



PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA
DE VALPARAISO



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

**DISEÑO, GENERACIÓN Y APLICACIÓN DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS Y RECOMBINANTES
DERIVADOS DE FLAGELINA DE *Vibrio anguillarum* COMO EFECTORES DE
INMUNOESTIMULACIÓN EN PECES.**



Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

Alumna: Roxana González Stegmaier
Profesor Guía: Dr. Luis Mercado Vianco

Noviembre, 2013

U.T.F.S.M.
BIBLIOTECAS

COMISIÓN EVALUADORA

La presente tesis ha sido revisada y aprobada por una comisión compuesta por:

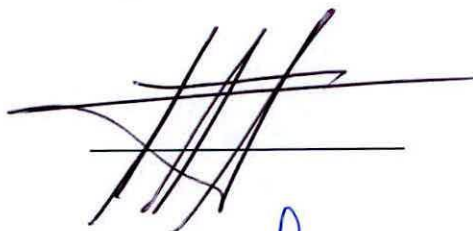
Dra.: Claudia Altamirano

Presidenta de la comisión, PUCV



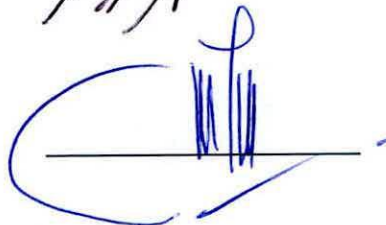
Dr.: Sergio Almonacid

Profesor del Doctorado en Biotecnología, UTFSM



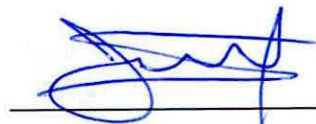
Dra.: Mónica Imarai

Profesora evaluador externo, USACH



DR.: Jaime Tobar

Profesor evaluador externo, Centrovvet



Dr.: Luis Mercado

Director de Tesis, PUCV



*A mi pequeña Antonia
y
A Mis Padres
Por su apoyo Incondicional*

RESUMEN

El incremento de las enfermedades que afectan a peces en cultivo ha determinado que la industria en Chile esté expuesta a perder su competitividad internacional. El gran desafío actual de la industria salmonera es aumentar el conocimiento acerca de la respuesta inmune de los peces, para identificar y desarrollar moléculas que puedan actuar como moduladores de la respuesta inmunológica.

El uso de inmunoestimulantes es una práctica eficaz para aumentar la inmunocompetencia y la resistencia a enfermedades de los peces. Algunos de estos inmunoestimulantes están siendo utilizados actualmente en la industria acuícola y se basan en moléculas altamente conservadas en los microorganismos, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), como los receptores tipo Toll (TLRs), presentes tanto en leucocitos como en células epiteliales.

En trucha arcoiris han sido identificadas dos isoformas de TLR5: la de membrana TLR5M y la soluble TLR5S, ambas unen flagelina. Además, la activación de TLR5M induce la expresión de TLR5S, con lo cual se amplifica la respuesta celular al PAMP flagelina, permitiendo así una mayor respuesta inmunológica, que consiste en la expresión de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas.

En el modelo de interacción entre flagelina de *Salmonella typhimurium* y TLR5 de mamíferos, los dominios clave de unión y activación de TLR5 han sido establecidos. En base a esta información y utilizando como modelo flagelina del patógeno de peces *Vibrio anguillarum*, se produjeron diversos péptidos sintéticos derivados del dominio D1 de flagelina y proteínas recombinantes de la molécula completa y del extremo amino del dominio D1 de la proteína.

La activación de células inmunitarias modelo por los péptidos sintéticos y las proteínas recombinantes fue evaluada a través de la sobreexpresión del TLR5S en células de hígado de trucha arcoiris, además de la sobreexpresión en macrófagos de dorada y trucha arcoiris de genes asociados a la respuesta inmune innata.

Los resultados generados en esta tesis, demuestran que el péptido 518 así como las proteínas recombinantes, son capaces de inducir la sobre-expresión de las citoquinas IL-1 β y TNF- α , además de la quimioquina IL-8 *in vitro*, genes pro-inflamatorios clave en la regulación de la respuesta inmune innata de los peces.

Las moléculas generadas en esta tesis, tanto sintéticas como recombinantes, poseen un potencial inmunomodulador análogo al efecto de PAMPs, sobre leucocitos de peces. Futuros ensayos *in vivo* proyectarían su potencial uso y contribución para la modulación de una inmunidad robusta en peces cultivados masivamente.

ABSTRACT

Pathologies fish has increased in the last decades; this has affected to the fish industry in Chile, which is exposed to competitiveness international loss. The main challenge of the salmon industry is increase knowledge about the immune response of fish for identify and develop new molecules, which can act as modulators of the immune response.

Efficiencies and effective use of immunostimulants increase immunocompetence and disease resistance of fish. Actually, some of these immunostimulants are currently being used in the aquaculture industry and are based on highly conserved molecules in microorganisms called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are recognized by pattern recognition receptors (PRRs), Toll-like receptors (TLRs), which are present in leucocytes and epithelial cells.

In rainbow trout have been identified two isoforms of TLR5: membrane TLR5M and soluble TLR5S, both bind flagellin. Furthermore, activation of TLR5M induces TLR5S expression, which is amplified cellular response to flagellin PAMP, allowing greater immune response, which is the expression of proinflammatory cytokines and chemokines.

In the model of interaction between *Salmonella typhimurium* flagellin and TLR5 in mammals key binding domains and activation of TLR5 has established. Based on this information and using flagellin as a model fish pathogen *Vibrio anguillarum* were produced various synthetic peptides derived from flagellin domain D1, recombinant proteins of the whole molecule and the amino terminal domain D1 of the protein.

Activation of immune cells by synthetic peptides model and recombinant proteins was evaluated by overexpression in liver cells TLR5S rainbow trout as well as in macrophages overexpression seabream and rainbow trout genes associated with innate immune response.

The results generated in this investigation show that the peptide 518 as well as recombinant proteins are capable of inducing overexpression of the cytokines IL-1 β , TNF- α and the chemokine IL-8 in *in vitro*, key pro-inflammatory genes regulator of the innate immune response of fish.

The molecules generated in this thesis, both synthetic and recombinant possess immunomodulatory potential analogous to the effect of PAMPs on fish leukocytes. Future trials *in vivo* and its potential use would project contribution to the modulation of robust immunity in massively farmed fish.

AGRADECIMIENTOS

A mi princesita Antonia por hacer que cada día sea especial.

A mis Padres y Hermana por ser mis grandes pilares y apoyarme en todas las decisiones que he tomado en mi vida, sin ellos nada hubiera sido posible.

A mi Tío Max, gracias por TODO!!

Al Dr Luis Mercado, mi director de tesis, por su apoyo, conversaciones, confianza y comprensión durante el desarrollo de mi tesis.

Al Dr Victoriano Mulero por recibirme en su laboratorio durante mi pasantía, lo que ha contribuido en mi crecimiento y formación.

Al Dr Alex Romero por permitir que terminara mi tesis en su laboratorio, por su gran apoyo, amistad y buenos consejos.

A la comisión evaluadora de mi tesis.

A los que fueron mis compañeros de laboratorio, Cariñito, Cricri, Jorge, Vero, Byron, Paula, Andrés, Herve y con especial cariño para Claudia, Dani y Edgar, gracias por su amistad.

A Fanny por su alegría, consejos y gran ayuda con los péptidos. A Cony por su buena onda y preocupación.

A mi gran amigo Franz, gracias por toda tu ayuda, apoyo, consejos y por sobre todo gracias por tu infinita paciencia.

A mi amiga Pati por su cariño, comprensión y apoyo durante todos los años de estudio.

A mi Angelito, gracias por haberme apoyado siempre y sobre todo por haber querido tanto a mi hijita.

A Vania por su gran ayuda durante todo el proceso de escritura y preparación de la tesis, gracias por poner claridad y concentración a mi revoltoso día a día.

Finalmente agradecer a todos los que ayudaron a la realización de esta tesis, CONICYT, BECACHILE, PUCV.

GRACIAS!!

ÍNDICE GENERAL

	Pág
DEDICATORIA.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. La Industria de la Salmonicultura en Chile.....	3
2.2. Respuesta Inmune en peces.....	5
2.3. Receptores tipo toll.....	9
2.4. Flagelina.....	12
2.5. Inmunomodulación por flagelina.....	16
2.6. Uso y evaluación de inmunoestimulantes en peces.....	18
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1. Material Biológico.....	21
4.1.1. Peces.....	21
4.1.2. Ratones.....	21
4.2. Diseño de secuencia epítopes para TLR5S de trucha arcoíris y Flagelina de <i>V. anguillarum</i>	21
4.3. Diseño de péptidos derivados del dominio D1 de flagelina de <i>Vibrio anguillarum</i>	22
4.4. Síntesis química de secuencias epítopes y péptidos derivados de flagelina de <i>Vibrio anguillarum</i>	22
4.5. Generación de anticuerpos.....	23
4.5.1. Inmunización.....	23
4.5.2. Purificación de anticuerpos por CN-Br-4B.....	23
4.5.3. Pruebas inmunológicas.....	24
4.6. ELISA.....	24
4.7. Clonamiento de rFla y rND1 de <i>V.anguillarum</i>	25
4.7.1. Clonamiento de flagelina y del extremo amino del Dominio D1 de flagelina de <i>V. anguillarum</i>	25
4.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
4.7.3. Ligación del producto de PCR al vector pGEMT-easy o pTXB1.....	25
4.7.4. Transformación de <i>Escherichia coli</i> competentes con ADN plasmidial.....	26
4.7.5. Extracción de ADN plasmidial a pequeña escala por el “Método Ebullición”.....	26
4.7.6. Digestiones de ADN plasmidial con enzimas de restricción.....	27

4.7.7. Fraccionamiento de ADN en geles de agarosa.....	27
4.8. Expresión de proteínas recombinantes (rFla y rND1 de <i>Vibrio anguillarum</i>).....	27
4.8.1. Expresión de las proteínas recombinantes (Fla y ND1).....	27
4.8.2. Extracción de proteínas totales.....	28
4.8.3. Cuantificación de proteínas.....	28
4.8.4. Purificación de las proteínas recombinantes.....	29
4.8.5. Electroforesis en geles de poliacrilamina en condiciones denaturantes.....	29
4.8.6. Western blot.....	30
4.8.7. Inmunofluorescencia.....	30
4.9. Ensayos de inmunomodulación.....	31
4.9.1. Cultivo Celular primario.....	31
4.9.2. Ensayo de activación de TLR5.....	31
4.9.3. Ensayo de inmunoestimulación.....	32
4.9.4. Extracción de ARN desde cultivo de células.....	32
4.9.5. Síntesis de ADN complementario.....	33
4.9.6. Cuantificación de cDNA mediante PCR cuantitativo (qPCR).....	33
4.9.7. Análisis estadístico.....	34
5. RESULTADOS.....	35
5.1. PARTE I: Diseño <i>in silico</i> y síntesis química de péptidos derivados del dominio D1 de flagelina de <i>V. anguillarum</i>	36
5.2. PARTE II: Generación de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra epítopes específicos.....	42
5.3. PARTE III: Generación del dominio ND1 recombinante y flagelina recombinante de <i>Vibrio anguillarum</i>	46
5.4. PARTE IV: Análisis de la función biológica de los péptidos sintéticos y de las proteínas recombinantes en función de la expresión de TLR5S en células totales de hígado a nivel transcripcional y de proteínas.....	52
5.5. PARTE V: Análisis del efecto de los péptidos sintéticos y de las proteínas recombinantes sobre la expresión génica de citoquinas expresadas en cultivo de leucocitos de diferentes especies de peces.....	55
6. DISCUSIÓN.....	65
7. CONCLUSIONES FINALES.....	76
8. PROYECCIONES FUTURAS.....	77
9. NOMENCLATURA.....	78
10. BIBLIOGRAFÍA.....	80
ANEXOS.....	88
FINANCIAMIENTO.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 2.1. Producción histórica de Salmónidos en la Industria Chile en toneladas brutas.....	3
Figura 2.2. Producción Mundial de Salmón y Trucha. Principales destinos de las Exportaciones chilenas en el año 2010.....	4
Figura 2.3. Localización celular de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs).....	8
Figura 2.4. Estructura de un receptor tipo toll (TLR).....	10
Figura 2.5. Estructura cristalizada de flagelina de <i>Salmonella typhimurium</i>	13
Figura 2.6. Secuencias proteicas de flagelinas de bacterias que estimulan el TLR5 en mamíferos.....	14
Figura 2.7. Representación esquemática de la organización de TLR5M y TLR5S de trucha Arcoiris.....	15
Figura 5.1. Selección de los aminoácidos responsables de la activación de TLR5.....	37
Figura 5.2. Secuencia de péptidos análogos al dominio D1 de flagelina de <i>V. anguillarum</i>	38
Figura 5.3. Estructura 3D de los péptidos diseñados.....	38
Figura 5.4.1. Confirmación de la pureza y masa molecular del péptido 517.....	39
Figura 5.4.2. Confirmación de la pureza y masa molecular del péptido 518.....	40
Figura 5.4.3. Confirmación de la pureza y masa molecular del péptido 519.....	41
Figura 5.5. Generación de un anticuerpo anti-TLR5S a partir de una secuencia epítipo.....	43
Figura 5.6. Generación de un anticuerpo anti-Flagelina a partir de una secuencia epítipo.....	45
Figura 5.7. Representación esquemática de flagelina de <i>V. anguillarum</i>	47
Figura 5.8. Clonamiento de flagelina y el dominio N-D1 de <i>V. anguillarum</i> en el vector pGEM-T-easy, células <i>E. coli</i> JM109.....	48
Figura 5.9. Ensayo de restricción del ADN plasmidial del clonamiento de flagelina de <i>V. anguillarum</i> en el vector de expresión pTXB1 en <i>E. coli</i> JM109.....	49
Figura 5.10. Expresión y purificación de rFla de <i>V. anguillarum</i> desde <i>E. coli</i> ER2566, usando el vector pTXB1.....	50
Figura 5.11. Expresión y purificación de rND1 de <i>V. anguillarum</i> desde <i>E. coli</i> ER2566, usando el vector pTXB1.....	51

Figura 5.12. Selección del mejor péptido en función de la expresión de TLR5S en células aisladas de hígado de trucha arcoíris.....	53
Figura 5.13. Determinación de TLR5S en células aisladas de hígado de trucha arcoíris a las 24h post estímulo por ELISA, utilizando un anticuerpo anti-TLR5S de trucha arcoíris.....	54
Figura 5.14. Dosis-respuesta de macrófagos de Dorada (<i>Sparus aurata</i>) estimulados por 3h con las proteínas recombinantes, rFla y rND1 de <i>V. anguillarum</i> , respectivamente.....	56
Figura 5.15. Determinación de IL-1b por qPCR en macrófagos de Dorada, usando 0,1 µg/ml y 1 µg/ml de estímulo por 3h.....	57
Figura 5.16. Determinación de TNFa en macrófagos de Dorada, estímulo utilizado de 0,1 µg/ml y 1 µg/ml por 3h.....	58
Figura 5.17. Dosis-respuesta de macrófagos de trucha arcoíris estimuladas por 3h con el péptido sintético.....	59
Figura 5.18. Análisis de expresión por qPCR de genes involucrados en la respuesta inmune innata en macrófagos de trucha arcoíris posterior a 3h de estimulación.....	61
Figura 5.19. Análisis de expresión por qPCR de genes involucrados en la respuesta inmune innata en macrófagos de trucha arcoíris después de ser estimulados por 6h.....	62
Figura 5.20. Determinación de IL-8 en células SHK-1 estimuladas con rFla y rND1 por 6h a través de microscopia confocal.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 2.1. Ligandos específicos conocidos para algunos TLRs en peces.....	11

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día Chile es el segundo mayor productor de salmónidos a nivel mundial, produciendo más de 400 mil toneladas anuales y con un nivel de exportación sobre los US\$ 2000 millones (Fuente: SalmonChile). Sin embargo, el incremento de las enfermedades que afectan a los peces en cultivo ha determinado que la industria salmonera esté expuesta a perder su competitividad internacional.

El gran desafío actual de la industria salmonera es aumentar y mejorar el conocimiento de la respuesta inmune de los peces, para identificar y desarrollar nuevas moléculas que puedan actuar como moduladores de la respuesta inmunológica.

La aplicación de tratamientos clásicos como antibióticos y vacunas, no ha sido efectiva ante las altas mortalidades debidas a patógenos, en consecuencia surge la necesidad de emplear otras estrategias que se basen en la activación de la respuesta inmune, para reforzar las defensas de los peces en las situaciones adversas provocadas por la invasión de agentes patógenos (Cabello, 2006).

El uso de inmunoestimulantes en peces es un método eficaz para aumentar la inmunocompetencia y la resistencia a enfermedades, algunos están siendo utilizados actualmente en la industria de la acuicultura. Estos se basan en moléculas altamente conservadas en los microorganismos denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son reconocidos por distintos tipos de receptores presentes tanto en leucocitos como en células epiteliales (Rebl *et al.*, 2010).

Las investigaciones se centran en la producción de moléculas derivadas de los PAMPs naturales o sintéticas y en dilucidar sus mecanismos de acción. Los más utilizados son los que activan a los receptores tipo toll 9 y 7, como el oligodeoxinucleotido CpG ligando del TLR9 e imidazoquinolinas ligando de TLR7 (Kileng *et al.*, 2008; Strandskog *et al.*, 2008).

En trucha arcoíris se han identificado dos isoformas del receptor tipo toll 5 (TLR5) que liga flagelina, una de membrana TLR5M y otra soluble TLR5S (Tsujita *et al.*, 2004). La estimulación de TLR5M por su ligando natural flagelina permite entre otros la expresión de TLR5S, éste amplifica la respuesta inmune al desplazarse por los líquidos circulantes, y unido a su ligando logra activar una mayor cantidad de células inmunitarias, originando una respuesta inmunológica potente, basada en la

producción de citoquinas y en la activación de leucocitos involucrados en la inmunidad adaptativa (Tsujita *et al.*, 2004; Tsukada *et al.*, 2005; Rebl *et al.*, 2010; Palti, 2011).

Considerando los antecedentes expuestos, postulamos que el uso de moléculas sintéticas o recombinantes análogas al dominio funcional de flagelina, podrían estimular TLR5 favoreciendo la expresión de genes pro-inflamatorios, para la generación de efectos inmunomoduladores.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 La Industria de la Salmonicultura en Chile

Una de las actividades económicas y pilar en la competitividad de nuestro país es la industria de la Salmonicultura, la que ha experimentado un rápido crecimiento en la producción de salmónes y truchas a partir de la década de los noventa (Fig. 2.1).

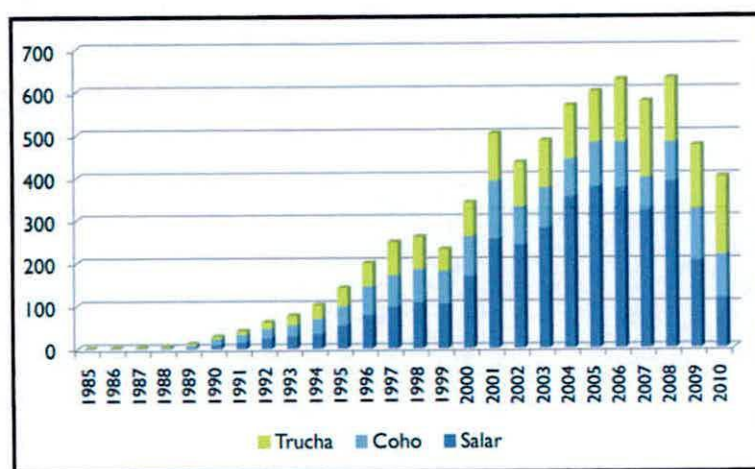


Figura 2.1 Producción histórica de Salmónidos en la Industria Chile en toneladas brutas (Fuente: Sernapesca).

La actividad de esta industria se concentra principalmente en el cultivo de tres especies, Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y Salmón coho (*Oncorhynchus kitsutch*), siendo la mayor la de Salmón del Atlántico.

Hasta hace dos años atrás producía más de 400 mil toneladas de salmónidos en el país, ocupando el segundo lugar en la producción Mundial de salmón y trucha cultivado (fig. 2.2 A), con un 27 % de la producción total, después de Noruega (SalmonChile, 2011), mostrando un crecimiento vigoroso y de importancia económica siendo uno de los principales rubros de exportación en Chile. La X y XI regiones son las que concentran la producción acuícola de salmónes en Chile.

El principal destino de las exportaciones chilenas de salmónidos se centra en Japón con un 44,2 %, en segundo lugar se ubica Estados Unidos con un 21,8 %, América latina con un 16,8 %, Asia con un 7,5% entre otros con un 9,7 % (Fig. 2.2 B, AquaChile, 2010).

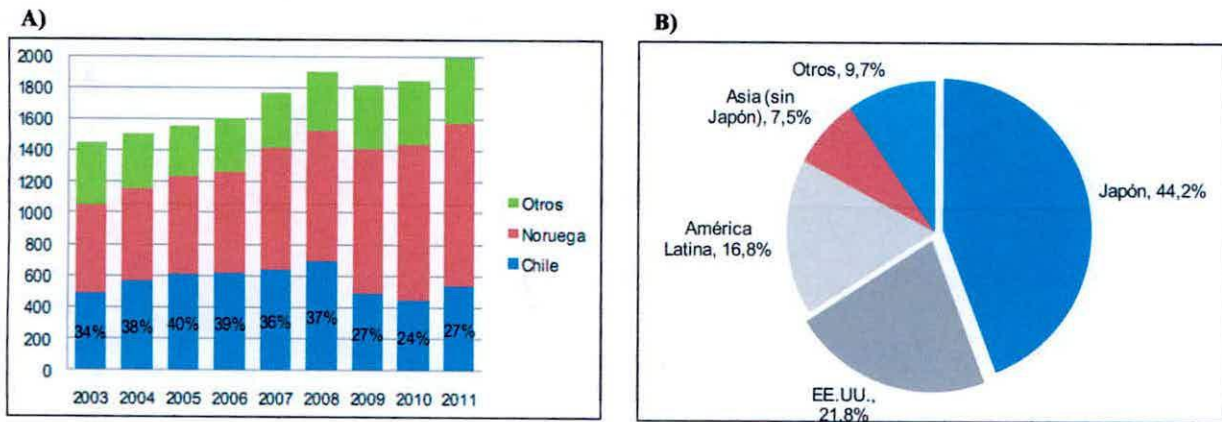


Figura 2.2 A) Producción Mundial de Salmón y Trucha en Miles de toneladas brutas y porcentaje del total (Fuente: SalmonChile). B) Principales destinos de las exportaciones chilenas en el año 2010 en miles de USD FOB (Memoria Anual AquaChile 2010).

Sin embargo, año tras año la proliferación de diversos agentes patógenos amenaza la industria produciendo pérdidas significativas. Dichos patógenos se aprovechan de las limitaciones asociadas a cultivos confinados tales como el hacinamiento y las escasas medidas sanitarias, mientras que la importación de ovas también contribuye a la introducción de nuevos agentes infecciosos (Asche *et al.*, 2010).

Entre los patógenos que están causando mayores problemas en nuestro país destacan, entre otros, los virus IPN e ISA; el parásito *Caligus rogercressey*; y múltiples bacterias, tales como las del género *vibrio*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum* y *Piscirickettsia salmonis* (Bravo y Midtlyng, 2007). Lo que hace necesario tomar medidas que permitan controlar y neutralizar su potencial impacto en el futuro para disminuir las pérdidas que se generan año a año.

2.2 Respuesta Inmune en peces

La respuesta inmune de todos los vertebrados, incluidos los peces, se organiza en base a dos estrategias: la respuesta inmune innata, y la respuesta inmune adquirida (Watts *et al.*, 2001; Magnadóttir, 2006; Lovy *et al.*, 2009). Es importante señalar que el sistema inmune innato constituye un mecanismo de defensa fundamental en peces a través de sus componentes humorales y celulares (Magnadóttir, 2006).

Con respecto a los principales órganos linfoides en teleósteos, destacan el timo, riñón cefálico (pro y mesonefros) y el bazo (Patel *et al.*, 2009).

El timo es un órgano par localizado subcutáneamente en el borde dorsal del opérculo, produce linfocitos T implicados en la estimulación de la fagocitosis, y en la producción de anticuerpos por las células B (Ellis 1988; Zapata *et al.*, 2006). El fenómeno de involución tímica es más dependiente de los ciclos hormonales y de las variaciones estacionales que de la edad. Se compone mayoritariamente de células linfoides, llamados timocitos, en distintos estadios de maduración, dispuestos en una red formada por células epitelio-reticulares. También por células mieloides del tipo macrófagos y granulocitos eosinófilos (Zapata *et al.*, 2006). En alevines muy jóvenes la cápsula que lo reviste se compone de una capa de células que aísla a los timocitos del agua, sin embargo, presenta fenestraciones o poros que sugieren que puede haber contacto directo entre los antígenos externos y el órgano que desaparece cuando los peces alcanzan la madurez (Zapata *et al.*, 2006).

El riñón, macroscópicamente es un órgano homogéneo, que está dividido en dos segmentos uno anterior y otro posterior. El riñón anterior está constituido fundamentalmente por tejido linfohematopoyético, análogo a la médula ósea de los mamíferos, en el que se produce la eritropoyesis, granulopoyesis y linfopoyesis (Razquin *et al.*, 1990). En él predominan los macrófagos responsables de la fagocitosis, los centros melanomacrofágicos (CMMs) para la formación de la memoria inmunológica por el procesamiento de antígenos, porque aquí se separa y concentra el material fagocitado, las células linfoides en todos sus estadios evolutivos, mayoritariamente células Ig⁺ (linfocitos B) (Agius y Roberts 2003; Tort *et al.*, 2003; Rauta *et al.*, 2012). El riñón anterior es un órgano bien innervado que sirve como órgano endocrino, homólogo a las glándulas suprarrenales en mamíferos, liberando corticoesteroides y otras hormonas. Así el riñón anterior es un órgano importante

con funciones regulatorias claves y órgano central de las interacciones inmune-neuroendocrinas y el sitio principal de la producción de anticuerpos (Rauta *et al.*, 2012).

El bazo es un órgano abdominal que es generalmente único, está recubierto por una cápsula fibrosa y no presenta una clara diferenciación entre pulpa blanca y pulpa roja, característica que lo diferencia del bazo de los mamíferos. Está compuesto por los CMMS y tejido linfoide (Ferguson, 1989). En los CMMS hay macrófagos que provienen de los capilares que irrigan el órgano donde han participado activamente en la fagocitosis de antígenos séricos (Press *et al.*, 1995). El bazo contribuye en la hematopoyesis, la degradación de antígenos y el procesamiento de anticuerpos (Rauta *et al.*, 2012).

En cuanto a las células del sistema inmunitario, está bien establecido que los peces teleósteos poseen monocitos/macrófagos, células citotóxicas no específicas (NCC), células agresoras naturales (*natural killer*, NK), granulocitos, células B y células T (Pettersen *et al.*, 2000; Rønneseth *et al.*, 2007; Randelli *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2009; Øverland *et al.*, 2010). Las principales células del sistema inmune innato son los macrófagos cuya función esencial es la fagocitosis, además, producen una variedad de citoquinas tales como interleuquinas, interferones y factor de necrosis tumoral, que regulan la respuesta inmune (Mulero *et al.*, 2008). Existen tres tipos de granulocitos identificados en peces, los neutrófilos, eosinófilos y basófilos (Øverland *et al.*, 2010). Estas células son fagocitos no profesionales porque tienen sólo cierta capacidad fagocítica, es decir, un limitado rango de ingesta de partículas, no pueden producir especies reactivas del oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) y producen citoquinas diferentes a las que producen los macrófagos. Los neutrófilos son las primeras células circulantes que son reclutados para llegar al sitio de infección, donde se activan y regulan por citoquinas (Øverland *et al.*, 2010).

En los peces, las células B, producen predominantemente IgM a diferencia de los mamíferos que expresan cinco clases de inmunoglobulinas nombradas según su isotipo de cadena pesada (IgA, IgD, IgE, IgM e IgG) (Zwollo *et al.*, 2005). Recientemente, han sido identificadas en peces isotipos de IgM, nombradas IgD, IgT o IgZ (Randelli *et al.*, 2008). La IgM de teleósteos existe como tetrámero (780 kDa), la concentración en suero es menor a 1mg/ml (Magnadóttir, 1998). El número de células B es alto en riñón, sangre y bazo, en el timo y tejido linfoide asociado a mucosas es bajo, estas células son consideradas fagocitos no profesionales (Øverland *et al.*, 2010).

Los linfocitos T, son los principales efectores en la defensa inmune adquirida, reconoce y responde a péptidos antigénicos asociados a las moléculas MHC clase I y II presentes en las células somáticas y en las células inmunitarias respectivamente (Randelli *et al.*, 2008). Genes codificando MHC clase I y II, TCR y sus co-receptores CD8 y CD4 han sido clonados en varias especies de peces y se han desarrollado anticuerpos para estudiar la expresión proteica en el contexto de su morfología y funcionalidad (Fisher *et al.*, 2013).

A pesar de la ausencia de anticuerpos reactivos, varias observaciones ofrecen tentadoras evidencias de que células homólogas a células dendríticas de mamíferos (mDCs) existen en peces. Esta evidencias incluyen: 1) la descripción de una red de células positivas a MHC clase II en áreas ricas en células T del bazo de *Nurse Shark* (Rumfelt *et al.*, 2002); 2) cultivos celulares esplénicos de trucha cuya mantención en el tiempo origina células no adherentes designadas como células dendríticas DCs basadas en su morfología (Ganassin *et al.*, 1996); 3) la identificación de los granulos de tipo Birbeck en las células de tejido linfoide y epitelio branquial de salmónidos (Lovy *et al.*, 2008); 4) la descripción de una línea celular fagocítica tipo células dendríticas desde Salmón del Atlántico (Pettersen *et al.*, 2008); y 5) la inmunotinción de células en el bazo y riñón anterior de salmón del Atlántico y trucha arcoíris con un anticuerpo específico CD207/langerin (antígeno expresado en la superficie de células dendríticas de mamíferos de la piel, especializadas denominadas células de langerhans) (Lovy *et al.*, 2009). Adicionalmente, Lugo-Villarino *et al.*, (2010) describieron la existencia de APCs dendríticas en Zebrafish basados en la morfología, características de tinción y ensayos funcionales. Mientras estas observaciones indican la existencia de células dendríticas (DCs), la caracterización funcional con respecto a los tipos celulares relevantes, específicamente con respecto a la presentación de antígenos, aun es débil. La función de las células dendríticas (DCs), células presentadoras de antígenos (APCs) especializadas es en gran parte un resultado de su capacidad para expresar altos niveles de moléculas coestimuladoras (Bassity *et al.*, 2012).

Un paso crucial en la iniciación de los mecanismos de defensa inmune innata, es el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), ligandos de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Rebl *et al.*, 2010). Las células de la inmunidad innata expresan diversos PRRs, tales como los receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo RIG-1(ácido retinoico inducible del gen 1) y los receptores tipo NOD (dominio de oligomerización de unión a nucleótidos) (Kumar *et al.*, 2009) (Fig.2.3). Estos receptores presentes en varios compartimentos celulares, desencadenan la expresión de citoquinas e interferones tipo I (Rebl *et al.*, 2010).

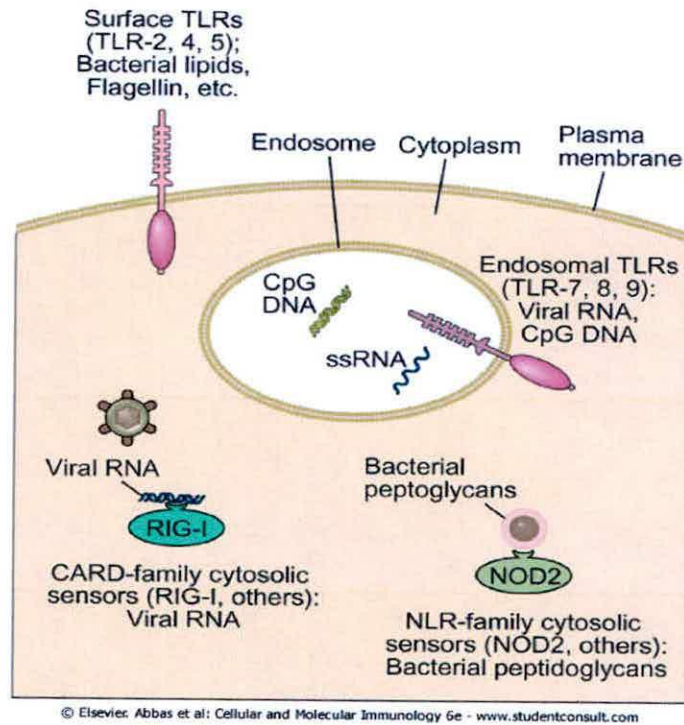


Figura 2.3. Localización celular de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs).

Las citoquinas son una familia de moléculas secretadas y regulatorias con una actividad tipo hormona y con una masa molecular que va desde 10 a 50 kDa, las cuales a menudo son glicosiladas (Scapigliati *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2013). Su rol en la iniciación de los eventos inflamatorios en respuesta a la exposición bacteriana es bien conocido en mamíferos, donde una cascada de citoquinas permite la atracción de tipos particulares de leucocitos y la activación de su vía antimicrobiana (Secombes *et al.*, 2009). Son producidas transitoriamente y localmente, actuando de manera paracrina o autocrina, pueden inducir una respuesta con tan solo cantidades en el rango de picomolar (Scapigliati *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2013).

Dentro de las citoquinas involucradas en la inmunidad innata se encuentran, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que es la primera citoquina liberada en esta cascada de señalización y que permite la expresión río abajo de la interleukina IL- β y quimioquinas como IL-8 (Secombes *et al.*, 2009). Estas citoquinas han sido identificadas en varias especies de peces, sus funciones y señalización han sido investigadas con grandes progresos (Zhu *et al.*, 2013).

IL-1 β y TNF- α han sido ampliamente usados como marcadores para evaluar una respuesta inflamatoria general en mamíferos, principalmente en la evaluación de inmunoestimulantes ya que los niveles de transcripción de estas dos citoquinas pueden generar la inducción de la respuesta inflamatoria o no por el inmunoestimulante (Zhang *et al.*, 2009). Son citoquinas de respuesta temprana en inflamación y regulan la producción de muchas citoquinas (Zhang *et al.*, 2009).

IL-8 fue primero identificada en mamíferos como una nuevo tipo de citoquina activando neutrofilos y denominada CXCL8 por ser miembro de la sub-familia CXC de quimioquinas, es producida por una amplia variedad de células en respuesta a muchos tipos de estímulos (Abdelkhalek *et al.*, 2009). Es una quimioquina que genera cambios bastante dinámicos en sus niveles de expresión, en tejidos sanos es apenas detectable pero su expresión puede ser inducida rápidamente de 10 a 100 veces por varios inductores, los que incluyen TNF- α , IL-1 β , bacterias, productos virales o estrés celular (Abdelkhalek *et al.*, 2009). La función principal es promover la activación y reclutamiento de neutrófilos a las áreas de inflamación aguda y su subsecuente adherencia a células endoteliales (Harun *et al.*, 2008; Abdelkhalek *et al.*, 2009).

2.3 Receptores tipo toll

Los receptores tipo toll (TLR) son proteínas de transmembrana con una masa molecular en un rango de 89 a 120 kDa en mamíferos (Kirschning *et al.*, 2001). Con dominios extracelular, transmembrana e intracelular (Fig.2.4). El dominio N-terminal extracelular tiene aproximadamente 16-28 repeticiones ricas en leucina (LRRs), cada una de estas repeticiones tiene entre 20-30 aminoácidos con el motivo "LXXLXXN" conservado (Kumar *et al.*, 2009). El dominio C-terminal de señalización citoplasmático posee un dominio TIR (receptor Toll/IL-1) el que es requerido para la interacción y reclutamiento de varias moléculas adaptadoras que activan la vía de señalización río abajo (Kirschning *et al.*, 2001; West *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009). Permitiendo la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), el cual controla la inducción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, así como la sobre-regulación de moléculas coestimuladoras en células dendríticas, esenciales para la activación de células T *naïve* (Means *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 2007).

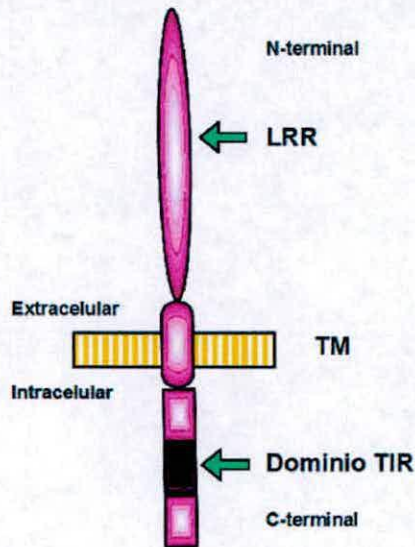


Figura 2.4. Estructura de un receptor tipo toll (TLR). En el dominio extracelular, LRR, corresponde a una región rico en leucinas. El TIR corresponde a un dominio citoplasmático del receptor IL-1 / Toll, TM corresponde al dominio de transmembrana (Sandor *et al.*, 2005).

En mamíferos los TLRs han sido descritos en macrófagos, granulocitos, células dendríticas (DCs) y células B, así como también en células no inmunes, como fibroblastos, células epiteliales y queratinocitos (Kawai *et al.*, 2007). La familia de los TLRs en mamíferos está compuesta por más de 11 tipos, cada uno liga en forma específica distintos PAMPs, derivados de virus, bacterias, protozoos y hongos (Akira y Sato 2003). En peces se han descrito 17 tipos de TLRs (TLR1, 2, 3, 4, 5, 5S, 7, 8, 9, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23) los que se han identificado en más de una docena de especies de teleósteos, con claros ortólogos de los TLRs de mamíferos (Rebl *et al.*, 2010).

Los PAMPs incluyen lipopolisacaridos (ligando de TLR4), lipoproteínas (ligando de TLR2), flagelina (ligando de TLR5), ADN bacterial CpG (ligando de TLR9), RNA de hebra simple (ligando TLR7) y RNA viral de hebra doble (ligando de TLR3) (Kawai *et al.*, 2007). Los TLRs tanto en mamíferos como en peces pueden actuar como monómeros o dímeros en el reconocimiento del PAMP (Purcell *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009).

El análisis filogenético molecular de varios componentes claves de la cascada de señalización de los TLRs, da como resultado que las moléculas activadas son altamente conservadas entre peces y mamíferos (Purcell *et al.*, 2006; Rebl *et al.*, 2010). Leucocitos de Trucha estimulados con diferentes PAMPs, reconocidos como activadores de TLRs de mamíferos, responden con la expresión de tres

clases de genes de citoquinas comunes para ambos grupos: a) interferon tipo I, b) citoquinas pro-inflamatorias (isoforma 1 de interleuquina-1 β , interleuquina-8 y la isoforma 1 y 2 del factor de necrosis tumoral alfa) y c) citoquina inmunoregulatoria de transformación del factor de crecimiento beta 1 (TGFbeta) (Purcell *et al.*, 2006).

El análisis genómico de diferentes especies de peces, utilizando como modelo pufferfish (*Takifugu rubripes*) y zebrafish (*Danio rerio*), ha permitido el estudio de TLR específicos, aumentando el conocimiento de la especificidad de patógenos y patrones de expresión de los TLRs y sus adaptadores en teleósteos (Baoprasertkul *et al.*, 2007).

De los 17 tipos de TLRs identificados en peces, solo se ha encontrado evidencia directa de la especificidad de su ligando para 5 de estos TLR, los que incluyen: TLR2, TLR3, TLR5M, TLR5s y TLR22 (Tabla 1).

Tabla 2.1
Ligandos específicos conocidos para algunos TLRs en peces. Adaptado de Palti, 2011.

TLR	Especies de peces	Ligando
TLR2	<i>Fugu</i> <i>Zebrafish</i> <i>Common carp</i>	Lipopéptidos Pam ₂ CSk ₄
TLR3	<i>Fugu</i> <i>Zebrafish</i>	dsRNA, polyI:C
TLR5S	<i>Fugu</i> <i>Rainbow trout</i>	Flagelina
TLR5M	<i>Fugu</i> <i>Rainbow trout,</i>	Flagelina
TLR22	<i>Fugu</i> <i>Zebrafish</i>	dsRNA, polyI:C

Por lo tanto, el reconocimiento de los PAMPs por los TLR es un paso clave para la inducción de la respuesta inflamatoria, así como para la instrucción de la respuesta adaptativa contra patógenos. El reconocimiento de los PAMPs por los TLRs permite al sistema inmune innato distinguir entre clases de

patógenos y coordinar respuestas inmunes innata y adaptativa, la que es lograda por la inducción diferencial de citoquinas y moléculas coestimuladoras dependiendo del tipo de agonista usado, los tipos celulares estimulados, y el repertorio de TLRs expresados por las diferentes células (Kumar *et al.*, 2009).

2.4 Flagelina

El sistema inmune reconoce PAMPs expresados en la superficie de agentes infecciosos pero no en células del hospedero. Bacterias Gram negativas móviles expresan en su superficie el flagelo, el cual les permite desplazarse a través de los tejidos durante la infección contribuyendo, además, en la virulencia de bacterias patogénicas (Takeda *et al.*, 2003).

La flagelina es una proteína monomérica de 55 kDa (Akira y Sato, 2003), la cual posee una estructura altamente compleja, siendo el componente principal del flagelo de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y el ligando del receptor tipo Toll 5 (TLR5) (Eaves-Pyles *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001). La activación del TLR5 en mamíferos, moviliza el factor nuclear NF- κ B y estimula la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF, IL-8), permitiendo de esta manera la activación de respuestas inmunes innatas (Hayashi *et al.*, 2001). Los genes de flagelina de una variedad de bacterias Gram negativas comparten regiones altamente conservadas en su amino y carboxilo terminal, y estas regiones son responsables para la actividad inmunoestimuladora de flagelina (Eaves-Pyles *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2003).

Flagelina FliC de *Salmonella typhimurium* ha sido cristalizada y su estructura molecular caracterizada (10.2210/pdb1UCU/PDB), posee cuatro dominios conectados linealmente denominados D0, D1, D2 y D3, los cuales están organizados desde el interior al exterior del filamento (Fig.2.5). El N-terminal de la cadena se inicia desde el dominio D0, pasando a través del dominio D1, D2 llegando a D3 y a continuación vuelve a través de D2 y D1, terminando con el C-terminal de la cadena en D0. Los tres dominios de conexión están formados por pares de cadenas antiparalelas cortas, y las que conectan los dominios D0 y D1 son conocidos como región *spoke* (S) (Yonekura *et al.*, 2003).

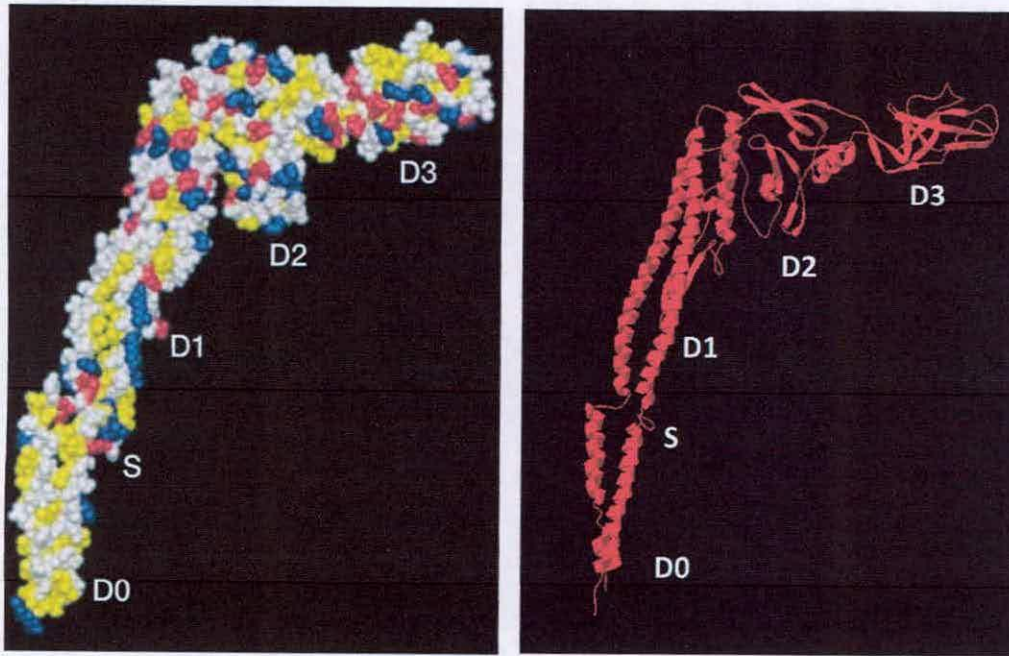


Figura 2.5.- Estructura cristalizada de flagelina de *Salmonella typhimurium*. D0: Dominio D0, D1: Dominio D1, D2: Dominio D2, D3: Dominio D3, S: región Spoke.

Una gran variedad de bacterias flageladas ha sido rastreada por su capacidad de ser reconocida por el TLR5, estimulando el TLR5 de manera dependiente de la activación NF- κ B (Akira y Sato, 2003). TLR5 humano y de ratón reconocen la flagelina bacteriana y envían la señal para activar el factor de transcripción NF- κ B. TLR5 junto con TLR4 también activan el factor 3 regulador del interferón (IRF-3) en respuesta a flagelina (Tsujita *et al.*, 2006). Sin embargo, algunas bacterias flageladas (Proteobacterias ϵ y β) que sintetizan flagelinas no son reconocidas por TLR5 a pesar de su vigorosa motilidad (Andersen-Nissen *et al.*, 2005). Flagelina de *S. typhimurium* sufre N-metilación de los residuos de lisina en la superficie expuesta del flagelo (Burnens *et al.*, 1997) y glicosilación en algunas bacterias como *P. aeruginosa* (Arora *et al.*, 2001). Experimentos realizados para producir vacunas recombinantes a través de la expresión de antígenos foráneos de la superficie del flagelo, han dado cuenta que la metilación podría afectar la antigenicidad de estos epítopes, modificando o suprimiendo la respuesta inmune dirigida contra ellos (Burnens *et al.*, 1997). Sin embargo, en experimentos utilizando flagelina, FliC de *Salmonella typhimurium* expresada y secretada en células CHO (Ovario de Hamster Chino) se determinó que las modificaciones post-traduccionales de la flagelina no son requeridas para el reconocimiento de TLR5 (Smith *et al.*, 2003). La flagelina induce la vía de señalización de TLR5 en una variedad de tipos celulares de mamíferos, como monocitos, células dendríticas, y células epiteliales positivas a TLR5 (Hayashi *et al.*, 2001; McSorley *et al.*, 2002; Mizel *et al.*, 2002). Flagelina, FliC de *S. typhimurium* puede estimular células del epitelio intestinal y liberar

mediadores proinflamatorios claves como IL-8 (Gewirtz *et al.*, 2001), contribuyendo también a la activación de células T CD4+ en el intestino (McSorley *et al.*, 2002). Aumenta la expansión clonal de células T CD4+ *in vivo* e induce la producción de interferón- γ (IFN- γ) *in vitro* (McSorley *et al.*, 2002). Algunas flagelinas también son capaces de inducir la producción de IL-8 a través de la activación de NF- κ B dependiente de TLR5 y a través de la señalización de MAPK (Harrison *et al.*, 2008).

Por tanto, la actividad de flagelina como un ligando específico para TLR5 proporciona un puente potencialmente importante entre la respuesta inmune innata y adaptativa. La comprensión de cómo esta molécula es capaz de estimular a TLR5 se basa en diversos estudios. Se ha demostrado que flagelina, FliC de *E. coli* enteroagregativa posee dos regiones en el dominio D1 conservado que son requeridos para la activación de TLR5 y liberación de IL-8 (Donnelly *et al.*, 2002). A través de ensayos bioquímicos, se ha demostrado que mutantes que carecen de los residuos 386-407 del dominio extracelular de TLR5 son incapaces de interactuar con flagelina, lo que hace referencia a que ésta se uniría directamente a TLR5 a través de estos residuos (Mizel *et al.*, 2003). Smith *et al.*, (2003) comparó las secuencias aminoácidas de flagelinas desde diferentes bacterias, conocidas por tener actividad estimuladora de TLR5 e identificó los residuos de aminoácidos conservados en estas regiones del dominio D1 de flagelina que podrían ser esenciales para el reconocimiento del TLR5 en mamíferos (Fig. 2.6). Realizó experimentos de mutagenesis de alanina (*Alanine-scanning mutagenesis*) y generó 22 mutantes, de las cuales, 9 no afectaron significativamente el reconocimiento del TLR5, 3 reducen significativamente el reconocimiento del TLR5 en un 50-75 % (N100A, D412A y R431A) y 10 reducen significativamente el reconocimiento del TLR5 en un 76-97 % (L88A, Q89A, R90A, L94A, Q97A, E114, I411, L415, T420A y L425A).

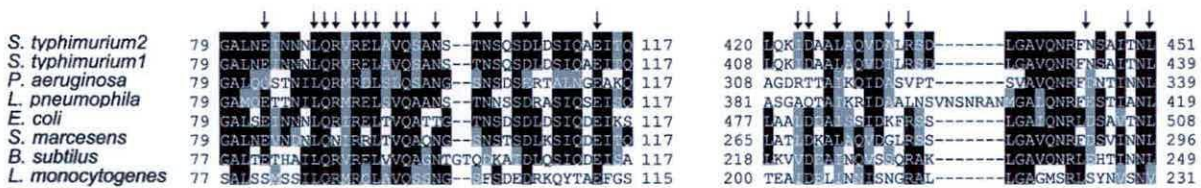


Figura 2.6.- Secuencias proteicas de flagelinas de bacterias que estimulan el TLR5 en mamíferos. Las secuencias fueron alineadas con ClustalW, las flechas indican los residuos de aminoácidos que fueron mutados a alanina en flagelina (Smith *et al.*, 2003)

Además, en flagelina, FlhC de *P. aeruginosa* cepa PAO1 se ha identificado una secuencia de 10 aminoácidos (LQRIRDLALQ, aminoácidos 88 al 97) en el extremo N-terminal de flagelina, que participa en la unión de esta proteína a su receptor (Verma *et al.*, 2005).

Por lo tanto, flagelina es una proteína bacteriana altamente conservada que provoca respuestas inflamatorias dependientes de TLR5. *In situ* juega un rol importante en la patogenicidad bacteriana porque facilita la motilidad y la adhesión a los tejidos del huésped, siendo un potente activador inmune.

Con respecto a peces teleosteos, el primer TLR5 que se identificó en peces óseos es una forma soluble sin dominio de transmembrana y sin dominio TIR de trucha arcoiris (Tsujita *et al.*, 2004; Fig. 2.7). Esta forma soluble de TLR5 también se ha identificado en pufferfish (Oshiumi *et al.*, 2003), salmón del atlántico (Tsoi *et al.*, 2006), catfish (Baoprasertkul *et al.*, 2007) y *Sparus aurata* (Muñoz *et al.*, 2013), además de su forma unida a la membrana (TLR5M, Fig. 2.7). Sin embargo, ninguna forma de TLR5 soluble ha sido identificada en el genoma de mamíferos (Baoprasertkul *et al.*, 2007).

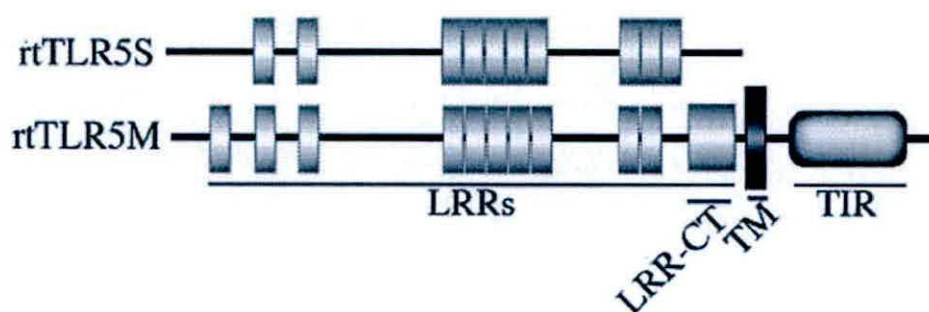


Figura 2.7.- Representación esquemática de la organización de TLR5M y TLR5S de trucha arcoiris. LRRs: corresponde a las repeticiones ricas en leucinas, LRR-CT: Región C-terminal que se asemeja a un dominio LRR, TM: dominio de transmembrana, TIR: corresponde a un dominio citoplasmático del receptor de IL-1/Toll (Tsujita *et al.*, 2004).

Además, se ha observado que en trucha TLR5 de membrana es expresado ubicuamente, mientras que su forma soluble se expresa solo en el hígado (Tsujita *et al.*, 2004). En catfish TLR5S no solo se expresa en el hígado sino también en riñón anterior, bazo, agallas, piel, ovario y cerebro (Rebl *et al.*, 2010). Un perfil similar se ha encontrado en pufferfish, el cual presenta una fuerte expresión de TLR5S en órganos digestivos. Además, en catfish la expresión de TLR5 es aumentada en todos los

tejidos después de la infección con *Edwardsiella ictulari*, un patógeno flagelar, observándose que TLR5M y TLR5S se unen a flagelina *in vitro* (Bilodeau *et al.*, 2006). Experimentos realizados para generar una quimera de TLR5S de trucha fusionado al dominio TIR intracelular de TLR5 humano, transfectada en células HeLa humana, fue capaz de activar el promotor de un gen reportero en respuesta a flagelina (Tsukada *et al.*, 2005). En la línea celular RTH149 de trucha, TLR5S es sobre regulado dentro de 8 horas después de un desafío con *Vibrio anguillarum* o flagelina purificada. Estos resultados, sugieren que en peces TLR5S es una proteína de fase aguda que censa la infección bacteriana a través del reconocimiento de una variedad de flagelinas para aumentar la activación de NF-kappaB, y puede ser importante para la sobrevivencia de los peces con infección bacteriana en el agua (Tsukada *et al.*, 2005). Se ha desarrollado un mecanismo hipotético para la detección de flagelina en trucha arcoiris, donde, la estimulación de TLR5M con flagelina causa la inducción de TLR5S en el hígado, uniéndose eficientemente a flagelina circulante, pudiendo activar a TLR5M, lo que provoca la amplificación de la señalización en un *feedback* positivo (Tsujita *et al.*, 2004).

2.5 Inmunomodulación por Flagelina

La inmunomodulación puede ser definida como una acción fisiológica ejercida sobre el sistema inmune para generar una mayor defensa ante agresiones externas, esta puede ser ejercida a través de sustancias de origen biológico o químico para estimular o suprimir la respuesta inmunológica. La mayoría de estos inmunomoduladores actúan sobre células del sistema inmunitario induciendo la liberación o inhibición de diferentes mediadores. Están asociados a moléculas altamente conservadas en los microorganismos denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), pudiendo ser reconocidos por distintos tipos de receptores presentes tanto en leucocitos como en células epiteliales. Entre estos PAMPs se encuentra la flagelina que es el principal componente del flagelo en bacterias Gram positivas y Gram negativas y es el ligando que activa específicamente los receptores Toll tipo 5 (TLR5) (Smith *et al.*, 2003).

El rol que tendría flagelina en la inmunidad de los peces es de gran importancia principalmente en la Trucha arcoiris, al presentar dos isoformas de TLR5, una isoforma de membrana y otra soluble (Tsujita *et al.*, 2004, Baoprasertkul *et al.*, 2007). Experimentos realizados en la línea celular de hepatoma de Trucha arcoiris RTH-149, han dado cuenta que la estimulación de TLR5M con *Vibrio anguillarum* o flagelina permite la regulación de TLR5S, y que la activación de NF-kB por flagelina es más significativa en la presencia del estímulo o expresión de TLR5S. Flagelina primero induce la activación

basal de NF- κ B vía TLR5M facilitando la producción de TLR5S y un mínimo de proteínas de fase aguda en el hígado. Luego la expresión de TLR5S inducible captura la flagelina bacteriana en la circulación y la lleva a TLR5M, el cual actúa como un receptor de señalización amplificando la respuesta celular en un *feedback* positivo (Tsuji *et al.*, 2004). Por lo tanto, TLR5S en los peces estaría generando un efecto sistémico amplificando la respuesta inflamatoria generada por TLR5 de membrana, donde las células inmunes aumentan la sensibilidad a flagelina.

Además se conocen efectos locales generados por flagelina de *Vibrio anguillarum* en leucocitos aislados de riñón cefálico de Trucha arcoíris, donde la estimulación de los leucocitos con dos diferentes dosis de flagelina (1 y 10 μ g/mL) genera una sobre regulación de la expresión de citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL1 β y la quimioquina IL-8 (Purcell *et al.*, 2006). Los efectos de flagelina a nivel de la inmunidad innata han sido comprobados en peces, sin embargo, todos los antecedentes que existen hasta la fecha son a nivel transcripcional, debido principalmente a la escasez de herramientas adecuadas para poder medirlo a nivel de fenotipo.

Antecedentes de experimentos realizados en mamíferos dan cuenta que el estímulo de flagelina-TLR5 no solo afectaría la respuesta inmune innata sino también la adaptativa. Flagelina ha sido estudiada como un modelo de antígeno útil, blanco de células T CD4 murino durante la infección con *Salmonella Typhimurium*. Además de ser blanco del sistema inmune adaptativo, flagelina bacteriana puede activar directamente respuestas inmunes innatas en monocitos y células epiteliales, donde la exposición de flagelina *in vitro* a estas células activa NF- κ B y secreta citoquinas inflamatorias. Esta capacidad inmunoestimuladora en mamíferos estaría siendo ejercida por TLR5 expresado en la superficie de monocitos, células dendríticas inmaduras y células epiteliales (McSorley *et al.*, 2002).

Un estudio reciente comparó la eficacia de la formulación de una vacuna suplementada con un adyuvante basado en 4 flagelinas de *V. anguillarum* (FlaA, FlaB, FlaD y FlaE) utilizando como modelo lenguado japonés (Japanese Flounder), demostrándose que flagelina, FlaB recombinante de *V. anguillarum* posee una fuerte inmunogenicidad e induce una protección significativamente alta *in vivo*, medida como porcentaje relativo de supervivencia, sugiriendo que podría ser utilizada como vacuna o inmunoestimulante en el control de las enfermedades en peces asociados con *V. anguillarum* u otros patógenos (Jia *et al.*, 2013).

2.6 Uso y evaluación de inmunoestimulantes en peces

Los inmunoestimulantes activan mecanismos celulares no específicos de la inmunidad innata, por lo que la mayoría de los estudios de evaluación de los efectos inmunológicos de éstos como candidatos para su uso, se basan en la activación de macrófagos y granulocitos (Fierro-Castro *et al.*, 2012). Son seguros y efectivos para la protección de la salud de los peces cultivados, mejoran la inmunidad innata, proporcionando protección contra una gran variedad de patógenos de peces (Sakai, 1999).

Los mecanismos por los cuales los inmunoestimulantes aumentan la protección contra los patógenos es mediada por el reconocimiento específico de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los que son reconocidos por los PRRs en las células del huésped (Akira *et al.*, 2004, 2006). La unión de éstos receptores con sus respectivos PAMPs, desencadena las vías de señalización intracelular permitiendo la producción y liberación de citoquinas pro-inflamatorias, generando una respuesta inmune innata (Rebl *et al.*, 2010).

En peces, el desarrollo de los inmunoestimulantes se basa en la utilización de PAMPs como, LPS, β -glucanos y RNAs doble hebra, los cuales aumentan la protección no específica por activación de las respuestas proinflamatorias y actividad microbicida a través de los PRRs (Sakai, 1999; Iliev *et al.*, 2005; Strandskog *et al.*, 2008; Fierro-Castro *et al.*, 2012).

Sin embargo, para otros inmunoestimulantes tipo levamisol, los mecanismos por los cuales provocan respuestas proinflamatoria y microbicida no es del todo claras. Además modificaciones en la forma molecular y procesamiento de purificación de los PAMPs usados como inmunoestimulantes pueden dar lugar a diferencias notables en la respuesta inmune como se ha demostrado para el LPS (Iliev *et al.*, 2005). No todas las especies de peces cultivados responden de la misma manera a un inmunoestimulante, ya que existen diferencias genéticas y adaptativas importantes entre ellos que afectan el sistema inmune de los peces (Bricknell *et al.*, 2005).

Varios estudios en peces, han demostrado que los β -glucanos son un inmunoestimulante potente, el cual permite mejorar el estado inmunológico y controlar enfermedades en peces de cultivo (Meena *et al.*, 2012). Se ha demostrado que el efecto de los β -glucanos varía con la especie de estudio, y depen-

de la cantidad incorporada en la dieta, la duración en la alimentación y temperatura ambiental. Los β -glucanos solubles pueden ser absorbidos por el intestino y por tanto ser nutritivos. Se ha demostrado su efecto en: inmunoestimulación de peces sanos, inmunoestimulación en peces inmunocomprometidos, inmunoestimulación por inyección (así como su efecto adyuvante), estimulación de la inmunidad adaptativa (Lin *et al.*, 2011; Meena *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que flagelina, FlaD recombinante de *V. anguillarum* utilizada con un adyuvante con el antígeno LPH (hemocianina de polyphemus hemolymph) en un estudio de inmunización dosis-respuesta, estimula el sistema inmune innato del salmón, induciendo efectos proinflamatorios en los días 2, 4 y 7 y la expresión de citoquinas importantes como TNF α , IL-6, IL-8 e IL-1 β las que fueron sobre-reguladas significativamente en el bazo (Hynes *et al.*, 2011).

Un estudio reciente comparo la eficacia de la formulación de una vacuna suplementada con adyuvante basado en 4 flagelinas, FlaA, FlaB, FlaD y FlaE de *V. anguillarum*, utilizando como modelo lenguado japonés (Japanese Flounder), encontrándose que estas flagelinas difieren en sus propiedades inmunoestimulantes y exhiben niveles variados de inmunoprotectividad y adyuvancia, sugiriendo que flagelina de *V. anguillarum* podría ser utilizada como vacuna o inmunoestimulante en el control de las enfermedades en peces asociados con *V. anguillarum* u otros patógenos (Jia *et al.*, 2013).

En base a los antecedentes antes mencionados, flagelina de una gran variedad de bacterias presenta un alto grado de conservación respecto de su dominio D1 (Anexo II, figura 1), dominio importante para el reconocimiento de su receptor y considerando que la estructura de flagelina de *S. typhimurium* está cristalizada, podemos predecir la estructura de flagelina de *V. anguillarum* y proponer que flagelina y péptidos derivados del dominio D1 de esta proteína, al presentar un alto grado de homología en los residuos de aminoácido descritos, pueden activar leucocitos de peces induciendo la sobreexpresión de moléculas claves en la respuesta inmune innata de éstos.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El dominio ND1 y péptidos derivados del dominio D1 de flagelina de *Vibrio anguillarum* producen efectos inmunoestimuladores de tipo pro-inflamatorio en leucocitos de peces.

OBJETIVO GENERAL

Comprobar el efecto inmunoestimulador del dominio ND1 y péptidos sintéticos derivados del dominio D1 de flagelina de *Vibrio anguillarum* en leucocitos de peces teleósteos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar *in silico* regiones conservadas y residuos de importancia funcional del dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum*.
2. Obtener el dominio ND1 recombinante y los péptidos sintéticos diseñados derivados de flagelina de *V. anguillarum*.
3. Demostrar el efecto inmunoestimulador de las moléculas generadas en base a modelos estandarizados de cultivo celular primario en diferentes peces teleósteos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material Biológico

4.1.1. Peces

Los peces utilizados en este trabajo fueron dos especies, trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) y dorada (*Sparus aurata*). Las truchas fueron de un tamaño de 50 g y proporcionadas por el animalario de la Universidad Miguel Hernández de Elche, España. Además de truchas de 100 – 200 g, que fueron obtenidas desde el Laboratorio Experimental de Acuicultura de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile (LEDA). Las doradas utilizadas tenían un peso de 300-500 g y fueron proporcionadas por el Centro Oceanográfico de Murcia, España.

4.1.2. Ratones

Se utilizaron hembras de 2 semanas de gestación, cepa CF-1, las que fueron obtenidos del Instituto de Salud Pública de Chile y trasladados al biotério de la Universidad Católica de Valparaíso, donde fueron mantenidos y aclimatados por al menos 2 semanas antes de ser inmunizados.

Todos los animales fueron manipulados de acuerdo a normas internacionales que considera el bienestar animal.

4.2. Diseño de secuencias epítopes para TLR5S de trucha arcoíris y Flagelina de *V. anguillarum*

Para la generación de anticuerpos se realizó un análisis *in silico* de la secuencia primaria de la moléculas, identificandose epítopes inmunogénicos a través del método de Kolaskar y Tongaonkar (1990), usado desde el servidor de bioinformática del grupo de inmunomedicina de la Universidad de Complutense de Madrid [<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>]. Además se analizaron los parámetros de hidrofobicidad, flexibilidad y accesibilidad a través del servidor Expasy (Gasteiger *et al.*, 2003). Se realizó la búsqueda de las estructuras tridimensionales, PDB, de las moléculas de interés a través del servidor *RCSB Protein Data Bank* y se proyectó la estructura para insertar las secuencias candidatas a

epítopes a través del programa Swiss-PdbViewer 4.0.1., donde las secuencias más expuestas fueron seleccionadas como epítopes.

4.3. Diseño de péptidos derivados del dominio D1 de flagelina de *Vibrio anguillarum*.

Las regiones de flagelina de *Vibrio anguillarum* que potencialmente se asocian a TLR5 en salmónidos, se identificaron a partir de la secuencia de flagelina de *Salmonella typhimurium*, disponible en base de datos con su estructura cristalizada (10.2210/pdb1UCU/PDB) (Yonekura *et al.*, 2003). Se realizaron alineamientos a través de ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) para determinar los dominios conservados entre las distintas secuencias de flagelinas disponibles en base de datos de secuencia proteicas del servidor UniProtKB. Una vez identificados los dominios responsables de la interacción de flagelina con el TLR5, y que son conservados en las distintas flagelinas, se identificaron los residuos de aminoácidos responsables de la activación de este receptor de acuerdo a lo señalado por Smith *et al.*, (2003). Una vez obtenidos, se establecieron como candidatos en la secuencia de flagelina de *V. anguillarum*. Posteriormente, utilizando el programa Swiss-PdbViewer 4.0.1, se generó la estructura 3D de flagelina de *V. anguillarum* a partir del PDB de Flagelina de *S. typhimurium*, obteniendo los péptidos candidatos a través de la superposición de ambas estructuras.

4.4. Síntesis química de secuencias epítopes y péptidos derivados de flagelina de *Vibrio anguillarum*

Para la síntesis química se utilizó la técnica en fase sólida mediante la estrategia de bloqueo Fmoc de los grupos funcionales de los aminoácidos (Houghten, 1985). Los aminoácidos utilizados para la síntesis de los diferentes péptidos tienen su grupo funcional bloqueado con el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc). Para la síntesis de cada uno de los péptidos, la adición de cada uno de los aminoácidos se realizó primero con la desprotección del grupo funcional Fmoc, a través de la adición de 20 % (v/v) piperidina en dimetilformamida (DMF). Para comprobar que los grupos aminos están desprotegidos y dispuestos para un nuevo acople, se realizó el test de ninhidrina o test de Kaiser (Kaiser *et al.*, 1970; Narvaez *et al.*, 2010). Luego de la desprotección se realizó la adición del aminoácido protegido con su grupo funcional Fmoc junto con los reactivos de acoplamiento 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en exceso de tres equivalentes con agitación ocasional y durante 3 horas, posteriormente se realizó el test de ninhidrina para comprobar la incorporación del aminoácido. Se realizó este procedimiento hasta la adición del último aminoácido constituyente del péptido. Finalizada

la síntesis, fueron clivados de la resina con ácido trifluoroacético (TFA). La pureza de los péptidos se verificó por HPLC y su peso molecular a través de espectroscopia de masas MALDI-TOF. Los péptidos generados fueron numerados de acuerdo al orden en la peptidoteca del laboratorio de marcadores inmunológicos de organismos acuáticos de la PUCV.

4.5. Generación de anticuerpos

4.5.1. Inmunización

Los ratones fueron inmunizados los días 0, 7, 14 y 21 mediante una inyección intraperitoneal con 60 µg del péptido sintético y el péptido FIS, (1:1), como un activador de células T *helper* (Narvaez *et al.*, 2010), y con adyuvante completo de *Freud*. El día 6 se inyectó una dosis de *Pristane* (Sigma Aldrich) para inducir la formación de tumor ascítico (Narvaez *et al.*, 2010). El día 30, los ratones fueron anestesiados con pequeñas dosis de cloroformo y se drenó el líquido ascítico rico en IgG anti-péptido epítotope. El fluido fue centrifugado a 300 xg por 10 minutos y el sobrenadante rico en IgGs se recolectó, alicuotó y fue congelado a -80°C hasta su utilización.

4.5.2. Purificación de anticuerpos por CN-Br-4B

Para la purificación de IgGs desde el líquido ascítico, primero se realizó la unión del péptido sintético a la resina *CNBr-activated Separopore*[®] (Bio World), para lo cual se utilizó 200 mg de resina, la que se lavó con 1,5 mL de HCl 1,0 mM por 15 min a t° ambiente en agitador orbital. Se centrifugó a 3000 xg por 5 min a 4 °C y posteriormente se lavó con 1,5 mL de *Buffer* acoplante (NaHCO₃ 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8.4) por 2 min a t° ambiente en orbital y se centrifugó a 3000xg por 5 min a t° ambiente. Luego, se resuspendió 1,5 mg de péptido sintético liofilizado en *buffer* acoplante y se agregó 1 mL de éste a la resina, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en agitador orbital. Transcurridas las 2 horas, se centrifugó a 3000xg por 5 min, se recuperó el sobrenadante como péptido no retenido y se guardó a -20 °C. Se bloquearon los sitios activos no acoplados de la resina con Tris-HCl 0,1 M, pH 8.0 por 2 horas a t° ambiente en agitador orbital. Se centrifugó a 3000xg por 5 min a 4°C y se lavó la resina con 500 µL de acetato de sodio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4.0. Luego la resina fue puesta en una columna previamente preparada y se lavó con 20 volúmenes de resina, alternando entre acetato de sodio pH 4.0 y Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8.3. Luego se lavó 3-5 veces con *buffer* acoplante. Finalmente, se realizó la unión y elución de la IgG específica. Para esto, se diluyó 1:10 el líquido

ascítico con buffer acoplante y se cargó 1 mL de la dilución lentamente en la columna para asegurar la unión de la IgG al péptido. Para eluir las IgGs, se usó 1 mL de glicina 100 mM, pH 2.5. La fracción se recuperó en un tubo que contenía 120 µL de Tris 1 M, pH 8.0 y se guardó a -20 para su cuantificación.

4.5.3. Pruebas inmunológicas

Las IgGs de ratón purificadas se cuantificaron por ELISA directo, utilizando una IgG comercial de ratón como calibrado (Invitrogen). El inmunorreconocimiento positivo de la secuencia epítope de TLR5S de trucha arcoiris y flagelina de *V. anguillarum* se evaluó por *Dot blot* y cuantitativamente por ELISA indirecto (Narvaez *et al.*, 2010).

4.6. ELISA

Para la implementación del ensayo de ELISA indirectos, el antígeno (muestra biológica) fue absorbido a la placa de ELISA (NUNC-*immune plate plysorp surface*) a una concentración de 30 ng/µL y en un volumen final de 100 µL de tampón carbonato 0,06 M, pH 9.6, a temperatura ambiente y con agitación suave durante toda la noche. El bloqueo de la placa se realizó en un volumen final de 200 µL de BSA 1 % (p/v), por 2 horas a 37 °C con agitación suave. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con PBST (PBS 1X + 0,05% v/v Tween-20) luego de la incubación con el anticuerpo. La incubación con el primer anticuerpo (anti-TLR5S, anti-IL-8) se realizó a una concentración de 40 ng/µL en un volumen final de 100 µL de BSA 1% (p/v) en PBS 1X por 90 minutos a 37 °C y con agitación suave. El segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (*goat anti-mouse IgG (Fc) horseradish peroxidase*, #31437, termo Scientific) se preparó a una dilución de 1: 7000 en un volumen final de 100 µL de BSA 1% en PBS1X por 75 minutos a 37 °C y con agitación suave. Para revelar se utilizaron 100 µL del reactivo TMBLUE (invitrogen) por pocillo y se dejó incubando por 15 minutos a 37°C y con agitación suave. Para detener la reacción se utilizaron 50 µL de ácido sulfúrico por pocillo. La lectura se realizó a 450 nm.

4.7. Clonamiento de rFla y rND1 de *Vibrio anguillarum*

4.7.1. Clonamiento de flagelina y del extremo amino del Dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum*

Para la amplificación del gen de flagelina, *FlaB*, se utilizó una cepa de *Vibrio anguillarum* obtenido en el laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática de la Universidad Austral de Chile (NCIMB:6; ATCC19264, *Listonella anguillarum*). El ADN genómico fue extraído utilizando el kit “E.Z.N.A Tissue DNA” (Omega Bio-Teck) según protocolo descrito por el fabricante. El gen *FlaB* de flagelina completa de *V. anguillarum* se obtuvo por PCR, utilizando el ADN genómico de *Vibrio anguillarum*. Se clonaron las regiones codificantes de flagelina completa, conteniendo los aminoácidos del 1-376, denominada Fla y otra codificando una proteína más pequeña del extremo amino del dominio D1 de flagelina, denominada ND1, conteniendo los residuos de aminoácidos del 45 – 132. Los oligonucleótidos utilizados para su amplificación fueron diseñados a partir de la secuencia de ADN depositada en GenBank (N° acceso: U52198.1, McGee *et al.*, 1996) y descritos en el Anexo I (Tabla A.1.).

4.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de Fla y ND1 de *Vibrio anguillarum* se desarrolló en las siguientes condiciones: denaturación inicial de 95 °C durante 5 min y 30 ciclos de: denaturación a 95 °C por 1 min, unión del partidor a la temperatura de *annealin* de 60 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1,5 min; seguido de una extensión final a 72 °C por 7 min. Cada reacción contenía 1X tampón de PCR *GoTaq® Flexi*, 6 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 1 μM de cada partidor, 1 U de *GoTaq®* DNA polimerasa (Promega) y 100 ng ADN.

4.7.3. Ligación del producto de PCR al vector *pGEMT-easy* o *pTXB1*

Para la ligación de los productos de PCR al vector *pGEMT-easy*, se prolongó la extensión final de la reacción de PCR por 30 minutos, ésto para favorecer la inserción de nucleótidos de adenina en los extremos del producto de PCR. Se utilizaron 30 μL de producto de PCR purificado, 10 μL de Tampón 5x *Colorless Gotaq Flexi* (Promega), 0,5 μL de DNA polimerasa *GoTaq Flexi* (Promega), 2 μL dNTPs 10 mM (Promega), 1 μL MgCl₂ (Promega), 6,5 μL de agua libre de nucleasa y se incubó a 72°C por 30

minutos. Para la ligación del producto de PCR al vector *pGEMT-easy* de clonamiento o el vector pTXB1 de expresión, se utilizó; 5 µL de *Rapid ligation 2x T4 DNA ligase* (Promega), 1 µL del vector (50 ng), 3 µL del producto de PCR y 1 µL de T4 DNA ligasa. Se incubó a 4°C toda la noche o a 16°C en termociclador por un tiempo mínimo de 1 hora para posteriormente desarrollar las transformación en células competentes, *Escherichia coli* JM109 (cepa de clonamiento) o en células *Escherichia coli* ER2566 (cepa de expresión).

4.7.4. Transformación de *Escherichia coli* competentes con ADN plasmidial

Para realizar la incorporación de ADN plasmidial recombinante en células *E. coli* competentes, las células se descongelaron en hielo, y se transfirió 100 µL de estas células bacterianas a tubos de 1,5 ml pre-enfriados en hielo y se agregó todo el volumen de la mezcla de ligación (vector/inserto, 10 µL), incubando 20 minutos en hielo y agitando suavemente cada 5 minutos. Posteriormente, el tubo con la mezcla se incubó a 42°C durante 45 segundos en un baño de agua. La mezcla de *E. coli* y ADN plasmidial se transfirió a un tubo de 15 mL con 1 mL de medio LB y se incubó en agitador a 200 rpm por 1 ½ horas a 37°C. Posteriormente, se sembraron las células cepa JM109 en placas de LB-agar-ampicilina (100 µg/mL) que contenían además 40 µL de X-gal (20 mg/mL) y 12 µL (200 mg/mL) de IPTG por placa. Transcurrido el tiempo, las colonias transformadas se aislaron y se cultivaron en medio LB líquido conteniendo 100 µg/mL de ampicilina por 16 h, para posteriormente extraer el ADN plasmidial.

4.7.5. Extracción de ADN plasmidial a pequeña escala por el “Método Ebullición”

Se inoculó una colonia de *E. coli* recombinante, obtenida en la sección 4.7.4 en 3 mL de medio LB fresco suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, en un tubo de 15 mL y se incubó durante 16 h a 37 °C y 200 rpm. Las células bacterianas se recolectaron por centrifugación a máxima velocidad durante 3 min. El sedimento bacteriano se resuspendió en 100 µL de solución STET (sacarosa 8%; Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 50 mM; Triton X-100 5 %) y en el momento se agregó 10 µL de lisozima (50 mg/mL). La mezcla se agitó con vortex y luego se hirvió en baño maría por 1 min. El lisado bacteriano se centrifugó a 12000xg por 10 min a 4 °C y el ADN plasmidial contenido en el sobrenadante fue aislado y se precipitó con un volumen de isopropanol. Se centrifugó a 12000xg por 15 min a 4 °C. El ADN precipitado se lavó con 0.5 mL de Etanol 70% frío. Finalmente, el ADN precipitado se deshidrató a temperatura ambiente y se resuspendió con 30 µL de agua destilada estéril.

Este ADN plasmidial se usó para digerirlo con enzimas de restricción y rastrear los plasmidios conteniendo el inserto del gen Fla y el fragmento ND1. Una vez obtenidos, se realizó la extracción de ADN plasmidial utilizando el kit E.Z.N.A. *plasmid* Mini Kit II (Omega Bio-Teck), siguiendo el protocolo del fabricante.

4.7.6 Digestiones de ADN plasmidial con enzimas de restricción

Las digestiones del ADN plasmidial con enzimas de restricción se realizaron según las condiciones sugeridas por el fabricante. Para ello se utilizaron 2 μL de ADN plasmidial, 1 μL de tampón de la enzima a una concentración de 1X, 0,2 μL de la enzima correspondiente (10 U/ μL) en un volumen final de 10 μL . Luego, se incubó a 37°C por mínimo 2 h.

4.7.7. Fraccionamiento de ADN en geles de agarosa

Para separar los fragmentos de ADN y productos de PCR, se utilizaron geles de agarosa al 1 % y 1,5 % (p/v) en tampón TAE 1X pH 8.0. La agarosa se fundió a 70 °C aproximadamente y se le agregó 5 μL de GelRed. El fraccionamiento electroforético se realizó a 80 volts constante, durante 50 minutos en tampón TAE 1X pH 8.0. Una vez finalizada la electroforesis se visualizó el ADN por exposición a luz U.V. en transiluminador (Vilber Lourmat TFX-20.M). Para estimar los tamaños de los fragmentos de ADN, se utilizaron estándares de tamaño molecular conocido (100 pb Biolabs).

4.8. Expresión de proteínas recombinantes (rFla y rND1 de *Vibrio anguillarum*)

4.8.1 Expresión de las proteínas recombinantes (Fla y ND1)

Para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó el vector pTXB1. Este vector contiene una inteína del gen *gyrA* de *Mycobacterium xenopi* de 198 residuos de aminoácidos, el cual está modificado para generar un corte inducido con thiol en el extremo N-terminal. Para expresar la proteína de interés esta fue fusionada al extremo C-terminal de un tag de inteína de ~28 kDa capaz de auto cortarse y que contiene un dominio de unión a quitina (CDB, 6kDa), el que permite la purificación por afinidad en una columna de quitina.

Para inducir la expresión de la proteína recombinante en la cepa de *E. coli* ER2566, primero se inoculó una colonia de *E. coli* ER2566 conteniendo el plasmido pTXB1-Fla y otra conteniendo el plasmido pTXB1-ND1 en 3 mL de medio LB, suplementado con 100 µg/mL de ampicilina cada uno y se cultivó a 37°C por 16 h con agitación a 200 rpm. Posteriormente, se tomó 250 µL de cada cultivo y se inocularon en 250 mL de medio LB conteniendo 100 µg/mL de ampicilina y se cultivo hasta llegar a un OD₆₀₀ = 0.5. Luego, se tomo una alícuota control de cada uno y se indujo con IPTG a una concentración final de 0,4 mM, para inducir la expresión de las proteínas.

Para inducir la expresión de flagelina recombinante, la bacteria se cultivo a 18°C por 4 h. Para el caso de ND1, la cepa se cultivo a 37°C por 4 h. Posteriormente las células fueron sedimentadas por centrifugación a 4500xg por 15 minutos a 4°C, y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

4.8.2. Extracción de proteínas totales

Para extraer las proteínas totales de la cepa *E. coli* ER2566, el sedimento obtenido en la sección 4.7.8 se resuspendió en 5 mL de tampón de lisis [500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8.5; 1 mM EDTA, 1:20 cocktail inhibidor de proteasas (Sigma)]. Posteriormente, las bacterias fueron lisadas por sonicación mediante 5 pulsos de 15 segundos, separados por descansos de 45 segundos para evitar el sobrecalentamiento de la muestra, la amplitud utilizada fue de 25 % y el ciclo se repitió cada 0,7 segundos. El homogenizado se centrifugó a 10000xg por 10 minutos a 4 °C, para eliminar los restos celulares. Las proteínas solubles contenidas en el sobrenadante, se guardaron a -20°C para posteriormente realizar la purificación de la proteína recombinante.

4.8.3. Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de las proteínas recombinantes y de las proteínas totales de los cultivos de células, se realizó utilizando el método del ácido Bicinonínico (BCA) por kit (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una curva de calibración de albúmina de 0-1 µg/µL. El volumen de muestra fue de 25 µL al que se le agregó 200 µL de reactivo (mezcla de los reactivos del kit A y B en proporción 1:50) y se incubo a 37°C por 30 minutos, se determinó su absorbancia a 562 nm (Smith *et al.*, 1985). Este método se basa en la reducción del Cu²⁺ a Cu¹⁺ en medio alcalino dependiente de la concentración de las proteínas. El Cu¹⁺ forma un complejo altamente específico con el ácido bicinonínico que tiene una absorbancia máxima a 562 nm.

4.8.4. Purificación de las proteínas recombinantes

La purificación de las proteínas recombinantes, se realizó utilizando el sistema IMPACT (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*) (NEB) el que permite la purificación de la proteína recombinante, a través de la actividad de corte de los elementos de *splicing* de la proteína, (denominados inteínas) para separar la proteína blanco del “tag” de afinidad (inteína). Cada *tag* de inteína posee un dominio de unión a quitina, lo que permite su purificación a través de una resina de quitina (NEB # SS6651S). Por lo tanto, se equilibró 1 mL de resina de quitina con 10 volúmenes de tampón de columna (20 mM Tris-HCl, pH 8.5; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA) y se cargaron las proteínas solubles, obtenidas en la sección 4.7.9., con un flujo de 0.5-1 mL/min. Posteriormente se lavó la columna con 20 volúmenes de tampón de columna con un flujo de 2 mL/min. Luego se lavó rápidamente con 3 volúmenes de tampón de corte (20 mM Tris-HCl, pH 8.5; 500 mM NaCl; 50 mM DTT; 1 mM NaCl) y se detuvo el flujo para incubar un tiempo de mínimo 40 h a 23 °C. Para eluir la proteína de la columna se usó tampón de columna. La proteína en solución fue dializada y concentrada por centricon (Amicon). Para la proteína Fla se usó un centricon de 30 kDa y para ND1 uno de 10 kDa. Las proteínas se cuantificaron por el método del ácido Bicinonínico y se guardaron a -80°C con 10% glicerol.

4.8.5. Electroforesis en geles de poliacrilamina en condiciones denaturantes

Se prepararon geles con el sistema de tampón discontinuo en condiciones denaturantes descrito originalmente por Laemmli (1970). Las dimensiones de los geles fueron las siguientes 95 x 100 x 0,75 mm y 16 x 20 x 0,5 cm respectivamente, organizados entre dos placas de vidrio y espaciadores de teflón. El gel separador se preparó con acrilamida-bisacrilamida 30% (p/v) 0,8% (p/v) respectivamente, a una concentración final de 12 % y 15 %, tamponado con Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8 y SDS 0,4 %. El gel espaciador se preparó a una concentración final de 4 % (p/v) tamponado con Tris-HCl 0,5 M y SDS 0,4 %. Ambos geles fueron polimerizados con persulfato de amonio 0,05 % (p/v) y TEMED 0,15 % (p/v) de concentración final. Las muestras con tampón de muestra fueron denaturadas calentándolas por 5 minutos a 95 °C en termociclador, para posteriormente ser cargadas cuidadosamente en los surcos del gel. Una vez que el sistema fue montado e inmerso en tampón de corrida, se le aplicó una corriente de 150 volts hasta que el indicador del frente iónico llegó al borde inferior del gel. Finalizada la electroforesis, el gel se fijó con solución de fijación (Metanol 50 %; ácido acético 12 %) por 30 minutos y luego se dejó teñiendo toda la noche en solución de tñido (Azul

de coomasie R-250 0,3 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %). Finalmente el gel se destiñó mediante repetidos lavados con solución de desteñido (30 % Metanol, 7 % Ácido acético) hasta que el gel quedara completamente claro y solo se apreciaran las bandas teñidas. Todas estas etapas se realizaron con agitación suave y constante en una plataforma rotatoria.

4.8.6. *Western blot*

Luego de realizada la electroforesis, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa a 150 volts por 90 minutos en cámara de hielo. Se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA al 3 % (p/v) por 90 min a 37 °C, posteriormente se realizaron 4 lavados con PBST (NaCl 136,89 mM, 2,68 mM KCL, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7.4, Tween-20 0,2 % (v/v)) y se incubó con el primer anticuerpo anti-Flagelina (519) a una concentración de 200 ng/μL en BSA 1 % por 90 minutos a 37 °C con agitación suave, se realizaron 4 lavados con PBST 0,2 % y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa 1:1000 por 2 h a 37 °C con agitación suave. Se realizaron 4 lavados con PBST 0,2 % y se realizó el revelado para lo que se incubó con 1 mL de DAB (10 mg/mL) y 15 μL de H₂O₂ en 20 mL de PBS1X. La reacción se detuvo sumergiendo la membrana en agua y realizando varios lavados.

4.8.7. *Inmunofluorescencia*

El análisis de inmunofluorescencia se realizó en células SHK-1 inducidas con rFla y rND1 por 3 h. Luego de realizados los estímulos, las células se fijaron en paraformaldehído 4 % en PBS 1X por 10 minutos y luego se lavaron con PBS 1X. Posteriormente las células se bloquearon con BSA 5 % (p/v), triton X-100 0,3 % (v/v) en PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente. Para la incubación con el anticuerpo primario se utilizó una dilución 1:50 (anti- IL-8) y se incubó toda la noche a 4 °C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBST 0,1 % por 15 minutos y luego se incubó con el anticuerpo secundario, anti-mouse Alexa 488 (invitrogen) a una dilución de 1:200 en BSA 1 % en PBS 1X por 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se incubó con BSA 1 % conteniendo Hoechst en una dilución 1:1000 por 15 minutos para teñir los núcleos. Posteriormente se lavó 2 veces con PBST 0,1 % por 15 minutos cada uno y se montaron las células sembradas sobre portaobjetos redondos de 12 mm utilizando medio de montaje *Dako Fluorecent Mounting Medium*, se dejó secar y se observaron al microscopio de fluorescencia (Olympus BX-51) y microscopio Confocal

FluoView 1000, de la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencia de la Universidad Austral de Chile

4.9. Ensayos de inmunomodulación

4.9.1. Cultivo Celular primario

Para el desarrollo de los ensayos funcionales se utilizaron dos especies de peces, trucha arcoíris y dorada. En trucha arcoíris se realizó extracción de macrófagos de riñón anterior y extracción de células de hígado, respectivamente. Los macrófagos de riñón anterior de trucha se obtuvieron por gradiente de percoll al 34 %/51 %, según protocolo descrito (Secombes, 1993; Bethke *et al.*, 2012). Para la obtención de las células totales de hígado, el órgano fue depositado en medio L15 suplementado con glutamina y 2 % (v/v) de ampicilina, el órgano fue macerados en malla de nylon de 100 μm , y las células fueron lavadas 3 veces con 10 mL de medio L15 con 2 % ampicilina, en cada lavado estas células se centrifugaron a 800xg por 5 min. Finalmente, los macrófagos como las células totales se resuspendieron en 1 mL de medio L15 conteniendo 5 % (v/v) suero fetal bovino y 2 % de ampicilina. Se determinó la concentración celular y la viabilidad celular con azul de tripan en cámara de Neubauer.

En dorada, la suspensión celular de riñón anterior se desarrollo según protocolo descrito (Sepulcre *et al.*, 2002) para lo cual, las células totales (40×10^6) fueron incubadas toda la noche a 23°C en frascos de 25 cm² en medio sRPMI (medio de cultivo RPMI-1640 con 0,35 % NaCl) libre de suero.

4.9.2. Ensayo de activación de TLR5

Las células totales de hígado obtenidas en la sección 4.9.1, se sembraron en placas de 12 o 24 pocillos tratadas previamente con 0,1% de polilisina y ajustadas a una concentración de 1×10^6 - $1,5 \times 10^6$ células de hígado en 500 μL de medio L15, conteniendo 5 % (v/v) suero fetal bovino y 2 % de ampicilina. Las células fueron estabilizadas a 18 °C por toda la noche. Se realizaron los estímulos con los péptidos sintéticos, rFLA y rND1 a una concentración de 2,41 μM equivalente a la concentración de flagelina de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a una concentración 24, 1 μM para los péptidos y rND1 para la determinación del transcrito de TLR5S a las 6h post estímulo y para la determinación de la proteína a las 24h post

estímulo. La determinación de la proteína se realizó a través de un ensayo de ELISA y el transcrito fue determinado por PCR cuantitativo.

4.9.3. Ensayo de immunoestimulación

Para la determinación de las citoquinas pro-inflamatorias en trucha los macrófagos de riñón anterior se sembraron en placas de 48 pocillos y a una concentración de 5×10^5 células en 500 μL de medio L15, conteniendo 5 % (v/v) suero fetal bovino y 2 % de ampicilina. Las células fueron estabilizadas a 18 °C por toda la noche. Los macrófagos de dorada obtenidos en la sección 4.9.1 en monocapa fueron lavados 2 veces para eliminar las células no adherentes con buffer fosfato salino (PBS, pH 7.2-7.4) e incubadas en medio sRPMI suplementado con 100 UI/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomycin (Biochrom) y 0,1 % suero. Se realizaron los estímulos por 3h con los péptidos sintéticos, rFLA y rND1 a una concentración de 2,41 μM equivalente a la concentración de flagelina de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a una concentración 24, 1 μM para los péptidos y rND1 en macrófagos de riñón anterior, tanto para trucha como para dorada. Adicionalmente se realizó un tiempo de 6h para los macrófagos de trucha arcoíris. Las células en cada experimento, después del estímulo, fueron recogidas con buffer de lisis o trizol y guardadas a -80°C para su posterior utilización.

Para realizar la curva dosis-respuesta del péptido 518, los macrófagos de riñón anterior de trucha arcoíris fueron sembrados en placa de 12 pocillos y a una concentración de 1.5×10^6 células en 1 mL de medio L15, conteniendo 5 % (v/v) suero fetal bovino y 2 % de ampicilina. Las células fueron estabilizadas a 18 °C por toda la noche. Se realizaron los estímulos con 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con el péptido 518 por 3h. La determinación de la citoquina fue realizada a través de ELISA indirecto según sección 4.6.

Los estímulos con rFLA y rND1 también fueron realizados en la línea celular derivada de riñón anterior de salmón (SHK-1) por 3 h para el desarrollo de inmunofluorescencia.

En todos los casos se usó como control negativo, células estimuladas solo con PBSIX.

4.9.4. Extracción de ARN desde cultivo de células

La extracción de ARN desde las células obtenidas en la sección 4.9.1 se realizó por kit. Para las células de riñón e hígado de trucha arcoíris, se utilizó el kit RNAquos Micro (AM1931-Ambion). Este kit permite obtener RNA total desde cultivos con ≤ 500.000 células. Para la obtención de ARN total de los macrófagos obtenidos de riñón anterior de dorada se utilizó el kit “PureLink™ RNA Mini Kit” (Ambion). Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El RNA fue cuantificado por NanoDrop (Thermo scientific) y almacenado a -80°C hasta su uso

4.9.5. Síntesis de ADN complementario

La reacción de transcripción reversa fue realizada usando dos protocolos, el primero, con $1\mu\text{g}$ de ARN ($8\mu\text{L}$) el que fue tratado con $1\mu\text{L}$ de DNAsa ($1\text{ U}/\mu\text{L}$, fermentas) y $1\mu\text{L}$ de tampón 10X con MgCl_2 . Esta mezcla fue incubada 10 minutos a 37°C , y se agregó $1\mu\text{L}$ de EDTA 25 mM y se incubó a 65°C . Posteriormente se agregó $1\mu\text{L}$ de oligodT ($50\mu\text{M}$), $1\mu\text{L}$ de dNTP's 10 mM y se incubó a 65°C por 5 minutos, se dejó en hielo y se agregó $4\mu\text{L}$ de tampón 4X de la SuperScriptIII, $1\mu\text{L}$ de DTT $0,1\text{ M}$, $1\mu\text{L}$ de RNAsa OUT ($40\text{ U}/\mu\text{L}$, invitrogen) y $1\mu\text{L}$ de la enzima SuperScriptIII ($200\text{ U}/\mu\text{L}$, invitrogen). Se incubó a 50°C por 50 minutos y luego a 70°C por 15 minutos en termociclador. Posteriormente se agregó $80\mu\text{L}$ de agua de biología molecular (Sigma). El cDNA se guardó a -20°C , hasta su uso. El segundo protocolo se desarrolló utilizando $5\mu\text{L}$ de ARN, $1\mu\text{L}$ de dNTPs 10 mM , $1,6\mu\text{L}$ de oligodT₁₅ $125\mu\text{g}/\text{mL}$ y $7,4\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas y se incubó a 60°C por 10 minutos, se dejó en hielo y se agregó $0,5\mu\text{L}$ de RNAsin ($10\text{ U}/\mu\text{L}$, promega) y $0,5\mu\text{L}$ de la enzima transcriptasa reversa (M-MLV, $200\text{ U}/\mu\text{L}$, promega) y se incubó a 42°C por 60 minutos, posteriormente se incubó a 72°C por 10 minutos. En ambos casos, el cDNA sintetizado se guardó a -20°C para su posterior cuantificación por PCR tiempo real (qPCR).

4.9.6. Cuantificación de cDNA mediante PCR cuantitativo (qPCR)

Cada reacción de amplificación para la determinación de IL-1 β , IL-8, TNF α en macrófagos de trucha arcoíris y dorada, y TLR5S en células de hígado de trucha arcoíris, se realizó empleando como templado $5\mu\text{L}$ de cDNA, previamente diluido 1:5 y obtenido según sección 4.9.5., $0,3\mu\text{L}$ de partidores específicos ($5\mu\text{M}$) (descritos en el anexo I, tabla A.2.) y $10\mu\text{L}$ de mezcla de amplificación “Power

SYBR®Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems). La reacción se llevó a cabo en un termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems).

Para el cálculo de la expresión relativa mediante la técnica de qPCR se realizaron las reacciones de amplificación del cDNA del gen endógeno (EF-1, para trucha y rps18 para dorada) en cada muestra y de los genes (IL-1 β , TNF α , IL-8, TLR5S) a determinar en las diferentes células estimuladas con péptidos sintéticos, rFLA y rND1 respectivamente. El cálculo se realizó a través del método comparativo CT (Delta CT). Para lo cual se realizaron los siguientes pasos de normalización con respecto al gen endógeno y con respecto al calibrador, en este caso control sin estímulo.

Paso 1: Normalización respecto del gen endógeno

$$Ct_{\text{gen blanco}} - Ct_{\text{gen endógeno}} = \Delta Ct$$

Paso 2: Normalización respecto del calibrador

$$\Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}} = \Delta \Delta Ct$$

Paso 3: Formula

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

4.9.7. Analisis estadístico

Todos los datos fueron mostrados como las medias \pm error estándar de muestras por triplicado. Las diferencias estadísticas fueron analizadas con Student's t-test y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si el valor de $p < 0.05$. Se utilizó el software GradPad Prism 5 para crear todos los gráficos y hacer los análisis estadísticos.

5. RESULTADOS

Esta tesis generó péptidos sintéticos y proteínas recombinantes del dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum* con efectos inmunoestimulantes, capaces de inducir la expresión de moléculas pro-inflamatorias en leucocitos de dos especies de peces.

Los resultados obtenidos en esta tesis serán presentados en 5 parte.

Parte I: Diseño *in silico* y síntesis química de péptidos derivados del dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum*.

Parte II: Generación de anticuerpos policlonales mono-específicos contra epítopes específicos

Parte III: Generación del dominio ND1 recombinante y flagelina recombinante de *V. anguillarum*

Parte IV: Análisis de la función biológica de los péptidos sintéticos y de las proteínas recombinantes en función de la expresión de TLR5S en células totales de hígado a nivel transcripcional y de proteínas.

Parte V: Análisis del efecto de los péptidos sintéticos y de las proteínas recombinantes sobre la expresión génica de citoquinas expresadas en cultivo de leucocitos de diferentes especies de peces.

5.1. PARTE I

Diseño *in silico* y síntesis química de péptidos derivados del dominio D1 de flagelina de *Vibrio anguillarum*.

Se realizó el alineamiento a través de Clustal W del EBI (<http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2/>) de flagelina de *S. typhimurum* (N° acceso UniProtKB/Swiss-Prot: P06179.4) con la de *V. anguillarum* (N° acceso UniProtKB/Swiss-Prot: Q56572.3) (Figura 5.1). Se identificó el dominio D1, destacado en rojo (Fig. 5.1) y dentro de esta secuencia se buscaron los residuos de aminoácidos que son responsables de la activación del receptor (achurado en amarillo, Fig.5.1) según lo señalado por Smith *et al.*, (2003). Si bien, no hay una gran homología de secuencia, al comparar sólo los residuos de aminoácidos responsables de la activación del receptor y del dominio D1, éstos están conservados en un 100 % en ambas especies.

Por tanto, de los datos obtenidos del alineamiento de las secuencias de flagelina se logró identificar en la secuencia de flagelina de *V. anguillarum* los residuos de aminoácidos importantes para la activación del TLR5, y a partir de estos residuos de aminoácidos se diseñaron los péptidos que fueron utilizados para los ensayos posteriores. Los residuos de aminoácidos que activan el receptor se encuentran en el dominio D1 de flagelina, el cual no está en una secuencia lineal, por tanto, para poder incluir todos los residuos de aminoácidos que activan el receptor, se diseñaron 4 péptidos de flagelina de *V. anguillarum*, de los cuales, dos poseen una bisagra de prolina (péptido 517 de 20 aminoácidos y péptido 518 de 50 aminoácidos), además de un péptido de 27 aminoácidos que incluye solo el extremo amino del dominio D1 (péptido 515) y otro de 21 aminoácidos del extremo carboxilo del dominio D1 de flagelina (péptido 519) (Figura 5.2).

<i>S. typhimurium</i>	-AQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAI	49
<i>V. anguillarum</i>	MAINVSTNVSAMTAQRYLNNAADGTQKSMERLSSGYKINSARDDAAGLQI	50
	* :. ** :: :*. ***: .. .:***** :****:***** *	
<i>S. typhimurium</i>	ANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELVAVQSA	99
<i>V. anguillarum</i>	SNRLTSQSRGLDMAVRNANDGISIAQTAEGAMNETTNI LQRMRLSLQSA	100
	:**:*:: :** * *****:***:* * **:*:*::***	
<i>S. typhimurium</i>	NSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDN-TLTIQVG	148
<i>V. anguillarum</i>	NGSNSSSERQAIQEEVSALNDELNRIAETTSFGGNKLLNGSFGNKSFOIG	150
	*.:**.*: ::** **:: :*::**:: *.** ** * . . :**:*	
<i>S. typhimurium</i>	ANDGETIDIDLKQINSQTLGLDLTLNVQQKYKVSDTAATVTGYADTTIALD	198
<i>V. anguillarum</i>	ADSGEAVMLSMSDMRSDTKAMG---GKSYVATN-----GKAPD	185
	*.:**:*: :.:.:.*:* .. . :.* :.:	
<i>S. typhimurium</i>	NSTFKASATGLGGTDQKIDGDLKFDTTGKYYAKVTVTGGTGKDGYYEVS	248
<i>V. anguillarum</i>	WSVTNATDLTSLYTDKQGE-----AREVTINAKAGDD--LEEV	221
	. :: * . ***: : :***:.. :*. * *	
<i>S. typhimurium</i>	VDKTNGEVTLAGGATSPLTGGLPATATEDVKNVQVANADLTEAKAALTA	298
<i>V. anguillarum</i>	ATYINGQN-----GDIKASVGD-----EGKLQLF	247
	. **:	
<i>S. typhimurium</i>	GVTGTASVVKMSYTDNNGKTIDGGLAVKVGDDYYSATQNKDGSISINTTK	348
<i>V. anguillarum</i>	NQKVSS-----DVTIGGGLGTEIG-----	266
	. ::	
<i>S. typhimurium</i>	YTADDGTSKTALNKLGGADGKTEVVSIGGKTYAASKAEGHNFKAQPD	398
<i>V. anguillarum</i>	FAAGKDVTVKDIN-----VTTVGG-----	285
	::*....: . :* *.:**	
<i>S. typhimurium</i>	AAATTENPLQKIDAAIAQVDILRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLTS	448
<i>V. anguillarum</i>	-----SQEAVALIDGALKAVDSQRASLGAFQNRFGHAINLNDINENVNA	330
	:.:.: **.* **:*:*.***.***. **:*:* * :*:.:	
<i>S. typhimurium</i>	VRSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR	494
<i>V. anguillarum</i>	SRSRIKDTYARETTQMTKSQILQQASTSVLAQAKQSPSAALSLLG	376
	****:*:* * .:.*:*****.*****:* * . ****	

Figura 5.1. Selección de los aminoácidos responsables de la activación de TLR5. La figura muestra el alineamiento múltiple de flagelina de *Salmonella typhimurium* y *Vibrio anguillarum*. En rojo se destaca el Dominio D1, en amarillo los aminoácidos responsables de la activación del receptor toll 5. Los asteriscos (*) indican un 100% de conservación en los residuos de aminoácidos importantes para la activación de TLR5 marcados en amarillo.

Nº	Péptido
515	LQRMRDLSLQ S ANGSNSSSERQAIQEE
517	LQRMRDLSLQ-PP-VALIDGAL
518	LQRMRDLSLQ S ANGSNSSSERQAIQEE-PP-IDGALKAVDSQRASLGAFQNR
519	IDGALKAVDSQRASLGAFQNR

Figura 5.2. Secuencia de péptidos análogos al dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum*. En rojo se ejemplifican los residuos de aminoácidos que son responsables de la activación del receptor tipo toll 5, en azul se muestra la bisagra de prolina.

Una vez diseñados los péptidos *in silico*, los cuales incluyen los residuos de aminoácidos responsables de la activación del receptor, se proyectó su estructura 3D *in silico*, para esto se utilizó la estructura cristalizada de *S. typhimurum* (PDB: 1UCU). Primero se superpuso la secuencia de flagelina de *V. anguillarum* sobre el modelo tridimensional de la proteína cristalizada para obtener una proyección de la estructura 3D de flagelina de *V. anguillarum*. Una vez obtenido este modelo teórico se proyectaron los péptidos, obteniéndose la predicción de estructura 3D de los mismos, lo cual se realizó, utilizando el programa Swiss.PdbViewer 4.0.1. (Fig. 5.3).

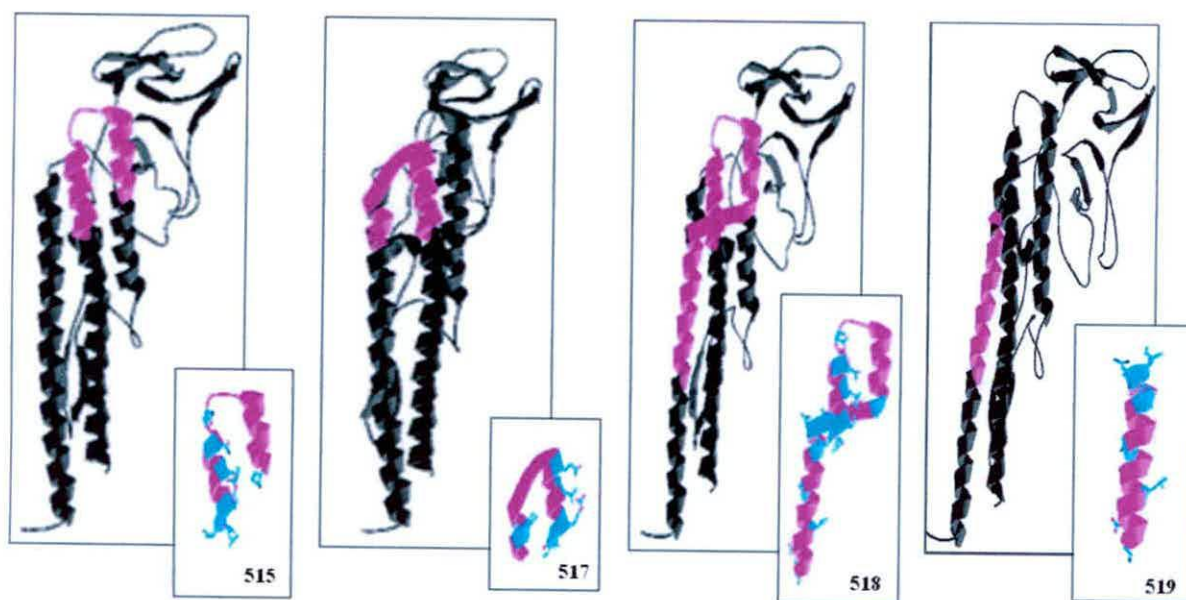


Figura 5.3. Estructura 3D de los péptidos diseñados. Mediante el programa SwissPdbViewer 4.0.1 se realizó la proyección 3D de los péptidos diseñados a partir de la estructura de flagelina de *V. anguillarum*. En rosado la proyección de cada péptido y en Calipso los residuos de aminoácidos importantes en la activación del TLR5.

Una vez diseñados y proyectada su estructura, los péptidos fueron sintetizados químicamente, utilizando la técnica en fase sólida Fmoc, descrita en la sección 4.4 de materiales y métodos. Posteriormente, a los péptidos ya sintetizados se les realizó HPLC para verificar su pureza (Figura 5.4.1 A, 5.4.2 A, 5.4.3 A). Los resultados obtenidos para los tres péptidos, muestran un perfil correspondiente para un extracto crudo de cada uno de los péptidos. Los resultados de la masa molecular de cada uno de los péptidos fue confirmada por espectroscopia de masa, Maldi-Tof (figura 5.4.1 B, 5.4.2 B, 5.4.3 B).

Péptido 517: LQRMRDLSLQPPVALIDGAL
PM: 2206.70 Da

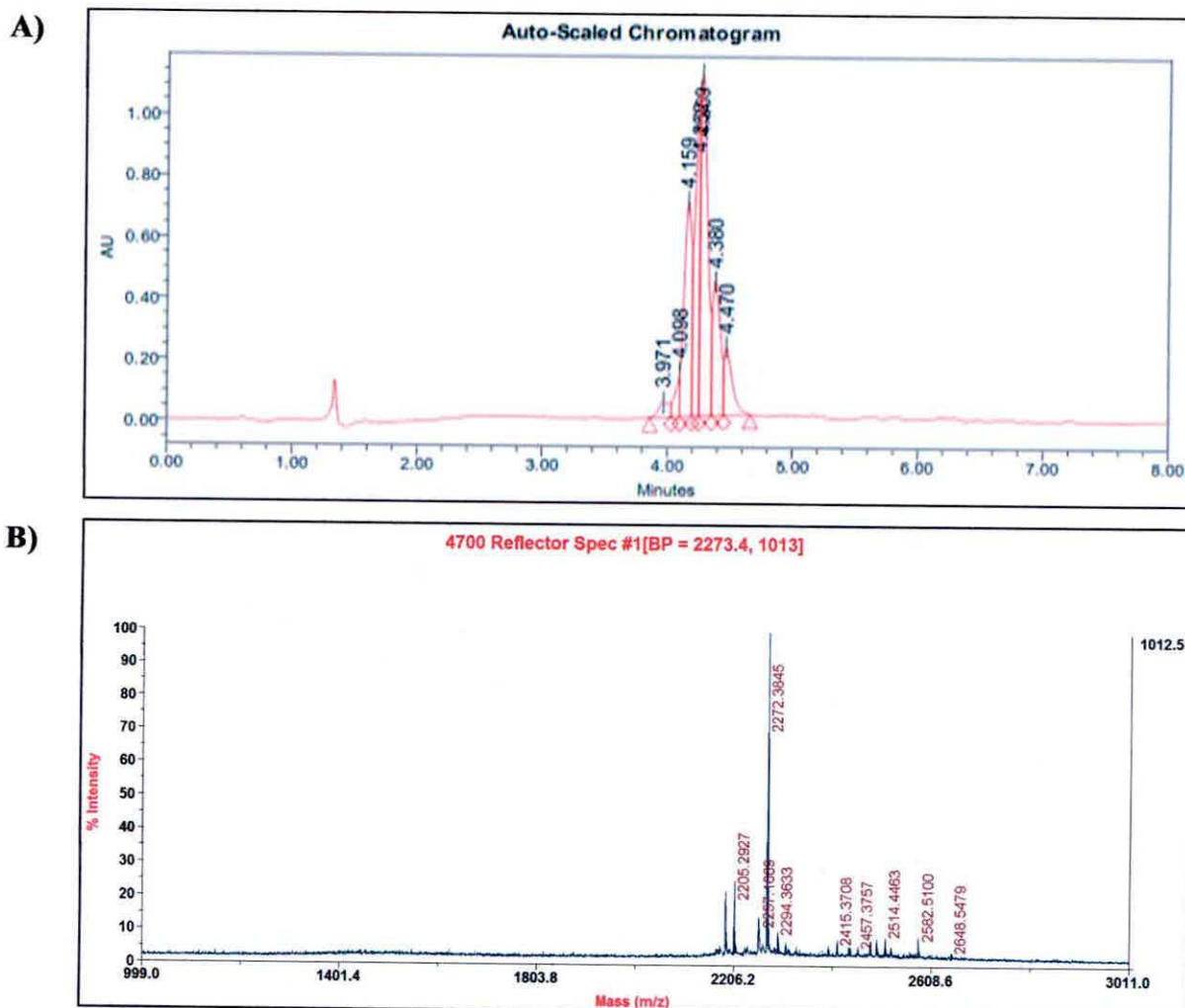


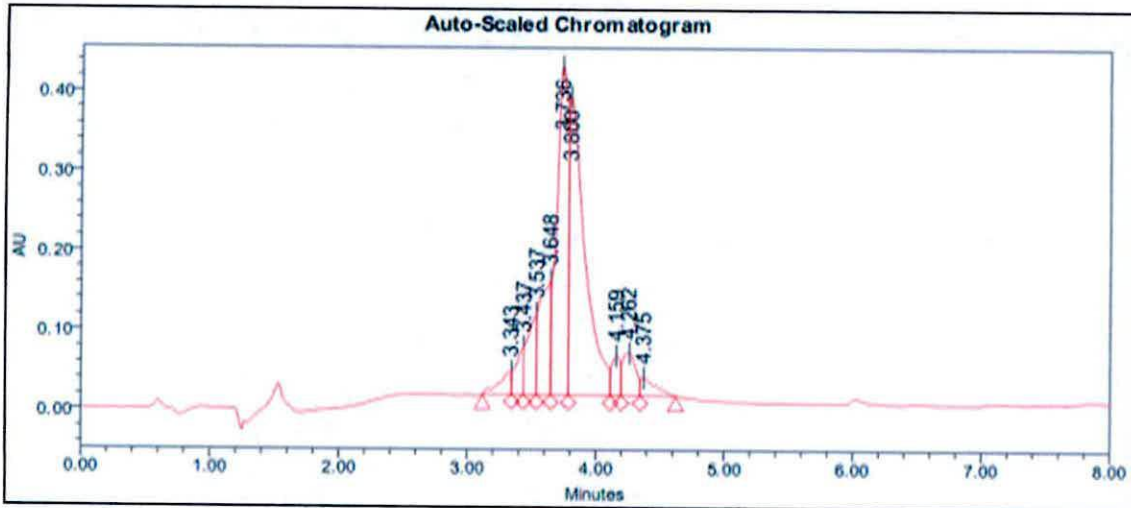
Figura 5.4.1. Confirmación de la pureza y masa molecular del péptido 517. En el panel A, se muestra el HPLC del extracto crudo del péptido sintético 517 y en el panel B su espectro de masa por MALDI TOF. El péptido 517 corresponde al péptido de 20 aminoácidos y que posee una bisagra de prolina.

Péptido 518:

LQRMRDLSLQSANGSNSSSERQAIQEPPIDGALKAVDSQRASLGAFQNR

PM: 5428.90 Da

A)



B)

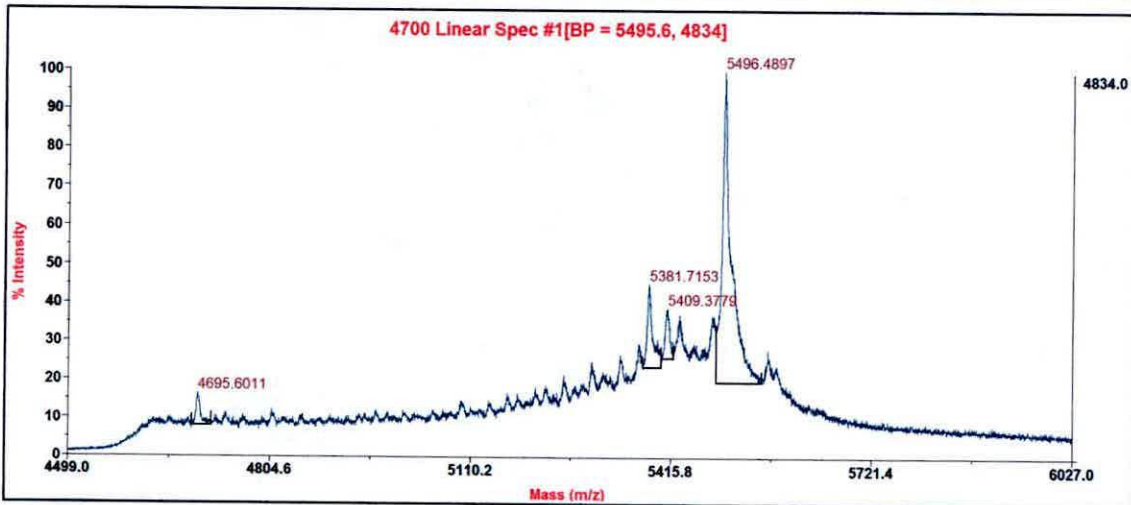
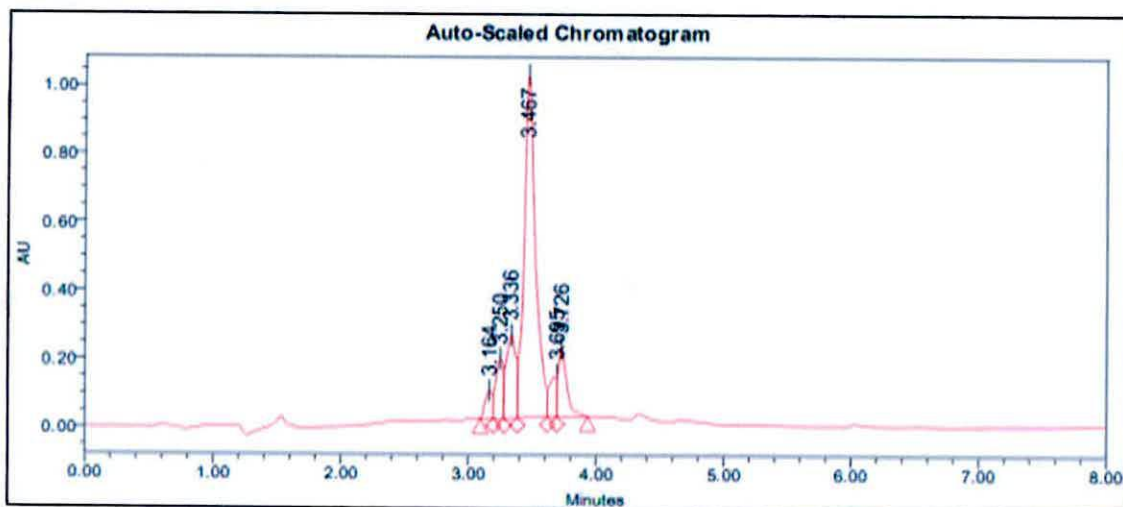


Figura 5.4.2. Confirmación de la pureza y masa molecular del péptido 518. En el panel A, se muestra el HPLC del extracto crudo del péptido sintético 518 y en el panel B su espectro de masa por MALDI TOF. El péptido 518 corresponde al péptido de 50 aminoácidos y que posee una bisagra de prolina.

Péptido 519: IDGALKAVDSQRASLGAFQNR
PM: 2217.60

A)



B)

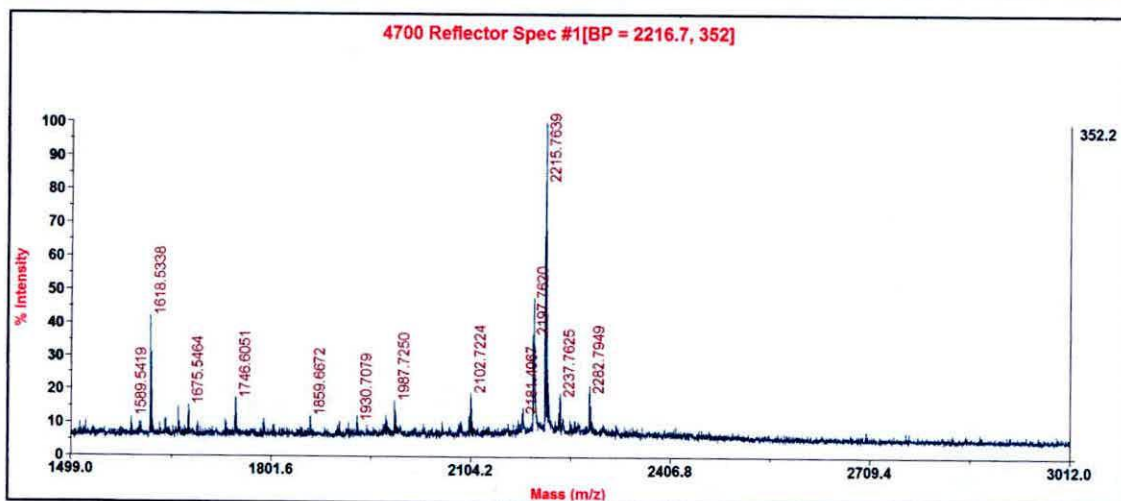


Figura 5.4.3. Confirmación de la pureza y masa molecular del péptido 519. En el panel A, se muestra el HPLC del extracto crudo del péptido sintético 519 y en el panel B su espectro de masa por MALDI TOF. El péptido 519 corresponde al péptido de 21 aminoácidos.

5.2. PARTE II

Generación de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra epítopes específicos

Se desarrollaron 2 anticuerpos policlonales monoespecíficos para las siguientes moléculas: TLR5S y flagelina de *V. anguillarum*, necesarias para el alcance de objetivos específicos. Estas moléculas se generaron de acuerdo a como se detalló en las secciones 4.4 y 4.5 de Materiales y Métodos.

TLR5S [*Oncorhynchus mykiss*] (773)

Como se ha mencionado anteriormente, TLR5S es un receptor soluble, que se expresa en el hígado de trucha arcoíris. Su secuencia primaria consta de 664 aminoácidos (Nºacceso NCB: NP_001117680.1), y de esta secuencia el péptido candidato posee 18 residuos (EDKLLGKHFRLKLNLS) (Fig. 5.5 A y B) el cual fue sintetizado y utilizado para generar el anticuerpo policlonal contra TLR5S, el que fue denominado 773 de acuerdo al orden asignado en la peptidoteca del laboratorio.

Los resultados obtenidos por herramientas bioinformáticas, muestran que el péptido candidato, posee una baja hidrofobicidad y propiedades de flexibilidad descritas para anticuerpos generados por epítopes (Anexo II, grafico 1 y 2) (Tainer *et al.*, 1984; Hoop *et al.*, 1985). En la figura 5.5 B, se muestra la estructura 3D del receptor, realizada utilizando la estructura cristalizada del receptor Toll 3 de ratón (DOI:10.2210/pdb3cig/pdb) (Liu *et al.*, 2008). En la figura 5.5 B, se indica en rosado la región del epítopo el cual está expuesto al reconocimiento por el anticuerpo generado. El péptido fue sintetizado usando la estrategia Fmoc, su pureza fue confirmada por RP-HPLC (fig. 5.5 C) y su masa molecular (2090,48 Da) por espectroscopia de masa (MALDI-TOF MS) (fig. 5.5 D).

El inmunoreconocimiento del anti-epítopo de TLR5S fue demostrado por dot blot, usando las IgGs de los tumores ascíticos como anticuerpo primario (fig.5.5 D). El reconocimiento del péptido sintético fue confirmado por ELISA indirecto (Fig.5.5 E), en donde la regresión lineal ($R^2 = 0.9907$), indica que no tiene reacción cruzada con otra secuencia epítopo.

A)

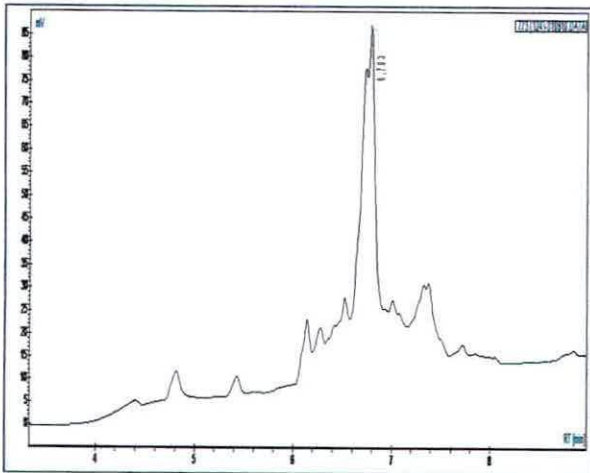
```
MSAHHFRGMMRNCILLVIFGVYLVQVVKCIPRCPLYGYIAVCTNLSLY
QVPALPPYITHVYMRDNYISEINEISFSGLEGLKELDLSWQRVNGLIIR
TNTFQRLANLAVLYLGHNRGLKIEPGAFLVGLSNLRTLSTLYVCDLTESTI
LQGDYLRPLVSLKTLDLYGNQVKRIQSPFFVNMDFQELNITLNQM
ESICEEDLLGFCGKHFRLLKLNVSLSYGMTQNGFDWKRRCGNPFRNM
SIETLDLSSNGFNVDKAKLFFNAIQGTKIHIIIEHSTMGKSFSGFSNFK
DPNKKTFNGLKNSGKILDLSKCFIFALQYAVFSPLREVEDITLAQNKI
NQIDRGAFWGLENLQRNLNLSHNLIGEYSYTFDNLPNILELDLSYNHI
GALGYQAFTGLPNLQILDLTGNSIRQLGTYGYLAPLNLQLNLADN
KITSLEGLLGFANSTIILNVQNNRLTNLEDEVYIVLAKFMRIERIWYGN
NNIKWCIFSSNISVPAVNSLKLELRNIALQILWGHGVCIDVFENLIKLF
SLDLSFNLSRALPDGIFKGLVSLSEMDLSFNLSLTYLQPDIFPASKTV
DLSYNFLSSPDPAAFSSLSWINLYRNRHFHCDGGLKDFLTWMNRINVT
FPDPGVAEFSCEFSDLHGVSLLNYSKVITEKYPKPSLKI
```

SECUENCIA: EDLLGFCGKHFRLLKLNLS-NH2 PM: 2090.48

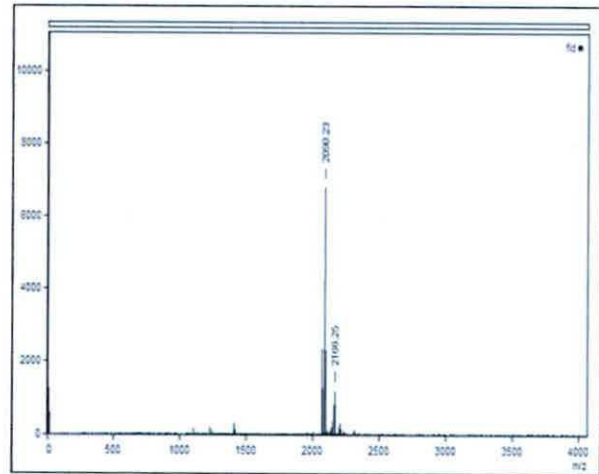
B)



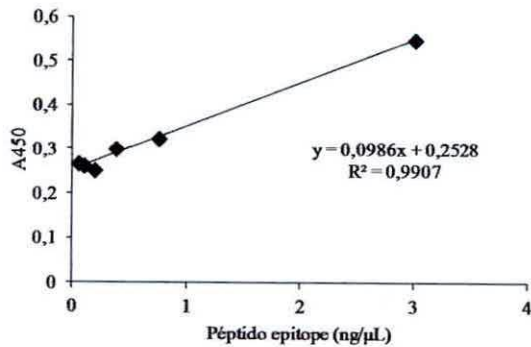
C)



D)



E)



F)

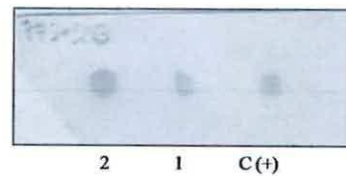


Figura 5.5. Generación de un anticuerpo anti-TLR5S a partir de una secuencia epítipo. A) Secuencia primaria de TLR5S de trucha arcoíris (NP_001117680.1), en rojo se muestra la secuencia epítipo de TLR5S. B) Estructura secundaria de TLR5S para trucha arcoíris, generada a partir del PDB de TLR3 de ratón (PDB: 3CIG), en rosado se muestra el epítipo de TLR5S. C) HPLC del péptido sintético. D) Espectro de masa del péptido. E) Correlación entre el anticuerpo y el péptido sintético por ELISA y F) Detección por Dot blot del péptido sintético con 3 μg/μL de anti-péptido epítipo de TLR5S de ratón. C (+): corresponde a 0,5 μL de líquido ascítico, 1: corresponde a lug de péptido sintético, 2: corresponde a 2 μg de péptido sintético.

Flagelina [*Vibrio anguillarum*] (519)

Como se ha mencionado anteriormente flagelina es el ligando natural que activa el TLR5, la importancia de generar un anticuerpo contra esta molécula se basa en poder corroborar que la proteína recombinante generada corresponde a flagelina.

La secuencia primaria de flagelina de *V. anguillarum* se obtuvo desde la base de datos UiProtKB/Swiss-Prot: Q56572.3, la que posee 376 aminoácidos. A partir de esta secuencia se diseñó un péptido de 21 residuos (IDGALKAVDSQRASLGAFQNR) (Fig. 5.6 A y B). Esta secuencia peptídica fue sintetizada y usada para generar el anticuerpo policlonal contra Flagelina, el péptido sintético fue denominado 519 de acuerdo al orden asignado en la peptidoteca del laboratorio.

Los resultados obtenidos por herramientas bioinformáticas, muestran que el péptido candidato, posee una baja hidrofobicidad y propiedades de flexibilidad descritas para anticuerpos generados por epítopes (Anexo II, grafico 3 y 4) (Tainer *et al.*, 1984; Hoop *et al.*, 1985). En la figura 5.6 B, se muestra el modelo de su posible estructura 3D, proyectada desde la estructura cristalizada de *S. typhimurium* (PDB:1UCU) a través del programa Swiss.PdbViewer 4.0.1., en rosado se indica la región epítope que está expuesta al reconocimiento por el anticuerpo generado.

El péptido fue sintetizado usando la estrategia Fmoc, su pureza confirmada por RP-HPLC (fig. 5.6 C) y su masa molecular correspondiente a 2216,70 Da por espectroscopia de masa (MALDI-TOF MS) (fig. 5.6 D).

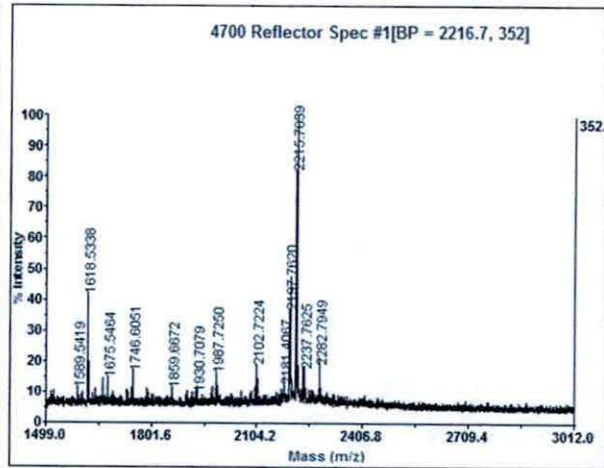
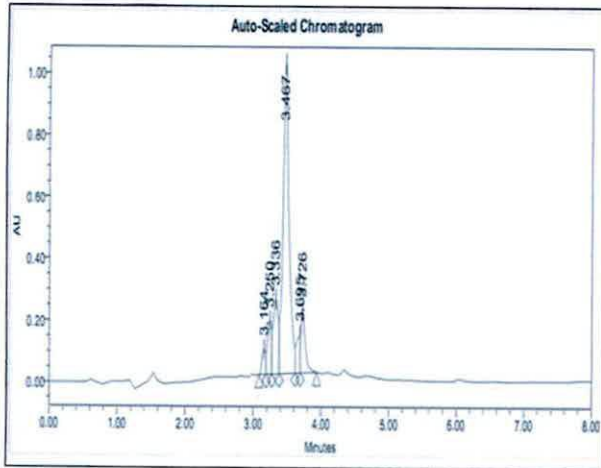
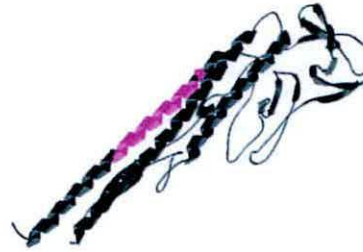
El inmunoreconocimiento del anti-epítope de Flagelina fue demostrado por *dot blot*, usando las IgGs de los tumores ascíticos como anticuerpos primarios (fig.5.6 F). El reconocimiento del péptido sintético fue confirmado por ELISA (Fig.5.6 E), en donde la regresión lineal ($R^2 = 0.9967$), indica que no tiene reacción cruzada con otra secuencia epítope.

A)

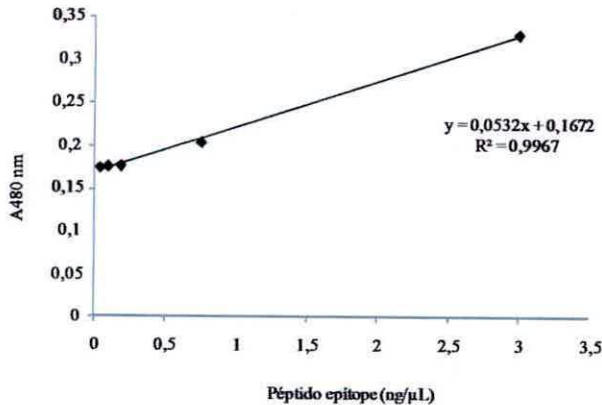
MAINVSTNVSAMIAQRYLNNAADGTQKSMERLSSGYKINSARD
 DAAGLQISNRLTSQSRGLDMAVRNANDGISIAQTAEAGAMNETINI
 LQRMRLSLQSANGSNSSSRQAIQEEVSALNDELNRIAETTSFG
 GNKLLNGSFGNKSQIGADSGEAVMLSMSDMRSDTKAMGGKSY
 VAINGKAPDWSVINAIDLILSYIDKQGEAREVTINAKAGDDLEE
 VATYINGQNGDIKASVGDEGKLQIFAANQKVSSDVITGGGLGTEI
 GFAAGKDVTVKDINVTTVGGSQEAVALIDGALKAVDSQRASLGA
 FQNRFGHAISNLDNINENVNASRSRIKDIDYARETTQMTKSQILQ
 QASTSVLAQAKQSPSAALSLG

IDGALKAVDSQRASLGA FQNR-NH2 PM: 2216.70

B)



E)



F)

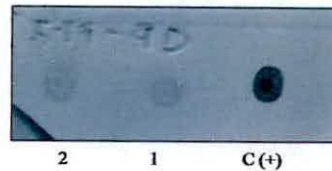


Figura 5.6. Generación de un anticuerpo anti-Flagelina a partir de una secuencia epítipo. A) Secuencia primaria de Flagelina de *Vibrio anguillarum* (Q56572.3), en rojo se muestra la secuencia epítipo. B) Modelo de la estructurasecundaria de flagelina de *V. anguillarum*, obtenida a partir del PDB de flagelina de *salmonella typhimurium* (PDB:1UCU) utilizando el programa Swiss.PdbViewer 4.0.1., en rosado se muestra el epítipo. C) HPLC del péptido sintético, D) espectro de masa del péptido, E) Correlación entre el anticuerpo y el péptido sintético por ELISA y F) Detección por Dot blot del péptido sintético con 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de anti-péptido epítipo de Flagelina de ratón, C (+): corresponde a 0,5 μL de liquido ascítico, 1: corresponde a 1 μg de péptido sintético, 2: corresponde a 2 μg de péptido sintético.

5.3. PARTE III

Generación del dominio ND1 recombinante y flagelina recombinante de *Vibrio anguillarum*.

Para corroborar si los péptidos diseñados obtenidos en el objetivo 1 son funcionales, se generó flagelina recombinante de *V. anguillarum*, la que fue utilizada como control positivo en los ensayos funcionales. Al mismo tiempo se desarrolló una proteína truncada de flagelina de *V. anguillarum* correspondiente al extremo amino del dominio D1 de flagelina, región conservada en las moléculas de flagelina, para comprobar el rol de este dominio en la activación de TLR5.

Recientes reportes indican que el genoma de *V. anguillarum* consta de 5 genes, *flaA*, *flaB*, *flaC*, *flaD* y *flaE* respectivamente que codifican las distintas flagelinas (Naka *et al.*, 2011). En esta tesis se generó la proteína recombinante del isotipo flagelina FlaB.

El gen de flagelina, FlaB, consta de 1128 nucleótidos que codifican una proteína de 376 aminoácidos, esta proteína consta de 4 dominios, D0, D1, D2 y D3 (Fig. 5.7 A y B), de los cuales está bien descrito que el dominio D1 de esta proteína, dominio conservado, es el responsable de la activación del TLR5 (Takeda *et al.*, 2003; Eaves-Pyles *et al.*, 2001).

Se desarrollaron partidores para la amplificación del gen FlaB completo de 1128 pares de bases y para la región amino del dominio D1 del gen FlaB de *V. anguillarum* de 396 pares de bases, denominada a ésta proteína truncada de flagelina, ND1 (Fig. 5.7 A y B). Para obtener la estructura 3D de la proteína truncada ND1, ésta se superpuso con la estructura de *V. anguillarum*, obtenida a partir de la estructura cristalizada de flagelina de *S. typhimurium* (PDB:1UCU) (Fig. 5.7 C, proteína truncada destacada en rosado).

Una vez desarrollados los análisis de secuencia y de estructura del gen FlaB, se realizó la extracción de ADN genómico de *V. anguillarum* desde una cepa Nacional (NCIMB:6; ATCC19264, *Listonella anguillarum*) (Fig. 5.8 A). A partir de este ADN genómico se realizó un PCR en gradiente utilizando los partidores descritos en el anexo I (Table A.1), lográndose amplificar la región correspondiente a flagelina completa de 1128 pb, la que denominaremos Fla y la región correspondiente al extremo amino del dominio D1 de flagelina de 396 pb, la que denominamos ND1 (Fig. 5.8 B).

El producto de PCR obtenido fue purificado e insertó en el vector de clonamiento pGEMT-easy en la cepa *E.coli* JM109. Como se describió en materiales y métodos, el producto de PCR fue amplificado utilizando partidores con los sitios de restricción *NdeI*. La existencia de cada inserto en el vector fue detectada por la digestión con la enzima *NdeI* (Fig. 5.8 C) la que genera los productos de digestión esperados para ambos clones (Fig. 5.8 D). Estos productos de digestión fueron secuenciados, presentando un 100% de identidad de secuencia nucleotídica (dato no mostrado).

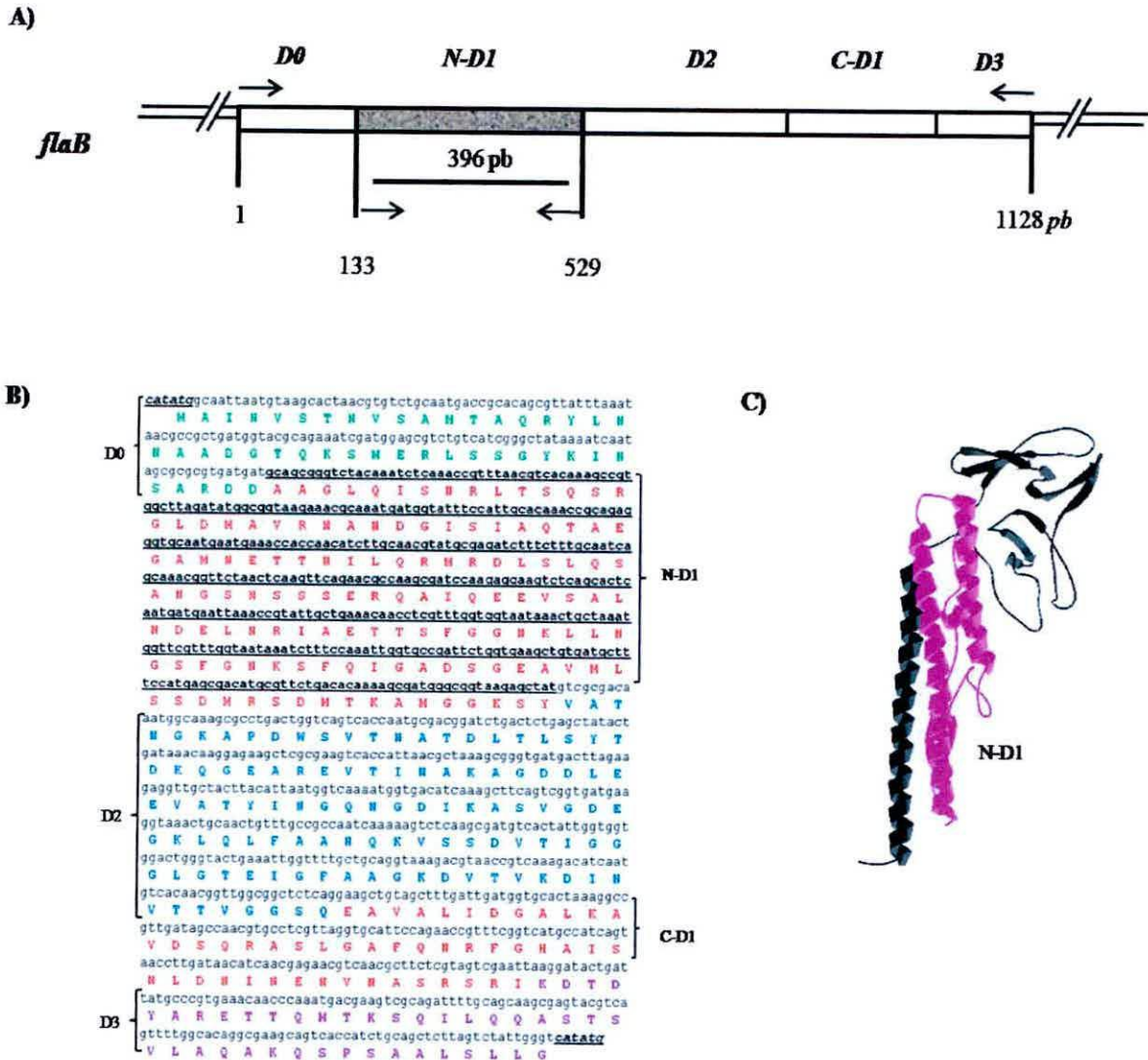


Figura 5.7. Representación esquemática de flagelina de *V.anguillarum*. A) Organización estructural de los dominios que conforman el gen FlaB, las flechas indican la posición de los partidores utilizados para clonar el gen FlaB de 1128 pb y el dominio N-D1 de 396 pb. B) Secuencia nucleotídica y aminoácídica de flagelina de *V.anguillarum*. C) Estructura secundaria de flagelina de *V.anguillarum* generada a partir del PDB de *Salmonella typhimurium* (1UCU), en rosado se indica la parte amino del dominio D1.

Comprobada su identidad de secuencia para cada inserto, y utilizando los productos de digestión generados anteriormente (Fig. 5.8 C y D) se desarrolló el clonamiento de estos insertos en el vector de expresión pTXB1 en la cepa *E. coli* JM109 para aumentar el número de copias de cada constructo.

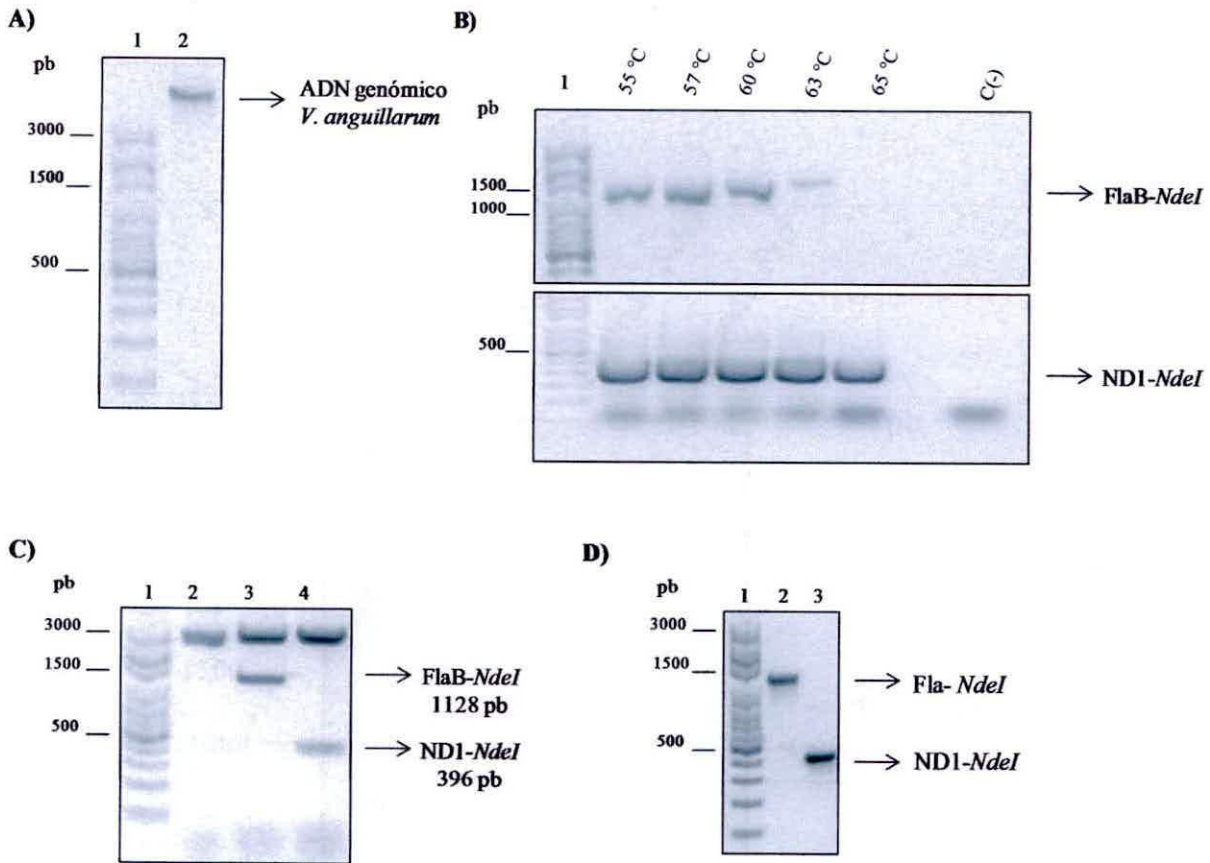


Figura 5.8. Clonamiento de flagelina y el dominio N-D1 de flagelina *V. anguillarum* en el vector pGEMT-easy, células *E. coli* JM109. A) Electroforesis de ADN genómico de *V. anguillarum*, en gel de agarosa al 1,5%. B) Productos del PCR en gradiente para flagelina (FlaB) y la parte amino del dominio D1 de flagelina (ND1) con los sitios de restricción *NdeI*. C) Gel de agarosa al 1,5% del ADN plasmidial de los clones obtenidos para FlaB y ND1, (2) ADN plasmidial sin digerir, (3) Corresponde al ADN plasmidial del constructo pGEMT-easy-FlaB-NdeI digerido con *NdeI*, (4) Corresponde al ADN plasmidial del constructo pGEMT-easy-ND1-NdeI digerido con *NdeI*. D) Gel de agarosa al 1,5% de los productos de digestión, insertos preparados con los sitios de restricción para ser clonados en el vector pTXB1. Para todos los casos (1) corresponde al estándar de 100 pares de bases (axxygen).

La verificación del inserto, correspondiente a flagelina completa en el vector de expresión pTXB1 fue detectada por la digestión con *NdeI*, enzima de restricción que genera un fragmento de 1128 pb, la orientación se verificó con la enzima *PstI*, la que generó los fragmentos esperados, uno de 925 pb y

otro de 303 pb (Fig. 5.9). Para ND1 se realizó la digestión con *NdeI*, obteniéndose el fragmento de digestión esperado de 396 pb (dato no mostrado).

Comprobado el clonamiento de ambos insertos en el vector de expresión, se desarrolló la transformación de cada uno de estos constructos, pTXB1-Fla-*NdeI* y pTXB1-ND1-*NdeI*, en la cepa de expresión *E. coli* ER2566.

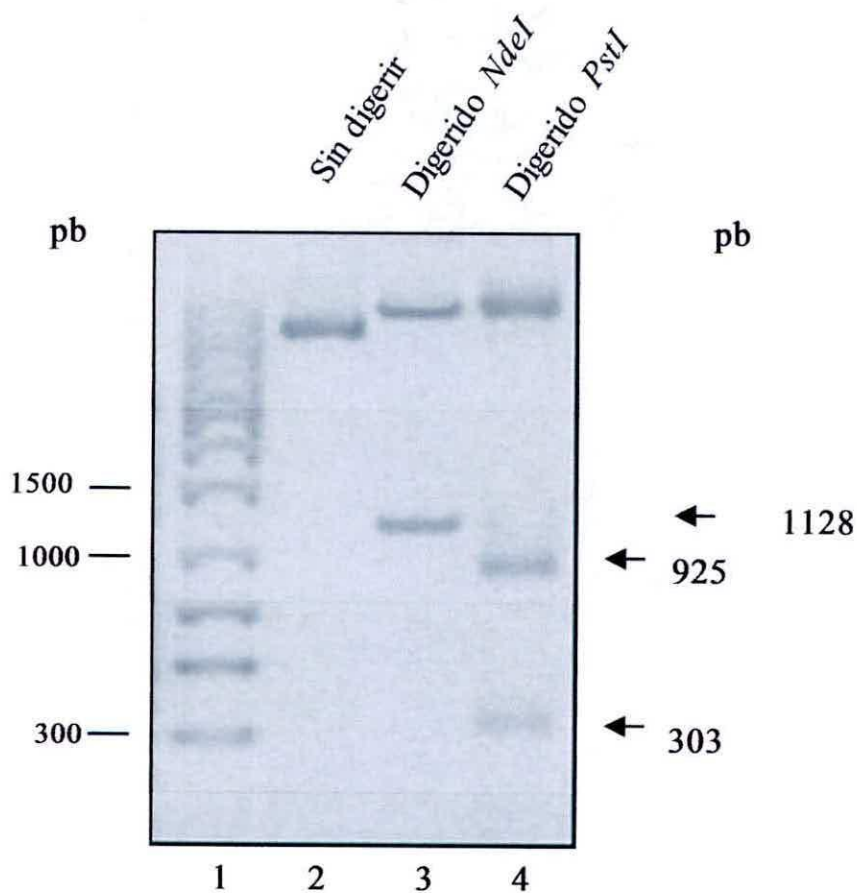


Figura 5.9. Ensayo de restricción del ADN plasmidial del clonamiento de flagelina de *V. anguillarum* en el vector de expresión pTXB1 en *E. coli* JM109. (1) corresponde al estándar de 1000 pares de bases (axygen), (2) corresponde al ADN plasmidial de *E. coli* JM109 llevando el constructo con el vector de expresión, pTXB1-Fla-*NdeI* sin digerir, (3) corresponde al ADN plasmidial del constructo digerido con *NdeI*, (4) corresponde al ADN plasmidial del constructo digerido con *PstI*. Las flechas indican los tamaños de los fragmentos obtenidos con las enzimas de restricción.

Una vez transformada la cepa de *E. coli* ER2566 con cada uno de los constructos, pTXB1-Fla-*NdeI* y pTXB1-ND1-*NdeI* independientemente, se realizó la inducción de la expresión de cada proteína con IPTG. Para la expresión de Fla se usó 0,4 mM de IPTG y se incubó por 6h a 18°C, obteniéndose la expresión del constructo con un peso aparente por SDS-PAGE de ~110 kDa con respecto al control sin IPTG (Fig. 5.10 A, líneas 2, 3 y 4).

Obtenida la expresión de la proteína soluble (Fig. 5.10 A, línea 4) se realizó la purificación de Fla a través de una columna de quitina (*chitin beads* NEB#S6651). Ésta permite la unión de la proteína carrier (inteína), proteína que posee un dominio de unión a quitina y por tanto facilita su unión a la columna para su posterior escisión de la proteína de interés por medio de un agente reductor (DTT) y así obtener la proteína recombinante pura (Fig. 5.10 A, línea 8).

En la figura 5.10 A, línea 8, se observa la proteína purificada a través de SDS-PAGE, con un peso molecular aparente de ~ 40 kDa, obteniéndose además, agregados de la proteína los que podrían corresponder a dímeros de la misma. Para corroborar este resultado se realizó un ensayo de *western blot* utilizando el anticuerpo generado (anti-flagelina, 519), observándose que la proteína efectivamente forma agregados (Fig. 5.10 B). El peso molecular de la proteína de 41.900,65 Da fue establecido por ESI-MS-TOF.

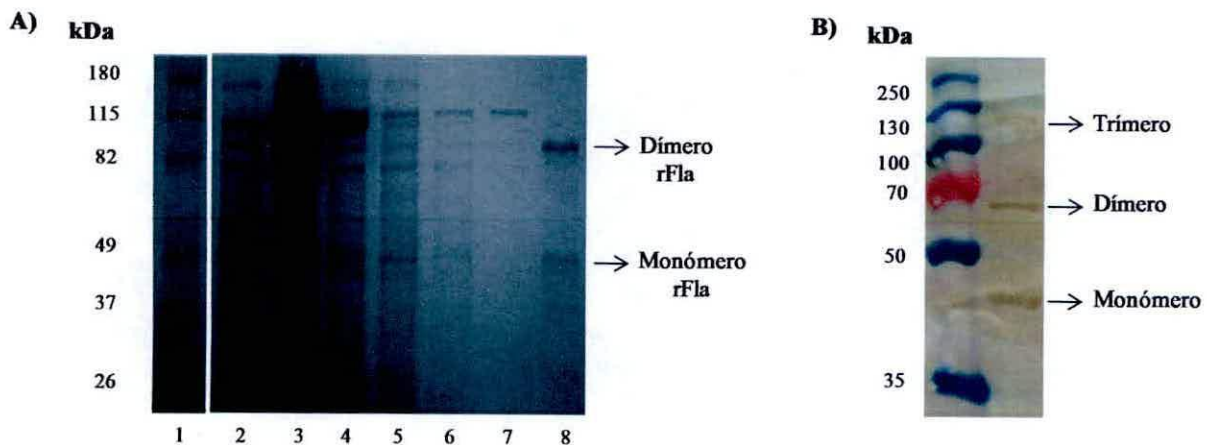


Figura 5.10. Expresión y purificación de rFla de *V. anguillarum* desde *E. coli* ER2566, usando el vector pTXB1. A) SDS-PAGE al 12% del perfil de expresión y purificación de flagelina recombinante. (1) Estándar de peso molecular (invitrogen, #10748-010), (2) Extracto de proteínas totales de *E. coli* sin inducir, (3) Extracto de proteínas totales de *E. coli* inducidas a 18°C por 6h con 0,4 mM de IPTG, (4) Extracto de proteínas totales solubles de *E. coli* inducidas a 18°C por 6h con 0,4 mM de IPTG, (5) Flujo a través de la columna de quitina (V0), (6) Flujo del lavado de la columna de quitina, (7) Flujo a través de la columna con DTT, (8) Eluido de la proteína recombinante. B) Western blot para rFla, utilizando 2 µL de la proteína purificada en condiciones reductoras y denaturantes. El anticuerpo utilizado fue anti-Flagelina (519) a una concentración de 200 ng/µL.

Con respecto a la proteína truncada (ND1), se logró expresar el constructo pTXB1-ND1-*Nde*I en la cepa de *E. coli* ER2566 inducida con IPTG a 37°C por 4h con respecto a la cepa sin ser inducida con IPTG, observada por SDS-PAGE (Fig. 5.11, líneas 2 y 3).

Comprobada la expresión de la proteína soluble (Fig. 5.11, línea 3) se realizó su purificación utilizando una columna de quitina, obteniéndose una proteína con un peso aparente de ~ 15 kDa (Fig. 5.11, línea 8). El peso molecular de la proteína de 16.044,29 Da fue establecido por ESI-MS-Trap.

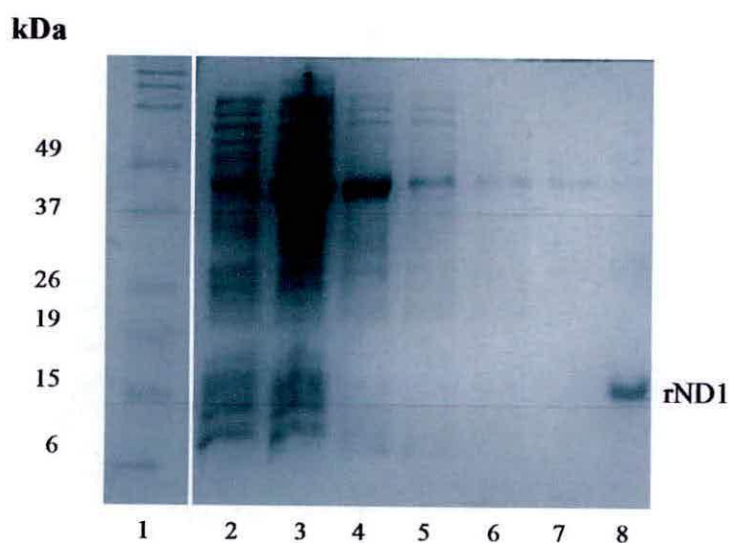


Figura 5.11. Expresión y purificación de rND1 de *V. anguillarum* desde *E. coli* ER2566, usando el vector pTXB1. SDS-PAGE al 15% del perfil de expresión y purificación del dominio ND1 recombinante. (1) Estándar de peso molecular (invitrogen, #10748-010), (2) Extracto de proteínas totales de *E. coli* sin inducir, (3) Extracto de proteínas totales de *E. coli* inducidas a 37°C por 4h con 0,4 mM de IPTG, (4) Extracto de proteínas totales solubles de *E. coli* inducidas a 37°C por 4h con 0,4 mM de IPTG, (5) Flujo a través de la columna de quitina (V0), (6) Flujo del lavado de la columna de quitina, (7) Flujo a través de la columna con DTT, (8) Eluido de la proteína recombinante.

5.4. PARTE IV

Análisis de la función biológica de péptidos sintéticos y de las proteínas recombinantes en función de la expresión de TLR5S en células totales de hígado a nivel transcripcional y de proteínas.

De acuerdo a lo descrito en la literatura, el mRNA de TLR5S es inducido significativamente en la línea celular de hepatoma de trucha (RTH-149) en respuesta a 10 unidades formadoras de colonias de *V. anguillarum*. De igual forma, se observó el mismo efecto utilizando 1 µg/mL de una flagelina recombinante de *V. anguillarum* (FlaA). En ambos casos, éste efecto se observó a las 4 horas post estímulo y su nivel máximo de expresión fue a las 6 horas, disminuyendo gradualmente, no observándose expresión del mRNA a las 48 horas post estímulo (Tsujiita *et al.*, 2004). Considerando éste antecedente, se realizó un ensayo similar utilizando células aisladas a partir de un tamizado de hígado de trucha arcoíris, éstas células fueron estimuladas con 1 µg/mL de los péptidos 517 (20 aminoácidos con bisagra de prolina), 518 (péptido de 50 aminoácidos con bisagra de prolina), 519 (péptido de 21 aminoácidos) y con las proteínas recombinantes. En el caso de la inducción con rFla se utilizó una concentración de 0,1 µg/mL y para rND1 0,1 µg/mL y 1 µg/mL, respectivamente. Todos los estímulos fueron realizados por 6 horas de acuerdo a los resultados obtenidos por Tsujiita en el 2004.

La expresión génica de TLR5S se determinó por qPCR, observándose que 0,1 µg/mL de rFla aumenta de forma significativa la expresión de TLR5S, a las 6 h post estímulo, con un aumento de 8,8 veces respecto del control de células sin estímulo (Fig. 5.12). Para los estímulos con rND1 se utilizaron dos concentraciones de 0,1 y 1 µg/mL, observándose que al usar 0,1 µg/mL de rND1 se induce 1,6 veces la expresión del transcrito, y al utilizar 1 µg/mL se logra una inducción de 2,2 veces la expresión de TLR5S respecto del control, siendo en ambos casos estadísticamente significativa.

Estos resultados muestran que las proteínas recombinantes generadas son capaces de activar el TLR5M, lo que origina una señalización intracelular que desemboca en la inducción del mRNA de TLR5S y su subsecuente sobreexpresión (Tsujiita *et al.*, 2004; Tsukada *et al.*, 2005; Hynes *et al.*, 2011).

Con respecto a los péptidos generados, tanto el 517, 518 y 519 activan este receptor, utilizando una concentración de 1 µg/ml como estímulo por 6h. Los resultados generados, dan cuenta de que el péptido 517 es capaz de inducir el mRNA de TLR5S en estas células y genera una sobreexpresión de 1,8 veces respecto al control. El péptido 518 es capaz de estimular el mRNA de TLR5S en 1,5 veces respecto al control y que ambos péptidos generan una diferencia significativa. Ahora bien, con respecto al péptido 519 éste también fue capaz de generar una sobreexpresión del mRNA de TLR5S de 1,1 veces sobre el control, que se traduce en un aumento del 10 % en la cantidad relativa del RNA mensajero para TLR5S bajo las condiciones de ensayo, sin embargo la diferencia no es significativa (Fig. 5.12).

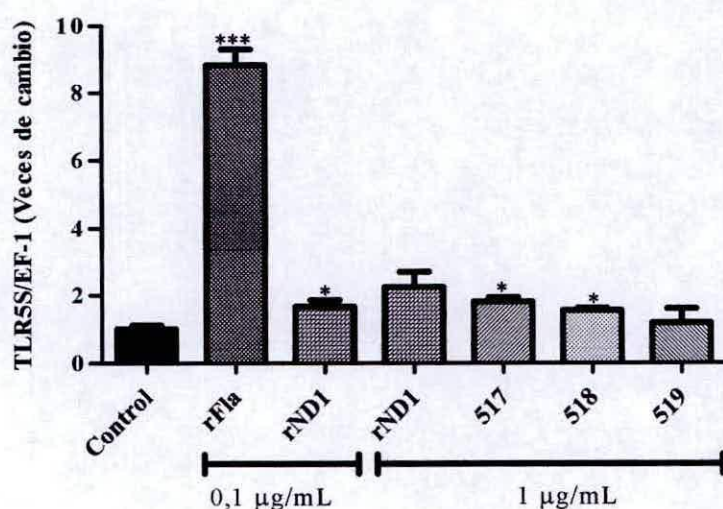


Figura 5.12. Selección del mejor péptido en función de la expresión de TLR5S en células aisladas de hígado de trucha arcoíris. A) Determinación de TLR5S a las 6 hrs post estímulo por qPCR, utilizando como gen endógeno el factor de elongación 1 (EF-1) en células aisladas de un homogenizado de hígado de trucha arcoíris. Control: corresponde al control sin estímulo, rFla: flagelina recombinante de *V. anguillarum*, rND1: proteína recombinante del dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum*, 517: péptido de 20 aminoácidos, 518: péptido de 50 aminoácidos, 519: péptido de 21 aminoácidos. Los resultados muestran las medias \pm error estándar de muestras por triplicado. Los (*) indican diferencias significativas con respecto al control sin estímulo, analizados por t-student, $p < 0,05$.

Dada la capacidad de los distintos péptidos sintéticos derivados de flagelina de *V. anguillarum* de inducir la expresión de TLR5S, se realizó la determinación de la proteína sintetizada mediante ELISA en el sobrenadante del cultivo de las células, utilizando el anticuerpo anti-TLR5S previamente generado en la parte II. Para éste ensayo, las células aisladas de hígado de trucha arcoíris, fueron

estimuladas con una concentración de 1 µg/mL de rND1 y del péptido 518. Como control positivo se uso 0,1 µg/mL de rFla, la proteína fue medida a las 24 h post estímulo (Fig. 5.13).

Los resultados representan las veces de cambio en la concentración de la proteína respecto al control sin estímulo, obteniéndose que tanto las proteínas recombinantes, como el péptido diseñado activarían el TLR5M, a las 24h post estímulo, produciendo la expresión y síntesis de TLR5S y su posterior secreción. Se observó en todos los tratamientos un incremento de la proteína de a lo menos 1,1 veces respecto al control sin estímulo, es decir 10 % sobre los niveles basales; sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los casos en función del método y tiempo empleado (Fig. 5.13).

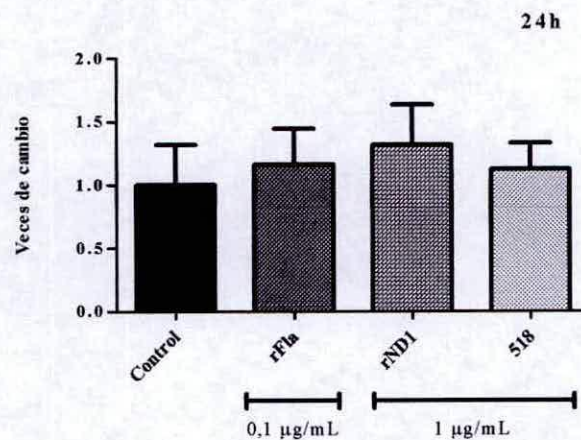


Figura 5.13. Determinación de TLR5S en células aisladas de hígado de trucha arcoíris a las 24h post estímulo por ELISA, utilizando un anticuerpo anti-TLR5S de trucha arcoíris. Control: corresponde al control sin estímulo, rFla: flagelina recombinante de *V.anguillarum*, rND1: proteína recombinante del dominio D1 de flagelina de *V.anguillarum*, 518: péptido de 50 aminoácidos. Los resultados muestran las medias ± error estándar de muestras por triplicado.

Los resultados, obtenidos tanto a nivel de transcrito como de la proteína nos dan cuenta que las proteínas recombinantes y los péptidos son capaces de generar la estimulación de las células aisladas de hígado, pudiendo activar su receptor de membrana, generando la sobreexpresión del mensajero para TLR5S de 1,1 a 8,8 veces respecto al control sin estímulo. Sin embargo, los datos obtenidos a nivel de transcrito no permiten determinar cuál de los péptidos es el más efectivo, principalmente porque los tres péptidos estudiados generaron la inducción de la expresión del TLR5S de una manera similar.

5.5. PARTE V

Análisis del efecto de los péptidos sintéticos y de las proteínas recombinantes sobre la expresión génica de citoquinas expresadas en cultivo de leucocitos de diferentes especies de peces

Los ensayos funcionales para medir las propiedades inmunomoduladoras de los péptidos sintéticos y de las proteínas recombinantes se desarrollaron en dos modelos de peces; Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y Dorada (*Sparus aurata*), utilizando macrófagos aislados de riñón anterior, los cultivos de las células se obtuvieron según protocolo descrito en la sección 4.8.2 de materiales y métodos.

Como se ha mencionado anteriormente flagelina se une al TLR5 de membrana y al TLR5 soluble. En el caso de TLR5M, su activación permite que la proteína adaptadora MyD88 inicie una cascada de señalización activando factores de transcripción y kinasas lo que resulta en la sobre-regulación de varias citoquinas inflamatorias para producir efectos proinflamatorios (Kawai *et al* 2007).

La funcionalidad de las proteínas recombinantes y de los péptidos sintéticos generados, se determinó por qPCR a través de la expresión de genes relevantes en la respuesta inmune innata como son las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α y la quimioquina IL-8. Los partidores utilizados en cada caso se especifican en el anexo I (complementos de materiales y métodos, Tabla A.2).

Primero, se determinó la dosis de rFla y rND1 necesaria para producir la expresión de IL-1 β en macrófagos de dorada, esta citoquina fue utilizada en consideración que su expresión es estimulada por diferentes PAMPs (Sepulcre *et al.*, 2007), entre ellos flagelina a las 3h post estímulo. Para rFla se utilizaron dos concentraciones 0.01 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ y para rND1 se utilizó 0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de estímulo (Fig. 5.14).

Los resultados de qPCR muestran que rFla es capaz de incrementar en más de 300 veces la expresión de la citoquina IL-1 β a las dos concentraciones utilizadas 0.01 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y con diferencias significativas con respecto al control sin estímulo. Ahora bien, con respecto a rND1, las tres

concentraciones de estímulo utilizadas generan una inducción en la expresión de IL-1 β , obteniéndose que con 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se incrementa 3 veces la expresión de esta citoquina, al utilizar una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el incremento es de 9 veces y al utilizar 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hay un aumento de 50 veces con respecto al control sin estímulo (Fig.5.14).

Estos resultados nos indican que tanto rFla como rND1 aumentan la expresión de IL-1 β a las 3h post estímulo en macrófagos de dorada y que la respuesta es dosis-dependiente. En base a este resultado se determinó que la mejor dosis a usar en los ensayos posteriores para rFla y rND1 es 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

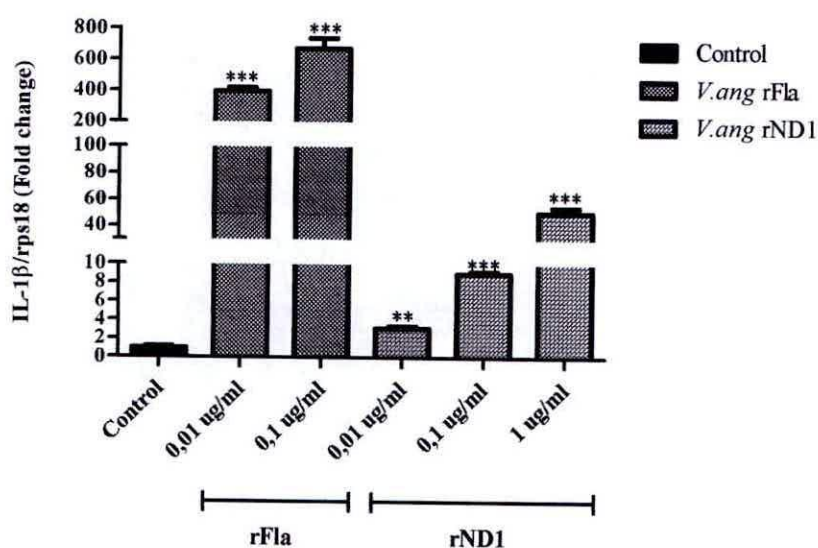


Figura 5.14. Dosis-respuesta de macrófagos de Dorada (*Sparus aurata*) estimulados por 3h con las proteínas recombinantes, rFla y rND1 de *V.anguillarum*, respectivamente. El incremento del mRNA de IL-1 β fue medido a través de la normalización con el mRNA S18 de dorada (rps18) y son presentados respecto al control sin estímulo. Los resultados son presentados como las medias \pm error estándar de muestras por triplicado. Los (*) indican diferencias significativas con respecto al control sin estímulo, analizados por t-student, $p < 0,05$.

Determinada la concentración necesaria para estimular los macrófagos de dorada se realizó la determinación de IL-1 β utilizando como estímulo los péptidos 517, 518, 519 y las proteínas recombinantes a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ equivalente a 2,41 μM ; sin embargo, para los péptidos se utilizó esta misma concentración y una diez veces más alta. Se realizó la conversión a molaridad para tener las mismas condiciones con todos los estímulos utilizados. Además se utilizó como control flagelina de *Bacillus subtilis* (InvivoGen) para validar nuestra flagelina recombinante y así poder utilizarla como control positivo en los ensayos siguiente.

Los análisis de expresión del transcrito por qPCR muestran que rFla genera una expresión de IL-1 β de más de 900 veces con respecto al control sin estímulo y de más de 50 veces con respecto a flagelina comercial. Con respecto a rND1, se obtiene un aumento de la expresión de IL-1 β de 6 veces más respecto al control (Fig. 5.15) y los tres péptidos sintéticos generan un aumento de la expresión de al menos 2,5 veces más respecto al control sin estímulo cuando se utiliza una concentración de 0,1 μ g/mL. Cuando la concentración de los péptidos se aumenta a 1 μ g/mL el péptido 517 aumenta de 2,5 a 4,3 veces más respecto del control sin estímulo, el péptido 518 aumenta de 5 a 240 veces respecto del control sin estímulo y el péptido 519 se mantiene constante a ambas concentraciones utilizadas (Fig. 5.15). Cabe destacar que todas las diferencias son significativas respecto del control sin estímulo.

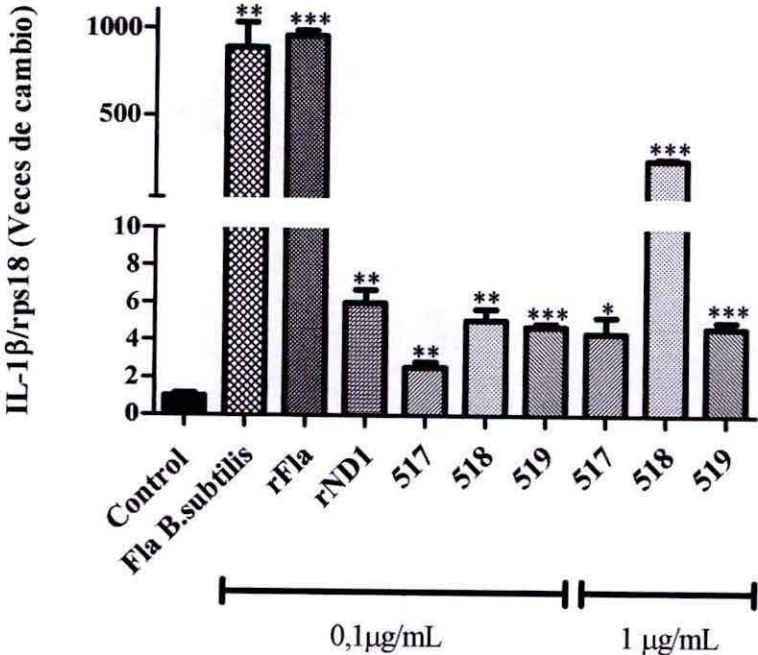


Figura 5.15. Determinación de IL-1 β por qPCR en macrófagos de Dorada, usando 0,1 μ g/ml y 1 μ g/ml de estímulo por 3h. C: control sin estímulo, rFla: flagelina recombinante de *V.anguillarum*, rND1: proteína recombinante del dominio rND1 de flagelina de *V.anguillarum*, C(+): Flagelina comercial (invivogen), 517: péptido de 20 aminoácidos, 518: péptido de 50 aminoácidos, 519: péptido de 21 aminoácidos. Los resultados muestran las medias \pm error estándar de muestras por triplicado. Los (*) indican diferencias significativas con respecto al control sin estímulo, analizados por t-student, $p < 0,05$.

Con estos resultados se determinó que la concentración necesaria para obtener una buena respuesta de los péptidos en los macrófagos de dorada era de 1 μ g/mL, 10 veces más de lo que se utilizó de rFla.

Una vez obtenidos los resultados para IL-1 β se determinó la expresión de TNF- α e IL-8 en macrófagos de dorada. La concentración de estímulo fue de 0.1 μ g/mL de rFla, sin embargo, para estudiar el efecto de los distintos péptidos se utilizó una concentración de 1 μ g/mL, tal como se menciona anteriormente. En la figura 5.16 A se puede observar que rFla genera un aumento en la expresión de TNF- α de 7 veces, respecto al control sin estímulo y de 4 veces respecto al control positivo, siendo estas diferencias significativas. Con respecto a rND1 y los péptidos 517, 518, 519, todos generan un aumento en la expresión de TNF- α de a lo menos 1,3 veces sobre los niveles basales del control sin estímulo (Fig. 5.16 A). Ahora con respecto a IL-8, los análisis de qPCR muestran que los macrófagos de dorada responden a todos los estímulos analizados, obteniéndose que rFla estimula la expresión de este gen en 900 veces con respecto al control sin estímulo y en 500 veces con respecto al control positivo, con diferencias significativas. Cabe señalar, que de los tres péptidos utilizados para estimular las células, el péptido 518 fue el que generó la mayor expresión de IL-8 en éstas células, produciendo una expresión de 100 veces, respecto al control sin estímulo, y el único de mayor inducción entre las diferentes citoquinas ensayadas (Fig. 5.16 B).

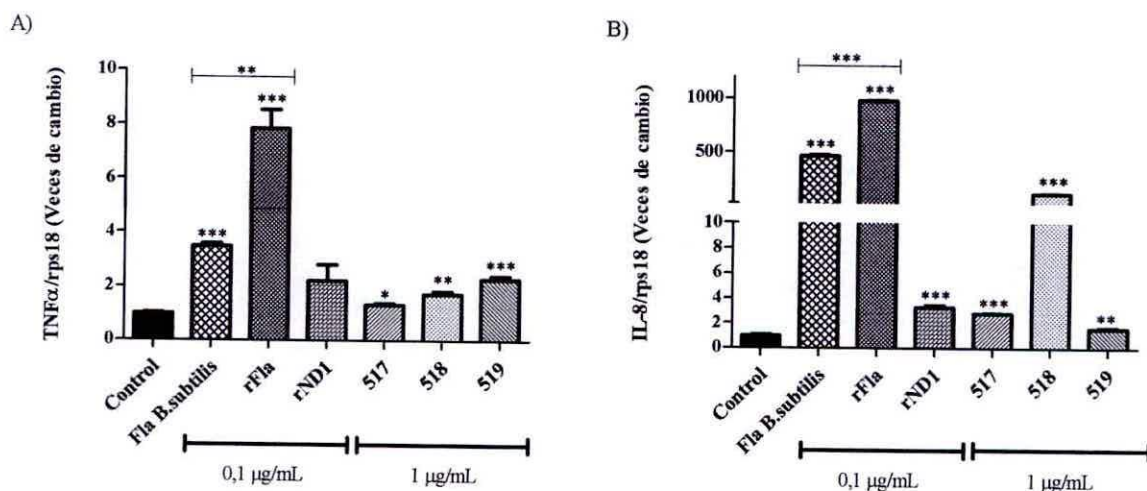


Figura 5.16. Determinación de TNF α en macrófagos de Dorada, estímulo utilizado de 0,1 μ g/ml y 1 μ g/ml por 3h. C: control sin estímulo, rFla: flagelina recombinante de *V. anguillarum*, rND1: proteína recombinante del dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum*, C(+): Flagelina comercial (invivogen), 517: péptido de 20 aminoácidos, 518: péptido de 50 aminoácidos, 519: péptido de 21 aminoácidos. Los resultados muestran las medias \pm error estándar de muestras por triplicado. Los (*) indican diferencias significativas con respecto al control sin estímulo, analizados por t-student, $p < 0,05$.

Basándonos en los resultados de qPCR obtenidos para las citoquinas IL-1 β , TNF α y la quimioquina IL-8 en los macrófagos aislados de dorada y considerando que en la parte III de esta tesis no se obtuvo resultados concluyentes respecto del péptido más efectivo en función al método aplicado asociado a la expresión de TLR5S en las células aisladas de hígado, tanto a nivel transcripcional como de proteínas, se optó por el péptido 518 para estimular los macrófagos de trucha arcoíris y evaluar la inducción del los mRNA de IL-1 β , TNF- α y la quimioquina IL-8, dado que en macrófagos de dorada, éste presentó los mejores resultados.

Como se contaba con un anticuerpo policlonal monoespecífico anti-IL-8 de trucha arcoíris (Santana *et al.*, 2012) y basándonos en los resultados obtenidos a nivel transcripcional para este gen en dorada, se desarrolló una curva dosis-respuesta del péptido sintético 518 en macrófagos de trucha arcoíris a las 3 h post estímulo. Los resultados determinados por ELISA muestran un incremento de 1,09 veces en la liberación de la proteína cuando se utiliza 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido, y de 1,23 veces cuando se utiliza una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respecto del control sin estímulo, traduciéndose en un aumento del 9% y 23% sobre el basal, respectivamente, y que ambas diferencias son significativas estadísticamente a las 3h (Fig. 5.17).

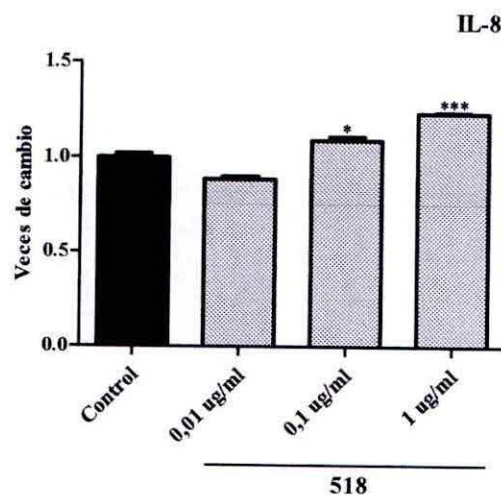


Figura 5.17. Dosis-respuesta de macrófagos de trucha arcoíris estimuladas por 3h con el péptido sintético. El incremento de la quimioquina IL-8 fue medido por ELISA y expresado como las veces de cambio respecto al control sin estímulo. Los resultados son presentados como las medias \pm error estándar de tres peces por duplicado. Los (*) indican diferencias significativas con respecto al control sin estímulo, analizados por t-student, $p < 0,05$.

Para los ensayos de qPCR los macrófagos fueron estimulados con 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rFla; sin embargo, se utilizó una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para rND1 y para el péptido 518. Basándonos en los resultados obtenidos previamente en dorada se determinó por qPCR la expresión de IL-1 β , TNF- α e IL-8 a las 3 y 6 h post estímulo.

Los resultados obtenidos muestran que rFla es capaz de estimular los macrófagos de trucha arcoíris, obteniéndose un incremento de 19 veces en la expresión de IL-1 β a las 3h de estímulo. El incremento de la expresión de TNF- α fue de 1,3 veces respecto al control sin estímulo y de 40 veces en la expresión de IL-8, todos con diferencias significativas respecto al control sin estímulo, lo que demuestra que esta proteína recombinante es funcional tanto en dorada como en trucha arcoíris (Fig. 5.18 A, B y C).

Con respecto a rND1 y el péptido 518, ambos son capaces de estimular los macrófagos de trucha arcoíris a las 3h de incubación, incrementando la expresión de los tres genes evaluados con respecto al control y que las diferencias son significativas. Los resultados muestran un incremento de IL-1 β en 2,1 veces utilizando rND1 y 1,4 veces con el péptido 518 (Fig.5.18 A). Para TNF- α , el incremento fue de 1,8 veces para rND1 y 1,2 veces para el péptido con respecto al control (Fig. 5.18 B). Con respecto a IL-8, se obtiene un incremento del transcrito en 3,1 veces para rND1 y de 2,5 veces para el péptido 518 (Fig. 5.18 C).

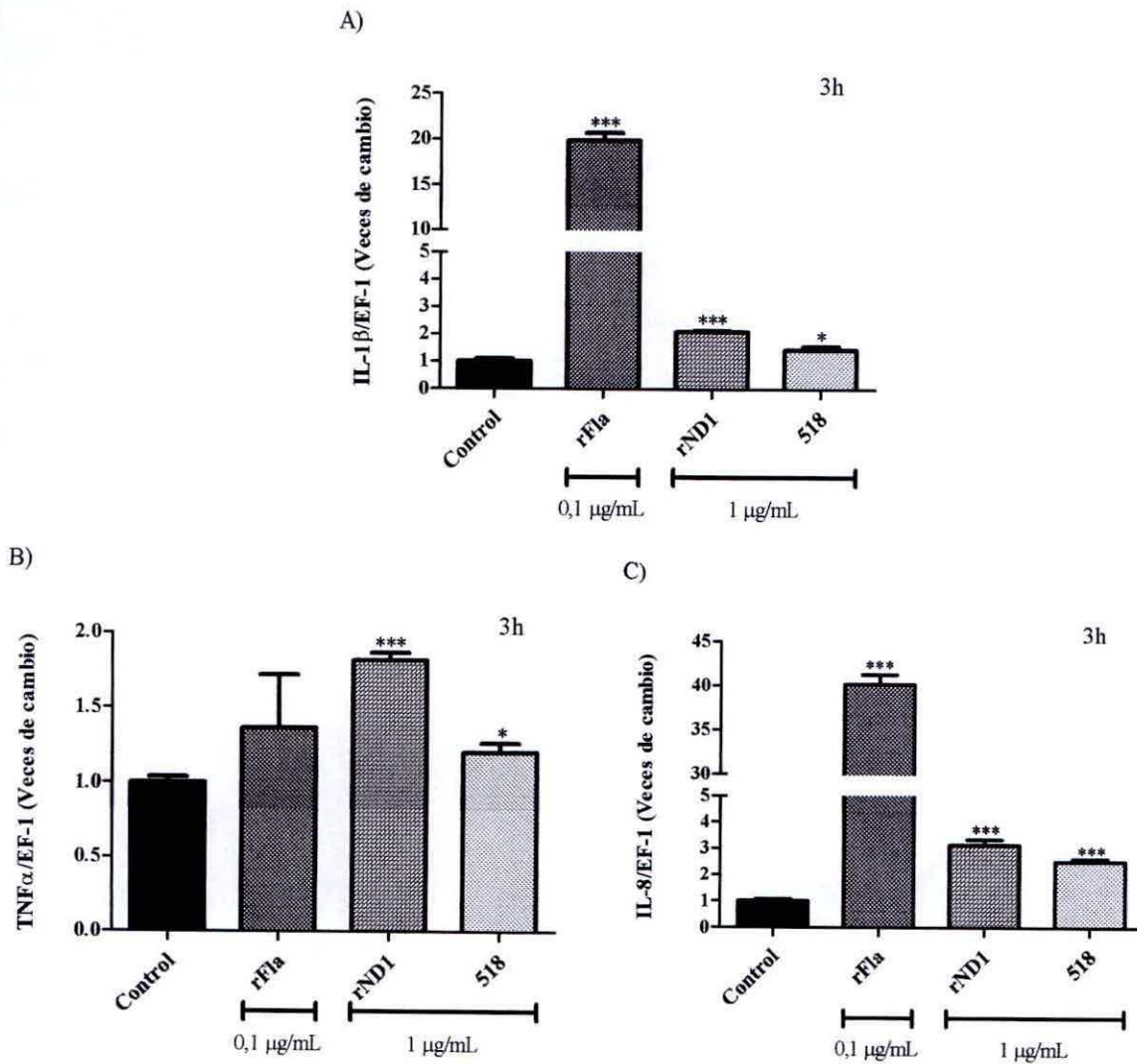


Figura 5.18. Análisis de expresión por qPCR de genes involucrados en la respuesta inmune innata en macrófagos de trucha arcoiris posterior a 3h de estimulación. Control: control sin estímulo, rFla: flagelina recombinante de *V. anguillarum*, rND1: proteína recombinante del dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum*, 518: péptido de 50 aminoácidos (El *10, indica la cantidad de estímulo por 10). Los resultados son presentados como las medias \pm error estándar de muestras por triplicado. Los (*) indican diferencias significativas con respecto al control sin estímulo, analizados por t-student, $p < 0,05$.

Paralelamente, se realizó el mismo experimento con 6h de estímulo, los resultados del qPCR muestran que rFla y rND1 incrementan la expresión de los tres genes estudiados, respecto al control sin estímulo (Fig. 5.19 A, B y C) y las diferencias son significativas. Sin embargo, los niveles de expresión son menores, principalmente en la inducción del mRNA de IL-8, la que disminuye más del 50 % con respecto a lo obtenido a las 3h de inducción (Fig. 5.18 A, B y C). Con respecto al péptido 518, la inducción de los genes estudiados disminuye considerablemente con respecto al control sin estímulo.

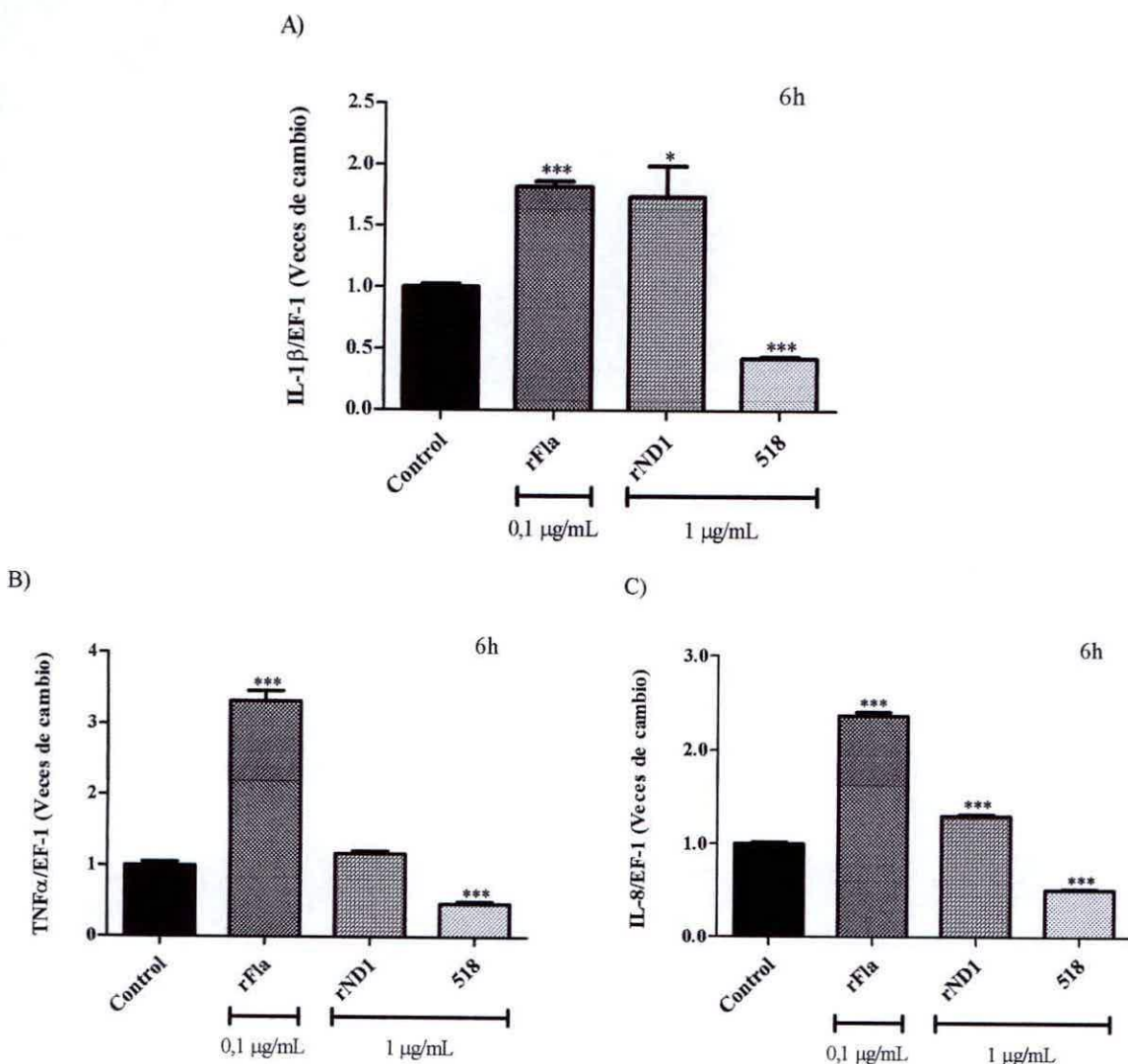


Figura 5.19. Análisis de expresión por qPCR de genes involucrados en la respuesta inmune innata en macrófagos de trucha arcoíris después de ser estimulados por 6h. Control: control sin estímulo, rFla: flagelina recombinante de *V.anguillarum*, rND1: proteína recombinante del dominio D1 de flagelina de *V.anguillarum*, 518: péptido de 50 aminoácidos (El *10, indica la cantidad de estímulo por 10). Los resultados son presentados como las medias \pm error estándar de muestras por triplicado. Los (*) indican diferencias significativas con respecto al control sin estímulo, analizados por t-student, $p < 0,05$.

De acuerdo a los resultados obtenidos a nivel transcripcional, se puede afirmar que las proteínas recombinantes generadas en esta tesis, así como el péptido sintético 518 diseñado a partir de la secuencia primaria de flagelina de *V. anguillarum*, son capaces de estimular la actividad transcripcional de macrófagos aislados de dos especies de peces teleósteos, trucha arcoíris y dorada, determinándose un incremento en la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune de estos peces.

Para verificar la síntesis de las distintas citoquinas por efecto de la inducción generada con los péptidos y proteínas recombinantes, se desarrollaron ensayos de inmunofluorescencia en la línea celular derivada de riñón anterior de salmón (SHK-1). Se realizó la determinación de la quimioquina IL-8, la cual en los resultados anteriores a nivel transcripcional incrementó sustancialmente sus niveles de mensajero cuando las células son estimuladas con las proteínas recombinantes. Para este ensayo se utilizó una concentración de 0,1 µg/mL de rFla y 1 µg/mL de rND1 y se determinó la expresión y localización por inmunofluorescencia de IL-8 a las 3h post estímulo, y como control negativo del experimento se utilizó PBS 1X.

Los resultados de esta inmunofluorescencia dan cuenta que existe un aumento en la disponibilidad de esta quimioquina, observándose aparentemente una mayor señal en las células tratadas, ya sea con rFla o bien con rND1 respecto al control sin estímulo y su localización es perinuclear (Fig. 5.20 C, D y B, respectivamente).

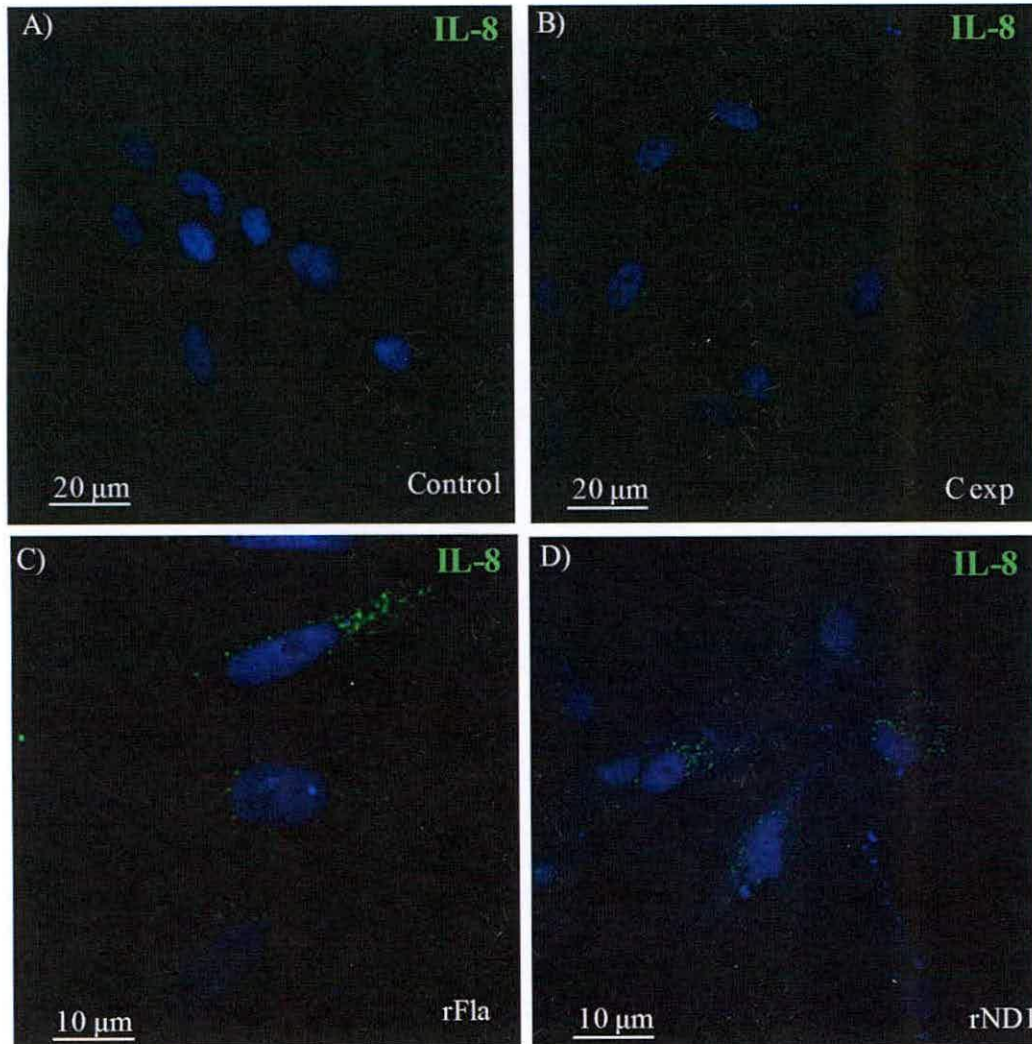


Figura 5.20. Determinación de IL-8 en células SHK-1 estimuladas con rFla y rND1 por 3h a través de microscopia confocal. A) corresponde al control sin primer anticuerpo. B) Control del experimento, sin estímulo. C) corresponden a células SHK-1 estimuladas con rFla. D) corresponden a las células SHK-1 estimuladas con rND1. El anticuerpo primario utilizado es anti-IL-8 de trucha arcoiris 1:50 y el anticuerpo secundario es anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 488, 1:200. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst.

6. DISCUSIÓN

La flagelina es la subunidad monomérica del flagelo, un importante factor de virulencia asociado a la motilidad en bacterias Gram positivas y Gram negativas, y además es el ligando que se une y activa el receptor tipo Toll 5 (TLR5) (Eaves-Pyles *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001; Akira y Sato, 2003; Smith *et al.*, 2003). La activación de este receptor permite la transducción de señales a través de la vía MyD88, en células del sistema inmunológico y epitelios, lo que genera la activación del factor de transcripción NF- κ B, la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas e interferones (Gewirtz *et al.*, 2001; Means *et al.*, 2003; Rebl *et al.*, 2010). Los genes de flagelina de una gran variedad de bacterias comparten regiones altamente conservadas en su extremo amino y carboxilo terminal del dominio D1, y estas regiones son las responsables de la actividad inmunoestimuladora de flagelina (Eaves-Pyles *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2003).

En trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y otras especies de teleósteos se ha identificado una forma soluble de TLR5, el cual no está presente en mamíferos (Oshiumi *et al.*, 2003; Tsujita *et al.*, 2004; Tsoi *et al.*, 2006; Baoprasertkul *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2010). Este receptor soluble carece del dominio de señalización citoplasmático y sólo posee un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (LRR), el cual se genera a partir de un gen específico (Tsoi *et al.*, 2006). Interesantemente, ambas isoformas del receptor son capaces de reconocer flagelina en su forma monomérica, lo cual sugiere la generación de una respuesta inmune robusta, mediada por estos receptores (Tsujita *et al.*, 2004). En base a éste antecedente, en esta tesis se desarrollaron por primera vez péptidos sintéticos y proteínas recombinantes derivados del dominio D1 de flagelina de *Vibrio anguillarum*, y se determinó *in vitro* su efecto inmunomodulador a través de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en células inmunitarias de peces teleósteos.

Para el desarrollo de los péptidos de flagelina de *Vibrio anguillarum*, nos basamos en los experimentos realizados por Smith *et al.*, (2003), el cual a través de ensayos de mutagenesis con alanina (*Alanine-scanning mutagenesis*), identificó 13 residuos de aminoácidos en el dominio D1 de flagelina FliC de *Salmonella typhimurium* que son importantes para el reconocimiento del receptor Toll 5 en mamíferos. Por tanto, la secuencia primaria de flagelina de *S. typhimurium* se alineó con la secuencia primaria de flagelina de *V. anguillarum* (Fig. 5.1). Se identificó en ambas secuencias el dominio D1, dominio conservado en estas proteínas y responsable de la activación del TLR5. Así mismo, el análisis *in silico*

mostró que los aminoácidos responsables de la activación del receptor en este dominio también se encuentran conservados en ambas secuencias.

Además Jacchieri y sus colaboradores realizaron una búsqueda *in silico* para predecir la región común de flagelinas de *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium* (Gillen *et al.*, 1991), *Listeria monocytogenes* (Sanchez-Campillo *et al.*, 1995), and *P. aeruginosa* (Totten *et al.*, 1990) que interactuara con el TLR5. Esta búsqueda confirmó que el dominio D1 está involucrado en el reconocimiento del TLR5 en *Salmonella* (Jacchieri *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Murthy *et al.*, 2004). Además se ha demostrado que flagelina de ϵ y α Proteobacterias no son reconocidas por TLR5, ya que éstos organismos poseen cambios específicos en el dominio D1, que previene el reconocimiento de flagelina por TLR5 (Andersen-Nissen *et al.*, 2005). Así mismo en *P. aeruginosa* cepa PAO1 se ha identificado una secuencia de 10 aminoácidos (LQRIRDLALQ, aminoácidos 88 al 97) en el extremo N-terminal de flagelina, la cual participa en la unión de esta proteína a su receptor (Verma *et al.*, 2005). Más específicamente, para esta proteína de *P. aeruginosa* fue predicho que la interacción flagelina-TLR5 involucra los residuos E552 (TLR5) / Q89 (flagelina), D555 (TLR5) / R92 (flagelina), y R558(TLR5) / D93. Se ha demostrado en la línea celular Caco-2 (células epiteliales de adenocarcinoma colorectal humano) que flagelina de *E. coli* enteroagregativa posee dos regiones en el dominio D1 conservado que son requeridos para la activación del TLR5 y la expresión y liberación de IL-8 (Donnelly *et al.*, 2002). Finalmente, considerando la distribución del dominio D1 a lo largo de la secuencia aminoácida de flagelina y los estudios de mutagénesis de la proteína de *S. typhimurium*, *S. entérica*, *S. muenchen* y *P. aeruginosa* han indicado que ciertos residuos del dominio D1 de flagelina son importantes para la activación del TLR5 (Smith *et al.*, 2003; Murthy *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2005).

A partir de los estudios de la estructura 3D de la forma cristalizada de flagelina FliC de *S. typhimurium* (PDB: 1UCU) se ha determinado que existen 4 dominios conectados linealmente denominados D0, D1, D2 y D3. El N-terminal de la cadena polipeptídica se inicia desde el dominio D0, pasando a través del dominio D1, D2 llegando a D3 y a continuación vuelve a través de D2 y D1, terminando con el C-terminal de la cadena en D0 (Fig.2.5). Los tres dominios D1, D2 y D3 están formados por pares de cadenas antiparalelas cortas y las que conectan los dominios D0 y D1 son conocidos como región *spoke* (Yonekura *et al.*, 2003). Este antecedente nos permitió realizar el modelamiento tridimensional de flagelina de *V. anguillarum* y de cada uno de los péptidos diseñados,

y así a partir de la secuencia de flagelina de *Salmonella typhimurium* obtener la estructura de cada uno de los péptidos (Fig. 5.3).

A la luz de éstos antecedentes, se diseñaron 4 péptidos análogos al dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum* (Fig. 5.2) que incluyeran los residuos del dominio D1, péptido 515 ubicado hacia el extremo amino y péptido 519 ubicado hacia el extremo carboxilo de la flagelina. Además, se diseñó otro péptido que incluyera todos los residuos de aminoácidos responsables de la activación del receptor y unidos por una bisagra de prolina (péptido 518) y un péptido que incluya sólo los residuos de aminoácidos que forman el núcleo central, unidos por una bisagra de prolina (péptido 517) (fig. 5.3). El diseño de los péptidos 517 y 518 se basó en estudios estructurales y funcionales que han demostrado que los residuos R90, L94 y Q97, los cuales están contenidos en estos dos péptidos, forman un núcleo central en la estructura de flagelina, el cual es esencial para el reconocimiento del receptor (Smith *et al.*, 2003).

De los péptidos diseñados fueron sintetizados el 517 que posee 20 aminoácidos, el 518 de 50 aminoácidos y el 519 de 21 aminoácidos, a través de la técnica en fase sólida F-moc de los grupos funcionales de los aminoácidos (Houghten, 1985). La pureza de cada uno de los péptidos sintéticos, fue verificada a través de HPLC, utilizando un extracto crudo de cada uno de los péptidos, (Fig. 5.4.1A, 5.4.2A, 5.5.3A) y determinándose el peso molecular de cada péptido por espectroscopia de masas (Fig. 5.4.1B, 5.4.2B, 5.5.3B).

Se generó flagelina, FlaB recombinante completa de *V. anguillarum*, la cual se aplicó como control positivo en cada uno de los ensayos destinados a validar la actividad biológica de los péptidos generados y una proteína recombinante correspondiente al extremo amino del dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum* (ND1). Finalmente se generó un anticuerpo contra flagelina de *V. anguillarum* y contra el TLR5S.

El anticuerpo generado para la detección de flagelina recombinante fue capaz de reconocer la proteína completa (40 kDa) y los agregados que ésta genera, analizado por western blot (Fig. 5,10B). Estos agregados también han sido descritos por otros autores al generar la proteína recombinante flagelina, FlaB de *S. typhimurium*, demostrando la autoagregación de la proteína en diferentes condiciones de fuerza iónica, lo cual fue verificado a través de microscopía electrónica (Saijo-Hamano *et al.*, 2004).

Una vez obtenidas todas estas herramientas biotecnológicas, se analizó la función biológica de los péptidos sintéticos y de las proteínas recombinantes rFla y rND1, analizando su efecto sobre la expresión del TLR5S en células totales de hígado de trucha. A partir de éstos análisis se pudo observar que tanto las proteínas recombinantes, como los péptidos sintéticos generados, son capaces de producir una respuesta a través del receptor Toll 5 de membrana, obteniéndose que con 0,1 µg/mL de rFLA se logra obtener un aumento de la expresión de TLR5S a las 6h post estímulo, correspondiente a 8,8 veces respecto del control sin estímulo y que además a la misma concentración para la proteína truncada, rND1 se genera un aumento en la expresión del transcrito de TLR5S de a lo menos 1,6 veces en estas células. Los péptidos generados del dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum* (517, 518) también fueron capaces de activar el TLR5M a las 6h post estímulo, al utilizar una concentración de 1 µg/mL, generando una expresión del transcrito de TLR5S de a lo menos 1,5 veces respecto al control sin estímulo, siendo en todos los casos una diferencia significativa (fig. 5.12).

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Tsujita et al., (2004) quienes demostraron que el TLR5S es inducido significativamente en la línea celular de hepatoma de trucha (RTH-149) en respuesta a 10 unidades formadoras de colonia de *V. anguillarum* atenuado, obteniendo un nivel máximo de expresión a las 6 horas post estímulo. Estos resultados también fueron observados cuando se estimulo esta línea celular RTH-149 con 1 µg/mL de flagelina FlaA recombinante de *V. anguillarum* (rFlaA). Estos resultados también fueron observados por Tsukada et al., (2005), quien evaluó en las mismas células la expresión de la citoquina de fase aguda, IL-1β, encontrando una sobre expresión de esta citoquina dentro de 1h y con un máximo a las 3h post estímulo con *V. anguillarum*, lo cual sugiere que TLR5S es otra proteína de fase aguda respondiendo a la infección bacteriana. Además, utilizando las mismas condiciones experimentales, evaluaron el efecto de Flagelina A recombinante obtenida con GST-tag desde *E. coli*, la que fue adicionada a las células RTH-149, confirmando los resultados obtenidos utilizando *V. anguillarum*, observándose el aumento de la expresión de TLR5S a las 6h post estímulo. Por lo tanto y de acuerdo a nuestro resultado TLR5S es diferencialmente sobre-regulado en células de hígado para responder positivamente a la respuesta inflamatoria generada por flagelina bacteriana y mediada por el TLR5 de membrana. Flagelina bacteriana puede ser capturada en los fluidos corporales por la forma soluble de TLR5 (Tsukada et al., 2005). Por lo tanto, al parecer el sistema de reconocimiento para flagelina es comparable al sistema de reconocimiento de LPS por el TLR4, donde la proteína LBP soluble y CD14 facilita el reconocimiento del LPS por TLR4 sobre la superficie de células inmune (Akashi et al., 2003; Miyake et al., 2004).

Tsujita *et al.*, (2006), desarrolló un ensayo para comprobar la capacidad de TLR5S para unir flagelina en células HeLa. Para esto, se generó una quimera para TLR5M, correspondiente al TLR5S fusionado al dominio de transmembrana y dominio TIR del TLR5 humano, el cual fue expresado en estas células. Ellos observaron que la fracción soluble de TLR5 de trucha tiene la capacidad de reconocer flagelina, ya que este receptor quimérico fue capaz de activarse y señalar la presencia de flagelina A y C de *V. anguillarum* a través de su ectodominio, lo cual implica la activación del dominio TIR humano del receptor provocando finalmente la activación del factor de transcripción NF- κ B, evaluado a través de un ensayo de lucifera en las células HeLa. Adicionalmente se comprobó que la co-expresión de Flagelina interactúa con el TLR5S a través de su dominio rico en repeticiones de leucina, presente en el ectodominio. Se comprobó además que la co-expresión de TLR5 humano con TLR5 soluble en células HeLa aumenta la respuesta de flagelina, reflejado en un aumento de la activación de NF- κ B medida por TLR5 humano. Lo anterior sugiere que TLR5S forma un complejo con flagelina, lo cual amplificaría la señal generada por la activación de TLR5M. De esta manera y a la luz de los resultados obtenidos en esta tesis, se puede postular que flagelina no solo es ligando de la forma de membrana y soluble de trucha arcoiris (Tsujita *et al.*, 2006) sino que además unida a su receptor induce la expresión de la forma soluble del receptor permitiendo una respuesta celular robusta dirigida a patógenos que presentan esta proteína.

Hynes *et al.*, (2011) generó dos formas diferentes de la flagelina D de *V. anguillarum*, una correspondiente a flagelina D completa de 377 aminoácidos, con un peso molecular aparente de 40,3 kDa (FDL) y una forma truncada de la proteína conteniendo los aminoácidos del 45 – 336 con un peso molecular aparente de 31,4 kDa (FDS). Para comprobar la capacidad de estas proteínas recombinantes de activar el factor de transcripción NF- κ B, se desarrolló un ensayo de luciferasa en células COS-7, comprobándose que la forma completa de la proteína (FDL) aparentemente activa más efectivamente la vía del TLR5 que la forma truncada (FDS), indicando que los residuos del N- terminal (1 – 44) y del C- terminal (337-377) podrían jugar un rol clave en la unión de flagelina a su receptor. Sin embargo, se plantea que el aumento en la activación de NF- κ B por la proteína completa con respecto a la proteína truncada podría deberse a que se han descrito dos receptores tipo-NOD presentes en humanos y ratones, el Naip5 y NLRC4, que son capaces de unir flagelina citosólica y contribuir a la activación del inflamasoma, generando una respuesta inflamatoria, incluyendo la activación de la caspasa 1 y NF- κ B (Franchi *et al.*, 2009).

De acuerdo a los antecedentes, rFLa, rND1 y los péptidos diseñados son capaces de activar el TLR5M, lo que origina una señalización intracelular que genera la inducción del mRNA de TLR5S y su subsecuente sobreexpresión en células de hígado de trucha arcoíris.

Purcell et al., (2006), demostró que leucocitos del riñón anterior de trucha arcoíris son capaces de responder *in vitro* a muchos de los agonistas de los TLRs en mamíferos. Demostrando que diferentes tipos de ligandos, estimulan distintos patrones de expresión de citoquinas, donde los genes evaluados para medir la inducción de la respuesta pro-inflamatoria son IL- β , IL8, y TNF- α .

Por lo tanto, para evaluar los efectos de los péptidos sintéticos y las proteínas recombinantes en la inmunidad de los peces, se desarrolló el análisis de expresión de citoquinas relevantes en la inmunidad innata de los peces como son IL-1 β , TNF- α y la quimioquina IL-8 en macrófagos de riñón anterior de dos modelos de peces teleósteos, Dorada y Trucha arcoíris.

La evaluación de la dosis efectiva a utilizar de cada una de las proteínas recombinantes se evaluó midiendo la citoquina proinflamatoria IL-1 β , citoquina que aumenta su expresión en cultivo de macrófagos de dorada al ser estimulados con diferente PAMPs independientemente (Sepulcre *et al.*, 2007).

Si bien la mayoría de los ensayos en que se evalúa la expresión de citoquinas generadas luego de estimular células con flagelina, utilizan 1-10 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína recombinante (Tsujiya *et al.*, 2004; Tsukada *et al.*, 2005; Purcell *et al.*, 2006; Tsujiya *et al.*, 2006; Sepulcre *et al.*, 2007; Hynes *et al.*, 2011) en esta tesis se desarrollo una curva de dosis/respuesta de 0,01 – 0,1 $\mu\text{g/mL}$ para rFLa y de 0,01; 0,1 y 1 $\mu\text{g/mL}$ para rND1, obteniéndose que ha concentraciones menores que las reportadas en bibliografía, nuestra proteína recombinante rFLA es capaz de incrementar en más de 300 veces la expresión de la citoquina IL-1 β en dorada y con diferencias significativas a las dos concentraciones utilizadas. De esta manera se eligió la concentración de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína para ser utilizado en ensayos posteriores (fig. 5.15). Ahora bien, con respecto a la proteína truncada rND1, se evaluaron 3 concentraciones y todas generaron la inducción en la expresión de IL-1 β en los macrófagos de dorada de a lo menos 3 veces con respecto al control sin estímulo (Fig. 5.15).

Analizando todos los resultados obtenidos en los ensayos funcionales en macrófagos de Dorada y Trucha arcoíris, podemos observar que flagelina, FlaB, recombinante de *V. anguillarum* (rFLa) es capaz

de generar una sobre-expresión *in vitro* de los genes involucrados en la respuesta inmune innata de los peces, citoquinas pro-inflamatorias, como son IL-1 β , TNF- α y la quimioquina IL-8. Además este efecto de flagelina de *V. anguillarum* es semejante e incluso mayor a los generados por Flagelina de *Bacillus subtilis*, proteína comercial (InvivoGen), utilizada como control positivo en los ensayos en dorada. Los resultados antes descritos son comparables a los obtenidos por Purcell et al., (2006), donde el evaluó el efecto de dos diferentes dosis de flagelina purificada desde *V. anguillarum* y *Edwardsiella*, (1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la expresión de genes involucrados en la respuesta pro-inflamatoria en leucocitos de trucha arcoíris. Para ambas flagelinas se observó que a las 6h post estimulación se genera una sobre-regulación en la expresión génica de los genes de las citoquinas proinflamatorias.

Sepulcre et al., (2007), caracterizó la capacidad de macrófagos de dorada de reconocer y responder a diferentes PAMPs, entre éstos flagelina de *B. subtilis* (invivoGen). Utilizando una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de esta proteína, se observó una sobre-regulación de IL-1 β , TNF- α , COX-2 (Ciclooxigenasa-2) a las 1.5 horas post estímulo, sugiriendo que estas células son capaces de responder a flagelina y generar una respuesta inflamatoria a través de la producción de citoquinas y la inducción de COX-2.

Ahora con respecto a la proteína recombinante truncada de flagelina, FlaB de *V. anguillarum* (rND1) correspondiente al extremo amino del dominio D1 de esta proteína (fig. 5.7), también generó un aumento en la expresión de cada una de las citoquinas evaluadas *in vitro*, sugiriendo que esta proteína también fue capaz de activar el TLR5 e inducir su señalización intracelular. Verma et al., (2005) a través de ensayos de mutagenesis identificó 10 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de flagelina de *P. aeruginosa* cepa PAO1 los cuales eran importantes para la activación del TLR5. Los cuales están contenidos dentro de la proteína recombinante truncada generada en esta tesis. Si bien Smith et al., (2001) identificó 13 residuos de aminoácidos presentes en el extremo N- terminal (L88, Q89, R90, L94, Q97, N100, E114) y C-terminal (I411, D412, L415, T420, L425, R431) del dominio D1 de flagelina, FliC de *S. typhimurium* que son requeridos para la activación del TLR5; Más aun, Andersen-Niessen et al., (2005) identificó mas específicamente la existencia de 3 aminoácidos ubicados en el extremo N-terminal del dominio D1 de flagelina, FliC de *S. typhimurium* (L89, Q90, L94), que serian esenciales para la activación del receptor, y que estos residuos son 100% conservados entre las diversas flagelinas bacterianas, lo cual indica que corresponden a residuos específicos y esenciales para la activación de TLR5, los cuales además están presente en nuestra proteína truncada de *V. anguillarum*.

Considerando los antecedentes antes descritos, los 3 péptidos generados a partir del dominio D1 de flagelina FlaB de *V. anguillarum*, contienen parte o la totalidad de estos residuos esenciales relacionados con la interacción de la proteína con su receptor TLR5. De esta manera se evaluó el efecto de éstos péptidos en macrófagos de Dorada, donde todos fueron capaces de activar el TLR5 y generar la señalización intracelular para la inducción de los genes involucrados en la respuesta inmune innata. Interesantemente el péptido 518 generó una mayor inducción de los niveles de expresión en los genes de citoquinas evaluados. Este péptido contiene los 13 residuos de aminoácidos descritos por Smith *et al.*, (2003), confirmando nuevamente la participación de estos residuos en la activación del TLR5.

Como se ha mencionado anteriormente estimulación de TLR5M y TLR5S con flagelina, produce la expresión de citoquinas inflamatoria, provocando una serie de efectos proinflamatorios y quimiotácticos para desencadenar la respuesta inmune innata y adaptativa (Hynes *et al.*, 2010).

Dentro de las citoquinas evaluadas, TNF- α es un importante factor de activación de macrófagos (MAF) producido por los leucocitos y se ha demostrado que induce una respuesta típica de macrófagos activados, evidenciada por un aumento de la especies reactivas del oxígeno, del nitrógeno, fagocitosis y producción de ácido nítrico en varias especies de peces (Hardie *et al.*, 1994; Mulero *et al.*, 1998; Tafalla *et al.*, 2001; Garcia-Castillo *et al.*, 2004). TNF- α recombinante de trucha se ha demostrado que aumenta la fagocitosis y la quimiotaxis de leucocitos de riñón anterior de trucha arcoíris e induce la expresión de un gran número de genes involucrados en la respuesta inmune como son IL-1 β , IL-8 y COX-2 (Whyte, 2007). En base a estos antecedentes, sugieren que los niveles aumentados de IL-1 β e IL-8, podrían ser una consecuencia del aumento en la expresión generada por TNF- α en los macrófagos de Dorada y trucha arcoíris luego de realizar los estímulos con las diferentes proteínas concentraciones de rFla, rND1 y péptidos derivados del dominio D1 de flagelina de *V. anguillarum*.

Durante etapas tempranas de la infección, IL-8 juega un rol fundamental en la iniciación y mediación de la respuesta inmune innata a través del reclutamiento de neutrófilos, linfocitos y eosinófilos al sitio de infección (Larsen *et al.*, 1989; Huber *et al.*, 1991). IL-8 es producida por varios tipos celulares los que incluyen monocitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliales y células epiteliales (Hoffmann *et al.*, 2002). Algunos reportes muestran que los PAMPs son sentidos a través de sus respectivos PRRs en las células del hospedero pudiendo inducir la fosforilación y la activación de proteínas MAP kinasas generando la subsecuente activación de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, e NF-IL6, permitiendo la transcripción del gen de IL-8 (D'Angio *et al.*, 2004). Flagelina de *E. coli*

enteroagregativa posee dos regiones en el dominio D1 conservado que son requeridos para la activación del TLR5 y liberación de IL-8 (Donnelly *et al.*, 2002). Además Flagelina puede estimular células del epitelio intestinal para liberar mediadores inflamatorios claves como IL-8 (Gewirtz *et al.*, 2001; McSorley *et al.*, 2002). Hecho que también ha sido mostrado en células epiteliales de pulmón (Lopez-Boado *et al.*, 2005), sin embargo los mecanismos por los cuales flagelina induce la expresión de IL-8 no han sido bien caracterizados en estas células.

Los resultados obtenidos al estimular tanto los macrófagos de dorada como de trucha arcoíris con las proteínas recombinantes y con el péptido 518 muestran que hay un aumento en la expresión del transcrito de IL-8 comparado al control sin estímulo. Con respecto a la evaluación de la generación de la proteína en macrófagos de trucha arcoíris estimulados con diferentes dosis del péptido 518 (fig. 5.17) se observa que existe un aumento de esta proteína a nivel intracelular, lo cual es menor al compararlo con los cambios de expresión obtenidos a nivel de transcrito. Lo anterior puede ser explicado ya que IL-8 al ser una proteína de exportación, se sintetiza y se libera al medio extracelular, lo cual dificultaría poder determinar la actividad traduccional generada por el aumento del transcrito. Lo más adecuado era determinar la proteína en el sobrenadante del cultivo celular, esto no se pudo realizar ya que la proteína se degrada fácilmente y se enmascara con la proteína en abundancia del suero fetal bovino presente en el medio de cultivo.

Para verificar la síntesis de las distintas citoquinas por efecto de la inducción generada con las proteínas recombinantes, se desarrollaron ensayos de inmunofluorescencia en la línea celular derivada de riñón anterior de salmón (SHK-1). Se realizó la determinación de la quimioquina IL-8, la cual en los resultados anteriores a nivel transcripcional incrementó sustancialmente sus niveles de mensajero cuando las células son estimuladas con las proteínas recombinantes generadas. Para este ensayo se utilizó una concentración de 0,1 µg/mL de rFla y 1 µg/mL de rND1 y se determinó la expresión y localización por inmunofluorescencia de IL-8 a las 3h post estímulo, como control negativo del experimento se utilizó PBS 1X. Los resultados de esta inmunofluorescencia dan cuenta que existe un aumento en la síntesis de esta quimioquina, observándose aparentemente una mayor señal en las células tratadas, ya sea con rFla o bien con rND1 respecto al control sin estímulo, con una localización perinuclear (Fig. 5.20 C, D y B, respectivamente). Aunque este resultado se correlaciona con los obtenidos anteriormente a nivel transcripcional en trucha y dorada, no son comparables considerando que es una línea celular de salmón del atlántico (SHK-1).

En peces, el desarrollo de los inmunoestimulantes se basa en la utilización de PAMPs como, LPS, β -glucanos y RNAs doble hebra, los cuales aumentan la protección no específica por activación de las respuestas proinflamatorias y actividad microbicida a través de los PRRs (Sakai, 1999; Iliev *et al.*, 2005). No todas las especies de peces cultivados responden de la misma manera a un inmunoestimulante, ya que existen diferencias genéticas y adaptativas importantes entre ellos que afectan el sistema inmune de los peces (Bricknell *et al.*, 2005). Tales problemas, junto con la alta variabilidad de la respuesta de los peces, dependiendo de la especie, condiciones ambientales y el mantenimiento, dificultan la selección preliminar y la prueba *in vivo* de drogas como candidatos a nuevos inmunoestimulantes, donde un método alternativo e para la evaluación de la actividad biológica de estas moléculas es el uso de cultivos celulares y ensayos *in vitro*, los cuales como estrategia prospectiva para el uso de inmunoestimulantes pueden dar resultados más repetitivos y más representativos, reduciendo la variabilidad *in vivo* y el costo de los ensayos de screening (Villena *et al.*, 2003; Fierro-Castro *et al.*, 2012).

Tomados juntos todos los resultados de esta tesis se puede concluir que tanto rFLA, rND1 y el péptido 518 son capaces de generar una respuesta en los macrófagos de dos especies de peces, generando la estimulación *in vitro* de genes que son de importancia en la respuesta inmune innata de estos peces.

Flagelina como adyuvante en vacunas de humanos ha sido reportado por varios grupos de investigación, aumentando la respuesta inmune innata a través de la vía de señalización del TLR5, promoviendo la inmunidad adaptativa inducida por el antígeno y permitiendo aumentar la protección contra desafíos bacterianos y virales (Applequist *et al.*, 2005; Honko *et al.*, 2006; Huleatt *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 2007). Estudios realizados en modelos murinos han demostrado que flagelina es un inmunógeno por sí misma y es capaz de inducir respuestas Th1 y Th2 (Cunningham *et al.*, 2004; Strindelius *et al.*, 2004).

La vacunación con antígenos conteniendo liposomas insertos con péptidos es una poderosa estrategia para estimular el sistema inmune innato y adaptativo para el desarrollo de potenciales vacunas. En este sentido péptidos conteniendo una secuencia del dominio N-terminal conservado de flagelina FliC de *S. typhimurium* (aminoácidos del 85-111) conteniendo un *tag* de histidina insertos en liposomas promueven fuertemente su unión a células dendríticas derivada de médula ósea murina y a esplenocitos CD11c⁺ y la unión a la célula se correlaciona con la expresión de TLR5 (Faham y Altin, 2010).

El genoma de *V. anguillarum* consta de 5 genes, *flaA*, *flaB*, *flaC*, *flaD* y *flaE* respectivamente que codifican las distintas flagelinas (Naka *et al.*, 2011). Un estudio reciente comparo la eficacia de la formulación de una vacuna suplementada con adyuvante basado en 4 de estas flagelinas (FlaA, FlaB, FlaD y FlaE) utilizando como modelo lenguado japonés (Japanese Flounder), encontrándose que estas flagelinas difieren en sus propiedades inmunoestimulantes y exhiben niveles variados de inmunoprotectividad y adyuvancia. El estudio demostró que flagelina, FlaB recombinante de *V. anguillarum* posee una fuerte inmunogenicidad e induce una protección significativamente alta *in vivo*, sugiriendo que flagelina de *V. anguillarum* podría ser utilizada como vacuna o inmunoestimulante en el control de las enfermedades en peces asociados con *V. anguillarum* u otros patógenos (Jia *et al.*, 2013).

Hynes *et al.*, (2011), generó flagelina, FlaD recombinante de *V. anguillarum* en dos formas, una de la forma total (FDL) y otra truncada (FDS) con porciones en el N- y C-terminal removidas para evitar la polimerización. Ambas formas de flagelina fueron utilizadas con un adyuvante con el antígeno LPH (hemocianina de *polyphemus hemolymp*) en un estudio de inmunización dosis-respuesta. FDS y FDL, estimulan el sistema inmune innato del salmón induciendo efectos proinflamatorios en los días 2, 4 y 7 y la expresión de citoquinas importantes como TNF α , IL-6, IL-8 e IL-1 β que fueron sobre-reguladas significativamente en el bazo.

Tomados juntos todos los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten postular a rFla, rND1 y el péptido 518 derivado del dominio D1 de flagelina FlaB de *V. anguillarum* como moléculas inmunoestimuladoras de peces de importancia en la industria salmonera nacional, pudiendo ser utilizados como inmunoestimulantes en peces cultivados, considerando que estas proteínas y péptido presentaron efectos inmunomoduladores *in vitro* en trucha arcoíris.

7. CONCLUSIONES FINALES

- El péptido sintético 518, generado a partir del dominio D1 de flagelina FlaB de *V. anguillarum*, generan la sobre-expresión de los genes de citoquinas pro-inflamatorias del tipo IL-1 β , IL-8 y TNF- α en células de riñon anterior de dorada y trucha arcoíris.
- Se logró generar flagelina, FlaB recombinante de *V. anguillarum* (rFla) y una proteína truncada de flagelina (rND1), demostrándose *in vitro* que ambas proteínas son funcionales, y generan la sobre-expresión de genes relacionados con la inmunidad innata de los peces, como son las citoquinas pro-inflamatorias del tipo IL-1 β , IL-8 y TNF- α en células de riñon anterior de dorada y trucha arcoíris .

8. PROYECCIONES FUTURAS

La generación de péptidos sintéticos basados en la estructura del sitio de unión de flagelina a TLR5 y la producción de dos proteínas recombinantes que resultaron ser funcionales en ensayos *in vitro*, aumentando los niveles transcripcionales de IL-1 β , TNF- α e IL-8, genes que son de importancia en la inmunidad innata de los peces, respaldan el efecto inmunomodulador de flagelina y péptidos derivados de flagelina, sugiriendo que pueden ser buenos inmunoestimulantes en peces de cultivo, no solo para el control y prevención de la vibriosis, sino que también con un efecto transversal a otras enfermedades, pudiendo ser administrada como inmunoestimulante en dieta o inyectable en combinación con vacunas monovalentes y multivalentes. En futuros estudios se podrá evaluar la actividad biológica de estas proteínas *in vivo* y corroborar los efectos en el sistema inmune en el organismo completo y determinar sus efectos protectivo en desafíos con patógenos bacterianos.

9. NOMENCLATURA

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- APCs: Célula presentadora de antígenos (*Antigen Presenting Cell*)
- ARN: Ácido ribonucleico
- BCA: Ácido Bicinconínico
- BSA: Albúmina de suero bovino
- CHO: Ovario de Hamster Chino
- cDNA: ADN complementario (*complementary DNA*)
- CDB: Dominio de unión a quitina (*chitin binding domain*)
- ClustalW: Programa para alineamiento múltiple de secuencias
- CMMs: Centros melanomacrofágicos
- DAB: 3,3'-Diaminobenzidina
- DC: Célula dendrítica
- DMF: dimetilformamida
- DTT: Dithiothreitol
- dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato
- EBI: Instituto de Bioinformática Europeo (*European Bioinformatics Institute*)
- EDTA: etanolamina tetra-acétato
- EF: Factor de elongación
- ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
- Fla: Flagelina
- Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonil
- HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento (*High-performance liquid chromatography*)
- HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
- Ig: Inmunoglobulina
- IL: Interleuquina
- IPN: Necrosis pancreática infecciosa causada por virus (*Infectious Pancreatic Necrosis*).
- IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- IRF-3: factor 3 regulatorio del interferón
- ISA: Anemia infecciosa del salmón causada por virus (*Infectious Salmon Anemia*).
- LPS: lipopolysaccharide (LPS)
- LB: Medio Luria-Bertani

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)
mRNA: ARN mensajero
NCC: células citotóxicas no específicas
ND1: Extremo amino del dominio D1
NF- κ B: factor de transcripción nuclear kappa B
NK: células agresoras naturales (*natural killer*)
NO: Óxido nítrico
NOD: dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
PDB: Base de datos proteica (*Protein Data Base*)
PRRs: receptores de reconocimiento de patrones
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RIG-1: ácido retinoico inducible del gen 1
ROS: Especies reactivas del oxígeno
rps18: Proteína ribosomal S18
SDS: Dodecil-sulfato de sodio
SHK-1: Células de riñón anterior de salmón
TAE: Buffer Tris-Acetato-EDTA.
TCR: Receptor de células T (*T Cell Receptor*).
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TFA: ácido trifluoroacético
TLRs: receptor tipo Toll (*toll-like receptor*)
TNF: Factor de necrosis tumoral
TRIS: tris-(hidroximetil)-aminometano

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkhalek N. K., Komiya A., Kato-Unoki Y., Somamoto T., Nakao M. 2009. Molecular evidence for the existence of two distinct IL-8 lineages of teleost CXC-chemokines. *Fish & Shellfish Immunology*. 27: 763–767.
- Aderem A., Underhill DM. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review Immunology* 17: 593-623.
- Agius C y Roberts R J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26, 499–509.
- Akira, S., y Sato, S. 2003. Toll-like Receptors and Their Signaling Mechanisms. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 35: 555-562.
- Andersen-Nissen, E., Smith, K., D., Strobe, K., L., Rassoulia Barrett, S., L, Cookson, B., T., Logan, S., M., y Aderem, A. 2006. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 102 (26): 9247–9252.
- Applequist S. E., Rollman E, Wareing M. D., Liden M., Rozell B., Hinkula J, et al. 2005. Activation of innate immunity, inflammation, and potentiation of DNA vaccination through mammalian expression of the TLR5 agonist flagellin. *Journal of Immunology*, 175(6):3882–91.
- Arora, S.K., Bangera, M., Lory, S. & Ramphal, R. 2001. A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 98: 9342–9347.
- Asche F., Hansen H., Tvetenas R., Tvetenas S. 2010. The Salmon Disease Crisis in Chile. *Marine Resource Economics*, 24: 405–411.
- Baoprasertkul P, Xu P, Peatman E, Kucuktas H, Liu Z. 2007. Divergent Toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5S, TLR20, TLR21. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 1218-1230.
- Bassity, E., Clark, TG., 2012. Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PloS One*. 7(3), e33196.
- Bravo, S., Midtlyng, P., 2007. The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999-2003. *Aquaculture* 270, 36–42.
- Bilodeau Lelania A., Peterson Brian C., Bosworth Brian G. 2006. Response of toll-like receptors, lysozyme, and IGF-I in back-cross hybrid (F1 male (blue x channel) x female channel) catfish challenged with virulent *Edwardsiella ictaluri*. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 29 39.
- Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005 The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*. 19, 457-472.
- Burnens Andre P. , Stanley John, Sack Ragna, Hunziker Peter, Brodard Isabelle y Nicolet Jacques.1997.. The flagellin N-methylase gene *fliB* and an adjacent serovar-specific IS200 element in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 143: 1539–1547.
- Cunningham AF, Khan M, Ball J, Toellner KM, Serre K, Mohr E, et al. 2004. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on *Salmonella* are Th1. *Eur J Immunol*. 34:2986–95.

D'Angio CT, LoMonaco MB, Johnston CJ, Reed CK, Finkelstein JN. 2004. Differential roles for NF-kappa B in endotoxin and oxygen induction of interleukin-8 in the macrophage. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 286 (1): L30-6.

Donnelly, M.A. y Steiner, T.S. 2002. Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 40456-40461.

Eaves-Pyles TD, Wong HR, Odoms K, Pyles RB. 2001. *Salmonella* flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *Journal of Immunology* 167: 7009-7016.

Ellis, A.E., 1988. Ontogeny of the immune system in teleost fish. In: Ellis, A.E. (Ed.), *General principles of fish vaccination*. Academic Press, pp. 20-31.

Faham A, Altin JG. 2010. Antigen-containing liposomes engrafted with flagellin-related peptides are effective vaccines that induce potent antitumor immunity and immunotherapeutic effect. *Journal of immunology.* 185(3):1744-54.

Ferguson, H.W. 1989 *Systemic Pathology of Fish. A text and atlas comparative tissue response in diseases of teleost.* Iowa state University Press. Ames. 5-103.

Fierro-Castro C, Barrioluengo L, López-Fierro P, Razquin BE, Carracedo B, Villena AJ. 2012. Fish cell cultures as in vitro models of pro-inflammatory responses elicited by immunostimulants. *Fish Shellfish Immunol.* 33(2):389-400.

Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. 2009. The inflammasome: a 869 caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease 870 pathogenesis. *Nat Immunol* 10 (3):241-7.

García-Castillo J, Chaves-Pozo E, Olivares P, Pelegrín P, Meseguer J, Mulero V. 2004. The tumor necrosis factor alpha of the bony fish seabream exhibits the in vivo proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. *The Cell and Molecular Life Sciences.* 61(11):1331-40.

Gasteiger, E, Gattiker, A, Hoogland, C, Ivanyi, I, Appel, R.D. y Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, vol. 31, no. 13, p. 3784-3788.

Gewirtz, A.T., Simon, P.O., Jr, Schmitt, C.K., Taylor, L.J., Hagedorn, C.H., O'Brien, A.D., Neish AS, Madara JL. 2001 *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *The Journal of Clinical Investigation* 107: 99-109.

Gillen, K. L., and K. T. Hughes. 1991. Molecular characterization of flgM, a gene encoding a negative regulator of flagellin synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173:6453-6459.

Hardie L, Chappell L, Secombes C. 1994. Human tumour necrosis factor alpha influences rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leukocyte responses. *Vet Immunol Immunop* 41: 73-84.

Harrison, L.,M., Rallabhandi, P., Michalski, J., Zhou, X., Steyert, S., R., Vogel, S., N., y Kaper, J., B. 2008. *Vibrio cholerae* Flagellins Induce Toll-Like Receptor 5-Mediated Interleukin-8 Production through Mitogen-Activated Protein Kinase and NF-kB Activation. *Infection and Immunity* 76(12): 5524-5534.

Harun N. O., Zou J., Zhang Y. A., Nie P., Secombes C. J. 2008. The biological effects of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant interleukin-8. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 673-681.

Hayashi, F., Smith, K., Ozinsky, A., Hawn, T., Yi E., Goodlett, D., Eng, J., Akira, S., Underhill, D., Aderem, A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099-1103.

- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *The journal of leukocyte biology*. 72(5):847-55.
- Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB. 2006. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun*. 74:1113-20.
- Hoop TP, Woods KR. 1985. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 78:3824-8.
- Hordvik, I., Torvund, J., Moore, L., Endresen, C. 2004. Structure and organization of the T cell receptor alpha chain genes in Atlantic salmon. *Molecular Immunology* 41: 553-559.
- Houghten Richard A. 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 82: 5131-5135.
- Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd, R.F., Weiss 3rd, S.J., 1991. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254, 99-102.
- Huleatt JW, Jacobs AR, Tang J, Desai P, Kopp EB, Huang Y, Song L, Nakaar V, Powell TJ. 2007. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine*. 25(4):763-75.
- Hwang, SD., Asahi, T., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T. 2010. Molecular cloning and expression study on Toll-like receptor 5 paralogs in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 29 (4), 630-8.
- Hynes NA, Furnes C, Fredriksen BN, Winther T, Bøgwald J, Larsen AN, Dalmo RA. 2011. Immune response of Atlantic salmon to recombinant flagellin. *Vaccine*. 29(44):7678-87.
- Iliev, D.B., Roach, J.C., Mackenzie, S., Planas, J.V., Goetz, F.W., 2005. Endotoxin recognition: in fish or not in fish? *FEBS Lett*. 579 (29), 6519-6528
- Jacchieri, S.G., Torquato, R. and Brentani, R., 2003. Structural Study of Binding of Flagellin by Toll-Like Receptor 5. *Journal of Bacteriology*. 185(14):4243.
- Jia, P., Hu, Y., Chi, H., Sun, B., Yu, W., Sun, L., 2013. Comparative study of four flagellins of *Vibrio anguillarum*: Vaccine potential and adjuvanticity. *Fish & Shellfish Immunology*. 34, 514-520.
- Johansson, P., Corripio-Miyar, Y., Wang, T., Collet, B., Secombes, C.J., Zou, J., 2012. Characterization and expression analysis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologue of the human dendritic cell marker CD208/lysosomal associated membrane protein 3. *Developmental & Comparative Immunology*. 37(3-4), 402-413.
- Kaiser E, Cole Scott RL, Bossinger CD, Cook PI. 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*. 34(2):595-598.
- Kawai, T. y Akira, S. 2007. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *TRENDS in Molecular Medicine* 13(11): 460-469.
- Kileng, O., Albuquerque, A., Robertsen, B., 2008. Induction of interferon system genes in Atlantic salmon by the imidazoquinoline S-27609, a ligand for Toll-like receptor 7. *Fish Shellfish Immunol*. 24, 514-522.
- Kirschning Carsten J., Bauer Stefan. 2001. Toll-like receptors: cellular signal transducers for exogenous molecular patterns causing immune responses. *International Journal of Medical Microbiology* 291: 251-260.

- Kolaskar, A.S. y Tongaonkar, P.C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters*, vol. 276, no. 1-2, p. 172-174.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 388, 621–625.
- Laemli, V. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Larkin, M, Blackshields, G, Brown, N.P, Chenna, R, Mcgettigan, P.A, Mcwilliam, H, Valentin, F, Wallace, I.M, Wilm, A, Lopez, R, Thompson, J.D, Gibson, T.J y Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, vol. 23, no. 21, p. 2947-2948.
- Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. 1989. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science*. 243(4897):1464-6.
- Lin S, Pan Y, Luo L, Luo L. 2011. Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish Shellfish Immunol*. 31: 788-794.
- Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, Davies DR. 2008. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*. 320(5874), 379-81.
- Lopez-Boado, Y.S., Cobb, L.M., Deora, R., 2005. *Bordetella bronchiseptica* flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells. *Infect. Immun*. 73, 7525–7534.
- Lovy, J., Wright, G.M., Speare, D.J., 2006. Morphological presentation of a dendritic-like cell within the gills of chinook salmon infected with *Loma salmonae*. *Dev. Comp. Immunol*. 30, 259.
- Lovy, J., Wright, G.M., Speare, D.J., 2008. Comparative cellular morphology suggesting the existence of resident dendritic cells within immune organs of salmonids. *Anat. Rec.—Adv. Integ. Anat. Evol. Biol*. 291, 456.
- Lovy, J., Savidant, G.P., Speare, D.J., Wright, G.M., 2009. Langerin/CD207 positive dendritic-like cells in the haemopoietic tissues of salmonids. *Fish Shellfish Immunol*. 27, 365.
- Magnadóttir, B., 1998. Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species. *Icelandic Agricultural Sciences* 12: 47-59.
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunology*. 20, 137–151.
- McDonald WF, Huleatt JW, Foellmer HG, Hewitt D, Tang J, Desai P, et al. 2007. A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *Journal of Infectious Diseases* ;195:1607–17.
- McSorley S, Ehst B, Yu Y, y Gewirtz A. 2002. Bacterial Flagellin Is an Effective Adjuvant for CD4+ T Cells In Vivo. *The Journal of Immunology*. 169: 3914–3919.
- Means Terry K., Hayashi Fumitaka, Smith Kelly D., Aderem Alan y Luster Andrew D. 2003. The Toll-Like Receptor 5 Stimulus Bacterial Flagellin Induces Maturation and Chemokine Production in Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 170: 5165–5175.
- Meena DK, Das P, Kumar S, Mandal SC, Prusty AK, Singh SK, Akhtar MS, Behera BK, Kumar K, Pal AK, Mukherjee SC. 2013. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*. 39(3):431-57.
- Miyake K. 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*. 12:186–92.

- Mizel SB, West AP, Hantgan RR. 2003. Identification of a sequence in human Toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 23624–29.
- Moore L.J., Dijkstra J.M., Koppang E.O., Hordvik I. 2009. CD4 homologues in Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology* 26: 10–18.
- Mulero V, Meseguer J. 1998. Functional characterisation of macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol* : 8: 143-156.
- Mulero I, Sepulcre M. P, Roca FJ., Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V. 2008. Characterization of macrophages from the bony fish gilthead seabream using an antibody against the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Developmental and Comparative Immunology* 32: 1151–1159.
- Muñoz I, Sepulcre MP, Meseguer J, Mulero V. 2013. Molecular cloning, phylogenetic analysis and functional characterization of soluble Toll-like receptor 5 in gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Fish Shellfish Immunol.* 35(1), 36-45.
- Murthy KG, Deb A, Goonesekera S, Szabó C, Salzman AL. 2004. Identification of conserved domains in *Salmonella muenchen* flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. *Journal of Biological Chemistry.* 279(7):5667-75.
- Naka H, Dias GM, Thompson CC, Dubay C, Thompson FL, Crosa JH. 2011. Complete genome sequence of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* harboring the pJM1 virulence plasmid and genomic comparison with other virulent strains of *V. anguillarum* and *V. ordalii*. *Infection and Immunity.* 79:2889-900.
- Narvaez Edgar, Berendsen Jorge, Guzman Fanny, Gallardo José A., Mercado Luis. 2010. An immunological method for quantifying antibacterial activity in *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) skin mucus. *Fish & Shellfish Immunology* 28: 235-239.
- Oshiumi, H., Tsujita, T., Shida, K., Matsumoto, M., Ikeo, K., Seya, T., 2003. Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics* 54, 791–800.
- Øverland Hanne S., Pettersen Eirin Fausa, Rønneseth Anita, Wergeland Heidrun I. 2010. Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 28: 193-204.
- Palti, Y. 2011. Toll-like receptors in bony fish: From genomics to function. *Developmental & Comparative Immunology.* 35 (12), 1263–1272.
- Patel, S., Sørhus, E., Fiksdal, I., Espedal, P., Bergh, Ø., Rødseth, O., Morton, H., Nerland, A., 2009. Ontogeny of lymphoid organs and development of IgM-bearing cells in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 26, 385–395.
- Pettersen Fausta E, Bjerknes R. y Wergeland H.I. 2000. Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 695-710.
- Press, C.McL., Reitan, L.J. y Landsverk, T. 1995. Antigen retention and enzyme reactivity in the spleen of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following administration of injectable furunculosis vaccine. *Journal of Fish Diseases.*, 18, 199-210.
- Prieto I, Herras-Stubbs S, Garcia-Granero M, Berasain C, Riezu-Boj J-I, Lasarte J-J, et al. 1995. Simple strategy to induce antibodies of distinct specificity: application to the mapping of gp120 and inhibition of HIV-1 infectivity. *European Journal of Immunology* 25:877- 883.

Purcell M, Smith K, Hood L, Winton J, y Roach J. 2006. Conservation of Toll-Like Receptor Signaling Pathways in Teleost Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D Genomics Proteomics* 1(1): 77–88.

Randelli Elisa, Buonocore Francesco, Scapigliati Giuseppe 2008. Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 326-340.

Rauta, P., Nayak, B., Das, S., 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters* 148, 23– 33.

Razquin, B.E., Castillo, A., Lopez-Fierro, P., Alvarez, F., Zapata, A., Villena, A.J., 1990. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immuno-and enzyme-histochemical study. *Journal of Fish Biology*. 36, 159–173.

Rebl, A., Goldammer, T., Seyfert, H. M. 2010. Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 134: 139–150.

Rønneseth, A., Wergeland, H., Pettersen, F., 2007. Neutrophils and B-cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 23, 493-503.

Sakai M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63–92.

Sanchez-Campillo, M., S. Dramsi, J. M. Gomez-Gomez, E. Michel, P. Dehoux, P. Cossart, F. Baquero, and J. C. Perez-Diaz. 1995. Modulation of DNA topology by flaR, a new gene from *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 18:801–811.

Sandor F., Buc M. 2005. Toll-like Receptors. I. Structure, Function and Their Ligands. *Folia Biologica (Praha)* 51, 148-156.

Santana, P., Palacios, C., Narváez, E., Guzmán, F., Gallardo, J., Mercado, L. 2012. Anti-peptide antibodies: A tool for detecting IL-8 in salmonids. *Electronic Journal of Biotechnology* 15 (5), 1-10.

Secombes CJ. 1993. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. En: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Robertsen BS, Van Muiswinkel WB, editores. *Techniques in fish immunology*. Segunda edición. Fair Haven, NJ: SOS Publications; 137-54.

Secombes CJ, Zou J. and Bird. 2009. Fish Cytokines: Discovery, Activities and Potential Applications. Zaccone G., Meseguer J., Garcia-Ayala A., Kapoor B.G. *Fish Defenses Volume 1: Immunology*. 1-36.

Sepulcre, M.P., Pelegrín, P., Mulero, V., Meseguer, J., 2002. Characterisation antibody unequivocally points to their involvement in fish phagocytic response. *Cell and Tissue Research*. 308 (1), 97-102.

Sepulcre MP, López-Castejón G, Meseguer J, Mulero V. 2007. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Molecular Immunology*. 44(8):2009-16.

Shen Linling, Stuge Tor B, Zhou He, Khayat Morad, Barker Katherine S, Quiniou Sylvie M A, Wilson Melanie, Bengtén Eva, Chinchar V Gregory, Clem L William, Miller Norman W. 2002. Channel catfish cytotoxic cells: a mini review. *Developmental and Comparative Immunology* 26: 141-149.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Frovenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C., 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*. 19, 76-85.

Smith, K., D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M., A., Rassoulian Barrett, S., L., Cookson, B., T., Aderem, A. 2003. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature Immunology* 4(12): 1247-1253.

Strandskog, G., Skjæveland, I., Ellingsen, T., Jorgensen, J.B., 2008. Double-stranded RNA-, CpG DNA-induced immune responses in Atlantic salmon: comparison, synergies. *Vaccine* 26, 4704–4715.

Strindeli L, Filler M, Sjöholm I. 2004. Mucosal immunization with purified flagellin from *Salmonella* induces systemic and mucosal immune responses in C3H/HeJ mice. *Vaccine*. 22:3797–808.

Tafalla C, Figueras A, Novoa B. 2001. Viral hemorrhagic septicemia virus alters turbot *Scophthalmus maximus* macrophage nitric oxide production. *Dis Aquat Org* 47:101– 107.

Tainer JA, Getzoff ED, Alexander H, Houghten RA, Olson AJ, Lerner RA, et al. 1984. The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature*. 312:127-34

Takeda Kiyoshi, Kaisho Tsuneyasu, y Akira Shizuo. 2003. Toll-Like Receptors. *Annual Review of Immunology* 21: 335–76.

Tort L., Balasch J., Mackenzie S., 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunologia*. 22: 277-286.

Totten, P. A., and S. Lory. 1990. Characterization of the type a flagellin gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK. *J. Bacteriol.* 172:7188–7199.

Tsujita, T., Tsukada, H., Nakao, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Seya, T., 2004. Sensing bacterial flagellin by membrane, soluble orthologs of Toll-like receptor 5 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Biological Chemistry*. 279, 48588–48597.

Tsoi, S., et al., 2006. Identification of a transcript encoding a soluble form of toll-like receptor 5 (TLR5) in Atlantic salmon during *Aeromonas salmonicida* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109 (1–2), 183–187.

Tsujita T, Ishii A, Tsukada H, Matsumoto M, Che F, Seya T. 2006. Fish soluble Toll-like receptor (TLR)5 amplifies human TLR5 response via physical binding to flagellin. *Vaccine* 24 : 2193–2199.

Tsukada, H., Fukui, A., Tsujita, T., Matsumoto, M., Iida, T., Seya, T., 2005. Fish soluble Toll-like receptor 5 (TLR5S) is an acute-phase protein with integral flagellin-recognition activity. *International Journal of Molecular Medicine*. 15, 519–525.

Verma, A., Arora, S.K., Kuravi, S.K, and Ramphal, R., 2005. Roles of Specific Amino Acids in the N Terminus of *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin and of Flagellin Glycosylation in the Innate Immune Response. *Infection And Immunity*. 73(12), 8237–8246.

Villena AJ. 2003. Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. *Fish Biology and Fisheries*.13:111-40.

Watts, M., Munday, B. y Burke, D., 2001. Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal* 79: 570-574.

West A. Phillip, Koblansky Anna Alicia, y Ghosh Sankar. ,2006. Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 22, 409–37.

Whyte SK. 2007. The innate immune response of finfish – a review of current knowl- 916 edge. *Fish Shellfish Immunol* 23 (6):1127–51

Yoder Jeffrey A. 2004. Investigating the morphology, function and genetics of cytotoxic cells in bony fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 138: 271–280.

Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. y Namba, K. 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 424: 643–650.

Yumiko Saijo-Hamano, Naoko Uchida, Keiichi Namba and Kenji Oosawa. 2004. In Vitro Characterization of FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, and FliE, Flagellar Basal Body Proteins of *Salmonella*. *J. Mol. Biol.* (2004) 339, 423–435.

Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C., Cortes, A., 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 126–136.

Zwollo P., Cole S., Bromage E., Kaattari S. 2005. B Cell Heterogeneity in the Teleost Kidney: Evidence for a Maturation Gradient from Anterior to Posterior Kidney. *The Journal of Immunology* 174, 6608–6616.

ANEXOS

INDICE DE ANEXOS

	Pág
ANEXO I: Complemento a Materiales y Métodos.....	90
Tabla A.1. Características de los partidores diseñados para amplificar Fla y ND1 de <i>Vibrio anguillarum</i> por PCR (Nº Acceso GenBank U52198.1).....	90
Tabla A.2. Características de los partidores utilizados para PCR tiempo real.....	90
ANEXO II: Complemento de Resultados.....	91
Gráfico 1. Hidrofobicidad en secuencia de TLR5S de trucha arcoíris.....	91
Gráfico 2. Flexibilidad en secuencia de TLR5S de trucha arcoíris.....	91
Gráfico 3. Hidrofobicidad en secuencia de flagelina de <i>V. anguillarum</i>	92
Gráfico 4. Flexibilidad en secuencia de flagelina de <i>V. anguillarum</i>	92
Figura 1. Alineamiento múltiple de las secuencias de flagelina de diferentes bacterias.....	93
ANEXO III: Productividad: Pasantía Doctoral, Publicaciones ISI y Presentaciones a congresos...	94

ANEXO I

Complemento a Materiales y Métodos

Tabla A.1.

Características de los partidores diseñados para amplificar Fla y ND1 de *Vibrio anguillarum* por PCR (N° Acceso GenBank U52198.1)

Gen	Partidor	Secuencia	Tm	Tamaño Producto
<i>FlaB</i>	Fla-F	CCTAAGGAGATCAATATGGC	60	1205 pb
	Fla-R	ACCTCATAGGTTGGCAGTGA		
<i>FlaB</i>	Fla- <i>NdeI</i> -F	<u>CATATGGCAATTAATGTAAGCACTAA</u>	60	1128
	Fla- <i>NdeI</i> -R	<u>CATATGACCCAATAGACTAAGAGCTG</u>		
<i>FlaB</i>	ND1- <i>NdeI</i> -F	<u>CATATGGCAGCGGGTCTACAAATCT</u>	60	396
	ND1- <i>NdeI</i> -R	<u>CATATGATAGCTCTTACCGCCCATC</u>		

Tabla A.2.

Características de los partidores utilizados para PCR tiempo real.

Especie	gen	partidores	N° acceso GenBank
Trucha arcoiris	IL-1 β	F- GGAGAGGTTAAAGGGTGGCGA R- TGCCGACTCCAACCTCCAACA	NM_001124347.1
Trucha arcoiris	IL-8	F- GGATGTCAGCCAGCCTTGTC R- TCCAGACAAATCTCCTGACCG	AY160981.1
Trucha arcoiris	TNF α	F- AGCATGGAAGACCGTCAACGAT R- ACCCTCTAAATGGATGGCTGCTT	NM_001124357.1
Trucha arcoiris	EF-1	F- ACCCTCCTCTTGGTCGTTTC R- TGATGACACCAACAGCAACA	NM_001124339.1
Trucha arcoiris	TLR5S	F-TGCTTCAAGTTATCTGCGAGGGGA R- TGGGGTGCATTTACCACTTGC	NM_001124208.1
Dorada	IL-1 β	F- GGGCTGAACAACAGCACTCTC R- TTAACACTCTCCACCCTCCA	AJ277166.2
Dorada	IL-8	F- GCCACTCTGAAGAGGACAGG R- TTTGGTTGTCTTTGGTCGAA	AM765841
Dorada	TNF α	F- TCGTTCAGAGTCTCCTGCAG R- TCGCGCTACTCAGAGTCCATG	AJ413189
Dorada	rps18	F- AGGGTGTGGCAGACGTTAC R- CTTCTGCCTGTTGAGGAACC	AM490061

ANEXO II

Complemento a Resultados

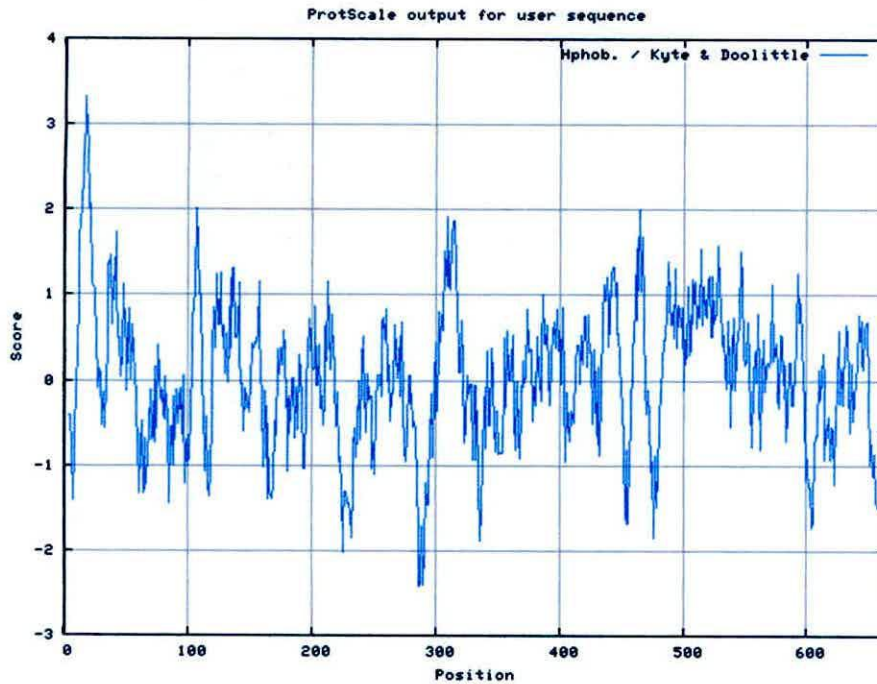


Gráfico 1.- Hidrofobicidad en secuencia de TLR5S de trucha arcoiris

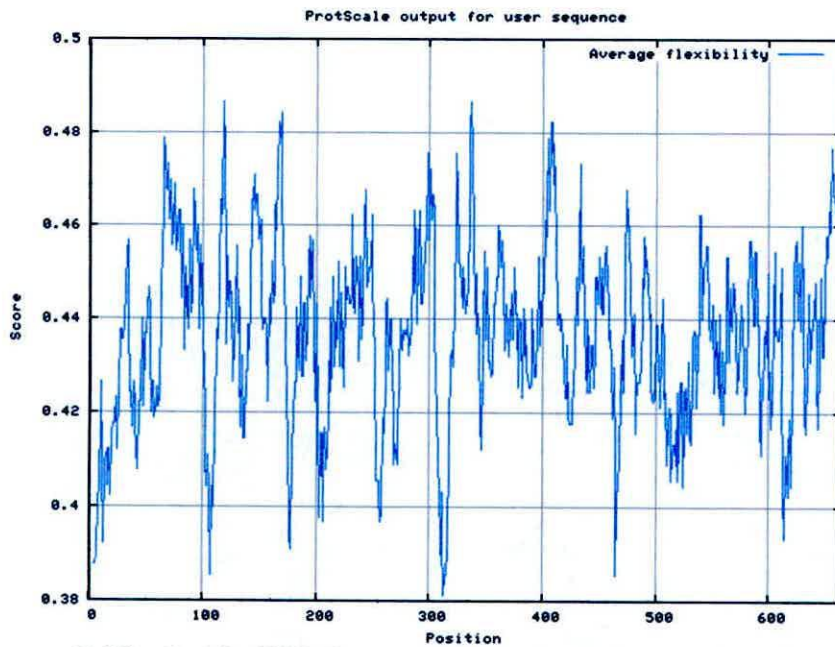


Gráfico 2.- Flexibilidad en secuencia de TLR5S de trucha arcoiris

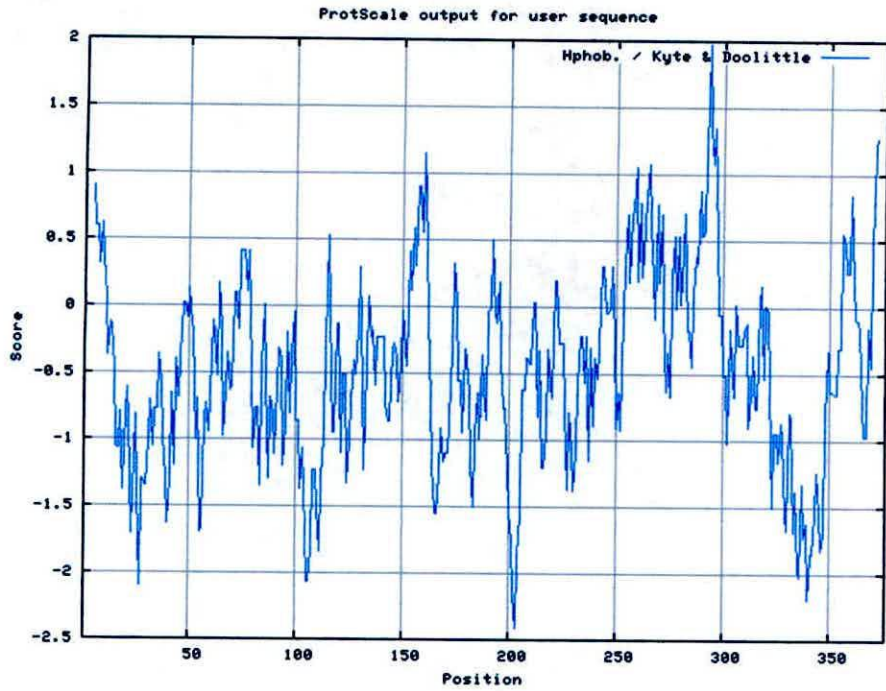


Gráfico 3.- Hidrofobicidad en secuencia de flagelina de *V. anguillarum*

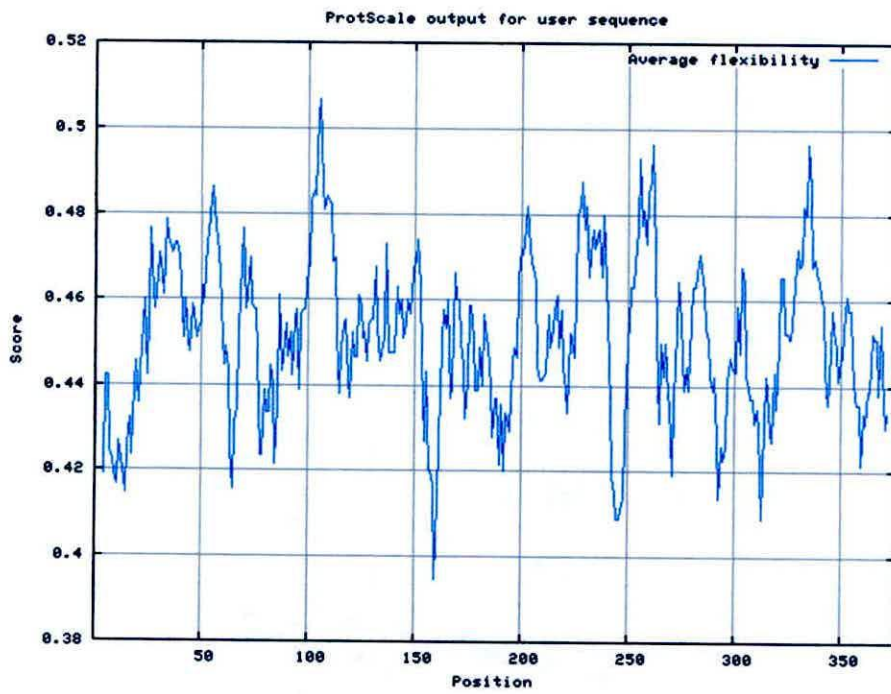


Gráfico 4.- Flexibilidad en secuencia de flagelina de *V. anguillarum*

```

S. typhimurium  AAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANS-- 58
E. coli         AAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRVRELTVQATTG-- 58
B. subtilis    AAGLAISEKMRGQIRGLEMASKNSQDGLISLIQTAEAGALTEHAILQRVRELWVQAGNTGT 60
P. aeruginosa  AAGLQISNRLSNQISGLNVATRNDGSIslaQTAEAGALQQSTNIIQRI RDLALQSANG-- 58
V. anguillarum AAGLQISNRLTSQSRGLDMAVRNANDGISIAQTAEAGMNETTNIILQRM RDLALQSANG-- 58
E. tarda       AAGQAIANRFTANINGLTQASRNANDGSIslaQTTEGALNEVNNNLQNI RRLSVQAQNG-- 58
A. salmonicida AAGLQISNRLTSQINGLDQGNRNANDGISVAQTAEAGMDEVTSMLQRMRTLAQQSANG-- 58
P. salmonis    AAGYAIITRMTTRLKGYDTAVRNASDAVSLVQIAGGAVGQQVNM LQRVRTLALQSAND-- 58
*** *  :: . * . :*.*.*: * : **: :   **.* * * : .

S. typhimurium  TNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLA-QDNTLTIQVGANDGETIDIDLK 117
E. coli         TNSESDLSSIQDEIKSRLEIDRVSGQTQFNGVNVLA-KNGSMKIQVGANDNQTTITIDLK 117
B. subtilis    QDKATDLQSIQDEISALTDEIDGISNRTEFNGKKLLD-GTYKVDTATPANQ-KNLVFIQ 118
P. aeruginosa  SNSDADRAALQKEVAAQQAELTRISDPTTFGGRKLLDGSFGTTSFQVGSNAYETIDISLQ 118
V. anguillarum SNSSSERQAIQEEVSALNDELNRIAETTSFGQNKLLNGSFGNKSFGIGADSGEAVMLSMS 118
E. tarda       SNSSSDLQSIQDEITQRLGEIDRISQQTDFNGVKVLS-KDQKLTIQVGANDGETIDIDLK 117
A. salmonicida SNNTDDRATALQQEYDQLMTEIDRVAGDPTFGQNLLGGYEG-TFQVGADAGQTITFRMT 117
P. salmonis    TNNTTDRANLNLEVQEIIEEFGFEAERTKFNGVRLLDGSLANQMFIQVEVDDTSLSLTFG 118
: . :  :: *      * :  :: * * . * . : *      : . : : :

S. typhimurium  PLQKIDAALAQVDTLRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLTSARSRI 454
E. coli         PLKALDDAIASVDKFRSSLGAVQNRRLDSAVTNLNNTTNLSAQSRRI 456
B. subtilis    QLKVVDEAINQVSSQRAKLGAVQNRLEHTINNLSASGENLTAESRI 263
P. aeruginosa  AIAVVDNALAAIDAQRADLGAVQNRFKNTIDNLTNISENATNARSRI 447
V. anguillarum AVALIDGALKAVDSQRA SLGAFQNRFGHAI SNLDNINENVNARSRI 335
E. tarda       PLATLDKALSQVDQLRSLGAVQNRFDVINNNLSTVNNLSASRSRI 335
A. salmonicida AMANLDYMIKVVD SKRAELGAVQNRFDSTIRNQANISENVNARSRI 265
P. salmonis    TVEIVDRAALDTLTIGAE LGAKQNRDLVVTIASIENQELNLT SARGRI 489
: : * : : : * * * * * : . . * . : . * *

```

Figura 1. Alineamiento múltiple de la secuencia proteica del dominio D1 de flagelina de diversas bacterias. El alineamiento fue creado con ClustalW, obteniéndose un promedio ~ 50% de identidad entre todas las secuencias.

ANEXO III

Productividad: Pasantía Doctoral, Publicaciones ISI y Presentaciones a congresos

Pasantía Doctoral:

Título trabajo: “ Caracterización de la capacidad inmunoestimulante de péptidos del dominio D1 de flagelina de *Vibrio anguillarum* mediante ensayos de qPCR e inmunológicos en leucocitos de trucha arcoíris.

Profesor a cargo: Dr. Victoriano Mulero.

Facultad de biología, departamento de biología celular e histología

Universidad de Murcia. España

Fecha pasantía: 1 de mayo – 31 de julio 2012

Financiamiento: Beca Chile de Pasantía Doctoral en el extranjero.

Publicaciones ISI:

González-Stegmaier, R., Romero, A., Mulero, V., and Mercado, L. Fish innate immune response evaluation by rFla and rND1 flagellin of *Vibrio anguillarum*. (Paper en preparación).

González-Stegmaier, R., Guzmán, F., Romero, A., Mulero, V., Mercado, L. A peptide derived from the D1 domain of *Vibrio anguillarum* flagellin modulates cytokines expression in Gilthead seabream and Rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*. Volumen 34, numero 6, pag. 1708.

Presentaciones a congresos:

3-7 Noviembre 2009

IX Congreso Latinoamericano de Inmunología. Hotel del Mar, Viña del Mar, Chile. Presentación formato Póster del Trabajo: "Theoretical evidences of fish TLR5 activation by peptide derived from flagellin". **Roxana González**, Fanny Guzmán, Gloria Arenas, Luis Mercado.

27-30 Septiembre 2011

XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Hotel Dreams, Valdivia, Chile. Presentación formato Póster del Trabajo: "Generation of antibodies as markers of cell activation in the adaptive immune system of teleost fish". **Roxana González**, Edgar Narváez, Paula Santana, Fanny Guzmán, Mónica Imarai y Luis Mercado.

28-3 Diciembre 2011

Congreso internacional "biotecnología Habana 2011. La Habana, Cuba. Presentación formato Póster del Trabajo en el simposio dedicado a biotecnología acuática. "Generation of synthetic peptides derived from *vibrio anguillarum* flagellin for potential use as immunomodulators in rainbow trout". **R. González**, E. Narváez, F. Guzmán, L. Mercado.

4-8 Diciembre 2011

Workshop Patógenos de Salmónidos. Pasado, Presente y Futuro. Buscando sustentabilidad. Puerto varas, Chile. Presentación formato Póster del Trabajo: "Generation of synthetic peptides derived from *vibrio anguillarum* flagellin for potential use as immunomodulators in rainbow trout"

R. González, E. Narváez, F. Guzmán, L. Mercado.

16-18 Enero 2013

IV Congreso Nacional de Acuicultura realizado en la Ciudad de Puerto Montt. Presentación formato Poster del Trabajo: Generación de un péptido derivado de flagelina de *Vibrio anguillarum* para su potencial uso como inmunomodulador en peces. **González-Stegmaier R**, Romero A, Guzmán, F, Mulero V, y Mercado, L.

25-28 Junio 2013

1ST International Conference of Fish and Shellfish Immunology, realizado en Vigo, España.
Presentación formado Poster del Trabajo: A peptide derived from the D1 domain of *vibrio anguillarum*
flagellin modulates cytokine expression in gilthead seabream and rainbow trout. **González-Stegmaier**
R, Guzmán F, Romero A, Mulero V, Mercado L.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada gracias al financiamiento de:

- **Beca CONICYT para estudios de doctorado.**
- **Beca Chile para pasantía doctoral en el extranjero.**
- **Becas CONICYT, PUCV para asistencia a congresos nacionales.**
- **Beca PUCV de apoyo para tesis doctoral .**
- **Beca PUCV de término de tesis doctoral.**