-3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>
- Georgiou, G., & Valax, P. (1999). Isolating inclusion bodies from bacteria. *Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates*, 309, 48-58.
- Gifre-Renom, L., Ugarte-Berzal, E., Martens, E., Boon, L., Cano-Garrido, O., Martinez-Nunez, E.,...Aris, A. (2020). Recombinant Protein-Based Nanoparticles: Elucidating Their Inflammatory Effects In Vivo and Their Potential as a New Therapeutic Format. *Pharmaceutics*, 12(5), Article 450. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050450>
- Gil-García, M., & Ventura, S. (2020). Coiled-coil inspired functional inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*, 19(1), Article ? (publicación en 2020 como prueba de concepto). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01375-4>
- Gomez, F. A., Tobar, J. A., Henriquez, 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), Article e54934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054934>
- Gonzalez, M. P., Munoz, J. L. P., Valerio, V., & Vargas-Chacoff, L. (2016). Effects of the ectoparasite *Caligus rogercresseyi* on *Salmo salar* blood parameters under farm conditions. *Aquaculture*, 457, 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.027>
- Gonzalez-Montalban, N., Garcia-Fruitos, E., & Villaverde, A. (2007). Recombinant protein solubility - does more mean better? *Nature Biotechnology*, 25(7), 718-720. <https://doi.org/10.1038/nbt0707-718>
- González-Stegmaier, R., Peña, A., Villarroel-Espíndola, F., Aguila, P., Oliver, C., MacLeod-Carey, D., Rozas-Serri, M., Enriquez, R., & Figueroa, J. (2021). Full recombinant flagellin B from *Vibrio anguillarum* (rFLA) and its recombinant D1 domain (rND1) promote a pro-inflammatory state and improve vaccination against *P. salmonis* in Atlantic salmon (*S. salar*). *Developmental and comparative immunology*, 117, 103988. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103988>
- Gu, P. L., Yu, K. L., & Chan, S. M. (2000). Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *Febs Letters*, 472(1), 122-128. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01420-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01420-4)
- Guerrero-Olazarán, M., Cab-Barrera, E. L., Galán-Wong, L. J., & Viader-Salvadó, J. M. (2004). " *Biología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura*" (227201544). <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/209>
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Raghava, G. P. S., & Open Source Drug, D. (2013). In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *Plos One*, 8(9), Article e73957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2016). Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1089-1098. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084264>
- Harshitha, M., D'souza, R., Akshay, S.D. et al. Oral administration of recombinant outer membrane protein A-based nanovaccine affords protection against *Aeromonas*

- hydrophila* in zebrafish. *World J Microbiol Biotechnol* 40, 250 (2024).
<https://doi.org/10.1007/s11274-024-04059-y>
- Happold, J., Sadler, R., Meyer, A., Hillman, A., Cowled, B., Mackenzie, C.,...Cameron, A. (2020). Effectiveness of vaccination for the control of salmonid rickettsial septicaemia in commercial salmon and trout farms in Chile. *Aquaculture*, 520, Article 734968.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734968>
- Herrera, V., Olavarría, N., Saavedra, J., Yuivar, Y., Bustos, P., Almarza, O., Mancilla, M., 2022. Complete Lipopolysaccharide of *Piscirickettsia salmonis* Is Required for Full Virulence in the Intraperitoneally Challenged Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12.. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.845661>.
- Hunt, D., Wilson, J. E., Weih, K. A., Ishido, S., Harton, J. A., Roche, P. A., & Drake, J. R. (2012). Francisella tularensis Elicits IL-10 via a PGE2-Inducible Factor, to Drive Macrophage MARCH1 Expression and Class II Down-Regulation. *Plos One*, 7(5), Article e37330.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037330>
- Husson, J., Chemin, K., Bohineust, A., HIVROZ, C., Henry, N., 2011. Force Generation upon T Cell Receptor Engagement. *PLOS ONE* 6, e19680.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019680>
- Jakob, E., Stryhn, H., Yu, J., Medina, M. H., Rees, E. E., Sanchez, J., & St-Hilaire, S. (2014). Epidemiology of Piscirickettsiosis on selected Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) salt water aquaculture farms in Chile. *Aquaculture*, 433, 288-294. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.018>
- Ji, J., Torrealba, D., Thwaite, R., Gomez, A. C., Parra, D., & Roher, N. (2019). Nanostructured TNF alpha protein targets the zebrafish (*Danio rerio*) immune system through mucosal surfaces and improves the survival after *Mycobacterium marinum* lethal infection. *Aquaculture*, 510, 138-149.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.050>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A SIMPLE METHOD FOR DISPLAYING THE HYDROPHATHIC CHARACTER OF A PROTEIN. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., & Xu, J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*, 7(8), 1511-1522. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.085>
- Labra, A., Arredondo-Zelada, O., Flores-Herrera, P., Marshall, S. H., & Gomez, F. A. (2016). In silico identification and characterization of putative Dot/Icm secreted virulence effectors in the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Microbial Pathogenesis*, 92, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.12.002>
- Labra, A., Bravo, S., & Marshall, S. H. (2020). Defining the role of *Caligus rogercresseyi* in transmission and spreading of *Piscirickettsia salmonis*. *Aquaculture*, 528, Article 735489. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735489>

- Laing, K. J., & Hansen, J. D. (2011). Fish T cells: Recent advances through genomics. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1282-1295. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.004>
- Lakho, S. A., Haseeb, M., Huang, J., Yang, Z., Hasan, M. W., Aleem, M. T., Li, X. (2020). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Eimeria acervulina* modulates the functions of chicken dendritic cells to boost Th1 type immune response and stimulates autologous CD4+ T cells differentiation in-vitro. *Veterinary Research*, 51(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00864-z>
- Larenas, J. J., Bartholomew, J., Troncoso, O., Fernandez, S., Ledezma, H., Sandoval, N., Smith, P. (2003). Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and in vitro study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(1), 25-30. <https://doi.org/10.3354/dao056025>
- Levipan, H. A., Irgang, R., Yanez, A., & Avendano-Herrera, R. (2020). Improved understanding of biofilm development by *Piscirickettsia salmonis* reveals potential risks for the persistence and dissemination of piscirickettsiosis. *Scientific Reports*, 10(1), Article 12224. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68990-4>
- Lhorente, J. P., Gallardo, J. A., Villanueva, B., Carabano, M. J., & Neira, R. (2014). Disease Resistance in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Coinfection of the Intracellular Bacterial Pathogen *Piscirickettsia salmonis* and the Sea Louse *Caligus rogercresseyi*. *Plos One*, 9(4), Article e95397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095397>
- Liovic, M., Ozir, M., Zavec, A. B., Peternel, S., Komel, R., & Zupancic, T. (2012). Inclusion bodies as potential vehicles for recombinant protein delivery into epithelial cells. *Microbial Cell Factories*, 11, Article 67. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-67>
- Liu, W., Xing, J., Tang, X., Sheng, X., Chi, H., Zhan, W., 2022. Characterization of Co-Stimulatory Ligand CD80/86 and Its Effect as a Molecular Adjuvant on DNA Vaccine Against *Vibrio anguillarum* in Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Frontiers in Immunology* 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.881753>
- Liu, Z., Zheng, J., Lin, X., Guo, X., Lin, X., & Li, J. (2021). A multi-epitope subunit vaccine providing broad cross-protection against diverse serotypes of *Streptococcus suis*. *Frontiers in Immunology*, 12, 736184. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.736184>
- Liu, M., Liu, H., Zhang, Y., & Ma, Y. (2024). A multi-epitope subunit vaccine providing broad cross-protection against diverse serotypes of *Streptococcus suis*. *Biology*, 13(3), 914. <https://doi.org/10.3390/biology13030914>
- Long, A., Goodall, A., & Jones, S. R. M. (2021). Development of a “*Piscirickettsia salmonis* immersion challenge model to investigate the comparative susceptibility of three salmon species”. *Journal of Fish Diseases*, 44(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/jfd.13261>
- López-Cano, A., Ferrer-Miralles, N., Sánchez, J., Carratalá, J.V., Rodríguez, X.R., Ratera, I., Guasch, J., Pich, O.Q., Bierge, P., Garcia-De-La-Maria, C., Miro, J.M., Garcia-Fruitós, E., Arís, A., 2023. A Novel Generation of Tailored Antimicrobial Drugs Based on Recombinant Multidomain Proteins. *Pharmaceutics* 15, 1068. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041068>
- Lugo-Villarino, G., Balla, K. M., Stachura, D. L., Banuelos, K., Werneck, M. B. F., & Traver, D. (2010). Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), 15850-15855. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000494107>
- Ma, K., Bao, Q., Wu, Y., Chen, S., Zhao, S., Wu, H., Fan, J., 2020. Evaluation of Microalgae as Immunostimulants and Recombinant Vaccines for Diseases Prevention and Control in Aquaculture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.590431>
- Magnan, C. N., Randall, A., & Baldi, P. (2009). SOLpro: accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics*, 25(17), 2200-2207. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp386>
- 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>
- Maiti, B., Dubey, S., Munang'Andu, H.M., Karunasagar, I., Karunasagar, I., Evensen, Ø., 2020. Application of Outer Membrane Protein-Based Vaccines Against Major Bacterial Fish Pathogens in India. *Frontiers in Immunology* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01362>
- Mardones, J. I., Paredes, J., Godoy, M., Suárez, R., Norambuena, L., Vargas, V., Fuenzalida, G., Pinilla, E., Artal, O., Rojas, X., Dorantes-Aranda, J. J., Lee Chang, K. J., Anderson, D. M., & Hallegraeff, G. M. (2021). *Disentangling the environmental processes responsible for the world's largest farmed fish-killing harmful algal bloom: Chile, 2016*. *Science of the Total Environment*, 766, 144383. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144383>
- Martinez, D., Diaz-Ibarrola, D., Vargas-Lagos, C., Oyarzun, R., Pontigo, J. P., Munoz, J. L. P., Vargas-Chacoff, L. (2018). Immunological response of the Sub-Antarctic Nototheniid fish *Eleginops maclovinus* injected with two strains of *Piscirickettsia salmonis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 75, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.012>
- Martinez-Alonso, M., Gonzalez-Montalban, N., Garcia-Fruitos, E., & Villaverde, A. (2009). Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*, 8, Article 4. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-4>
- Marty, G. D., Saksida, S. M., & Quinn, T. J. (2010). Relationship of farm salmon, sea lice, and wild salmon populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(52), 22599-22604. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009573108>
- Mauel, M. J., Ware, C., & Smith, P. A. (2008). Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(2), 213-214. <https://doi.org/10.1177/104063870802000211>
- Melamed, P., Gong, Z. Y., Fletcher, G., & Hew, C. L. (2002). The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture*, 204(3-4), 255-269. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00838-9](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00838-9)
- Meyer, A., Burroughs, A., Sadler, R., Happold, J., Cowled, B., Mackenzie, C., Cameron, A. (2019). Quantifying the effects of sea lice burden and lice bathing treatments on salmonid rickettsial septicaemia in commercial salmon and trout farms in Chile. *Aquaculture*, 513, Article 734411. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734411>

- Millar, A. D., Tapia, P., Gómez, F. A., Marshall, S. H., Fuentes, D. E., & Valdés, J. H. (2018). *Draft genomes and reference transcriptomes extend the coding potential of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis**. **Electronic Journal of Biotechnology**, **33**.
<https://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/2018.04.002>
- Morales-Lange, B., Ramirez-Cepeda, F., Schmitt, P., Guzman, F., Lagos, L., Overland, M., Mercado, L. (2021). Interferon Gamma Induces the Increase of Cell-Surface Markers (CD80/86, CD83 and MHC-II) in Splenocytes From Atlantic Salmon. *Frontiers in Immunology*, *12*, Article 666356. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.666356>
- Moxon, R., Reche, P. A., & Rappuoli, R. (2019). Editorial: Reverse Vaccinology. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02776>
- Mulero, I., Garcia-Ayala, A., Meseguer, J., & Mulero, V. (2007). Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. *Aquaculture*, *268*(1-4), 244-250. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.046>
- Munang'andu, H. M. (2018). Intracellular Bacterial Infections: A Challenge for Developing Cellular Mediated Immunity Vaccines for Farmed Fish. *Microorganisms*, *6*(2), Article 33. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020033>
- Murray, A. G. (2013). Epidemiology of the spread of viral diseases under aquaculture. *Current Opinion in Virology*, *3*(1), 74-78. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.002>
- Naito, T., Tanaka, H., Naoe, Y., & Taniuchi, I. (2011). Transcriptional control of T-cell development. *International Immunology*, *23*(11), 661-668.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxr078>
- Nombela, I., Requena-Platek, R., Morales-Lange, B., Chico, V., Puente-Marin, S., Ciordia, S., Ortega-Villaizan, M. (2019). Rainbow Trout Red Blood Cells Exposed to Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Up-Regulate Antigen-Processing Mechanisms and MHC I&II, CD86, and CD83 Antigen-presenting Cell Markers. *Cells*, *8*(5), 386.
<https://doi.org/10.3390/cells8050386>
- Nourdin-Galindo, G., Sanchez, P., Molina, C. F., Espinoza-Rojas, D. A., Oliver, C., Ruiz, P.,...Yanez, A. J. (2017). Comparative Pan-Genome Analysis of *Piscirickettsia salmonis* Reveals Genomic Divergences within Genogroups. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, Article 459. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00459>
- Ohtake, S., & Arakawa, T. (2013). Recombinant Therapeutic Protein Vaccines. *Protein and Peptide Letters*, *20*(12), 1324-1344.
<https://doi.org/10.2174/092986652012131112122245>
- Olivares, J., & Marshall, S. H. (2010). Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a fallowing period in salmon farms. *Journal of Fish Diseases*, *33*(3), 261-266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01119.x>
- Oliver, C., Hernandez, M. A., Tandberg, J. I., Valenzuela, K. N., Lagos, L. X., Haro, R. E., Yanez, A. J. (2017). The Proteome of Biologically Active Membrane Vesicles from *Piscirickettsia salmonis* LF-89 Type Strain Identifies Plasmid-Encoded Putative Toxins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, Article 420.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00420>

- Oliver, C., Valenzuela, K., Hernandez, M., Sandoval, R., Haro, R. E., Avendano-Herrera, R., Yanez, A. J. (2016). Characterization and pathogenic role of outer membrane vesicles produced by the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis* under in vitro conditions. *Veterinary Microbiology*, 184, 94-101.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.09.012>
- Omasits, U., Ahrens, C. H., Muller, S., & Wollscheid, B. (2014). Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, 30(6), 884-886. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607>
- Ortiz-Severin, J., Travisany, D., Maass, A., Chavez, F. P., & Cambiazo, V. (2019). *Piscirickettsia salmonis* Cryptic Plasmids: Source of Mobile DNA and Virulence Factors. *Pathogens*, 8(4), Article 269. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040269>
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T.,...Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D206-D214.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>
- Parra, D., Reyes-Lopez, F. E., & Tort, L. (2015). Mucosal immunity and B cells in teleosts: effect of vaccination and stress. *Frontiers in Immunology*, 6, Article 354.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00354>
- Perez-Sanchez, T., Mora-Sanchez, B., & Balcazar, 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>
- Pesarrodona, M., Jauset, T., Diaz-Riascos, Z. V., Sanchez-Chardi, A., Beaulieu, M. E., Seras-Franzoso, J.,...Vazquez, E. (2019). Targeting Antitumoral Proteins to Breast Cancer by Local Administration of Functional Inclusion Bodies. *Advanced Science*, 6(18), Article 1900849. <https://doi.org/10.1002/advs.201900849>
- Pleizier, N. K., Algera, D., Cooke, S. J., & Brauner, C. J. (2020). A meta-analysis of gas bubble trauma in fish. *Fish and Fisheries*, 21(6), 1175-1194.
<https://doi.org/10.1111/faf.12496>
- Pontigo, J. P., Espinoza, C., Hernandez, M., Nourdin, G., Oliver, C., Avendano-Herrera, R.,...Yanez, A. J. (2021). Protein-Based Vaccine Protect Against *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Immunology*, 12, Article 602689.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.602689>
- Pradeepkiran, J. A. (2019). Aquaculture role in global food security with nutritional value: a review. *Translational Animal Science*, 3(2), 903-910.
<https://doi.org/10.1093/tas/txz012>
- Prechtel, A. T., & Steinkasserer, A. (2007). CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Archives of Dermatological Research*, 299(2), 59-69. <https://doi.org/10.1007/s00403-007-0743-z>
- Price, D., Ibarra, R., Sanchez, J., & St-Hilaire, S. (2017). A retrospective assessment of the effect of fallowing on piscirickettsiosis in Chile. *Aquaculture*, 473, 400-406.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.034>
- Pridgeon, J. W., Klesius, P. H., & Shoemaker, C. A. (2020). Novel chimeric multiepitope vaccine for streptococcosis disease in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). *Scientific Reports*, 10(1), 14615. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71403-6>

- Puente-Marin, S., Thwaite, R., Mercado, L., Coll, J., Roher, N., & Ortega-Villaizan, M. D. M. (2019). Fish Red Blood Cells Modulate Immune Genes in Response to Bacterial Inclusion Bodies Made of TNF α and a G-VHSV Fragment. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01055>
- Pulgar, R., Hodar, C., Travisany, D., Zuniga, A., Dominguez, C., Maass, A., Cambiazo, V. (2015). Transcriptional response of Atlantic salmon families to *Piscirickettsia salmonis* infection highlights the relevance of the iron-deprivation defence system. *Bmc Genomics*, *16*, Article 495. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1716-9>
- Puncham, N., Rodkhum, C., Kondo, H., Hirono, I., & Sakai, M. (2020). Novel chimeric multiepitope vaccine for streptococcosis disease in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). *Scientific Reports*, *10*(1), 298. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57283-0>
- Qi, X. M., Lu, Q., Hu, J. P., & Xiong, S. D. (2019). Spontaneous C-cleavage of a truncated intein as fusion tag to produce tag-free VP1 inclusion body nanoparticle vaccine against CVB3-induced viral myocarditis by the oral route. *Microbial Cell Factories*, *18*, Article 66. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1115-z>
- Ramirez, R., Gomez, 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>
- Rappuoli R. (2000). Reverse vaccinology. *Current opinion in microbiology*, *3*(5), 445–450. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00119-3)
- Reche, P. A., Glutting, J. P., & Reinherz, E. L. (2002). Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs. *Human Immunology*, *63*(9), 701-709, Article Pii s0198-8859(02)00432-9. [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(02\)00432-9](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(02)00432-9)
- Rees, E. E., Ibarra, R., Medina, M., Sanchez, J., Jakob, E., Vanderstichel, R., & St-Hilaire, S. (2014). Transmission of *Piscirickettsia salmonis* among salt water salmonid farms in Chile. *Aquaculture*, *428*, 189-194. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.031>
- Roca-Pinilla, R., López-Cano, A., Saubi, C. *et al.* A new generation of recombinant polypeptides combines multiple protein domains for effective antimicrobial activity. *Microb Cell Fact* *19*, 122 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01380-7>
- Roca-Pinilla, R., Cano-Garrido, O., Serna, N., García-Fruitós, E., Ferrer-Miralles, N., & Villaverde, A. (2022). Antimicrobial recombinant proteins designed as chimeras of host defense peptides show a dual mechanism of action. *Pharmaceutics*, *14*(5), 1032. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051032>
- Rojas, M. V., Olivares, J., del Rio, R., & Marshall, S. H. (2008). Characterization of a novel and genetically different small infective variant of *Piscirickettsia salmonis*. *Microbial Pathogenesis*, *44*(5), 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.10.012>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014a). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014b). Recombinant protein expression in microbial systems. *Frontiers in Microbiology*, *5*, Article 341. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00341>
- Rozas, M., & Enriquez, 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>

- 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, Article 856896. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.856896>
- Rozas-Serri, M., Pena, A., & Maldonado, L. (2019). Gene expression associated with immune response in Atlantic salmon head-kidney vaccinated with inactivated whole-cell bacterin of *Piscirickettsia salmonis* and pathogenic isolates. *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 789-795. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.031>
- 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/10.1111/jfd.12756>
- Rozas-Serri, M., Peña, A., Gardner, I., Peñaloza, E., Maldonado, L., Muñoz, A., Aranis, F. (2023). Co-Infection by LF-89-Like and EM-90-Like Genogroups of *Piscirickettsia Salmonis* in Farmed Atlantic Salmon in Chile: Implications for Surveillance and Control of *Piscirickettsiosis*. *Pathogens*, 12(3), 450. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030450>
- Saavedra, J., Hernandez, N., Osses, A., Castillo, A., Cancino, A., Grothusen, H., Mancilla, M. (2017). Prevalence, geographic distribution and phenotypic differences of *Piscirickettsia salmonis* EM-90-like isolates. *Journal of Fish Diseases*, 40(8), 1055-1063. <https://doi.org/10.1111/jfd.12581>
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). (2024). Productos biológicos inmunológicos con registro provisional de uso en salmónidos. *Recuperado de Servicio Agrícola y Ganadero: Registro provisional de productos inmunológicos de uso en salmónidos.* https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/lista_salmonidos_registro_provisional_10122024.pdf
- Saha, S., & Raghava, G. P. S. (2004). BcePred: Prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. *Artificial Immune Systems, Proceedings*, 3239, 197-204.
- Saleh, M., El-Moghazy, A., Elgohary, A. H., Saber, W. I. A., & Helmy, Y. A. (2025). Revolutionizing nanovaccines: A new era of immunization. *Vaccines*, 13(2), 126. <https://doi.org/10.3390/vaccines13020126>
- Salinas, I. (2015). The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology*, 4(3), 525-539. <https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Santibanez, N., Vega, M., Perez, T., Yanez, A., Gonzalez-Stegmaier, R., Figueroa, J.,...Romero, A. (2020). Biofilm Produced In Vitro by *Piscirickettsia salmonis* Generates Differential Cytotoxicity Levels and Expression Patterns of Immune Genes in the Atlantic Salmon Cell Line SHK-1. *Microorganisms*, 8(10), Article 1609. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101609>
- Sayyaf Dezfuli, B., Lorenzoni, M., Carosi, A., Giari, L., Bosi, G., 2023. Teleost innate immunity, an intricate game between immune cells and parasites of fish organs: who wins, who loses. *Frontiers in Immunology* 14.. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1250835>.

- Scapigliati, G. (2013). Functional aspects of fish lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(2), 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.012>
- Schober, I., Bunk, B., Carril, G., Freese, H.M., Ojeda, N., Riedel, T., Meier-Kolthoff, J.P., Göker, M., Spröer, C., Flores-Herrera, P.A., Nourdin-Galindo, G., Gómez, F., Cárdenas, C., Vásquez-Ponce, F., Labra, A., Figueroa, J., Olivares-Pacheco, J., Nübel, U., Sikorski, J., Marshall, S.H., Overmann, J., 2023. Ongoing diversification of the global fish pathogen *Piscirickettsia salmonis* through genetic isolation and transposition bursts. *The ISME Journal* 17, 2247–2258. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01531-9>
- Schrodinger, LLC. (2015). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 <p class="MsoNormal">
- Schulte, P. M. (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1856-1866. <https://doi.org/10.1242/jeb.118851>
- Selvaraj, V., Sampath, K., & Sekar, V. (2005). Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(4), 293-306. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.001>
- Selvaraj, V., Sampath, K., & Sekar, V. (2006). Adjuvant and immunostimulatory effects of beta-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(1-2), 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.06.011>
- Sepulcre, M. P., Alcaraz-Perez, F., Lopez-Munoz, A., Roca, F. J., Meseguer, J., Cayuela, M. L., & Mulero, V. (2009). Evolution of Lipopolysaccharide (LPS) Recognition and Signaling: Fish TLR4 Does Not Recognize LPS and Negatively Regulates NF-kappa B Activation. *Journal of Immunology*, 182(4), 1836-1845. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801755>
- Seras-Franzoso, J., Peebo, K., Corchero, J. L., Tsimbouri, P. M., Unzueta, U., Rinas, U.,... Villaverde, A. (2013). A nanostructured bacterial bioscaffold for the sustained bottom-up delivery of protein drugs. *Nanomedicine*, 8(10), 1587-1599. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.188>
- Seras-Franzoso, J., Sanchez-Chardi, A., Garcia-Fruitos, E., Vazquez, E., & Villaverde, A. (2016). Cellular uptake and intracellular fate of protein releasing bacterial amyloids in mammalian cells. *Soft Matter*, 12(14), 3451-3460. <https://doi.org/10.1039/c5sm02930a>
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. (2013). *Programa sanitario específico de vigilancia y control de piscirickettsiosis (PSEVC-piscirickettsiosis, res. (E) N°3174/2012)*. Chile: Res. Ex. N° 3174-2012. <https://www.sernapesca.cl>
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. (2022). Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional. In. Subdirección de Acuicultura Departamento de Salud Animal Valparaíso. <https://www.sernapesca.cl>
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. (2023). Informe con antecedentes sanitarios de agua dulce y mar. 1° semestre 2023. <https://www.sernapesca.cl>

- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. (2024). *Índice (%) y cantidad (t) de antimicrobianos administrados en la salmonicultura chilena entre 2014 y 2024*. En *Informe sobre uso de antimicrobianos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena, año 2024*. <https://www.sernapesca.cl>
- Shao, T., Zhu, L. Y., Nie, L., Shi, W., Dong, W. R., Xiang, L. X., & Shao, J. Z. (2015). Characterization of surface phenotypic molecules of teleost dendritic cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 49(1), 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.11.010>
- Smith, P. A., Contreras, J. R., Rojas, M. E., Guajardo, A., Diaz, S., & Carbonero, A. (2015). Infectivity of *Piscirickettsia salmonis* in immersion-bath exposed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fry. *Journal of Fish Diseases*, 38(8), 765-770. <https://doi.org/10.1111/jfd.12288>
- Solanki, V., Tiwari, M., & Tiwari, V. (2019). Prioritization of potential vaccine targets using comparative proteomics and designing of the chimeric multi-epitope vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41496-4>
- Solanki, V., & Tiwari, V. (2018). Subtractive proteomics to identify novel drug targets and reverse vaccinology for the development of chimeric vaccine against *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 8, Article 9044. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26689-7>
- Solem, S. T., Jorgensen, J. B., & Robertsen, B. (1995). Stimulation of respiratory burst and phagocytic-activity in atlantic salmon (*salmo-salar* l) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 5(7), 475-491. [https://doi.org/10.1016/s1050-4648\(95\)80049-2](https://doi.org/10.1016/s1050-4648(95)80049-2)
- Sotomayor-Gerding, D., Troncoso, J. M., Pino, A., Almendras, F., & Diaz, M. R. (2020). Assessing the Immune Response of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) after the Oral Intake of Alginate-Encapsulated *Piscirickettsia salmonis* Antigens. *Vaccines*, 8(3), 450. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030450>
- Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E., & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 4(1), 89-101. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.89>
- Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature Immunology*, 14(4), 320-326. <https://doi.org/10.1038/ni.2549>
- Tandberg, J., Oliver, C., Lagos, L., Gaarder, M., Yanez, A. J., Ropstad, E., & Winther-Larsen, H. C. (2017). Membrane vesicles from *Piscirickettsia salmonis* induce protective immunity and reduce development of salmonid rickettsial septicemia in an adult zebrafish model. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 189-198. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.015>
- Tian, H.-F., Xing, J., Tang, X.-Q., Chi, H., Sheng, X.-Z., Zhan, W.-B., 2022. Cluster of differentiation antigens: essential roles in the identification of teleost fish T lymphocytes. *Marine Life Science & Technology* 4, 303–316. <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00136-z>
- Thwaite, R., Berbel, C., Aparicio, M., Torrealba, D., Pesarrodonna, M., Villaverde, A., Roher, N. (2020). Nanostructured recombinant protein particles raise specific antibodies against

- the nodavirus NNV coat protein in sole. *Fish & Shellfish Immunology*, 99, 578-586.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.029>
- Thwaite, R., Ji, J., Torrealba, D., Coll, J., Sabes, 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, Article 1652.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01652>
- Tobar, I., Arancibia, S., Torres, C., Vera, V., Soto, P., Carrasco, C.,...Tobar, J. A. (2015). Successive oral immunizations against Piscirickettsia salmonis and infectious salmon anemia virus are required to maintain a long-term protection in farmed salmonids. *Frontiers in Immunology*, 6, Article 244. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00244>
- Torrealba, D., Parra, D., Seras-Franzoso, J., Vallejos-Vidal, E., Yero, D., Gibert, I.,...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-Fruitos, E. (2016). Complex Particulate Biomaterials as Immunostimulant-Delivery Platforms. *Plos One*, 11(10), Article e0164073.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164073>
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1366-1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
- Unzueta, U., Cespedes, M. V., Sala, R., Alamo, P., Sanchez-Chardi, A., Pesarrodoná, M.,...Seras-Franzoso, J. (2018). Release of targeted protein nanoparticles from functional bacterial amyloids: A death star-like approach. *Journal of Controlled Release*, 279, 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.004>
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., & Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56(10), 486-503. <https://doi.org/10.17221/3294-vetmed>
- Valenzuela-Avilés, 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.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1019404>
- Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escarate, C. (2018). Dual RNA-Seq Uncovers Metabolic Amino Acids Dependency of the Intracellular Bacterium Piscirickettsia salmonis Infecting Atlantic Salmon. *Frontiers in Microbiology*, 9, Article 2877.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02877>
- Valenzuela-Muñoz, V., Benavente, B. P., Casuso, A., Leal, Y., & Gallardo-Escárate, C. (2021). Chimeric Protein IPath[®] with Chelating Activity Improves Atlantic Salmon's Immunity against Infectious Diseases. *Vaccines*, 9(4), 361.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9040361>
- Vargas, D., Vallejos-Vidal, E., Reyes-Cerpa, S., Oyarzun-Arrau, A., Acuna-Castillo, C., Imarai, M.,...Sandino, A. M. (2021). The Analysis of Live-Attenuated Piscirickettsia salmonis Vaccine Reveals the Short-Term Upregulation of Innate and Adaptive Immune Genes in Atlantic Salmon (Salmo salar): An In Situ Open-Sea Cages Study. *Microorganisms*, 9(4), Article 703. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040703>

- Vasta, G. R., Nita-Lazar, M., Giomarelli, B., Ahmed, H., Du, S. J., Cammarata, M.,...Amzel, L. M. (2011). Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: Relevance to innate and adaptive immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1388-1399. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.08.011>
- Vazquez, E., Corchero, J. L., Burgueno, J. F., Seras-Franzoso, J., Kosoy, A., Bosser, R.,...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/10.1002/adma.201104330>
- Walsh, G. (2010). Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discovery Today*, 15(17-18), 773-780. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.06.009>
- Wang, L., Maji, S. K., Sawaya, M. R., Eisenberg, D., & Riek, R. (2008). Bacterial Inclusion Bodies Contain Amyloid-Like Structure. *PLoS Biology*, 6(8), e195. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060195>
- Wang, X., Zhou, B., Hu, W., Zhao, Q., & Lin, Z. (2015). Formation of active inclusion bodies induced by hydrophobic self-assembling peptide GFIL8. *Microbial Cell Factories*, 14(1), Article 88. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0270-0>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R.,...Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296-W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35, W407-W410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>
- Wittamer, V., Bertrand, J. Y., Gutschow, P. W., & Traver, D. (2011). Characterization of the mononuclear phagocyte system in zebrafish. *Blood*, 117(26), 7126-7135. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-321448>
- Wu, L. T., Qin, Z. D., Liu, H. P., Lin, L., Ye, J. M., & Li, J. (2020). Recent Advances on Phagocytic B Cells in Teleost Fish. *Frontiers in Immunology*, 11, Article 824. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00824>
- Xing, J., An, Z., Tang, X., Sheng, X., Chi, H., & Zhan, W. (2023). Expression and Immune Characterization of Major Histocompatibility Complex in *Paralichthys olivaceus* after Antigen Stimulation. *Biology*, 12(12), 1464. <https://doi.org/10.3390/biology12121464>
- Xu, D., & Zhang, Y. (2012). Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 80(7), 1715-1735. <https://doi.org/10.1002/prot.24065>
- Yang, J. Y., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W174-W181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Frias, C. G., & Cortes, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>
- Zhang, W. P., Ding, W., Li, Y. X., Tam, C., Bougouffa, S., Wang, R. J., Qian, P. Y. (2019). Marine biofilms constitute a bank of hidden microbial diversity and functional potential. *Nature Communications*, 10, Article 517. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08463-z>

- Zhang, Y. A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*, *11*(9), 827-U882. <https://doi.org/10.1038/ni.1913>
- Zuniga, A., Aravena, P., Pulgar, R., Travisany, D., Ortiz-Severin, J., Chavez, F. P., Cambiazo, V. (2020). Transcriptomic Changes of *Piscirickettsia salmonis* During Intracellular Growth in a Salmon Macrophage-Like Cell Line. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*, Article 426. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00426>

APÉNDICE

Apéndice 1. Inmunofluorescencia de la capacidad fagocítica de las RTS-11 en presencia de 5, 10 y 20 ug/mL de SkipZ, pulseJ y HopQ durante 12 horas de inducción.

119

Apéndice 2. Panel de citometría realizado para determinar el porcentaje de fluorescencia de atto 488 fagocitado por RTS-11. Ejemplos de una réplica de cada nanoproteínas. 120

Apéndice 3. Expresión de marcadores moleculares de la respuesta inmune, principalmente de la presentación de antígenos y proinflamatorios. Las células RTS-11 fue estimulada a 5,10 y 20 (g/mL) durante 24 horas con las tres NPs: 1) SkipZ (verde). 2) PulseJ (amarillo). 3) HopQ (rojo). El análisis de qPCR fue normalizado con el gen de referencia elf-1, y los resultados fueron presentados como promedio \pm SEMs de triplicados desde tres experimentos diferentes (n = 3). Diferencias entre los tratamientos y el control negativo fue analizado por Wilcox-test. Diferencias en nivel transcriptómica son indicados con asteriscos, p-value es considerado (*) $p < 0.05$.

122

Apéndice 4. Análisis de Componentes Principales (PCA) para los diferentes grupos experimentales con elipses de confianza de la vacuna HopQ. Los grupos representados son: "control" (azul, triángulos), "uno" (amarillo, cruces), "siete" (rojo, cuadrados) y "catorce" (rojo, círculos) que corresponden a los 4 tiempos evaluados en el bioensayo. Se observan claras separaciones entre algunos grupos, lo que indica diferencias en las variables medidas entre los grupos experimentales. 123

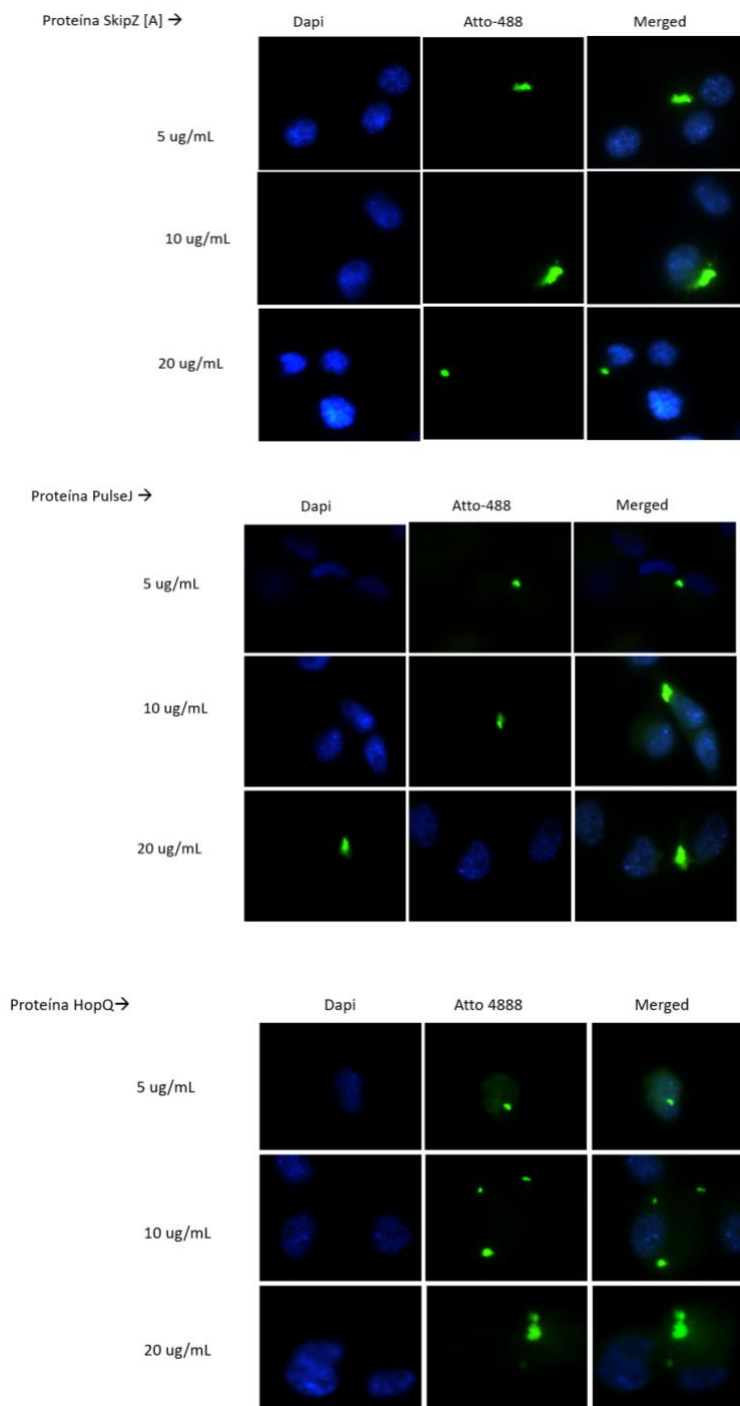
Apéndice 5. Análisis de Componentes Principales (PCA) para los grupos experimentales con elipses de confianza, considerando la vacuna SkipZ. Los grupos analizados son: "control" (azul, triángulos), "uno" (amarillo, cruces), "siete" (rojo, cuadrados) y "catorce" (rojo, círculos). Los diferentes patrones de agrupación sugieren variaciones significativas en la expresión de SkipZ entre los grupos experimentales. 124

Apéndice 6. Expresión diferencial de genes relacionados en respuesta a la vacuna HopQ de muestras de riñón anterior tomadas a los 1,7 y 14 días posterior a la vacunación, junto al control con PBS 1X. Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con (*) para $p < 0.05$ y con (**) para $p < 0.01$, para (***) $p < 0.001$ y para (****) $p < 0.0005$. 126

Apéndice 7. Expresión de genes relacionados en respuesta a la vacuna SkipZ de muestras de riñón anterior tomadas a los 1,7 y 14 días posterior a la vacunación, junto al control con PBS 1X. Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con (*) para $p < 0.05$ y con (**) para $p < 0.01$, para (***) $p < 0.001$ y para (****) $p < 0.0005$.

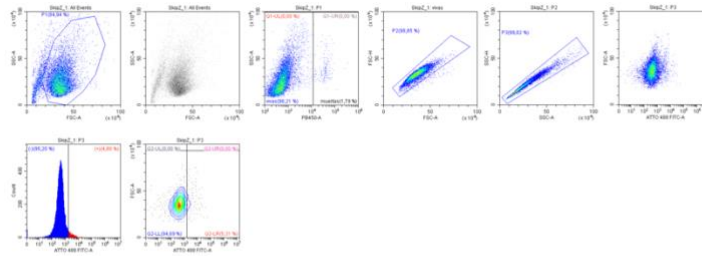
129

Apéndice 8. Imágenes de microscopia de la nanoproteínas HopQ mediante microscopia electrónica de barrido por emisión de campo obtenidas en ekl laboratorio IRTA, Barcelona 130



Apéndice 1. Inmunofluorescencia de la capacidad fagocítica de las RTS-11 en presencia de 5, 10 y 20 ug/mL de SkipZ, pulseJ y HopQ durante 12 horas de inducción.

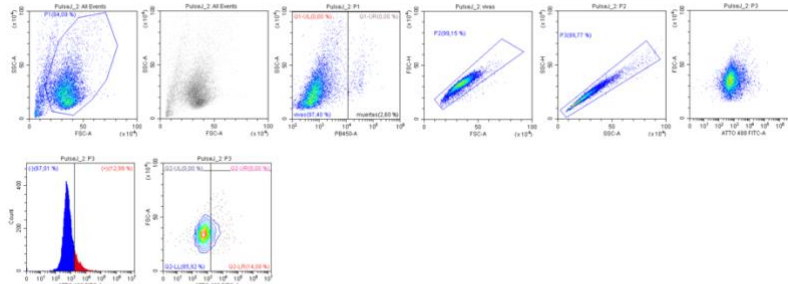
Skip_Z_1



Tube Name: Skip_Z_1

Population	Events	% Total	% Parent	Parent Population	Median ATTO 488 FITC-A	rSD ATTO 488 FITC-A
All Events	12544	100.00 %	100.00 %	###	434.8	270.4
P1	10655	84.94 %	84.94 %	All Events	440.8	258.7
vivas	10464	83.42 %	98.21 %	P1	488.7	257.3
mueritas	191	1.52 %	1.79 %	P1	549.7	283.0
P3	10325	82.31 %	99.82 %	P2	436.1	252.9
(-)	9829	78.36 %	95.20 %	P3	419.4	232.9
(+)	496	3.95 %	4.80 %	P3	3135.1	1613.4

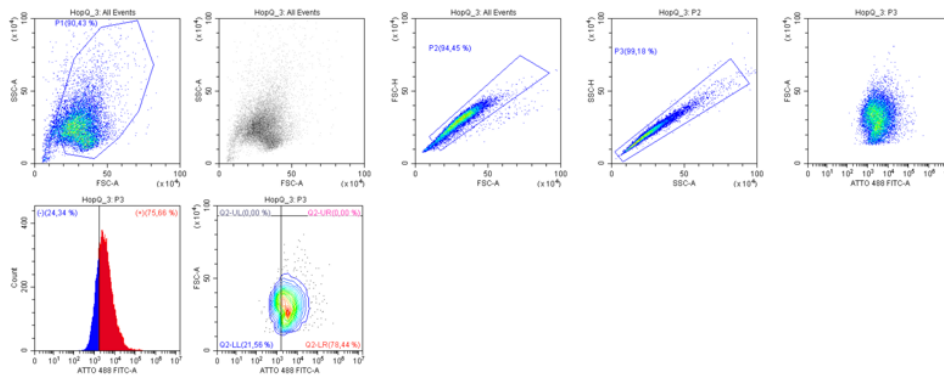
Pulse1_2



Tube Name: Pulse1_2

Population	Events	% Total	% Parent	Median ATTO 488 FITC-A	rSD ATTO 488 FITC-A	Parent Population
All Events	11718	100.00 %	100.00 %	651.9	422.8	###
P1	9854	84.99 %	84.09 %	656.8	403.6	All Events
vivas	9598	81.81 %	97.40 %	651.0	398.8	P1
mueritas	256	2.18 %	2.60 %	928.6	588.7	P1
P3	9494	81.02 %	99.77 %	646.8	391.8	P2
(-)	8261	70.50 %	87.01 %	585.8	304.4	P3
(+)	1233	10.52 %	12.99 %	2985.0	1492.5	P3

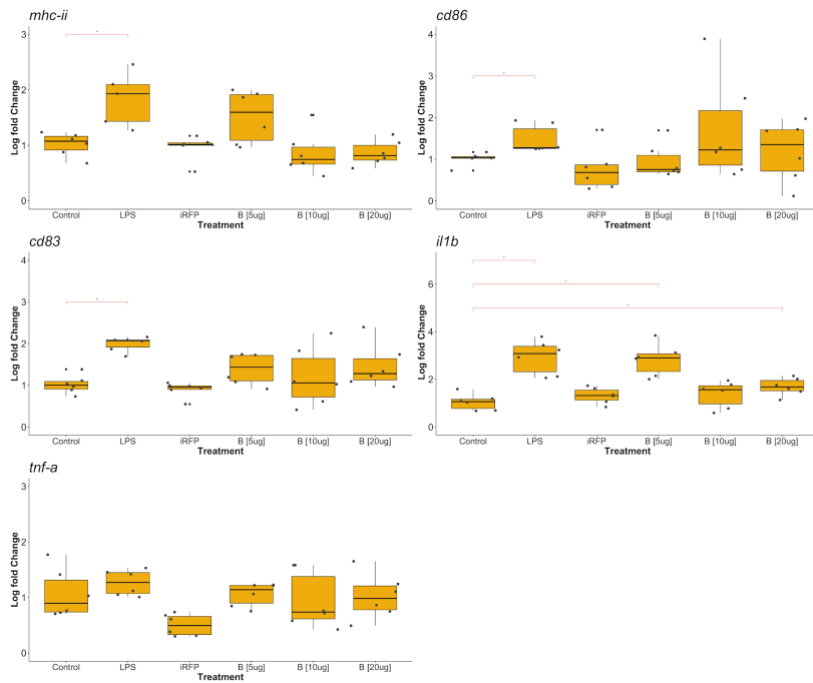
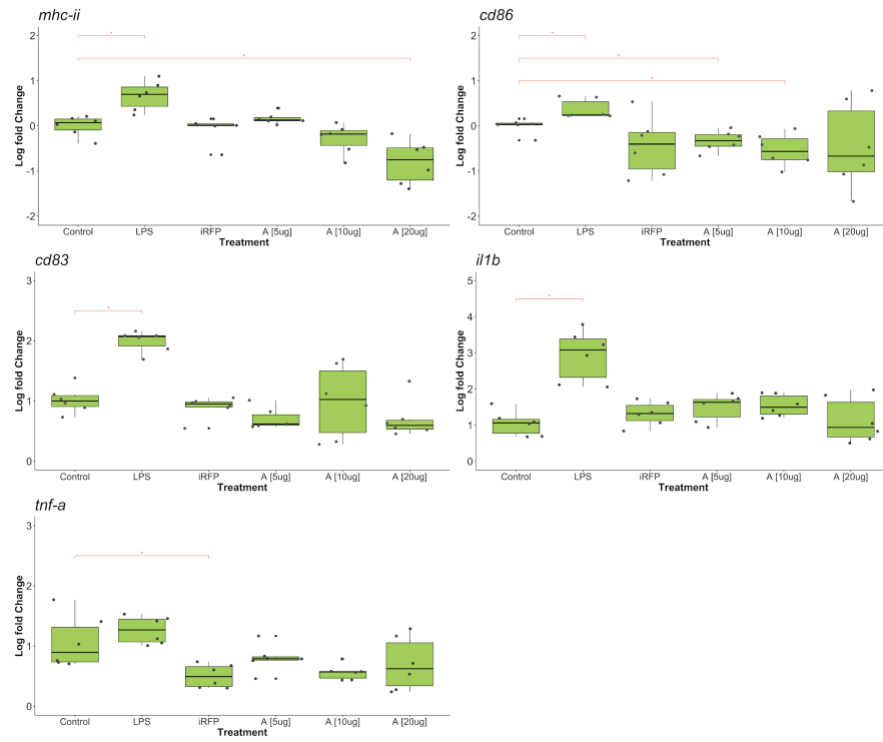
HopQ_3

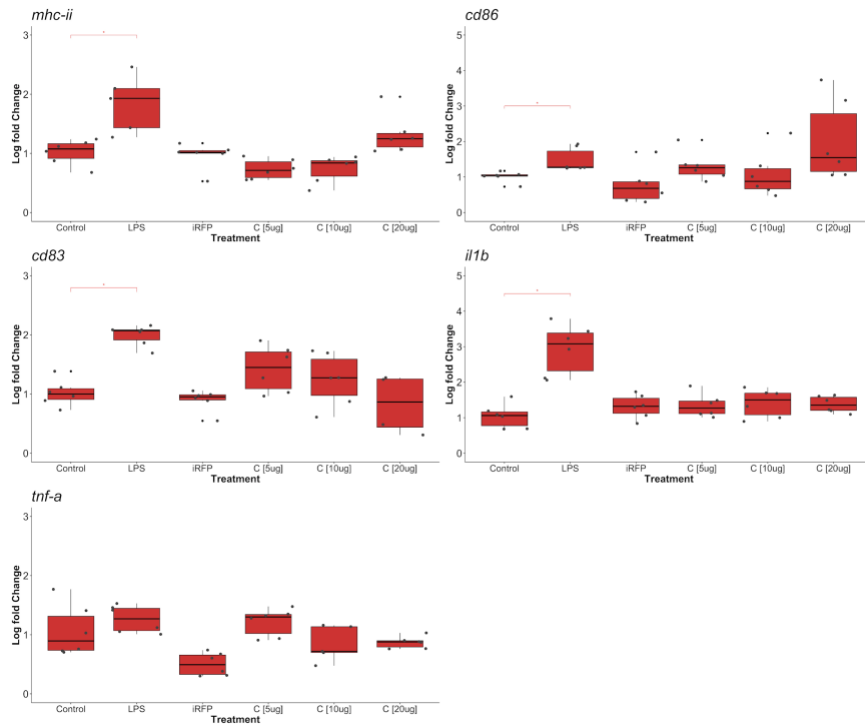


Tube Name: HopQ_3

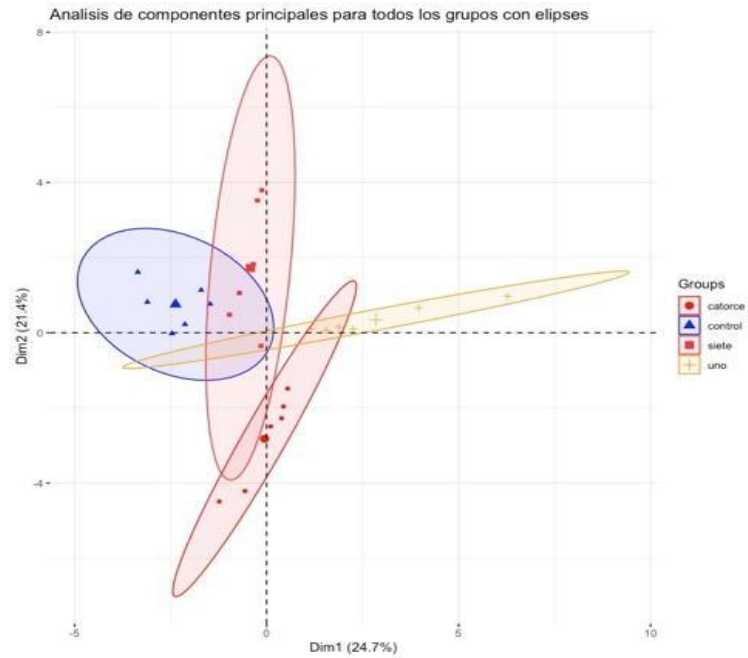
Population	Events	% Total	% Parent	Median ATTO 488 FITC-A	rSD ATTO 488 FITC-A	Parent Population
All Events	12733	100.00 %	100.00 %	3016.6	2376.2	###
P1	11514	90.43 %	90.43 %	3164.6	2453.0	All Events
P3	11927	93.67 %	99.18 %	3081.6	2359.0	P2
(-)	2903	22.80 %	24.34 %	1225.6	405.5	P3
(+)	9024	70.87 %	75.66 %	4035.3	2477.9	P3

Apéndice 2. Panel de citometría realizado para determinar el porcentaje de fluorescencia de atto 488 fagocitado por RTS-11. Ejemplos de una réplica de cada nanoproteínas.

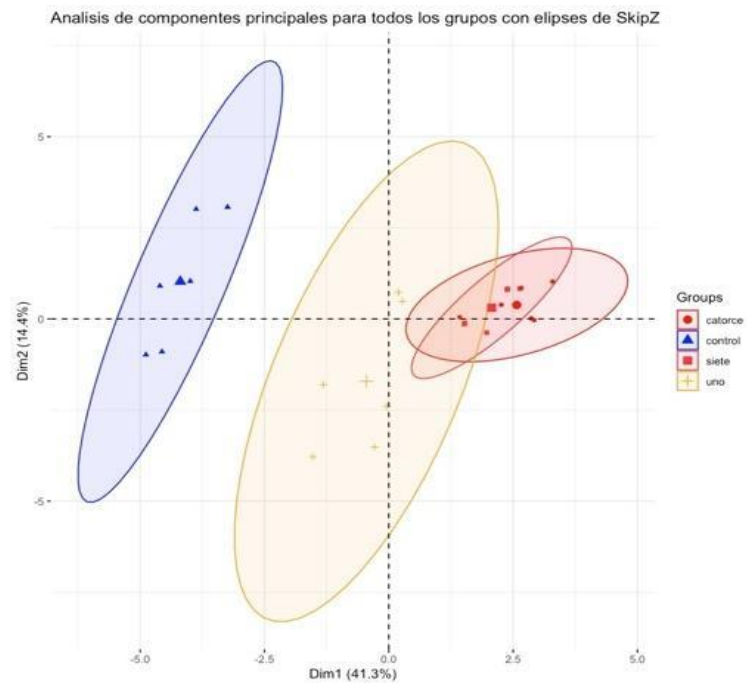




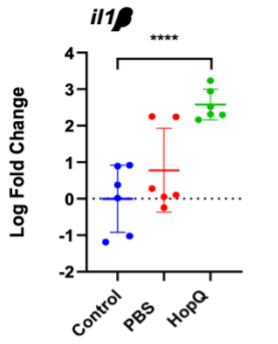
Apéndice 3. Expresión de marcadores moleculares de la respuesta inmune, principalmente de la presentación de antígenos y proinflamatorios. Las células RTS-11 fue estimulada a 5,10 y 20 μ g/mL durante 24 horas con las tres NPs: 1) SkipZ (verde). 2) PulseJ (amarillo). 3) HopQ (rojo). El análisis de qPCR fue normalizado con el gen de referencia *elf-1*, y los resultados fueron presentados como promedio \pm SEMs de triplicados desde tres experimentos diferentes ($n = 3$). Diferencias entre los tratamientos y el control negativo fue analizado por Wilcox-test. Diferencias en nivel transcriptómica son indicados con asteriscos, p-value es considerado (*) $p < 0.05$.



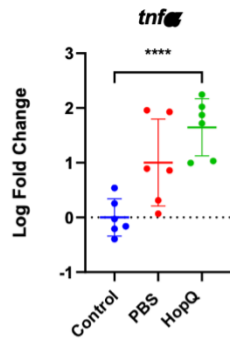
Apéndice 4. Análisis de Componentes Principales (PCA) para los diferentes grupos experimentales con elipses de confianza de la vacuna HopQ. Los grupos representados son: “control” (azul, triángulos), uno” (amarillo, cruces), “siete” (rojo, cuadrados) y “catorce” (rojo, círculos) que corresponden a los 4 tiempos evaluados en el bioensayo. Se observan claras separaciones entre algunos grupos, lo que indica diferencias en las variables medidas entre los grupos experimentales.



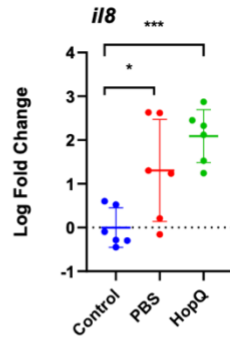
Apéndice 5. Análisis de Componentes Principales (PCA) para los grupos experimentales con elipses de confianza, considerando la vacuna SkipZ. Los grupos analizados son: “control” (azul, triángulos), “uno” (amarillo, cruces), “siete” (rojo, cuadrados) y “catorce” (rojo, círculos) . Los diferentes patrones de agrupación sugieren variaciones significativas en la expresión de SkipZ entre los grupos experimentales.



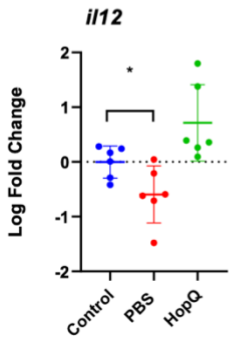
Un día post vacunación



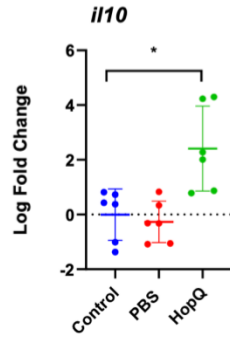
Un día post vacunación



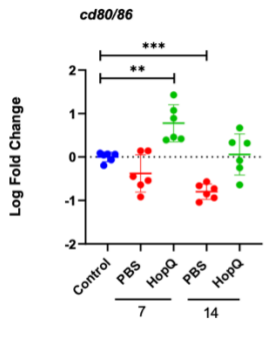
Un día post vacunación



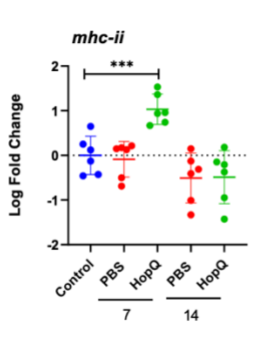
Un día post vacunación



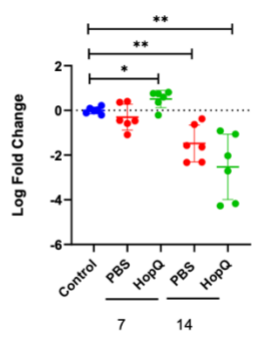
Un día post vacunación



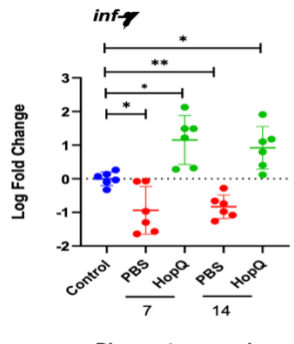
Dias post vacunación



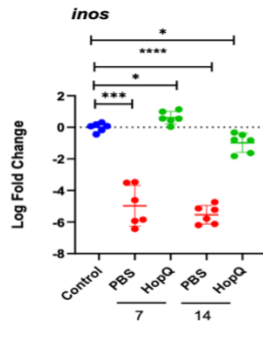
Dias post vacunación



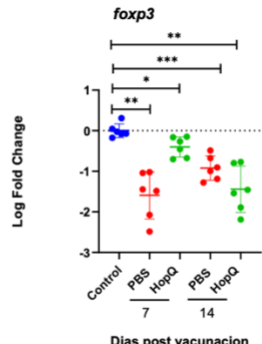
Dias post vacunación



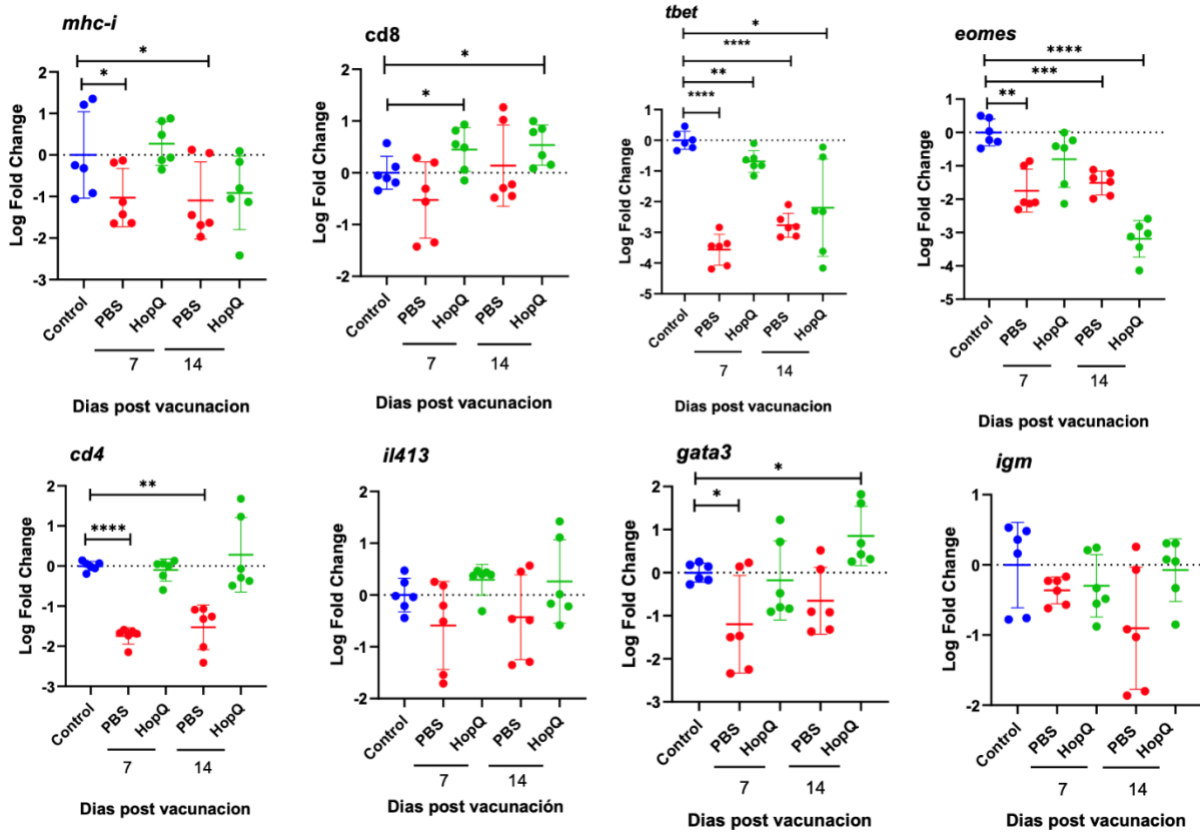
Dias post vacunación



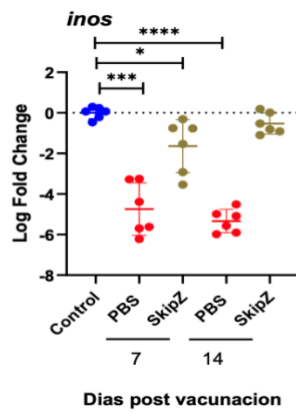
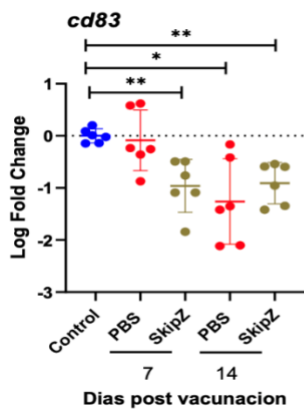
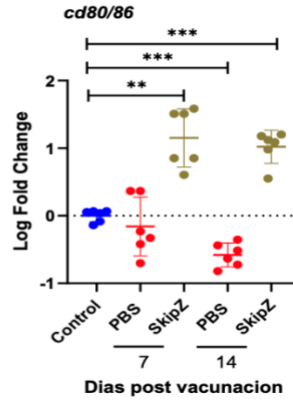
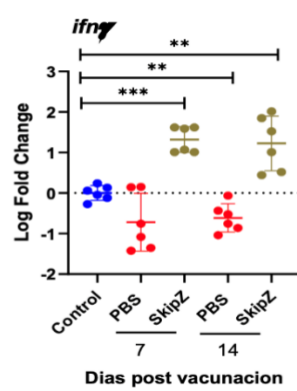
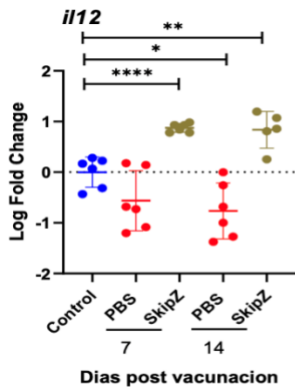
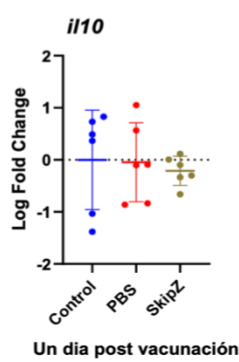
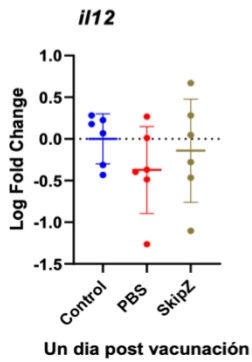
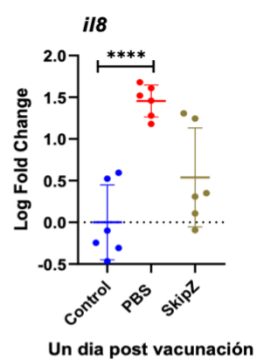
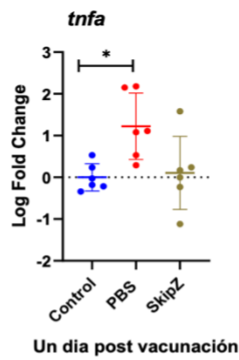
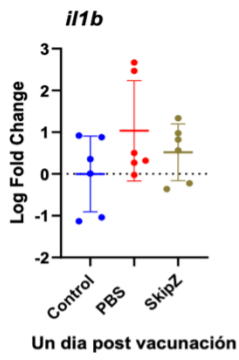
Dias post vacunación

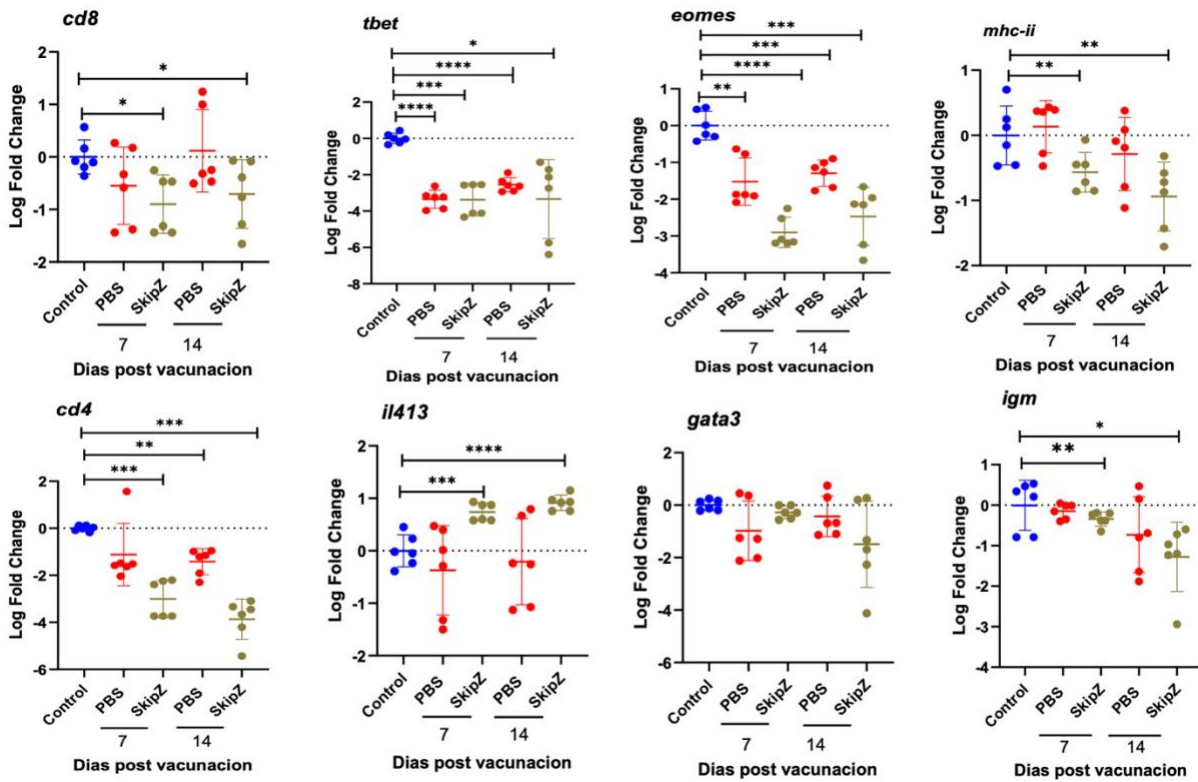


Dias post vacunación

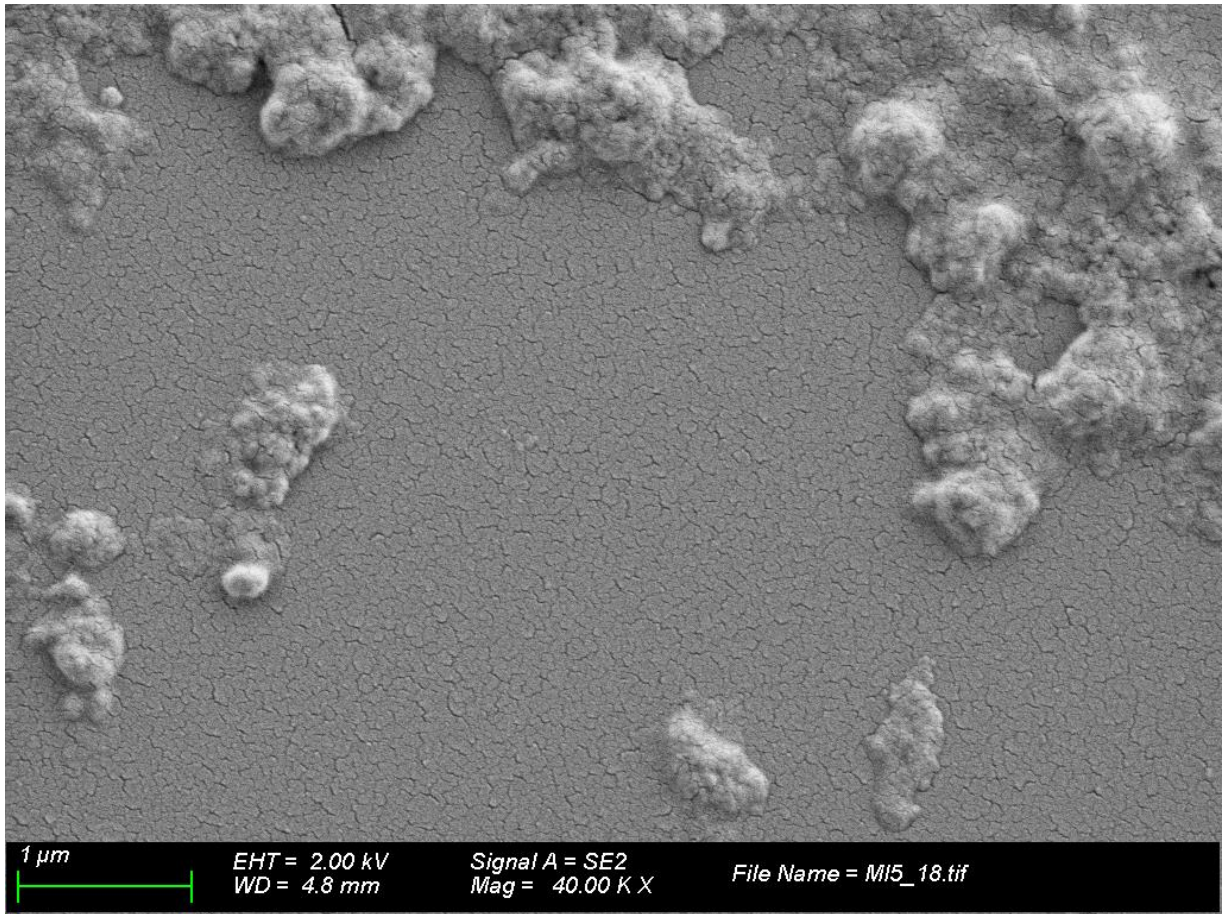


Apéndice 6. Expresión diferencial de genes relacionados en respuesta a la vacuna HopQ de muestras de riñón anterior tomadas a los 1,7 y 14 días posterior a la vacunación, junto al control con PBS 1X. Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con (*) para $p < 0.05$ y con (**) para $p < 0.01$, para (***) $p < 0.001$ y para (****) $p < 0.0005$.





Apéndice 7. Expresión de genes relacionados en respuesta a la vacuna SkipZ de muestras de riñón anterior tomadas a los 1,7 y 14 días posterior a la vacunación, junto al control con PBS 1X. Las diferencias en los niveles de transcripción se indican con (*) para $p < 0.05$ y con (**) para $p < 0.01$, para (***) $p < 0.001$ y para (****) $p < 0.0005$.



Apéndice 8. Imágenes de microscopia de la nanoproteinas HopQ mediante microscopia electrónica de barrido por emisión de campo obtenidas en ekl laboratorio IRTA, Barcelona

FINANCIAMIENTOS Y COLABORACIONES

- Beca de manutención y arancel de la Universidad Técnica Federico Santa María (2020-2021)
- Beca de Doctorado Nacional de la Agencia Nacional de Investigación (ANID) con beneficios complementarios de Gastos Operacionales y Extensión por COVID-19 (2022 – 2024)
- Tesis de Doctorado en el Sector Productivo Convocatoria 2022- ANID (TDP220008). Título de proyecto “Producción de una vacuna en base a nanoproteínas quiméricas altamente antigénicas para combatir brotes de *Piscirickettsia Salmonis*”.
- Proyecto de incentivo al emprendimiento de base científica-tecnológica (EBCT) en el Programa Growing up, convocatoria ejecuta tu idea 2023 de SCIENCE UP, Consorcio Ciencia 2030-PUCV.
- Proyecto Programa Growing Up: Ejecuta tu Idea 2024, Consorcio Ciencia 2030-PUCV.
- Proyecto CORFO 20SN-151304 - CORFO Súmate a Innovar: Producción y purificación a escala de laboratorio de cuerpos de inclusión (CI) como inmunoestimulantes para el control de *Piscirickettsia salmoni*
- Proyecto Fondecyt Post-doctoral 3210502 de la Dra. Debora Torrealba. Cuerpos de inclusión como inmunoestimulantes de administración oral para el control de *Piscirickettsia salmonis* en Salmón del Atlántico.
- Empresa Salmones Camanchaca apoyo con 250 peces smolt y 8 estanques para el uso durante 2 semanas, permitiendo realizar el 3 objetivo de la tesis doctoral.

PRODUCTOS

PUBLICACIONES

- Torrealba, D.; López, D.; Zelada, P.; Salinas-Parra, N.; Valenzuela-Avilés, P.; Garcia-Fruitós, E.; Arís, A.; Mercado, L.; Altamirano, C.; Gallardo-Matus, J. **Immunomodulation Evidence of Nanostructured Recombinant Proteins in Salmonid Cells**. *Animals* 2024, 14, 844. <https://doi.org/10.3390/ani1406084>. Factor de impacto: 2,7
- Valenzuela-Aviles P, Torrealba D, Figueroa C, Mercado L, Dixon B, Conejeros P and Gallardo-Matus J (2022) **Why vaccines fail against Piscirickettsiosis in farmed salmon and trout and how to avoid it: A review**. *Front. Immunol.* 13:1019404. doi: 10.3389/fimmu.2022.1019404. Factor de impacto: 5,7

PASANTIA

- Pasantía en la Universidad Agrícola de Suecia, bajo el alero de proyecto CONICYT-STINT (Chile - Suecia) denominado "Genomics of Coinfection of Pathogens in Salmonid Fish", código del proyecto: 0608470 - CONICYT GENOMICS OF COINFECTION/CS2018-7993, en el laboratorio del doctor Anti Vasemagi.

CONFERENCIAS

- XLIII Congreso de Ciencias del Mar "Ciencia y Comunidad: Navegando por la gestión sostenible de los recursos marinos". "Desarrollo de un prototipo de vacuna multi-epítoto nanoestructurada para el control de la piscirickettsiosis evaluación en células de salmónidos". Mayo 2024- Concepcion. Formato Poster.
- International Symposium on Genetics in Aquaculture ISGA XIV. "Evaluation of the immune response induced by vaccination in atlantic salmon (*S. salar*) cultivated under field conditions". Diciembre 2022– Puerto Varas. Formato Poster.

- VIII Congreso Nacional de Acuicultura, organizado por la Universidad Católica de Temuco y la Sociedad Chilena de Acuicultura. Trabajo titulado: “Indicadores moleculares de respuesta inmune adaptativa inducida por vacunación en salmón del Atlántico (*S. salar*) cultivado en condiciones de campo”. Diciembre 2021. Presentación como expositora.
- I Jornada Científica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Trabajo titulado: Producción y caracterización de nanoproteínas quiméricas recombinantes de antígenos *Piscirickettsia salmonis*. Mayo 2023

PROPIEDAD INTELECTUAL

- Registro de marca denominada PULSE. Categoría 5, vacuna para uso veterinario. N° solicitud: 1592730
- Estudio de patentabilidad de las 3 secuencias antigénicas multi-epítomos en el estudio jurídico MICP Abogados.