UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

Plataforma modular de vacunas de subunidad como estrategia de vacunación oral antiviral para peces de cultivo

Mauricio Rojas Peña

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons: https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons: https://creativecommons.org/licenses/?lang=es

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license: https://creativecommons.org/licenses/?lang=en

Plataforma modular de vacunas de subunidad como estrategia de vacunación oral antiviral para peces de cultivo

Nuevo enfoque profiláctico
para combatir infecciones virales
en especies acuícolas de interés comercial

Programa de Doctorado
en Acuicultura

Tesis Doctoral
Mauricio Rojas Peña

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina
2024

Directora Tesis
Nerea Roher Armentia

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina
Departament de Biologia cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia

CONTENIDO

RESUMEN *4*

RESUM *6*

ABREVIACIONES *8*

INTRODUCCIÓN GENERAL **9**

1. Acuicultura como sector productivo 10
2. Proliferación de enfermedades infecciosa 12
3. Enfermedades virales 13
4. Vacunas de peces 15
5. Tipos de vacunas antivirales 21

5.1 Vacunas vivas atenuadas 25
5.2 Vacunas inactivadas 25
5.3 Vacunas de subunidad recombinantes 26
5.4 Vacunas de Partículas Tipo Virus (*Virus like proteins,* VLP) 27
5.5 Vacunas de ADN 28

1. Adyuvantes 28
2. Métodos de vacunación en peces 31

7.1 Administración por inyección 33
7.2 Administración por inmersión 33
7.3 Administración oral 34

3. El sistema inmune 36

8.1 El sistema inmune innato 39
8.2 El sistema inmune adaptativo 41
8.3 Respuesta inmune celular 42
8.4 Citocinas 44
8.5 Respuesta Inmune antiviral 45
8.6 Interferón gamma 47
8.7 Quimiocinas 49
8.8 Respuesta inmune humoral 50
8.9 Inmunidad de la mucosa intestinal 51

4. Vacunas subunitarias recombinantes basadas en Cuerpos de Inclusión 55
10. Nuevo enfoque profiláctico de vacunación oral antiviral 59

REFERENCIAS *60*

OBJETIVOS GENERALES *70*

CAPITULO I **72**

Proteínas modulares nanoestructuradas del virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) como vacuna antiviral oral **72**

RESUMEN *73*

1. INTRODUCCIÓN *73*

2. MATERIALES Y MÉTODOS *76*

3. RESULTADOS *82*

4. DISCUSIÓN *94*

5. REFERENCIAS *98*

CAPITULO II **102**

Proteína antigénica modular del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) nanoestructurada con IFNγ como alternativa profiláctica de vacunación oral contra IPN virus **102**

RESUMEN *103*

1. INTRODUCCIÓN *103*

2. MATERIALES Y MÉTODOS *108*

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN *114*

4. CONCLUSIONES *134*

5. REFERENCIAS *135*

CAPITULO III **140**

Una vacuna de subunidad de administración oral y dirigida a la mucosa para proteger a los peces contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) **140**

RESUMEN *141*

1. INTRODUCCIÓN *141*

2. MATERIALES Y MÉTODOS *145*

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN *149*

4. CONCLUSIONES *164*

5. REFERENCIAS *166*

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES **170**

DISCUSIÓN GENERAL *171*

Plataforma modular de vacunas de subunidad 171

Caracterización de las plataformas modulares 175

Funcionalidad *in vitro*: Internalización y estimulación de la respuesta inmune antiviral 177

Funcionalidad *in vivo*: Inmunomodulación antiviral de las vacunas modulares 180

CONCLUSIONES *188*

REFERENCIAS *189*

AGRADECIMIENTOS *194*

RESUMEN

Las enfermedades virales que impactan la acuicultura necesitan ser controladas de forma barata y eficientemente. La vacunación es la principal herramienta preventiva para combatir enfermedades virales altamente infecciosas que afectan a los peces de cultivo. En la industria acuícola la mayoría de las vacunas antivirales disponibles son para salmónidos y por lo general son del tipo inactivadas y administradas por inyección, método que estresa a los peces afectando su bienestar general y a un alto costo comercial. En contraste, las vacunas suministradas por vía oral es el método ideal de entrega, sin la necesidad de manipular los peces y costos operacionales añadidos. Sin embargo, las vacunas orales presentan problemas de estabilidad y degradación del antígeno durante el proceso de digestión que deben ser resueltos. En este estudio, presentamos una innovadora plataforma modular recombinante de vacunas de subunidad para administración oral, nanoestructuradas como cuerpos de inclusión (IBs, *Inclusion bodies*). Los IBs, son agregados proteicos obtenidos de la producción de proteínas recombinantes que se creía que no tenían funcionalidad. No obstante, se ha demostrado que los IBs presentan interesantes propiedades funcionales, tales como; estabilidad estructural y térmica, seguridad con un alto contenido antigénico con la capacidad de internalizar células y liberación lenta de proteína funcional y son fáciles de producir a un reducido costo. Las plataformas modulares incluyen la proteína antigénica recombinante del virus unida a un His-tag en la parte C-terminal. Además, por el extremo N-terminal unimos el antígeno viral recombinante con un péptido espaciador a un Interferón gamma recombinante como adyuvante para evaluar si el dominio IFN induce un aumento de la respuesta inmune. De la misma forma, unimos el antígeno viral con IFN a una secuencia ligando, para evaluar si el ligando seleccionado tiene el potencial de dirigir la vacuna a células u órganos de relevancia inmunológica, y estimular una respuesta inmune local y/o sistémica. Para el estudio, seleccionamos el virus de la viremia primaveral que afecta a la carpa (SVCV) y el virus de la necrosis pancreática infecciosa que afecta a salmónidos (IPNV), especies que en conjunto representan cerca del 86% de la producción total de peces cultivados a nivel mundial. Por primera vez, diseñamos y producimos proteínas recombinantes nanoestructuradas de la glicoproteína G3 de SVCV (SVCV^{NP}), G3 de SVCV unido a IFNγ (SVCV-IFN^{NP}), proteína VP2 de IPNV unido a IFNγ (IPNV-IFN^{NP}) y VP2 de IPNV unido a IFNγ y un ligando CCR5 (IPNV-IFNγ-CCR5^{NP}). Realizamos la caracterización morfológica de las plataformas modulares por microscopia electrónica de barrido (FESEM) y demostramos que las nanoestructuras son internalizadas por células hepáticas de pez cebra (ZFL), por cultivos primarios de macrófagos de riñón anterior de trucha arcoíris (RT-HKM) y por células de intestino de trucha (RTgutGC), mediante citometría de flujo y microscopia confocal. A nivel *in vitro*, los módulos nanoestructurados indujeron la expresión de genes asociados a la inmunidad innata en células de ZFL, RTgutGC y RT-HKM. Los módulos recombinantes que incluyen el módulo IFNγ y/o ligando, mostraron funcionalidad inmunomoduladora induciendo un

incremento en la respuesta inmune antiviral y de vías de señalización de IFN y del receptor del ligando CCR5 (CCR11). En experimentos *in vivo* con larvas de pez cebra (*D. rerio*) demostramos que SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} fluorescentes son absorbidos a nivel intestinal y en páncreas. Además, demostramos que los peces cebra adultos vacunados con SVCV-IFN^{NP} y desafiados con el virus SVC, presentan un excelente nivel de protección, indicando el potencial adyuvante del módulo IFNγ. En ensayos *in vivo* con trucha arcoíris (*O. mykiss*) administrados por intubación oral, demostramos que IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} fluorescentes son absorbidos en el tracto intestinal, biodistribuidos al riñón anterior y endocitados por macrófagos del riñón. En poblaciones linfoides y mieloides colectadas y aisladas por *cell sorting* del intestino posterior de truchas intubadas oralmente con IPNV-IFN^{NP} se observó un incremento en la expresión de marcadores de genes inmuno relevantes. En experimentos *in vivo,* truchas juveniles fueron intubadas de forma oral con IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} y observamos la expresión de marcadores de genes de respuesta inmune en intestino posterior, bazo y macrófagos del riñón anterior el día 1, 3, 15 y 21 después de la intubación. En ensayos ELISA, truchas juveniles fueron intubadas oralmente con los módulos de IPNV y obtenido el suero a los 21 días después de la intubación. IPNV-IFN^{NP} mostró títulos de anticuerpos similares a los grupos control, sugiriendo que los peces fueron portadores asintomáticos de IPNV. No obstante, los sueros de las truchas intubadas con el módulo ligando (IPNV-IFN-CCR5^{NP}) mostraron una inducción significativa de anticuerpos específicos del virus IPN en comparación a IPNV-IFN^{NP} y los grupos control, lo que podría indicar que el ligando CCR5 puede estar promoviendo la migración celular y consecuentemente la inducción de anticuerpos específicos del virus de IPN. Los resultados en conjunto muestran, que las vacunas orales de subunidad que incluyen los módulos interferón gamma y/o ligando pueden estimular la respuesta inmune innata-adaptativa y proteger a los peces contra el virus de SVC e IPN.

RESUM

Les malalties virals que impacten l'aqüicultura necessiten ser controlades de manera barata i eficient. La vacunació és la principal eina preventiva per combatre malalties virals altament infeccioses que afecten els peixos de cultiu. A la indústria aqüícola la majoria de les vacunes antivirals disponibles són per a salmònids i, en general, són del tipus inactivades i administrades per injecció, mètode que estressa els peixos afectant el seu benestar general i amb un alt cost comercial. En contrast, les vacunes subministrades per via oral és el mètode ideal de lliurament, sense la necessitat de manipular els peixos i els costos operacionals afegits. Tot i això, les vacunes orals presenten problemes d'estabilitat i degradació de l'antigen durant el procés de digestió que han de ser resolts. En aquest estudi, presentem una innovadora plataforma modular recombinant de vacunes de subunitat per a administració oral, nanoestructurades com a cossos d'inclusió (IBs, *Inclusion bodies*). Els IBs, són agregats proteics obtinguts de la producció de proteïnes recombinants que es creia que no tenien funcionalitat. Tot i això, s'ha demostrat que els IBs presenten interessants propietats funcionals, com ara; estabilitat estructural i tèrmica, seguretat amb un alt contingut antigènic amb la capacitat d'internalitzar cèl·lules, alliberament lenta de proteïna funcional i són fàcils de produir a un cost reduït. Les plataformes modulars inclouen la proteïna antigènica recombinant del virus unida a un His-tag a la part C-terminal. A més, per l'extrem N-terminal unim l'antigen viral recombinant amb un pèptid espaiador a un Interferó gamma (IFN) recombinant com a adjuvant per avaluar si el domini IFN indueix un augment de la resposta immune. De la mateixa manera, unim l'antigen viral amb IFN a una seqüència lligant, per avaluar si el lligand seleccionat té el potencial de dirigir la vacuna a cèl·lules o òrgans de rellevància immunològica, i estimular una resposta immune local i/o sistèmica. Per a l'estudi, seleccionem el virus de la virèmia primaveral que afecta la carpa (SVCV) i el virus de la necrosi pancreàtica infecciosa que afecta salmònids (IPNV), espècies que en conjunt representen prop del 86% de la producció total de peixos cultivats a nivell mundial. Per primera vegada, s'han dissenyat produït proteïnes recombinants nanoestructurades de la glicoproteïna G3 de SVCV ($SVCV^{NP}$), G3 de SVCV unit a IFNγ ($SVCV\text{-}IFN^{NP}$), proteïna VP2 d'IPNV unit a IFNγ ($IPNV\text{-}IFN^{NP}$) i VP2 d'IPN a IFNγ i un lligand CCR5 ($IPNV\text{-}IFN\gamma\text{-}CCR5^{NP}$). Realitzem la caracterització morfològica de les plataformes modulars per microscòpia electrònica de rastreig d'emissió de camp (FESEM) i demostrem que les nanoestructures són internalitzades per cèl·lules hepàtiques de peix zebra (ZFL), per cultius primaris de macròfags de ronyó anterior de truita irisada (RT-HKM) i per cèl·lules d'intestí de truita (RTgutGC), mitjançant citometria de flux i microscòpia confocal. A nivell in vitro, els mòduls nanoestructurats van induir l'expressió de gens associats a la immunitat innata a cèl·lules de ZFL, RTgutGC i RT-HKM. Els mòduls recombinants que inclouen el mòdul IFN i/o lligant, van mostrar funcionalitat immunomoduladora induint un increment en la resposta immune antiviral i de vies de senyalització d'IFN i del receptor del lligand CCR5 (CCR11). En experiments

in vivo amb larves de peix zebra (*D. rerio*) demostrem que SVCV^{NP} i SVCV-IFN^{NP} fluorescents són absorbits a nivell intestinal i en pàncrees. A més, demostrem que els individus de peix zebra adults vacunats amb SVCV-IFN^{NP} i desafiats amb el virus SVC, presenten un excel·lent nivell de protecció, indicant el potencial adjuvant del mòdul IFNγ. En assaigs *in vivo* amb truita irisada (*O. mykiss*) administrats per intubació oral, demostrem que IPNV^{NP} i IPNV-IFN^{NP} fluorescents són absorbits en el tracte intestinal, biodistribuïts al ronyó anterior i endocitats per macròfags del ronyó. A poblacions limfoides i mieloides col·lectades i aïllades per *cell sorting* de l'intestí posterior de truites intubades oralment amb IPNV-IFN^{NP} es va observar un increment en l'expressió de marcadors de gens immunològics rellevants. En experiments *in vivo*, truites juvenils van ser intubades de forma oral amb IPNV-IFN^{NP} i IPNV-IFN-CCR5^{NP} i observem l'expressió de marcadors de gens de resposta immune en intestí posterior, melsa i macròfags del ronyó anterior a dia 1, 3, 15 i 21 després de la intubació. En assaigs ELISA, truites juvenils van ser intubades oralment amb els mòduls d'IPNV i obtingut el sèrum als 21 dies després de la intubació. IPNV-IFN^{NP} va mostrar títols d'anticossos similars als grups control, suggerint que els peixos van ser portadors asimptomàtics d'IPNV. No obstant això, els sèrums de les truites intubades amb el mòdul lligand (IPNV-IFN-CCR5^{NP}) van mostrar una inducció significativa d'anticossos específics del virus IPN en comparació amb IPNV-IFN^{NP} i els grups control, cosa que podria indicar que el lligand CCR5 pot promoure la migració cel·lular i conseqüentment la inducció d'anticossos específics del virus d'IPN. Els resultats en conjunt mostren que les vacunes orals de subunitat que inclouen els mòduls interferó gamma i/o lligant poden estimular la resposta immune innata-adaptativa i protegir els peixos contra el virus de SVC i IPN.

ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AMPs: Antimicrobial peptides
ANOVA: Analysis of variance
APC: Antigen presenting cell
APROMAR: Asociación empresarial de acuicultura española
ARN: Ácido ribonucleico
BCRs: B-cell receptors
Booster: Vacuna de refuerzo
CCL4: C-C motif chemokine ligand 4
CCR11: Rainbow trout chemokine receptor
CCR5: CC chemokine receptor type 5
DE: Desviación estándar
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
EF1-α: Elongation Factor 1-alpha
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
FAO: Food & Agriculture Organization of the United Nations
FBS: Fetal bovine serum
FESEM: Field emission scanning electron microscopy
FFU: Focus forming units
FITC: Fluorescein isothiocyanate
G: Glycoprotein
GALT: Gut-associated lymphoid tissue
GFP: Green fluorescent protein
HVCy-3: Cyprinid herpervirus 3
i:m: Intramuscular
i:p: Intraperitoneal
IBs: Inclusion bodies
IFM: Intensidad de fluorescencia media
IFN: Interferón
IFNγ: Interferón gamma
IFNGR2: Interferon gamma receptor 2
Igs: Inmunoglobulinas
IHNV: Infectious haematopoietic necrosis virus
IL-1β: Interleukin 1 beta
IL-10: Interleukin-10
IL: Interlukin
IP-10: IFN-gamma-inducible protein 10
IPNV Infectious pancreatic necrosis virus
IPTG: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
IRF: Interferon regulatory factor
iRFP: Infra-red fluorescent protein
ISAV: Infectious salmon anemia virus
JAK: Janus kinase
KHV: Koi herpes virus
LCDV: Lymphocystis diseases virus
LPS: Lipopolysaccharide
MHC: Major histocompatibility complex
Mx: Interferon-induced GTP-binding protein Mx
NOD: Nucleotide-binding & oligomerization
NPs: Nanopellets
O/N: Overnight
OD: Optical density
OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal
OMG: Organismo modificado genéticamente
ORF: Open reading frame
PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns
PBS: Phosphate buffered saline
PGN: Peptidoglycan
PLGA: Poly (lactic-c-glycolic acid)
Poly(I:C): Polyinosinic:polycytidylic acid
PRR: Pattern recognition receptors
RAS: Recirculation aquaculture system
RPS: Relative percentage survival
RSIV: Red sea bream iridovirus
RT-HKM: Rainbow trout head kidney macrophages
RT: Room temperature
RTgutGC: Rainbow trout intestinal ephitelial cell line
SAV: Salmonid alphavirus
STAT: Signal transducer & activator of transcription
SVCV: Spring viremia of carp virus
TCR: T cell receptor
Th: Helper T lymphocyte
TiLV: Tilapia tilapinevirus, o Tilapia lake virus
TLRs: Toll-like receptors
TNFα: Tumor necrosis factor alpha
Treg: Regulatory T cell
UK: United Kingdom
USA: United States of America
UV: Ultravioleta
VER: Viral encephalopathy & retinopathy
VHSV: Viral septicemia hemorrhagic virus
Vig-1: Viperin
VNNV: Viral nervous necrosis virus
VP2: Viral capside protein 2
ZFL: Zebrafish liver cell line

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Acuicultura como sector productivo

La Acuicultura es la práctica del cultivo de organismos de origen acuático (peces, moluscos, crustáceos y algas) para la alimentación humana. La producción acuícola es la industria alimentaria de mayor crecimiento durante las últimas tres décadas, debido principalmente a la creciente demanda de proteínas saludables de origen acuático y a la sobre explotación de peces mediante la pesca extractiva [1]. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [1], en el 2021 la producción pesquera y acuícola mundial alcanzó un récord de 218 millones de toneladas (t). La pesca extractiva reportó 92 millones de toneladas (42,3%) y la acuicultura 126 millones de toneladas (57,7%) (**Figura 1**).

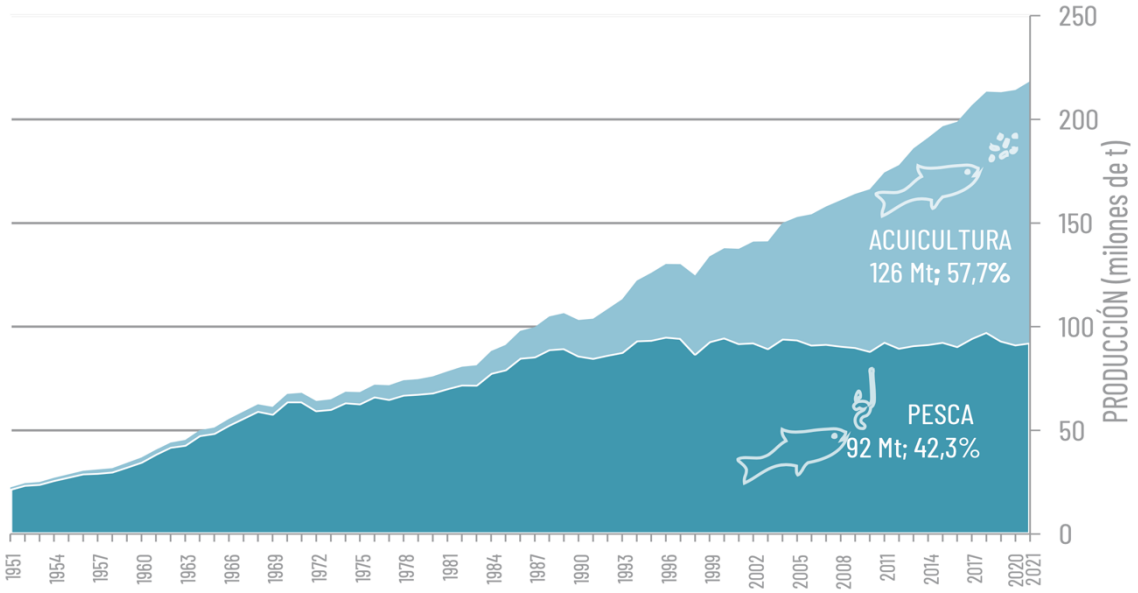


Figura 1. Producción mundial de la pesca extractiva y la acuicultura según la FAO (Periodo 1951-2021. Modificado de APROMAR 2023.

A nivel mundial, Asia domina la acuicultura produciendo el 92% del total y China es el productor más importante, alcanzando el 58% de la producción total. En contraste, la Unión Europea (UE) representa solo el 1% de la producción acuícola mundial en peso y 1,5% en valor [2]. Según la FAO, las principales especies producidas en la UE son el mejillón (423.379 t), la trucha arcoíris (193.266 t), la dorada (103.130 t), el ostión japonés (98.826 t) y la lubina (96.647 t) [1]. En el 2021 España fue el miembro de la UE con la mayor producción acuícola (271.060 t/23,7%), seguido de Francia (198.886 t/17,4%), Italia (145.862 t/12,8%), Grecia (143.926 t/12,6%) y Polonia (44.787 t/3,9%) (**Figura 2**).

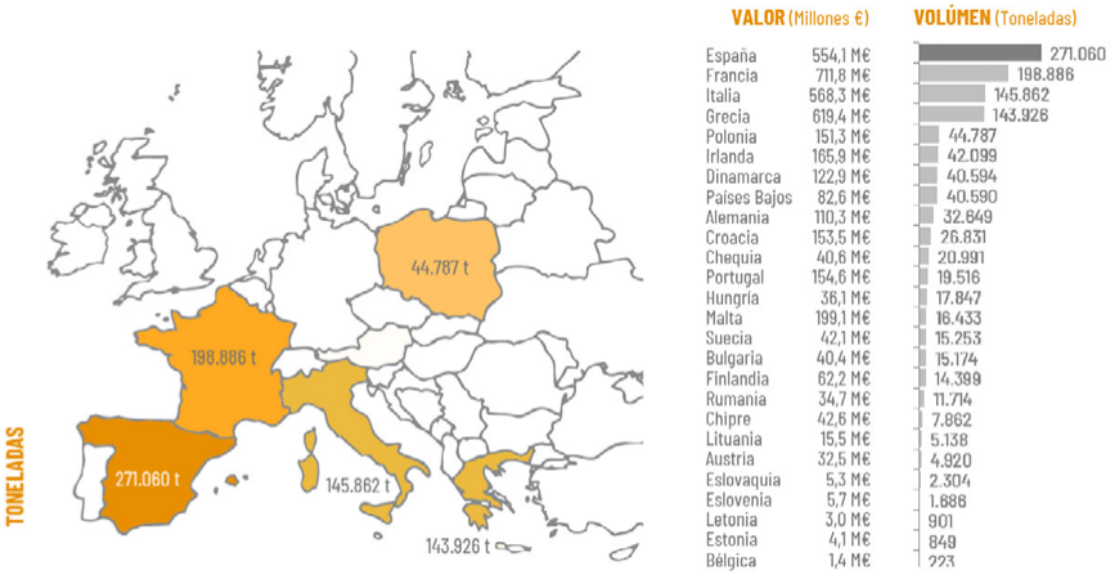


Figura 2. Producción de acuicultura en los Estados miembros de la Unión Europea. Modificado de APROMAR, 2023.

En España en el año 2021, la pesca extractiva aportó el 74,9% de los productos marinos en comparación al 25,1% que genera la acuicultura [3]. El 2022 en España las cosechas de las principales especies sumaron un total de 332.855 t con un valor de venta de 760,7 M€, desglosadas en mejillón (255.218 t/159,3 M€), lubina (23.622 t/181,6 M€), trucha arcoíris (16.328 t/43,6 M€) y atún rojo (10.877 t/183,2 M€) [3].

La UE es el primer mercado mundial para los productos acuáticos. En el 2019, la dependencia de los productos acuáticos en la UE fue de un 76,4 % del consumo, con una tasa de autosuficiencia del 23,6 % [3]. En definitiva, el consumo de animales acuáticos sigue al alza alcanzando un promedio de 20,2 kg/persona/año en el 2020, más del doble que el registrado (9,9 kg/persona) en la década de los 60s. Se estima que para el 2030, la producción acuícola total aumente en un 13% y que alcance los 100 millones de t [1]. La acuicultura se caracteriza por una enorme diversidad y dinamismo, tanto en términos de especies cultivadas como en la naturaleza de los sistemas de producción [4]. Sin embargo, la intensificación y expansión de la acuicultura enfrenta algunos desafíos y/o riesgos que pueden generar un impacto negativo muy significativo en el suministro de alimentos y en la economía, y que deben ser abordados de forma inmediata para que se desarrolle en un entorno biocontrolado y sea considerada social y económicamente sostenible. Uno de los principales obstáculos para la acuicultura sostenible de peces en muchas regiones, ha sido el control y prevención de las enfermedades infecciosas [5]. En este sentido, es imprescindible controlar y evitar al máximo el impacto de los sistemas de cultivo en el medio ambiente, y aplicar medidas preventivas de bioseguridad que tengan en cuenta la salud y bienestar de los animales de cultivo, para evitar

condiciones que contribuyan a la proliferación y/o brote de enfermedades infecciosas que afecten el desarrollo sostenible de la acuicultura.

2. Proliferación de enfermedades infecciosa

Las enfermedades infecciosas que afectan a los peces de cultivo son uno de los principales factores que limitan la expansión de la producción acuícola mundial, generando importantes pérdidas económicas que se estima alcanzan el 10% de la producción global de la acuicultura, superando los $10 billones de dólares anuales [6]. Los peces son regularmente cultivados y engordados de forma controlada en sistemas semi abiertos de canales (*raceways*) y lagos artificiales, en sistemas de recirculación (RAS) de agua dulce subterránea y superficial en estanques, y en sistemas abiertos de balsa jaula en agua marina costera o en mar abierto. Todos estos sistemas presentan condiciones que de alguna u otra forma pueden generar contaminación en el medio ambiente y estrés crónico en los animales, que pueden facilitar y favorecer la proliferación de enfermedades infecciosas. La aparición, gravedad y propagación de las enfermedades dentro de las poblaciones de peces, es similar a la asociada a las enfermedades en poblaciones humanas, sin embargo, en las poblaciones de peces el medio acuático tiene el componente adicional que puede facilitar la propagación de los agentes causantes de la enfermedad [7]. Las enfermedades se transmiten entre individuos de dos formas: mediante transmisión vertical a través de los embriones de generación en generación o por transmisión horizontal mediante el contacto directo entre peces o el medio infectado [7]. El brote y diseminación de las enfermedades infecciosas en la actividad acuícola intensiva, puede ser provocada por una combinación de factores, tales como; alta densidad de cultivo, déficit nutricional y/o inadecuada cantidad o calidad del alimento, movimiento de huevos y peces enfermos entre centros de cultivo, uso excesivo de antibióticos que promueven la resistencia a los fármacos, carencia y control de medidas de bioseguridad, cambios en los parámetros ambientales físico-químicos del agua (pH, CO_2, amonio, solidos suspendidos, temperatura y salinidad), y a la práctica del monocultivo que carece de diversidad genética y aumenta el riesgo de contraer y facilitar la diseminación de enfermedades infecciosas [1, 8]. Así también, se debe considera que el ambiente acuático tiene una gran diversidad de virus desconocidos, los cuales podrían infectar y causar enfermedades en los peces [8]. Además, las especies cultivadas pueden adquirir enfermedades infecciosas de las especies silvestres y, a su vez, exportar agentes infecciosos a las especies salvajes [9]. Eventos debidos al cambio climático, como las variaciones en la temperatura del agua y el aumento de vectores infecciosos, también pueden favorecer la ocurrencia y transmisión de enfermedades en los centros de cultivo [10, 11].

El Instituto Veterinario de Noruega (https://www.vetinst.no) acaba de reportar (marzo, 2024) que las enfermedades infecciosas lideran ampliamente con un 38% las causas por mortalidad en los centros

de cultivo noruegos, seguidas por las lesiones (traumas) con un 33 %, causas desconocidas un 20 % y otras causas con un 9%. Además, reportan que en el 2023 cerca de 40 millones de salmones (94%) y truchas (6%) de más de 3 g murieron en los centros de cultivo en tierra y que 65,3 millones de salmones (96%) y truchas (4%) murieron en la fase de agua de mar, registrando un aumento de mortalidad récord de un 16,7% y 14%, incremento de mortalidades nunca registradas por los noruegos (https://www.vetinst.no). Las enfermedades infecciosas más comunes fueron: 1) las llagas o úlceras de invierno (bacteriano), probablemente iniciado por el tratamiento mecánico en peces contra el piojo de mar, 2) el síndrome de miocardiopatía (CMS) relacionado causalmente con *Piscine Myocarditis Virus* (PMCV), 3) la enfermedad de las branquias, sin agente causal definido, 4) la inflamación del corazón y el músculo esquelético (HSMI), asociada con la infección por ortoreovirus de Piscine (PRV) y 4) la pasteurelosis agente causal bacteriano.

En resumen, una combinación de medidas inmuno-profilácticas de bioseguridad enfocadas a la aplicación eficiente de herramientas de gestión sanitaria como una constante vigilancia y control de las enfermedades establecidas y emergentes, la mejora, revisión y actualización de los protocolos de bioseguridad, los regímenes de vacunación y el uso de inmunoestimulantes y/o uso de vacunas de refuerzo (*booster*), han ayudado y podrían contener en el futuro las perdidas debido a enfermedades virales o cualquier otro tipo de enfermedades infecciosas [12], aminorando significativamente el impacto negativo de éstas en el desarrollo de la industria acuícola global.

3. Enfermedades virales

Los cultivos de peces en la acuicultura son afectados por enfermedades en diversos grados, y a medida que se cultivan nuevas especies y se exploran y aplican nuevos métodos de cultivo, surgen y reaparecen enfermedades que plantean nuevos obstáculos y retos a la acuicultura global [5]. El agente común causal más recurrente de enfermedades infecciosas, son las bacterias, seguido de las enfermedades virales, los parásitos y los hongos [9, 13]. Entre las enfermedades patogénicas observadas en los organismos acuáticos, las enfermedades virales son las de mayor impacto [13] y más devastadoras, causando grandes pérdidas a la industria acuícola [14], además de ser las enfermedades más difíciles de controlar, debido a la elevada susceptibilidad de los animales a edades tempranas, la falta de medidas terapéuticas antivirales, el conocimiento insuficiente de la patogénesis de las infecciones virales y de los mecanismos naturales de resistencia de las poblaciones de peces [15]. Adicionalmente, las enfermedades virales pueden reducir el bienestar de los peces al causar diversas condiciones que afectan su bienestar, como la disminución de la ingesta de alimento, comportamiento anormal de natación, depredación de peces enfermos e interacciones sociales negativas [8]. Muchas de las enfermedades que causan un impacto económico significativo en acuicultura son de origen viral, las cuales no cuentan con tratamientos disponibles o tienen un

limitado número de vacunas comerciales de parcial eficacia [5]. Dhar y colaboradores listan las principales enfermedades virales que afectan a especies de peces de interés comercial [12]. Por otro lado, La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) es responsable de recopilar y difundir información sobre enfermedades animales, incluyendo las enfermedades virales en peces. Brevemente, se señalan y describen las principales enfermedades virales de declaración obligatoria para la OIE [1]: 1) La Infección por Síndrome ulcerante epizoótico (SUE), es una enfermedad causada por un hongo (*Aphanomyces invadans*) que afecta principalmente a peces de agua dulce tropicales de agua caliente como la tilapia y el pez gato, y se caracteriza por la aparición de ulceras en la piel y aletas que pueden causar la muerte sino se tratan oportunamente; 2) La Infección por el alfavirus de los salmónidos (SAV) es un virus que afecta a salmones y truchas. Es una enfermedad causada por el alfavirus que se caracteriza por presentar lesiones en piel y branquias, letargo, pérdida de apetito y en casos graves, la muerte. Los peces juveniles suelen ser más susceptibles a la enfermedad que los adultos; 3) La infección por herpesvirus de la carpa koi (KHV) es una enfermedad que afecta a la carpa koi. Es causada por el herpesvirus-3 de los ciprínidos (HVCy-3) y se caracteriza por presentar letargo, perdida de equilibrio, manchas blancas y grises en la piel, lesiones en branquias y erosiones en aletas. Es una enfermedad altamente contagiosa y mortal especialmente en peces juveniles o debilitados; 4) La infección por iridovirosis de la dorada japonesa (RSIV), es una enfermedad viral que afecta en particular a la dorada japonesa (*Sparus aurata*) y se caracteriza por presentar falta de apetito, oscurecimiento en piel, dificultad para nadar, exoftalmia y hemorragia en la piel y las branquias; 5) La infección por el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (EHN) es una enfermedad que afecta a los peces de agua salada y se presenta en varias especies, como truchas y salmones. Se caracteriza por ser altamente contagiosa y los peces presentan hemorragias en diferentes partes del cuerpo como la piel, abdomen y branquias, como también palidez y deformaciones en corazón y vasos sanguíneos; 6) La infección por el virus de la septicemia vírica hematopoyética (VHS), es una enfermedad viral que afecta a una amplia gama de especies de peces de agua dulce y salada, incluyendo salmónidos y carpas. Es causada por el virus de la VHS y se caracteriza por provocar síntomas como hemorragias, ulceraciones en las branquias, y altas tasas de mortalidad; 7) La anemia infecciosa del salmón (ISA), es una enfermedad viral que afecta principalmente a los salmones, especialmente al salmón del Atlántico. Es causada por el virus del ISA y se caracteriza por presentar anemia, hemorragias en los músculos y órganos internos, y mortalidad y, 8) La infección por el virus de la tilapia del lago (TiLV), es una enfermedad viral que afecta a la tilapia y se caracteriza por presentar síntomas como letargo, pérdida de apetito, lesiones en la piel y altas tasas de mortalidad. Es importante destacar que la lista de enfermedades es dinámica pudiendo variar y actualizarse en función de los avances científicos, el control de las enfermedades o la detección de nuevas enfermedades. Por otro lado, hay otras enfermedades infecciosas que no están incluidas en la lista de la OIE pero que impactan enormemente a diferentes especies de cultivo de peces, como es el caso

del virus de la encefalopatía y retinopatía (VER) o también conocido como el virus de la necrosis nerviosa viral (VNNV) perteneciente a la familia de los Nodavirus y responsable de altas mortalidades en peces de agua dulce y marina como la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) [16]. VER se caracteriza por provocar una retinopatía y encefalopatía que genera una necrosis en el sistema nervioso central, con vacuolización y degeneración neuronal en el cerebro y la retina que provoca hasta el 100% de la mortalidad en peces juveniles, además de nado errático, letargia, coloración anormal e inflamación abdominal [17]. El virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV) agente causal de la enfermedad viral de linfocistis (LCD) es otra enfermedad viral de relevancia que es frecuentemente detectada en los cultivos de dorada (*Sparus aurata, L.*) del Mediterráneo y se caracteriza por presentar lesiones nodulares en la piel [18]. El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es otra de las enfermedades con alto impacto en la producción acuícola, el agente causante de la enfermedad es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), que puede generar mortalidades de entre un 80 y 90% en las primeras etapas de vida de las truchas y en peces juveniles posterior al proceso de esmoltificación del salmón del atlántico; en general los síntomas más frecuentes observados en alevines, son el nado errático y la anorexia en peces juveniles posterior al proceso de esmoltificación [19]. Por último, otra enfermedad viral que tiene un importante impacto económico es la viremia primaveral de la carpa (SVC) que afecta principalmente a la carpa común (*Cyprinus carpio*) y que puede alcanzar tasas de mortalidad de hasta un 90% en carpas juveniles [20]. El agente causal de la enfermedad es el virus de la viremia primaveral de la carpa (*Spring viremia carp virus*, SVCV). Esta enfermedad es endémica de Europa, América y varios países asiáticos, y se caracteriza por presentar distensión abdominal, exoftalmia, petequias hemorrágicas en piel y órganos internos [21]. En general, la mayoría de las enfermedades mencionadas anteriormente son altamente contagiosas y tienen un impacto negativo en la industria acuícola. Además, no cuentan con tratamientos o vacunas disponibles para su contención y prevención, lo cual resalta la urgente necesidad de desarrollar y aplicar medidas profilácticas sostenibles y eficientes como la vacunación, especialmente en las primeras etapas de vida de los animales.

4. Vacunas de peces

En comparación con las vacunas para humanos que ha llevado a la producción de más de 760 vacunas desde 1796, la historia de las vacunas para peces es muy reciente, con una producción de alrededor de 40 vacunas comercialmente disponibles desde la década de los 70s. La primera vacuna para peces fue una vacuna inactivada administrada de forma oral contra *Aeromonas salmonicida* y la primera vacuna comercialmente licenciada fue una que se produjo a partir de *Yersinia ruckeri* inactivada, y se utilizó para proteger a los peces contra la boca roja entérica (ERM) mediante administración oral [22]. Para elaborar vacunas de peces son considerados múltiples factores, tales como: viabilidad de fabricación de la vacuna, especie hospedador/es objetivo, naturaleza del antígeno, órganos diana,

necesidad de adyuvantes y tipo, naturaleza de la infección en el hospedador, ruta de administración de la vacuna, dosis y pautas de administración, tamaño de los peces, tipos de desafíos experimentales y respuesta inmune (humoral y celular) esperada post vacunación y desafío con el patógeno, entre otros [23, 24]. Las vacunas son preparados biológicos de antígenos derivados de patógenos (organismo entero o unidad del patógeno) convertidos en no patógenos por diversos medios, que estimulan el sistema inmune de forma que aumenta la resistencia a una enfermedad si se produce una infección posterior por el mismo patógeno [25]. En resumen, las vacunas estimulan el sistema inmune innato y adaptativo de los peces para montar una respuesta contra un patógeno o contra una estructura definida (la parte inmunogénica o epítopo) de un patógeno en particular [6, 26]. La vacunación es la herramienta más costo-efectiva y sostenible para controlar las enfermedades infecciosas en peces de cultivo, jugando un papel crucial en la prevención contra infecciones parasitarias, bacterianas y virales en la industria acuícola global [26]. Las vacunas están habitualmente disponibles para enfermedades bacterianas y virales, siendo el desarrollo de vacunas parasitarias todo un reto debido a la antigenicidad y a la necesidad de producción masiva del antígeno [11]. El desarrollo de una acuicultura sostenible no es posible sin la prevención de las enfermedades infecciosas, y la vacunación se ha convertido en la herramienta más importante para su prevención [6]. En ese sentido, la implementación de una adecuada estrategia de vacunación en los centros de cultivo tiene un rol preponderante para prevenir brotes y la proliferación de las enfermedades virales [12]. Las vacunas antivirales han sido implementadas como medio profiláctico en la acuicultura durante décadas, y diferentes tipos y rutas de administración han sido licenciadas y están comercialmente disponibles y en etapas experimentales en especies de peces de interés comercial [11, 23, 26, 27, 28]. En la **Tabla 1** se incluye un resumen de las principales vacunas antivirales comerciales disponibles. A la fecha, existen cerca de 44 vacunas antivirales licenciadas y casi todas son del tipo inactivadas, se administran intraperitoneal, y van dirigidas contra enfermedades que han impactado significativamente la salmonicultura, tales como el virus de IPN e ISA que afectan a especies salmónidas como el salmón del Atlántico con un alto valor comercial. El desarrollo de vacunas se ha convertido en una importante herramienta profiláctica para reducir el uso de fármacos, y es especialmente avanzado en las enfermedades que afectan al salmón del Atlántico [23, 27], reflejándose en la drástica reducción del uso de antibióticos en los cultivos de salmón noruego y británico debido a la introducción de vacunas a base de aceite [6, 27]. Sin embargo, se ha reportado que las vacunas comerciales antivirales disponibles para salmónidos no siempre protegen, presentando a menudo una baja inmunogenicidad y eficacia [24, 26, 27]. Por otro lado, tratamientos eficaces y la disponibilidad de vacunas comerciales contra enfermedades virales que puedan afectar los cultivos de peces del mediterráneo que no sean especies salmónidas, como es el caso de la carpa (SVCV), el turbot (VNNV, VHSV) y la lubina y dorada (VNNV) son limitadas [29], solo existiendo dos vacunas inyectables para lubina contra el virus de VNN (**Tabla 1**), lo mismo ocurre con otras

especies de importancia comercial en Asia, como la carpa y la tilapia [11, 27]. Probablemente, se debe a que la elaboración de las vacunas y obtención de las licencias son procesos muy costosos y de alta complejidad que requieren insumos y equipos caros de alta tecnología [11]. La prueba de esto es que las vacunas una vez que son elaboradas y testeadas a nivel *in vitro* o *in vivo* en ensayos pilotos, deben pasar por un proceso de verificación de seguridad y eficacia mediante una serie de experimentos *in vivo* de alto costo y operativa con la especie de interés para poder obtener la aprobación final para su uso farmacéutico de acuerdo con la ley de cada país [30]. Esto puede resultar demasiado caro para las pequeñas y medianas compañías, lo que puede llevar al uso generalizado de medicamentos y al abandono del uso de vacunas antivirales preventivas en especies de cultivo que tienen menor importancia económica [28].

Tabla 1. Lista de vacunas antivirales comerciales disponibles para peces de cultivo.

Enfermedad/Agente causal	Tipo de vacuna	Ruta Administración	Antígeno	Nombre Vacuna	Hospedador	Farmacéutica	País
Necrosis Pancreática Nerviosa/IPNV	Inactivada	i.p.	IPN virus	ALPHA JECT® (2)*	Salmónidos	Pharmaq	Chile
	Inactivada	i.p.	IPN virus	Aquavac 6 Emulsion	salmón del Atlántico	MSD Animal Health	Irlanda
	Inactivada	i.p.	IPN virus	Blueguard® IPN inyectable	Salmónidos	Virbac	Chile
	Inactivada	i.p.	IPN virus	IPE-VAC® 2 INMERSIÓN	Salmónidos	Veterquimica	Chile
	Inactivada polivalente	i.p.	IPN virus	ALPHA JECT® (8)*	Salmónidos	Pharmaq	Chile
	Inactivada polivalente	i.p.	IPN virus	Pentium Forte Plus	salmón del Atlántico	Elanco	Dinamarca/ Noruega
	Inactivada polivalente	i.p.	IPN virus	PENTIUMFORTE PLUS ILA	salmón del Atlántico	Elanco	Chile
	Inactivada polivalente	i.p.	IPN virus	Birnagen Forte® 2	Salmónidos	Elanco	Chile
	Inactivada	i.p.	IPN virus	Norvax® Minova 6	salmón del Atlántico	MSD Animal Health	UK
	Inactivada polivalente	i.p.	IPN virus	Blueguard® IPN+SRS +AS+VO+ISA	salmón del Atlántico	Virbac	Chile
	Inactivada polivalente	i.p.	IPN virus	PROVIDEAN AQUATEC 2 y 3	Salmónidos	Tecnovax	Chile
	Inactivada polivalente	i.p.	IPN virus	PROVIDEAN AQUATEC 4 y 5	salmón del Atlántico	Tecnovax	Chile
Necrosis Pancreática Nerviosa/IPNV	Inactivada polivalente	i.p.	IPN virus	AGROVAC 4 + ISA	salmón del Atlántico	Agrovet	Chile

Enfermedad/Agente causal	Tipo de vacuna	Ruta Administración	Antígeno	Nombre Vacuna	Hospedador	Farmacéutica	País
	Inactivada polivalente	i.p.	IPN virus	AquaVac® PD3	salmón del Atlántico	MSD Animal Health	Irlanda/UK
	Inactivada polivalente	i.p.	IPN virus	AGROVAC IPN-SRS	Salmónidos	Agrovet	Chile
	Subunitaria	i.p.	cápside VP2	AQUAVAC® SARISTIN 2	Salmónidos	MSD Animal Health	Chile
	Subunitaria encapsulada	Oral	cápside VP2 y VP3	AQUAVAC® IPN Oral	Salmónidos	MSD Animal Health	Canadá/USA
Enfermedad del Páncreas/SAV	Inactivada polivalente	i.p.	alfavirus	AquaVac® PD3	salmón del Atlántico	MSD Animal Health	Irlanda/UK
	Inactivada	i.p.	SPD virus	Norvax® Compact PD	salmón del Atlántico	MSD Animal Health	UK
	Inactivada	i.p.	alfavirus	ALPHA JECT micro 1 PD	salmón del Atlántico	Pharmaq	UK/Noruega/Irlanda
SAV3	ADN	i.m.	alfavirus	CLYNAV™	salmón del Atlántico	Elanco GmbH	Europa
Anemia infecciosa del Salmón (ISA)	Inactivada polivalente	i.p.	ISA virus	AGROVAC 4 + ISA	salmón del Atlántico	Agrovet	Chile
	Inactivada polivalente	i.p.	ISA virus	PROVIDEAN AQUATEC 4 y 5	salmón del Atlántico	Tecnovax	Chile
Anemia infecciosa del Salmón (ISA)	Inactivada polivalente	i.p.	ISA virus	ALPHA JECT® (4)*	salmón del Atlántico	Pharmaq	Chile, Canadá, Noruega, Islas Feroe

Enfermedad/Agente causal	Tipo de vacuna	Ruta Administración	Antígeno	Nombre Vacuna	Hospedador	Farmacéutica	País
	Inactivada	i.p.	ISA virus	ALPHA JECT® micro 1 ISA	salmón del Atlántico	Pharmaq	Chile
	Inactivada polivalente	i.p.	ISA virus	PENTIUMFORTE PLUS ILA	salmón del Atlántico	Elanco	Chile
	Inactivada polivalente	i.p.	ISA virus	FORTE VII	Salmónidos	Elanco	Canadá
	Subunitaria (ISA)/inactivada (IPN)	i.p.	ISA virus	Blueguard® SRS+ IPN+VO+ISA	salmón del Atlántico	Virbac	Chile
Necrosis nerviosa viral/RGNNV	Inactivada	i.p.	VNN virus	ALPHA JECT® micro 1 Noda	Lubina	Pharmaq	Europa
VNNV	Inactivada	i.p.	VNN virus	ICTHIOVAC®VNN	Lubina	HIPRA	Europa
Necrosis hematopoyética infecciosa/IHNV	ADN	i.m.	Glicopr. G	Apex-IHN	Salmónidos	Elanco	Canadá
Koi herpes virus/KHV	Atenuada	inmersión	KH virus	KV3	Carpa común	Phibro Animal Health	Indonesia/Israel
Necrosis infecciosa del bazo y el riñón/ISKNV	Inactivada	i.p.	ISKN virus	AQUAVAC® IridoV	Tilapia/ Lubina Asiática	MSD Animal Health	Asia, Brasil

*Número de vacunas adicionales ALPHA JECT®, Inyección intraperitoneal: (i.p.), Inyección intramuscular: (i.m.). Vacunas comerciales disponible entre septiembre del 2023 y abril del 2024 en base a revisiones reportadas por [12, 28,31] y en las páginas web de las compañías farmacéuticas indicadas.

5. Tipos de vacunas antivirales

El diseño de nuevas y efectivas vacunas es uno de los mayores desafíos para la acuicultura. Existen diferentes tipos de vacunas contra enfermedades virales que podrían ser englobadas como vacunas inactivadas/muerta, vacunas atenuadas/viva, vacunas de subunidad recombinante y vacunas de ADN, entre otras (**Figura 3**). Regularmente, las vacunas han sido desarrolladas a partir de virus inactivados mediante procesos fisicoquímicos sin comprometer la antigenicidad del virus [26, 28]. Sin embargo, las vacunas inactivadas siguen presentando algunos inconvenientes, tales como, corta duración de inmunidad, necesidad de altas dosis de inoculación, efectos adversos, y estrictos requerimientos de inactivación [28]. La mayoría de las vacunas antivirales se administran mediante inyección intraperitoneal en la cavidad abdominal, porque es el método más eficaz [32]. No obstante, este método no es la mejor ruta de administración debido a que es invasivo para los peces y conlleva sobremanipular y estresar a los animales con un alto costo operacional [28], además, de no ser un proceso práctico para inyectar peces de menor peso que en general son más susceptibles a enfermedades [32], poniendo en peligro la salud y bienestar de los animales. En general, las vacunas elaboradas con patógenos enteros atenuados han demostrado ser más ventajosas que otros tipos de vacunas, pero los esfuerzos parecen ser insuficientes debido a que la mayoría no previenen completamente las enfermedades [31]. Adicionalmente, los virus atenuados presentan riesgos de bioseguridad al no poderse descartar de forma absoluta la reversión de la atenuación y por lo tanto el peligro potencial de propagación del virus. En la **Tabla 2** se resumen las principales características, ventajas y desventajas de las vacunas antivirales disponibles en la acuicultura. En general, no hay tratamientos efectivos contra enfermedades virales que afectan a especies de peces fuera de las especies salmónidas (**Tabla 1**) y las existentes en muchos casos han presentado una reducida eficacia. En este sentido, en las últimas décadas se ha estado trabajando en el desarrollo de nuevos formatos de vacunas antivirales con la ayudan en la profundización de los conocimientos de inmunología y la patogénesis viral en peces, así como en avances en biotecnología, como es la ingeniería genética y la secuenciación de los genomas completos de las especies de peces de interés comercial [12, 28, 30, 33, 34]. Los estudios se están centrando en el desarrollo de vacunas recombinantes de última generación que pueden ser producidas mediante diversos sistema de expresión, como son las vacunas de ADN que son regularmente administradas por inyección intramuscular o las vacunas de subunidad recombinantes, apropiadas para administración oral y/o mediante inyección que promuevan una respuesta inmune sistémica y/o en la mucosa que puede alcanzar igualmente altos niveles de inmunidad en comparación a las vacunas tradicionales [26].

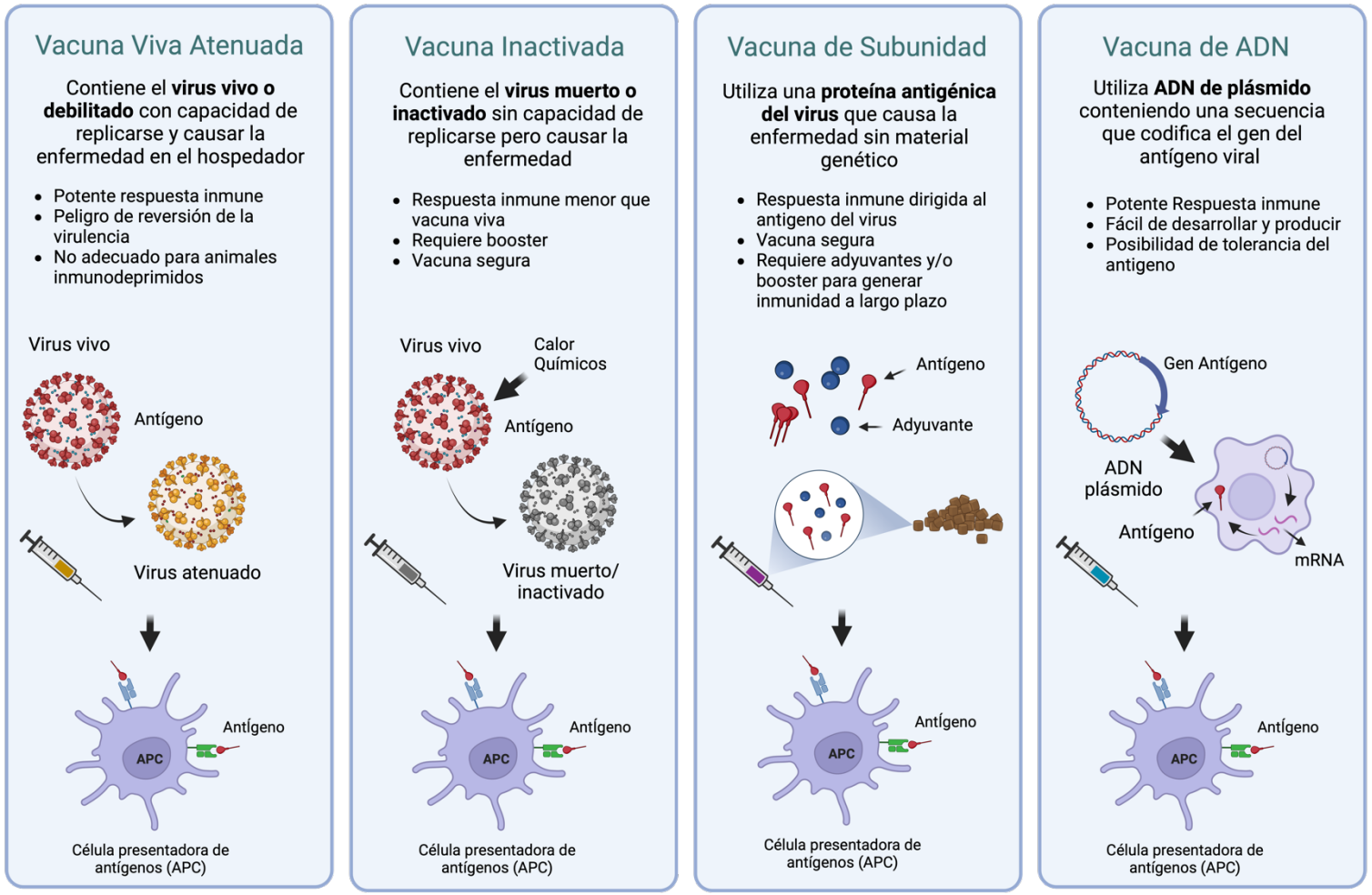


Figura 3. Principales tipos de vacunas antivirales utilizadas en la acuicultura (Ilustración M. Rojas, BioRender)

Tabla 2. Características de los principales tipos de vacunas antivirales utilizados en acuicultura. Adaptado de Bedekar y Kole, 2022 [24] y Du et al, 2022 [28].

Tipo de Vacuna	Características Vacuna	Ventajas	Desventajas
Vacuna Viva atenuada	Estas vacunas contienen microorganismos vivos atenuados, debilitados o desprovistos de capacidad patógena, pero capaces de replicarse y presentar propiedades inmunológicas en el huésped. Los métodos utilizados para la atenuación van desde la atenuación química o por calor, el paso continuo del patógeno en diferentes sistemas heterólogos (animales, cultivo de tejidos, huevos embrionados) y la atenuación genética (mutación por deleción, interrupción o inserción de la vía metabólica o el gen de virulencia).	Proporciona una estable y larga inmunidad celular y humoral al huésped La vacuna es auto replicante y no necesita inmunización de refuerzo La inmunización puede ser por inyección, inmersión o administración oral	Período de validez corto, estabilidad térmica deficiente y altos requisitos para las condiciones de transporte y almacenamiento Riesgo de revertir a la cepa de virulencia Riesgo de recombinación de diferentes cepas que resulta en la aparición de una nueva cepa Rango de uso relativamente estrecho Amenaza grave para los animales fuera del objetivo y el medio acuático No es adecuado para animales inmunocomprometidos, ya que trabajan en un sistema inmunitario activo
Vacuna Inactivada	Estas vacunas contienen microorganismos muertos (virus) que han sido inactivados a través de procesos físicos o químicos como el calor, el formaldehído o el tratamiento por radiación. Los patógenos inactivados pierden su capacidad de causar enfermedad, pero siguen siendo antigénicos o inmunogénicos para el huésped, que, a su vez, reconoce la estructura extraña del patógeno muerto y activa su sistema inmunológico.	Fácil de preparar y económicamente factibles Alta estabilidad inmunogénica Fácil de almacenar y transportar No requiere cadena de frío pudiendo transportarse en forma liofilizada Fácil preparación de vacunas multivalentes Alta seguridad No conlleva el riesgo de volver a su estado de causante de la enfermedad.	Por estar inactivada respuesta inmune débil y con un corto periodo de inmunidad, requiere múltiples dosis de refuerzo Induce principalmente inmunidad humoral y no puede inducir respuestas inmunes celulares o de mucosas Altas dosis de inoculación y reacciones adversas Requiere una inactivación estricta Para maximizar su eficacia, requieren adyuvantes La ruta de administración por inyección es en su mayoría es efectivo.
Vacuna de Subunidad	La vacuna de subunidad utiliza la tecnología recombinante en la que solo las regiones diana inmunogénicas de un patógeno se utilizan como antígenos de la vacuna y se expresan en un huésped heterólogo. Luego, el antígeno es purificado y se utiliza en la formulación de la vacuna. Las herramientas biotecnológicas se utilizan para el reconocimiento y el diseño de la secuencia génica del antígeno protector del patógeno. Después de diseñar, los genes antigénicos se insertan en los huéspedes de producciones procariotas y	No contiene componentes vivos, por lo que no hay riesgo de inducir enfermedad Segura, estable y fácil de fabricar Remueve componentes dañinos, alta seguridad Solo conserva el ingrediente activo, la inmunidad es fuerte Alta pureza y buena estabilidad	En peces ineficiente inmunogenicidad de los antígenos recombinantes para inducir inmunidad o protección induce una respuesta inmune débil Necesidad de incorporar adyuvantes y repetidas vacunaciones No puede inducir inmunidad celular y de la mucosa

Tipo de Vacuna	Características Vacuna	Ventajas	Desventajas
	eucariotas. Se cultivan a gran escala bajo condiciones de laboratorio estrictamente controladas por metodología de fermentación para producir la proteína antigénica. Los anfitriones de producción van desde bacterias, cultivo celular, levadura, células de insectos, microalgas, así como plantas transgénicas.	Alto rendimiento, puede ser producida a gran escala. Bajos efectos adversos	
Vacuna ADN	Las vacunas de ADN utilizan la maquinaria transcripcional de las células del receptor de la vacuna como sistema de expresión. Consiste en la administración por inyección de un plásmido, que contiene un gen específico del patógeno que codifica una proteína antigénica en las células del huésped. El ADN plasmídico se expresa en el interior de la célula, por transcripción en ARNm y luego por traducción en la proteína codificada por el gen. El sistema inmunitario huésped reconoce las proteínas antigénicas expresadas como "vacuna /antígeno extraño"	Induce una inmunidad protectora fuerte y duradera al huésped No poseen ningún riesgo de infección involuntaria Las vacunas de ADN son estables en polvo seco o en solución y no necesitan cadena de frío El vector puede codificar la vacuna multivalente para múltiples enfermedades, pudiendo administrarse en una sola administración Las vacunas de ADN son relativamente baratas y fáciles de producir, ahorro de tiempo y esfuerzo. Fácil de almacenar y transportar	El ADN puede inducir respuestas autoinmunes La expresión continua de antígenos extraños puede producir consecuencias adversas, como la tolerancia El antígeno solo es reconocido de forma local después de la inyección intramuscular Riesgo de inserción de ADN extraño en el genoma de los peces Restricciones legales de licencia y comercialización en la mayoría de los países (relacionadas con la integración del genoma)

5.1 Vacunas vivas atenuadas

Las vacunas atenuadas o vivas contienen la forma viva del virus, inducen respuesta inmunitaria pero no pueden causar la enfermedad. Este tipo de vacuna es ampliamente utilizada en humanos y suelen provocar una respuesta inmune fuerte y sostenida contra la enfermedad en el tiempo. Las vacunas atenuadas vivas se realizan a partir de la selección de un virus vivo menos virulento para que generen una respuesta inmune contra el virus objetivo. Para disminuir la virulencia del virus, éstos son modificados genéticamente o cultivados en condiciones que permiten atenuar su virulencia, lo que permite que el virus se replique en el huésped, pero a una tasa mucho menor que el virus salvaje sin presentar signos clínicos o si los presenta sea de una forma muy reducida [12]. Las vacunas atenuadas vivas suelen ser más inmunogénicas que las vacunas inactivadas/muertas debido a su capacidad para proliferar o penetrar en el huésped y estimular una fuerte respuesta inmune celular innata y adaptativa [35], sin la necesidad de aplicar *booster* de vacunación y agregar adyuvantes a las vacunas [28]. Las vacunas vivas atenuadas han demostrado ser seguras. Sin embargo, presentan algunos inconvenientes o riesgos que deben ser considerados, tales como; una corta vida útil, escasa estabilidad térmica, alta precaución en el transporte, óptimas condiciones de almacenamiento, posible excreción y transmisión del virus a contactos no inmunes, posible reversión o causar la enfermedad en hospedadores con inmunidad reducida y el potencial de generar mutaciones que restablezcan la virulencia [28]. La mayoría de los progresos en este tipo de vacunas para peces de cultivo son los referentes a infecciones bacterianas [28]. A la fecha solo hay una vacuna comercial basada en virus atenuados, la vacuna KV3 (Phibro Animal Health) contra el herpes virus ciprínido (KHV) que afecta a la carpa Koi y común, y que se encuentra registrada para su uso en Israel (**Tabla 1**).

5.2 Vacunas inactivadas

Las vacunas inactivadas antivirales son las vacunas más ampliamente usadas en la acuicultura de peces y generalmente son administradas por inyección intraperitoneal. Las vacunas inactivadas o muertas contienen virus que perdieron la capacidad de replicarse en el hospedador y que, para inducir una respuesta inmune, necesitan contener más antígeno que las vacunas vivas atenuadas. Estas vacunas usan métodos físicos o químicos para inactivar la alta virulencia del virus. Los métodos químicos de inactivación (destrucción de ADN o proteínas del patógeno) son los más utilizados debido a que son más simples, de bajo costo y fiables en contraste a los métodos físicos (por ejemplo, luz ultravioleta o altas temperaturas) [28]. Las vacunas inactivadas inducen la respuesta inmune debido a que retienen los antígenos expuestos en la superficie del virus, así como componentes del genoma inactivado [12]. Sin embargo, este tipo de vacuna es habitualmente menos eficiente contra enfermedades virales [26], debido a que en el proceso de inactivación el ADN o la proteína antigénica

puede ser destruida o desnaturalizada y perder su potencial antigénico. Además, presentan limitaciones de inmunogenicidad debido a que los virus inactivados no tienen la capacidad de colonizar y reproducirse en el hospedador, siendo rápidamente expulsados del cuerpo, lo que genera una pobre activación de la inmunidad celular, disminución en la duración de la inmunidad y en consecuencia requerir la aplicación de una mayor dosis de la vacuna. Esta carencia de inmunización regularmente es suplida agregando adyuvantes a las vacunas, haciendo vacunas polivalentes con múltiples antígenos o aplicando *booster* de inmunización para su mejora [26, 28]. Regularmente se han reportado casos donde las vacunas inactivadas han presentado dificultades para ser cultivadas o no generan inmunidad suficiente contra enfermedades virales que afectan a peces de interés comercial [12, 36]. Sin embargo, las vacunas inactivadas siguen siendo las vacunas antivirales de mayor disponibilidad comercial a nivel global en diferentes países, especialmente contra enfermedades virales que afectan a salmónidos como IPNV, ISAV y SAV (Tabla 1), probablemente debido a que son fáciles de preparar, necesitan un corto periodo de desarrollo, son estables bajo condiciones de almacenamiento, tienen inmunogenicidad estable, presentan un bajo costo de producción, y son seguras, ya que no tienen problemas de reversión [28].

5.3 Vacunas de subunidad recombinantes

Las vacunas de subunidad (*subunit vaccines*) utilizan solo una parte del patógeno, tales como proteínas, toxinas o carbohidratos para estimular la respuesta inmune en el hospedador. Para elaborar estas vacunas, técnicas biotecnológicas son utilizadas para identificar y diseñar la secuencia del epítopo o antígeno proteico específico del patógeno [11]. Hay diferentes formas de producir vacunas de subunidad, los componentes inmunogénicos pueden aislarse y purificarse directamente desde el patógeno o las proteínas inmunogénicas específicas pueden ser producidas utilizando diferentes tipos de vectores de expresión de proteína recombinante como es la levadura, plantas transgénicas, insectos, cultivos celulares y bacterias [26, 28]. Un par de ejemplos de vacunas comerciales que han utilizado estos sistemas de expresión, son el basado en *Escherichia coli* para producir una vacuna comercial (Animal health) contra IPNV en Noruega y el basado en levadura, en una vacuna comercial (Centrovet) contra ISA en Chile [12]. Las vacunas de subunidad presentan la ventaja de ser seguras debido a que no contienen patógenos vivos o completos que puedan replicarse en el hospedador. Además, tienen la capacidad de poder ser bien caracterizadas y centrar la respuesta inmune en el reconocimiento de un antígeno o número reducido de antígenos específicos, como también incorporar componentes no naturales [37]. Adicionalmente, son estables, presentan un alto grado de producción y purificación, baja reacción a efectos adversos, son altamente conservadas entre las diferentes cepas de la misma especie y se expresan en la superficie del patógeno para que las APC puedan reconocerlas fácilmente [28]. No obstante, las vacunas subunitarias recombinantes pueden generar una respuesta inmune menor, debido a que habitualmente se elaboran con un solo antígeno

y no se replican en el hospedador como las vacunas atenuadas/vivas, por lo que pueden requerir ser administradas inicialmente con dosis múltiples o aplicar dosis de refuerzo, además de incluir adyuvantes que ayudan a reforzar y alargar la respuesta inmune [28, 37]. En este sentido, existen citoquinas que pueden contribuir sustancialmente como adyuvantes en la mediación de la inmunidad celular contra patógenos virales durante las respuestas inmunitarias adaptativas [28, 38]. En general, aunque la efectividad entre los diferentes tipos de vacunas de subunidad ha sido variable, la efectividad de la inmunidad de la mucosa y celular de las vacunas de subunidad ha mejorado significativamente, gracias a los últimos avances que han logrado estabilizar las proteínas antigénicas y la adición de adyuvantes [12, 28]. A la fecha, existen dos vacunas antivirales subunitarias disponibles comercialmente producidas por MSD Animal Health para combatir el virus de IPN; una vacuna (Aquavac® SARISTIN 2) que debe ser administrada por inyección intraperitoneal y esta licenciada para su uso en Chile, y una segunda vacuna (Aquavac® IPN Oral) de administración oral que está registrada para su uso en Canadá y USA. También hay una tercera vacuna (Blueguard® ISA+ IPN+AS+VO) licenciada, es producida por Virbac para ser suministrada al salmón del Atlántico por inyección intraperitoneal en Chile (**Tabla 1**).

5.4 Vacunas de Partículas Tipo Virus (*Virus like proteins,* VLP)

Las vacunas VLP es un tipo de vacuna de subunidad recombinante. Se forman a partir de moléculas que tienen la habilidad de auto ensamblarse imitando la forma y tamaño de una partícula viral. Estas vacunas carecen de material genético para replicarse por lo que no son capaces de generar la enfermedad al huésped, pero sin ser reconocidas por el sistema inmune como si fueran virus. La expresión y auto ensamblaje de las VLP puede ser generada usando proteínas virales recombinantes en diversos sistemas de expresión, tales como líneas celulares de mamíferos, levadura, plantas, insectos y bacterias [26] que luego se purifican y son utilizadas en las vacunas. Este tipo de vacuna de subunidad tiene la habilidad de inducir una potente y duradera respuesta inmune mediante el reconocimiento repetitivo de las partículas y por la producción de una elevada respuesta humoral y celular debido a que presenta las proteínas en su tamaño y forma más autentica [39]. Debido a estas ventajas, varias vacunas han sido aprobadas o están en fase clínica en humanos por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos [39], cómo también se están probando vacunas VLP experimentalmente contra enfermedades virales tales como el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV), alfavirus de los salmónidos (SAV), iridovirus y el virus de la necrosis nerviosa (NNV), virus que afectan a peces de cultivo de importancia comercial [40]. Sin embargo, aún no existen vacunas comercialmente disponibles.

5.5 Vacunas de ADN

Las vacunas de ADN a diferencia de las vacunas de proteínas recombinantes utilizan la maquinaria transcripcional de las células del receptor de la vacuna como sistema de expresión. En general, consiste en la administración por inyección de un plásmido, que contiene un gen específico del patógeno que codifica una proteína antigénica en las células del huésped. El ADN plasmídico se expresa en el interior de la célula, primero por transcripción en ARNm y luego por traducción en la proteína codificada por el gen. Finalmente, el sistema inmune del huésped reconoce a la proteína antigénica expresada. Es decir, la proteína antigénica recombinante expresada es internalizada y procesada por las células presentadoras de antígenos (APC) y presentada a los linfocitos T y B - mediadores de la respuesta inmune adaptativa - mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que se espera estimulen una fuerte respuesta inmune. Las vacunas de ADN a menudo son más efectivas contra infecciones virales ya que tienen la habilidad de inducir una fuerte y larga respuesta inmune celular y humoral [26]. Asimismo, presentan gran eficacia en las primeras etapas de vida de los peces y son relativamente baratas y fáciles de producir. Las vacunas de ADN se consideran más seguras que las vacunas vivas atenuadas, ya que solo expresan los segmentos de proteína antigénica y no todo el organismo, aunque las interacciones de antígenos dentro del huésped no se entienden bien [26]. Sin embargo, aún falta claridad para distinguir los animales vacunados con ADN de los organismos modificados genéticamente (OMG), lo que plantea problemas en cuanto a la concesión de licencias y aceptación de este tipo de vacunas al público en general [41]. A la fecha, existen dos vacunas de ADN disponibles comercialmente; la vacuna de ADN (Clynav) contra el alfavirus tipo 3 (SAV) que está licenciada para ser administrada al salmón del Atlántico en Europa y una vacuna (Apex-IHN) contra el IHNV, que está registrada para su uso en Canadá (**Tabla 1**).

1. Adyuvantes

Los adyuvantes son moléculas o componentes heterogéneos inmunoestimuladores que tienen la capacidad de modular el sistema inmune incrementando la potencia o efectividad de un antígeno. De este modo, los adyuvantes ayudan a incrementan la eficacia de las vacunas contra enfermedades infecciosas que afectan a peces de cultivo. Los adyuvantes por lo general, son incorporados en los tipos de vacunas basadas en patógenos inactivados o en proteínas antigénicas recombinantes. La incorporación de adyuvantes en las vacunas, permite suministrar una menor dosis de antígeno, promover un incremento en la duración de la inmunidad y potenciar el sistema inmune facilitando la entrega del antígeno, estimulando la inmunidad temprana, así como aumentar la magnitud de la respuesta adaptativa de una vacuna o la habilidad de prevenir la infección y/o muerte mediante la formación de anticuerpos o mediando la actividad de las células T citotóxicas, además de reducir la necesidad de volver inmunizar (*booster*) a los animales [6, 28]. Además, pueden estimular el

reclutamiento de células relacionadas con el sistema inmune en el sitio donde son administradas, inducir la expresión de citoquinas y quimioquinas, promover la internalización del antígeno en células presentadoras de antígenos (*Antigen-Presenting Cells,* APCs) y activar la respuesta inflamatoria [28, 43]. Por lo tanto, el uso de adyuvantes tiene la capacidad de mejorar la efectividad de las vacunas, reducir la dosis de inmunización, reducir los costos de la vacuna, mejorar la respuesta inmune del hospedador al antígeno y prolongar la inmunidad de la vacuna en el tiempo [28]. Los adyuvantes han sido categorizados de diferentes formas en función de su mecanismo de acción. Ribeiro et al [43] clasifican a los adyuvantes en dos tipos (señal tipo 1 y 2). Los adyuvantes de señal tipo 1 mejoran la presentación del antígeno en términos de concentración, lugar y tiempo, mejorando de este modo la inmunogenicidad del antígeno. Por otra parte, los adyuvantes de señal tipo 2, proporcionan señales co-estimuladoras durante el reconocimiento del antígeno y crean un entorno propicio para la respuesta inmunitaria específica del antígeno con la capacidad de señalar a las células T que los antígenos presentados son los apropiados para iniciar una repuesta inmunitaria. Por lo tanto, ambos tipos de adyuvantes facilitan la activación de linfocitos T y B, pero con un diferente modo de acción [44, 45]. En Acuicultura, los adyuvantes a menudo son formulados en base a aluminio y aceite de origen mineral (Señal tipo 1) que incluyen surfactantes y emulsiones [6, 24, 43] y son suministrados vía inyección intraperitoneal. Los adyuvantes oleosos son los más frecuentes en la salmonicultura, el adyuvante completo de Freund (*Freund's complete adjuvant,* CFA) es el más efectivo y ampliamente usado, y está compuesto de micobacterias que son inactivadas por medio de calor y aceites minerales que contienen tensioactivos. Sin embargo, se ha reportado que este adyuvante puede causar daños en el sitio de inyección y generar granulomas [24]. Por este motivo, fue desarrollado el adyuvante incompleto de Freund (*Freund's incomplete adjuvant,* FIA), que no contiene componentes de micobacterias y que ha demostrado ser igual de efectivo reduciendo los efectos adversos [24]. Por otro lado, el adyuvante Montanide desarrollado por SEPPIC basado en aceite mineral, en aceite no mineral o mezcla de ambos, y usado para fabricar diferentes tipos de emulsiones (agua en aceite, aceite en agua o agua-aceite en agua) parece ser una alternativa más segura y efectiva [28, 46]. Así mismo, se ha reportado que los adyuvantes con base de aluminio son más seguros que los adyuvantes con base de aceite, causando menos daño y menores efectos adversos [28, 47]. Sin embargo, a pesar que los adyuvantes comúnmente utilizados en acuicultura (base aceite/aluminio) han mostrado efectividad, generalmente se ha reportado que pueden causar daños en el sitio de inyección, músculo o en órganos (ciegos pilóricos, bazo, entre otros) y efectos adversos, tales como melanosis y adherencia en músculo/órganos que afectan el rendimiento de la vacuna, la calidad de la carne, y contrariamente a lo esperado en un adyuvante, impactar en el bienestar, salud y crecimiento de los peces [28, 43]. En este sentido, en contraste a los adyuvantes facilitadores de señal tipo 1 que poco se sabe de los mecanismos que rigen el efecto adyuvante, los adyuvantes tipos 2 parecen ser más seguros y eficientes debido a que proporcionan las señales correctas de co-

estimulación para las células inmunes adaptativas especificas durante el reconocimiento del antígeno [43].

Los adyuvantes pueden proveer a las células de patrones moleculares (PAMPs, *Pathogen-associated molecular patterns*) que son reconocidos por receptores de reconocimiento (PRR *Pattern recognition receptors*) que consecuentemente activan la respuesta inmune en el hospedador [42]. Las últimas investigaciones, han explorado la capacidad que tienen los diferentes ligandos de PRR incluyendo diferentes PAMPs y otros TLR (*Toll-like receptor*) endógenos, para inducir una significativa activación y diferenciación de las células Th [44]. El uso de micropartículas o nanopartículas como vehículo de entrega de vacunas adyuvantes se ha convertido en una importante alternativa de desarrollo de vacunas mucosales, las cuales incluyen viriones y polímeros. Los antígenos (péptidos, proteínas y ADN) contenidos en las nanopartículas son transportados y liberados a los órganos linfoides, mediante difusión y/o degradación de las nanopartículas [28]. Estudios recientes han demostrado que diversos tipos de adyuvantes co-estimuladores (por ejemplo; β-glucanos, saponinas, Poly(I:C), oligonucleótidos sintéticos y citoquinas) cuando son administrados combinados con antígenos, pueden ayudar a obtener una efectiva protección inmunológica [24, 48]. El uso de citoquinas es una atractiva alternativa al uso de adyuvantes oleosos, debido a que estas pequeñas proteínas secretadas por las células inmunes y no inmunes juegan un importante rol en la modulación de la respuesta inmune reduciendo los niveles de toxicidad y mejorando el bienestar general de los animales [42]. En este sentido, el uso de citoquinas recombinantes puede ser un buen candidato adyuvante para el desarrollo de vacunas de subunidad, debido a que en general este tipo de vacunas presentan una pobre inmunogenicidad en comparación a las vacunas atenuadas o inactivadas [43]. Por ejemplo, un experimento usando IL-8 recombinante como adyuvante contra VHSV en trucha arcoíris indujo la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1β y TNFα) [48], también se ha demostrado que interferón gamma (IFN) recombinante tiene la capacidad de activar a las células presentadoras de antígenos (APCs) y sobre expresar la respuesta inmune humoral y celular en ensayos realizados contra enfermedades virales (ISAV/IHNV) que afectan a salmónidos [28, 43]. Adicionalmente, los ligandos y receptores de vías co estimuladores también representan una interesante alternativa como adyuvantes. En efecto, se ha reportado que la combinación de ligandos como adyuvantes (oligonucleótidos, CpG/ácido; polinosínico:policidílico, poliI:C) - agonistas de los receptores tipo toll (TLR) en vacunas - tiene la capacidad de incrementan la respuesta innata y adaptativa, así como también, se ha demostrado que la adición de estos TLR-ligandos con una formulación de dosis baja de antígeno, aumenta significativamente la protección contra virus, como es el caso del alfavirus del salmón (SAV) [50, 51]. A pesar que se ha reportado que los TLR (*Toll-like receptor*) ligandos pueden ser potentes adyuvantes para combatir enfermedades infecciosas promoviendo el desarrollo de células Th1 y la inducción de IL-12 en células dendríticas (DCs),

también se detectó en forma paralela, que los TLR-ligandos tienen la habilidad de inducir IL-10 y células T reguladoras inhibidoras, lo que demuestra que la actividad adyuvante de los ligandos puede verse comprometida por la co-inducción de células T reguladoras inhibidoras [51]. El prometedor progreso en el uso de nuevas herramientas biotecnológicas que incluyan nanopartículas sintéticas y naturales, como citoquinas y ligandos están demostrando ser una potente y viable alternativa para la formulación de vacunas con adyuvantes para administración oral mucosal.

2. Métodos de vacunación en peces

La administración de vacunas es indispensable para controlar y evitar la proliferación de enfermedades infecciosas en los centros de cultivo. Para que una vacuna alcance una protección completa y efectiva es imprescindible seleccionar una ruta apropiada de administración. Hoy en día el método de entrega de una vacuna no solo depende de una administración costo-efectiva, sino que también debemos considerar un enfoque sostenible que tenga en cuenta el bienestar de los animales y el efecto en el medio ambiente. En la acuicultura, la administración de las vacunas regularmente se realiza por tres rutas diferentes: inyección intraperitoneal/intramuscular, inmersión y administración oral.

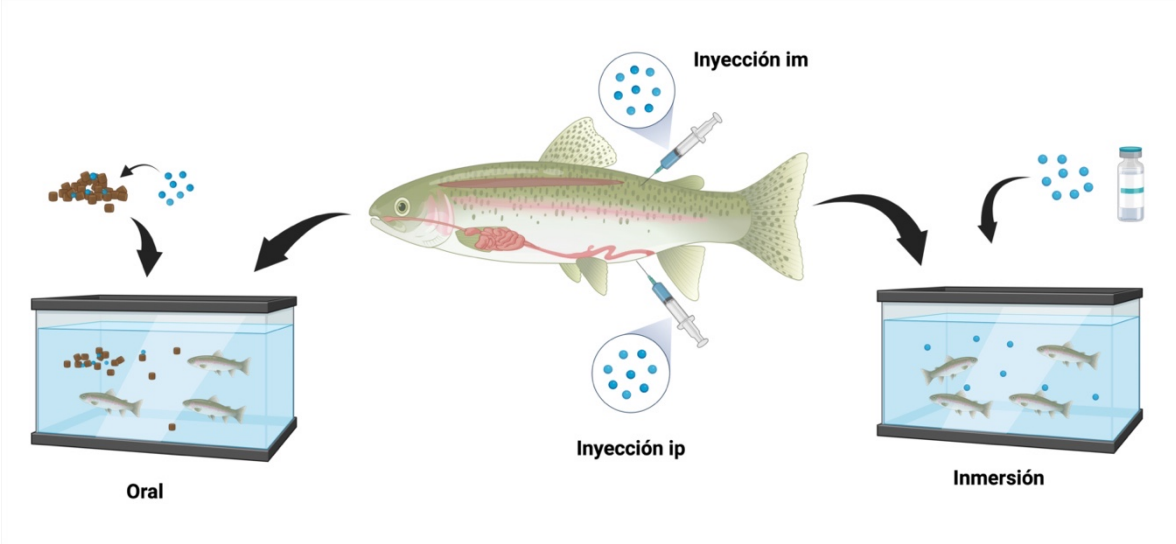


Figura 4. Principales rutas de administración de vacunas utilizadas en la acuicultura (Ilustración M. Rojas, BioRender).

Tabla 3. Características de las principales rutas de administración en acuicultura. Adaptado de Makesh and Rajendran, 2022 [44] y Du et al, 2022 [28].

Rutas de Vacunación	Características	Ventajas	Desventajas
Inyección	Se realiza de forma manual o automática por inyección intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). Se puede transmitir una pequeña cantidad de antígeno a los peces, jugando una protección efectiva y por un largo periodo de tiempo.	Se puede administrar la cantidad exacta de vacuna Alta respuesta inmune sistémica y con un largo periodo de protección Económico para peces de mayor tamaño El uso de adyuvantes aumenta la eficacia de la vacuna Las vacunas multivalentes se pueden administrar con una sola inyección Una menor cantidad de vacuna puede generar una protección sostenida	Causa estrés y posibles lesiones externas en los peces, incluso con el uso de anestesia Pueden causar daño en el punto de inyección o adherencia en órganos Requiere mucho trabajo operacional y con un elevado costo Se pueden usar solo en peces de más de 20 g de tamaño No es económico para peces de bajo valor comercial
Inmersión	Se transfieren los peces a un estanque con agua que contiene la vacuna durante un corto y definido periodo de tiempo, y posterior inmunización vuelven a retornar sus estanques.	Menos nivel de estrés por manipulación Relativamente fácil de operar Fácil método de inmunización Adecuado para peces pequeños, igualmente se pueden vacunar peces de mayor tamaño Los peces se pueden vacunar de forma masiva Se pueden administrar vacunas multivalentes	Requiere una alta dosis de vacuna La respuesta inmune es menor que la de la vacunación por inyección Solo se puede aplicar a poblaciones de peces concentradas Requiere medidas de refuerzo
Oral	Las vacunas son incorporadas al pienso y administradas de forma oral para activar la inmunidad de la mucosa intestinal; el mejor método de vacunación para los peces y otros animales de acuicultura.	Simple y fácil método de operación e inmunización Evita estrés y daño mecánico en los peces por manipulación Se pueden vacunar peces de todos los tamaños Se pueden vacunar los peces de forma masiva No requiere operación adicional en los centros, reduciendo costos operacionales	La dosis de vacunación por pez exacta no se puede controlar La respuesta inmune es menor que la de la vacunación por inyección El antígeno de la vacuna es destruido por el tracto digestivo Requiere alta dosis de vacuna Inmunización deficiente

7.1 Administración por inyección

En la acuicultura, el método más utilizado y efectivo para administrar vacunas es por medio de la inyección intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). De esta manera se asegura que los peces sean inmunizados de forma homogénea con la misma dosis, permitiendo una protección duradera y estable en el tiempo [28]. El proceso de vacunación requiere que los peces tengan un tamaño apropiado, generalmente peces juveniles sobre 20 g. Adicionalmente requiere que los animales sean ayunados, sedados, retirados del agua grupalmente, y rápidamente vacunados de forma manual y/o automática usando agujas o pistolas de vacunación con control de dosis mediante vía intraperitoneal o intramuscular, tarea que inevitablemente requiere manipular y estresar a los peces junto a la necesidad en muchos casos de contar con una especializada y gran cantidad de mano de obra de personal calificado que administre la vacuna correctamente (pinchazo), chequee regularmente la dosis de entrega de la vacuna y evite lesiones en el sitio de inyección. Además, este tipo de vacuna necesita regularmente la incorporación de adyuvantes oleosos en su formulación para mejorar la inmunogenicidad, lo cual puede promover la formación de lesiones como adhesión, melanosis, peritonitis o inflamación local en el sitio de inyección [24]. Adicionalmente, la vacunación por inyección no puede ser administradas en los primeros estadios de vida de los peces debido al pequeño tamaño de los peces, especialmente en la etapa de alevinaje y pre esmoltificación cuando el sistema inmune aún no está desarrollado y justamente requiera múltiples vacunaciones para proteger a los peces contra actuales y futuros patógenos. Aunque el método de vacunación por inyección es invasivo y muy estresante para los peces, a la fecha sigue teniendo la ventaja de ser el método de entrega del antígeno más efectivo para activar el sistema inmune, además de tener la capacidad de ser entregado mezclado con otros antígenos, a una menor concentración con control de dosis y en un formato de alta purificación [12]. No obstante, la demanda de los productores y de la opinión pública en la aplicación de métodos de administración de vacunas logísticamente prácticos para los centros de cultivo y de menor costo que no afecten el crecimiento y el bienestar general de los peces sigue siendo una prioridad para el desarrollo de una acuicultura sostenible.

7.2 Administración por inmersión

El método de administración por inmersión consiste en proveer la vacuna (antígeno) mediante la inmersión de peces en agua con una solución acuosa de vacuna durante un periodo de tiempo determinado. El antígeno puede ser absorbido por la mucosa de la piel, branquias y el tracto gastrointestinal, los cuales pueden inducir una rápida y efectiva respuesta inmune de la mucosa y sistémica, pero una limitada respuesta humoral [12, 24, 28]. La vacunación por inmersión es un simple y efectivo método de vacunación en masa de peces de pequeño tamaño, tales como alevines

(<0,5 g) y juveniles. La vacunación por inmersión en general se puede clasificar en dos tipos; la vacunación por inmersión como tal, que consiste en la administración de una vacuna con una elevada dosis y en un breve periodo de tiempo y la vacunación por baño, que consiste en el suministro de una vacuna más diluida y por un periodo de tiempo más prolongado. La vacunación por baño o inmersión tienen la ventaja de reducir la manipulación de los peces, lo cual implica disminuir el riesgo por daño mecánico en peces, reducir la mortalidad y la generación de estrés en los animales tratados. Además, es un método relativamente barato y de necesidad de menor mano de obra en comparación al método de vacunación por inyección. Sin embargo, las vacunas por inmersión/baño presentan la desventaja de requerir grandes cantidades de vacuna y de tener un bajo control de la dosis por pez, debido a que el fármaco al ser dispuesto en el agua (primero es diluido en menor volumen) depende fuertemente del control y manejo de variables, tales como el volumen de agua, comportamiento/movilidad de los peces, nivel de homogenización y solubilidad de la vacuna durante el proceso de inmersión, resultando en una reducida disponibilidad del antígeno en algunos peces o en todo el grupo, lo que consecuentemente genera una pobre inducción de la respuesta humoral con una corta y/o moderada duración de la inmunidad [12, 13, 24, 28]. Además, la vacunación por inmersión está limitada a pequeños peces debido a que con peces de mayor talla es necesario una mayor cantidad de vacuna (antígeno) para la inmunización [12]. Para mejorar la eficacia de este tipo de vacuna, se deben considerar y controlar factores tales como; naturaleza del antígeno (soluble/nanopartícula), integridad de la mucosa, tamaño de los peces, temperatura, selección de dosis, volumen y tiempos de inmersión [24]. Así como implementar nuevas estrategias y herramientas biotecnologías que permitan mejorar la inmunización por inmersión, como la incorporación de adyuvantes en las vacunas, *booster* de vacunación y el desarrollo y aplicación de nuevos tipos de vacunas [24, 28].

7.3 Administración oral

La vacunación oral es el método de administración más seguro e ideal debido a que puede ser suministrada junto con el alimento a un gran número de peces al mismo tiempo, permitiendo que el antígeno llegue directamente a la mucosa del tracto gastrointestinal de los peces. La vacunación oral no requiere manipular a los peces, por lo tanto, no genera estrés ni pérdidas de apetito y/o posibles mortalidades posteriores al manejo, como ocurre o puede ocurrir mediante el método de inyección. Además, puede ser entregado a peces de diferentes tamaños y desde las primeras etapas de vida del animal. Tampoco requiere de una logística de vacunación, mano de obra y costos operacionales adicionales para los centros de cultivo, y relevantemente, no impacta el crecimiento, calidad de la carne y el bienestar de los peces. Adicionalmente, las vacunas orales pueden administrarse como refuerzo (*booster*) para mantener la protección o proporcionar protección adicional después de la vacunación por inmersión o inyección [12]. Por estas razones, las vacunas orales se presentan como la opción de vacunación más atractiva, considerando que el crecimiento exponencial e intensivo de

la acuicultura mundial demanda métodos de inmunización más seguros para los animales, prácticos y de bajo costo que tengan la capacidad de ser aplicados a gran escala. Sin embargo, las vacunas orales al igual que los otros tipos de vacunas, presentan algunos desafíos para mejorar su eficacia. Por ejemplo, al igual que en las vacunas de inmersión, requieren de una gran cantidad de vacuna (antígeno) para alcanzar una eficiente inmunidad y la dosis de vacuna por pez puede variar - y por lo tanto el nivel de inmunización por individuo - debido a que no es posible asegurar que los peces consuman la misma cantidad de alimento y, por lo tanto, la misma dosis de antígeno.

Además, se ha reportado que las vacunas dirigidas a la mucosa pueden generar tolerancia inmunológica oral. La tolerancia oral es un estado de falta de respuesta inmunológica a determinados antígenos de la mucosa, es decir una supresión de la respuesta inmune celular y humoral (anticuerpos) en el sistema inmune de la mucosa. En vertebrados mayores la tolerancia oral se ha asociado a causas, tales como la administración de bajas dosis que favorecen la inducción de linfocitos T reguladores y altas dosis asociados a anergia linfocitaria [52]. En peces la tolerancia oral se ha asociado a la administración repetida y prolongada de pequeñas cantidades del mismo antígeno, la vacunación de peces demasiado jóvenes (inmunocompetentes), las bajas temperaturas, tipo de antígeno, régimen de administración, así como la genética son factores que han sido implicados en la inducción de la tolerancia oral [54, 55]. Las barreras fisicoquímicas conferidas por el tejido linfoide mucosal (GALT) protegen contra la invasión de patógenos, sin embargo, también puede restringir la biodisponibilidad del antígeno para alcanzar el sitio de infección en el intestino e iniciar la inmunización local, así como también puede inducir inmunotolerancia debido a su baja biodisponibilidad [54]. La tolerancia oral se ha reportado en peces juveniles como la carpa (reducción de linfocitos T citotóxicos) y la trucha (preexposición de lipopolisacáridos), que han sido expuestos a las proteínas antigénicas en dosis bajas y de forma reiterada [54, 55, 56, 57]. Sin embargo, también se ha demostrado que aplicar repetidas inmunizaciones orales tienen la capacidad de proteger e incrementar los niveles de anticuerpos (IgM) en salmones de cultivo después de vacunaciones realizadas por inyección [57]. Así también una vacuna oral recombinante producida en *E. coli* contra el nodavirus (VNNV) en juveniles de lubina genero un aumento de IgM específico de VNNV y una sobrevivencia del 100% posterior al desafío [58]. Para formular una vacuna oral, se debe considerar que el antígeno tenga la capacidad de soportar altas temperaturas y la presión del proceso de extrusión al que puede ser sometido el pienso durante su fabricación [24]. Además, el antígeno necesita ser protegido de la degradación producida por los ácidos del estómago antes de alcanzar el intestino posterior para ser procesados por las células inmunológicas [24, 59, 60]. En esta dirección, para mejorar la eficacia de las vacunas orales, se han desarrollado diversos materiales que encapsulan las vacunas y protegen al antígeno de la biodegradación estomacal, como es el caso de alginatos, chitosan, liposomas, microesferas de polímero y *biofilms* [28]. Por ejemplo, una vacuna oral de subunidad recombinante

encapsulada y expresada en levadura (Matriz de polisacárido catiónico, Micromatrix™) contra ISA virus que afecta a salmón del Atlántico demostró inducir una protección significativa contra el virus [61]. Adicionalmente, las investigaciones se están enfocando en la investigación de vacunas orales transportadoras de componentes antigénicos exógenos mediante microorganismos no patógenos, como es el caso de insectos (larvas halógenas, gusanos), probióticos (*Lactobacillus*, levaduras), plantas (*Chlamydomonas*) y virus. En esta línea, esfuerzos importantes se están realizando en el desarrollo y perfeccionamiento de nuevas vacunas orales con la ayuda de las herramientas biotecnológicas con el objetivo de proteger al antígeno del medio acido del estómago de los peces e incrementar la estabilidad de las vacunas como también la duración de la eficacia y el nivel protección a largo plazo de las vacunas en la mucosa contra enfermedades altamente infecciosas y persistentes.

3. El sistema inmune

El sistema inmune hace referencia a todos los mecanismos de defensa utilizados por los seres vivos para reconocer y combatir una gran variedad de microorganismos externos. Los peces teleósteos al igual que los vertebrados mayores, poseen un robusto y completo sistema de defensa inmunológico. La mayor diferencia entre el sistema inmune de los peces y los invertebrados mayores es que durante los primeros estadios embrionarios, los peces dependen únicamente de la inmunidad innata para sobrevivir [55]. El desarrollo de la inmunidad contra un patógeno es un proceso complejo que puede necesitar de una a algunas semanas. El sistema inmune puede ser categorizado en dos sistemas que están dependientemente interconectados; el sistema inmune innato (no especifico) y el sistema inmune adaptativo (específico). El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del hospedador contra una infección y juega un rol crucial en el reconocimiento precoz y subsecuente desencadenamiento de la respuesta proinflamatoria frente a patógenos externos y está compuesto por barreras físicas, moléculas efectoras y células inmunológicas. Las barreras físicas incluyen la piel, branquias, epitelio nasal, así como el mucus superficial en piel, intestino y órganos. Las barreras moleculares están compuestas por péptidos antimicrobianos, citocinas, proteínas de complemento, anticuerpos naturales, inhibidores de crecimiento y proteasa y las células inmunológicas del sistema innato incluyen células fagocíticas especializadas, tales como células dendríticas, macrófagos, monocitos, células citotóxicas no específicas (NCC) y neutrófilos [44]. Por otro lado, el sistema inmune adaptativo está constituido por herramientas inmunológicas más potentes que el sistema inmune innato, debido a que tienen la capacidad de erradicar patógenos específicos y generar memoria inmunológica con la habilidad de proteger al hospedador contra infecciones posteriores al patógeno. El sistema inmune adaptativo está compuesto por linfocitos T y B, y por moléculas efectoras tales como citocinas e inmunoglobulinas [45, 62]. El sistema inmune adaptativo se puede subdividir en dos tipos de respuesta inmune; la respuesta inmune humoral y la respuesta inmune

celular. En términos generales, la respuesta inmune humoral es mediada por los linfocitos B que secretan anticuerpos específicos que reconocen, marcan y neutralizan a determinados patógenos externos para que sean eliminados, y la respuesta inmune celular es mediada por los linfocitos T cooperadores que reconocen antígenos en la superficie de las células infectadas y secretan citocinas que activan a células inmunológicas tales como macrófagos para que eliminen a los patógenos intracelulares contenidos y los linfocitos T citotóxicos, que detectan y eliminan a células infectadas con patógenos intracelulares específicos y los linfocitos T reguladores que suprimen la respuesta inmunitaria [63]. El sistema inmune está compuesto por dos tipos de receptores. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *Pattern recognition receptors*) que se encuentran en la membrana celular y el citosol de células fagocíticas como células dendríticas y macrófagos que tienen la función de identificar patrones moleculares de microorganismos patógenos asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), y los receptores de antígenos específicos (TCR, *T cell receptor*) generados después de una infección y mediados por los linfocitos T y B, anticuerpos, células presentadoras de patógenos (APCs, *antigen-presenting cells*), citocinas y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II (MHCI y MHCII), así como también por estructuras linfoides asociados a la mucosa (MALT, *Mucosa-associated lymphoid structures*) tales como el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, *Gut-associated lymphoid tissue*), el tejido linfoide asociado a la piel (SALT, *Skin-associated lymphoid tissue*), el tejido linfoide asociado a la nariz (NALT, *Nasal-associated lymphoid tissue*) y el tejido linfoide interbranquial asociado a las branquias (GIALT, *Inter-branchial gill-associates lymphoid tissue*) que forman parte de la respuesta inmunitaria sistémica [24, 64, 65, 66, 67]. En la **Figura 5** se observa una representación general del funcionamiento de los componentes del sistema inmune y la mediación entre el sistema inmune celular y humoral [159].

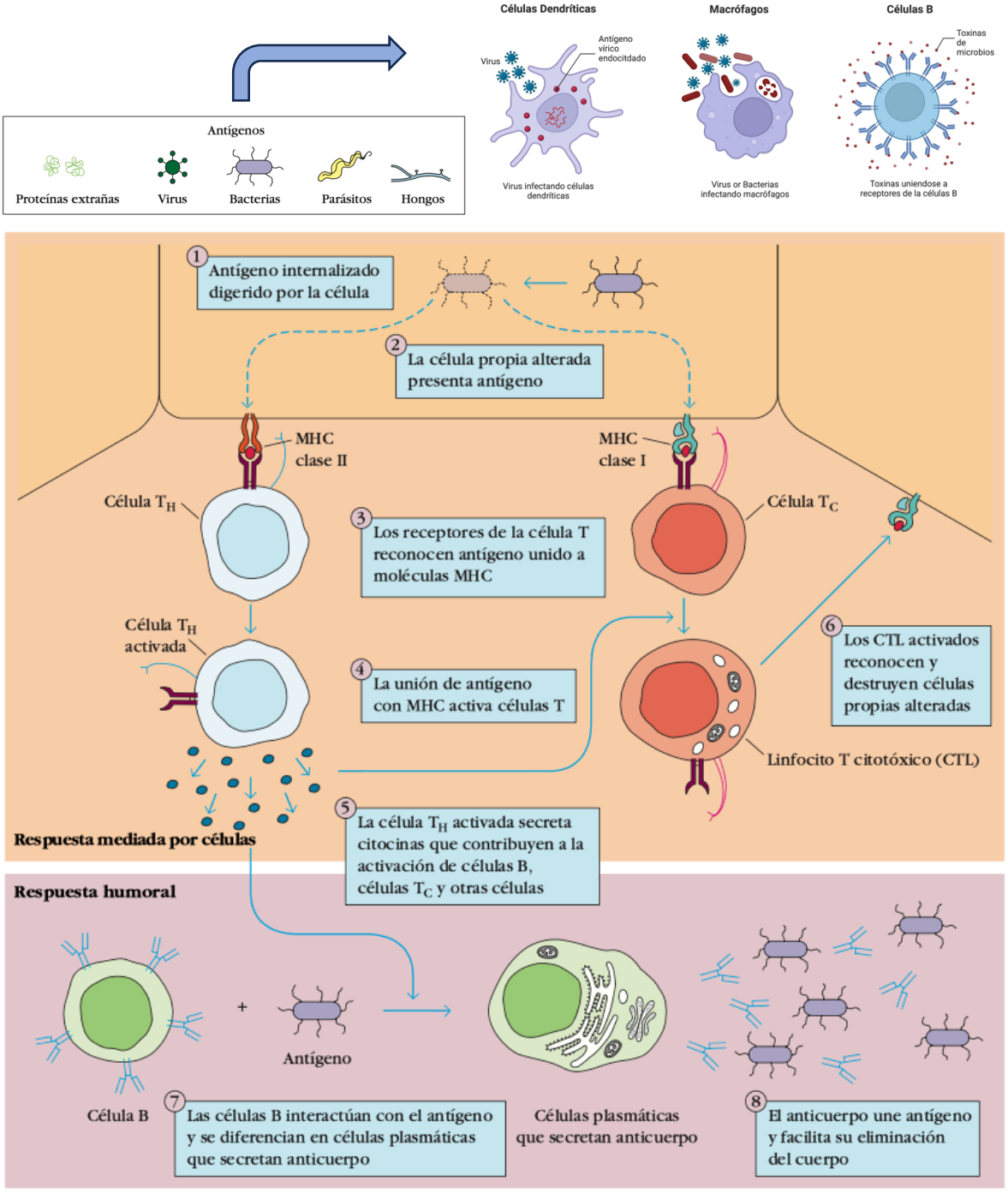


Figura 5. Descripción general de la mediación entre la respuesta inmune humoral y celular. En la respuesta mediada por células, varias subpoblaciones de células T reconocen antígeno presentado en células propias. Las células Th responden al antígeno y producen citocinas. Las células Tc reaccionan al antígeno convirtiéndose en linfocitos T citotóxicos (CTL), que median la destrucción de las propias células infectadas, como por ejemplo células infectadas por virus. En la respuesta humoral las células B interactúan con el antígeno y luego se diferencian en células plasmáticas que secretan anticuerpos.

El anticuerpo secretado se une al antígeno y facilita su eliminación del cuerpo. Ilustración modificada de [159] y retocada parcialmente por M. Rojas (BioRender).

8.1 El sistema inmune innato

El sistema inmune innato reconoce señales de peligro o PAMPs mediante un número limitado de receptores (PRRs) codificados por la línea germinal. Una vez que los PRR reconocen a los PAMPs, los PRR dan las señales al huésped para desencadenar una respuesta proinflamatoria y antimicrobiana mediante la activación de vías de señalización intracelular. De esta manera, los PRR inducen la activación de la expresión génica y secreción de moléculas efectoras, tales como citocinas y quimiocinas que en conjunto orquestan la respuesta inmune innata temprana a una infección y dan las señales para el inicio de la activación de la respuesta adaptativa [62]. En el caso de los peces teleósteos, se han descrito varios grupos de PRR envueltos en la respuesta inmune innata contra patógenos; Los receptores tipo toll (TLRs, *Toll-like receptors*) que reconocen los ácidos nucleicos virales y los intermediarios de ARN de doble cadena, siendo los receptores más ampliamente estudiados y centrales para la comunicación entre la respuesta innata y la respuesta inmune adaptativa [62, 65], los receptores tipo RIG-I (RLRs, *RIG-I-like receptors*) que detectan ARN viral e inician la respuesta innata antiviral vía producción de IFN tipo 1, los receptores tipo NOD (NLR, *NOD-like receptors*), los receptores de lectina tipo C (CLR, *C-type lectin receptors*) y las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRPs, *peptidoglycan recognition proteins*) [65, 68, 69]. Los PAMPs reconocidos por los receptores (PRR), están compuestos por polisacáridos, glicoproteínas, lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, ADN bacteriano y ARN viral de doble cadena, entre otros tipos de moléculas [64, 70]. Los componentes del sistema inmune innato pueden ser categorizado en factores físicos, humorales y celulares que incluyen moléculas receptoras celulares y humorales que son solubles en plasma y otros fluidos corporales [72]. Los factores físicos incluyen las escamas, la mucosa, y las células epiteliales que recubren las branquias, la piel, y tracto gastrointestinal que juega un papel preponderante en la resistencia a infecciones y los factores humorales, sustancias que tienen funciones preventivas que inhiben el crecimiento de microrganismos y neutralizan las enzimas de las que dependen los patógenos [64]. Los peces tienen una gran variedad de sustancias de defensa no especifica como transferrina, lectinas, lisozima, péptidos antimicrobianos, citocinas, anticuerpos naturales y componentes del complemento, que pueden destruir y/o provocar la lisis de microorganismos o suprimir su crecimiento. Por ejemplo, la lisina que es una enzima que incluye a las lisozimas y a los péptidos antimicrobianos. Las lisozimas se pueden encontrar en el mucus, plasma y el tejido linfoide de los peces, y actúan sobre la capa de peptidoglicano de las paredes celulares, provocando la lisis bacteriana y los péptidos antimicrobianos pueden ser encontrados en el mucus y juegan un rol preponderante en la defensa contra virus y bacterias. Además, la respuesta inmune innata está compuesta por una gran variedad de células inmunológicas, que no solo incluye

macrófagos, granulocitos y células dendríticas, sino que también eritrocitos, trombocitos, células B y subtipos de células T [64]. En teleósteos los macrófagos son una de las células inmunes más importantes que unen la inmunidad innata y adaptativa. cumpliendo un rol clave como primera línea de defensa contra patógenos desde el inicio de la respuesta inmune mediante la fagocitosis y la producción de citocinas. Además, poseen varios receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) capaces de reconocer diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La fagocitosis es el mayor mecanismo para eliminar patógenos y, por lo tanto, es un componente crítico del sistema inmunitario innato y adaptativo. La evidencia experimental ha demostrado que las células fagocíticas teleósteas como los macrófagos pueden reconocer, destruir antígenos y provocar respuestas inmunes adaptativas que involucran múltiples citoquinas [73]. Los macrófagos desempeñan diferentes papeles en el sistema inmune y son potentes células inmunes innatas, que ejercen una defensa antimicrobiana crucial a través de la fagocitosis y la liberación de diferentes mediadores antimicrobianos, incluidas las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) y la producción de citocinas proinflamatorias. Además, también sirven como células profesionales presentadoras de antígenos (APC) para activar el sistema inmunitario adaptativo (linfocitos T y B) [74, 75].

Brevemente, la activación de los macrófagos es producida mediante la estimulación con IFNγ y un desencadenante microbianos o PAMPs [74] y se puede dividir en dos tipos: activación clásica polarizada (M1) inducida por citocinas Th1 (como IFNγ y TNFα) y la activación alternativa (M2) inducida por citocinas Th2 (como IL-4, IL-10 y IL-13) [74, 76]. La polarización clásica M1 es crucial en la inflamación y erradicación de la inflamación bajo la influencia de IFNγ + lipopolisacáridos (LPS) y es inducida por un estímulo microbiano, que pueden ser detectados por varios receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en la superficie de los macrófagos. Los macrófagos activados clásicamente liberan altos niveles de citoquinas proinflamatorias como TNFα, interleucina-6 (IL-6) e IL-1β para hacer frente a las infecciones y, por lo tanto, promover las respuestas Th1 [75]. Por otro lado, la polarización alternativa M2 inhibe la inflamación (respuesta antiinflamatoria) y promueven la regeneración y reparación de tejidos activados por interleucinas IL-4/IL-13, ligandos de receptores similares a Toll (TLR) o secretando IL-10 [74, 77, 78] (**Figura 6**). Además, muestran un fenotipo más inmunosupresor caracterizado por una disminución de la presentación de antígenos en las células T y la producción de citoquinas que estimulan una respuesta Th2 [75]. Sin embargo, Hoy en día, la clasificación M1/M2 es considerado un enfoque demasiado simplificado que no cubre completamente el espectro total de fenotipos de macrófagos *in vivo*. Especialmente, en circunstancias patológicas, los macrófagos se comportan como células plásticas que modifican en el espacio y el tiempo su perfil de expresión y transcripción a lo largo de un espectro continuo, teniendo fenotipos de macrófagos M1 y M2 como extremos [76, 79, 80].

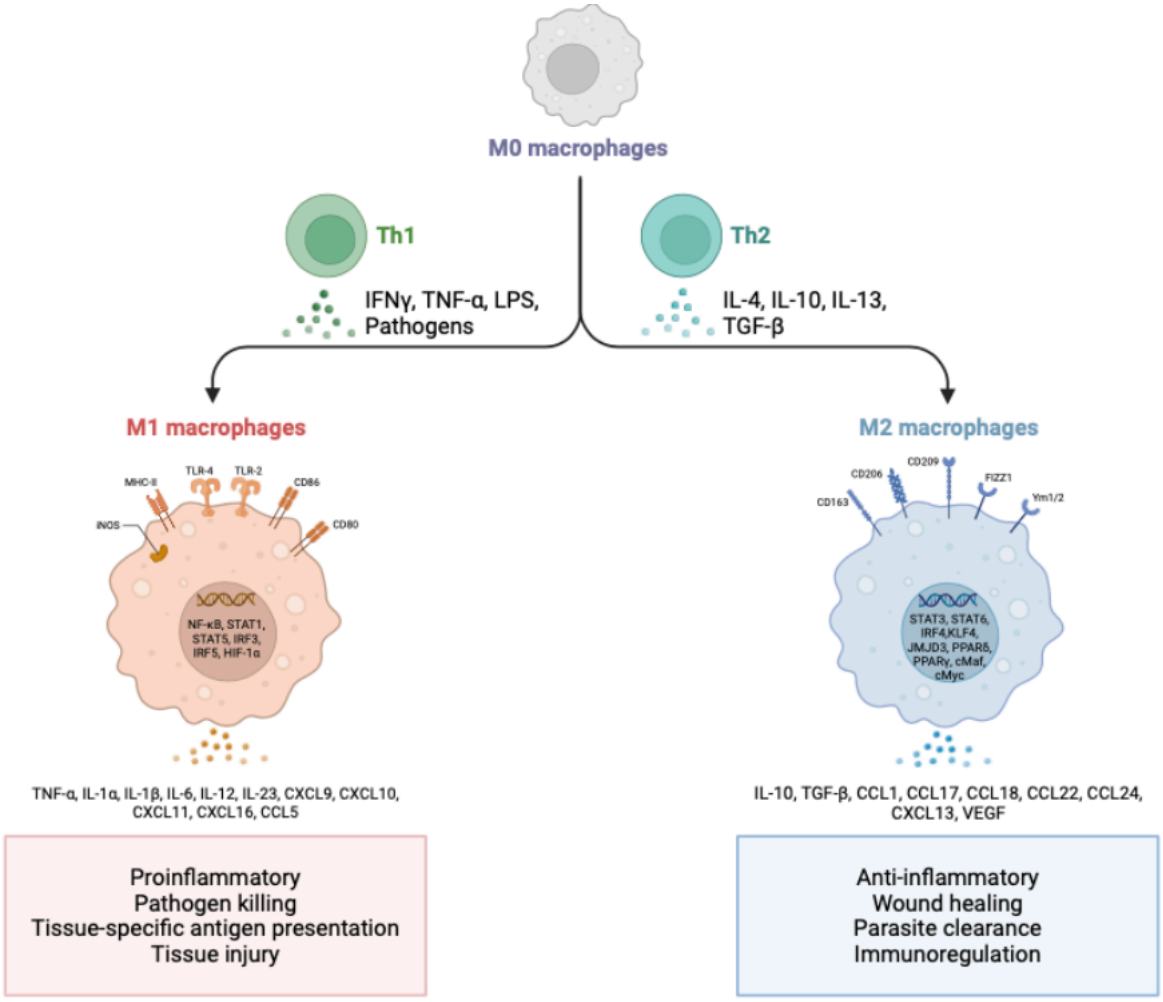


Figura 6. Representación de polarización de macrófagos M1 y M2. Modificado de Kwon et al 2020. Ilustración N. Roher & M. Rojas (Biorender).

8.2 El sistema inmune adaptativo

El sistema inmune adaptativo se caracteriza por el reconocimiento de antígenos específicos y el desarrollo de memoria inmunológica mediante la activación de linfocitos T y B, los cuales son capaces de proporcionar una protección más potente y eficaz contra un patógeno específico y en infecciones posteriores con el mismo patógeno. Los linfocitos T y B poseen diversos y específicos receptores que son capaces de detectar patógenos con gran especificidad. Los receptores de las células T (TCRs, *T cell receptors*) inician la activación de la respuesta inmune celular mediante la detección-procesamiento de antígenos y consecuente presentación de péptidos en la superficie celular por moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC). Por otro lado, los receptores de las células B (BCRs, *B-cell receptors*) o inmunoglobulinas (Igs) y su forma libre secretada (anticuerpos) inducen la activación de la respuesta inmune humoral reconociendo y marcando antígenos en su

forma nativa [80]. El sistema inmune adaptativo puede dividirse en dos tipos de respuesta inmunológica que trabajan en forma conjunta y sincronizada; la respuesta inmune celular y respuesta inmune humoral. En la **Figura 7** se observa un esquema propuesto por Abbas et al donde se ilustra las diferentes etapas de la respuesta inmune adaptativa en el tiempo [63].

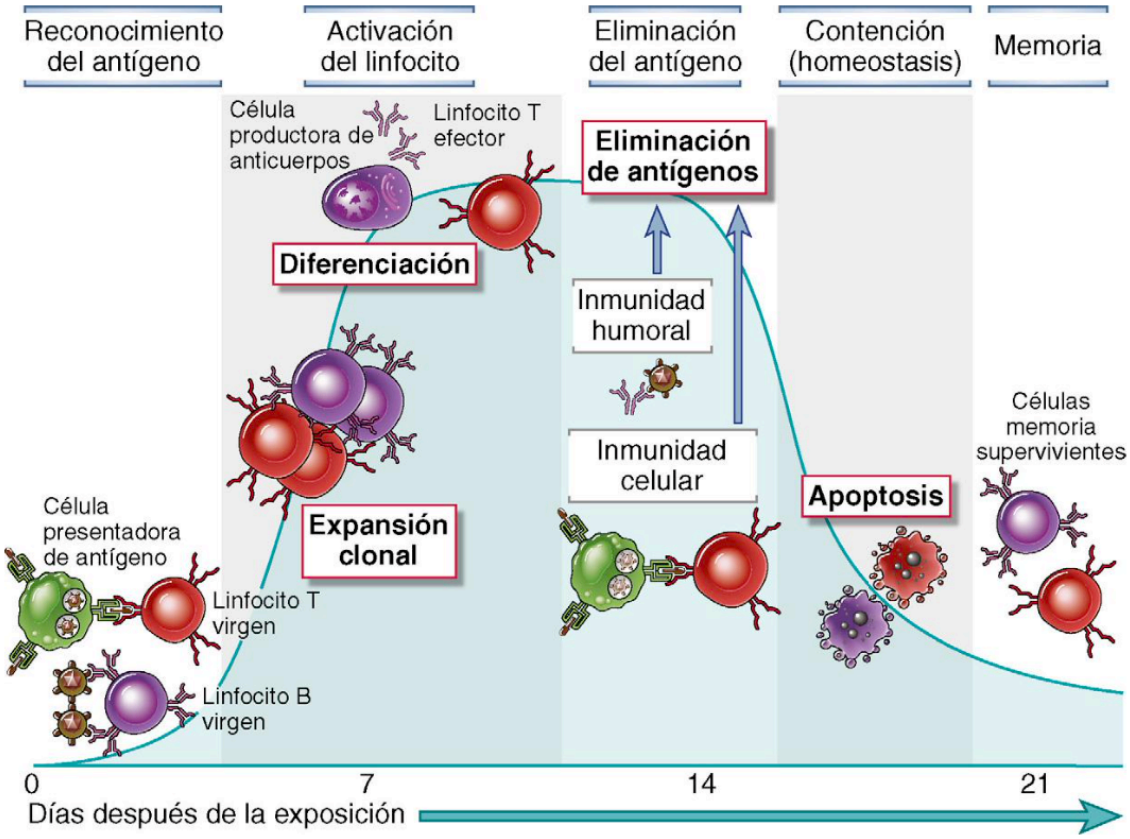


Figura 7. Fases de la respuesta inmune adaptativa. Las respuestas inmunitarias adaptativas constan de fases distintas; las tres primeras son el reconocimiento del antígeno, la activación de los linfocitos y la eliminación del antígeno (la fase efectora). La respuesta declina a medida que los linfocitos estimulados por el antígeno mueren por apoptosis, lo que restaura la homeostasis, y las células especificas frente al antígeno que sobreviven son responsables de la memoria. La duración de cada fase puede variar en diferentes respuestas inmunitarias. El eje y representa una medida arbitraria de la magnitud de la respuesta. Estos principios se aplican a la inmunidad humoral (mediada por linfocitos B) y a la inmunidad celular (mediada por linfocitos T). Ilustración modificada de [63].

8.3 Respuesta inmune celular

Los linfocitos T son las células encargadas de orquestar la respuesta inmune celular y se desarrollan y maduran en el timo, órgano linfoide primario especializado del sistema inmunitario [81], además se desarrollan en el riñón anterior, principal órgano hematopoyético de los peces teleósteos [24]. Las

células T maduras particularmente se encuentran en tejidos linfoides primarios, tales como el timo, riñón anterior y bazo, además de ser encontradas de forma abundante en la mucosa del tejido del intestino, branquias y piel [24, 56, 73]. En un contexto de vacunación y de respuesta inmunológica celular mediado por linfocitos T citotóxicos (CTLs, *Cytolytic T lymphocytes*), el antígeno contenido en la vacuna es detectado e internalizado por los receptores de células presentadoras de antígenos (APCs), tales como células dendríticas y macrófagos, los cuales tienen la misión de transportar el antígeno a los órganos linfáticos secundarios, tales como el riñón anterior y bazo para ser presentados a las células T citotóxicas vírgenes [24]. Para esto, en el citosol de las APCs infectadas el antígeno es fragmentado a péptido, y captado y presentado en la membrana superficial por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHCI) con el propósito que receptores específicos (TCR) de los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos no activados las detecten y desarrollen la capacidad de destruir a las células infectadas. En resumen, los linfocitos T citotóxicos expresan moléculas CD8 y co-receptores TCR que están encargadas de destruir células infectadas con patógenos intracelulares y las moléculas MHCI están presentes en todas las células nucleadas y han sido especialmente diseñadas para unirse a un péptido antigénico intracelular (Por ejemplo, fragmentos de virus) y presentarlo a células CTL citotóxicas [24, 74]. En esta línea, se ha reportado un aumento significativo de la actividad citotóxica en leucocitos periféricos de la sangre de truchas arcoíris inmunizados con vectores de ADN que codifican a la glicoproteína G de VHSV [83]. Al igual que con los linfocitos T citotóxicos, para iniciar la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T cooperadores (Th), los antígenos son captados por APCs especializadas, tales como macrófagos, células dendríticas y células B, las cuales fragmentan el antígeno y presentan los péptidos antigénicos en la superficie de las células infectadas con la ayuda de las moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, con el objetivo que los receptores de linfocitos T helper $CD4^+$ no activadas reconozcan al antígeno, proliferen, se diferencien y activen a células fagocíticas para que eliminen al patógeno. Los linfocitos Th expresan moléculas CD4 y receptores TCR, y están encargados de reconocer antígenos situados en la superficie de las APCs y secretar citocinas. Por otro lado, las moléculas MHC II, han sido especialmente diseñadas para unirse a un péptido antigénico que solo es reconocido por los linfocitos Th [24, 74]. Los linfocitos Th $CD4^+$ una vez diferenciados activan células APC como macrófagos y linfocitos B, tras el reconocimiento de antígenos específicos en el contexto del MHC II en la superficie de la célula B [80]. Además, genera un subconjunto de células Th que individualmente expresan un conjunto único de citocinas inflamatorias que están encargadas de regular el sistema inmune y la memoria inmunológica [76, 77].

8.4 Citocinas

Las citocinas (o citoquinas) son pequeñas proteínas de bajo peso molecular secretadas por las células del sistema inmune innato y adaptativo y están envueltas en la regulación del sistema inmune mediante la interacción y comunicación entre células. La red de citocinas está conservada entre vertebrados cumpliendo funciones clave en la hematopoyesis, la inflamación y la respuesta inmune [86]. En humanos más de 100 citocinas han sido identificadas y recientes estudios han demostrado que comparten funciones similares a las detectadas en peces [79, 80]. Estas pequeñas proteínas, responsables de la transmisión de señales entre las células, activan la respuesta inmune generando pequeños cambios fisiológicos vía receptores específicos presentes en la superficie celular [79, 80]. Las citocinas están implicadas en la respuesta inmune desde la inducción de la respuesta inmune innata mediada por APCs hasta la generación de células T citotóxicas y producción de anticuerpos [89]. Las citocinas tienen la capacidad de atraer leucocitos al sitio de infección y activar sus mecanismos antimicrobianos para eliminar a cualquier patógeno [87]. De esta manera, las citocinas en el sitio de entrada de un patógeno generan señales inflamatorias en las células que regulan la capacidad fagocítica de las células residentes y las células que van arribando al lugar de infección para destruir al patógeno. Además, regulan la presentación de antígenos de células dendríticas (DCs, *Dendritic cells*) y su migración a órganos linfoides, tales como el bazo para iniciar la respuesta inmune adaptativa [90]. Los linfocitos Th $CD4^+$ cooperadores entran en un estado de proliferación y diferenciación que genera diferentes subconjuntos de linfocitos Th cuando son activados por medio del reconocimiento de un péptido dispuesto por moléculas MHCII en la superficie de células dendríticas u otro tipo de células infectadas [91]. En general, se han caracterizados al menos cuatro subconjuntos de linfocito Th (Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras) y adicionalmente en mamíferos se han reportado otros tres subconjuntos de células Th (Th9, Th 22 y Tfh). Cada grupo de células Th expresa un conjunto único de citocinas y factores de transcripción [72, 83]. Los linfocitos Th1 y Th2 son las poblaciones dominantes y mayormente caracterizadas [76, 77]. Los linfocitos Th1 se caracterizan por promover la respuesta inmune contra patógenos intracelulares virales y bacterianos. Los linfocitos Th1 tras ser activados producen citocinas tales como TNFα, IL-10 e IFNγ que inducen la producción de óxido nítrico (NO, *Nitric oxide*) y activación de macrófagos que mejoran la presentación de los antígenos e inducen la proliferación de linfocitos T citotóxicos, células que juegan un importante rol en la inmunidad celular contra patógenos intracelulares. El proceso de diferenciación a Th1 es mediado por las citocinas IL-12, IL-18, IFNα e IFNγ, y es controlado por los factores de transcripción T-bet, STAT1 y STAT4 [80]. Todas estas moléculas, tales como IFNγ han sido detectadas y caracterizadas en salmónidos y en una gran variedad de peces [78, 84, 85, 86]. Las citocinas y los IFNγs de teleósteos en general muestran funciones conservadas con sus ortólogos de mamíferos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Actividad biológica de las citocinas en peces en comparación a los mamíferos. Adaptado de Zou y Secombes, 2016 [87].

Citocinas	Homólogo Humano	Receptores	Función conocida sistema inmune
IL-10, IL-10 viral	IL-10	il-10R1/CRFB12, il-10R2/CRFB4	Suprimir las respuestas inmunitarias, inhibir la inflamación, promover la proliferación de células T, la memoria de las células B y la producción de IgM
IL-20L	IL-19, IL-20, IL-24	No reportado	No reportado
IL-22	IL-22	No reportado	Activar los genes peptídicos antimicrobianos y la inmunidad antibacteriana
IL-26	IL-26	No reportado	No reportado
Grupo IFN I (IFN-a, d, e)	IFN tipo I	FNAR1/CRFB5, IFNAR2/CRFB1	Inducir la expresión de los efectores antivirales, promover la apoptosis, regular la inflamación
Grupo IFN II (IFN-b, c, f)	IFN tipo I	IFN-γR1/CRFB13, IFN-γR2/CRFB6	Inducir la expresión de los efectores antivirales, promover la apoptosis
IFN-γ	IFN tipo II	IFN-γR1/CRFB13, IFN-γR2/CRFB6	Activar los fagocitos, mejorar la presentación de antígenos, promover la expresión de citoquinas Th2
IFN-γrel	IFN tipo II	CRFB17, IFN-γR2/CRFB6	Regula la inmunidad antibacteriana y antiviral

8.5 Respuesta Inmune antiviral

Dependiendo de la naturaleza de la infección viral el sistema inmune puede utilizar diferentes mecanismos de respuesta inmune innata o adaptativa. Los virus son microrganismos altamente infecciosos que presentan una forma sencilla y estructura y composición muy variable que incluye un segmento de ácido nucleico (ADN o ARN) rodeado por una cubierta de proteínas. Los virus para sobrevivir y replicarse necesitan infectar células uniéndose a receptores específicos de la superficie celular. De esta misma forma, los mecanismos básicos de replicación y los procesos de infección de los virus de los peces no parecen ser diferentes de sus homólogos en los vertebrados endotermos [95]. Las principales familias de virus descritos como agente causal de enfermedades de peces de cultivo incluyen los virus de ARN tales como birnaviruses (IPNV), ortomixovirus (ISAV), reovirus (IHNV), rhabdovirus (VHSV/SVCV), y virus de ADN como iridovirus (LCDV).

Una vez que los virus entran al hospedador, se produce una primera activación de la respuesta antiviral mediante la inducción de una respuesta inmune innata inflamatoria compuesta por el reclutamiento de células inmunológicas circulantes como macrófagos y neutrófilos [96]. Varios tipos de receptores de respuesta inmune innata celular participan en respuesta a una infección viral, tales como los receptores tipo Toll (TLRs), RIG-I y NOD (NLRs). Los receptores al ser activados por los virus causan la secreción de citoquinas inflamatorias e interferones (IFNs) así como la activación de células implicadas en la inflamación y en la inducción de la respuesta adaptativa. Los interferones

(IFNs) de respuesta innata son de las proteínas secretoras liberadas por las células infectadas más potentes para combatir las infecciones virales porque previenen la replicación de los virus, al interferir directamente con su capacidad de replicarse dentro de una célula infectada. Existe dos tipos de IFN descritos en peces, el tipo I y tipo II o IFNγ. Los IFNs actúan como moléculas de señalización que permiten a las células infectadas advertir a las células cercanas de una presencia viral, esta señal hace que las células vecinas aumenten el número de moléculas MHC clase I en sus superficies, de modo que los linfocitos T que circulan en el área puedan identificar y eliminar la infección viral [97].

Por otra parte, las células infectadas secretan genes antivirales específicos en respuesta a un estado de infección viral. Ortega-Villaizan y colaboradores [98] en una revisión reportaron y caracterizaron algunos genes asociados a la respuesta inmune innata por la vía del interferón en respuesta a infecciones virales en peces de cultivo; Interferón tipo I (IFN), la proteína resistente al mixovirus (Mx), el gen estimulado por el interferón 15 (ISG15), viperin (Vig) y el gen inducido por el reovirus de la carpa de hierba (GIG). Además, se debe considerar el gen del ácido poliinosínico-politidílico sintético dsRNA (Poly(I:C)), el cual es utilizado como un eficaz inductor de la respuesta innata de las células inmunes utilizándose ampliamente para estudiar la respuesta celular de virus de dsRNA. Adicionalmente, la infección viral puede activar células dendríticas (DC) o macrófagos produciendo moléculas antiinflamatorias como IL-10 y TGF-β [96]. Numerosos estudios han evaluado la activación de la respuesta inmune innata de genes de respuesta antiviral de virus que afectan a los peces de importancia comercial como es el caso de salmónidos y ciprínidos. Por ejemplo, se ha reportado un incremento significativo en la expresión de IFN y Vig-1 después de la estimulación por Poly(I:C) y la infección por SVC virus en cultivos celulares *in vitro* del epitelio de la carpa [99]. Por otro lado, IFN inyectado intramuscularmente en rodaballo fue capaz de inducir la expresión de Mx, IFI56 e ISG15 y, como consecuencia, reducir significativamente la mortalidad del rodaballo desafiados con el virus de VHS [100]. También se ha reportado la sobre expresión de genes de IFN y *mx* en células de salmónidos expuestos a VHSV, ISAV e IHNV [98]. Nuestro grupo también ha demostrado una significativa sobreexpresión de genes antivirales (Vig-1 y Mx) en cultivos celulares primarios *in vitro* (RT-HKM) estimulados con NPs antivirales recombinantes ($VHSV^{NP}$, $IPNV^{NP}$ y $VNNV^{NP}$) [101].

En relación con la respuesta inmune adaptativa contra infecciones virales, como ya mencionamos, las células infectadas por los virus utilizan a las moléculas MHC clase I para presentar fragmentos de péptidos del virus en la superficie celular. Luego, los péptidos virales son reconocidos por receptores (TCRs) de los linfocitos T citotóxicos circundantes o por las células NK (*Natural killer*), las cuales matan a las células infectadas con el virus [97]. Por otra parte, los anticuerpos (IgM/IgT) también tienen la capacidad de combatir virus circulantes mediante la neutralización, aglutinación y

marcaje de los virus antes que infecten a las células, así como también de activar la fagocitosis celular mediante la unión a receptores [97].

8.6 Interferón gamma

Los interferones gamma (IFNs) son citocinas secretoras implicadas en la respuesta proinflamatoria y en la defensa contra infecciones virales interfiriendo en la replicación viral intracelular [66, 95]. En vertebrados, se han identificado tres subfamilias (IFN tipo I, II y III) de las cuales IFN tipo I y II ahora se sabe cumplen un importante rol contra infecciones virales en peces teleósteos [86]. Los IFN de tipo I (principalmente IFNα/IFNβ) son producidas por la mayoría de las células tras la infección viral y se desencadenan mediante vías de señalización específicas que conducen a la activación de la defensa inmune contra infecciones víricas. En cambio, los IFN del tipo II o IFNγ son citocinas regulatorias producidas primariamente por células APCs que orquestan la respuesta inmune innata y posteriormente por linfocitos Th y T citotóxicos, células mediadoras de la respuesta inmune celular adaptativa contra infecciones virales [79, 86, 96]. En varios peces teleósteos han sido detectado dos tipos de IFNγ (IFNγ e IFN-γrel) como en el caso de la trucha arcoíris y el pez cebra [94]. El IFNγ es una citocina secretada principalmente por linfocitos Th1 $CD4^+$, T $CD8^+$ y células NK pero también se ha reportado que otras células; como las células B y células presentadoras de antígeno (APCs) tales como macrófagos, monocitos y las células dendríticas tienen la habilidad de secretar IFNγ [87, 97, 98, 99]. IFNγ es un regulador clave de la activación de macrófagos, además de ser la citocina que estimula directamente la activación y diferenciación de linfocitos Th $CD4^+$ no activados al fenotipo Th1, adicionalmente está implicado en varios aspectos de la inmunidad, tales como estimular de la presentación de antígenos, controlar la proliferación celular, apoptosis, inducción del estado antiviral, inmunomodulación, inflamación y tráfico de leucocitos [87, 96, 99]. El IFNγ activa la respuesta celular a través de dos receptores tetraméricos; IFN-R1, primariamente usado para la unión del ligando e IFN-R2 usado para la señalización. Tras la activación por homodimeros de IFNγ, IFN-R1 e IFN-R2 reclutan a la quinasa Janus (Jak) 1 y Jak2 a la región citoplasmática respectivamente, lo que conduce a la fosforilación y activación de los transductores de señales y activadores de la transcripción (Stat) 1. De esta manera, los homodímeros fosforilados de Stat1 fosforilados migran al núcleo y se unen a los sitios de activación gamma (GAS) en la región promotora de los genes que responden al IFN para iniciar la expresión génica [79, 100] (**Figura 8**). Zou y colaboradores [92] fueron los primeros en identificar y caracterizar a IFNγ en trucha arcoíris y detectaron que IFNγ recombinante producido en *Escherichia coli* estimula significativamente la expresión génica de IP-10, MHCII y STAT1 y además aumenta la actividad respiratoria en macrófagos. Adicionalmente, Sun et al [103] reportaron que IFNγ tiene la habilidad de inducir una actividad antiviral contra IPNV (ISG15 y Mx) y SAV3 en salmón del Atlántico, virus que afectan importantemente a la

salmonicultura. Además, en otro estudio se demostró que la estimulación *in vitro* de leucocitos del riñón de la platija oliva (*Paralichthys olivaceus*) con IFNγ recombinante induce significativamente la expresión génica de IL-1β, CXCL13, STAT1 e IFNγ, además en el mismo estudio reportaron que el grupo de peces que fue inyectado IFNγ alcanzo un 60% de sobrevivencia en comparación al grupo control que tuvo un 100% de moralidad en peces infectados con la bacteria *Edwardsiella tarda* [108].

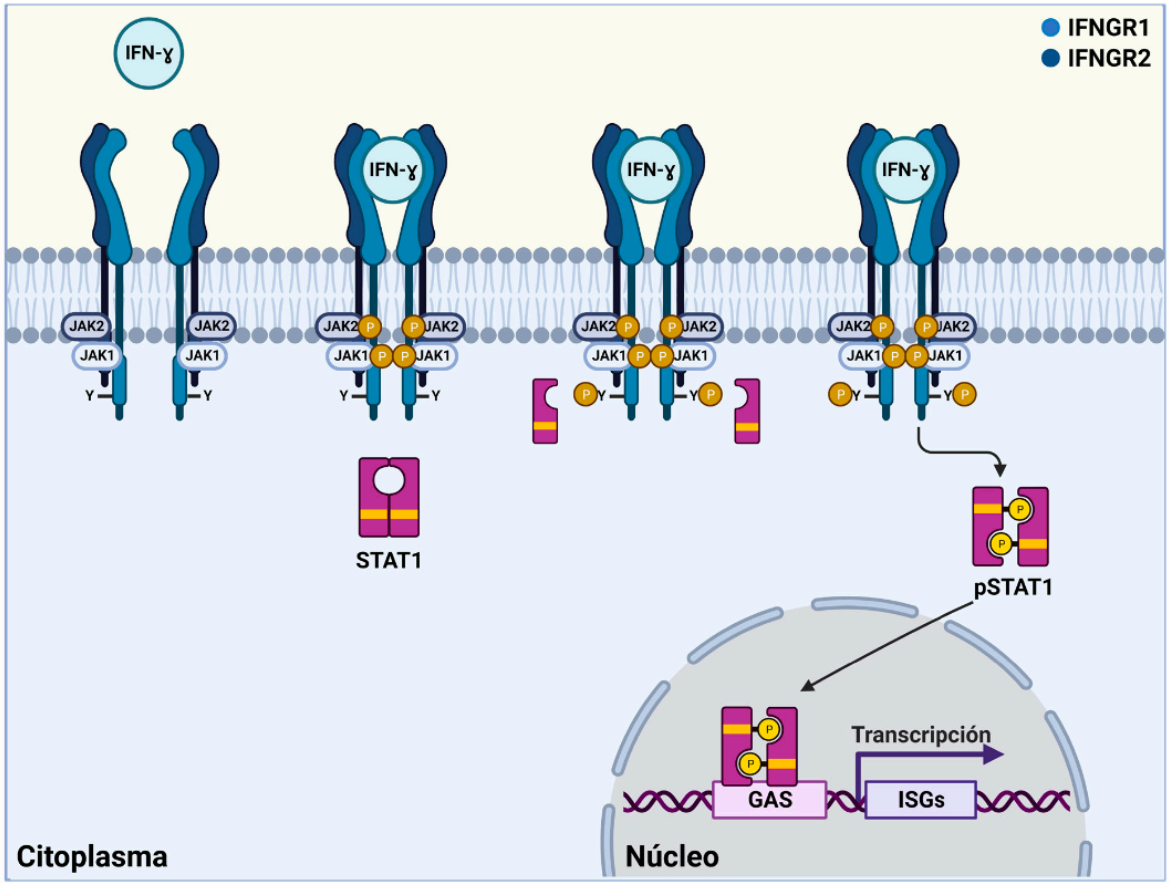


Figura 8. La vía de señalización de IFNγ comienza con su complejo receptor formado por IFNGR1 e IFNGR2 que en sus dominios intracelulares se encuentran asociados con JAK1 y JAK2, respectivamente. La unión del IFNγ con su receptor, permite la activación por transfosforilación de JAK1/2, la fosforilación de los dominios internos del receptor por las proteínas JAK, y el reclutamiento de STAT1 para, a su vez, ser fosforilado y activado. STAT1 fosforilado se homodimeriza y se transloca al núcleo para iniciar la transcripción de los genes con secuencias GAS en sus regiones promotoras. Ilustración modificada de Zamora-Salas et al. [109].

8.7 Quimiocinas

Las quimiocinas (o quimioquinas) son una familia pequeña de citocinas que pueden modular el sistema inmune a través de receptores de quimiocinas acoplados a proteínas G de la superficie celular y funcionan como quimioatrayentes, jugando un rol importante en la migración de células efectoras inmunológicas a los tejidos o sitios de infección. La principal vía por la que los receptores de quimiocinas se internalizan es la vía mediada por clatrina, pero algunos receptores pueden utilizar rutas de internalización dependientes de balsas lipídicas/caveolas [110]. Los receptores de quimiocinas interactúan con un grupo de ligandos peptídicos de 8-10 kDa y son indispensables para la coordinación de la migración celular en diversos procesos fisiológicos tales como el sistema inmune [111]. En general, hay menos receptores que quimiocinas, con aproximadamente 20 receptores frente a 50 ligandos identificados en los mamíferos, por lo que la mayoría de los receptores se unen a más de un ligando. Con la excepción de los CR atípicos, la unión de ligandos causa cambios conformacionales en los receptores que a su vez desencadenan señales intracelulares que causan eventos celulares como la migración celular direccional [112]. La parte extracelular N-terminal del receptor es responsable de la unión del ligando, mientras que los dominios intracelulares, incluido el terminal C, están involucrados en la señalización intracelular y se nombran de acuerdo con la clase de quimiocinas a la que se unen [111, 113, 114]. Las quimiocinas se clasifican dentro de cuatro grupos; CXC, CC, C y CX3C. Dentro de la familia de quimiocinas CC, en el contexto del presente estudio se ha demostrado que la quimiocina CCR5, sus receptores y ligandos desempeñan un papel relevante en las enfermedades inflamatorias, regulando el tráfico intracelular y desencadenando la respuesta inmune humoral y celular de diferentes tipos de leucocitos que migran entre la sangre y el sitio de infección como herramienta terapéutica contra enfermedades infecciosas [102, 103, 104, 105]. Además, podrían estar implicadas en la mediación entre células inmunológicas y las funciones efectoras de linfocitos T, macrófagos y células dendríticas [106, 107]. En humanos, la quimiocina CCR5, se ha descrito como el principal co-receptor del VIH y potente agonista del receptor CCR5 utilizado por el virus VIH para dirigirse a las células [120]. Las quimiocinas humanas son muy conservadas y se ha sugerido que pueden compartir similitudes estructurales con las quimiocinas de los peces [121]. Se ha reportado que la quimioquina CXCL8-like del pez dulce Ayu (*Plecoglossus altivelis*) está implicada en la respuesta inmunológica mediando la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos/macrófagos [122]. Además, se ha demostrado que la quimioquina recombinante CK11 de trucha es capaz de estimular la actividad antimicrobiana inhibiendo el crecimiento de bacterias de trucha, y sobreexpresar IL-1β e IL-8 en leucocitos de riñón anterior expuestos a CK11 [123]. También, ha sido reportado que receptores CCRs de la trucha fueron sobre expresados en tejidos de la trucha tales como bazo, riñón anterior y las branquias por IL-1β, IL-6, IFNγ y Poly(I:C) [124].

Prosiguiendo con la diferenciación de linfocitos Th CD4. Los linfocitos Th reguladores (Treg) tienen como función principal mantener la homeostasis inmunitaria del hospedador mediante mecanismos que incluyen la supresión de las respuestas inmunitarias y el control del reconocimiento de moléculas propias frente a las no propias. Por otra parte, los linfocitos Treg se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FoxP3 y por la secreción de IL-10 y TGF-β. Respecto al subconjunto de linfocitos Th17, estas células participan en la respuesta inmunitaria contra hongos y bacterias extracelulares y secretan IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, citocinas que estimulan la secreción de quimiocinas por parte de las células residentes, lo que conduce al reclutamiento de neutrófilos y macrófagos en el sitio de inflamación [80]. Por otro lado, el subconjunto de linfocitos Th2 juega un rol preponderante y clave en la respuesta inmune contra patógenos extracelulares. Las células Th2 se caracterizan por producir citocinas tales como IL-4, IL-5 e IL-13. La citocina IL-4 se caracteriza por regula la proliferación de la especificidad (expansión clonal) de las células Th2 y junto a IL-13, activan a macrófagos y promueven la secreción de isotipos de inmunoglobulinas de los linfocitos B para controlar las infecciones extracelulares [73, 78, 113]. Sin embargo, se ha reportado que la estimulación de IL-4/IL-13A recombinante unidas en células del riñón anterior de trucha, modularon la expresión a la baja de citocinas proinflamatorias (IFNγ e IL-1β) y al alza de citocinas antiinflamatorias (IL-10 y SOCS3), lo que siguiere un posible rol antiinflamatorio regulador de las citocinas Th2 [126].

8.8 Respuesta inmune humoral

Los linfocitos B son las células inmunológicas encargadas de orquestar la respuesta inmune humoral. Las células B son producidas en el riñón anterior y circulan a través de la sangre y por los órganos linfoides secundarios [56, 67]. Los linfocitos B circulantes en la sangre pueden encontrar antígenos nativos de forma soluble y en la superficie de las células T clones en órganos linfoides secundarios poco después que el antígeno entra al organismo mediante sus receptores específicos (BCR, *B-cell receptors*) que contienen inmunoglobulinas y están localizados en su membrana superficial, y además, sintetizar inmunoglobulinas específicas que tiene la capacidad de bloquear y marcar a los antígenos específicos para su posterior eliminación por parte de células fagocíticas [64, 73, 115]. Los receptores de células B (BCR) están compuestas por inmunoglobulinas y por dos cadenas invariantes CD79 (CD79α y CD79β) [80]. En esta línea, la inmunoglobulina reconoce al antígeno y las cadenas invariantes CD79 están encargadas de dar la señal de transducción al núcleo celular [80]. Los linfocitos B aparte de tener la capacidad de producir anticuerpos, también poseen la habilidad de estimular la respuesta inmune de otras formas y eficientemente; Los linfocitos B pueden ser activados y convertirse en presentadores de antígeno con gran eficiencia. Los linfocitos B reconocen un antígeno nativo soluble con sus receptores específicos (BCR), el cual es internalizado y fragmentado a péptido en el citosol y luego es captado y presentado por las moléculas MHCII en la superficie

celular a linfocitos Th. Adicionalmente, los linfocitos B tienen una gran capacidad fagocítica y de concentrar una pequeña cantidad de fragmentos de antígeno, lo cual incrementa su potencial como células presentadora de antígenos y que ha demostrado tener un rol microbicida importante a nivel de respuesta inmune innata, en peces como trucha arcoíris [73, 115, 116, 117]. Por lo tanto, las células B en teleósteos también desempeñan un papel importante en la respuesta innata y en la eliminación temprana de patógenos, de forma similar a las células B1 de mamíferos [80]. Adicionalmente, se ha reportado que las células B están envueltas en la regulación del sistema inmune innato y adaptativo mediante la producción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y la IL-35 así como proinflamatorias, como TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8 e IFNs [118, 119].

8.9 Inmunidad de la mucosa intestinal

La mucosa cubre la mayor parte del cuerpo de los peces teleósteos siendo la principal puerta de entrada de patógenos infecciosos. Los peces teleósteos están expuestos a un medio ambiente rico en patógenos y otros agentes estresores que bombardean continuamente la mucosa superficial de los tejidos. Además, conviven en armonía con otros microrganismos comensales que habitan en la microbiota del intestino. En todos los vertebrados existe una mucosa superficial asociada a tejido linfoide. En teleósteos los tejidos linfoides asociados a las mucosas (MALT, *Mucosa-associated lymphoid tissue*) son el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), el tejido linfoide asociado a la piel (SALT), el tejido linfoide asociado a las branquias (GIALT) y el tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT). El tracto gastrointestinal de los peces está directamente conectado con el ambiente externo y además de cumplir funciones digestivas y fisiológicas, es la principal puerta de entrada de patógenos que está compuesto por el tejido linfoide intestinal (GALT), tejido inmunológicamente activo que protege contra infecciones [120, 121]. El GALT de los peces está constituido por elementos difusos en lugar de estar compuesto por elementos organizados como las placas de Peyer presentes en organismos endotermos. A la fecha, variados estudios han reportado y evidenciado que la vacunación dirigida a la mucosa y las infecciones en la mucosa inducen la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa en los diferentes tejidos/sitios de la mucosa superficial de los peces teleósteos [67, 120, 121, 122, 123] La estructura longitudinal del intestino puede variar entre peces teleósteos, sin embargo, generalmente puede dividirse en dos principales segmentos; el primer segmento está compuesto por enterocitos que tienen la capacidad de absorber las proteínas/macromoléculas procedentes de la dieta y el segmento posterior que tiene funciones osmorreguladoras y se ha demostrado que contiene varios tipos de células inmunitarias, lo que sugiere que participan en las respuestas inmunitarias contra la invasión de patógenos [133].

En el contexto de infección, cuando la mucosa superficial detecta una señal de peligro, inmediatamente se desencadenará una respuesta inmune innata que posteriormente desarrollará una

respuesta inmune adaptativa basada en linfocitos T, linfocitos B y la generación de anticuerpos específicos. Para esto, el sistema inmune de la mucosa intestinal cuenta con una gran variedad de herramientas inmunológicas para combatir infecciones contra patógenos, tales como barreras fisicoquímicas, moleculares y celulares. Las barreras fisicoquímicas están compuestas por una capa de mucosa superficial que crea una pared contra cualquier patógeno, la cual protege a las células epiteliales del intestino y actúa como un importante mecanismo de defensa innato que mantiene la homeostasis del tejido [124, 125]. La mucosa es secretada por células caliciformes desde el epitelio al lumen y está compuesto de agua (~95%) y glicoproteínas, principalmente mucina (~ 5%), el cual le confiere la viscosidad a la mucosa [138]. La glicosilación de la mucina modula la viscosidad y el rol de barrera del mucus que permite la remoción física de los patógenos contenidos en la mucosa y adheridos al lumen del intestino [120, 126]. A pesar de que se han observado alteraciones y/o cambios en las secreciones de expresión génica de la mucosa en peces teleósteos expuestos a factores medio ambientales (como estrés) e infecciones, aún sus funciones o alteraciones no son bien entendidos. Adicionalmente, se han descrito varias moléculas antimicrobianas implicadas en el sistema inmune innato en el intestino de varias especies de peces, tales como lisozimas, componentes del complemento, citocinas, lectinas o péptidos antimicrobianos (AMPs, *Antimicrobial peptides*). Sin embargo, al parecer esta última parece tener un rol más crítico en la inmunidad de la mucosa debido a que han sido observadas en las células caliciformes del intestino de algunos peces [132].

El GALT de los teleósteos está compuesto por dos grupos de células inmunitarias implicadas en la respuesta inmune: Los leucocitos de la lámina propia (LPLs, *Lamina propria leukocytes*), que contiene un amplio grupo de células residentes y circulantes, tales como macrófagos, granulocitos y células plasmáticas; y los linfocitos intraepiteliales (IEL, *intraepithelial lymphocytes*), formados principalmente por linfocitos T residentes (tales como T $CD4^+$ y $CD8^+$) y unos pocos linfocitos B situados entre las células epiteliales. Además, otros tipos de células forman parte de la respuesta inmune intestinal, tales como las células epiteliales o enterocitos, las células productoras de mucus y las células neuroendocrinas [120, 127]. También se ha reportado un alto reclutamiento de células B en los ciegos pilóricos, observando un incremento significativo del número de células B IgM/IgT en el tejido intraepitelial en respuesta a una vacunación oral [140]. En la **Figura 9** se muestra una descripción de la estructura del epitelio y de las principales poblaciones de leucocitos en el GALT implicadas en la respuesta inmune de la mucosa, descrito por Salinas y Parra, 2015 [132].

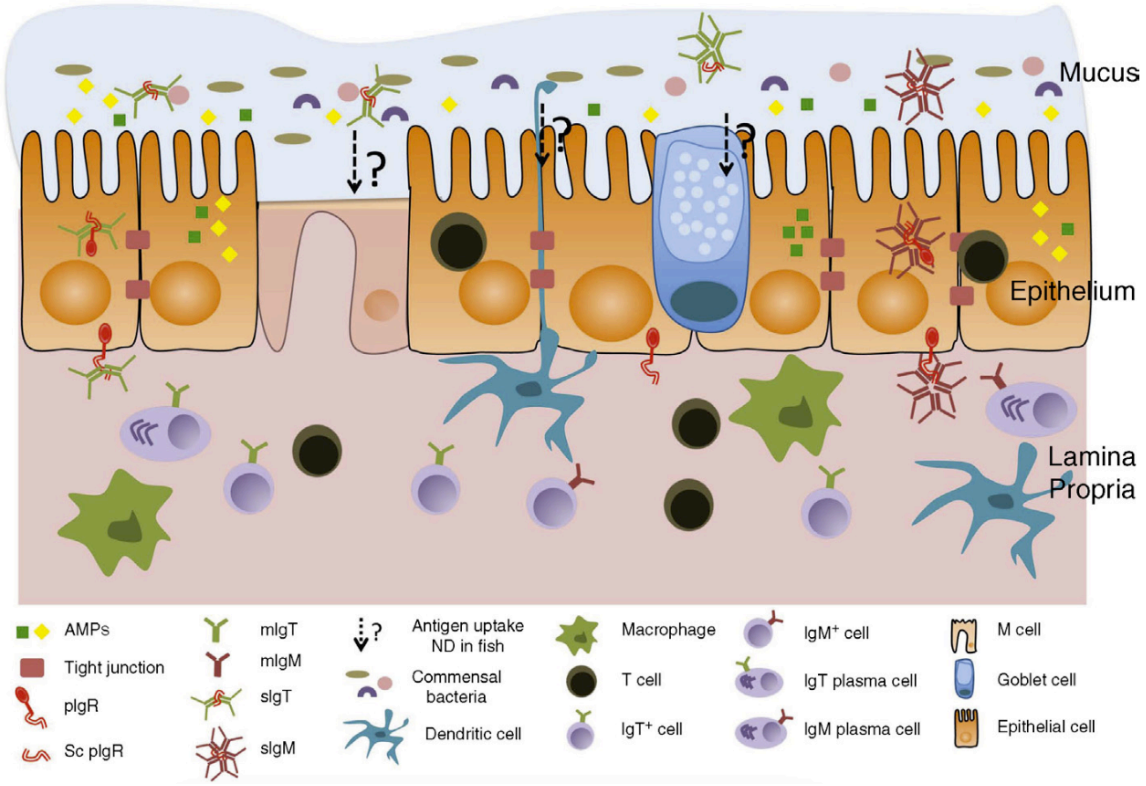


Figura 9. Representación de la estructura del epitelio intestinal y las principales células residentes implicadas en la respuesta inmune de la mucosa en peces. Se observan macrófagos, células B y T y células plasmáticas, así como la capa de mucus y la microbiota asociada al intestino. Se muestran células M y células dendríticas, subconjuntos celulares cruciales en la GALT de mamíferos, aunque aún no se ha demostrado su presencia en el intestino de los peces. También se representan componentes humorales de la respuesta inmune (Igs y AMPs). Se sugieren posibles vías de absorción de antígenos (?). AMP, péptidos antimicrobianos; pIgR, receptor Ig polimérico; mIgT/M, inmunoglobulina unida a la membrana; sIgT/M, inmunoglobulina secretada; ND, no determinado. Ilustración modificada de Salinas y Parra et al [132].

Las células B y las inmunoglobulinas (Igs) juegan un rol clave en la respuesta inmune local innata-adaptativa y en la mantención de la homeostasis de la mucosa intestinal [121, 129]. Los peces tienen tres isotipos de inmunoglobulinas IgM, IgD e IgT. Las IgM e IgT están presentes en la mucosa intestinal de la trucha arcoíris de forma secretada. El transporte de Igs del epitelio hacia el lumen, se produce a través de receptores de inmunoglobulinas poliméricos (pIgRs, *polimeric immunoglobulin receptors*) presentes en la superficie de las células epiteliales intestinales por un proceso llamado transcitosis [132]. Las inmunoglobulinas son glicoproteínas altamente especializadas que tienen la capacidad de reconocer una gran cantidad de antígenos de bacterias, virus y otros microorganismos causantes de enfermedades [67, 121]. Los linfocitos B producen los anticuerpos como parte de la activación de la inmunidad humoral y también producen anticuerpos naturales polireactivos que son

capaces de reconocer múltiples antígenos [142]. Las Igs son principalmente localizadas en el riñón anterior y son liberadas en los fluidos corporales de los peces (suero y secreciones mucosales) en forma soluble o unida a la membrana de la superficie de las células B como receptores de células B (BCR) [67, 131, 132, 133]. Las moléculas de Ig están compuestas por dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas que proporcionan dos sitios de unión a antígenos idénticos a través de los dominios variables amino-terminales (V) tanto de las cadenas H como de las cadenas L. Los dominios carboxilo-terminales (C) de las cadenas H definen los isotipos (clases) de Ig y las funciones efectoras de la Ig mediante la unión a sus receptores en las células efectoras [66]. Las Igs son las mediadoras de la respuesta inmune humoral y también juegan un rol preponderante en la respuesta inmune mucosal [67]. De los tres isotipos de inmunoglobulinas reportados en peces teleósteos, la IgM es la primera hemoglobina descrita en peces y lejos la más caracterizada a nivel molecular y funcional además de ser la más abundante en el sistema circulatorio de los peces, mostrando una funcional heterogeneidad con formas monoméricas, dímeras y tetraméricas, siendo regularmente detectada en plasma y suero, así como también está presente en las secreciones mucosales como polímero, pero por un corto periodo de tiempo debido a que las proteasas del intestino son capaces de degradar las IgM [24, 67, 131, 132, 134]. La concentración de IgM en el suero puede variar entre especie (0,6 – 21 mg/ml), dependiendo del tamaño de los peces, la temperatura del ambiente, calidad del agua, estrés, o nivel de inmunización de los animales, entre otros [129, 135]. Se ha reportado que la concentración de IgM en la mucosa (4,5 a 280 μg/ml) es mucho menor que en suero [122, 129]. Sin embargo, se ha demostrado que el aumento del título de anticuerpos de IgM en el suero de los peces es capaz de neutralizar y aglutinarse contra virus y bacterias patógenas, activando la vía clásica de memoria inmunológica al reconocer al patógeno [141]. La inmunoglobulina isotipo IgT presenta multiméricas formas y ha sido descrita y caracterizada estructural y funcionalmente como la inmunoglobulina especializada de la inmunidad mucosal [67, 122, 129, 136]. A la fecha, tres subclases de IgT (IgT1, IgT2 e IgT3) han sido identificados en trucha arcoíris y todas son detectables en suero [128]. En paralelo, inmunoglobulina isotipo IgZ ha sido identificada en mucus y suero de peces cebra, y subdividida en dos subclases [149]. La proteína IgT se expresa como monómero (~180 kDa) en suero de trucha y en la mucosa se ha encontrado mayormente como polímero (~4-5 monómeros) asociado por interacciones no covalentes [141]. Importantemente, se ha reportado que las IgT tienen la habilidad de interactuar con la microbiota manteniendo la homeostasis, además de tener la capacidad de atacar bacterias y prevenir que ingresen al epitelio [148]. En el intestino, piel y mucosa nasal de la trucha, la relación IgT/IgM es mucho mayor en el plasma en ausencia de estimulación antigénica [136, 138, 139]. Se ha reportado que a pesar de que IgM por lejos es el isotipo predominante en el suero de truchas, el isotipo IgT alcanza el doble de concentración en la mucosa del intestino en comparación a IgM ([148]. También, se ha reportado que las concentraciones de IgT son altamente prevalentes en la

mucosa de diferentes sitios de la mucosa en contraste a IgM que predomina en el suero en caso de infección [136, 138, 139]. Por otro lado, la inmunoglobulina IgD es un monómero que ha sido identificado en diferentes peces teleósteos, que parece tener un papel significativo en la inmunidad mucosal de la piel y branquias [24] pero que aún no es del todo claro [68, 129]. Dos monoméricas variantes de tamaño se han descrito en trucha con concentraciones en suero de entre 2 y 80 µg/ml [134]. Salinas y cooperadores [141] señalaron en una revisión de diferentes estudios, que la concentración de IgD en el mucus de varios sitios de la mucosa es menor que en el suero. Además, señalaron que a algunos estudios han revelado que IgD se induce transcripcionalmente durante infecciones virales y bacterianas, recientes estudios han reportado la ausencia de títulos de IgD específicos de patógenos en el suero y mucosa de la trucha en respuesta a la infección por parásitos y bacterias. De esta manera el rol de IgD en la inmunidad del hospedador parece no estar claro. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que la IgD secretada es capaz de recubrir la microbiota de diferentes sitios de la mucosa, tales como las branquias y el intestino [140, 141]. Por otra parte, se deben considerar factores tales como la interacción de la secreción de Ig (tales como IgT) con la microbiota comensal que habita en el intestino y/o en el sitio de infección, debido a que la microbiota cumple un importante rol en la salud de los peces, que se ha reportado está envuelta en la protección contra agentes infecciosos [154]. El sistema inmunitario de la mucosa además de proteger permite la colonización de comunidades microbianas complejas y diversas. De esta manera, el sistema inmune desarrolla y activa linfocitos con gran especificidad y capacidad de memoria que es capaz de recordar comensales y patógenos en la mucosa. De forma paralela, los microorganismos comensales han disminuido su patogenicidad para habitar de forma ventajosa y nutritiva en la mucosa superficial del intestino sin ser eliminados [137]. Por lo tanto, el tejido linfoide de la mucosa ha desarrollado un complejo sistema inmunitario que interactúa con la microbiota en la mucosa, y la relación entre ellas puede proporcionar beneficios mutuos que mantienen la homeostasis en el tejido intestinal y consecuentemente la salud general de los animales [133]. Los mecanismos por los cuales un antígeno induce una respuesta inmune en la mucosa como comprender las limitaciones, funcionalidad e interacción de los componentes inmunológicos que residen en la mucosa intestinal, parecen ser factores claves que necesitan constantemente ser más estudiados y profundizados para diseñar vacunas más eficaces dirigidas a la mucosa.

4. Vacunas subunitarias recombinantes basadas en Cuerpos de Inclusión

Los cuerpos de inclusión bacterianos (IBs, *Inclusion bodies*) son nanopartículas proteicas insolubles agregadas y funcionales que se forman a partir de la sobreproducción de proteínas recombinantes en una variedad de sistema de producción, tales como levadura, células de plantas, insectos u organismos procariotas como en *Escherichia coli*. Los IBs usualmente presentan un rango de tamaño aproximado de entre 0,5 y 1,3 µm dependiendo de factores, tales como el tamaño de la secuencia de

aminoácidos de la proteína, las características genéticas de la cepa productora y las condiciones de cultivo durante el proceso de producción de la proteína [143, 144]. Usando microscopia electrónica se ha comprobado que los IBs pueden acumularse en el citoplasma o en el periplasma de *E. coli* durante la sobreproducción de las proteínas recombinantes [144, 145, 146, 147].

Inicialmente, en contraste a las proteínas solubles, - proteínas apropiadamente plegadas y completamente funcionales - los cuerpos de inclusión fueron considerados como residuos de la producción de las proteínas recombinantes que se asumió eran proteínas inactivadas mal plegadas que adquieren una forma tridimensional incorrecta y no funcional que fallan en alcanzar su conformación nativa y que la industria farmacéutica hacía el esfuerzo de eliminar o al menos parcialmente reducir su formación [148, 149, 150]. Sin embargo, ahora se sabe que los IBs son proteínas mecánicamente estables y funcionales y que son resistentes a condiciones extremas de disrupción celular y fácilmente aisladas desde las células por medios físicos simples y obtenidos con relativa pureza a partir de producciones de proteínas recombinantes, las cuales también pueden ser transformadas a una forma soluble mediante solubilización y posterior *refolding* [151, 152]. En diferentes estudios se ha demostrado que los IBs presentan gran estabilidad y la capacidad de ser producidos a nano escala, nanopartículas que tienen la capacidad de penetrar en las células mientras mantienen su actividad biológica además de proporcionar una liberación lenta de proteína funcional a lo largo del tiempo [163]. Adicionalmente, en nuestro grupo de investigación en experimentos *in vitro* y en peces (pez cebra, trucha y lenguado) hemos corroborado y demostrado que los IBs expresados en *E. coli* presentan biocompatibilidad y funcionalidad inmunológica con una alta estabilidad mecánica y termal, y la capacidad de contener altos niveles de antígeno que estimula el sistema inmune, además de ser fáciles de producir y a bajo costo [94, 152, 153, 154].

E. coli es uno de los sistemas de expresión más extensamente utilizado para la producción de proteínas recombinantes como IBs, debido a que ofrece ventajas, tales como ser un sistema de crecimiento de bajo costo, seguro, acumular una rápida biomasa, posibilidad de realizar fermentaciones a una alta densidad celular y desarrollar un escalado simple del proceso de producción. Además, la genética de la *E. coli* está bien caracterizada por lo que muchas herramientas han sido desarrolladas para la ingeniería cromosómica, facilitando la clonación y expresión de genes [167]. La aislación de los IBs desde *E. coli* usualmente presenta un alto rendimiento de proteína recuperada (~90-95%) que a su vez puede contener un alto contenido de impurezas adicionales procedentes de los restos celulares, así como también contener células viables sin lisar [95, 157]. Rodríguez-Carmona y colaboradores elaboraron una serie de protocolos de purificación de cuerpos de inclusión sobrexpresados en *E. coli* mediante una combinación de métodos de disrupción mecánica y enzimática (**Figura 10**) que permite lisar las células y recuperar IBs a niveles viables de contaminación manteniendo su organización agregada y tamaño [159]. De esta misma forma, nuestro

grupo de investigación ha adecuado y optimizado procedimientos de purificación de disrupción mecánica-enzimática celular para purificar IBs recombinantes antigénicos libres de *E. coli* funcionalmente viables [94, 152, 157]. Como se ha indicado previamente, el proceso de purificación de los IBs recombinante en *E. coli* genera impurezas adicionales, las cuales podrían estar constituidas por pequeños fragmentos de la membrana celular tales como lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos (PGN, *Petidoglycan*), componentes ribosomales, trazas de proteínas hidrofóbicas de membrana, así como por restos de ADN y ARN [158]. Estos componentes son conocidos por presentar propiedades inmunomoduladoras [168], lo cual puede brindar una mayor capacidad y potencia a nuestra nueva propuesta de plataforma modular de vacunación oral antiviral.

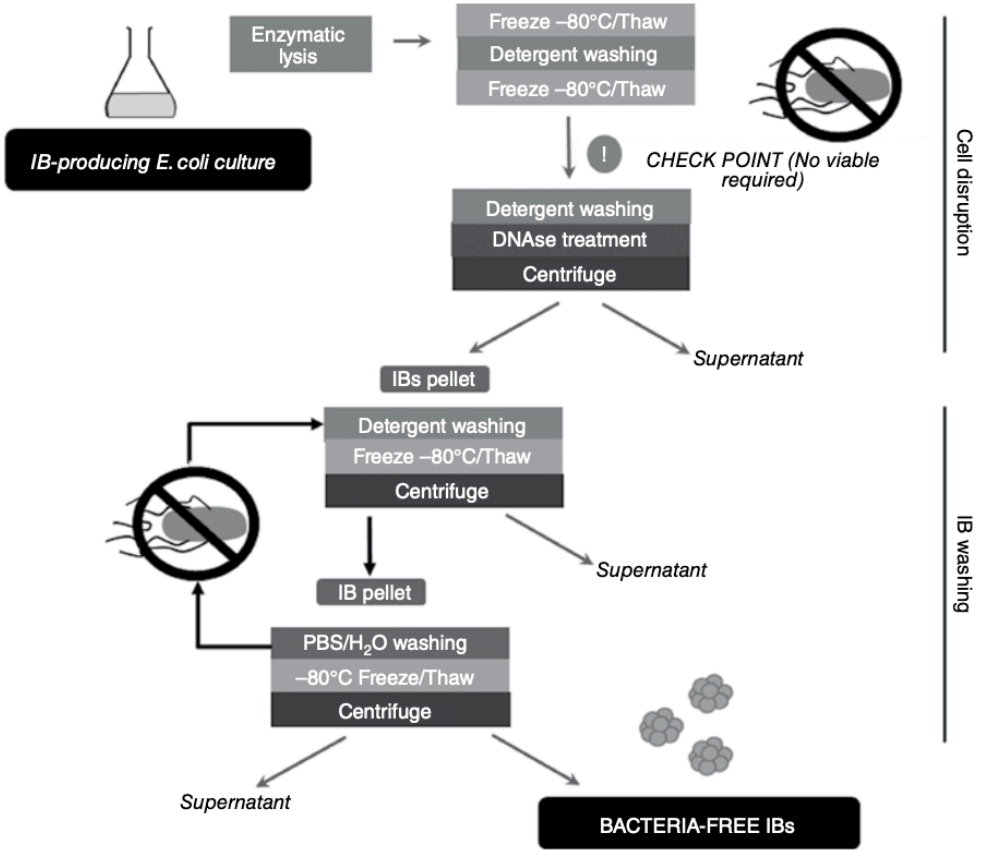


Figura 10. Esquema tipo general de purificación de cuerpos de inclusión (IB) en *E. coli* mediante disrupción mecánica y enzimática. Ilustración modificada de [170].

En resumen, las ventajas de diseñar vacunas con antígenos virales recombinantes como IBs, son múltiples: a) Son proteínas a nano-escala altamente estables, ajustables y no tóxicas que penetran en las células, mientras mantienen una significativa actividad biológica; b) Pueden ser diseñados a partir de proteínas antigénicas de interés y promover una lenta liberación de proteína funcional en el tiempo; c) Son estables a pH gastrointestinal por lo que el antígeno recombinante se podría

administrar oralmente a través del alimento, evitando la encapsulación, y el costo y estrés asociado al suministro de la vacuna por inyección intraperitoneal; d) La producción de IBs en *E. coli* es fácil de realizar, con un simple procedimiento de purificación enzimática y mecánica que minimiza los costos y de fácil y rápido escalado; e) Los IBs son estables bajo condiciones de liofilización en un amplio rango de temperaturas, lo que indica su potencial como un producto farmacéutico con una vida útil duradera, sin necesidad de protección térmica y alta estabilidad para ser incluidos en el proceso de elaboración de pienso por extrusión.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que los IBs pueden funcionar como un vehículo portador de antígenos virales y provocar una respuesta inmune innata y adaptativa contra virus que afectan a peces teleósteos. Torrealba et al [164] evaluaron el potencial inmunoestimulante de los IBs en peces por nanoestructuración de la citoquina recombinante TNFα y CCL4, testeados en modelos de infección bacteriana en peces cebra. Además, la internalización de los IBs de TNFα en células intestinales fue demostrado *in vivo* en trucha arcoíris por intubación vía oral. Adicionalmente, Thwaite et al [94, 154] demostraron en experimentos *in vitro* e *in vivo* el potencial inmunológico de los antígenos virales configurados como IBs. Para esto, se diseñaron y produjeron tres proteínas recombinantes antigénicas antivirales: *Viral capsid protein* 2 (VP2) del virus de la necrosis pancreática viral IPNV, la glicoproteína G del virus de la septicemia hemorrágica viral VHSV y *Coat Protein* C del virus de la necrosis nerviosa VNNV, virus que afectan a peces de cultivo de interés comercial. Los estudios demostraron que: a) Los NPs pueden producirse con un método costo-efectivo reproducible y barato; b) Los NPs pueden ser endocitados tanto *in vitro* en líneas celulares de hígado del pez cebra (ZFL) como *in vivo* en intestino del pez cebra cuando son administrados de forma oral por intubación, sin presentar efectos tóxicos en las células; c) Los NPs pueden provocar una respuesta inmune *in vitro*, incrementando la respuesta inmune innata antiviral de los marcadores genéticos en células ZFL y en los cultivos celulares de macrófagos del riñón anterior de trucha arcoíris; d) Los NPs de VNNV, probados en lenguado senegalés juveniles (*Solea senegalensis*) por inyección intraperitoneal y oral, generaron anticuerpos específicos. En el mismo estudio, en el riñón anterior de los peces inyectados con NPs se registró un incremento en la expresión de genes relacionados a la inmunidad adaptativa, indicando que hubo una respuesta sistémica adaptativa, mientras que los peces intubados estimularon la respuesta inmune de la mucosa en el intestino [166]. Por lo tanto, evidencia suficiente existe para afirmar que las proteínas antigénicas virales recombinantes elaboradas a partir de IBs y testeadas en trucha arcoíris y lenguado senegalés, tienen la capacidad de estimular la respuesta inmune innata-adaptativa y potencialmente usarlas como inmunoestimulante y/o vacunas antivirales.

10. Nuevo enfoque profiláctico de vacunación oral antiviral

En el presente estudio, continuando con la línea de investigación y considerando que las secuencias peptídicas permiten incluir funciones adicionales, planteamos perfeccionar el enfoque biotecnológico de vacunación mediante el diseño de plataformas de vacunación modular nanoestructurada manteniendo la estructura de la proteína del antígeno viral y añadiendo "módulos efectores" como el interferón gamma (IFNγ) que presenta una comprobada respuesta antiviral y "módulos ligando" como CCR5 con el objetivo de dirigir la vacuna a células/tejidos específicos. Hipotetizando que estas vacunas modulares podrán reforzar y otorgar características de protección adicionales a las vacunas recombinantes nanoestructuradas.

REFERENCIAS

[1] *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022*. FAO, 2022. doi: 10.4060/cc0461es.

[2] J. G. & J. V. Rasmus Nielsen, *Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF) – The EU Aquaculture Sector – Economic report 2020 (STECF-20-12)*. 2020.

[3] Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR)., "La Acuicultura en España 2023," Sep. 2022. Accessed: Feb. 26, 2024. [Online]. Available: https://apromar.es/wp-content/uploads/2023/09/La_acuicultura_Espana_2023_APROMAR_v2.pdf

[4] P. J. Walker and J. R. Winton, "Emerging viral diseases of fish and shrimp," *Veterinary Research*, vol. 41, no. 6. Nov. 2010. doi: 10.1051/vetres/2010022.

[5] H. D. Rodger, "Fish disease causing economic impact in global aquaculture," in *Birkhauser Advances in Infectious Diseases*, no. 9783034809788, Springer Basel, 2016, pp. 1–34. doi: 10.1007/978-3-0348-0980-1_1.

[6] Ø. Evensen, "Development of Fish Vaccines: Focusing on Methods," in *Fish Vaccines*, Basel: Springer Basel, 2016, pp. 53–74. doi: 10.1007/978-3-0348-0980-1_3.

[7] B. L. Nicholson, "Fish Diseases in Aquaculture. The Fish Site. Infectious diseases caused by bacteria, viruses and parasites are a primary concern in aquaculture.," Apr. 2006. Accessed: Feb. 27, 2024. [Online]. Available: https://thefishsite.com/articles/fish-diseases-in-aquaculture

[8] K. K. Mugimba, D. K. Byarugaba, S. Mutoloki, Ø. Evensen, and H. M. Munang'Andu, "Challenges and solutions to viral diseases of finfish in marine aquaculture," *Pathogens*, vol. 10, no. 6. MDPI AG, Jun. 01, 2021. doi: 10.3390/pathogens10060673.

[9] K. D. Lafferty *et al.*, "Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics," *Ann Rev Mar Sci*, vol. 7, pp. 471–496, Jan. 2015, doi: 10.1146/annurev-marine-010814-015646.

[10] R. L. Naylor *et al.*, "A 20-year retrospective review of global aquaculture," *Nature*, vol. 591, no. 7851. Nature Research, pp. 551–563, Mar. 25, 2021. doi: 10.1038/s41586-021-03308-6.

[11] S. Thomas, *Vaccine Design Methods and Protocols, Volume 2. Vaccines for Veterinary Diseases Second Edition*, vol. 2411. New York, NY: Springer US, 2022. doi: 10.1007/978-1-0716-1888-2.

[12] A. K. Dhar, S. K. Manna, and F. C. Thomas Allnutt, "Viral vaccines for farmed finfish," *Indian Journal of Virology*, vol. 25, no. 1. pp. 1–17, Jan. 2014. doi: 10.1007/s13337-013-0186-4.

[13] Marian and Mcloughlin, "Fish Vaccination. A brief overview. Aquatic Veterinary Services Aquatic Veterinary Services Belfast Belfast," 2006. Accessed: Feb. 27, 2024. [Online]. Available: https://transition-news.org/IMG/pdf/fish-vaccine-overview.pdf

[14] H. Mondal, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee, and J. Thomas, "Viral infections in cultured fish and shrimps: current status and treatment methods," *Aquaculture International*, vol. 30, no. 1. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 227–262, Feb. 01, 2022. doi: 10.1007/s10499-021-00795-2.

[15] F. S. B. Kibenge, M. G. Godoy, M. Fast, S. Workenhe, and M. J. T. Kibenge, "Countermeasures against viral diseases of farmed fish," *Antiviral Research*, vol. 95, no. 3. pp. 257–281, Sep. 2012. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.06.003.

[16] A. López-Muñoz *et al.*, "Viral nervous necrosis virus persistently replicates in the central nervous system of asymptomatic gilthead seabream and promotes a transient inflammatory response followed by the infiltration of IgM + B lymphocytes," *Dev Comp Immunol*, vol. 37, no. 3–4, pp. 429–437, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.dci.2012.02.007.

[17] J. Z. Costa and K. D. Thompson, "Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy," *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 53. Academic Press, pp. 35–49, Jun. 01, 2016. doi: 10.1016/j.fsi.2016.03.033.

[18] I. Cano *et al.*, "Detección y cuantificación del virus de linfocistis (LCDV) en doradas (Sparus aurata L) cultivadas mediante PCR a tiempo real. Sesión de Sanidad Animal," 2006.

Accessed: Feb. 28, 2024. [Online]. Available: https://digital.csic.es/bitstream/10261/46471/1/Linfocistis.pdf
[19] C. P. Dopazo, "The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and its virulence determinants: What is known and what should be known," *Pathogens*, vol. 9, no. 2. MDPI AG, Feb. 01, 2020. doi: 10.3390/pathogens9020094.
[20] C. W. E. Embregts *et al.*, "Intramuscular DNA vaccination of juvenile carp against spring viremia of carp virus induces full p3wrotection and Establishes a Virus-Specific B and T Cell Response," *Front Immunol*, vol. 8, no. OCT, Oct. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01340.
[21] U. Ashraf, Y. Lu, L. Lin, J. Yuan, M. Wang, and X. Liu, "Spring viraemia of carp virus: Recent advances," *Journal of General Virology*, vol. 97, no. 5. Microbiology Society, pp. 1037–1051, May 01, 2016. doi: 10.1099/jgv.0.000436.
[22] J. L. Clarke, M. T. Waheed, A. G. Lössl, I. Martinussen, and H. Daniell, "How can plant genetic engineering contribute to cost-effective fish vaccine development for promoting sustainable aquaculture?," *Plant Molecular Biology*, vol. 83, no. 1–2. pp. 33–40, Sep. 2013. doi: 10.1007/s11103-013-0081-9.
[23] A. Miccoli, M. Manni, S. Picchietti, and G. Scapigliati, "State-of-the-art vaccine research for aquaculture use: The case of three economically relevant fish species," *Vaccines*, vol. 9, no. 2. MDPI AG, pp. 1–29, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/vaccines9020140.
[24] M. K. Bedekar and S. Kole, "Fundamentals of Fish Vaccination," 2022, pp. 147–173. doi: 10.1007/978-1-0716-1888-2_9.
[25] Anthony E. Ellis, "Fish Vaccination," *Elsevier Science Publishing Co Inc*, 1988.
[26] J. Ma, T. J. Bruce, E. M. Jones, and K. D. Cain, "A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches," *Microorganisms*, vol. 7, no. 11. MDPI AG, Nov. 01, 2019. doi: 10.3390/microorganisms7110569.
[27] A. Adams, "Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 90, pp. 210–214, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.066.
[28] Y. Du, X. Hu, L. Miao, and J. Chen, "Current status and development prospects of aquatic vaccines," *Frontiers in Immunology*, vol. 13. Frontiers Media S.A., Nov. 10, 2022. doi: 10.3389/fimmu.2022.1040336.
[29] E. Gomez-Casado, A. Estepa, and J. M. Coll, "A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines," *Vaccine*, vol. 29, no. 15. pp. 2657–2671, Mar. 24, 2011. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.097.
[30] T. A. Jose Priya and S. Kappalli, "Modern biotechnological strategies for vaccine development in aquaculture – Prospects and challenges," *Vaccine*, vol. 40, no. 41, pp. 5873–5881, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.vaccine.2022.08.075.
[31] M. Dadar *et al.*, "Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends," *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, vol. 25, no. 3. Taylor and Francis Inc., pp. 184–217, Jul. 03, 2017. doi: 10.1080/23308249.2016.1261277.
[32] K. P. Plant and S. E. LaPatra, "Advances in fish vaccine delivery," *Dev Comp Immunol*, vol. 35, no. 12, pp. 1256–1262, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.dci.2011.03.007.
[33] R. P. E. Yanong, "Viral Diseases in Aquaculture MSD MANUAL Veterinary Manual," 2022. Accessed: Feb. 28, 2024. [Online]. Available: https://www.msdvetmanual.com/exotic-and-laboratory-animals/aquaculture/viral-diseases-in-aquaculture
[34] A. Assefa and F. Abunna, "Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish," *Veterinary Medicine International*, vol. 2018. Hindawi Limited, 2018. doi: 10.1155/2018/5432497.
[35] M. M. Levine and M. B. Sztein, "Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology," *Nat Immunol*, vol. 5, no. 5, pp. 460–464, May 2004, doi: 10.1038/ni0504-460.
[36] Ø. Evensen and J. A. C. Leong, "DNA vaccines against viral diseases of farmed fish," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 35, no. 6, pp. 1751–1758, 2013, doi: 10.1016/j.fsi.2013.10.021.

[37] M. Hansson, P. Nygren, and S. Sta˚hl, “Design and production of recombinant subunit vaccines,” *Biotechnol Appl Biochem*, vol. 32, no. 2, pp. 95–107, Oct. 2000, doi: 10.1042/ba20000034.
[38] C. J. Secombes, “Cytokines and Immunity,” in *Principles of Fish Immunology*, Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 301–353. doi: 10.1007/978-3-030-85420-1_10.
[39] S. Nooraei *et al.*, “Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers,” *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 19, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2021. doi: 10.1186/s12951-021-00806-7.
[40] K. H. Jeong, H. J. Kim, and H. J. Kim, “Current status and future directions of fish vaccines employing virus-like particles,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 100, pp. 49–57, May 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.02.060.
[41] N. Lorenzen and S. Lapatra, “Vacunas de ADN para peces de vivero,” *Revue Scientifique et Technique de l’OIE*, vol. 24, no. 1, pp. 201–213, Apr. 2005, doi: 10.20506/rst.24.1.1565.
[42] M. Guo and C. Li, “An overview of cytokine used as adjuvants in fish: current state and future trends,” *Reviews in Aquaculture*, vol. 13, no. 2. John Wiley and Sons Inc, pp. 996–1014, Mar. 01, 2021. doi: 10.1111/raq.12509.
[43] C. M. S. Ribeiro and V. E. J. C. Schijns, “Immunology of Vaccine Adjuvants,” 2010, pp. 1–14. doi: 10.1007/978-1-60761-585-9_1.
[44] M. Makesh and K. V. Rajendran, *Fish immune system and vaccines*. Springer Nature, 2022. doi: 10.1007/978-981-19-1268-9.
[45] J. Y. Hwang, M. G. Kwon, Y. J. Kim, S. H. Jung, M. A. Park, and M. H. Son, “Montanide IMS 1312 VG adjuvant enhances the efficacy of immersion vaccine of inactivated viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in olive flounder, Paralichthys olivaceus,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 60, pp. 420–425, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.fsi.2016.12.011.
[46] F. Sun, J. Zhou, Y. Zhang, Q. Liu, Q. Wang, and X. Liu, “A compound ginseng stem leaf saponins and aluminium adjuvant enhances the potency of inactivated Aeromonas salmonicida vaccine in turbot,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 128, pp. 60–66, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.fsi.2022.07.027.
[47] H. M. Munang’andu, I. Salinas, C. Tafalla, and R. A. Dalmo, “Editorial: Vaccines and Immunostimulants for Finfish,” *Frontiers in Immunology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Sep. 29, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.573771.
[48] N. Jimenez, J. Coll, F. J. Salguero, and C. Tafalla, “Co-injection of interleukin 8 with the glycoprotein gene from viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) modulates the cytokine response in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss),” *Vaccine*, vol. 24, no. 27–28, pp. 5615–5626, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.04.061.
[49] H. L. Thim *et al.*, “Immunoprotective activity of a Salmonid Alphavirus Vaccine: Comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I:C alone or combined with an oil adjuvant,” *Vaccine*, vol. 30, no. 32, pp. 4828–4834, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.05.010.
[50] H. L. Thim *et al.*, “Vaccine adjuvants in fish vaccines make a difference: Comparing three adjuvants (Montanide ISA763A oil, CpG/poly I:C combo and VHSV glycoprotein) alone or in combination formulated with an inactivated whole salmonid alphavirus antigen,” *Vaccines (Basel)*, vol. 2, no. 2, pp. 228–251, Mar. 2014, doi: 10.3390/vaccines2020228.
[51] A. G. Jarnicki *et al.*, “Attenuating Regulatory T Cell Induction by TLR Agonists through Inhibition of p38 MAPK Signaling in Dendritic Cells Enhances Their Efficacy as Vaccine Adjuvants and Cancer Immunotherapeutics 1,” 2008. [Online]. Available: http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/180/6/3797/982853/zim00608003797.pdf
[52] H. L. Weiner, A. P. da Cunha, F. Quintana, and H. Wu, “Oral tolerance,” *Immunol Rev*, vol. 241, no. 1, pp. 241–259, May 2011, doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x.
[53] S. Mutoloki, H. M. Munang’andu, and Ø. Evensen, “Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake, and immune induction,” *Front Immunol*, vol. 6, no. OCT, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00519.

[54] P. T. Lee, F. Y. Yamamoto, C. F. Low, J. Y. Loh, and C. M. Chong, "Gut Immune System and the Implications of Oral-Administered Immunoprophylaxis in Finfish Aquaculture," *Frontiers in Immunology*, vol. 12. Frontiers Media S.A., Dec. 16, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.773193.

[55] J. H. W. M. Rombout, H. B. T. Huttenhuis, S. Picchietti, and G. Scapigliati, "Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 19, no. 5 SPEC. ISS., pp. 441–455, 2005, doi: 10.1016/j.fsi.2005.03.007.

[56] G. A. Davidson, A. E. Ellis, and C. J. Secombes, "A preliminary investigation into the phenomenon of oral tolerance in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1792)," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 4, no. 2, pp. 141–151, Mar. 1994, doi: 10.1006/fsim.1994.1012.

[57] I. Tobar *et al.*, "Successive oral immunizations against Piscirickettsia salmonis and infectious salmon anemia virus are required to maintain a long-term protection in farmed salmonids," *Front Immunol*, vol. 6, no. MAY, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00244.

[58] D. Gonzalez-Silvera, F. A. Guardiola, C. Espinosa, E. Chaves-Pozo, M. Á. Esteban, and A. Cuesta, "Recombinant nodavirus vaccine produced in bacteria and administered without purification elicits humoral immunity and protects European sea bass against infection," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 88, pp. 458–463, May 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.03.013.

[59] P. H. M. Joosten, "Immunological aspects of oral vaccination in fish," Wageningen University, 1997. Accessed: Feb. 29, 2024. [Online]. Available: https://library.wur.nl/WebQuery/wda/abstract/941236

[60] K. A. Johnson and D. F. Amend, "EflScacy of Vibrio anguillarum and Yersinia ruckeri bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids," 1983.

[61] M. Caruffo, C. Maturana, S. Kambalapally, J. Larenas, and J. A. Tobar, "Protective oral vaccination against infectious salmon anaemia virus in Salmo salar," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 54, pp. 54–59, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.fsi.2016.03.009.

[62] T. H. Mogensen, "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 22, no. 2. pp. 240–273, Apr. 2009. doi: 10.1128/CMR.00046-08.

[63] Abul K. Abbas & Andrew H. Lichtman & Shiv Pillai, *Cellular and Molecular Immunology, 9th Edition*, Ninth edition. Elsevier, Philadelphia, PA., 2017.

[64] D. M. Mokhtar, G. Zaccone, A. Alesci, M. Kuciel, M. T. Hussein, and R. K. A. Sayed, "Main Components of Fish Immunity: An Overview of the Fish Immune System," *Fishes*, vol. 8, no. 2, p. 93, Feb. 2023, doi: 10.3390/fishes8020093.

[65] R. A. Dalmo and J. Bøgwald, "Innate Immunity," in *Principles of Fish Immunology*, Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 31–103. doi: 10.1007/978-3-030-85420-1_2.

[66] I. Salinas, Y. A. Zhang, and J. O. Sunyer, "Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish," *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 35, no. 12. pp. 1346–1365, Dec. 2011. doi: 10.1016/j.dci.2011.11.009.

[67] I. Salinas, "The mucosal immune system of teleost fish," *Biology*, vol. 4, no. 3. MDPI AG, pp. 525–539, Jul. 31, 2015. doi: 10.3390/biology4030525.

[68] T. J. Kindt and R. A. Goldsby, "Inmunología de Kuby, Sexta edición," 2020. Accessed: Mar. 08, 2024. [Online]. Available: https://oncouasd.files.wordpress.com/2015/06/inmunologia.pdf

[69] T. Aoki, J. ichi Hikima, S. D. Hwang, and T. S. Jung, "Innate immunity of finfish: Primordial conservation and function of viral RNA sensors in teleosts," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 35, no. 6, pp. 1689–1702, 2013, doi: 10.1016/j.fsi.2013.02.005.

[70] S. Boltaña, N. Roher, F. W. Goetz, and S. A. MacKenzie, "PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish," *Dev Comp Immunol*, vol. 35, no. 12, pp. 1195–1203, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.dci.2011.02.010.

[71] B. Magnadóttir, "Innate immunity of fish (overview)," in *Fish and Shellfish Immunology*, Academic Press, 2006, pp. 137–151. doi: 10.1016/j.fsi.2004.09.006.

[72] C. Uribe, H. Folch, R. Enriquez, and G. Moran, "Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review," 2011.

[73] R. Sinha, “Macrophage: A Key Player of Teleost Immune System,” in *Macrophages - Celebrating 140 Years of Discovery*, IntechOpen, 2022. doi: 10.5772/intechopen.103804.
[74] M. Joerink, C. M. S. Ribeiro, R. J. M. Stet, T. Hermsen, H. F. J. Savelkoul, and G. F. Wiegertjes, “Head Kidney-Derived Macrophages of Common Carp (Cyprinus carpio L.) Show Plasticity and Functional Polarization upon Differential Stimulation,” *The Journal of Immunology*, vol. 177, no. 1, pp. 61–69, Jul. 2006, doi: 10.4049/jimmunol.177.1.61.
[75] P. Ruytinx, P. Proost, J. Van Damme, and S. Struyf, “Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions,” *Front Immunol*, vol. 9, Sep. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01930.
[76] M. Maciuszek, K. Klak, L. Rydz, B. M. L. Verburg-van Kemenade, and M. Chadzinska, “Cortisol Metabolism in Carp Macrophages: A Role for Macrophage-Derived Cortisol in M1/M2 Polarization,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 23, p. 8954, Nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21238954.
[77] F. O. Martinez and S. Gordon, “The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment,” *F1000Prime Rep*, vol. 6, Mar. 2014, doi: 10.12703/P6-13.
[78] S. K. Biswas, A. Sica, and C. E. Lewis, “Plasticity of Macrophage Function during Tumor Progression: Regulation by Distinct Molecular Mechanisms,” *The Journal of Immunology*, vol. 180, no. 4, pp. 2011–2017, Feb. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2011.
[79] P. J. Murray and T. A. Wynn, “Protective and pathogenic functions of macrophage subsets,” *Nat Rev Immunol*, vol. 11, no. 11, pp. 723–737, Nov. 2011, doi: 10.1038/nri3073.
[80] B. Abós, C. Bailey, and C. Tafalla, “Adaptive Immunity,” in *Principles of Fish Immunology*, Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 105–140. doi: 10.1007/978-3-030-85420-1_3.
[81] T. Nakanishi, Y. Shibasaki, and Y. Matsuura, “T Cells in Fish,” *Biology (Basel)*, vol. 4, no. 4, pp. 640–663, Sep. 2015, doi: 10.3390/biology4040640.
[82] U. Fischer, E. O. Koppang, and T. Nakanishi, “Teleost T and NK cell immunity,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 35, no. 2, pp. 197–206, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.fsi.2013.04.018.
[83] K. Utke *et al.*, “Cell-mediated immune responses in rainbow trout after DNA immunization against the viral hemorrhagic septicemia virus,” *Dev Comp Immunol*, vol. 32, no. 3, pp. 239–252, 2008, doi: 10.1016/j.dci.2007.05.010.
[84] T. Wang and C. J. Secombes, “The cytokine networks of adaptive immunity in fish,” *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 35, no. 6. Academic Press, pp. 1703–1718, 2013. doi: 10.1016/j.fsi.2013.08.030.
[85] L. Zhou, M. M. W. Chong, and D. R. Littman, “Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation,” *Immunity*, vol. 30, no. 5. pp. 646–655, May 22, 2009. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.001.
[86] J. Zou and C. J. Secombes, “Teleost fish interferons and their role in immunity,” *Dev Comp Immunol*, vol. 35, no. 12, pp. 1376–1387, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.dci.2011.07.001.
[87] J. Zou and C. J. Secombes, “The function of fish cytokines,” *Biology*, vol. 5, no. 2. MDPI AG, Jun. 01, 2016. doi: 10.3390/biology5020023.
[88] M. Sakai, J. ichi Hikima, and T. Kono, “Fish cytokines: current research and applications,” *Fisheries Science*, vol. 87, no. 1. Springer Japan, Jan. 01, 2021. doi: 10.1007/s12562-020-01476-4.
[89] S. Reyes-Cerpa, K. Maisey, F. Reyes-Lpez, D. Toro-Ascuy, A. Mara, and M. Imarai, “Fish Cytokines and Immune Response,” in *New Advances and Contributions to Fish Biology*, InTech, 2012. doi: 10.5772/53504.
[90] J. A. Chabalgoity, A. Baz, A. Rial, and S. Grille, “The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines,” *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 18, no. 1–2, pp. 195–207, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.cytogfr.2007.01.016.
[91] H. Yamane and W. E. Paul, “Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets,” *Immunol Rev*, vol. 252, no. 1, pp. 12–23, Mar. 2013, doi: 10.1111/imr.12032.

[92] J. Zou *et al.*, “Identification and Bioactivities of IFN-γ in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss): The First Th1-Type Cytokine Characterized Functionally in Fish,” *The Journal of Immunology*, vol. 175, no. 4, pp. 2484–2494, Aug. 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2484.
[93] Z. Gan, S. N. Chen, B. Huang, J. Zou, and P. Nie, “Fish type I and type II interferons: composition, receptor usage, production and function,” *Reviews in Aquaculture*, vol. 12, no. 2. Wiley-Blackwell, pp. 773–804, May 01, 2020. doi: 10.1111/raq.12349.
[94] P. Pereiro, A. Figueras, and B. Novoa, “Insights into teleost interferon-gamma biology: An update,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 90, pp. 150–164, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.002.
[95] C. H. Kim and J.-A. Leong, “FISH VIRUSES,” in *Encyclopedia of Virology*, Elsevier, 1999, pp. 558–568. doi: 10.1006/rwvi.1999.0100.
[96] B. T. Rouse and S. Sehrawat, “Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome?,” *Nat Rev Immunol*, vol. 10, no. 7, pp. 514–526, Jul. 2010, doi: 10.1038/nri2802.
[97] A. O. Kordon, L. Pinchuk, and A. Karsi, “Adaptive Immune System in Fish,” *Turk J Fish Aquat Sci*, vol. 22, no. 4, Nov. 2021, doi: 10.4194/TRJFAS20235.
[98] M. del M. Ortega-Villaizan, V. Chico, and L. Perez, “Fish Innate Immune Response to Viral Infection—An Overview of Five Major Antiviral Genes,” *Viruses*, vol. 14, no. 7. MDPI, Jul. 01, 2022. doi: 10.3390/v14071546.
[99] S. Li *et al.*, “The P Protein of Spring Viremia of Carp Virus Negatively Regulates the Fish Interferon Response by Inhibiting the Kinase Activity of TANK-Binding Kinase 1,” *J Virol*, vol. 90, no. 23, pp. 10728–10737, Dec. 2016, doi: 10.1128/jvi.01381-16.
[100] P. Pereiro, M. M. Costa, P. Díaz-Rosales, S. Dios, A. Figueras, and B. Novoa, “The first characterization of two type I interferons in turbot (Scophthalmus maximus) reveals their differential role, expression pattern and gene induction,” *Dev Comp Immunol*, vol. 45, no. 2, pp. 233–244, 2014, doi: 10.1016/j.dci.2014.03.006.
[101] R. Thwaite *et al.*, “Protein Nanoparticles Made of Recombinant Viral Antigens: A Promising Biomaterial for Oral Delivery of Fish Prophylactics,” *Front Immunol*, vol. 9, Jul. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01652.
[102] B. Robertsen, “The interferon system of teleost fish,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 20, no. 2, pp. 172–191, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.fsi.2005.01.010.
[103] B. Sun, I. Skjæveland, T. Svingerud, J. Zou, J. Jørgensen, and B. Robertsen, “Antiviral Activity of Salmonid Gamma Interferon against Infectious Pancreatic Necrosis Virus and Salmonid Alphavirus and Its Dependency on Type I Interferon,” *J Virol*, vol. 85, no. 17, pp. 9188–9198, Sep. 2011, doi: 10.1128/jvi.00319-11.
[104] K. Schroder, P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume, “Interferon-γ: an overview of signals, mechanisms and functions,” *J Leukoc Biol*, vol. 75, no. 2, pp. 163–189, Feb. 2004, doi: 10.1189/jlb.0603252.
[105] J. D. Burke and H. A. Young, “IFN-γ: A cytokine at the right time, is in the right place,” *Semin Immunol*, vol. 43, p. 101280, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.smim.2019.05.002.
[106] J. R. Schoenborn and C. B. Wilson, “Regulation of Interferon-γ During Innate and Adaptive Immune Responses,” *Advances in Immunology*, vol. 96. pp. 41–101, 2007. doi: 10.1016/S0065-2776(07)96002-2.
[107] X. Hu and L. B. Ivashkiv, “Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon-γ: Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases,” *Immunity*, vol. 31, no. 4, pp. 539–550, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.immuni.2009.09.002.
[108] C. Y. Jung *et al.*, “Recombinant interferon-γ activates immune responses against Edwardsiella tarda infection in the olive flounder, Paralichthys olivaceus,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 33, no. 2, pp. 197–203, 2012, doi: 10.1016/j.fsi.2012.04.015.
[109] S. X. Zamora-Salas, M. L. Robles-Villarruel, M. Macías-Silva, M. E. Álvarez-Sánchez, and Á. C. Tecalco-Cruz, “Interferón-gamma: vías de señalización y sus implicaciones en el cáncer,” *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 26, Feb. 2023, doi: 10.22201/fesz.23958723e.2023.533.

[110] N. F. Neel, E. Schutyser, J. Sai, G.-H. Fan, and A. Richmond, “Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking,” *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 16, no. 6, pp. 637–658, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.008.
[111] J. Zou, A. K. Redmond, Z. Qi, H. Dooley, and C. J. Secombes, “The CXC chemokine receptors of fish: Insights into CXCR evolution in the vertebrates,” *Gen Comp Endocrinol*, vol. 215, pp. 117–131, May 2015, doi: 10.1016/j.ygcen.2015.01.004.
[112] U. Grimholt, H. Hauge, A. G. Hauge, J. Leong, and B. F. Koop, “Chemokine receptors in Atlantic salmon,” *Dev Comp Immunol*, vol. 49, no. 1, pp. 79–95, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.dci.2014.11.009.
[113] M. Szpakowska, V. Fievez, K. Arumugan, N. van Nuland, J.-C. Schmit, and A. Chevigné, “Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors,” *Biochem Pharmacol*, vol. 84, no. 10, pp. 1366–1380, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.bcp.2012.08.008.
[114] L. Vangelista and S. Vento, “The expanding therapeutic perspective of CCR5 blockade,” *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. JAN. Frontiers Media S.A., Jan. 12, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2017.01981.
[115] A. D. Luster, “Chemokines regulate lymphocyte homing to the intestinal mucosa,” *Gastroenterology*, vol. 120, no. 1, pp. 291–294, Jan. 2001, doi: 10.1053/gast.2001.21403.
[116] C. E. Hughes and R. J. B. Nibbs, “A guide to chemokines and their receptors,” *FEBS Journal*, vol. 285, no. 16. Blackwell Publishing Ltd, pp. 2944–2971, Aug. 01, 2018. doi: 10.1111/febs.14466.
[117] J. E. Pease and T. J. Williams, “Chemokines,” in *Asthma and COPD*, Elsevier, 2009, pp. 313–325. doi: 10.1016/B978-0-12-374001-4.00026-2.
[118] P. M. Murphy, “Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry,” *Nat Immunol*, vol. 2, no. 2, pp. 116–122, Feb. 2001, doi: 10.1038/84214.
[119] M. Oppermann, “Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation,” *Cell Signal*, vol. 16, no. 11, pp. 1201–1210, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.cellsig.2004.04.007.
[120] H. Gaertner *et al.*, “Highly potent, fully recombinant anti-HIV chemokines: Reengineering a low-cost microbicide,” 2008. [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/content/full/
[121] H. Xu and F. Liu, “Advances in chemokines of teleost fish species,” *Aquaculture and Fisheries*. KeAi Communications Co., Mar. 01, 2023. doi: 10.1016/j.aaf.2023.01.008.
[122] C. Q. Chu, X. J. Lu, C. H. Li, and J. Chen, “Molecular characterization of a CXCL8-like protein from ayu and its effect on chemotaxis of neutrophils and monocytes/macrophages,” *Gene*, vol. 548, no. 1, pp. 48–55, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.gene.2014.07.006.
[123] E. Muñoz-Atienza *et al.*, “CK11, a Teleost Chemokine with a Potent Antimicrobial Activity,” *The Journal of Immunology*, vol. 202, no. 3, pp. 857–870, Feb. 2019, doi: 10.4049/jimmunol.1800568.
[124] Z. Qi, J. W. Holland, Y. Jiang, C. J. Secombes, P. Nie, and T. Wang, “Molecular characterization and expression analysis of four fish-specific CC chemokine receptors CCR4La, CCR4Lc1, CCR4Lc2 and CCR11 in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss),” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 68, pp. 411–427, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.fsi.2017.07.031.
[125] J. Xing, H. fei Tian, X. qian Tang, X. zhen Sheng, and W. bin Zhan, “Kinetics of T lymphocyte subsets and B lymphocytes in response to immunostimulants in flounder (Paralichthys olivaceus): implications for CD4+ T lymphocyte differentiation,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-69542-6.
[126] T. Wang *et al.*, “First in-depth analysis of the novel Th2-type cytokines in salmonid fish reveals distinct patterns of expression and modulation but overlapping bioactivities,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 10, pp. 10917–10946, Mar. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7295.
[127] D. Rodríguez-Pinto, “B cells as antigen presenting cells,” *Cellular Immunology*, vol. 238, no. 2. pp. 67–75, Dec. 2005. doi: 10.1016/j.cellimm.2006.02.005.
[128] X.-J. Zhang *et al.*, “B Cell Functions Can Be Modulated by Antimicrobial Peptides in Rainbow Trout Oncorhynchus mykiss: Novel Insights into the Innate Nature of B Cells in Fish,” *Front Immunol*, vol. 8, Apr. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.00388.

[129] J. Li *et al.*, “B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities,” *Nat Immunol*, vol. 7, no. 10, pp. 1116–1124, Oct. 2006, doi: 10.1038/ni1389.
[130] F. E. Lund and T. D. Randall, “Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity,” *Nat Rev Immunol*, vol. 10, no. 4, pp. 236–247, Apr. 2010, doi: 10.1038/nri2729.
[131] S. Fillatreau, “Regulatory functions of B cells and regulatory plasma cells,” *Biomed J*, vol. 42, no. 4, pp. 233–242, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.bj.2019.05.008.
[132] I. Salinas and D. Parra, “Fish mucosal immunity: intestine,” 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-417186-2/00006-6.
[133] Y. Yu, Q. Wang, Z. Huang, L. Ding, and Z. Xu, “Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish,” *Frontiers in Immunology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Oct. 02, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.567941.
[134] D. Parra, T. Korytář, F. Takizawa, and J. Oriol Sunyer, “B cells and their role in the teleost gut,” 2016.
[135] D. Porter, D. Peggs, C. McGurk, and S. A. M. Martin, “Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT) primary cells and stable cell lines as predictive models for intestinal health in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss),” *Front Immunol*, vol. 13, Oct. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.1023235.
[136] A. E. Ellis, “Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria,” *Dev Comp Immunol*, vol. 25, no. 8–9, pp. 827–839, Oct. 2001, doi: 10.1016/S0145-305X(01)00038-6.
[137] D. Gomez, J. O. Sunyer, and I. Salinas, “The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens,” *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 35, no. 6. Academic Press, pp. 1729–1739, 2013. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.032.
[138] F. Jutfelt, “Barrier function of the gut,” *Encyclopedia of Fish Physiology. From Genome to Environment, volume 2, pp. 1322-1331. San Diego: Academic Press.*, 2011, doi: 10.1016/B978-0-1237-4553-8.00068-X.
[139] C. Tafalla, E. Leal, T. Yamaguchi, and U. Fischer, “T cell immunity in the teleost digestive tract,” *Dev Comp Immunol*, vol. 64, pp. 167–177, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.dci.2016.02.019.
[140] N. A. Ballesteros, R. Castro, B. Abos, S. S. Rodríguez Saint-Jean, S. I. Pérez-Prieto, and C. Tafalla, “The Pyloric Caeca Area Is a Major Site for IgM+ and IgT+ B Cell Recruitment in Response to Oral Vaccination in Rainbow Trout,” *PLoS One*, vol. 8, no. 6, Jun. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0066118.
[141] I. Salinas, Á. Fernández-Montero, Y. Ding, and J. O. Sunyer, “Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances,” *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 121. Elsevier Ltd, Aug. 01, 2021. doi: 10.1016/j.dci.2021.104079.
[142] J. O. Sunyer and P. Boudinot, “B-Cell Responses and Antibody Repertoires in Teleost Fish: From Ag Receptor Diversity to Immune Memory and Vaccine Development,” in *Principles of Fish Immunology*, Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 253–278. doi: 10.1007/978-3-030-85420-1_8.
[143] E. S. Bromage, I. M. Kaattari, P. Zwollo, and S. L. Kaattari, “Plasmablast and Plasma Cell Production and Distribution in Trout Immune Tissues 1,” 2004. [Online]. Available: http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/173/12/7317/1181716/7317.pdf
[144] P. Zwollo, S. Cole, E. Bromage, and S. Kaattari, “B Cell Heterogeneity in the Teleost Kidney: Evidence for a Maturation Gradient from Anterior to Posterior Kidney,” *The Journal of Immunology*, vol. 174, no. 11, pp. 6608–6616, Jun. 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.11.6608.
[145] M. Mendoza and S. Magadán, “Immunoglobulins in Teleost,” in *Principles of Fish Immunology: From Cells and Molecules to Host Protection*, Springer International Publishing, 2022, pp. 229–252. doi: 10.1007/978-3-030-85420-1_7.
[146] F. Hatten, Å. Fredriksen, I. Hordvik, and C. Endresen, “Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, Salmo salar. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 11, no. 3, pp. 257–268, Apr. 2001, doi: 10.1006/fsim.2000.0313.

[147] S. T. Solem and J. Stenvik, "Antibody repertoire development in teleosts—a review with emphasis on salmonids and Gadus morhua L," *Dev Comp Immunol*, vol. 30, no. 1–2, pp. 57–76, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.dci.2005.06.007.
[148] Y. A. Zhang *et al.*, "IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity," *Nat Immunol*, vol. 11, no. 9, pp. 827–835, Sep. 2010, doi: 10.1038/ni.1913.
[149] J. fei Ji *et al.*, "Differential immune responses of immunoglobulin Z subclass members in antibacterial immunity in a zebrafish model," *Immunology*, vol. 162, no. 1, pp. 105–120, Jan. 2021, doi: 10.1111/imm.13269.
[150] Z. Xu *et al.*, "Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 32, pp. 13097–13102, Aug. 2013, doi: 10.1073/pnas.1304319110.
[151] L. Tacchi *et al.*, "Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates," *Nat Commun*, vol. 5, Oct. 2014, doi: 10.1038/ncomms6205.
[152] Z. Xu *et al.*, "Mucosal immunoglobulins at respiratory surfaces mark an ancient association that predates the emergence of tetrapods," *Nat Commun*, vol. 7, Feb. 2016, doi: 10.1038/ncomms10728.
[153] P. Perdiguero *et al.*, "Teleost IgD+IgM− B Cells Mount Clonally Expanded and Mildly Mutated Intestinal IgD Responses in the Absence of Lymphoid Follicles," *Cell Rep*, vol. 29, no. 13, pp. 4223-4235.e5, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.101.
[154] J. Galindo-Villegas, D. Garciá-Moreno, S. De Oliveira, J. Meseguer, and V. Mulero, "Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebrafish development," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 39, Sep. 2012, doi: 10.1073/pnas.1209920109.
[155] M. M. Carrió, J. L. Corchero, and A. Villaverde, "Dynamics of in vivo protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 169, no. 1, pp. 9–15, Dec. 1998, doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13292.x.
[156] G. A. Bowden, A. M. Paredes, and G. Georgiou, "Structure and Morphology of Protein Inclusion Bodies in Escherichia Coli," *Nat Biotechnol*, vol. 9, no. 8, pp. 725–730, Aug. 1991, doi: 10.1038/nbt0891-725.
[157] G. Taylor, M. Hoare, D. R. Gray, and F. A. O. Marston, "Size and Density of Protein Inclusion Bodies," *Nat Biotechnol*, vol. 4, no. 6, pp. 553–557, Jun. 1986, doi: 10.1038/nbt0686-553.
[158] N. S. De Groot, A. Espargarö, M. Morell, and S. Ventura, "Studies on bacterial inclusion bodies," *Future Microbiology*, vol. 3, no. 4. pp. 423–435, Aug. 2008. doi: 10.2217/17460913.3.4.423.
[159] E. Rodríguez-Carmona, O. Cano-Garrido, J. Seras-Franzoso, A. Villaverde, and E. García-Fruitós, "Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies," *Microb Cell Fact*, vol. 9, no. 1, p. 71, Dec. 2010, doi: 10.1186/1475-2859-9-71.
[160] M. Martínez-Alonso, N. González-Montalbán, E. García-Fruitós, and A. Villaverde, "Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies," *Microb Cell Fact*, vol. 8, no. 1, p. 4, Dec. 2009, doi: 10.1186/1475-2859-8-4.
[161] E. García-Fruitós, "Inclusion bodies: a new concept," *Microb Cell Fact*, vol. 9, no. 1, p. 80, 2010, doi: 10.1186/1475-2859-9-80.
[162] E. García-Fruitós *et al.*, "Bacterial inclusion bodies: making gold from waste," *Trends Biotechnol*, vol. 30, no. 2, pp. 65–70, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.tibtech.2011.09.003.
[163] U. Rinas, E. Garcia-Fruitós, J. L. Corchero, E. Vázquez, J. Seras-Franzoso, and A. Villaverde, "Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half," *Trends Biochem Sci*, vol. 42, no. 9, pp. 726–737, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.tibs.2017.01.005.
[164] D. Torrealba *et al.*, "Nanostructured recombinant cytokines: A highly stable alternative to short-lived prophylactics," *Biomaterials*, vol. 107, pp. 102–114, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.043.
[165] D. Torrealba *et al.*, "Complex Particulate Biomaterials as Immunostimulant-Delivery Platforms," *PLoS One*, vol. 11, no. 10, p. e0164073, Oct. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0164073.

[166] R. Thwaite *et al.*, "Nanostructured recombinant protein particles raise specific antibodies against the nodavirus NNV coat protein in sole," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 99, pp. 578–586, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.02.029.
[167] F. Baneyx and M. Mujacic, "Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli," *Nat Biotechnol*, vol. 22, no. 11, pp. 1399–1408, Nov. 2004, doi: 10.1038/nbt1029.
[168] A. Ruyra *et al.*, "Targeting and stimulation of the zebrafish (Danio rerio) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes," *Vaccine*, vol. 32, no. 31, pp. 3955–3962, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.05.010.
[169] M. Rojas-Peña *et al.*, "How modular protein nanoparticles may expand the ability of subunit anti-viral vaccines: The spring viremia carp virus (SVCV) case," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 131, pp. 1051–1062, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.fsi.2022.10.067.
[170] M. L. Silvia Maria Doglia, *Protein Aggregation in Bacteria*. Wiley, 2014. doi: 10.1002/9781118845363.

OBJETIVOS GENERALES

JUSTIFICACIÓN

El aumento de la población mundial y el interés por alimentos sanos y seguros posiciona a la acuicultura como la industria proveedora de alimentos de mayor crecimiento. El aumento explosivo en la producción acuícola ha generado la ocurrencia y proliferación de enfermedades virales que no han podido ser controladas eficientemente. Existen pocas vacunas comerciales disponibles y la mayoría son administradas por inyección, que es un método económicamente costoso, que genera estrés, disminuye el bienestar animal, y puede consecuentemente afectar el crecimiento de los peces y generar pérdidas económicas considerables a los cultivadores. Por otra parte, las vacunas orales parecen solucionar estos problemas existiendo muy pocas disponibles, probablemente debido a que su diseño debe sortear la complejidad de evitar la degradación de la vacuna antes de llegar a la mucosa intestinal asegurando una estimulación potente del sistema inmune.

En el presente estudio, proponemos un nuevo enfoque profiláctico de plataforma de vacunación oral compuesto por módulos de nanopartículas de proteínas recombinantes basadas en cuerpos de inclusión (IBs) con características inmunoestimulantes para combatir enfermedades virales que afectan a peces de interés comercial, nanoestructuras inmunológicamente funcionales que no requieren encapsulación y tienen la ventaja de resistir condiciones ambientales adversas.

Hipótesis del proyecto de investigación: Las proteínas recombinantes de antígenos virales de SVCV e IPNV unidos a módulos de proteínas recombinantes inmunoestimulantes de interferón gamma o ligando inducen una mayor respuesta inmune que los antígenos virales sin IFN o ligando.

Objetivo principal de la tesis doctoral es determinar si las proteínas recombinantes nanoestructuradas de antígenos virales (SVCV-G3 e IPNV-VP2) combinadas con un módulo de proteína recombinante de interferón gamma (IFNγ) o molécula ligando (CCR5) con características inmunoestimulantes, pueden estimular la respuesta inmune local y sistémica en peces y protegerlos contra el virus de IPN y SVC. Para esto, hemos establecido y desarrollado los siguientes **objetivos específicos:**

Producir y purificar módulos nanoestructurados recombinantes de antígenos virales expresados como cuerpos de inclusión en *E. coli* del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) y el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) unido a un módulo de proteína recombinante de interferón gamma y/o molécula ligando.

Realizar la caracterización morfológica y medición morfométrica de las nanoestructuras antivirales recombinantes, y testear la estabilidad de las nanoestructuras evaluando la resistencia y cambios morfológicos en condiciones extremas de pH y temperatura.
Evaluar *in vitro* la internalización de las nanoestructuras y determinar la dosis y tiempo de respuesta de las vacunas modulares marcadas fluorescentemente en líneas celulares del hígado del pez cebra (ZFL), del epitelio intestinal de trucha arcoíris (RTgutGC) y en cultivos primarios de macrófagos del riñón anterior de trucha arcoíris (RT-HKM).

Evaluar *in vitro* la expresión de genes antivirales de respuesta inmune en células ZFL, células del epitelio intestinal (RTgutGC) y en macrófagos (RT-HKM) estimulados con las nanoestructuras modulares recombinantes.

Elaborar ensayos *in vivo* con larvas y peces cebra adultos expuestos a los módulos recombinantes de SVCV, donde se evalúa: 1) La internalización y toxicidad en larvas del pez cebra expuestas a las nanopartículas, 2) la expresión de marcadores de genes de respuesta inmune en larvas del pez cebra, 3) y el nivel de protección del módulo IFNγ en experimento de infección con peces cebra adultos desafiados con SVC virus.

Elaborar ensayos *in vivo* con trucha arcoíris juveniles expuestas a los módulos recombinantes de IPNV mediante intubación oral, donde se evalúa: 1) La capacidad de absorción de las nanopartículas en el epitelio intestinal y captación en el riñón anterior, 2) la expresión de marcadores de genes de respuesta inmune en poblaciones de células aisladas desde el intestino posterior, 3) la biodistribución y la expresión de genes marcadores de respuesta inmune innata y adaptativa en diferentes órganos linfoides, 4) y la expresión de anticuerpos específicos de IPN virus en suero de truchas intubadas con las vacunas modulares con IFNγ y ligando.

CAPITULO I

Proteínas modulares nanoestructuradas del virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) como vacuna antiviral oral

Vacuna subunitaria con propiedades inmunomoduladoras para proteger a ciprínidos

Capitulo basado en la publicación:

How modular protein nanoparticles may expand the ability of subunit anti-viral vaccines: The spring viremia carp virus (SVCV) case.

Rojas-Peña M, Aceituno P, Salvador ME, Garcia-Ordoñez M, Teles M, Ortega-Villaizan MDM, Perez L, Roher N. Fish Shellfish Immunol. 2022 Dec; 131:1051-1062. doi: 10.1016/j.fsi.2022.10.067. Epub 2022 Nov 9. PMID: 36371050.

RESUMEN

La viremia primaveral de la carpa (SVCV) es una enfermedad viral grave que afecta normalmente a juveniles de ciprínidos. Los peces en etapas juveniles son especialmente difíciles de vacunar. La administración oral de vacunas incluidas en el alimento podría ser el método de suministro ideal para minimizar el estrés por manipulación y los costos asociados a los procesos tradicionales de vacunación por inmersión e inyección. Sin embargo, la administración oral de vacunas incluidas en pienso conlleva inconvenientes relacionados con la degradación del antígeno y una débil correlación de protección de las vacunas. En el presente estudio, proponemos una plataforma vacunal basada en proteínas recombinantes (vacunas de subunidad) fabricadas como materiales nanoestructurados altamente resistente, y que proporciona excelentes niveles de protección frente al virus de la SVC en un desafío realizado por inyección intraperitoneal (i.p.). El dominio G3 de la glicoproteína G del SVCV fue sobre-expresada en *E. coli* junto con IFNγ del pez cebra y purificada a partir de agregados bacterianos (cuerpos de inclusión) como biomaterial nanoestructurado altamente organizado (Nanopellets, NPs). Los NPs del módulo SVCV interferón gamma (SVCV-IFN^{NP}) fueron exitosamente internalizados por las células del pez cebra (ZFL) y estimularon la expresión de diferentes marcadores antivirales y de interferón gamma (por ejemplo, Vig-1, Mx, Lmp-2 o IFNGR1, entre otros) en cultivos celulares del hígado del pez cebra (ZFL). Para evaluar si SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} pueden ser internalizados por el epitelio intestinal e inducir una respuesta antiviral, realizamos experimentos con SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} en larvas de pez cebra de 3 días post-fecundación (dpf). Tanto SVCV^{NP} como SVCV-IFN^{NP} fueron absorbidos y acumulados en el intestino sin signos de toxicidad. La respuesta antiviral en larvas mostró un patrón de inducción diferente: SVCV-IFN^{NP} no indujo una respuesta antiviral mientras que SVCV^{NP} mostró una buena inducción antiviral. Curiosamente, una línea celular derivada de embriones del pez cebra (ZF4), mostró una respuesta antiviral como las células ZFL, aunque el Lmp-2 y el IFNGR1 (marcadores de la respuesta IFNγ) no se sobre expresaron. Experimentos de infección *in vivo* realizados con peces cebra adultos indicaron un excelente nivel de protección contra el virus de SVC, en la que los peces vacunados con SVCV-IFN^{NP} alcanzaron una mortalidad acumulada del 20%, en contraste a los peces control, que alcanzaron un 80% de mortalidad acumulada.

1. INTRODUCCIÓN

La viremia primaveral de la carpa (SVCV) es una enfermedad viral infecciosa común en la carpa (*C. carpio*) y en otras especies de peces ciprínidos como el pez cebra (*Danio rerio*), la carpa koi (*Cyprinus carpio koi*), la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), la carpa dorada (*Carassius auratus*) o la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), entre otros, causada por el virus de SVC

(SVCV). El SVCV es un miembro de la familia Rhabdoviridae, con ssRNA de sentido negativo que codifica cinco proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), glicoproteína (G) y polimerasa dependiente de ARN (L). La proteína G es la proteína antigénica viral más importante y determina la infectividad y las propiedades serológicas del virus [1]. En la **Figura 1** se muestra un esquema de la estructura y el genoma de SVCV [1].

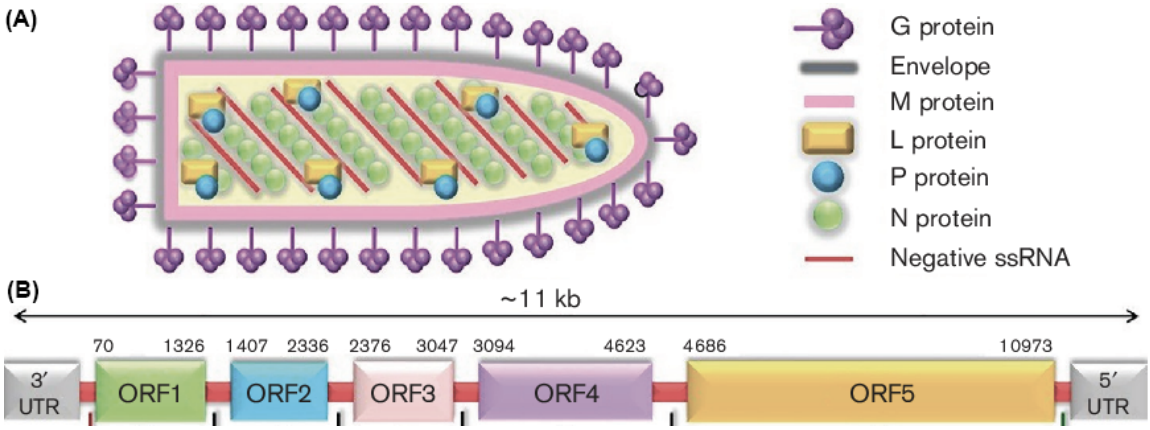


Figura 1. Esquema del SVCV y su genoma. (**A**) Modelo de estructura viral. (**B**) Organización del genoma que muestra proteínas codificadas, uniones genéticas y regiones líderes y de remolque. Los números indican las posiciones de inicio y final de los respectivos ORF. Modificado de [1].

Los enfoques terapéuticos o profilácticos para combatir el SVCV han sido ineficaces y actualmente no se dispone de ninguna vacuna comercial. La expansión geográfica y el rango de infección del SVCV supone una gran amenaza no solo para las piscifactorías y las industrias de peces ornamentales, sino también para las poblaciones de peces salvajes [2]. Los brotes de SVC virus pueden alcanzar el 90% de mortalidad en peces juveniles y, aunque no hay vacunas aprobadas para el SVC, se han probado en ensayos experimentales vacunas inactivadas, vivas atenuadas, de ADN o de otro tipo [1, 3, 4]. Sin embargo, las vacunas atenuadas plantean un ligero riesgo, ya que se han dado casos excepcionales en los que las cepas atenuadas pueden revertir a patógenas y causar la enfermedad [5], y en el caso de las vacunas de ADN los problemas de seguridad están relacionados con el uso de vectores de ADN. En este contexto, las vacunas de subunidades no presentan ninguno de estos problemas de seguridad, ya que no contienen material genético exógeno. Los inconvenientes de las vacunas de subunidades son que tienen una alta susceptibilidad a la degradación de la proteína (sistema lábil) y la falta de patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMPs) que el sistema inmunitario utiliza para reconocer patógenos a través de receptores de reconocimiento de patrones (*Pathogen Recognition Receptors*, PRR), por lo que se necesitan adyuvantes con actividad coestimuladora para aumentar la magnitud de la respuesta inmunitaria [5].

En este estudio, hemos diseñado una plataforma de vacunación basada en un módulo proteico antigénico altamente estable (proteína del fragmento G) con propiedades adyuvantes incluidas en la vacuna (proteína modular de IFNγ). En 1957, los IFN se describieron originalmente como moléculas que "interferían" con la replicación viral [6]. Desde entonces, se han caracterizado dos tipos de IFNs, (tipo I y tipo II) en varias especies de peces. Dentro de los IFNs de peces de tipo II sólo se han descrito dos miembros, IFNγ e IFN-γrel, que señalizan a través de los receptores CRFB13 (IFNGR1-2) y CRFB17 (IFNGR1-1) [7]. El IFN-γ y el IFN-γrel difieren en el número de sitios de N-glicosilación que proporcionarían al IFN-γ glicosilado una vida media más prolongada [8]. Tras la activación por IFN-γ, el IFNGR1 y el IFNGR2 reclutan a la quinasa Janus (JAK) 1 y a la JAK2 en sus respectivos dominios citosólicos, lo que conduce a la fosforilación y activación de STAT1 que migra al núcleo y se une a los sitios de activación del IFN-γ (GAS) e inicia la expresión de los genes dependientes del IFNγ [9]. En el pez cebra también se han descrito 2 isoformas de IFNγ (IFN-γ y el IFN-γrel) [8]. Sin embargo, peces cebra adulto tratados con IFN-γrel no lograron mediar la resistencia frente a infecciones víricas y bacterianas [10]. Hemos centrado nuestra atención en IFNγ porque en mamíferos es una molécula versátil con diferentes funciones, como la regulación de las respuestas Th1 y la eliminación de patógenos intracelulares, la regulación de la activación y función de los macrófagos [11,12] o la promoción de la presentación de antígenos para inhibir la replicación viral entre otras [13]. En los teleósteos, la expresión de IFNγ es inducida por diferentes virus, incluidos SVCV, VHSV, RGNNV, IHNV, así como imitadores sintéticos como Poly(I:C) [13]. Al mismo tiempo, a nivel *in vitro,* IFNγ es capaz de inducir la expresión de genes antivirales y de inhibir la replicación del virus [8,9]. IFNγ también puede tener actividad antibacteriana al aumentar la NOS, la producción de ROS y la actividad fagocítica de los macrófagos [8].

Por otra parte, se han descrito efectos tóxicos de IFNγ en larvas de pez cebra probablemente asociados a una activación excesiva de la inflamación [14]. El embrión de pez cebra también es capaz de combatir infecciones víricas, como el SVCV, el virus de la rabia de la cabeza de serpiente y el virus de la necrosis nerviosa [15,16] y durante la fase inicial de las infecciones víricas, los patógenos inducen TLR3, Mxa-c y Viperin [17] mientras que la infección bacteriana provocó la inducción de citoquinas proinflamatorias como TNFα [17]. Todo esto nos llevó a especular que la inclusión de IFNγ como adyuvante en la vacuna podría potenciar el rendimiento del nuevo sistema de vacuna recombinante.

Otro problema importante mencionado anteriormente es la inestabilidad de las proteínas recombinantes cuando se expresan y purifican en su forma nativa. Para superar este problema, utilizamos proteínas recombinantes purificadas a partir de cuerpos de inclusión (IB, por sus siglas en inglés). Estos IB tienen una conformación nanoestructurada específica, contienen una mezcla de

andamiajes agregados y proteína nativa, y son extremadamente resistentes a condiciones químicas y biológicas duras [18]. Estas características estructurales, hacen que nuestra plataforma de vacunación encaje muy bien con los enfoques de vacunación oral, siendo un método de administración no estresante, barato y altamente deseable que puede ser administrada mezclada con el alimento a peces en etapas juveniles [19]. En el presente estudio, una prueba de concepto de vacunación con proteína recombinante nanoestructurada de la glicoproteína G de SVCV unido a IFNγ, indujo una fuerte respuesta inmune innata en el pez cebra que se correlacionó con una protección significativa frente a un desafío con el virus de SVC.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño, producción y caracterización de proteínas antigénicas virales nanoestructuradas

Cepas víricas y plásmidos

La proteína G recombinante del SVCV fue diseñada basándose en la secuencia de la glicoproteína G (región G3, AA 254-381, Uniprot acc. no: Q91DS0) reportada en Zhu *et al,* 2019 como la más antigénica [20]. El antígeno G recombinante de SVCV con el módulo de interferón gamma (SVCV-IFN) se basó en la secuencia de la región G3 (254-381) unida a la secuencia del IFN gamma 1 de *D. rerio* (27-175) (NCBI GenBank NP_998029.1). Los clones se diseñaron utilizando el ORF y pET22b eliminando la señal de localización periplásmica e incluyendo una etiqueta poliHis-tag en la C terminal (**Figura 2**). Los clones fueron optimizados mediante codones para su expresión en *E. coli*, se sintetizaron con GeneScript y se subclonaron en pET22b. Los plásmidos se transformaron en E. *coli* BL21 (DE3) (Novagen). La proteína fluorescente iRFPHis fue clonada en pET22b (Genscript) y se utilizó como proteína control no relevante.

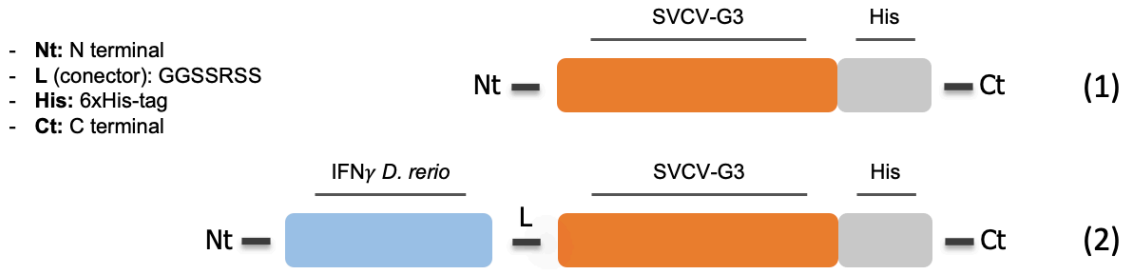


Figura 2. Diseño de plataformas modulares funcionales de (**1**) SVCV^{NP} y (**2**) SVCV-IFN^{NP}.

2.2 Producción, purificación, cuantificación y marcado fluorescente de los NPs

Los métodos para la producción y caracterización de la proteína recombinante fueron reportados previamente [21]. Brevemente, se describen algunas modificaciones para estos constructos en particular: *E. coli* se cultivó durante la noche (O/N) en medio LB (Gibco) con ampicilina (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) y la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* se indujo con 1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG, Panreac) cuando la $DO_{550\ nm}$ alcanzó 0,5-0,8. El crecimiento se llevó a cabo durante 4,5 h a 37°C. Para la purificación de las NPs, los cultivos celulares se sometieron a un proceso de disrupción enzimática y mecánica [18]. En los cultivos se añadió lisozima (1,5 µg/ml, Roche), inhibidor de proteasas cOmplete EDTA-free Tablets (Roche) y fluoruro de fenil-metanosulfonilo (PMSF, Roche) (0,4 mM) y se incubaron a 37ºC durante 2 h a 250 rpm. A continuación, los cultivos se congelaron a -80ºC durante la noche (O/N). Tras la descongelación, se añadió Triton X-100 (Roche) (0,2% v/v) y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se añadió DNasa I (1 µg/ml) y $MgSO_4$ (1 M) en los cultivos, y fueron incubados durante 1 h a 37°C con agitación. Los NPs fueron recolectados por centrifugación a 15000 Xg, 15 min a 4°C y resuspendieron en tampón de lisis (50 mM Tris HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) a 1/10 del volumen original del cultivo. Por último, se realizaron varios ciclos de congelación-descongelación para eliminar las bacterias viables restantes. Los pellets de NPs purificados, denominadas $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ se almacenaron a -80 ºC hasta su uso. La proteína fue semi-cuantificada mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-His-tag (Genscript A00186-100), y la concentración de la proteína fue calculada utilizando el software Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad) (**Figura 3**). Para citometría de flujo o microscopía confocal, los NPs se conjugaron con éster Atto-488 NHS (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. La eficacia del marcaje se determinó con el Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

2.3 Caracterización de los NPs de proteínas recombinantes virales

Fue utilizada la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) para determinar la morfología externa y las dimensiones físicas de las nanopartículas. Las muestras se prepararon resuspendiendo los NPs a una concentración de 100 µg/ml en agua mQ, pipeteando 20 µl sobre los chips de silicio, y dejando secar los NPs al aire O/N. Los NPs se expusieron a diferentes condiciones *in vitro*. Para el pH, los NPs se incubaron bajo agitación suave a pH 2 y 10 durante 3 h junto con una muestra de control. En cuanto a la temperatura, los NPs se incubaron durante 5 minutos a 100ºC. Tras la incubación, todos los NPs se centrifugaron a 10.000 Xg durante 5 min a 4ºC y se resuspendieron a 10 y 50 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Sigma-Aldrich) y finalmente fueron depositados 20 µl sobre chips de silicio, y secados al aire toda noche O/N. Fueron tomadas imágenes de microscopía electrónica con un FESEM (Zeiss Merlin) y se analizaron con el

paquete Fiji (National Institute of Health, EE.UU.). Fueron medidas al menos 60 partículas y se generaron histogramas de distribución de tamaños con el software Past 4.04 (Universidad de Oslo).

2.4 Cultivo celular y virus

Las células ZFL de pez cebra (CRL-2643, ATCC) fueron cultivadas según Thwaite et al. [21] a 28°C y 5% de CO_2 en DMEM + GlutaMAX (Gibco), 10% de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor (Gibco), 0,01 mg/ml de insulina (Sigma-Aldrich), 50 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (Sigma-Aldrich), 2% (v/v) de antibiótico/antimicótico (Gibco) y 0.5% (v/v) de suero de trucha filtrado (filtro de 0,20 µm Corning) e inactivado térmicamente durante 30 min a 56°C.

Los fibroblastos embrionarios de pez cebra (células ZF4) se cultivaron a 28ºC y 5% de CO_2 en medio RPMI (Gibco) suplementado con 10% de FBS (Cultek), 1 mM de piruvato (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco) y 2 µg/ml de anfotericina B (Gibco).

Las células EPC de pececillo cabezón (*Pimephales promelas*) se mantuvieron a 28°C y 5% de CO_2 en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS, 1 mM de piruvato, 2 mM de L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina y 2 µg/ml de anfotericina B.

El SVCV (cepa 56/70) aislado originalmente de la carpa (Fijan, 1971) se propagó en células EPC a 28°C hasta que se observó un efecto citopático. A continuación, se recogió el medio de cultivo celular, se centrifugó a 4000 Xg durante 30 minutos y se almacenaron alícuotas de virus a -80°C.

2.5 Endocitosis de antígenos virales nanoestructurados por las células ZFL

Para testear la endocitosis de las células, se añadieron NPs marcados con fluorescencia a cultivos de células de ZFL con una confluencia del 70-80% tras 2-3 h de incubación en medio mínimo (0-0,5% FBS) a las dosis y tiempos indicados a continuación. Para los ensayos de dosis-respuesta, se añadieron $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ a dosis de 2,5, 5, 10, 20 y 40 µg/ml y luego se incubaron O/N (12-14 h). Para los ensayos de endocitosis, se añadieron NPs de SVCV a dosis de 5 y 10 µg/ml e incubaron simultáneamente durante 12 y 24 h. Para los ensayos comparativos entre $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ se añadieron dosis de 5 y 10 µg/ml y se incubaron O/N (12-14 h). Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Tras los tratamientos, las células ZFL se lavaron en PBS e incubaron a 28°C y 5% de CO_2 con 1 mg/ml de tripsina (Gibco) durante 15 min. Este fuerte paso de tripsinización tenía como objetivo eliminar los NPs adheridos a la superficie celular [22]. A continuación, se añadieron dos volúmenes de medio completo y las células se separaron por centrifugación a 300 Xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los pellets se resuspendieron en PBS para citometría de flujo (FACSCalibur BD), y se contaron 10.000 eventos. Los datos se analizaron con FlowJo 10.4 (Leland Stanford University) y se representaron gráficamente con Prism

8.01 (GraphPad Prism). Para confirmar que los NPs fluorescentes fueron endocitados por las células, realizamos microscopía confocal (Zeiss LSM 700). Las células de ZFL se sembraron en placas Ibidi (µ-Dish 35 mm) y se incubaron a 28°C y 5% de CO_2. Al día siguiente, las células con una confluencia aproximada del 50-60% se colocaron en medio mínimo durante 2 h. Finalmente se añadieron $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ a una dosis de 20 µg/ml y se incubaron durante 16 h a 28°C. Las células fueron teñidas con Hoechst (núcleos) y CellMask Deep Red (membrana) (Life Technologies). Las imágenes se analizaron con el software Imaris v8.2.1 (Bitplane) e ImageJ (National Institute of Health, USA).

2.6 Extracción de ARN y Q-PCR

El ARN total de las células ZFL fue extraído utilizando TriReagent (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. El rendimiento y la calidad del ARN fueron determinadas en el Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) y la integridad se evaluó en el bioanalizador Agilent 2100 utilizando el kit RNA 6000 Nano Lab-Chip (Agilent Technologies). A continuación, se sintetizó ADNc a partir de 1 µg de ARN total de alta calidad utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad). La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) fue realizada a 60°C de temperatura en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX384 touch (Bio-Rad) utilizando el kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Cada mix de PCR fue preparada con 5 µl de SYBR green supermix, 0,4 µM de cebadores específicos, 2 µl de ADNc diluido y 2,6 µl de agua (Sigma-Aldrich) en un volumen final de 10 µl. El gen EF1-α fue utilizado como gen de referencia. El factor de dilución para todos los genes analizados fue de 1:10 (Vig-1, Mx, CCL4, Lmp-2, IFNGR1, IL-1β, TNFα, IRF1, T-bet, IL-10, Prf19b, GZMA) (**Tabla 1**). Todas las muestras (n=6 por tratamiento) fueron analizadas por triplicado y los datos analizados mediante el método de Livak [23].

Tabla 1. Cebadores específicos del pez cebra usados para la qPCR.

Gen	Secuencia (5´- 3´)	N° Acceso	Referencia
EF1-α	FW_CTTCTCAGGCTGACTGTGC RV_ACGATCAGCTGTTTCACTCCC	AY422992	Thwaite et al. (2018)
Mx	FW_ACATCTTGGATCGTTCAGGGGA RV_AACGCAGGTTCCTCCAACAG	NM_182942.4	Thwaite et al. (2018)
Vig-1	FW_CTTATAGGTCGAGCACAGGGC RV_ACGTACTGGATTGAGAGCGGTG	NM_001025556.1	Thwaite et al. (2018)
CCL4	FW_TAAAATGAGCACCTCTCGCTTTG RV_ GACTGAGGCTTACGGCACACA	NM_001129894.1	Wang et al. (2011)
IFNGR1	FW_TGTGAAGGCATTATGGAACGAA RV_CTTCCATGTTGATTGAAGGTGAAT	NC_007112.7	Grayfer et al. (2009)
IL-1β	FW_ ATGGCATGCGGGCAATATG	NM_212844.2	Sieger et al. (2009)

Gen	Secuencia (5´- 3´)	N° Acceso	Referencia
	RV_ TGCAGGCCAGGTACAGGTTAC		
Lmp-2	FW_ TTATTTCCAGAACCGGGATG RV_ACTCCTGGCATTCCCTCTTT	BC078384.1	Sieger et al. (2009)
TNFα	FW_ACCAGGCCTTTTCTTCAGGT RV_GCATGGCTCATAAGCACTTGTT	NM_212859.2	Pereiro et al. (2020)
IRF1	FW_GTGTCCAGAATGCGCATGC RV_GCCCACTGCTTGAACAGACA	NC_007132.6	Ruan et al. (2017)
T-bet	FW_ACACTGGCACTCACTGGATG RV_CTCCTTCACCTCCACGATGT	NM_001170599.1	Mitra et al. (2009)
GZMA	FW_AACACACAGCAGCACAGAGG RV_GAGCCTGAAAGCACTCCAAC	NC_007132.7	Pereiro et al. (2020)
Prf19b	FW_ATGGCTCTCCTTCTGTTGCTC RV_ACATCCACCACAAACGCTCC	NC_007130.7	Pereiro et al. (2020)
IL-10	FW_TCACGTCATGAACGAGATCC RV_CACCATATCCCGCTTGAGTT	AY887900.1	Zhang et al. (2005)

Para aislar el ARN total de las células ZF4, se utilizó el E.Z.N.A.® Total RNA Kit (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se cuantificó el ARN con un espectrofotómetro NanoDrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) y se utilizó la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) para la síntesis de ADNc a partir del ARN, tal como se ha descrito previamente [24]. Para evaluar la expresión de genes en células ZF4, se realizaron RT-qPCR en reacciones de 20 µl que contenían 24 ng de ADNc, 10 µl de SYBR green master mix (Thermo Fischer Scientific) y a una concentración final de 900 nM de cada cebador utilizando el sistema QUANTSTUDIO 3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.). El gen EF1-α fue utilizado como gen de referencia.

2.7 Mantención peces cebra

Los peces cebra se mantuvieron en acuarios en un sistema de recirculación a una temperatura de 28 ± 1ºC. Las condiciones de iluminación fueron de 14:10 h (luz:oscuridad) y los peces adultos se alimentaron dos veces al día a razón de un 2% de su peso corporal. Los niveles de amoníaco, nitrito, nitrato y pH fueron medidos una vez por semana (pH=7,5 ± 0,5) y mantuvieron bajo los niveles tóxicos. Para la puesta de embriones, se transfirieron dos hembras y cuatro machos en grupos a un tanque de cría a última hora de la tarde. A la mañana siguiente, a las 3 h del inicio de la luz, los embriones fueron recogidos y se cultivaron en un medio E3 embrionario en una placa Petri (Deltalab). Los huevos fecundados se separaron de los no fecundados con una pipeta de plástico (Deltalab). Todos los experimentos con pez cebra se realizaron siguiendo la guía de los principios Internacionales para la Investigación con Animales (EU 2010/63) y los Comités de Ética de la

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB, CEEH) y de la Generalitat Valenciana (2019/VSC/PEA/0203).

2.8 Endocitosis *in vivo* en larvas de pez cebra

Se distribuyeron grupos de cinco larvas por tratamiento en placas de 6 pocillos (Thermo Fisher) por duplicado y se sumergieron en 1 ml de medio E3 con PBS, $SVCV^{NP}$ fluorescente y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ (10 µg/ml), GFP (10 µg/ml) y LPS (10 µg/ml). Se evaluó la biodistribución de los NPs en las larvas de los peces cebra después de 24 y 48 h utilizando un estereomicroscopio de fluorescencia (Nikon SMZ800) acoplado a una cámara (Nikon DS-Fi2). En paralelo, grupos de n=5 larvas fueron tratadas como se indica previamente, lavadas y homogeneizadas en TriReagent para análisis de la expresión génica tal como se indica en la sección de extracción de ARN y Q-PCR.

2.9 Desafío de infección contra SVCV en peces cebra

Peces cebra de un tamaño medio de 35 mm y 0,4 g, fueron adquiridos en una tienda de animales local. Los animales fueron aclimatados en tanques de 20 litros a 21ºC durante 14 días antes del ensayo de vacunación. A continuación, los peces cebra fueron divididos en cinco grupos: grupo control no infectado, grupo control infectado por SVCV, grupo control $iRFP^{NP}$, grupo $SVCV^{NP}$ y el grupo $SVCV\text{-}IFN^{NP}$. Cada individuo fue anestesiado con tricaína (metanosulfonato de tricaína, Sigma-Aldrich) (40 mg/l) e inyectado por vía intraperitoneal (i.p.) con 30 µl de PBS que contenían 5 µg de cada antígeno utilizando una jeringa-aguja 23G (Terumo Europe N.V.). A los 30 días post-vacunación (dpv), los peces fueron infectados por inmersión durante 2 h en agua de acuario que contenía SVCV ($1{,}4 \times 10^7$ partículas infecciosas de SVCV). Los individuos fueron mantenidos a 21ºC durante el desafío y se registró diariamente la mortalidad de cada grupo.

2.10 Estadísticas

Los gráficos y análisis fueron realizados con el software Prism 8.01 (GraphPad Prism). Las comparaciones de medias para cada grupo experimental frente al control y entre tratamientos, se analizaron mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett o la prueba no paramétrica no pareada de Mann-Whitney. Los datos se muestran como media ± desviación estándar (DE) y $p < 0{,}05$ se consideró estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización de los antígenos proteicos modulares nanoestructurados SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}

Hemos producido dos proteínas virales recombinantes diferentes en *E. coli* como cuerpos de inclusión (IB) o Nanopellets (NPs) con rendimientos de moderados a buenos: SVCV^{NP} 0,3 mg/l y SVCV-IFN^{NP} 3,6 mg/l (**Figura 3**). La expresión de proteínas recombinantes es un proceso empírico con varias limitaciones experimentales que afectan al rendimiento de la producción. Los rendimientos de producción de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} oscilaron entre moderados y buenos en comparación con otras NPs como VHSV^{NP} y VHSV-IFN^{NP} en las que obtuvimos 14 y 14,2 mg/l, respectivamente (datos no publicados).

El tamaño y la morfología de ambos NPs se evaluaron mediante FESEM (**Figura 4**). SVCV-IFN^{NP} es generalmente oviforme (de forma elíptica) mientras que SVCV^{NP} es más redonda y pequeña. Hemos observado morfologías similares en otros IB producidos en *E. coli* utilizando la misma cepa BL21(DE3) y en M15(pREP4) [21]. El rango de tamaños se muestra en la **Figura 4**, siendo la anchura y la longitud media de 420 ± 67,5 nm y 693 ± 154 nm para SVCV^{NP} y de 624 ± 104,9 nm y 982 ± 216,9 nm para SVCV-IFN^{NP}, respectivamente. Las características morfológicas de la proteína de control inmunológicamente irrelevante nanoestructurada iRFP^{NP} fueron reportadas anteriormente en Torrealba et al. [25]. La integridad morfológica y estructural de los NPs se evaluó bajo diferentes condiciones ambientales de temperatura y pH para evaluar la resistencia de los NPs homologando procedimientos de extrusión industrial de pienso y condiciones de pH gastrointestinal. SVCV^{NP} (**Figura 5A**) y SVCV-IFN^{NP} (**Figura 5B**) se sometieron a condiciones de temperatura alta (100ºC) y pH extremo (pH 2 y 10) no observando cambios significativos en el tamaño o la morfología.

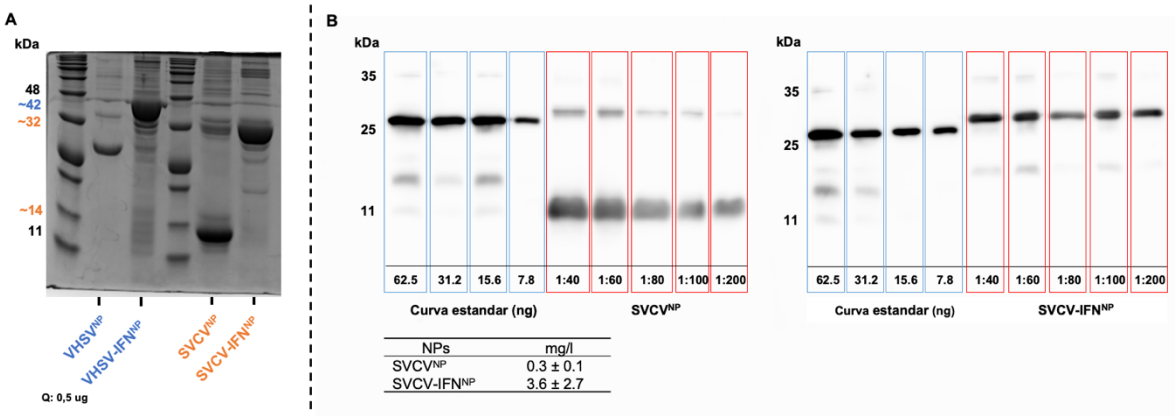


Figura 3. Cuantificación de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} y SDS-PAGE teñido con Coomassie. (**A**) Los NPs fueron semi cuantificados mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-His-tag. Las concentraciones de proteína se calcularon a partir de una curva estándar de una proteína recombinante marcada con His utilizando el software Quantity One (Bio-Rad). La curva estándar osciló entre 62,5 y 7,8 ng y las diluciones de los NPs fueron de 1:40 a 1:200. El rendimiento de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} fue calculada a partir de 3 lotes diferentes. (**B**) Los NPs de SVCV y SVCV-IFN junto con otros NPs (VHSV^{NP} y VHSV-IFN^{NP}, datos no mostrados) fueron evaluados mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie para mostrar el nivel de pureza y comparar la homogeneidad de las muestras.

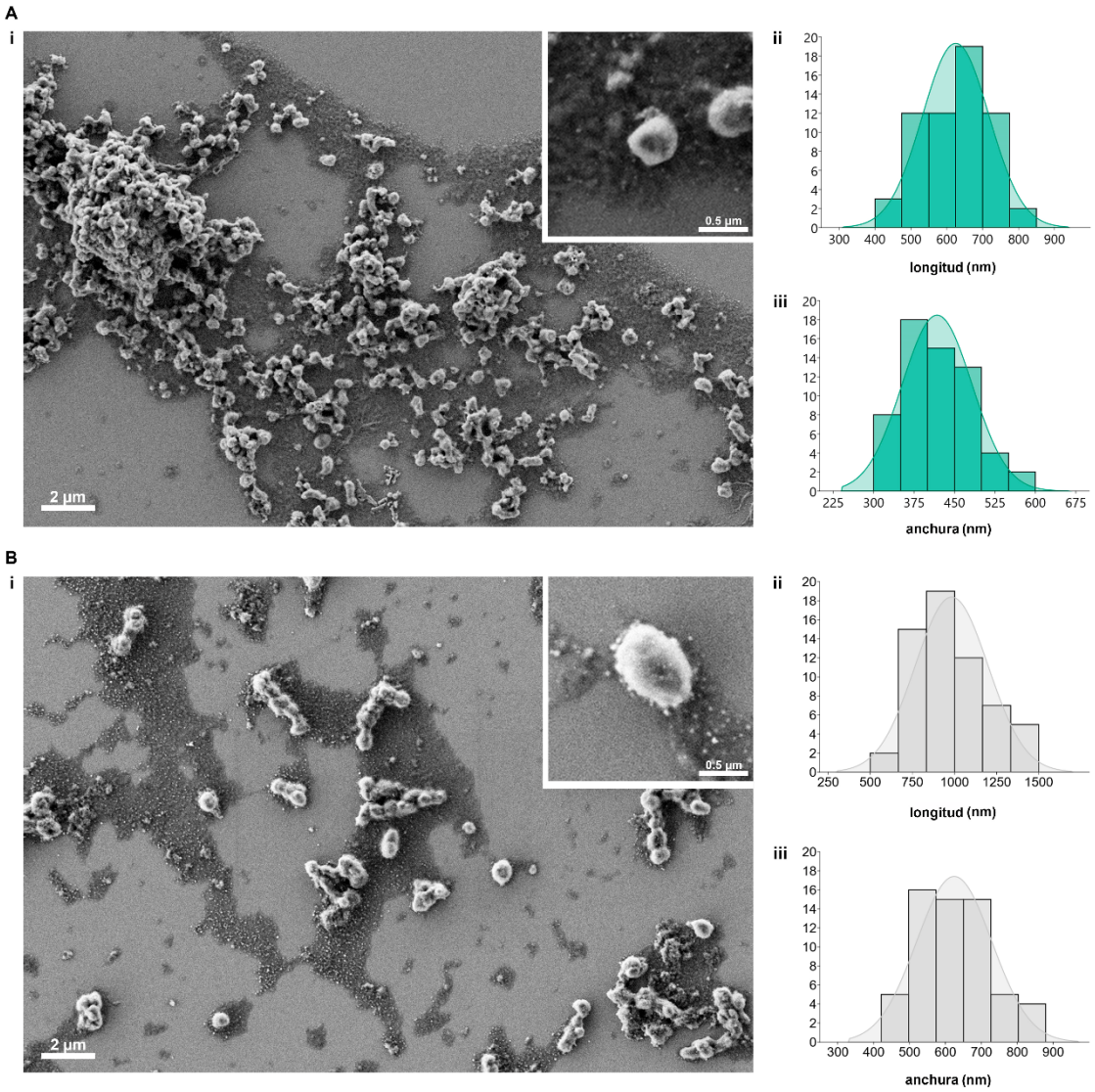


Figura 4. Caracterización de las proteínas nanoestructuradas de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) (**i**) de SVCV^{NP} (**A**) y SVCV-IFN^{NP} (**B**). Histogramas de distribución de tamaños (n=60) de las medidas de longitud (**ii**) y anchura (**iii**) de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}.

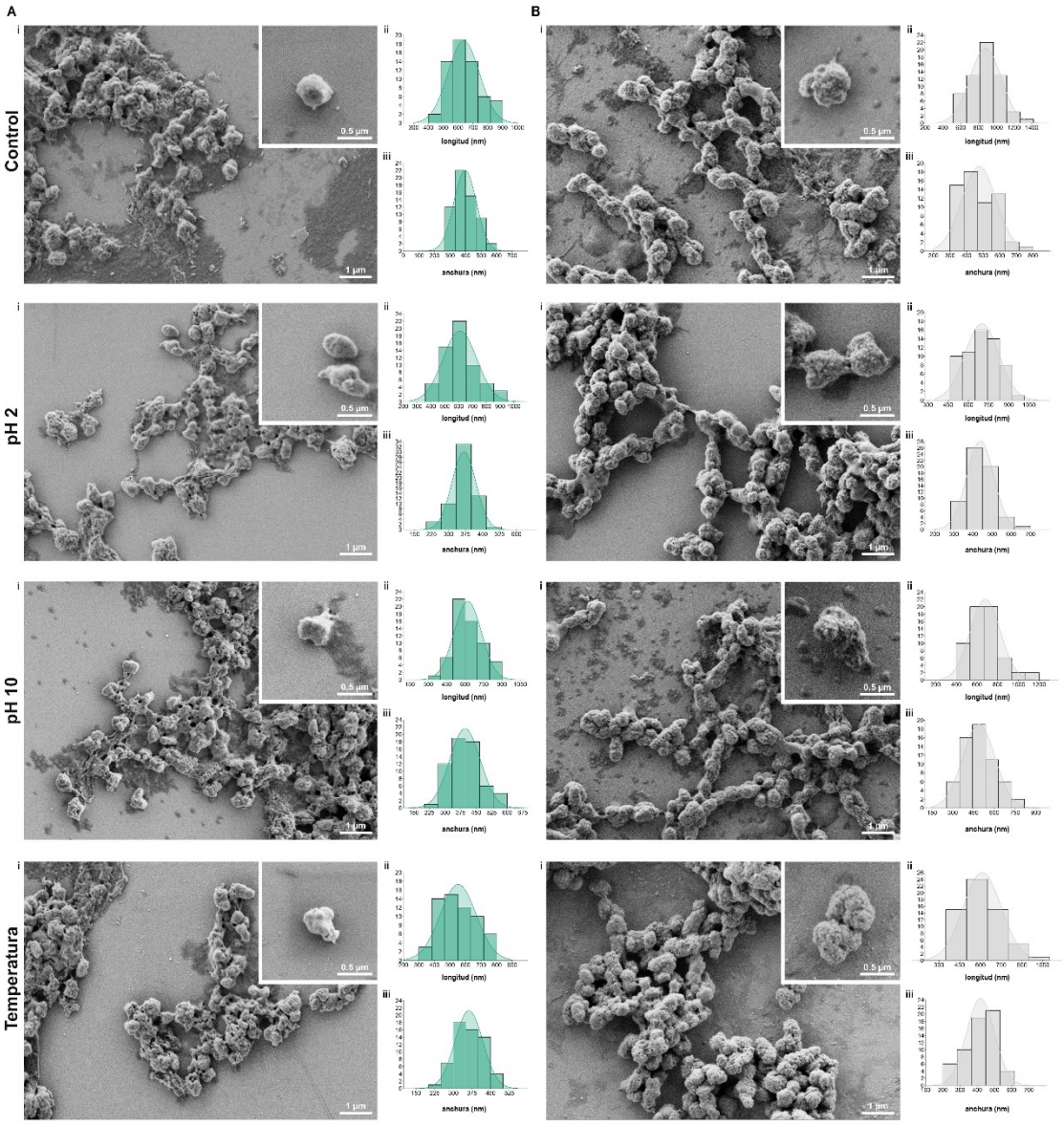


Figura 5. Caracterización de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} bajo diferentes condiciones de pH y Temperatura. Imágenes FESEM (**i**) de SVCV^{NP} (**A**) y SVCV-IFN^{NP} (**B**) sometidas a pH 2, pH 10 y temperatura alta (5 min a 100 ºC). Histogramas de distribución de tamaños (n=60) de las medidas de longitud (**ii**) y anchura (**iii**) de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}.

3.2 Endocitosis de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} por células de ZFL

Los NPs modulares de SVCV fueron internalizados por las células de hígado del pez cebra (ZFL). En los experimentos de dosis-respuesta, se observó que la endocitosis de SVCV^{NP} fue ligeramente más eficiente que la de SVCV-IFN^{NP}, alcanzando ~100% de células fluorescentes positivas a 10 µg/ml frente a ~90% de células fluorescentes positivas a la misma dosis, respectivamente (**Figura 6A y 6C**). En ambos casos, la intensidad media de fluorescencia (IFM) aumentó gradualmente hasta

la dosis de 10 μg/ml (**Figura 6A y 6C**), y a dosis más altas disminuyó significativamente. Esta disminución no fue relacionada con la toxicidad o la apoptosis, ya que la supervivencia celular fue del 100% en todas las dosis y tiempos (datos no mostrados). Posiblemente, la IFM disminuyó debido a que las células no fueron capaces de captar más NPs (el 100% de las células fueron fluorescentes) y porque los NPs comenzaron a metabolizarse. Para los experimentos de de endocitosis, se eligió la dosis de 10 μg/ml. En los experimentos de temporalidad, a las 12 y 24 h las células ZFL tratadas con $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ alcanzaron el mismo porcentaje de fluorescencia y la misma IFM (**Figura 6B y 6D**). No se observaron diferencias en la captación de ZFL a dosis de 5 o 10 μg/ml a las 12 h de incubación entre $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ cuando ambos NPs fueron testeados en paralelo (**Figura 6E**). Además, estos resultados (**Figura 6E**) fueron muy coherentes con los anteriores cuando los NPs fueron probados por separado (**Figura 6A-D**).

Las imágenes de microscopía confocal de las células ZFL desafiadas con $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ mostraron que ambos NPs fueron internalizados y acumulados en el interior del citosol. Las imágenes 3D demostraron la internalización completa tanto de $SVCV^{NP}$ como de $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ en células ZFL (**Figura 7**). Los ensayos de microscopía confocal fueron realizados con 20 μg/ml de NPs a las 24 h y los datos de internalización por citometría mostraron que el 100% y el 90% de las células eran fluorescentes a 20 μg/ml. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia media (IFM) en las células tratadas con $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ (**Figura 6C**) fue inferior a la de las células tratadas con $SVCV^{NP}$ (Figura 4A). Aparentemente, las imágenes de microscopía confocal no muestran ninguna diferencia entre las células tratadas con $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ en cuanto al tamaño o la intensidad cualitativa de los aglomerados fluorescentes en el citosol (**Figura 7**).

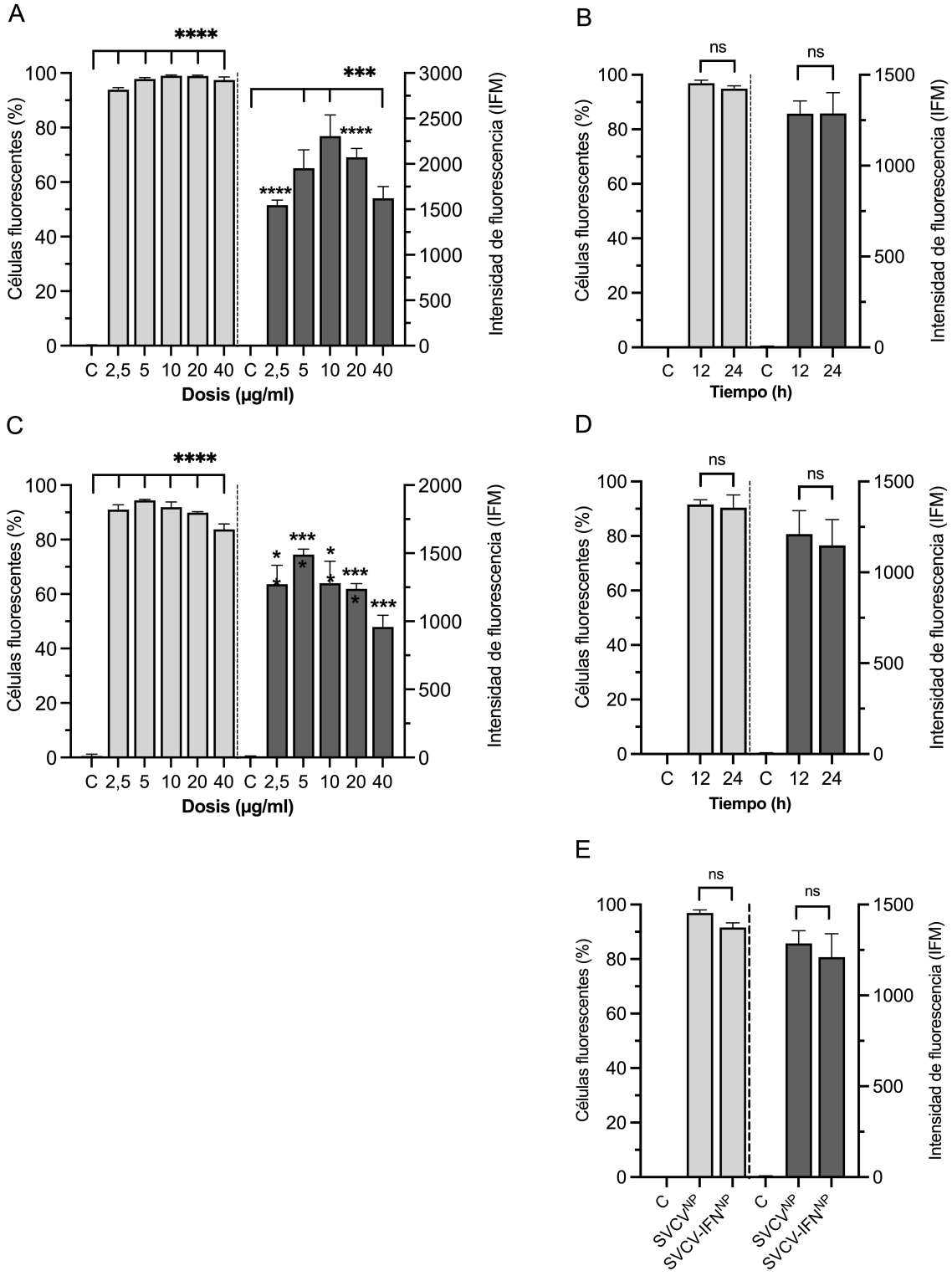


Figura 6. Endocitosis de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} en células ZFL. (**A**) SVCV^{NP} dosis-respuesta; (B) SVCV^{NP} tiempo-respuesta de endocitosis; (**C**) SVCV-IFN^{NP} dosis-respuesta; (**D**) SVCV-IFN^{NP} tiempo-respuesta de endocitosis y (**E**) endocitosis comparativa de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} a 10 µg/ml durante 12 h. Para los ensayos de dosis respuesta, se añadieron dosis de 2,5 a 40 µg/ml de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} marcados con fluorescencia a células ZFL, se incubaron durante 12 h y se

evaluó la endocitosis mediante citometría de flujo. Para los ensayos de tiempo-respuesta de endocitosis, se añadieron 10 µg/ml de $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ marcados con fluorescencia a células ZFL y se incubaron durante 12 y 24 h. Las diferencias de las medias entre tratamientos fueron analizadas mediante un ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Niveles de significancia ns: no significativo; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

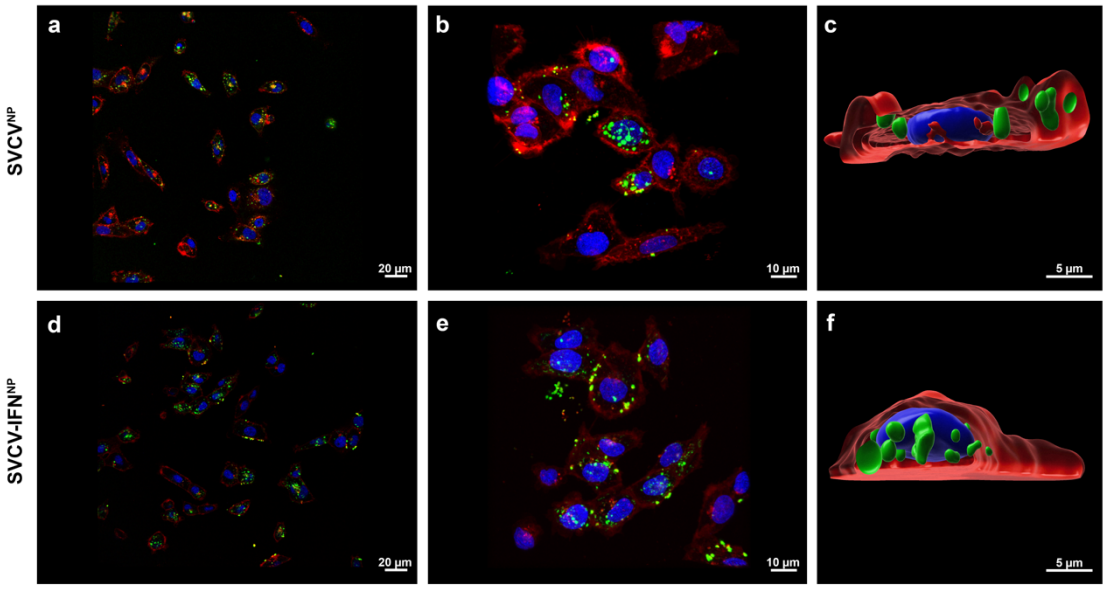


Figura 7. Microscopía confocal e imágenes digitalizadas (z-stacks) de células ZFL con $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$. Los NPs son verdes, la membrana celular roja y los núcleos azules. Células ZFL tratadas con $SVCV^{NP}$; (**a, b**) microscopía confocal y (**c**) imagen digitalizada (z-stacks), y células ZFL tratadas con $SVCV\text{-}IFN^{NP}$; (**d, e**) microscopía confocal y (**f**) imagen digitalizada (z-stacks). Las células fueron incubadas durante 16 h con $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ a 20 µg/ml.

3.3 Análisis de la expresión génica en células ZFL estimuladas con $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$

Para ver si los NPs antigénicos podían inducir una respuesta antiviral en línea con la provocada por la infección viral, se estimularon células ZFL con los NPs virales a 10 µg/ml durante 16 h (O/N). También utilizamos Poly(I:C) a 10 µg/ml, como imitador del dsRNA viral, y LPS como imitador bacteriano. $iRFP^{NP}$ (10 µg/ml) fue el NP control fabricado como proteína inmunológicamente irrelevante, con todos los contaminantes potenciales de *E. coli* generados durante la preparación de los NPs. La expresión de marcadores genéticos de la respuesta inmunitaria a la infección vírica fue analizada mediante qPCR (**Figura 8**). En las células ZFL se ha descrito previamente una fuerte y típica respuesta antiviral tras el tratamiento con Poly(I:C) [26]. La proteína $iRFP^{NP}$ sin un papel

inmune relevante no indujo la expresión de genes antivirales, mientras que SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} fueron capaces de estimular las células ZFL incrementando la expresión génica de Vig-1, Mx, Lmp-2, IRF1, CCL4 e IFNGR1. Es importante destacar que la inclusión del módulo de proteína IFNγ aumentó la capacidad de SVCV^{NP} para estimular la respuesta antiviral, lo que demuestra que IFNγ podría actuar como un potente adyuvante cuando se incluye dentro del mismo NP (**Figura 8**). Además, se observó una inducción de la expresión del receptor IFNγ (IFNGR2) y del polipéptido de baja masa molecular (Lmp)-2 tras la administración de SVCV-IFN^{NP}, lo que indica una inducción paralela de las vías de señalización de IFNγ presumiblemente tras la unión de IFNγ a su receptor. Las citocinas proinflamatorias (TNFα) y antiinflamatorias (IL-10*)* también fueron reguladas al alza en ZFL, pero no se observaron diferencias significativas entre SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}.

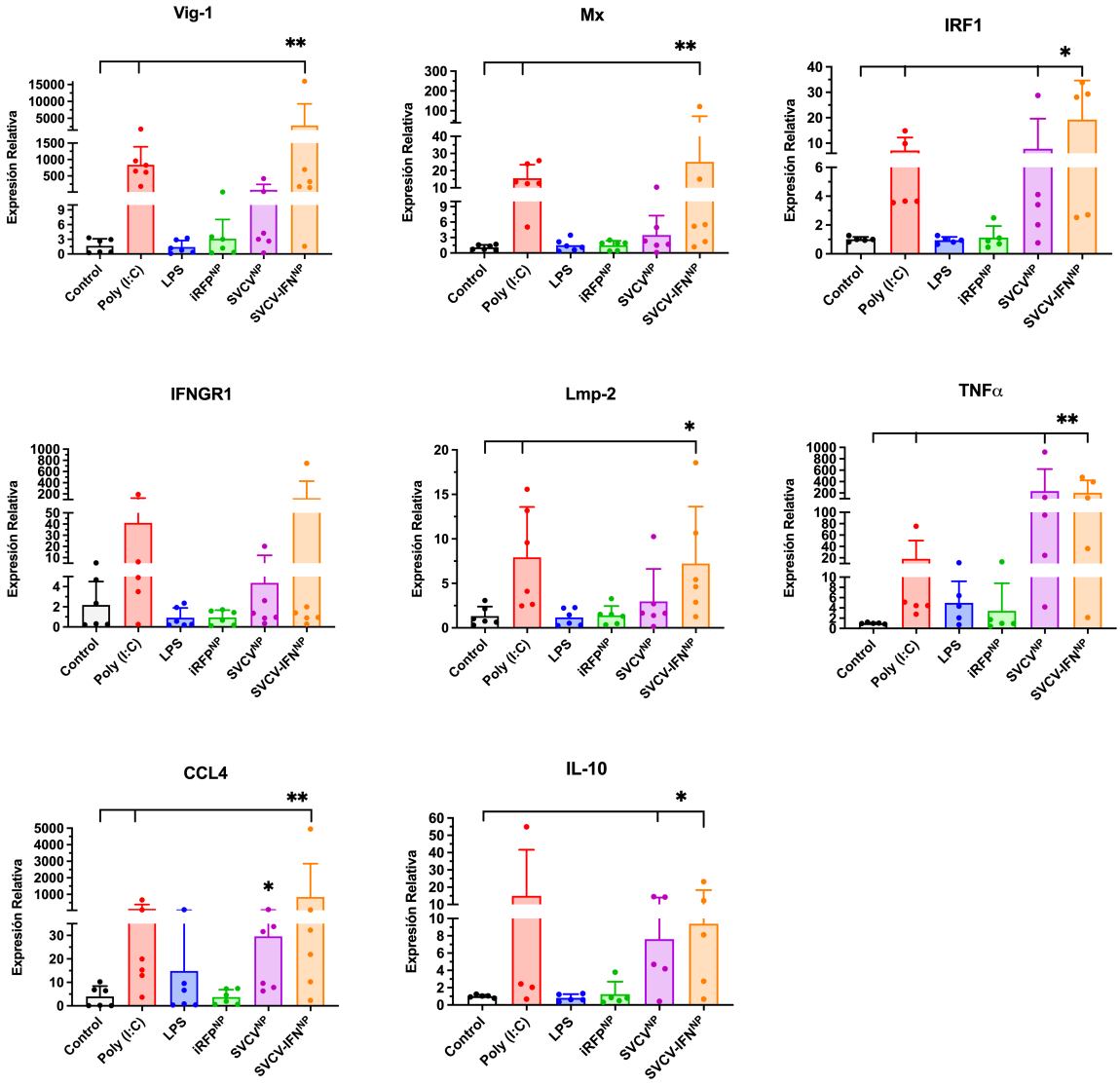


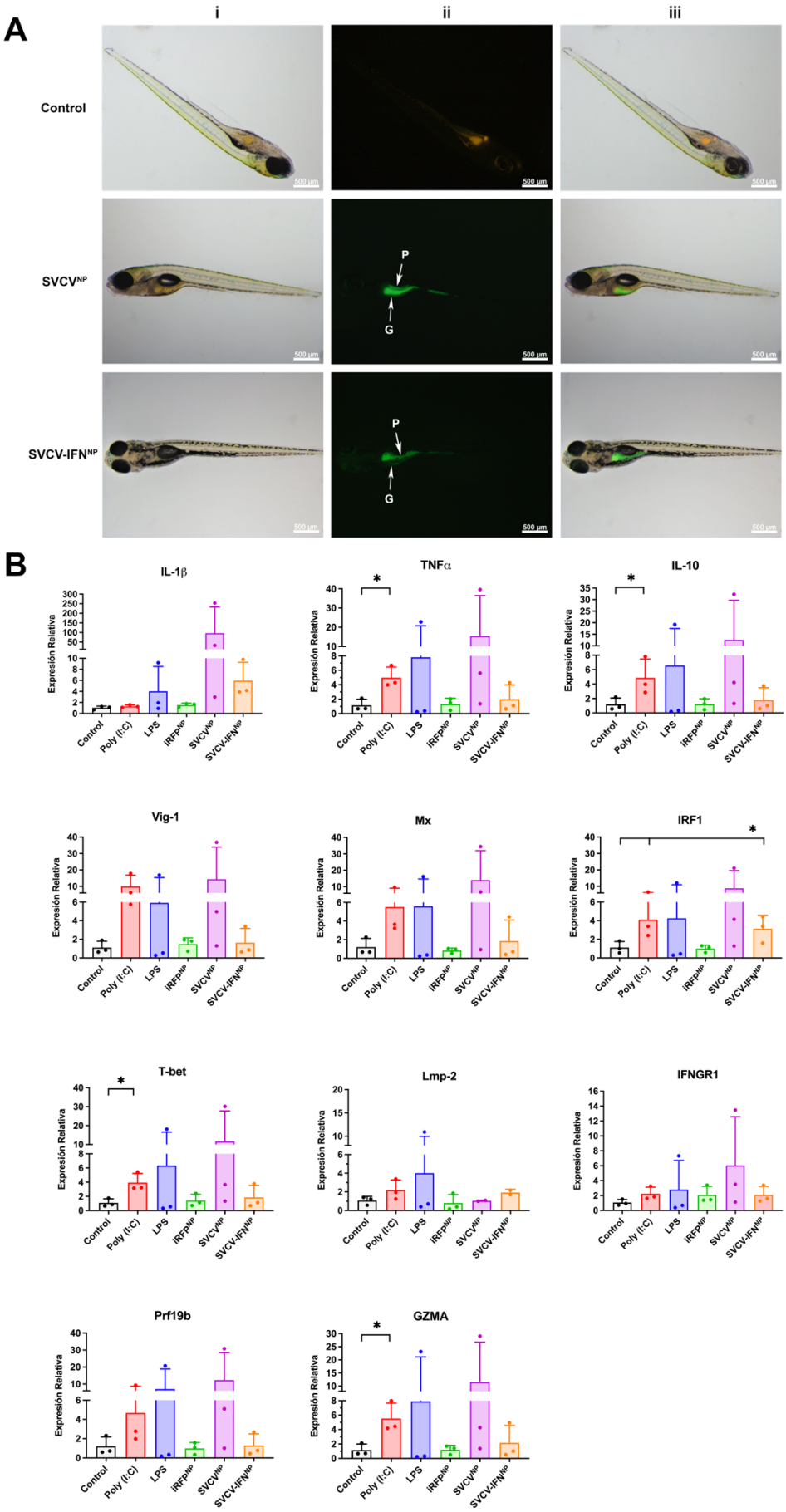
Figura 8. Análisis de la expresión génica de ZFL estimuladas con SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}. Las células ZFL fueron incubadas de la siguiente manera: células control no estimuladas (negro), 10 µg/ml de Poly(I:C) (rojo) y LPS (azul), 10 µg/ml de SVCV^{NP} (púrpura), 10 µg/ml de SVCV-IFN^{NP} (naranja) y 10 µg/ml de iRFP^{NP} como control inmune genéticamente irrelevante (verde). Los datos son la media ± SD (n=6). Las diferencias estadísticas entre tratamientos y controles se analizaron mediante la prueba no paramétrica no apareada de Mann-Whitney. Niveles de significación *p < 0,05; **p < 0,01.

3.4 Biodistribución y expresión génica de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} en larvas y embriones de pez cebra

Larvas de pez cebra eclosionadas aproximadamente a las 72 horas post-fecundación (hpf) fueron incubadas con 10 y 20 µg/ml de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} fluorescentes en medio E3. Después de 24 y 48 h, las larvas vivas fueron anestesiadas y se realizaron registros de imágenes de éstas con un

microscopio estereoscópico (**Figura 9A**). A las 24 h la internalización de SVCV^{NP} por parte de las larvas (n=6) fue casi indetectable, mientras que observamos altos niveles de fluorescencia a las 48 h en alrededor del 100% de las larvas, mostrando principalmente acumulación en el tracto gastrointestinal y el páncreas (**Figura 9A**). Es importante destacar que las larvas tratadas con SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} murieron tras 24 h de incubación a la dosis más alta, 20 μg/ml. Sin embargo, a 10 μg/ml, todo el conjunto de larvas sobrevivió tras la inmersión en la solución con SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}.

También evaluamos la respuesta antiviral en larvas de pez cebra post tratamiento con SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}. Para intentar comprender la respuesta *in vivo* a las proteínas modulares SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}, seleccionamos un panel de genes potencialmente representativos de respuestas inmunitarias diferenciales: respuesta directa al virus, respuesta de macrófagos, respuestas de células T Th1 o citotóxicas. Sin embargo, como se muestra en la **Figura 9B**, casi todos los genes seleccionados fueron estimulados *in vivo* por SVCV^{NP} pero no por SVCV-IFN^{NP}. Para explorar por qué los tratamientos con SVCV-IFN^{NP} no indujeron la respuesta IFNγ en larvas, utilizamos la línea celular embrionaria de pez cebra ZF4 para evaluar si este patrón era común en células del mismo origen y estadio de desarrollo. Se analizó la expresión génica de las células ZF4 tras el tratamiento con SVCV^{NP}, SVCV-IFN^{NP}, Poly(I:C) (10 μg/ml), LPS (10 μg/ml) e iRFP^{NP}. Como se muestra en la Figura 7C, las células ZF4 derivadas de embriones tratados con SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} estimularon una respuesta antiviral a niveles similares a los observados en células ZFL (**Figura 8**) aunque sin mostrar diferencias en los niveles de estimulación entre SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}. Sin embargo, ZF4 no logró aumentar la expresión de Lmp-2 e IFNGR.


A
i
ii
iii
Control
SVCV^NP
SVCV-IFN^NP
P
G
500 µm
B
IL-1β
TNFα
IL-10
Vig-1
Mx
IRF1
T-bet
Lmp-2
IFNGR1
Prf19b
GZMA
Expresión Relativa
Control
Poly (I:C)
LPS
iRFP^NP
SVCV^NP
SVCV-IFN^NP

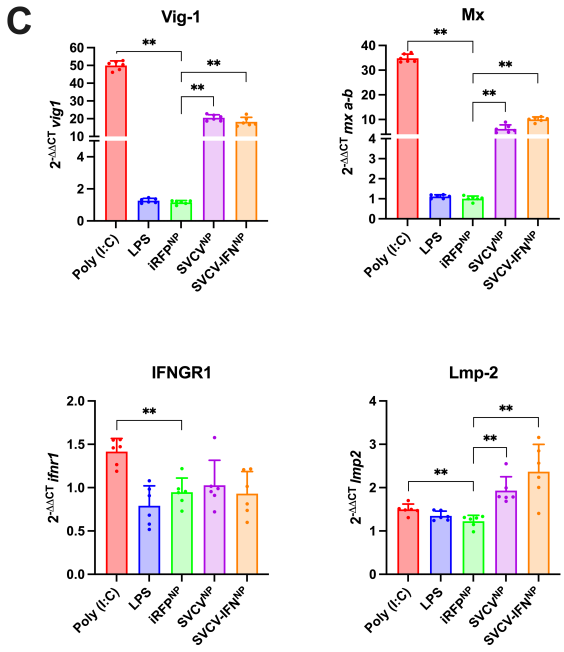


Figura 9. Biodistribución y expresión génica de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} en larvas y embriones del pez cebra. (**A**) Captación en larvas. Larvas de pez cebra (3 dpf) fueron sumergidas con 10 µg/ml de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} fluorescente durante 48 h. Se utilizó medio E3 con PBS como control. (**i**) Imagen transmitida, (**ii**) imagen fluorescente e (**iii**) imagen fusionada. (**B**) Expresión génica en larvas. Grupos de 5 larvas por tratamiento fueron estimuladas por inmersión durante 24 h como se menciona a continuación: células control no estimuladas (negro), 50 µg/ml de Poly(I:C) (rojo), 25 µg/ml de LPS (azul), 10 µg/ml de SVCV^{NP} (morado), 10 µg/ml de SVCV-IFN^{NP} (naranja) y 10 µg/ml de iRFP^{NP} como control inmunogénico irrelevante (verde). Los datos son la media ± SD (n=5). No se detectaron diferencias entre los tratamientos y el control (prueba no paramétrica no pareada de Mann-Whitney). (**C**) Las células ZF4 fueron incubadas de la siguiente manera: células control no estimuladas (negro), 10 µg/ml de Poly(I:C) (rojo) y LPS (azul), 10 µg/ml de SVCV^{NP} (púrpura), 10 µg/ml de SVCV-IFN^{NP} y 10 µg/ml de iRFP^{NP} como control inmunogénico irrelevante (verde). Los datos son la media ± SD (n=6). Las diferencias estadísticas entre tratamientos y controles se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Niveles de significancia *p < 0,05; **p < 0,01.

3.5 Efecto protector de las vacunas contra la infección por SVCV en el pez cebra

Se realizó un ensayo de supervivencia en peces cebra infectados con SVC virus tras diferentes tratamientos con las vacunas nanoestructuradas. Los peces cebra vacunados con SVCV-IFN^{NP} presentaron un porcentaje de supervivencia relativa (RPS) de 76% con un 20% de mortalidad porcentual acumulada tras 18 días de infección con SVCV. Las tasas de mortalidad de iRFP^{NP} y SVCV^{NP} fueron del 41,7%, y 50,0%, respectivamente (**Figura 10B**). El inicio de la mortalidad se

produjo principalmente entre el día 4 y 8 post-infección (dpi), retrasándose en el grupo de SVCV-IFN^{NP} donde las primeras mortalidades se registraron a los 7 dpi. Los peces muertos mostraron signos clínicos de SVCV (**Figura 10A**) y la presencia del virus en los peces enfermos se confirmó mediante RT-qPCR (datos no mostrados). Previo al ensayo de infección, se realizó una prueba de toxicidad de los NPs en animales adultos inyectados vía intraperitoneal con 5 y 10 µg de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}, y no se observaron signos de macrotoxicidad (datos no mostrados).

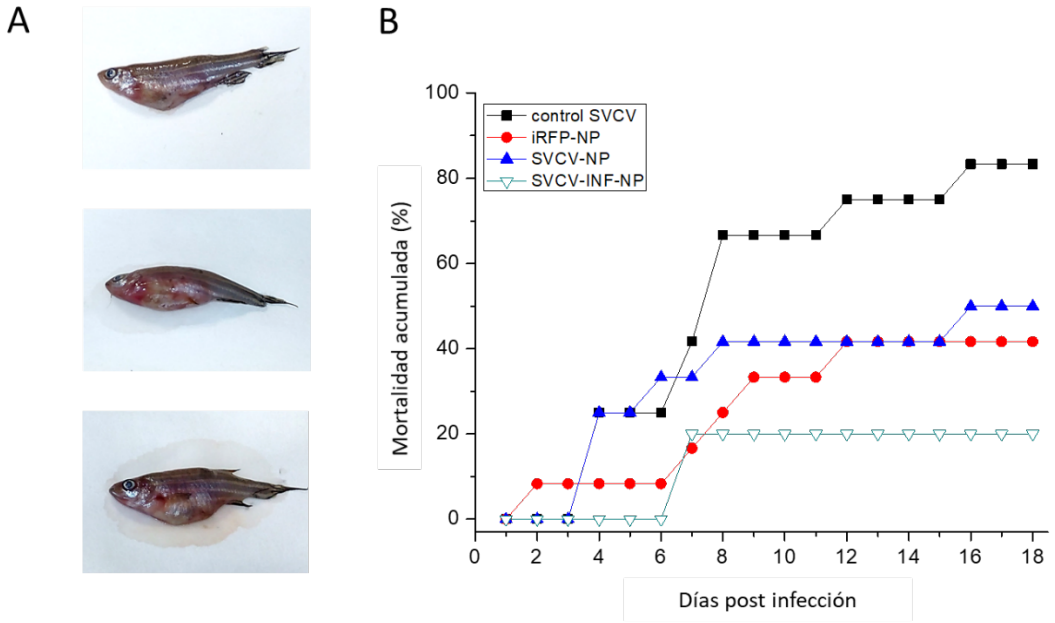


Figura 10. SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} administrados a peces cebra protegen contra la infección *in vivo* por el virus de SVC. (**A**) Imágenes representativas de los signos clínicos del virus SVC en peces. **(B)** Tasa de mortalidad acumulada de los peces cebra tras la exposición a SVCV. Los peces fueron vacunados con dosis de 5 µg/pez (iRFP^{NP}, SVCV^{NP}, SVCV-IFN^{NP}) mediante inyección intraperitoneal. Treinta días después de la vacunación, los peces fueron desafiados con SVCV (4 x 10^4 TCID50/ml). El número de peces muertos de cada grupo fue registrado diariamente.

4. DISCUSIÓN

Encontrar métodos terapéuticos y profilácticos rentables, seguros y eficaces para las enfermedades víricas de los peces sigue siendo un reto. El principal problema a la hora de utilizar vacunas de subunidades es la corta vida útil de las proteínas solubles. Esto es especialmente importante en los métodos de administración oral. Para superar la degradabilidad, se ha investigado la encapsulación mediante diferentes materiales biocompatibles. Entre otros, los liposomas, el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) o los nanotubos de carbono (CNT) han demostrado ser eficaces para la administración de fármacos y profilácticos (véase [27]). Sin embargo, el costo de la encapsulación

sigue siendo un problema para el desarrollo de profilaxis en peces, sobre todo para aquellas especies con un valor de mercado moderado y una producción elevada, como la carpa común (FAO, 2020). Estos altos niveles de producción de la carpa común (*C. carpio*) y la carpa herbívora (*C. idella*) (un total de 9,89 millones de toneladas/año) hacen aún más relevante el desarrollo de vacunas contra el virus de la SVC.

Aquí presentamos una plataforma modular biocompatible y barata que permite la producción de proteínas recombinantes en una conformación altamente estable, adecuada para la inyección y la inclusión en piensos para la administración oral. $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ expuestos a altas temperaturas y pH extremos no mostraron cambios de forma ni tamaño. Trabajos anteriores demostraron que la nanoestructura $TNF\alpha^{NP}$ también permanece estructural y funcionalmente intacta cuando se somete a temperaturas o pH extremos [18, 21]. Además, la alta salinidad no tiene ningún impacto ni en la estructura ni en la función de los NPs (datos no mostrados). Aunque los IFNs pueden ser utilizados para el tratamiento de diferentes enfermedades humanas, su estabilidad y vida media plasmática siguen siendo uno de los principales obstáculos que dificultan la utilización de proteínas recombinantes como medida terapéutica [28]. IFNγ no ha mostrado la bioactividad esperada *in vivo* debido a la degradación, y también la tendencia a agregarse irreversiblemente en condiciones de desnaturalización leve [29].

En el presente estudio, IFNγ nanoestructurado combinada con el módulo antigénico del SVCV permaneció estable y funcional incluso en las condiciones más duras de pH y temperatura. Este enfoque modular es muy versátil y podría incluir otros módulos, como ligandos para moléculas o receptores específicos, que proporcionarían un sinfín de funciones adicionales a la proteína antigénica recombinante. El rendimiento de producción de estas proteínas modulares es bueno, aunque depende en gran medida de la proteína, y el $SVCV^{NP}$ y el $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ mostraron niveles de expresión moderados en comparación con otros antígenos virales como el $VHSV^{NP}$ o el $VNNV^{NP}$ [21].

A nivel funcional, los cultivos celulares de ZFL endocitaron eficazmente $SVCV^{NP}$ y $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ y provocaron una fuerte respuesta antiviral. El módulo IFNγ contenido en $SVCV\text{-}IFN^{NP}$ otorgó a los NPs una mayor capacidad para inducir una respuesta antiviral, probablemente mediante la estimulación de las vías de señalización del receptor IFN, y conduciendo, por ejemplo, la regulación al alza de Lmp-2. Sieger et al describieron en larvas de pez cebra que, a excepción de algunos miembros de la familia *irg* (GTPasas relacionadas con la inmunidad), los únicos genes que respondían a IFNγ eran IFN-Phi 1 y Lmp-2 [17]. Lmp-2 participa en la degradación de proteínas intracelulares en péptidos antigénicos y es un buen marcador de la activación de IFNγ. Está bien descrito que en cultivos celulares los genes de IFN en el pez cebra son inducibles por Poly(I:C) [30].

El SVCV^{NP} y el SVCV-IFN^{NP} fueron incluso más eficientes que el Poly(I:C) estimulando la respuesta antiviral en células ZFL, indicando excelentes propiedades inmunoestimulantes en comparación con adyuvantes como Montanide, saponina o péptidos [4, 31, 32, 33].

En las células ZF4 el panorama es ligeramente distinto, y aunque SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} estimularon una respuesta antiviral similar y dentro del rango del Poly(I:C), el SVCV-IFN^{NP} no consiguió inducir la respuesta de IFNγ observada en las células ZFL. López-Muñoz probó previamente la capacidad de IFNγ recombinante de pez cebra expresado en HEK293 para estimular la expresión de genes antivirales como Mx en ZF4 y para prevenir la infección por SVCV [10]. Vale la pena mencionar que la producción de proteínas recombinantes utilizando un sistema bacteriano o un sistema heterólogo de mamífero como HEK293 son sustancialmente diferentes en términos de estructura y bioactividad.

Las larvas de pez cebra mostraron una elevada absorción gastrointestinal y pancreática tanto de SVCV^{NP} como de SVCV-IFN^{NP}, pero nuevamente, las larvas de pez cebra no respondieron a SVCV-IFN^{NP} aunque pudieron montar una buena respuesta específica al virus y proinflamatoria. Resultados similares en larvas de 4 dpf infectadas con SVCV fueron reportados por Lopez-Muñoz et al. [34]. No menos importante, las larvas de pez cebra expuestas a SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} murieron tras ser incubadas (24 h) a la dosis más alta (20 μg/ml). Sin embargo, a dosis de 10 μg/ml sobrevivieron todas las larvas expuestas a SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} que es el doble de la dosis utilizada en el desafío del pez cebra. La toxicidad de IFNγ ha sido descrita previamente por López-Muñoz et al. en embriones de pez cebra microinyectados que sobre expresaron IFNγ [14]. Aunque es difícil comparar la administración por inmersión en baño de IFNγ con la administración por microinyección a embriones de pez cebra.

Es importante destacar que las larvas de pez cebra y las células ZF4 son del mismo origen (embrión) y que las respuestas antivirales contra el antígeno recombinante solo fueron consistentes entre ellas (sobre expresión de Vig-1 y Mx). El sistema inmunitario adaptativo del pez cebra se desarrolla aproximadamente a las 4 semanas de edad [35]. Esto significa que, durante las primeras semanas de desarrollo, el embrión/larva depende únicamente del sistema inmune innato y podría ser que dentro de este periodo los diferentes mecanismos de respuesta antiviral maduren a un ritmo diferente y sólo los sistemas adultos muestren el repertorio completo de mecanismos antivirales. Dios et al. caracterizaron el progreso de la maduración del sistema antiviral en el pez cebra entre 2 y 29 dpf utilizando la expresión de IFNγ y describen como IFNγ empezó a ser detectable a los 14 dpf sin estímulos virales, y a los 8 dpf con estímulos virales. Por el contrario, los genes tipo I de IFN fueron sobreexpresados a altos niveles después de estímulos virales a los 2 dpf [36].

Los peces cebra adultos vacunados con SVCV-IFN^{NP} e infectados con el virus de la SVC, mostraron excelentes niveles de supervivencia en comparación con los peces no vacunados y control. Se ha intentado previamente proteger a la carpa contra el virus de la SVCV utilizando una vacuna de ADN diseñada con un plásmido que impulsa la expresión de la proteína G de SVCV proporcionando diferentes grados de protección contra el virus de la SVC [37, 38] alcanzando algunas de estas vacunas de ADN excelentes niveles de protección incluso a dosis bajas [39]. Estas vacunas experimentales implican el uso de material genético exógeno con las correspondientes preocupaciones de bioseguridad. Otro enfoque exitoso que no implican el uso de material genético exógeno, es la ingeniería de *Lactobacilus* para expresar la proteína G de SVCV en la superficie externa bacteriana [3, 40] obteniendo buenos niveles de protección contra la infección por SVCV. En general, nuestros hallazgos demuestran la capacidad que tienen las vacunas de NP modulares autoadyuvantes para conferir una protección eficiente contra un desafío viral en un contexto bioseguro y barato.

Serán necesarios más estudios para adaptar esta plataforma de vacunación a la administración oral e incorporando los NPs en el alimento para peces, con el fin de ser testeados como vacuna oral contra la infección por el virus de la SVC en especies relevantes para la acuicultura como la carpa, prestando especial atención a la supervivencia y la correlación entre la protección y la respuesta inmunitaria de la mucosa intestinal.

5. REFERENCIAS

[1] U. Ashraf, Y. Lu, L. Lin, J. Yuan, M. Wang, X. Liu, Spring viraemia of carp virus: recent advances, J Gen Virol. 97 (2016) 1037–1051. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000436.

[2] W. Ahne, H. Bjorklund, S. Essbauer, N. Fijan, G. Kurath, J. Winton, Spring viremia of carp (SVC), Dis Aquat Organ. 52 (2002) 261–272. https://doi.org/10.3354/dao052261.

[3] C. Zhang, S. Guo, Z. Zhao, Z.-R. Guo, R. Ma, G.-X. Wang, B. Zhu, Surface display of spring viremia of carp virus glycoprotein on Lactococcus lactis and its protection efficacy in common carp (Cyprinus carpio L.), Fish Shellfish Immun. 104 (2020) 262–268. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.06.021.

[4] P. García-Valtanen, A. Martinez-Lopez, M. Ortega-Villaizan, L. Perez, J.M. Coll, A. Estepa, In addition to its antiviral and immunomodulatory properties, the zebrafish β-defensin 2 (zfBD2) is a potent viral DNA vaccine molecular adjuvant, Antivir Res. 101 (2014) 136–147. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.11.009.

[5] V. Aida, V.C. Pliasas, P.J. Neasham, J.F. North, K.L. McWhorter, S.R. Glover, C.S. Kyriakis, Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine: A Herald to Human Medicine Vaccines, Frontiers Vet Sci. 8 (2021) 654289. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.654289.

[6] A. Isaacs, J. Lindenmann, Virus interference. I. The interferon, Proc Royal Soc Lond Ser B - Biological Sci. 147 (1957) 258–267. https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0048.

[7] S.N. Chen, Z. Gan, J. Hou, Y.C. Yang, L. Huang, B. Huang, S. Wang, P. Nie, Identification and establishment of type IV interferon and the characterization of interferon-υ including its class II cytokine receptors IFN-υR1 and IL-10R2, Nat Commun. 13 (2022) 999. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28645-6.

[8] P. Pereiro, A. Figueras, B. Novoa, Insights into teleost interferon-gamma biology: An update, Fish Shellfish Immun. 90 (2019) 150–164. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.002.

[9] J. Zou, C.J. Secombes, Teleost fish interferons and their role in immunity, Dev Comp Immunol. 35 (2011) 1376–1387. https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.001.

[10] A. López-Muñoz, F.J. Roca, J. Meseguer, V. Mulero, New Insights into the Evolution of IFNs: Zebrafish Group II IFNs Induce a Rapid and Transient Expression of IFN-Dependent Genes and Display Powerful Antiviral Activities, J Immunol. 182 (2009) 3440–3449. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802528.

[11] A.M. Gocher, C.J. Workman, D.A.A. Vignali, Interferon-γ: teammate or opponent in the tumour microenvironment?, Nat Rev Immunol. (2021) 1–15. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00566-3.

[12] J. Zou, A. Carrington, B. Collet, J.M. Dijkstra, Y. Yoshiura, N. Bols, C. Secombes, Identification and Bioactivities of IFN-γ in Rainbow Trout Oncorhynchus mykiss: The First Th1-Type Cytokine Characterized Functionally in Fish, J Immunol. 175 (2005) 2484–2494. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2484.

[13] Z. Gan, S.N. Chen, B. Huang, J. Zou, P. Nie, Fish type I and type II interferons: composition, receptor usage, production and function, Rev Aquacult. 12 (2020) 773–804. https://doi.org/10.1111/raq.12349.

[14] A. López-Muñoz, M.P. Sepulcre, F.J. Roca, A. Figueras, J. Meseguer, V. Mulero, Evolutionary conserved pro-inflammatory and antigen presentation functions of zebrafish IFNγ revealed by transcriptomic and functional analysis, Mol Immunol. 48 (2011) 1073–1083. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.01.015.

[15] D. Aggad, M. Mazel, P. Boudinot, K.E. Mogensen, O.J. Hamming, R. Hartmann, S. Kotenko, P. Herbomel, G. Lutfalla, J.-P. Levraud, The Two Groups of Zebrafish Virus-Induced Interferons Signal via Distinct Receptors with Specific and Shared Chains, J Immunol. 183 (2009) 3924–3931. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901495.

[16] R. Espín-Palazón, A. Martínez-López, F.J. Roca, A. López-Muñoz, S.D. Tyrkalska, S. Candel, D. García-Moreno, A. Falco, J. Meseguer, A. Estepa, V. Mulero, TNFα Impairs Rhabdoviral Clearance by Inhibiting the Host Autophagic Antiviral Response, Plos Pathog. 12 (2016) e1005699. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005699.

[17] D. Sieger, C. Stein, D. Neifer, A.M. van der Sar, M. Leptin, The role of gamma interferon in innate immunity in the zebrafish embryo, Dis Model Mech. 2 (2009) 571–581. https://doi.org/10.1242/dmm.003509.

[18] D. Torrealba, D. Parra, J. Seras-Franzoso, E. Vallejos-Vidal, D. Yero, I. Gibert, A. Villaverde, E. Garcia-Fruitós, N. Roher, Nanostructured recombinant cytokines: A highly stable alternative to short-lived prophylactics, Biomaterials. 107 (2016) 102–114. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.08.043.

[19] S. Mutoloki, H.M. Munang'andu, Ø. Evensen, Oral Vaccination of Fish – Antigen Preparations, Uptake, and Immune Induction, Front Immunol. 6 (2015) 519. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00519.

[20] B. Zhu, C. Zhang, B. Yang, Z.-R. Guo, Y.-Y. Zheng, Y.-M. Gong, G.-X. Wang, Preliminary screening and immunogenicity analysis of antigenic epitopes of spring viremia of carp virus, Fish Shellfish Immun. 94 (2019) 833–841. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.063.

[21] R. Thwaite, J. Ji, D. Torrealba, J. Coll, M. Sabés, A. Villaverde, N. Roher, Protein Nanoparticles Made of Recombinant Viral Antigens: A Promising Biomaterial for Oral Delivery of Fish Prophylactics, Front Immunol. 9 (2018) 1652. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01652.

[22] J. Seras-Franzoso, A. Sánchez-Chardi, E. Garcia-Fruitós, E. Vázquez, A. Villaverde, Cellular uptake and intracellular fate of protein releasing bacterial amyloids in mammalian cells, Soft Matter. 12 (2016) 3451–3460. https://doi.org/10.1039/c5sm02930a.

[23] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method, Methods. 25 (2001) 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

[24] V. Chico, N. Gomez, A. Estepa, L. Perez, Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR, J Virol Methods. 132 (2006) 154–159. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.005.

[25] D. Torrealba, J. Seras-Franzoso, U. Mamat, K. Wilke, A. Villaverde, N. Roher, E. Garcia-Fruitós, Complex Particulate Biomaterials as Immunostimulant-Delivery Platforms, Plos One. 11 (2016) e0164073. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164073.

[26] A. Ruyra, D. Torrealba, D. Morera, L. Tort, S. MacKenzie, N. Roher, Zebrafish liver (ZFL) cells are able to mount an anti-viral response after stimulation with Poly (I:C), Comp Biochem Physiology Part B Biochem Mol Biology. 182 (2015) 55–63. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.12.002.

[27] J. Ji, D. Torrealba, À. Ruyra, N. Roher, Nanodelivery Systems as New Tools for Immunostimulant or Vaccine Administration: Targeting the Fish Immune System, Biology. 4 (2015) 664–696. https://doi.org/10.3390/biology4040664.

[28] F. Castro, A.P. Cardoso, R.M. Gonçalves, K. Serre, M.J. Oliveira, Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion, Front Immunol. 9 (2018) 847. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847.

[29] A. Razaghi, L. Owens, K. Heimann, Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation, J Biotechnol. 240 (2016) 48–60. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.022.

[30] D. Igawa, M. Sakai, R. Savan, An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals, Mol Immunol. 43 (2006) 999–1009. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.05.009.

[31] M.-H. Jung, S. Kole, S.-J. Jung, Efficacy of saponin-based inactivated rock bream iridovirus (RBIV) vaccine in rock bream (Oplegnathus fasciatus), Fish Shellfish Immun. 121 (2022) 12–22. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.047.

[32] A. Miccoli, M. Manni, S. Picchietti, G. Scapigliati, State-of-the-Art Vaccine Research for Aquaculture Use: The Case of Three Economically Relevant Fish Species, Nato Adv Sci Inst Se. 9 (2021) 140. https://doi.org/10.3390/vaccines9020140.

[33] J. Galindo-Villegas, I. Mulero, A. García-Alcazar, I. Muñoz, M. Peñalver-Mellado, S. Streitenberger, G. Scapigliati, J. Meseguer, V. Mulero, Recombinant TNFα as oral vaccine adjuvant protects European sea bass against vibriosis: Insights into the role of the CCL25/CCR9 axis, Fish Shellfish Immun. 35 (2013) 1260–1271. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.046.

[34] A. López-Muñoz, F.J. Roca, M.P. Sepulcre, J. Meseguer, V. Mulero, Zebrafish larvae are unable to mount a protective antiviral response against waterborne infection by spring viremia of carp virus, Dev Comp Immunol. 34 (2010) 546–552. https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.12.015.

[35] S.H. Lam, H.L. Chua, Z. Gong, T.J. Lam, Y.M. Sin, Development and maturation of the immune system in zebrafish, Danio rerio: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study, Dev Comp Immunol. 28 (2004) 9–28. https://doi.org/10.1016/s0145-305x(03)00103-4.

[36] S. Dios, A. Romero, R. Chamorro, A. Figueras, B. Novoa, Effect of the temperature during antiviral immune response ontogeny in teleosts, Fish Shellfish Immun. 29 (2010) 1019–1027. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.08.006.

[37] T. Kanellos, I.D. Sylvester, F. D'Mello, C.R. Howard, A. Mackie, P.F. Dixon, K.-C. Chang, A. Ramstad, P.J. Midtlyng, P.H. Russell, DNA vaccination can protect Cyprinus Carpio against spring viraemia of carp virus, Vaccine. 24 (2006) 4927–4933. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.03.062.

[38] E.J. Emmenegger, G. Kurath, DNA vaccine protects ornamental koi (Cyprinus carpio koi) against North American spring viremia of carp virus, Vaccine. 26 (2008) 6415–6421. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.08.071.

[39] C.W.E. Embregts, D. Rigaudeau, T. Veselý, D. Pokorová, N. Lorenzen, J. Petit, A. Houel, M. Dauber, H. Schütze, P. Boudinot, G.F. Wiegertjes, M. Forlenza, Intramuscular DNA Vaccination of Juvenile Carp against Spring Viremia of Carp Virus Induces Full Protection and Establishes a Virus-Specific B and T Cell Response, Front Immunol. 8 (2017) 1340. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01340.

[40] L.-C. Cui, X.-T. Guan, Z.-M. Liu, C.-Y. Tian, Y.-G. Xu, Recombinant lactobacillus expressing G protein of spring viremia of carp virus (SVCV) combined with ORF81 protein of koi herpesvirus (KHV): A promising way to induce protective immunity against SVCV and KHV infection in cyprinid fish via oral vaccination, Vaccine. 33 (2015) 3092–3099. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.002.

CAPITULO II

Proteína antigénica modular del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) nanoestructurada con IFNγ como alternativa profiláctica de vacunación oral contra IPN virus

Vacuna subunitaria con propiedades adyuvantes para proteger a salmónidos

RESUMEN

La vacunación es la principal herramienta preventiva para controlar la proliferación de enfermedades virales en la industria acuícola. La vacunación oral parece ser el mecanismo idónea para suministrar las vacunas, debido a que no generan estrés en los animales y no requieren de costos adicionales para su administración. En el presente estudio, presentamos un nuevo enfoque de plataforma de vacuna oral nanoestructurada que combina un antígeno viral recombinante de la cápside de IPNV-VP2 con un módulo de IFNγ recombinante de trucha arcoíris (IPNV-IFN^{NP}). El módulo IFNγ proporciona propiedades antivirales adicionales a la vacuna para proteger a truchas juveniles contra el virus IPN. La vacuna nanoestructurada denominada "Nanopellets, NPs", es funcional, fácil de producir a un bajo costo y estable bajo condiciones extremas de pH y temperatura. Los NPs de IPNV-IFNγ fueron sobreexpresados en *E. coli* y purificados mediante métodos de disrupción enzimática y mecánica, y posteriormente caracterizados por microscopía electrónica de barrido (FESEM). IPNV-IFN^{NP} fueron endocitados por macrófagos (RT-HKM) y células intestinales (RTgutGC) de trucha. IPNV-IFN^{NP} indujeron una respuesta antiviral (Vig-1 y Mx), proinflamatoria (IL-1β y CCL4) y de genes asociados a las vías de señalización de IFN (IFNGR2 & IP-10) en cultivos primarios de macrófagos. IPNV-IFN^{NP} indujo una ligera expresión de genes antivirales (Vig-1 y Mx) en las células RTgutGC en comparación a la proteína control iRFP^{NP}, y a la expresión antiviral observada en macrófagos. Sin embargo, el módulo IFNγ estimuló la expresión de la citocina proinflamtoria IL-1β y la quimiocina IP-10 inducible por IFNγ en las RTgutGC. Los NPs modulares de IPNV fueron intubados a truchas juveniles de forma oral, absorbidos por el epitelio del intestino y biodistribuidos e internalizados por macrófagos en el riñón anterior. Mediante clasificación celular (*cell sorting*), fueron aisladas dos poblaciones de leucocitos (denominadas mieloides y linfoides) del intestino posterior de truchas juveniles intubadas con IPNV-IFN^{NP} fluorescentes. La población mieloide mostró sobreexpresión de marcadores de linaje mieloide como MCSFR2a, CD83, MHCI y MHCII y la población linfoide, mostró sobreexpresión de marcadores de linaje linfoide como CD8α, IgM y Lamp3. Además, observamos un aumento de la expresión de quimioquinas proinflamatorias (IL-8 y CCL4) en los leucocitos de las truchas estimuladas con iRFP^{NP} e IPNV-IFN^{NP}, respectivamente. Los resultados sugieren que el antígeno recombinante antiviral combinado con el módulo IFNγ (IPNV-IFN^{NP}) pueden estimular la respuesta inmune antiviral en trucha arcoíris juveniles.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades infecciosas virales que genera mayores pérdidas económicas en la salmonicultura, es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). IPNV es una enfermedad altamente contagiosa que puede alcanzar altas tasas de mortalidad (~100%) en alevines de trucha

arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón del atlántico (*Salmo salar)*, y en juveniles post esmoltificación cuando son transferidos al mar [2, 3]. Los signos clínicos clásicos observados en alevines son la natación errática y anorexia, y la pérdida de apetito, letargia y nado superficial con pérdida de equilibrio tras el proceso de esmoltificación [3, 4]. El agente causal es el virus IPN (IPNV) miembro del género *Aquabirnavirus* de la familia *Birnaviridae*. La transmisión viral puede ocurrir de forma horizontal, ingresando el virus por las branquias o el tracto gastrointestinal, y de forma vertical, transmitiendo la enfermedad a las siguientes generaciones a través de los huevos de reproductores portadores del virus. Además, IPNV puede ser excretado por las heces, la orina, los líquidos de desove y las mucosas externas [5]. En salmón del atlántico cultivado, la selección de peces genéticamente resistentes ha logrado controlar en gran medida los brotes de IPN. Sin embargo, en las últimas décadas en Escocia, Noruega y Chile se han reportado brotes con hallazgos de variantes del virus IPN incluso en salmones genéticamente resistentes que podrían causar grandes mortalidades [4, 6, 7]. IPNV en alevines y smolts de salmón del atlántico cultivados en sistemas de recirculación causa mortalidades acumulada de entre 0,4 y 3,5% [4] y en un brote de IPN en salmones post smoltificados de entre 700-800 g, se reportó que la mortalidad alcanzó hasta un 10% [7]. También se ha indicado que la mayoría de las áreas de cría de salmónidos son endémicas para el IPNV y que probablemente sea la razón por la que entre el 30 y el 40 % de las pisciculturas de salmónidos tienen brotes cada año [8]. IPNV es un virus icosaédrico de una capa sin cubierta con un tamaño aproximado de 60 nm [9]. IPNV tiene un genoma bisegmentado (Segmentos A y B) de doble cadena (dsARN). El segmento A contiene un gran marco de lectura (ORF) que codifica una gran poliproteína (106 kDa) que se corta para generar pVP2, VP4 y VP3, y un pequeño marco de lectura (ORF) que se une al terminal amino de VP5 [10]. La proteína VP2 es el componente principal de la cápside viral y se organiza formando las espigas de la cápside del virus, jugando un papel crucial en el reconocimiento de las células huésped por el virus y la infección [8, 9]. En la **Figura 1** se observa la estructura viral y el genoma de IPNV (https://viralzone.expasy.org).

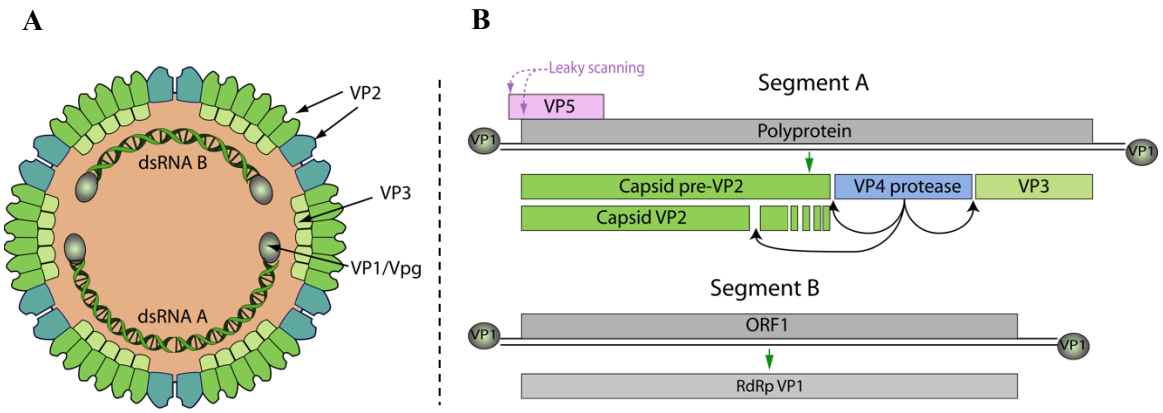


Figura 1. Estructura viral y segmentos del genoma del virus IPN. (**A**) Estructura viral (proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3) y los segmentos del genoma (A y B). (**B**). Representación esquemática del genoma del IPNV en el segmento A (VP2 y VP3 incluidas las proteínas no estructurales VP4 y VP5) y el segmento B que contiene un ORF grande que codifica la proteína VP1. https://viralzone.expasy.org.

La vacunación desempeña un papel importante para controlar y prevenir enfermedades virales en la acuicultura. A la fecha, existen diversos tipos de vacunas comerciales disponibles contra IPNV, especialmente del tipo inactivadas y suministradas por vía intraperitoneal (i.p.) (**Tabla 1, Introducción General**). Sin embargo, se ha reportado que las vacunas disponibles presentan una moderada eficacia [9, 10, 11, 12] y que la probabilidad de atenuar un brote de IPNV depende más de controlar los factores que afectan al estrés fisiológico de los animales, tales como; calidad del agua, densidades de cultivo, correcta alimentación, disminución de la manipulación, temperatura y salinidad del agua [15]. Adicionalmente, la administración de vacunas por inyección es costosa y dificultosa de realizar, además de causar estrés y posibles lesiones a los animales durante la manipulación. En contraste, la vacunación por vía oral parece ser el método de inmunización ideal deseable, seguro, práctico y económico, que evita estresar a los animales pero que debe ser protegido de la degradación gastro intestinal. Un enfoque alternativo es el uso de antígenos virales de proteínas recombinantes como vacunas de subunidad para administración oral. En comparación a las vacunas tradicionales atenuadas o inactivadas, las vacunas de subunidad son seguras y estables. Las vacunas de subunidad no contienen material genético que pueda replicarse en el huésped y pueden ser nanoestructurados con la capacidad de inducir la respuesta inmune mediante el reconocimiento de un antígeno específico [13, 14]. Sin embargo, las vacunas de subunidad en formato de administración oral generalmente requieren de la aplicación de dosis de refuerzo o la adición de adyuvantes que permitan mejorar y/o prolongar la inmunidad en los animales [13, 14] además de considerar proteger a la proteína antigénica de las enzimas y del pH ácido en el tracto gastrointestinal para que el antígeno pueda ser captada por las células inmunitarias presentes en la mucosa o por las células inmunes presentes en la lámina intestinal [15, 16, 17]. Diferentes tipos de vacunas experimentales

encapsuladas para proteger al antígeno de la degradación estomacal han sido reportados; las vacunas encapsuladas en perlas de alginato, quitosano, quitosano-PLGA (poli D, ácido L-láctico-co-glucólico), polímero de quitosano y las mediadas por liposomas [18, 20, 21, 22, 23]. La mayoría de los esfuerzo están puestos en la creación de vacunas de ADN recombinante por su alto nivel de protección. Las vacunas de ADN plasmídico provocan una fuerte respuestas inmune tanto por anticuerpos como a nivel celular [25]. Una vacuna experimental oral de ADN microencapsulada a base de alginato basado en el gen VP2, confirió una importante protección a trucha arcoíris contra IPNV, induciendo Mx y mostrando un 82 % de supervivencia relativa en peces desafiados por inmersión con el virus de IPN 15 y 30 días después de la administración de la vacuna [26]. Reyes et al en una vacuna oral liposomal de ADN contra IPNV en salmón del atlántico reportaron que la vacuna indujo niveles detectables de anticuerpos específicos de VP2 y confirió una protección significativa después del desafío del IPNV, con un porcentaje de supervivencia relativo (RPS) de hasta un 66 %, para dosis doble de 2 mgpDNA/kg de pez día [27]. No obstante, las vacunas de ADN presentan el inconveniente de ser cuestionadas por la opinión pública, factor que podría retrasar significativamente el proceso de registro de estas vacunas [14]. Además, se ha reportado que el alto costo del material encapsulado pareciera no ser realista en la aplicación práctica de las vacunas encapsuladas, y que algunos materiales podrían causar reacciones no específicas y reducir la eficacia de este tipo de vacunas [17], lo que podría responder que a la fecha solo existe una vacuna oral subunitaria encapsulada disponible comercialmente (AQUAVAC® IPN Oral) contra el virus de IPN para su uso en Canadá y USA. Además, que el diseño de estas vacunas debe considerar lidiar con problemas de degradación del antígeno en el entorno gastrointestinal o la tolerancia intestinal, mecanismos que aún siguen siendo poco comprendidos [28].

En este estudio, presentamos el diseño de una plataforma modular de proteína recombinante nanoestructurada como cuerpos de inclusión (IBs) de vacuna de subunidad para administración oral no encapsulada, que hemos denominado “Nanopellets” (NPs). La vacuna de subunidad fue diseñada a base de la proteína antigénica (VP2 cápside) de IPNV combinada con un interferón gamma (IFNγ) de trucha arcoíris (*O. mykiss*) (IPNV-IFN^{NP}) con potencial inmunoestimulante antiviral. Nuestro grupo ya ha demostrado las múltiples ventajas y el potencial adyuvante de las proteínas antigénicas recombinantes como IBs [19, 20, 21, 22]. Buscando potenciar la respuesta antiviral de la proteína antigénica recombinante, combinamos el antígeno con el IFNγ de trucha, debido a que IFNγ es una citocina inmunomoduladora clave implicada en la respuesta inmunitaria antiviral innata y adaptativa con un alto potencial adyuvante. Los IFN son citocinas secretadas por las células que median en el estado de resistencia frente a estímulos externos, o inducen un estado antiviral en las células en respuesta a infecciones virales [23, 24]. En teleósteos, se han identificado dos miembros del IFN de tipo II (IFNγ e IFNγ-rel). Los receptores IFNγ (IFNGR1 e IFNGR2) interaccionan con la superficie

celular y activan la vía de señalización intracelular JAK/STAT [35]. Los interferones (IFN) se han estudiado en varios peces y pueden inhibir la replicación de virus en las células [24, 26, 27]. El IFNγ está implicado en numerosos aspectos de la inmunidad, como la activación de macrófagos y linfocitos T, la mejora de la presentación de antígenos, la proliferación celular, la apoptosis, el tráfico de leucocitos y la inflamación [38]. IFNγ es producido por células implicadas en las primeras etapas de la infección (inmunidad innata) como los macrófagos, además de desempeñar un papel mediador en la respuesta inmune adaptativa, siendo expresado principalmente por $CD4^+$ T helper 1 (Th1) y $CD8^+$ linfocitos citotóxicos en respuesta a antígenos presentados por MHC [27, 29]. En teleósteos, se ha reportado que IFNγ es inducido por VHSV, SVCV, VNNV y IHNV [36]. Además, IFNγ está implicado en la activación y diferenciación de macrófagos hacia macrófagos de tipo M1, que se caracterizan por la producción de citoquinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) e inducen la diferenciación de linfocitos Th1 [38]. Zou y colaboradores, demostraron que un IFNγ recombinante de trucha arcoíris era capaz de aumentar la actividad del estallido respiratorio en macrófagos de riñón anterior, así como que la expresión de STAT1 es estimulada por IFNγ recombinante en líneas celulares de RTS-11 de forma dosis dependiente [40]. En estudios previos, hemos demostrado que los antígenos virales recombinantes nanoestructurados del virus de la septicemia hemorrágica viral ($VHSV^{NP}$), pueden inducir una respuesta inmune en cultivos primarios de macrófagos de riñón anterior de trucha arcoíris [29]. Así mismo, Sun y colaboradores demostraron que el IFNγ estimula la actividad antiviral en líneas celulares de salmón atlántico (TO y ASK, *Atlantic Salmon Kidney*) contra IPNV [41].

En el presente estudio, producimos y purificamos una nueva vacuna subunitaria modular nanoestructurada (IPNV-IFN^{NP}) contra el virus IPN para ser administrada por vía oral. La vacuna modular IFNγ es segura, fácil de producir a bajo costo y funcionalmente activa. Los resultados mostraron que truchas juveniles intubadas oralmente con los NPs combinados con IFNγ (IPNV-IFN^{NP}) son absorbidos por el epitelio gastrointestinal y biodistribuidos al riñón anterior de las truchas en un mayor grado que los NPs sin IFNγ. El módulo recombinante que incluye el IFNγ (IPNV-IFN^{NP}) induce un mayor incremento de la respuesta inmune de genes antivirales, proinflamatorios y de las vías de IFN en macrófagos de truchas juveniles en comparación a IPNV sin IFNγ. Sin embargo, IPNV-IFN^{NP} no induce una respuesta antiviral en líneas celulares del intestino de trucha (RtgutGC), pero si una respuesta inmune proinflamatoria y de la quimiocina IP-10 inducida por interferón gamma. El módulo IFNγ (IPNV-IFN^{NP}) administrado por intubación oral a truchas juveniles estimula a marcadores de genes de respuesta inmune adaptativa en poblaciones de linfocitos aislados del intestino de las truchas. Estos resultados en conjunto mostraron que IPNV-IFN^{NP} puede estimular la respuesta inmune antiviral en truchas juveniles.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño, producción y caracterización de proteínas antigénicas virales nanoestructurada IPNV-IFN^{NP}

El módulo recombinante antigénico IPNV-IFN^{NP} fue diseñado basándose en la secuencia de la proteína de la cápside VP2 de IPNV (1-442, UniProt acc. No: Q703G9) – previamente diseñada por Thwaite et al [29] – unida a la secuencia de interferón gamma (IFNγ) de la trucha arcoíris (*O. mykiss*) (25-180, UniProt acc. No: Q5QSL2) (**Figura 2**). Las secuencias fueron unidas con un péptido enlazador (GGSSRSS) que favorece la flexibilidad, el orden y la formación de los dominios nanoestructurados de forma separada [42]. Las construcciones se optimizaron en codones para su expresión en *E. coli* y se clonaron en pET22b con una etiqueta C-terminal de polihistidinas (6xpolyHis). Los plásmidos se transformaron en *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) para la expresión de la proteína recombinante. La proteína roja fluorescente (iRFP) clonada en pET22b (GenScript) se utilizó como proteína de control inmunológicamente no relevante.

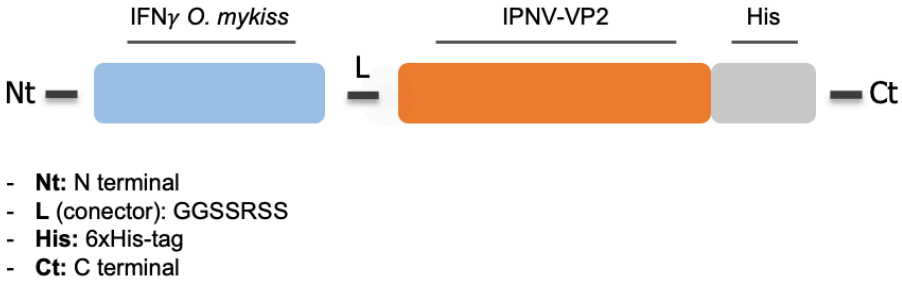


Figura 2. Representación de la plataforma modular funcional de IPNV-IFN^{NP}.

2.2 Producción, purificación, cuantificación y marcado fluorescente de IPNV-IFN^{NP}

La producción de proteínas recombinantes como cuerpos de inclusión (IBs) ha sido descrita previamente por Thwaite et al. [29]. *E. coli* BL21 transformada con el plásmido correspondiente se cultivó durante la noche (O/N) en medio LB (Gibco) con ampicilina (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) y la expresión de la proteína se indujo con 1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG, Panreac) cuando los cultivos frescos alcanzaron una $DO_{550\ nm}$ 0,6-0,9. La expresión se llevó a cabo durante 5 h (IPNV-IFN^{NP}) a 37°C y 250 rpm. Los cultivos fueron purificados mediante disrupción enzimática y mecánica como se ha descrito en el **Capítulo 1** y previamente por nuestro grupo [20, 22]. Las nanoestructuras de IPNV-IFN^{NP} fueron almacenadas a -80ºC hasta su uso. Finalmente, la semicuantificación (western blot) y el marcaje fluorescente de las proteínas (éster Atto-488 NHS),

así como la citometría de flujo (CytoFLEX LX) y la microscopia confocal (Zeiss LSM 700) se realizó según lo indicado en el **Capítulo 1.**

2.3 Caracterización morfométrica de las nanoestructuras proteicas de IPNV-IFN^{NP}

Para determinar la morfología y tamaño de las nanoestructuras o Nanopellets (NPs) se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM). Las muestras se prepararon resuspendiendo los NPs a 100 µg/ml en agua mQ estéril. Los NPs se incubaron en agitación suave a pH 2 y pH 7,4 durante 3 h y a una temperatura de 100ºC durante 5 min. Tras la incubación, todos los NPs se centrifugaron a 10.000xg durante 5 min a 4ºC, se resuspendieron en agua mQ estéril y 20 µl se depositaron sobre chips de silicio y se secaron al aire a temperatura ambiente (O/N). Finalmente, las imágenes se registraron en un microscopio electrónico FESEM (Zeiss Merlin) y se analizaron con el paquete Fiji [43]. Se midieron un mínimo de 60 nanopartículas y se trazaron histogramas de distribución de tamaños con el software Past 4.12 [44].

2.4 Caracterización funcional *in vitro* de IPNV-IFN^{NP} en macrófagos de trucha arcoíris

2.4.1 Cultivos celulares

Macrófagos del riñón anterior de trucha arcoíris (RT-HKM) se obtuvieron de *O. mykiss* (~120 g) según Roher et al. [45]. Los cultivos primarios se mantuvieron en DMEM + GlutaMAX (Gibco), 10% de FBS inactivado por calor y 100 µg/ml de Primocin (Invitrogen) a 18°C y 5% de CO_2. La captación de NPs y la expresión génica se evaluaron el día 5, cuando los monocitos estaban completamente diferenciados a macrófagos. La línea celular intestinal de trucha arcoíris RTgutGC (Rainbow Trout gut Guelph Canada) fueron obtenidas del laboratorio de la Dra. Carolina Tafalla y se cultivaron según Brandts et al. [46] y Kawano et al. [47] a 20ºC en atmósfera sin CO_2, en medio Leibovitz L-15 + GlutaMAX (Gibco), 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor (56°C durante 30 min.) (Gibco) y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (Gibco).

2.4.2 Endocitosis de IPNV-IFN^{NP} por las células RT-HKM y RTgutGC

Para determinar si los cultivos primarios de macrófagos (RT-HKM) y las células del intestino de trucha (RTgutGC) son capaces de internalizar los NPs a diferentes dosis y tiempos, los cultivos celulares fueron expuestos a IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} fluorescentes (Atto-488 NHS). Para los ensayos, se añadió IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} marcados a células RT-HKM y RTgutGC al 80% de confluencia después de 2 h de incubación en medio mínimo. Para los ensayos de dosis-respuesta, a las células se añadió IPNV-IFN^{NP} a 2,5, 5, 10, 20 y 50 µg/ml y se incubaron durante 12 h. Para los ensayos de tiempo-respuesta de endocitosis, las células fueron incubadas con IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} (20 µg/ml)

durante 12 y 24 h. Para los ensayos de endocitosis comparativa entre NPs, las células se incubaron con 20 µg/ml de IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} durante 12 h. Para desprender los macrófagos, las células se tripsinizaron con 1 mg/ml de tripsina (Gibco) y para desprender las RTgutGC, se utilizó un 30% (v/v) de la solución TrypLE™ Express (1X) rojo fenol (Gibco), luego se detuvo el proceso de desprendimiento y las células se precipitaron por centrifugación a 300xg durante 5 min a Tª ambiente. Finalmente, los macrófagos y las células intestinales fueron resuspendidas en PBS para citometría de flujo (CytoFLEX LX) y se analizaron un mínimo de 10.000 eventos utilizando CytExpert 2.4 (Beckman Coulter). Finalmente, los resultados se representaron gráficamente con el paquete Prism 8.01 (GraphPad Prism). Para verificar que los NPs fueron internalizados por los macrófagos y células RTgutGC, se realizó microscopía confocal (Zeiss LSM 700). Los macrófagos y células intestinales fueron sembrados en ibidi µ-Dish de 35 mm y se incubaron O/N a 18°C y 5% de CO_2 y a 20°C sin CO_2, respectivamente. Ambos grupos de células fueron incubadas en un medio mínimo con una confluencia aproximada del 60-70% y, tras 2 h, se añadieron NPs de IPNV-IFN^{NP} a 40 µg/ml e incubaron 14 h. A continuación, el medio fue sustituido y se tiñeron las células con tinción Hoechst (10 µg/ml) y CellMask Deep Red (5 µg/ml) (Life Technologies) y fueron registradas las imágenes de los macrófagos (Zeiss LSM 700) y analizadas utilizando el software Imaris v8.2.1 (Bitplane). Los experimentos de internalización de NPs en RT-HKM y RTgutGC fueron realizados por separado.

2.4.3 Análisis de la expresión génica en células RT-HKM y RTgutGC expuestas a IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP}

Se incubaron macrófagos y células intestinales de trucha con IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} para evaluar si el NP que contienen el módulo IFNγ, inducen una mayor expresión de genes antivirales e inflamatorios asociados al sistema inmune innato en comparación a la proteína recombinante sin IFNγ. Las células intestinales RTgutGC y los cultivos primarios de macrófagos de *O. mykiss* (RT-HKM) se obtuvieron como se describe en la sección **2.4.1.** Los macrófagos diferenciados y las células intestinales se incubaron en medio mínimo durante 2 h y se estimularon durante 15 h con los compuestos indicados. Las células RT-HKM fueron estimuladas con IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} a 20 µg/ml, iRFP^{NP} (como proteína recombinante nanoestructurada inmunológicamente no relevante) a 20 µg/ml, Poly(I:C) como imitador de ARN viral y LPS como imitador bacteriano a 10 µg/ml y se incubaron células sin estímulos como control. Por otro lado, las células RTgutGC fueron estimuladas con IPNV^{NP}, IPNV-IFN^{NP} e iRFP^{NP} a 20 µg/ml, Poly(I:C) a 25 µg/ml y LPS a 50 µg/ml y también se incubaron células sin tratar como control. La expresión génica se realizó según el método descrito en la sección **2.6** del **Capítulo 1.** Brevemente, el ARN total de RT-HKM y RTgutGC se extrajo utilizando TriReagent (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante y el rendimiento y la calidad del ARN se determinaron en Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total de alta calidad utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript

(Bio-Rad). La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizó a 60 °C en un sistema de detección de PCR CFX384 (Bio-Rad) utilizando el kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Cada mezcla de PCR consistió en 5 µl de SYBR Green, 0,4 µM de cebadores específicos, 2 µl de ADNc diluido (1:10) y 2,6 µl de agua (Sigma-Aldrich) en un volumen final de 10 µl. El factor de elongación 1 alfa (EF1-a*)* se utilizó como gen de referencia. Se evaluó la expresión génica de los genes de respuesta inmune (Vig-1, Mx, CCL4, IL-1β, IFNGR2 e IP-10*)*. Las secuencias de los cebadores, los números de acceso y las referencias correspondientes se encuentran en la **Tabla 1**. Las muestras (n = 6 por tratamiento) se analizaron por triplicado y los datos se analizaron mediante el método de Livak [48].

Tabla 1. Cebadores específicos de trucha arcoíris usados para la qPCR.

Gen	Secuencia (5'-3')	N°. de acceso	Referencia
EF1-α	FW_ CAAGGATATCCGTCGTGGCA	NM_001124339.1	Tachi et al. (2010)
	RV_ ACAGCGAAACGACCAAGAGG		
Mx	FW_ ATGCCACCCTACAGGAGATGAT	NM_001171901.1	Thwaite et al. (2018)
	RV_ TGCAGCTGGGAAGCAAACTCC		
Vig-1	FW_ AACGCTGGGGAGAACAGTCT	NM_001124253.1	Thwaite et al. (2018)
	RV_ TCCCCTCTCGGCAATCCA		
CCL4	FW_TGTTCACCCCTCGTCTTGCT	NM_001124489.2	Thwaite et al. (2018)
	RV_ ACATTTCTTCGGTCCGCTTG		
IFNGR2	FW_ GAGTCCATCCAAGTCAGAAAG	EU244877.1	Gao et al. (2009)
	RV_ CCCACTACCAAGACACCCAAC		
IL-1β	FW_ GGAGGCAGCAGCAGCTACCACAAA	XM_036979104.1	Clark et al. (2021)
	RV_ CCGATTTGGAGCAGGACAG		
IP-10	FW_ AGCCACTCCTGCAGGAACAT	AJ417078.1	Zou et al. (2005)
	RV_CACTTCTTCCCTTCTCCGTTCC		
CD83	FW_ TTGGCTGATGATTCTTTCGATATC	AY263797.1	Nombela et al. (2019)
	RV_ TGCTGCCAGGAGACACTTGT		
MHCI	FW_ GACAGTCCGTCCCTCAGTGT	AF287485.1	Chaves-Pozo et al. (2010)
	RV_ CTGGAAGGTTCCATCATCGT		
MHCII	FW_ TGCCATGCTGATGTGCAG	AF115533.1	Jørgensen et al. (2009)
	RV_ GTCCCTCAGCCAGGTCACT		
IL-8	FW_ AGAATGTCAGCCAGCCTTGT	AJ279069.1	Zhang et al. (2001)
	RV_ TCTCAGACTCATCCCCTCAGT		
TGF-β1	FW_GCTGCCGACAACAAAGATAATG	NM_001281368.2	Maehr et al. (2012)
	RV_GTGCCAGCGATCTCCATGT		
IL-10	FW_ CGACTTTAAATCTCCCATCGAC	AB118099.1	Inoue et al. (2005)

Gen	Secuencia (5'-3')	N°. de acceso	Referencia
	RV_ GCATTGGACGATCTCTTTCTTC		
Lamp3	FW_ CATGAAAAGCTGTTCCCAACTGC	HE608240.1	Johansson et al. (2012)
	RV_ GCACTCAACCTCCTCTCCAAAC		
CLEC4T1	FW_ACCACTGACCACAGCGAATTG	NM_001281394.2	Johansson et al. (2016)
	RV_AACATTTCTCATCATTCCACCAC		
IgM	FW_ CTTGGCTTGTTGACGATGAG	S63348.1	Andersson et al. (1993)
	RV_ GGCTAGTGGTGTTGAATTGG		
IgT	FW_CATCAGCTTCACCAAAGGAAGTG	AY870268.1	Attaya et al. (2020)
	RV_TCACTTGTCTTCACATGAGTTACCC		
CCR11	FW_GCTAATTGATCATTAATTATACCTGACAA	KM516345.1	Zhitao et al. (2017)
	RV_ ATGACGCCCACGATGAAGAC		
CLEC4T1	FW_ACCACTGACCACAGCGAATTG	NM_001281394.2	Johansson et al. (2016)
	RV_AACATTTCTCATCATTCCACCAC		
MCSFR2a	FW_GACTTTGCCCCTCCAGAGATATACAC	AB091826.1	Attaya et al. (2020)
	RV_ATCACAATCCTCACTAATCTTAGCTTGG		
MCSFR2b	FW_CAGACTTTGCCCCTCCAGAAATATAC	HG794517.1	Attaya et al. (2020)
	RV_TGTCTGATCACAATCCCCATTC		
CD11b	FW_ GAAATTCACTGGGGATAGAGAAACAG	AM713180.2	Mikrout et al 2009
	RV_ CTACTCCAACTCCTGTCCCTATTATC		

2.5 Caracterización funcional *in vivo* de los NPs tras la intubación oral en la trucha arcoíris

2.5.1 Cultivo de trucha arcoíris

Truchas juveniles (*O. mykiss*) de entre 100 y 140 g fueron obtenidas de un centro de producción de truchas y mantenidos en el estabulario de la UAB (Ref: ES082660037080) en un sistema de recirculación y en un estanque de 1,2 m^3 a una densidad de 13 kg/m^3 a ~16ºC y fotoperiodo 12 h:12 h. Los peces fueron alimentados diariamente con una dieta comercial al 2% de su peso corporal. Las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato fueron monitoreados y controlados diariamente. Los experimentos se realizaron siguiendo los Principios Rectores Internacionales para la Investigación con Animales (EU 2010/63).

2.5.2 Endocitosis y biodistribución de $IPNV^{NP}$ e $IPNV\text{-}IFN^{NP}$ tras una intubación oral

Para evaluar si los NPs son absorbidos por el epitelio gastrointestinal y tienen capacidad para alcanzar el riñón anterior de truchas juveniles, se administraron por intubación $IPNV^{NP}$ e $IPNV\text{-}IFN^{NP}$. Para

el ensayo, se dejaron en ayuno 4 truchas por tratamiento durante al menos 48 horas antes de las intubaciones. Antes de la intubación, cada pez fue anestesiado con MS-222 (50 mg/l) (Sigma-Aldrich) y pesado (140 ± 23 g). A continuación, los NPs de IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} marcados con fluorescencia se resuspendieron en PBS y se administraron a 6 mg/kg de pez utilizando una jeringa de insulina con una aguja 22G con un fino tubo de silicona dispuesto sobre la aguja para asegurar que los NPs alcancen el esófago sin causar daño tisular. Los peces control fueron intubados con PBS (1 ml). Los animales fueron monitorizados individualmente durante 5 min después de la intubación y devueltos a los tanques experimentales por grupo tratado. 24 h después de la intubación, los peces fueron sacrificados por sobredosis de anestesia (150 mg/l), y el riñón anterior fue diseccionado, homogeneizado y las células cultivadas durante 48 h. Las células fueron separadas y centrifugadas a 300 xg durante 5 min a temperatura ambiente, resuspendidas en PBS y al menos 10.000 eventos fueron analizados por citometría de flujo (CytoFLEX LX).

2.5.3 Respuesta inmune en los leucocitos intestinales tras la intubación oral con IPNV-IFN^{NP}

Para evaluar la respuesta inmune local en el intestino, se intubaron individuos de trucha arcoíris (117 ± 3 g) con IPNV-IFN^{NP}, y se aislaron poblaciones de células linfoides y mieloides del intestino mediante clasificación celular por citometría de flujo (*cell sorting*). Se intubaron tres animales por tratamiento (6 mg/kg) y mantuvieron como se describe en la sección **2.5.1**. Los peces control fueron intubados con PBS (1 ml) e iRFP^{NP} (6 mg/kg pez). A las 24 h de la intubación, las truchas fueron sacrificadas mediante sobredosis de MS-222 (150 mg/l) y el intestino posterior retirado y lavado (PBS). A continuación, el intestino posterior se mezcló con colagenasa tipo IV (Gibco) a 1,5 mg/ml y se incubó bajo agitación circular (Roller, Selecta) durante 1 h a temperatura ambiente (RT) en oscuridad. Las células se recuperaron del homogeneizado intestinal utilizando un colador celular de 100 µm, se lavaron con PBS y se pelletearon por centrifugación a 400xg, 10 min a 4°C. Por último, las células se resuspendieron en PBS y las poblaciones de leucocitos se clasificaron y aislaron según su tamaño, complejidad y fluorescencia (perfil FSC/SSC/FITC), utilizando un separador celular (FACSJazz BD cell sorter). Las células clasificadas se recogieron en TriReagent y se almacenaron a -80ºC hasta su uso. El análisis de la expresión génica se realizó como se describe en la sección **2.4.3**, utilizando un panel de genes implicados en la respuesta inmune innata (Vig-1, Mx, CCL4*,* IL-1β, IFNGR2, IP-10*,* TGFβ, IL-10 e IL-8*)* y en la inmunidad adaptativa (CD4, CD8α, MCSFR2a, MCSFR2b, CD11b, CLECT4T1, Lamp3, CD83, MHCI, MHCII e IgM). Las secuencias de los cebadores y los números de acceso se encuentran en la **Tabla 1.**

2.6 Estadísticas

La estadística se realizó con GraphPad Prism 8.01 para Windows. Las comparaciones de medias para cada grupo experimental respecto al control y entre tratamientos se analizaron mediante ANOVA unidireccional, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett o prueba t unilateral sin pares con corrección de Welch para varianzas desiguales, o prueba no paramétrica de Mann-Whitney sin pares. Los datos se presentan como media ± desviación estándar (DE) y ns: no significativo; *p < 0,1; **p < 0,05; ***p < 0,01; ****p < 0,001 se consideró estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de las proteínas virales antigénicas modulares nanoestructuradas IPNV-IFN^{NP}

3.1.1 Características morfométricas de IPNV-IFN^{NP}

Se ha producido una proteína modular recombinante (IPNV-IFN^{NP}) combinando la secuencia de la proteína del antígeno VP2 de IPNV con la secuencia de IFN gamma de trucha arcoíris. Para efectos comparativos, también fue producido la proteína antigénica recombinante de IPN virus sin el módulo IFNγ (IPNV^{NP}) producida y reportada por Thwaite et al [29]. El rendimiento de producción promedio de IPNV-IFN^{NP} fue de 13,7 mg/l similares a los rendimientos obtenidos en VHSV^{NP} (14 mg/l) y VHSV-IFN^{NP} (14,2 mg/l) (datos no publicados). Por otra parte, el rendimiento promedio de IPNV^{NP} fue de 4,8 mg/l igual a los promedios obtenidos previamente por nuestro grupo (5 mg/l) (datos no publicados) y comparables a los obtenidos en IPNV-IFNγ-CCR5^{NP} (4,7 mg/l) (**Capitulo 3**) y altos en comparación a los niveles de producción alcanzados para los NPs de SVCV que fueron de 0,3 mg/l (SVCV^{NP}) y 3,6 mg/l (SVCV-IFN^{NP}), respectivamente. En algunas proteínas recombinantes los rendimientos de producción pueden ser variables entre producciones (datos no publicados). Además, el rendimiento es dependiente de la secuencia de los NPs y del tamaño de la proteína recombinante, debiendo ser probados empíricamente para cada proteína e incluso escalando la producción con un biorreactor (datos no mostrados). IPNV-IFN^{NP} se nanoestructura de forma consistente y robusta entre producciones, y presenta una forma generalmente oviforme con una superficie porosa (**Figura 2**) y de características similares a IPNV^{NP} sin el módulo de IFNγ [29]. La longitud media de IPNV-IFN^{NP} es de 937 ± 156 nm (**Figura 2**) y la de IPNV^{NP} es 734 ± 195 nm [29].

La longitud media de IPNV-IFN^{NP} incubada a pH 2 (1151± 234 nm) y a 100ºC (902 ± 172 nm) (**Figura 2B, 2C**) es similar a la longitud en condiciones controladas (**Figura 2A**). Asimismo, la morfología de los NPs se mantiene intacta demostrando que los NPs no pierden las propiedades

estructurales en condiciones extremas de pH y temperatura, por lo que podrían ser capaces de soportar el ambiente acido característico del estómago en especies de salmónidos [49] y las altas temperaturas que regularmente son utilizadas en el proceso de extrusión para elaborar pienso, no requiriendo métodos de encapsulación. Los NPs son proteínas agregadas puras, mecánicamente estables, funcionalmente activas y fáciles de producir y aislar desde *E. coli* a un reducido costo y con un alto rendimiento y fácilmente escalables. En contraste a las proteínas solubles, los NPs tienen una mayor estabilidad y pureza debido a que mantienen su estructura secundaria y porque están formadas esencialmente por la proteína recombinante de interés [40, 41, 42]. Por otro lado, para diseñar una vacuna que incluya citocinas recombinantes nativas como adyuvante, se debe tener en cuenta que las citocinas nativas tienen tiempos de vida media muy cortos, que están en el rango de minutos [53]. Esto hace necesaria su encapsulación para evitar la degradación por las enzimas presentes en el tracto intestinal y aplicar una administración frecuente que aumenta la posibilidad de generar efectos secundarios en el hospedador [22, 43, 44]. En nuestro caso la proteína antigénica que incluye IFNγ recombinante demostró ser segura, estructuralmente estable y funcional para su uso como adyuvante, debido a que es capaz de tolerar condiciones ambientales extremas. Lo mismo fue observado con los NPs de SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} (**Capítulo 1**) y en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación quienes reportaron que citocinas recombinantes (CCL4^{NP} y TNFα^{NP}) producidas como NPs son capaces de mantener su funcionalidad y mantener la morfología intacta cuando se exponen a condiciones extremas de pH y temperatura [32]. También hemos demostrado que VHSV-IFN^{NP} es capaz de mantener el mismo peso molecular después de pasar por un proceso de extrusión de pienso. Este pienso al ser administrado a truchas juveniles estimula la respuesta inmune ya que se observa la inducción de la producción de anticuerpos específicos del virus VHS 30 días post vacunación oral (datos no publicados).

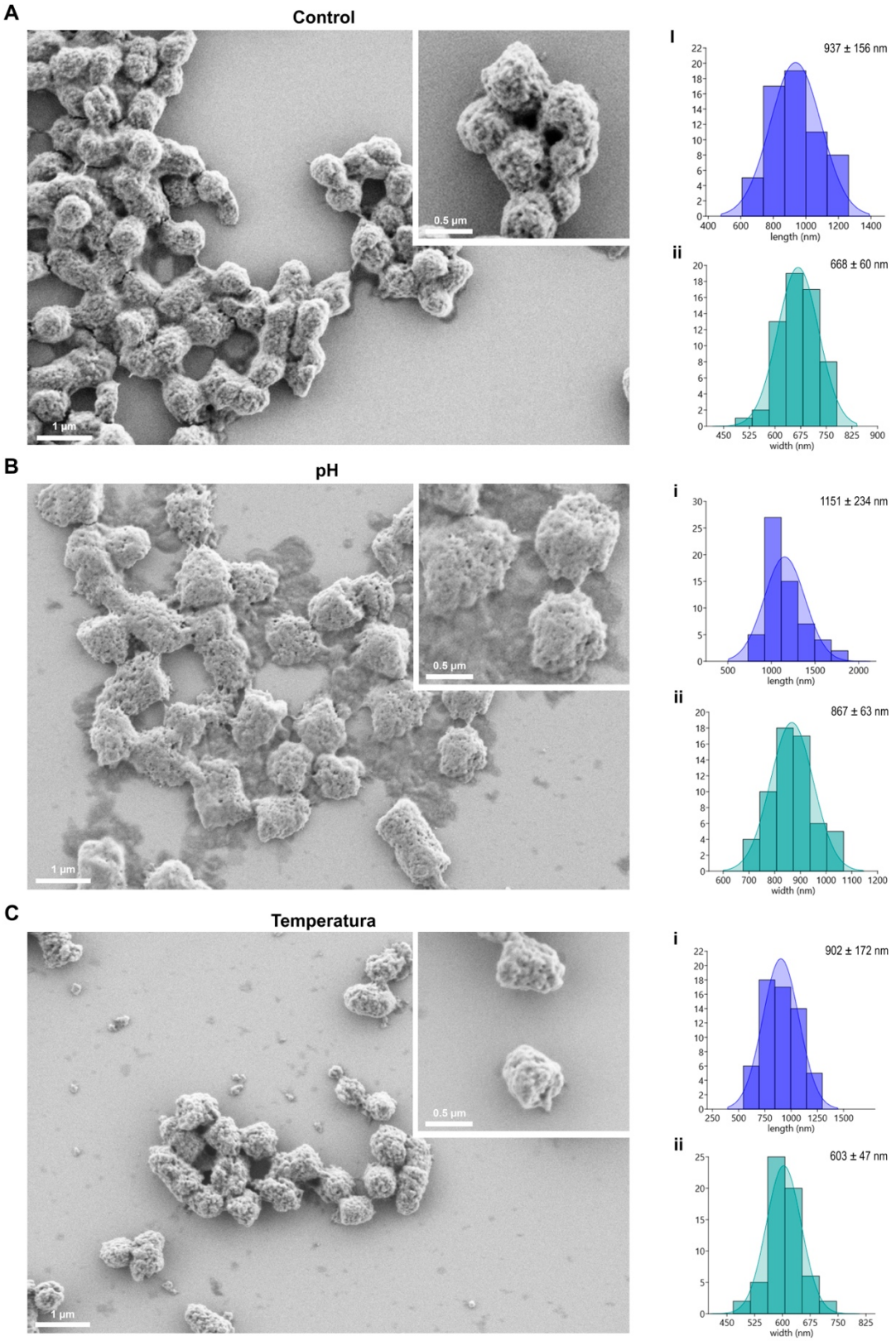


Figura 2. Caracterización de la proteína antigénica nanoestructurada IPNV-IFN^{NP} en condiciones extremas de pH y temperatura. Imágenes FESEM de IPNV-IFN^{NP} (**A**), IPNV-IFN^{NP} expuestas a pH

2 (**B**) y a temperatura de 100ºC (**C**). Histogramas de distribución de tamaños de longitud (**i**) y anchura (**ii**) (n=60) de IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN^{NP}.

3.1.2 Endocitosis del módulo antigénico viral nanoestructurado IPNV-IFN^{NP} por macrófagos de head kidney (HKM) y células RTgutGC.

Los cultivos primarios de macrófagos y las células intestinales de trucha internalizaron los NPs (IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP}). En los ensayos de dosis-respuesta, una media de 77% de células positivas de RT-HKM endocitaron IPNV-IFN^{NP}, considerando todas las dosis, alcanzando un promedio de 73 ± 8%, 84 ± 9%, 86 ± 10% y 88 ± 9% de células positivas a 5, 10, 20 y 50 µg/ml, respectivamente. Además, se observó un aumento de la intensidad media de fluorescencia (IFM) a medida que aumentaba la dosis (**Figura 3A**). Anteriormente habíamos descrito la susceptibilidad de las células a internalizar más NPs a medida que aumentaba la dosis [29]. Para los ensayos de tiempo-respuesta, fue seleccionada la dosis de 20 µg/ml. En los ensayos de tiempo-respuesta, las células RT-HKM tratadas con IPNV-IFN^{NP} muestran el mismo porcentaje de células fluorescentes positivas (<90%) e intensidad de fluorescencia media a las 12 y 24 h (**Figura 3B**), resultados similares a los observados con SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}. Los ensayos de endocitosis comparativa en células HKM expuestas a IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} a 20 µg/ml muestran un alto (<90%) y similar porcentaje de células positivas entre los NPs, y una leve disminución en la intensidad de fluorescencia de IPNV-IFN^{NP} en comparación a IPNV^{NP}, pero sin detectar diferencias significativas (**Figura 3C**).

Los ensayos de dosis-respuesta en RTgutGC tratadas con IPN-IFN^{NP} mostraron un promedio de 84% de células positivas considerando todas las dosis, con una media de 87 ± 4%, 99 ± 0,4%, 99,7 ± 0,05% y 90 ± 4% de células positivas a 5, 10, 20 y 50 µg/ml, respectivamente (**Figura 3D**). Se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia en las RTgutGC a medida que aumentaba la dosis al igual que con los macrófagos. Para los ensayos de tiempo-respuesta, fue seleccionada la dosis de 20 µg/ml. Los ensayos de tiempo-respuesta de las células RTgutGC tratadas con IPNV-IFN^{NP} a 20 µg/ml muestran el mismo porcentaje (~100%) de células positivas a las 12 y 24 h pero la intensidad de fluorescencia disminuye a las 24 h (**Figura 3E**). La disminución de la intensidad de fluorescencia de los NPs también fue observada por Thwaite et al [29], pero a las 48 h post tratamiento, indicando que posiblemente las células comenzaron a metabolizar los NPs entre las 24 h y las 48 h. En ese sentido, también podríamos suponer que las RTgutGC comenzaron a metabolizar los NPs a las 24 h, debido al rápido y alto porcentaje de células positivas (~100%) observadas a las 12 h. Los ensayos de endocitosis comparativa entre IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} a 20 µg/ml muestran un alto (~100%) y similar porcentaje de células intestinales positivas y se observó prácticamente el doble de intensidad de fluorescencia promedio en las células RTgutGC tratadas con IPNV-IFN^{NP} en comparación a las tratadas con IPNV^{NP} (**Figura 3F**). Esto podría deberse a que los NPs se estarían

uniendo a los receptores de IFN promoviendo la internalización de IPNV-IFN^{NP} en las células intestinales. Adicionalmente, el alto porcentaje de internalización de los NPs en las RTgutGC puede explicarse debido a la capacidad que tienen las células epiteliales de absorber macromoléculas. Las RTgutGC son células intestinales originalmente obtenidas del intestino posterior de la trucha y se ha reportado que las células epiteliales del intestino distal en peces presentan grandes vacuolas y participan en la absorción y transporte de partículas y macromoléculas [48, 49]. Además, estas células se caracterizan por presentar numerosos microvellos, una red vesicular sobredesarrollada y lisosomas, siendo absorbidas las proteínas por diferentes vías como la transcitosis o la pinocitosis [56].

En general, hemos observado un alto porcentaje de macrófagos (RT-HKM) y células intestinales (RTgutGC) capaces de internalizar IPNV-IFN^{NP} (**Figura 3**), lo que concuerda con las imágenes de microscopia confocal donde se observa la acumulación de IPNV-IFN^{NP} fluorescente en el citosol tanto en macrófagos como en células RTgutGC en al menos en un 70% de las células tras 14 h de exposición (**Figura 4B, 4E**). Hemos observado lo mismo con los NPs de SVCV-IFN^{NP}, IPNV-IFN-CCR5^{NP} y VHSV-IFN^{NP} (datos no publicados), y en estudios anteriores con citocinas nanoestructuradas (TNFα y CCL4) [32] y proteínas antigénicas recombinantes [29] donde ha sido reportado que los NPs tienen la capacidad de ser internalizados rápida y fácilmente por macrófagos de trucha y células ZFL (*zebrafish liver*) e inducir un incremento de la expresión de genes de respuesta inmune antiviral, proinflamatoria y de vías de señalización. Estos resultados coinciden con los resultados de expresión génica antiviral y proinflamatoria observados en el presente estudio en macrófagos HK tratados con IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} (**Figura 5**). Sin embargo, la acumulación de IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} en células RTgutGC parece no ser suficiente para inducir la expresión de genes de actividad antiviral (Vig-1 y Mx) en los cultivos celulares intestinales (**Figura 6**) discutido en la sección **3.1.3.**

Los patógenos o proteínas antigénicas pueden cruzar las barreras epiteliales de varias maneras: a través de uniones estrechas entre las células, a través de la transcitosis o el citoplasma sin una vesícula, o a través de áreas dañadas del epitelio. Estas rutas son utilizadas por diferentes patógenos que infectan a los mamíferos en el tracto gastrointestinal, pero poco se conoce de las rutas de los patógenos en el intestino de los peces [55]. Estudios que nos permitan entender los mecanismos celulares por los cuales nuestras nanoestructuras recombinantes son endocitadas y donde son internalizadas necesitan ser elaborados. La endocitosis describe dos mecanismos de absorción celular diferentes: la pinocitosis, que absorben moléculas dentro de pequeñas vesículas, formando protruciones en la membrana celular externa que luego se fusionan de nuevo con la membrana celular y la fagocitosis, llevada a cabo por fagocitos profesionales que engullen partículas más grandes, como microorganismos y desechos celulares [57]. La pinocitosis cubre la endocitosis mediada por

receptores o macropinocitosis, la endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina y la endocitosis independiente de clatrina y caveolina [57]. Las células están equipadas con diferentes vías de endocitosis que posteriormente determinan el tráfico y el destino intracelular de las partículas en compartimentos específicos, tales como endosomas y lisosomas [50, 51]. Nuestro grupo ha reportado que nanopartículas fluorescentes de poliestireno son exitosamente endocitadas por células ZFL y macrófagos de trucha y acumuladas principalmente en los lisosomas [46]. Kuhn et al. en células humanas demostraron con partículas de poliestireno fluorescentes, que el tamaño de las partículas (40 nm y 1 μm), las vías de endocitosis y los tipos de células (en este caso macrófagos y células epiteliales) fueron determinantes en la interacción y la absorción de las partículas [57], lo que en algún grado puede responder a las diferencias observadas tanto en la internalización como en la respuesta inmunológica de las células RT-HKM y RTgutGC tratadas con nuestros NPs, resguardando las diferencias de comparar entre un bionanomaterial y nanopartículas inertes. Se ha demostrado que IPNV entra en células embrionarias CHSE-214 y en células de macrófagos de salmón del atlántico SHK-1 por macropinocitosis [52, 53]. En nuestro grupo también se ha demostrado que células ZFL y macrófagos de trucha tratadas con liposomas encapsulados fluorescentes con Poly(I:C) y LPS fueron eficientemente endocitados y metabolizado por el sistema lisosomal/endosomal, siendo internalizadas preferentemente mediante la endocitosis dependiente de caveolas y en menor grado por la endocitosis mediada por clatrina, además de estimular la expresión de varias citoquinas involucradas en la respuesta antiviral y bacteriana [61]. Los compartimientos lisosomales/endosomales tienen la característica de presentar receptores TLR3 en su superficie y de realizar el procesamiento de MHCII [62]. Por lo tanto, de la misma forma – mediante marcajes por fluorescencia - sería atractivo verificar las vías de endocitosis por las cuales los NPs nanoestructurados son internalizados en las membranas de las células y si son metabolizados en los compartimentos lisosomales/endosomales a péptidos e inducir una respuesta inmune celular.

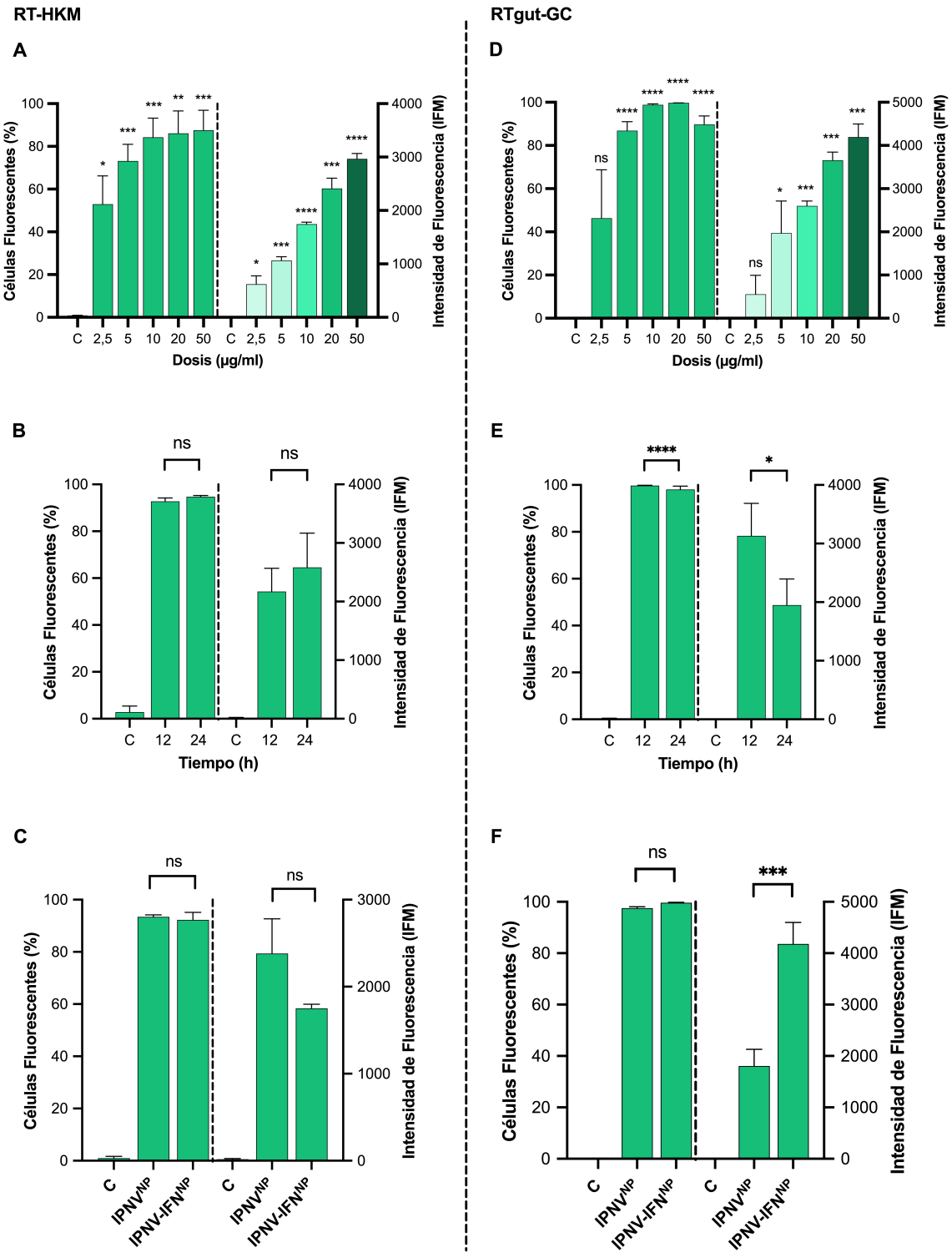


Figura 3. Endocitosis de IPNV-IFN^{NP} por RT-HKM y RTgutGC. Los macrófagos (RT-HKM) y las células intestinales (RTgutGC) de trucha se trataron con NPs fluorescentes y analizaron por citometría de flujo: (**A, D**) Dosis-respuesta, (**B, E**) tiempo-respuesta y (**C, F**) endocitosis comparativa. Para los ensayos de dosis-respuesta, se añadieron de 2,5 a 50 µg/ml de IPNV-IFN^{NP} a células HKM (**A**) y RTgut (**D**) y se incubaron durante 12 h. Para los ensayos de tiempo-respuesta,

los macrófagos (**B**) y las células intestinales (**E**) se incubaron durante 12 h y 24 h a 20 µg/ml. Para los ensayos de endocitosis comparativa, se añadieron 20 µg/ml de NPs ($IPNV^{NP}$ vs. $IPNV\text{-}IFN^{NP}$) a los macrófagos (**C**) y las células intestinales (**F**) y se incubaron durante 12 h. Las diferencias entre medias se analizaron mediante un ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, tratamientos frente a control. Niveles de significancia: ns, no significativo; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

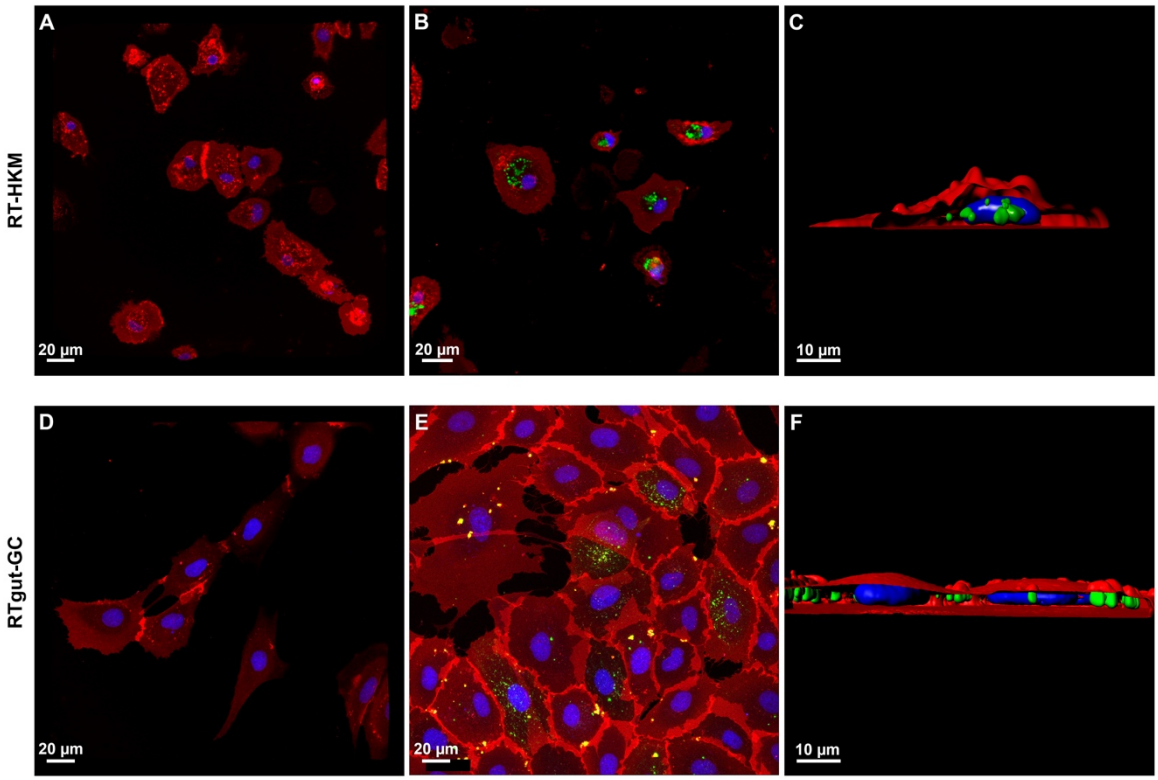


Figura 4. Microscopía confocal e imágenes digitalizadas (z-stacks) de RT-HKM y RTgutGC con $IPNV\text{-}IFN^{NP}$. Macrófagos HK y células RTgutGC fueron tratadas con $IPNV\text{-}IFN^{NP}$ a 40 µg/ml y se incubaron durante 14 h. Macrófagos sin tratar (**A**). Macrófagos tratados con $IPNV\text{-}IFN^{NP}$; (**B**) microscopía confocal y (**C**) imagen digitalizada (z-stacks). Células RTgutGC no tratadas (**D**). Células RTgutGC con $IPNV\text{-}IFN^{NP}$; (**E**) microscopía confocal y (**F**) imagen digitalizada (z-stacks). Los NPs están marcados en verde, la membrana celular en rojo y los núcleos en azul.

3.1.3 Análisis de la expresión génica en células RT-HKM y RTgutGC estimuladas con $IPNV^{NP}$ e $IPNV\text{-}IFN^{NP}$

Se realizaron ensayos *in vitro* con cultivos celulares de macrófagos de trucha y en líneas celulares de intestino de *O. mykiss* tratadas con los NPs ($IPNV^{NP}$ vs. $IPNV\text{-}IFN^{NP}$) para evaluar si la proteína antigénica recombinante de IPNV unida a la secuencia de IFNγ es capaz de evocar una respuesta

inmune antiviral. Se utilizó un grupo de genes marcadores; Vig-1 y Mx para la actividad del antígeno VP2 de IPNV, IP-10 e INFGR2 para la actividad de IFNγ e IL-1β y CCL4 para los contaminantes procedentes de la purificación bacteriana de los NPs. Se utilizó LPS como control positivo de los estímulos bacterianos y Poly(I:C) fuerte estimulador antiviral [63] como control positivo que imitar dsRNA viral.

IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} (20 μg/ml) y Poly(I:C) (10 μg/ml), indujeron una sobreexpresión significativa de los genes antivirales (Vig-1 y Mx*)* en macrófagos en comparación a las células control sin tratar y no se observaron diferencias significativas entre los NPs (IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP}) e iRFP^{NP} (20 μg/ml) (Figura 5). Previamente, Thwaite et al. reportó que IPNV^{NP} induce la sobreexpresión de Vig-1 y Mx en cultivos primarios de macrófagos de trucha [29]. Así mismo, en el **Capítulo 1** reportamos que SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} estimulan la expresión de estos mismos genes en células ZFL, siendo significativamente mayor la expresión cuando las células fueron tratadas con SVCV-IFN^{NP} en comparación al antígeno recombinante sin IFNγ (SVCV^{NP}). También en el **Capítulo 3**, volvimos a observar que la proteína recombinante IPNV que contienen IFNγ con una secuencia de una quimiocina ligando (IPNV-IFN-CCR5^{NP}) induce una fuerte respuesta antiviral (Vig-1 y Mx*)* en cultivos primarios de macrófagos. Es sabido que los IFN interfieren en la replicación viral y que IFNγ es principalmente secretado por células T h1 (helper) y células presentadoras de antígenos tales como NK (*Natural killer*) y macrófagos, que están encargadas de orquestar la respuesta inmune antiviral [29, 30, 41]. Sun et al [41] evaluaron la actividad antiviral contra IPNV reportando que IFNγ recombinante de trucha induce la expresión de Mx y Viperin (Vig-1) en cultivos celulares de salmónidos (*TO* y *ASK cells*). Estos resultados son comparables a los nuestros y evidencian que IFNγ combinado con un antígeno viral tiene potencial inmunoestimulante con la capacidad de montar un estado inicial de respuesta inmune antiviral. Adicionalmente, los NPs (IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP}) al igual que Poly(I:C) indujeron la expresión del receptor de IFNγ (IFNGR2) y la quimiocina inducida por interferón gamma IP-10 (CXCL10) a niveles significativamente mayores que la proteína inmunológicamente no relevante iRFP^{NP}. IP-10 desempeñar un papel importante en el tráfico y atracción de células T activadas a los sitios de inflamación [65] .Sun et al [41] también ha reportado que IFNγ es más efectivo induciendo IP-10. Estos resultados sugieren que los NPs se pueden estar uniendo a los receptores de IFN en los macrófagos promoviendo la internalización de los NPs y la inducción de las vías de señalización de IFN. IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} también indujeron la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1β y CCL4 a niveles significativamente mayores que la proteína control iRFP^{NP} en macrófagos. La expresión de estos genes inflamatorios también ha sido observada en cultivos primarios de macrófagos tratados con VHSV^{NP} y VHSV-IFN^{NP} (datos por publicar) y en células ZFL estimuladas con NPs de SVCV (SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP}) (**Capítulo 1**).

Buscando evaluar la funcionalidad de los NPs en el epitelio del intestino de *O. mykiss*, órgano diana de IPNV y una de las principales puertas de entrada de los virus [66], hemos realizado ensayos *in vitro* de respuesta inmune innata en células RTgutGC tratada con los NPs. $IPNV^{NP}$ e $IPNV\text{-}IFN^{NP}$ (20 µg/ml) no estimularon la expresión de genes antivirales (Vig-1 y Mx). Sin embargo, Poly(I:C) (25 µg/ml) dsADN control sintético que imita una infección viral y la proteína control no inmunológicamente relevante $iRFP^{NP}$ (20 µg/ml) que presentaría los mismos contaminantes bacterianos que se arrastran durante la purificación de los NPs ($IPNV^{NP}$ e $IPNV\text{-}IFN^{NP}$), indujeron una fuerte sobreexpresión de Vig-1 y Mx en las células RTgutGC (**Figura 6**).

Está ampliamente descrito que el Poly(I:C) induce un estado antiviral que puede llegar incluso a limitar la replicación viral celular [67]. También se ha reportado que Poly(I:C) a dosis similares a las usadas por nosotros (20 µg/ml), induce una sobreexpresión de genes antivirales (Mx1) en RTgutGC estimuladas durante 24 h. En el mismo estudio, células RTgutGC estimuladas con el virus de IPN, incrementaron la expresión de Mx1 e IL-1β. También observamos que el módulo que incluye IFNγ ($IPNV\text{-}IFN^{NP}$) induce significativamente la expresión de IL-1β en comparación a $IPNV^{NP}$, no así la respuesta antiviral con ambos NPs, la cual ha sido débil en contraste a Poly(I:C) que ha estimulado fuertemente la expresión de genes antivirales y de vías de señalización en las RTgutGC.

Probablemente los receptores de patrones de reconocimiento (PRR) no reconocieron la proteína recombinante antigénica VP2 de IPNV. Para detectar una infección, un estimulador viral como Poly(I:C) debe ser reconocido en el interior de la célula por el receptor TLR3 que está localizado en la membrana de los endosomas [61, 62]. Sin embargo, Zhou et al. detectaron que no todos los tipos de células reaccionan a Poly(I:C). Además, reportaron que la eficiencia de activación de los TLR3 por Poly(I:C) puede estar muy influenciada por factores tales como el tamaño y estructura de la molécula, método de entrega y el tipo de células [69]. Estos resultados podrían hacernos hipotetizar que tanto las características de nuestros NPs como la vía de internalización y el tipo de célula podrían estar implicados en la no unión a receptores de activación antiviral lisosomal intracelular en las RTgutGC.

Por otra parte, aunque las RTgutGC presentaron una gran capacidad de internalizar macromoléculas como hemos mencionado y podido comprobar con nuestros NPs (**Figura 3 y 4**), nosotros hipotetizamos que las células epiteliales no respondieron bien a los estímulos inmunes antivirales de nuestros NPs, posiblemente debido a que son células epiteliales derivadas de la parte distal del intestino con características inmunocompetentes menos especializadas que los leucocitos. El epitelio intestinal distal - compuesto principalmente de enterocitos - es el principal sitio de absorción de macromoléculas y comparten diferentes características morfológicas y funciones fisiológicas con las secciones anteriores del intestino en peces, tales como; la digestión, la absorción de nutrientes, la

osmorregulación y un rol inmunológico importante como barrera física contra los patógenos y con la capacidad de internalizar antígenos [20, 62, 63] pero que requiere de la presencia de las células presentadoras de antígenos y linfocitos T y B para inducir una activación potente y sistémica del sistema inmune [55].

Las células del epitelio intestinal es una monocapa compuesta principalmente por enterocitos (células absorbentes), así como por células caliciformes, células endocrinas y células inmunes [55]. Las células epiteliales o enterocitos ofrecen una protección efectiva como barrera contra patógenos mostrando el contenido luminal a través de endocitosis y liberando las partículas o antígenos en la membrana basal o lamina propia, sin embargo, esta protección no es absoluta requiriendo de la acción de las principales células residentes implicadas en las respuestas inmunes de la mucosa (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y T, entre otras) así como la capa de mucus y la microbiota asociada al intestino [48, 49]. A diferencia de los mamíferos que se conocen bien las propiedades de la inmunidad innata de las células intestinales, en peces apenas se ha estudiado cómo las células epiteliales detectan y responden a los antígenos en el intestino de los peces [56]. Los estudios con la línea celular RTgutGC, han estado más enfocados en evaluar la toxicidad de compuestos o de ingredientes y solo algunos estudios de respuesta inmune antiviral y bacteriano. Investigadores han sugerido que las células epiteliales cumplen un papel más importante en el control de las bacterias presentes en el lumen, que tienen el rol de transportar Igs de la mucosa al lumen, lo cual tiene sentido considerando la mayor abundancia de bacterias alojadas en el intestino distal [48, 49, 63], algunos estudios demuestran el uso de RTgutGC para evaluar infecciones bacterianas y la exposición a LPS [64, 65], y por otro lado, existen pocos estudios que han evaluado y constatado la respuesta inmune en las células epiteliales intestinales en respuesta a infecciones virales [56]. En la carpa bajo infección por CyHV-3, se observó una mayor sobreexpresión de las citocinas IFN-a2 e IL-1β en células del intestino distal de la carpa [73] y en un estudio con RTgutGC fue reportado que Poly(I:C) induce una respuesta antiviral sobrexpresando IFN1, IFN2 y Mx1 mientras que el virus IPN indujo significativamente la expresión de IFN1, IFN2, Mx1, TLR3, TLR22 e IL-1β entre otros [74]. Recientemente se ha propuesto un modelo de infección viral *in vitro* utilizando células RTgutGC para estudiar la interacción de los patógenos virales de salmónidos (ISAV, IPNV y SAV3) con las células del epitelio intestinal [66]. Consecuentemente, nosotros especulamos que tanto las características de nuestros NPs como la naturaleza de la línea celular RTgutGC, pueden estar incidiendo en la menor inducción de actividad antiviral en las células intestinales tratadas con nuestros NPs antigénicos.

El gen receptor de IFN (IFNGR2) presentó un menor nivel de expresión en las células desafiadas con los NPs ($IPNV^{NP}$ e $IPNV\text{-}IFN^{NP}$) si lo comparamos con la expresión en células RT-HKM (**Figura**

5), lo que podría estar generando una disminución de la activación de las vías de señalización y por lo tanto de los genes implicados en la actividad antiviral. Sin embargo, IP-10 (quimiocina inducible por IFNγ), fue inducida fuerte y significativamente por IPNV-IFNγ como se ha reportado previamente [41], y por los controles positivos (Poly(I:C) e iRFP^{NP}). En células RTgutGC se ha reportado que el tamaño, tipo de compuestos, afinidad por el receptor y la carga superficial de nanopartículas pueden determinar la capacidad de absorción por parte de las células – lo que parece no afectar a nuestros NPs (**Figura 4**) – así como dictar el grado y naturaleza de respuesta inmunológica [75], lo que también podría explicar la menor respuesta antiviral de las células RTgutGC expuestas a los NPs. Se observaron bajos niveles de expresión de CCL4 en las RTgutGC tratadas con los NPs (IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP}) sin detectar diferencias con las células no tratadas y las tratadas con iRFP^{NP}. Por el contrario, los macrófagos HK tratados con IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} mostraron una sobrexpresión significativa de CCL4. CCL4 es un quimioatractante de macrófagos y linfocitos, en el mero (*Epinephelus coioides*) se ha reportado que CCL4 atrae leucocitos, induce una respuesta inflamatoria e impulsa la diferenciación de los linfocitos en la vía Th1 [76].

Los resultados muestran que la vacuna de subunidad que contiene la proteína recombinante de IFNγ (IPNV-IFN^{NP}) induce una mayor sobreexpresión de genes antivirales y proinflamatorios en macrófagos (RT-HKM) en comparación a la línea celular intestinal RTgutGC, lo que puede ser explicado por la naturaleza del tipo de celular. Porter et al. [77] reportaron diferencias en las magnitudes de la expresión génica antiviral (Mx y IFN1α) y proinflamatoria (IL-1β) en leucocitos del tejido linfoide de la mucosa (GALT), macrófagos (RTS11) y en RTgutGC tratados con Poly(I:C) y la interleucina recombinante IL-1β, concluyendo que se necesitan desarrollar modelos de cultivo celular específicos del intestino que logren proporcionar una visión unificada de los mecanismos que intervienen en la interacción entre la nutrición y el sistema inmune.

En el presente estudio, los ensayos *in vitro* con macrófagos indicaron que la inclusión de un módulo de IFNγ aumenta la capacidad de IPNV^{NP} para estimular la respuesta antiviral y proinflamatoria. Adicionalmente, se observó una inducción de la expresión del receptor IFN (IFNGR2) y de la quimiocina inducida por IFN gamma (IP-10*)* posterior a la exposición con IPNV-IFN^{NP}, lo que presumiblemente indica una inducción paralela de las vías de señalización de IFN por la unión a receptores de IFN y demuestra que IFN podría actuar como un potente adyuvante cuando se une con el antígeno viral de IPNV dentro del mismo NP.

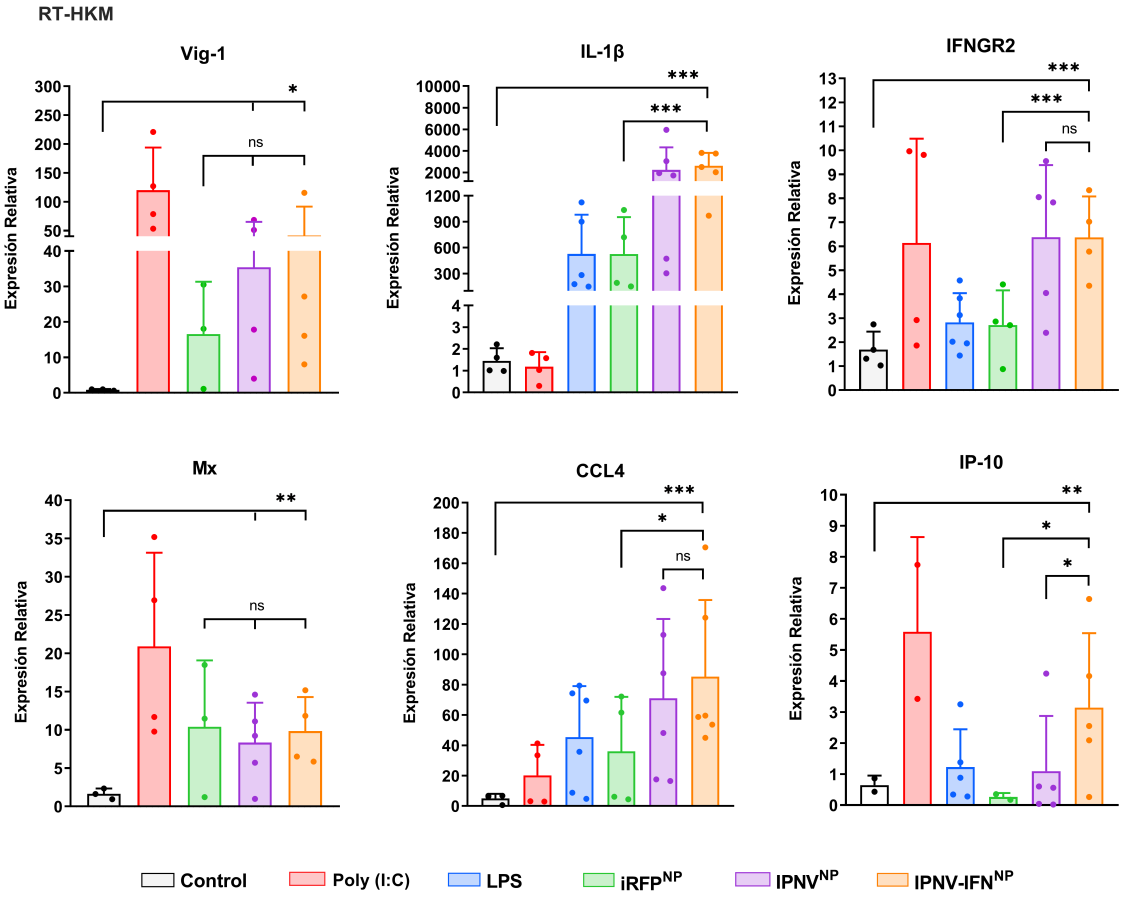


Figura 5. Macrófagos de trucha (RT-HKM) expuestos a los NPs. Células HKM no tratadas (blanco), Poly(I:C) 10 µg/ml (rojo), LPS 10 µg/ml (azul), iRFP^{NP} 20 µg/ml (verde), IPNV^{NP} 20 µg/ml (morado) e IPNV-IFN^{NP} 20 µg/ml (naranja). Las RTgutGC fueron incubadas con los NPs y controles durante 15 h. Los datos son el promedio ± DE (n=4). Las diferencias estadísticas entre tratamientos se analizaron mediante la prueba t unilateral por pares con corrección de Welch para varianzas desiguales o la prueba no paramétrica de Mann-Whitney por pares. Niveles de significancia: ns, no significativo; *p < 0,1; **p < 0,05; ***p < 0,01.

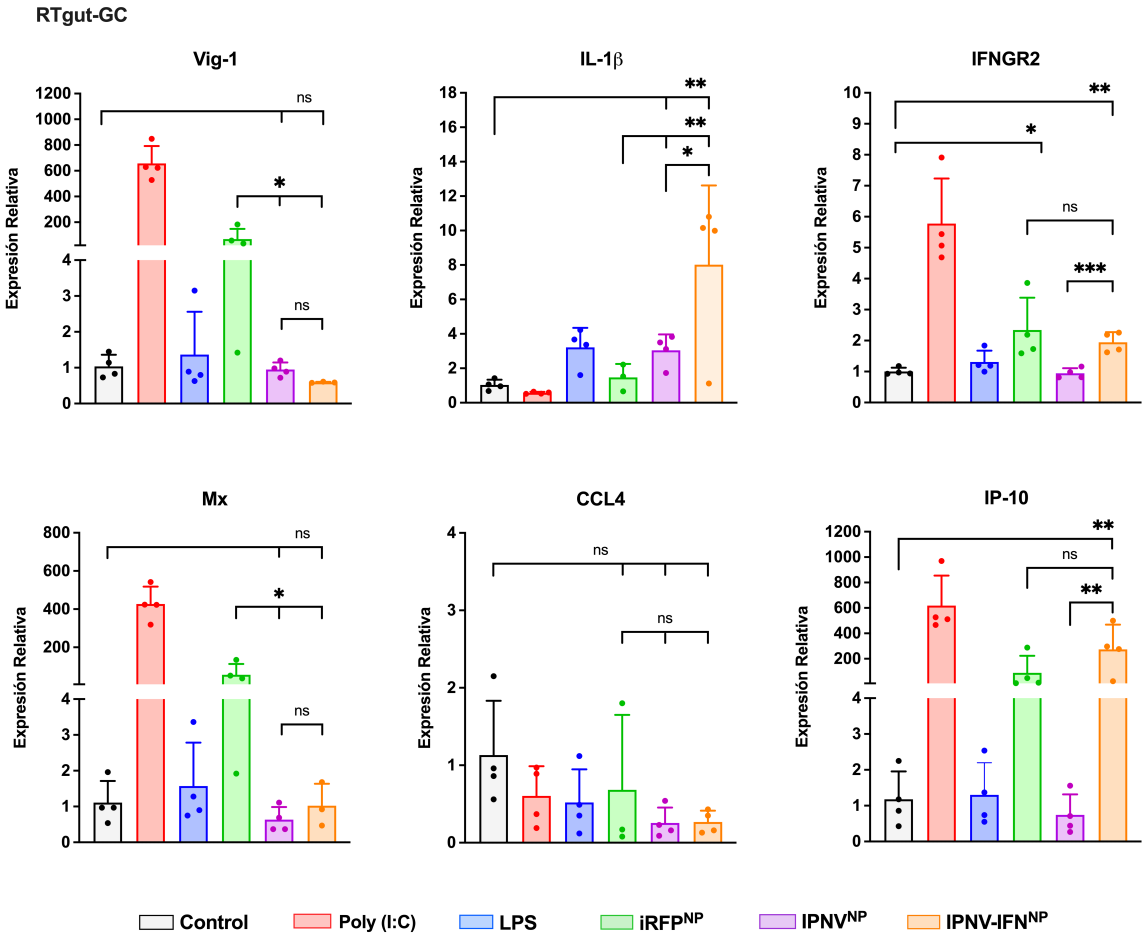


Figura 6. Células intestinales de trucha (RTgutGC) expuestas a los NPs. Células RTgutGC no tratadas (blanco), Poly(I:C) 25 µg/ml (rojo), LPS 50 µg/ml (azul), iRFP^{NP} 20 µg/ml (verde), IPNV^{NP} 20 µg/ml (morado) e IPNV-IFN^{NP} 20 µg/ml (naranja). Las RTgutGC fueron incubadas con los NPs y controles durante 15 h. Los datos son la media ± DE (n=4). Las diferencias estadísticas entre tratamientos se analizaron mediante la prueba t unilateral por pares con corrección de Welch para varianzas desiguales o la prueba no paramétrica de Mann-Whitney por pares. Niveles de significancia: ns, no significativo; *p < 0,1; **p < 0,05; ***p < 0,01.

3.2 Caracterización funcional *in vivo* de los NPs tras la intubación oral de trucha arcoíris

3.2.1 Absorción y biodistribución de IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP}

Posterior a la administración oral de IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} fluorescentes, los peces mostraron buena recuperación post anestesia, y un comportamiento normal sin signos de toxicidad u ocurrencia de mortalidad 24 h después de la intubación. IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} fueron internalizados por las células epiteliales intestinales y parcialmente biodistribuidos al riñón anterior. Los macrófagos aislados de peces intubados con IPNV-IFN^{NP} mostraron un mayor porcentaje promedio de células fluorescentes

(hasta un 2,4%) y una mayor intensidad media de fluorescencia (hasta 4545) en comparación con IPNV^{NP} (**Figura 7**). Previamente se ha demostrado que los NPs de TNFα^{NP} fluorescentes, también administrados por intubación oral (7,49 mg/kg pez), son capaces de atravesar el estómago, llegar a los ciegos pilóricos y el intestino medio y pasar a través de los epitelios intestinales alcanzando la lámina propia y la submucosa de truchas detectando un 20% de células positivas a las 24 h [32]. De la misma forma, Jie et al. [78] intubaron oralmente peces cebra adultos con IBs fluorescentes de TNFα detectando en intestino entre un 15% (10 μg) y 29% (20 μg) de células positivas fluorescentes administradas a las 24 h, la diferencia en el porcentaje de internalización de los NPs entre peces cebra y truchas puede deberse a las diferencias anatómicas del intestino entre ambas especies donde la trucha tiene estomago mientras que el pez cebra no tiene [78]. En consonancia con estos resultados, también hemos demostrado que IPNV-IFN^{NP} puede llegar rápidamente a los macrófagos del riñón anterior una vez que los NPs alcanzan el tracto gastrointestinal y a niveles más altos que los NPs de IPNV^{NP}. Brevemente, hipotetizamos que los NPs fluorescentes logran pasar y resistir el ambiente ácido del estómago y las enzimas gastrointestinales, y atravesar el epitelio intestinal mucosal (GALT) y probablemente ser transportadas por células inmunológicas hasta alcanzar el riñón anterior. Este resultado demuestra que los NPs recombinantes son resistentes a la degradación no necesitando ser encapsulada y que podrían tener una rápida biodisponibilidad en órganos linfoides. Sin embargo, aún debemos evaluar si la cantidad de vacuna suministrada es suficiente para inducir una respuesta inmune local inicial y si los NPs alcanzar otros órganos linfoides (como el bazo o branquias) y que consecuentemente promueva una respuesta inmune sistémica. Torrealba y colaboradores demostraron que la citocina TNFα nanoestructurada logra llegar a bazo (78% células positivas) y al riñón anterior (22,9% células positivas) de truchas y observar un aumento de la expresión génica de las citocinas proinflamatorias TNFα, IL-1β e IL-8 a las 48 h [32]. No obstante, estos resultados son orientativos debido a que los NPs fueron suministrados mediante inyección y se evaluó el nivel de protección que confieren las citocinas recombinantes contra una infección bacteriana *(Pseudomonas aeruhinosa*).

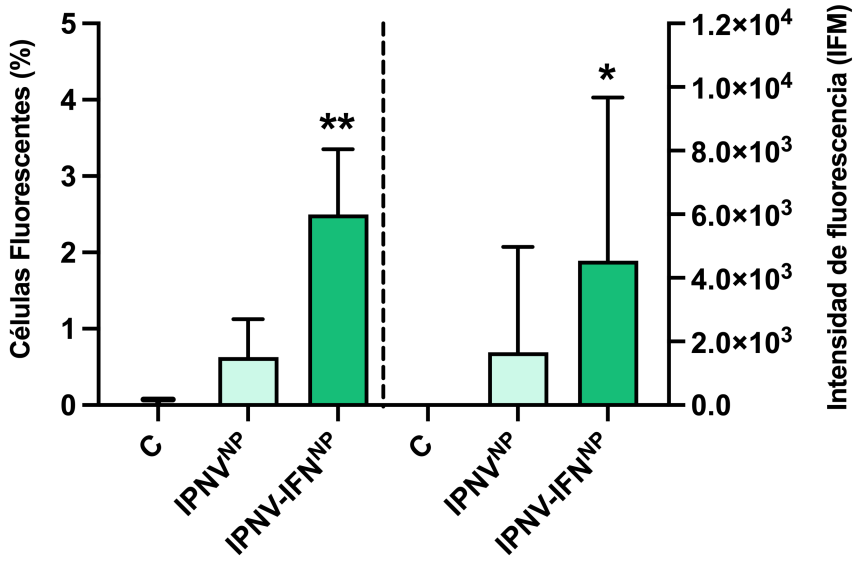


Figura 7. Endocitosis de IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} en RT-HKM tras intubación oral. Se tomaron muestras de RT-HKM de trucha intubada (6 mg/kg pez) con IPNV^{NP} e IPNV-IFN^{NP} fluorescentes para análisis de citometría de flujo 24 h después de la intubación. Las diferencias entre la media de cada grupo de tratamiento y el control se analizaron mediante la prueba no paramétrica no apareada de Mann-Whitney. Niveles de significancia *p < 0,05; **p < 0,01.

3.2.2 Caracterización de la respuesta inmune en poblaciones celulares aisladas del intestino tras la intubación con IPNV-IFN^{NP}

Se intubaron por vía oral IPNV-IFN^{NP} para evaluar si estimulaban la respuesta inmune innata local y adaptativa en poblaciones de leucocitos. Las poblaciones de leucocitos se aislaron del intestino posterior homogeneizado (~140 g) 24 h después de la intubación oral con IPNV-IFN^{NP} (6 mg/kg pez). Se detectaron y clasificaron dos poblaciones diferentes de leucocitos y se denominaron linfoide (L) y mieloide (M) en función de su complejidad, tamaño y fluorescencia (perfiles FSC/SSC/FITC). Posteriormente, se analizó la expresión de genes marcadores asociados a linfocitos (células T y B) y APCs (**Figura 8**). La Figura 8B muestra que en la población de células linfoides los genes CD8α e IgM asociados a células T citotóxicas y células B respectivamente, mostraron mayores niveles de expresión, aunque sin diferencias significativas entre tratamientos (**Figura 8B**). La población linfoide de los peces intubados con IPNV-IFN^{NP} mostró una sobreexpresión significativa de Lamp3, CD83, MHCI y MHCII en comparación con los peces control (PBS). Sin embargo, la expresión de MHCI y MHCII en la población linfoide (**Figura 8B**) es menor en comparación con la población mieloide (**Figura 8C**). Se ha reportado la sobreexpresión de estos genes marcadores en leucocitos del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) estimulados con PAMP bacterianos, víricos y citoquinas recombinantes, como IFNs, IL-1β, IL-6 y TNFα [44, 45]. Además, se ha informado que el GALT está compuesto por dos tipos de células implicadas en la respuesta inmunitaria: Los

leucocitos de la lámina propia (LLP), que contienen un gran grupo de células residentes y circulantes como macrófagos/granulocitos; y los linfocitos intraepiteliales (LIEs), formados principalmente por linfocitos T residentes (T CD4 y CD8α) y unos pocos linfocitos B localizados entre las células epiteliales [56]. Ambos tipos de linfocitos T y B podrían responder a una infección de las mucosas [81].

La sobreexpresión de genes MHC de clase I y clase II aislados de células GALT puede estar directamente implicada en el inicio de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, siendo responsable del procesamiento y presentación de antígenos peptídicos en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APCs), tales como las células dendríticas (CD83), los macrófagos (MCSFR2a) y las células B (IgM*)*, y su expresión puede ser reconocida por los receptores de células T (TCR) de las células T citotóxicas CD8α o auxiliares/reguladoras CD4 [82]. Además, asociado a la expresión de MHC, detectamos un marcador de macrófago MCSFR2a [79], que mostró mayores niveles de expresión en la población mieloide aislada de peces intubados con IPNV-IFN^{NP}, en contraste con los peces intubados con iRFP^{NP} (**Figura 8C**). Todos estos resultados sugieren que la vacuna recombinante IPNV-IFN^{NP} podía estimular poblaciones de células linfocitarias con capacidad para inducir la respuesta inmunitaria adaptativa. En cuanto a los genes de la respuesta inmunitaria innata (**Figura 9**), observamos niveles bajos de expresión en ambos tipos de poblaciones, aunque observamos un aumento de la expresión de CCL4 en los peces estimulados con IPNV-IFN^{NP} en comparación con el control (PBS). Además, IL-8 se sobreexpresó en los peces intubados con iRFP^{NP}. La IL-8 es una de las primeras quimiocinas presentes poco después de iniciarse la inflamación y una de sus principales funciones es el reclutamiento de neutrófilos en el lugar de la infección. Sin embargo, hoy se sabe que es secretada por una amplia variedad de células, incluidas las células epiteliales y endoteliales [83].

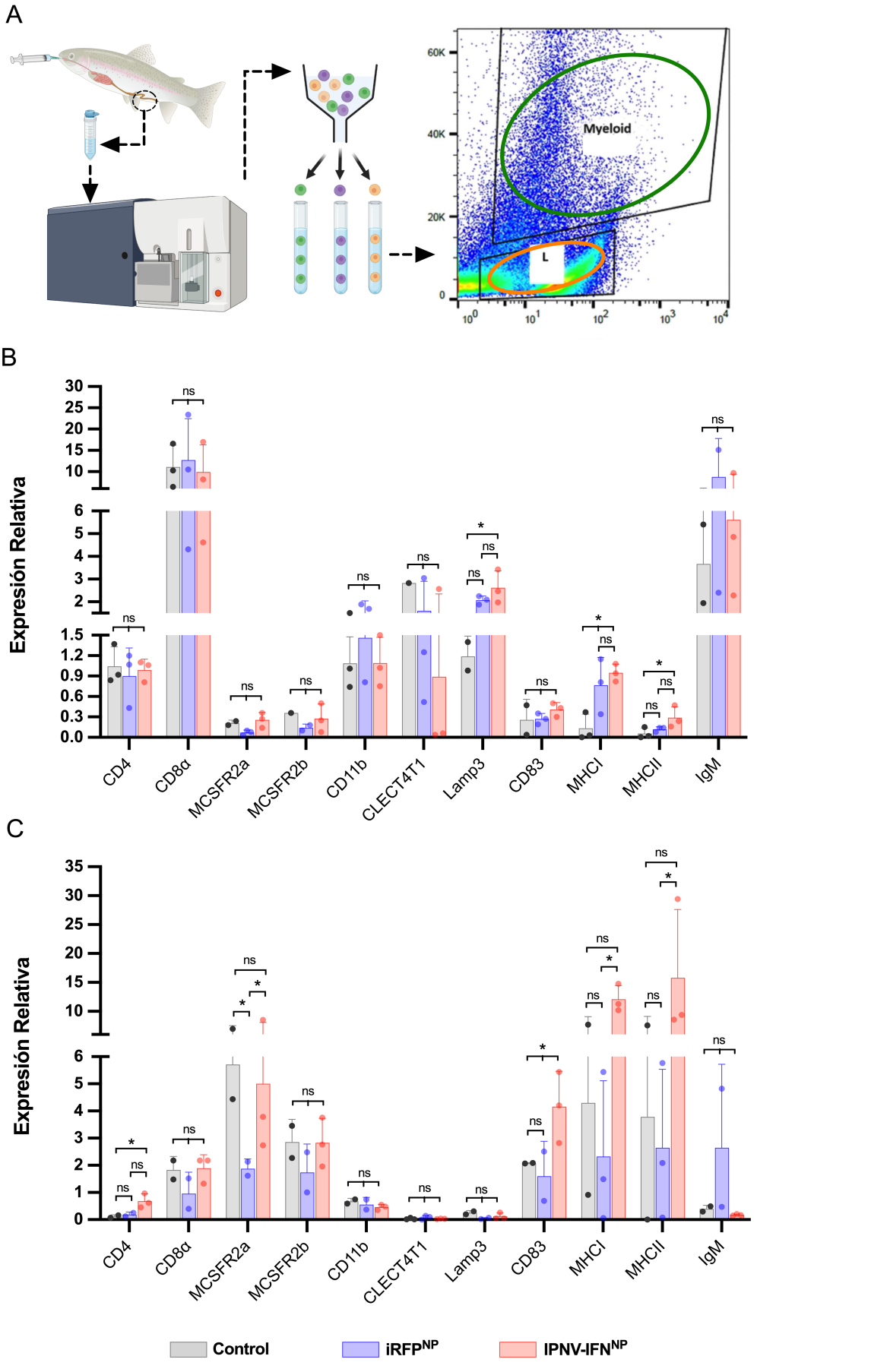

A
Myeloid
L
60K
40K
20K
0
B
Expresión Relativa
CD4
CD8α
MCSFR2a
MCSFR2b
CD11b
CLECT4T1
Lamp3
CD83
MHCI
MHCII
IgM
C
Expresión Relativa
Control
iRFP^NP
IPNV-IFN^NP

Figura 8. Análisis de expresión génica de poblaciones de leucocitos aislados del intestino de trucha arcoíris. (**A**) Imágenes representativas de poblaciones linfoides [L] y mieloides [Myeloid] clasificadas y recuperadas por clasificación celular "*cell sorting*" según tamaño, complejidad y fluorescencia (perfil FSC/SSC/FITC) 24 h después de la intubación oral con IPNV-IFN^{NP} (6 mg/kg pez). (**B**) Expresión génica en la población linfoide. (**C**) Expresión génica en la población mieloide. Control (PBS) (gris), iRFP^{NP} (púrpura) e IPNV-IFN^{NP} (rojo). Los datos son la media ± DE (n=3). Las diferencias estadísticas entre tratamientos se analizaron mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett o la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Niveles de significancia: ns, no significativo; *p < 0,1; **p < 0,05.

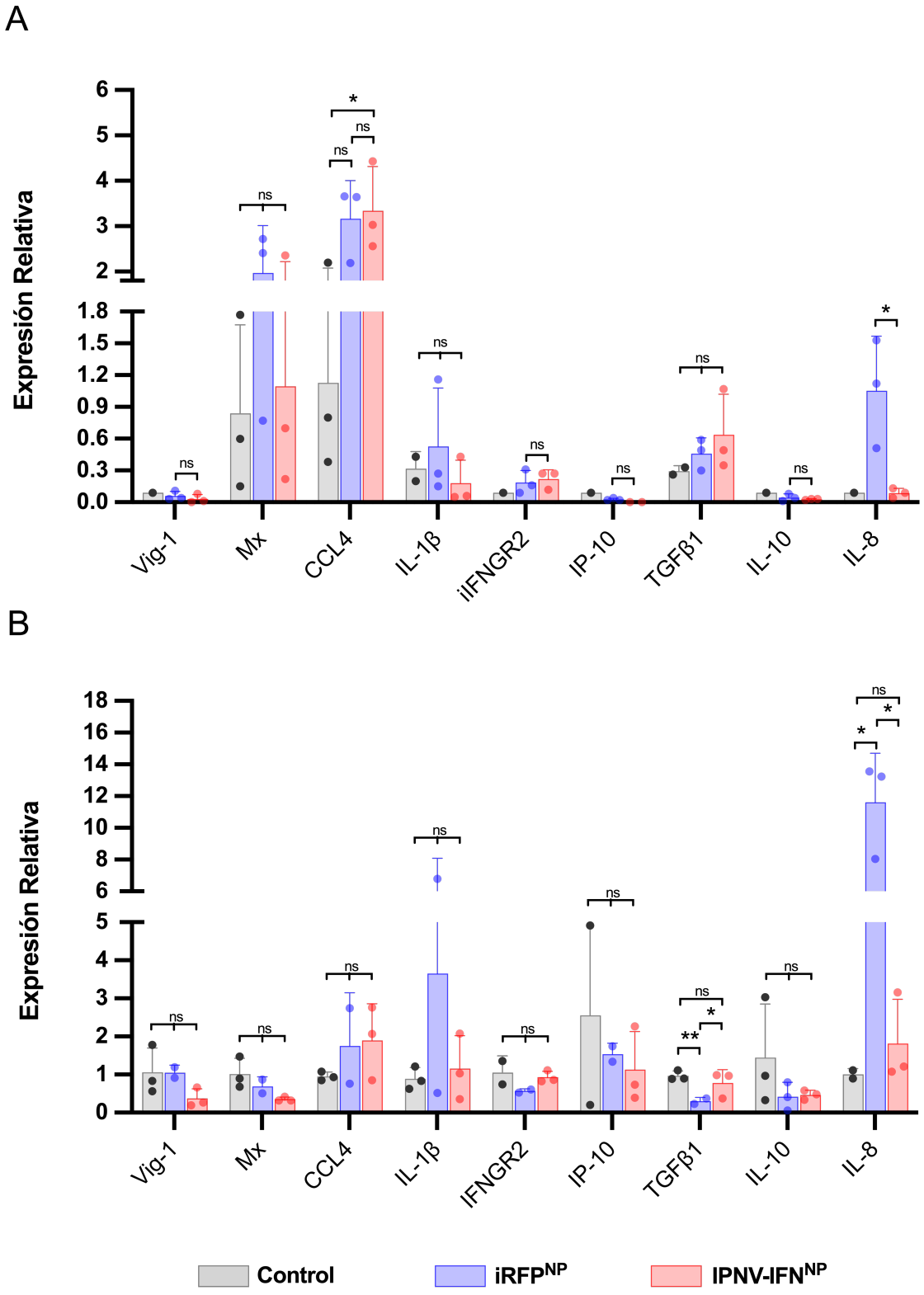


Figura 9. Análisis de la expresión génica de genes marcadores leucocitarios de la respuesta inmunitaria innata. (**A**) Expresión génica en la población linfoide. (**B**) Expresión génica en la población mieloide. Control (PBS) (gris), iRFP^{NP} (morado) e IPNV-IFN^{NP} (rojo) intubados

oralmente a 6 mg/kg de pez. Los datos son la media ± DE (n=3). Las diferencias estadísticas entre tratamientos se analizaron mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett o la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Niveles de significancia: ns, no significativo; *p < 0,1; **p < 0,05.

4. CONCLUSIONES

Planteamos un nuevo enfoque de vacuna oral de subunidad contra el virus IPN. Hemos demostrado que la vacuna es segura, estable y funcional, siendo resistente a condiciones ambientales extremas (temperatura y pH ácido), y administrable por vía oral. El diseño de la vacuna está compuesto por módulos proteicos versátiles que incluyen el antígeno viral y un módulo IFNγ, citocina moduladora del sistema inmune que puede proporcionar protección contra el virus IPN potenciando la respuesta inmune local y sistémica en trucha arcoíris juveniles.

Estudios *in vitro* que determinen los mecanismos por los cuales los NPs son internalizados en las células e inducen un estado antiviral necesitan ser elaborados. Adicionalmente, para evaluar el potencial adyuvante del módulo IPNV-IFNγ, experimentos *in vivo* que incluyan incorporar la vacuna en pienso y testear el nivel de protección de la vacuna contra el virus de IPN en salmónidos deben ser planeados.

5. REFERENCIAS

[1] C. P. Dopazo, "The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and its virulence determinants: What is known and what should be known," *Pathogens*, vol. 9, no. 2. MDPI AG, Feb. 01, 2020. doi: 10.3390/pathogens9020094.

[2] D. Tapia, Y. Eissler, F. E. Reyes-Lopez, J. Kuznar, and J. M. Yáñez, "Infectious pancreatic necrosis virus in salmonids: Molecular epidemiology and host response to infection," *Rev Aquac*, vol. 14, no. 2, pp. 751–769, Mar. 2022, doi: 10.1111/raq.12623.

[3] B. Lakshmi, S. Syed, and V. Buddolla, "Current advances in the protection of viral diseases in aquaculture with special reference to vaccination," in *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, Elsevier, 2018, pp. 127–146. doi: 10.1016/B978-0-12-816328-3.00010-6.

[4] M. Godoy *et al.*, "Isolation of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant from Genetically Resistant Farmed Atlantic Salmon (Salmo salar) during 2021–2022," *Pathogens*, vol. 11, no. 11, Nov. 2022, doi: 10.3390/pathogens11111368.

[5] R. S.-M. Chong, "Infectious pancreatic necrosis," in *Aquaculture Pathophysiology*, Elsevier, 2022, pp. 165–175. doi: 10.1016/B978-0-12-812211-2.00011-1.

[6] J. Benkaroun, K. F. Muir, R. Allshire, C. Tamer, and M. Weidmann, "Isolation of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant from a Fish Farm in Scotland," *Viruses*, vol. 13, no. 3, p. 385, Feb. 2021, doi: 10.3390/v13030385.

[7] B. Hillestad, S. Johannessen, G. O. Melingen, and H. K. Moghadam, "Identification of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant in Atlantic Salmon (Salmo salar L.) that can Cause High Mortality Even in Genetically Resistant Fish," *Front Genet*, vol. 12, Nov. 2021, doi: 10.3389/fgene.2021.635185.

[8] A. Cuesta, E. Chaves-Pozo, A. I. de las Heras, S. R. Saint-Jean, S. Pérez-Prieto, and C. Tafalla, "An active DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) with a different mode of action than fish rhabdovirus DNA vaccines," *Vaccine*, vol. 28, no. 19, pp. 3291–3300, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.106.

[9] Ø. S. Nina. Evensen, "Infectious pancreatic necrosis virus," *Encyclopedia of virology*, 2008.

[10] E. Mileva, "Infectious Pancreatic Necrosis of Salmonid Fish - Distribution and Laboratory Methods for Diagnosis," *Trakia Journal of Sciences*, vol. 17, no. 4, pp. 401–412, 2019, doi: 10.15547/tjs.2019.04.018.

[11] F. Coulibaly, C. Chevalier, B. Delmas, and F. A. Rey, "Crystal Structure of an Aquabirnavirus Particle: Insights into Antigenic Diversity and Virulence Determinism," *J Virol*, vol. 84, no. 4, pp. 1792–1799, Feb. 2010, doi: 10.1128/jvi.01536-09.

[12] A. Adams, "Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 90, pp. 210–214, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.066.

[13] M. K. Bedekar and S. Kole, "Fundamentals of Fish Vaccination," 2022, pp. 147–173. doi: 10.1007/978-1-0716-1888-2_9.

[14] J. Ma, T. J. Bruce, E. M. Jones, and K. D. Cain, "A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches," *Microorganisms*, vol. 7, no. 11. MDPI AG, Nov. 01, 2019. doi: 10.3390/microorganisms7110569.

[15] A. M. Eriksson-Kallio, "Characteristics of Infectious Pancreatic Necrosis in Finland: Epidemiology, genetic characterization and virulence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) of farmed fish in Finland," 2022. Accessed: Mar. 09, 2024. [Online]. Available: https://helda.helsinki.fi/server/api/core/bitstreams/cc7a449c-6410-4bbd-b889-703919bab437/content

[16] M. Hansson, P. Nygren, and S. Sta˚hl, "Design and production of recombinant subunit vaccines," *Biotechnol Appl Biochem*, vol. 32, no. 2, pp. 95–107, Oct. 2000, doi: 10.1042/ba20000034.

[17] Y. Du, X. Hu, L. Miao, and J. Chen, "Current status and development prospects of aquatic vaccines," *Frontiers in Immunology*, vol. 13. Frontiers Media S.A., Nov. 10, 2022. doi: 10.3389/fimmu.2022.1040336.

[18] R. D. Day, I. R. Tibbetts, and S. M. Secor, “Physiological responses to short-term fasting among herbivorous, omnivorous, and carnivorous fishes,” *J Comp Physiol B*, vol. 184, no. 4, pp. 497–512, May 2014, doi: 10.1007/s00360-014-0813-4.
[19] J. Bøgwald and R. A. Dalmo, “Protection of teleost fish against infectious diseases through oral administration of vaccines: Update 2021,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 20. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms222010932.
[20] S. Mutoloki, H. M. Munang’andu, and Ø. Evensen, “Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake, and immune induction,” *Front Immunol*, vol. 6, no. OCT, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00519.
[21] A. Radhakrishnan, B. Vaseeharan, P. Ramasamy, and S. Jeyachandran, “Oral vaccination for sustainable disease prevention in aquaculture—an encapsulation approach,” *Aquaculture International*, vol. 31, no. 2, pp. 867–891, Apr. 2023, doi: 10.1007/s10499-022-01004-4.
[22] S. Kole, S.-M. Shin, I.-S. Kwak, S. H. Cho, and S.-J. Jung, “Efficacy of Chitosan-PLGA encapsulated trivalent oral vaccine against viral haemorrhagic septicemia virus, Streptococcus parauberis, and Miamiensis avidus in olive flounder (Paralichthys olivaceus),” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 127, pp. 843–854, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.fsi.2022.07.029.
[23] S. Kole, S. S. N. Qadiri, S.-M. Shin, W.-S. Kim, J. Lee, and S.-J. Jung, “Nanoencapsulation of inactivated-viral vaccine using chitosan nanoparticles: Evaluation of its protective efficacy and immune modulatory effects in olive flounder (Paralichthys olivaceus) against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) infection,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 91, pp. 136–147, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.05.017.
[24] P. Sukkarun *et al.*, “Chitosan-polymer based nanovaccine as promising immersion vaccine against Aeromonas veronii challenge in red tilapia (Oreochromis sp.),” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 129, pp. 30–35, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.fsi.2022.08.035.
[25] J. J. Donnelly, J. B. Ulmer, J. W. Shiver, and M. A. Liu, “DNA Vaccines,” *Annu Rev Immunol*, vol. 15, no. 1, pp. 617–648, Apr. 1997, doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.617.
[26] A. I. de las Heras, S. Rodríguez Saint-Jean, and S. I. Pérez-Prieto, “Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 28, no. 4, pp. 562–570, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.fsi.2009.12.006.
[27] M. Reyes *et al.*, “A novel ‘in-feed’ delivery platform applied for oral DNA vaccination against IPNV enables high protection in Atlantic salmon (Salmon salar),” *Vaccine*, vol. 35, no. 4, pp. 626–632, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.vaccine.2016.12.013.
[28] C. W. E. Embregts and M. Forlenza, “Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species,” *Dev Comp Immunol*, vol. 64, pp. 118–137, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.dci.2016.03.024.
[29] R. Thwaite *et al.*, “Protein Nanoparticles Made of Recombinant Viral Antigens: A Promising Biomaterial for Oral Delivery of Fish Prophylactics,” *Front Immunol*, vol. 9, Jul. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01652.
[30] D. Torrealba *et al.*, “Complex Particulate Biomaterials as Immunostimulant-Delivery Platforms,” *PLoS One*, vol. 11, no. 10, p. e0164073, Oct. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0164073.
[31] R. Thwaite *et al.*, “Nanostructured recombinant protein particles raise specific antibodies against the nodavirus NNV coat protein in sole,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 99, pp. 578–586, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.02.029.
[32] D. Torrealba *et al.*, “Nanostructured recombinant cytokines: A highly stable alternative to short-lived prophylactics,” *Biomaterials*, vol. 107, pp. 102–114, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.043.
[33] C. E. Samuel, “Antiviral actions of interferons,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 14, no. 4. pp. 778–809, 2001. doi: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001.
[34] Q. Gao *et al.*, “The search for the IFN-γ receptor in fish: Functional and expression analysis of putative binding and signalling chains in rainbow trout Oncorhynchus mykiss,” *Dev Comp Immunol*, vol. 33, no. 8, pp. 920–931, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.dci.2009.03.001.
[35] J. Zou and C. J. Secombes, “Teleost fish interferons and their role in immunity,” *Dev Comp Immunol*, vol. 35, no. 12, pp. 1376–1387, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.dci.2011.07.001.

[36] Z. Gan, S. N. Chen, B. Huang, J. Zou, and P. Nie, “Fish type I and type II interferons: composition, receptor usage, production and function,” *Reviews in Aquaculture*, vol. 12, no. 2. Wiley-Blackwell, pp. 773–804, May 01, 2020. doi: 10.1111/raq.12349.

[37] G. Ding *et al.*, “Transcriptome Sequencing Reveals the Antiviral Innate Immunity by IFN-γ in Chinese Sturgeon Macrophages,” *Front Immunol*, vol. 13, Mar. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.854689.

[38] P. Pereiro, A. Figueras, and B. Novoa, “Insights into teleost interferon-gamma biology: An update,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 90, pp. 150–164, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.002.

[39] B. Robertsen, “The interferon system of teleost fish,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 20, no. 2, pp. 172–191, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.fsi.2005.01.010.

[40] J. Zou *et al.*, “Identification and Bioactivities of IFN-γ in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss): The First Th1-Type Cytokine Characterized Functionally in Fish,” *The Journal of Immunology*, vol. 175, no. 4, pp. 2484–2494, Aug. 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2484.

[41] B. Sun, I. Skjæveland, T. Svingerud, J. Zou, J. Jørgensen, and B. Robertsen, “Antiviral Activity of Salmonid Gamma Interferon against Infectious Pancreatic Necrosis Virus and Salmonid Alphavirus and Its Dependency on Type I Interferon,” *J Virol*, vol. 85, no. 17, pp. 9188–9198, Sep. 2011, doi: 10.1128/jvi.00319-11.

[42] P. Argos, “An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion,” *J Mol Biol*, vol. 211, no. 4, pp. 943–958, Feb. 1990, doi: 10.1016/0022-2836(90)90085-Z.

[43] J. Schindelin *et al.*, “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis,” *Nat Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jul. 2012, doi: 10.1038/nmeth.2019.

[44] D. A. T. Hammer, P. D. Ryan, Ø. Hammer, and D. A. T. Harper, “Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis,” 2001. [Online]. Available: http://palaeo-electronica.orghttp://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

[45] N. Roher, A. Callol, J. V. Planas, F. W. Goetz, and S. A. MacKenzie, “Endotoxin recognition in fish results in inflammatory cytokine secretion not gene expression,” *Innate Immun*, vol. 17, no. 1, pp. 16–28, Feb. 2011, doi: 10.1177/1753425909348232.

[46] I. Brandts, M. Garcia-Ordoñez, L. Tort, M. Teles, and N. Roher, “Polystyrene nanoplastics accumulate in ZFL cell lysosomes and in zebrafish larvae after acute exposure, inducing a synergistic immune response in vitro without affecting larval survival in vivo,” *Environ Sci Nano*, vol. 7, no. 8, pp. 2410–2422, 2020, doi: 10.1039/D0EN00553C.

[47] A. Kawano *et al.*, “Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide,” *Aquac Nutr*, vol. 17, no. 2, pp. e241–e252, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00757.x.

[48] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.

[49] Å. Krogdahl, A. Sundby, and H. Holm, “Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (Salmo salar). Enzyme pH optima, chyme pH, and enzyme activities,” *Aquaculture*, vol. 449, pp. 27–36, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.02.032.

[50] N. Ferrer-Miralles, P. Saccardo, J. L. Corchero, Z. Xu, and E. García-Fruitós, “General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins,” 2015, pp. 1–24. doi: 10.1007/978-1-4939-2205-5_1.

[51] S. Ventura and A. Villaverde, “Protein quality in bacterial inclusion bodies,” *Trends Biotechnol*, vol. 24, no. 4, pp. 179–185, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.tibtech.2006.02.007.

[52] U. Rinas, E. Garcia-Fruitós, J. L. Corchero, E. Vázquez, J. Seras-Franzoso, and A. Villaverde, “Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half,” *Trends Biochem Sci*, vol. 42, no. 9, pp. 726–737, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.tibs.2017.01.005.

[53] L. Mullen *et al.*, “Latent cytokines for targeted therapy of inflammatory disorders,” *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 11, no. 1, pp. 101–110, Jan. 2014, doi: 10.1517/17425247.2014.863872.

[54] A. Azizi, A. Kumar, F. Diaz-Mitoma, and J. Mestecky, “Enhancing Oral Vaccine Potency by Targeting Intestinal M Cells,” *PLoS Pathog*, vol. 6, no. 11, p. e1001147, Nov. 2010, doi: 10.1371/journal.ppat.1001147.

[55] F. Jutfelt, “Barrier function of the gut,” *Encyclopedia of Fish Physiology. From Genome to Environment, volume 2, pp. 1322-1331. San Diego: Academic Press.*, 2011, doi: 10.1016/B978-0-1237-4553-8.00068-X.
[56] I. Salinas and D. Parra, “Fish mucosal immunity: intestine,” 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-417186-2/00006-6.
[57] D. A. Kuhn *et al.*, “Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages,” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 5, pp. 1625–1636, Sep. 2014, doi: 10.3762/bjnano.5.174.
[58] B. M. Rothen-Rutishauser, S. Schürch, B. Haenni, N. Kapp, and P. Gehr, “Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red Blood Cells Visualized with Advanced Microscopic Techniques,” *Environ Sci Technol*, vol. 40, no. 14, pp. 4353–4359, Jul. 2006, doi: 10.1021/es0522635.
[59] J. Levicán-Asenjo, R. Soto-Rifo, F. Aguayo, A. Gaggero, and O. Leon, “Salmon cells SHK-1 internalize infectious pancreatic necrosis virus by macropinocytosis,” *J Fish Dis*, vol. 42, no. 7, pp. 1035–1046, Jul. 2019, doi: 10.1111/jfd.13009.
[60] J. Levican, C. Miranda-Cárdenas, R. Soto-Rifo, F. Aguayo, A. Gaggero, and O. León, “Infectious pancreatic necrosis virus enters CHSE-214 cells via macropinocytosis,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 3068, Jun. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-03036-w.
[61] A. Ruyra, M. Cano-Sarabia, S. A. MacKenzie, D. Maspoch, and N. Roher, “A Novel Liposome-Based Nanocarrier Loaded with an LPS-dsRNA Cocktail for Fish Innate Immune System Stimulation,” *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e76338, Oct. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0076338.
[62] P. Nordly, H. B. Madsen, H. M. Nielsen, and C. Foged, “Status and future prospects of lipid-based particulate delivery systems as vaccine adjuvants and their combination with immunostimulators,” *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 6, no. 7, pp. 657–672, Jul. 2009, doi: 10.1517/17425240903018863.
[63] A. Ruyra *et al.*, “Targeting and stimulation of the zebrafish (Danio rerio) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes,” *Vaccine*, vol. 32, no. 31, pp. 3955–3962, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.05.010.
[64] L. Zhou, M. M. W. Chong, and D. R. Littman, “Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation,” *Immunity*, vol. 30, no. 5. pp. 646–655, May 22, 2009. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.001.
[65] J. H. Dufour, M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane, and A. D. Luster, “IFN-Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking 1,” 2002. [Online]. Available: http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/168/7/3195/1149047/3195.pdf
[66] G. Løkka, A. A. A. Gamil, Ø. Evensen, and T. M. Kortner, “Establishment of an In Vitro Model to Study Viral Infections of the Fish Intestinal Epithelium,” *Cells*, vol. 12, no. 11, p. 1531, Jun. 2023, doi: 10.3390/cells12111531.
[67] I. Jensen, A. Albuquerque, A.-I. Sommer, and B. Robertsen, “Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 13, no. 4, pp. 311–326, Oct. 2002, doi: 10.1006/fsim.2001.0406.
[68] H. Schug, Y. Yue, R. Krese, S. Fischer, T. M. Kortner, and K. Schirmer, “Time- and concentration-dependent expression of immune and barrier genes in the RTgutGC fish intestinal model following immune stimulation,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 88, pp. 308–317, May 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.036.
[69] Y. Zhou *et al.*, “TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C,” *Innate Immun*, vol. 19, no. 2, pp. 184–192, Apr. 2013, doi: 10.1177/1753425912459975.
[70] Y. A. Zhang *et al.*, “IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity,” *Nat Immunol*, vol. 11, no. 9, pp. 827–835, Sep. 2010, doi: 10.1038/ni.1913.
[71] K. Komatsu *et al.*, “Expression profiles of cytokines released in intestinal epithelial cells of the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, in response to bacterial infection,” *Dev Comp Immunol*, vol. 33, no. 4, pp. 499–506, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.dci.2008.09.012.
[72] J. Wang *et al.*, “Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss) Intestinal Epithelial Cells as a Model for Studying Gut Immune Function and Effects of Functional Feed Ingredients,” *Front Immunol*, vol. 10, Feb. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00152.

[73] H. Syakuri *et al.*, “Intestinal barrier of carp (Cyprinus carpio L.) during a cyprinid herpesvirus 3-infection: Molecular identification and regulation of the mRNA expression of claudin encoding genes,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 34, no. 1, pp. 305–314, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.fsi.2012.11.010.

[74] R. Simón, P. Martínez, L. González, M. C. Ordás, and C. Tafalla, “Differential response of RTGUTGC and RTGILL-W1 rainbow trout epithelial cell lines to viral stimulation,” *J Fish Dis*, vol. 46, no. 4, pp. 433–443, Apr. 2023, doi: 10.1111/jfd.13755.

[75] T. N. Alkie, J. de Jong, K. Jenik, K. M. Klinger, and S. J. DeWitte-Orr, “Enhancing innate antiviral immune responses in rainbow trout by double stranded RNA delivered with cationic phytoglycogen nanoparticles,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49931-2.

[76] Y.-J. Hsu, C.-Y. Hou, S.-J. Lin, W.-C. Kuo, H.-T. Lin, and J. H.-Y. Lin, “The biofunction of orange-spotted grouper (Epinephelus coioides) CC chemokine ligand 4 (CCL4) in innate and adaptive immunity,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 35, no. 6, pp. 1891–1898, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.020.

[77] D. Porter, D. Peggs, C. McGurk, and S. A. M. Martin, “Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT) primary cells and stable cell lines as predictive models for intestinal health in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss),” *Front Immunol*, vol. 13, Oct. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.1023235.

[78] J. Ji, R. Thwaite, and N. Roher, “Oral Intubation of Adult Zebrafish: A Model for Evaluating Intestinal Uptake of Bioactive Compounds,” *Journal of Visualized Experiments*, no. 139, Sep. 2018, doi: 10.3791/58366.

[79] A. Attaya, C. J. Secombes, and T. Wang, “Effective isolation of GALT cells: Insights into the intestine immune response of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) to different bacterin vaccine preparations,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 105, pp. 378–392, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.06.051.

[80] A. Attaya *et al.*, “Gene expression analysis of isolated salmonid GALT leucocytes in response to PAMPs and recombinant cytokines,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 80, pp. 426–436, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.fsi.2018.06.022.

[81] I. Salinas, “The mucosal immune system of teleost fish,” *Biology*, vol. 4, no. 3. MDPI AG, pp. 525–539, Jul. 31, 2015. doi: 10.3390/biology4030525.

[82] U. Fischer, E. O. Koppang, and T. Nakanishi, “Teleost T and NK cell immunity,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 35, no. 2, pp. 197–206, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.fsi.2013.04.018.

[83] A. Rebl, H. Rebl, T. Korytář, T. Goldammer, and H. M. Seyfert, “The proximal promoter of a novel interleukin-8-encoding gene in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) is strongly induced by CEBPA, but not NF-κB p65,” *Dev Comp Immunol*, vol. 46, no. 2, pp. 155–164, 2014, doi: 10.1016/j.dci.2014.03.024.

CAPITULO III

Una vacuna de subunidad de administración oral y dirigida a la mucosa para proteger a los peces contra el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV)

Vacuna recombinante modular con propiedades inmunomoduladoras para proteger a salmónidos.

RESUMEN

La vacunación contra enfermedades vírales es una de las principales herramientas profilácticas para garantizar la sostenibilidad de la acuicultura. La mayoría de las vacunas comerciales disponibles son inactivadas con un corto tiempo de inmunización y se administran mediante inyección, lo que causa estrés en los animales y elevados costos operacionales. La administración oral parece ser la mejor opción, debido a que no requiere manipular los peces garantizando el bienestar de los animales. Sin embargo, las vacunas orales por lo general necesitan estar protegidas de la degradación del antígeno en el estómago y tienen que diseñarse combinadas con un adyuvante o considerar administraciones de refuerzo para mejorar los niveles de inmunización. En el presente estudio, hemos desarrollado una vacuna antiviral oral para truchas juveniles altamente estable en condiciones duras de pH y temperatura que se autoorganiza como un biomaterial nanoestructurado con características inmunoestimuladoras. La proteína antigénica de la cápside IPNV-VP2 se unió al IFNγ de la trucha arcoíris (IPNV-IFNγ) y a un ligando CCR5 de tipo humano (IPNV-IFNγ-CCR5). El constructo modular se sobreexpresó en *E. coli* y se purificó con una combinación de métodos enzimáticos y físicos simples. IPNV-IFN-CCR5^{NP} fue caracterizado por microscopía electrónica como nanopartículas que fueron endocitadas por macrófagos de trucha (RT-HKM), induciendo la sobreexpresión de genes antivirales (Vig-1 y Mx), proinflamatorios (IL-1β y CCL4) y del receptor diana del ligando (CCR11 de trucha). Se evaluó la expresión génica en órganos linfoides secundarios intubados oralmente con iRFP^{NP}, IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} mostrando que los NPs no estimulaban la respuesta antiviral. Sin embargo, los linfocitos B IgM/IgT, las quimiocinas proinflamatorias (CCL4 y IP-10), el gen antiinflamatorio (IL-10) y el receptor CCR11 fueron sobreexpresados en días específicos tras la intubación y en diferentes órganos (intestino posterior, riñón anterior y bazo). Por último, se observaron títulos elevados de anticuerpos del virus IPN en el día 21 en todos los tratamientos (incluidos los peces no tratados), lo que sugiere que las truchas juveniles eran portadoras asintomáticas del virus IPN. No obstante, se detectó un aumento significativo del título de Ab en las truchas estimuladas con IPNV-IFN-CCR5^{NP} en comparación con los otros grupos. Esto sugiere que el ligando podría estar uniéndose a su receptor en las células diana y orquestando la activación de la respuesta inmunitaria local y sistémica.

1. INTRODUCCIÓN

La vacunación es el método más eficaz para prevenir una amplia gama de enfermedades víricas en acuicultura. El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) es una enfermedad vírica aguda y muy contagiosa que afecta a peces jóvenes de trucha arcoíris (*O. mykiss*) y salmón atlántico (*S. salar)* en piscifactorías [1, 2, 3]. Este virus puede causar el 100% de la mortalidad en las primeras etapas

de vida de la trucha y en los juveniles de salmón post-esmoltificación [1, 2] Dopazo et al. indicaron que el IPNV se detecta a menudo en los leucocitos circulantes y, en consecuencia, se propaga a diferentes tejidos, como el riñón, el intestino y el páncreas durante la infección aguda [1]. El tropismo tisular del IPNV depende en gran medida de las especies de peces, las cepas virales y la edad de los peces [1].

El virus IPN es un miembro del género *Aquabirnavirus* dentro de la familia *Birnaviridae* y es el agente causante de la enfermedad IPNV. El genoma viral tiene dos segmentos (A y B) de ARN de doble cadena (ds) [4]. El segmento A contiene un marco de lectura abierto (ORF) que codifica una gran proteína que se escinde para generar pVP2 (precursor de VP2), VP4, y VP3 [5]. La proteína VP2 es el principal componente de la cápside vírica y es responsable de la virulencia y el tropismo de la célula huésped [6, 7]. El desarrollo de vacunas contra el IPNV se ha vuelto indispensable para la prevención y el control de las infecciones víricas en salmónidos [8, 9, 10]. Existen en el mercado varias vacunas inactivadas contra el IPNV para administración intraperitoneal (i.p.) y actualmente no más de dos para administración oral. Sin embargo, se ha informado de que no siempre protegen contra la enfermedad, mostrando a menudo una baja inmunogenicidad y eficacia [8, 11, 12]. Las vacunas inactivadas son menos eficaces, porque los procesos de inactivación pueden destruir o desnaturalizar la proteína antigénica [11, 13, 14]. Actualmente, hay dos vacunas de subunidades disponibles en el mercado: una para administración intraperitoneal (IPNV, cápside VP2) y la segunda (IPNV, cápside VP2-VP3) para administración oral a alevines de salmón (MSD Animal Health). A diferencia de las vacunas atenuadas o inactivadas, las vacunas de subunidades tienen la ventaja de ser seguras porque no contienen patógenos vivos o enteros que puedan replicarse en el huésped. Además, las estructuras de las vacunas de subunidades están bien caracterizadas, centran la respuesta inmunitaria en el reconocimiento de un antígeno específico y puede producirse en grandes cantidades [15, 16]. Sin embargo, las vacunas de subunidades pueden inducir una respuesta inmunitaria menor, ya que suelen elaborarse con un único antígeno y no se replican en el hospedador como las vacunas atenuadas, requiriendo dosis múltiples de refuerzo o adyuvantes que ayuden a aumentar y prolongar el periodo de inmunización [15, 16]. Un método para mejorar la seguridad y la eficacia de cualquier vacuna consiste en administrar el antígeno con un ligando que tenga alta afinidad por células u órganos infectados [17]. Estas vacunas dirigidas administrarían el antígeno directamente a las células infectadas, evitando la captación inespecífica y la toxicidad potencial para las células sanas, y también podrían administrarse a dosis más bajas, porque la unión al receptor y la internalización pueden concentrar los conjugados en el interior de las células patológicas receptoras-positivas [17].

La inclusión de antígenos en el alimento es el método más atractivo y práctico para administrar vacunas, porque es seguro, no estresante y puede administrarse fácilmente a alevines y peces de todas las tallas. Para diseñar y desarrollar una vacuna oral eficaz que estimule una fuerte respuesta

inmunitaria local y sistémica, la proteína antigénica debe estar protegida contra el entorno ácido del estómago para permanecer intacta cuando llegue a la parte inferior del intestino, donde se absorbe y transporta a las células inmunitarias [18, 19]. Las vacunas orales a base de proteínas y péptidos son aún más difíciles de elaborar debido a que pueden ser rápidamente degradadas por el ácido gastrointestinal y las enzimas intestinales, mostrando baja solubilidad, escasa permeabilidad e inestabilidad gastrointestinal [20]. Para evitar la degradación de las proteínas, se han intentado varias estrategias, en particular sistemas de administración que encapsulan la proteína o nanotransportadores dirigidos a los enterocitos para facilitar la internalización de micropartículas antigénicas [21]. A la fecha, diferentes vacunas orales contra IPNV, VNNV, VHSV o SVCV han sido encapsuladas en microcápsulas de alginato o nanopartículas de quitosano [18]. Se ha informado de que una vacuna oral encapsulada de refuerzo contra el ISAV es capaz de aumentar los niveles de anticuerpos IgM en salmón de cultivo [22]. Se han desarrollado diferentes vacunas experimentales no encapsuladas utilizando levaduras o plantas para expresar antígenos virales [23]. Diferentes estrategias se centran en mejorar la absorción oral en el tracto gastrointestinal o en intentar desarrollar nanotransportadores que contengan ligandos específicos dirigidos a receptores o células intestinales especializadas [20]. El transporte de antígenos a las células epiteliales intestinales puede estar mediado por células presentadoras de antígenos (APC) como los macrófagos o receptores celulares de membrana específicos en los enterocitos [20, 23]. Se ha demostrado que los ligandos unidos a la superficie de los nanotransportadores pueden mejorar significativamente la captación y el transporte transepitelial de antígenos [21].

En este contexto, hemos diseñado una vacuna oral de subunidad con un adyuvante (IFNγ) y dirigida (ligando CCR) contra el IPNV que no necesita ser encapsulada, es segura y estable bajo condiciones extremas. A falta de una molécula ligando de CCR5 en salmónidos, hemos añadido un módulo de ligando CCR5 humano que se ha descrito como un potente agonista del receptor CCR5 [24]. Los receptores CCR5 se expresan de forma constitutiva en los linfocitos intraepiteliales (IELs) del intestino posterior y se han descrito como el principal correceptor del VIH. En general, las quimiocinas humanas están muy conservadas y comparten similitudes estructurales con las quimiocinas de los peces [25]. Se han descrito dos homólogos de CCR5 en el salmón [26] y uno en la trucha arcoíris denominado CCR11, que se expresa de forma constitutiva en el bazo, el riñón anterior, las gónadas y el intestino, y puede aumentar su expresión en respuesta a Poly(I:C) o a las citocinas [27].

Adicionalmente, hemos incluido un dominio que codifica el IFNγ. Los IFNs son citoquinas secretadas por las células que pueden inhibir la replicación de virus dentro de las células e inducir una respuesta antiviral contra las infecciones virales [28, 29, 30, 31]. El IFN de tipo I conduce a la activación de las defensas inmunitarias innatas contra la infección vírica, y los de tipo II (IFNγ) están

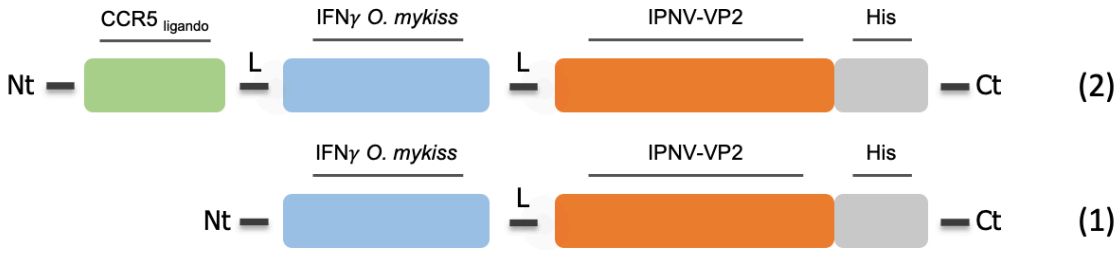
más implicados en la mejora de la inmunidad mediada por las células inmunológicas [32]. Se han identificado dos miembros del IFN de tipo II, el IFNγ y el IFNγ-rel que, al unirse a sus receptores (IFNGR1 e IFNGR2), activan la vía de señalización JAK/STAT induciendo la expresión de varios genes bajo el control de IFNγ [32, 33, 34]. El IFNγ es secretado por células implicadas en las primeras fases de una infección, como las natural killer (NK) y los macrófagos, y desempeña un papel mediador en la respuesta inmunitaria adaptativa, siendo expresado principalmente por los linfocitos T helper 1 $CD4^+$ y los linfocitos citotóxicos $CD8^+$ en respuesta a antígenos presentados por el MHC [31, 35]. Se ha descrito que el IFNγ es inducido de forma significativa por varios virus de peces, como el VHSV, el SVCV, el VNNV y el IHNV [29]. Sun et al [36] demostraron que el IFNγ es capaz de estimular la actividad antiviral contra el IPNV y el SAV3 en salmónidos.

Estudios previos del grupo han demostrado que las proteínas recombinantes antivirales ($IPNV^{NP}$) producidas como IBs o Nanopellets (NPs), tienen la capacidad de estimular la respuesta inmune innata en macrófagos de HK y adaptativa, en ensayos *in vivo* [37, 38]. Además, hemos demostrado que las proteínas antivirales recombinantes nanoestructuradas (NPs) presentan múltiples ventajas: a) proteínas a nanoescala estables, modificables y no tóxicas que penetran en las células manteniendo la actividad biológica; b) promueven la liberación lenta de la proteína funcional; c) son estables a pH bajo (pH = 2), por lo tanto puede administrarse por vía oral dentro del pienso sin necesidad de encapsulamiento; d) los NPs son fáciles de producir, a bajo costo y de fácil escalado; e) los NPs son estables a temperaturas extremas (-80 a 100°C) con una larga vida útil, fáciles de almacenar sin necesidad de protección térmica y pueden tolerar el proceso de fabricación de piensos por extrusión. En el estudio, hemos combinado un módulo proteico para fabricar una proteína recombinante con diferentes funcionalidades. Se ha nanoestructurado una subunidad de vacuna que incluye una proteína antigénica VP2 (IPNV-VP2 cápside) unida a un IFNγ de trucha y un ligando de quimiocina CCR5 de humano ($IPNV\text{-}IFN\text{-}CCR5^{NP}$) para evaluar si la adición de IFN gamma de trucha tiene la capacidad de potenciar la respuesta inmunitaria antiviral, y si la adición del ligando tiene la capacidad de dirigir la vacuna a células específicas del intestino y, por lo tanto, activar la respuesta inmune local y sistémica. Los resultados mostraron que la nanoestructura recombinante de IFNγ con ligando (CCR5) unidas a proteínas antigénicas recombinantes (IPNV-VP2) estimulan la expresión de genes antivirales y proinflamatorios en RT-HKM y que $IPNV\text{-}IFN\text{-}CCR5^{NP}$ fue capaz de estimular significativamente la expresión de anticuerpos IgM específicos de IPNV en comparación con el control $iRFP^{NP}$ e $IPNV\text{-}IFN^{NP}$, lo que sugiere que la administración oral de $IPNV\text{-}IFN\text{-}CCR5^{NP}$ puede inducir una respuesta inmune sistémica en truchas juveniles.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño y producción de la proteína antigénica viral nanoestructurada IPNV-IFN-CCR5^{NP}.

Se diseño una proteína antigénica recombinante modular IPNV-IFN-CCR5^{NP} basada en la proteína antigénica VP2 del IPNV (1-442) (UniProt acc. no: Q703G9) unida a IFNγ de O. *mykiss* (25-180) (UniProt acc. no: Q5QSL2) y a una secuencia del ligando del receptor 5 de quimioquinas (QGPPGDIVLA). El ligando CCR5 se ha descrito como un potente correceptor del receptor CCR5 humano, que conduce a la activación de la vía de señalización [24]. Además, un péptido enlazador (GGSSRSS) de los módulos proporciona flexibilidad a los dominios adyacentes [39] (**Figura 1**). Las construcciones se optimizaron en codones para su expresión en *E. coli*, y clonaron y transformaron según lo descrito en el **Capítulo 2.**



- **Nt:** N terminal
- **L** (conector): GGSSRSS
- **His:** 6xHis-tag
- **Ct:** C terminal

Figura 1. Diseño de plataformas modulares funcionales de IPNV-IFN^{NP} (1) e IPNV-IFN-CCR5^{NP} (2).

2.2 Producción, purificación, cuantificación y caracterización morfométrica de IPNV-IFN-CCR5^{NP}

La producción de las proteínas recombinantes como IBs se realizó según el método descrito en el **Capítulo 2**. La expresión de IPNV-IFN-CCR5^{NP} se llevó a cabo durante 1,5 h a 37°C y 250 rpm, y la purificación de los cultivos se realizó por disrupción enzimática y mecánica según el proceso descrito en el **Capítulo 1.** Tras la purificación, los NPs de IPNV-IFN-CCR5^{NP} se almacenaron a -80ºC. Finalmente, las proteínas fueron semicuantificadas, marcadas fluorescentemente y evaluadas por citometría de flujo y microscopia confocal según lo indicado en el **Capítulo 1**.

2.3 Caracterización morfométrica de las nanoestructuras proteicas de IPNV-IFN-CCR5^{NP}

La morfometría y el tamaño de los NPs nanoestructurados fue determinada con un microscopio electrónico de barrido (FESEM) y las muestras se prepararon y analizaron según el punto 2.3 del **Capítulo 2.**

2.4 Caracterización funcional *in vitro* de IPNV-IFN-CCR5^{NP} en macrófagos de trucha arcoíris

2.4.1 Cultivo celular

Los macrófagos fueron obtenidos del riñón anterior (RT-HKM) de *O. mykiss* (100-140 g) según lo descrito en el punto **2.4.1** del **Capítulo 2**, y la internalización y expresión génica de los NPs, fue evaluada cuando los monocitos estaban completamente diferenciados a macrófagos el día 5.

2.4.2 Endocitosis de IPNV-IFN-CCR5^{NP} por las células RT-HKM

Para determinar si los macrófagos internalizan los NPs, se añadió IPNV-IFN-CCR5^{NP} fluorescente a diferentes dosis y tiempos a macrófagos HK al 80% de confluencia después de 2 h de incubación en medio mínimo (0-0,5% FBS). Para los ensayos de dosis-respuesta, se añadió a las células IPNV-IFN-CCR5^{NP} a 2,5, 5, 10, 20 y 50 µg/ml y se incubaron durante 12 h. Para los ensayos de endocitosis comparativa entre NPs, las células se incubaron con IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} (20 µg/ml) durante 12 h. Para los ensayos de tiempo-respuesta, las células se incubaron con 20 µg/ml de IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} durante 1 h, 3 h y 12 h. A continuación, los macrófagos fueron desprendidos, resuspendidos y analizados por citometría de flujo (CytoFLEX LX) como lo descrito en el **Capítulo 2.** Para comprobar que los NPs estaban presentes en el interior de los macrófagos, se realizó microscopía confocal (Zeiss LSM 700). RT-HKM fueron sembradas e incubadas con IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} fluorescentes a 40 µg/ml durante 15 h, teñidas con tinción Hoechst y CellMask Deep Red, y las imágenes de las células registradas por microscopia confocal (Zeiss LSM 700) según el procedimiento descrito en el punto 2.4.2 del **Capítulo 2.**

2.4.3 Análisis de la expresión génica en células RT-HKM expuestas a IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP}

Se incubaron macrófagos HK con IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} para evaluar si estimulaban el sistema inmunitario innato y si el dominio ligando (IPNV-IFN-CCR5^{NP}) es capaz de inducir la expresión de los receptores del gen CCR5. Los cultivos primarios de RT-HKM se obtuvieron como se describe en la sección **2.4.1** del **Capítulo 2.** Los macrófagos diferenciados se incubaron en medio

mínimo durante 2 h y se estimularon durante 15 h con: IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} a 20 µg/ml, Poly(I:C) y LPS a 10 µg/ml, iRFP^{NP} a 20 µg/ml y células no tratadas como control. La expresión génica se realizó según el método descrito en la sección **2.4.3** del **Capítulo 2.** Se evaluó la expresión de genes de respuesta inmune innata (Vig-1, Mx, CCL4, IL-1β, IFNGR2 e IP-10*)* y CCR11 (receptor de trucha tipo CCR5). Las secuencias de los cebadores y los números de acceso figuran en la **Tabla 1** del **Capítulo 2.** Todas las muestras (n=4 por tratamiento) se analizaron por triplicado y los datos se analizaron mediante el método de Livak [40].

2.5 Caracterización funcional *in vivo* de los NPs tras la intubación oral de trucha arcoíris

2.5.1 Cultivo de trucha arcoíris

Diferentes grupos de truchas juveniles (*O. mykiss*) de entre 20-30 g y 100-140 g fueron obtenidas de centros de producción y mantenidos en el estabulario de peces de la UAB (Ref: ES082660037080) en un sistema de recirculación en 5 estanques de 0,5 m^3 y un estanque de 1,2 m^3 a una densidad de entre 10 y 13 kg/m^3 a ~16ºC y fotoperiodo 12 h:12 h. Los peces fueron alimentados con dietas comerciales (INICIO PLUS/EFICO, Biomar S.A.) al 2 y 3% de su peso corporal. Los niveles de amoníaco y pH del agua fueron medidos y controlados diariamente. Los experimentos se realizaron siguiendo los Principios Rectores Internacionales para la Investigación con Animales (EU 2010/63).

2.5.2 Expresión génica en órganos linfoides secundarios de truchas juveniles intubadas con IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP}

Para evaluar la biodistribución de los NPs en órganos mediante análisis de genes y determinar si el módulo ligando incrementa la respuesta inmune en comparación con el módulo interferón sin ligando, IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} fueron administrados por vía oral a individuos juveniles de trucha. Para el ensayo, fueron seleccionadas 100 truchas juveniles (29 ± 3,2 g) que fueron distribuidas aleatoriamente en 4 estanques (23 peces/estanque) y aclimatadas durante una semana. Los peces se dejaron en ayuno durante al menos 48 horas y los NPs (IPNV-IFNγ e IPNV-IFNγ-ligando) fueron administrados oralmente por intubación a una dosis de ~8,33 mg/kg pez/día (n=23 peces/tratamiento) durante tres días consecutivos (dosis total= 25 mg/kg pez) según el procedimiento descrito en el apartado **2.5.2** del **Capítulo 2.** Además, se administraron PBS (100 ul) e iRFP^{NP} (~8,3 mg/kg pez) una proteína inmune no relevante, que se utilizaron como controles siguiendo el mismo esquema. Se recogieron muestras de intestino posterior, bazo y riñón anterior n=4 truchas/tratamiento los días 1, 3, 15 y 21, tras la última intubación y hasta el día 21, los peces fueron alimentados según lo indicado en la sección **2.5.1.** Además, se tomaron muestras de sangre (suero) en el tiempo 0 previo a la intubación y el día 21 tras la intubación. Las muestras de bazo, riñón anterior e intestino posterior

fueron homogenizadas (Polytron PT 1600 E, KINEMATICA AG) y se extrajo el ARN utilizando TriReagent (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el análisis de la expresión génica, se seleccionó un conjunto de genes implicados en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Vig-1, Mx, CCL4, IL-1β, IFNGR2, IP-10, IL-10, TGF-β, CD4, CD8α, MHCI, MHCII, IgM, IgT) y CCR11 (receptor de trucha tipo CCR5). El análisis de genes se realizó como se describe en la sección **2.4.3.**

2.5.3 Títulos de anticuerpos específicos contra IPNV en suero de trucha tras la intubación con IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP}

Para evaluar si IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} inducían la producción de anticuerpos específicos contra el virus IPN, se intubaron por vía oral alevines de trucha arcoíris (~30 g) (dosis total = 25 mg/kg de pez) con IPNV-IFN^{NP}, IPNV-IFN-CCR5^{NP}, iRFP^{NP} y PBS (100 µl). Se realizaron ELISA indirectos utilizando muestras de suero de al menos 4 peces no tratados en el día 0 (29 ± 3,4 g) y de peces intubados con NPs en el día 21 (30 ± 3,8 g). Brevemente, se recubrieron 96 placas de micropocillos (Microlon Sigma-Aldrich) con IPNV inactivado a 0,5 µg/pocillo en 50 µl de PBS O/N a 4ºC. Los pasos posteriores se realizaron a RT (~21ºC). Se realizaron lavados 3X entre pasos con PBS al 0,05% (v/v) de Tween-20. El bloqueo se realizó con 200 µl de leche desnatada al 3% en PBS durante 2 h. Se prepararon diluciones triplicadas de suero en PBS al 0,05% (v/v) de Tween-20 y 0,5% de BSA (50 µl/pocillo). El anticuerpo monoclonal anti-trucha IgM (1G7) [41, 42] se diluyó en tampón de lavado (1:200) y se incubó (50 µl/pocillo) durante 90 min [43]. El anticuerpo anti-ratón de conejo conjugado con peroxidasa RAM-PO (Sigma-Aldrich) se diluyó en tampón de lavado (1:500) y se incubó (100 µl/ml) durante 1 h. Se añadió el reactivo de sustrato 3,3'5,5' tetrametilbencina (TMB) (Thermo Scientific) (100 µl/pocillo) y se incubó durante 20-30 min en oscuridad. La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de 2 M H_2SO_4 y la absorbancia se midió a 450 nm en el lector de absorbancia de microplacas iMark (Bio Rad). El título de anticuerpos específicos se definió como el inverso de la mayor dilución que seguía dando un resultado positivo.

2.6 Estadísticas

La estadística se realizó con GraphPad Prism 8.01 para Windows. Las comparaciones de medias para cada grupo experimental frente al control y entre tratamientos se analizaron mediante ANOVA unidireccional, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett o prueba t unilateral sin pares con corrección de Welch para varianzas desiguales, o prueba no paramétrica de Mann-Whitney sin pares. Los datos se presentan como media ± desviación estándar (DE) y ns: no significativo; *p < 0,1; **p < 0,05; ***p < 0,01; ****p < 0,001 se consideró estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de las proteínas virales antigénicas modulares nanoestructuradas IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP}

3.1.1 Características morfométricas de los NPs

Hemos producido y purificado una proteína modular nanoestructurada, denominadas Nanopellets (NPs) utilizando un enfoque modular con combinaciones del dominio antigénico V2 del virus IPN, la secuencia del IFN gamma (IPNV-IFNγ^{NP}) y la secuencia del ligando CCR5 (IPNV-IFNγ-CCR5^{NP}) (**Figura 2**). El rendimiento de producción promedio para IPNV-IFN-CCR5^{NP} (n = 2 purificaciones) fue de 4,7 mg/l, menor que IPNV-IFN^{NP} (8 mg/l) (**Figura 2**) y VHSV-IFN^{NP} (14,2 mg/l) (datos no publicados), similar a IPNV^{NP} (4,8 mg/l) y SVCV-IFN^{NP} (3,6 mg/l). y mayor que SVCV^{NP} (0,3 mg/l) (**Capítulos 1 y 2**). Estos resultados confirman que el rendimiento de los NPs varía en función del tamaño de la secuencia y longitud del constructo. IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} mostraron un tamaño y una morfología externa diferentes (**Figura 3**). IPNV-IFN^{NP} tiene una superficie porosa y una forma general oviforme, mientras que IPNV-IFN-CCR5^{NP} tiene una forma redondeada y una superficie más lisa (**Figura 3**). La longitud media de IPNV-IFN^{NP} (937 ± 156 nm) es aproximadamente el doble que la de IPNV-IFN-CCR5^{NP} (460 ± 89 nm). Aunque IPNV-IFN-CCR5^{NP} es una proteína más grande (~69 kDa) mostró una morfología más compacta con la mitad del tamaño de IPNV-IFN^{NP} (~67,5 kDa). La longitud media de IPNV-IFN^{NP} incubada a pH 2 y a 100ºC fue similar a los NPs control sin tratar (**Figura 3A, i y ii**) (Sección **3.1.1, Capítulo 2**). De esta misma forma, la longitud media de IPNV-IFN-CCR5^{NP} incubada a pH 2 (516 ± 132 nm) y a 100ºC (404 ± 91 nm) también fueron similares a IPNV-IFN-CCR5^{NP} sin tratar (**Figura 3B, i y ii**), indicando que IPNV-IFN-CCR5^{NP} a pH 2 y temperatura extrema mantiene las propiedades estructurales siendo capaz de resistir ambientes estomacales ácidos y altas temperaturas que puede alcanzar el proceso de extrusión al producir pienso.

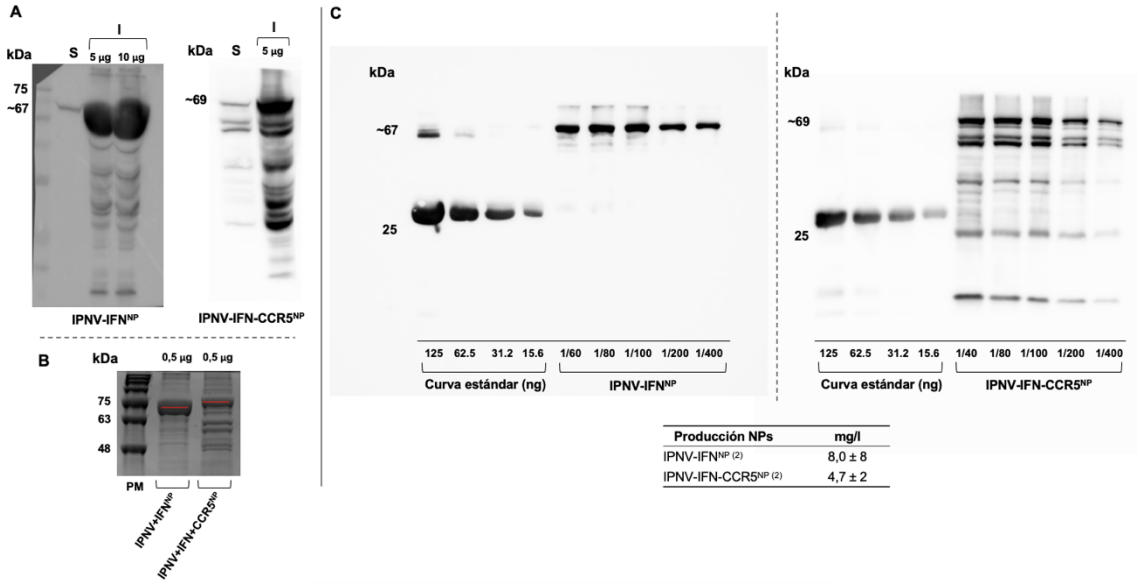


Figura 2. Fracción soluble-insoluble, SDS-PAGE Coomassie y cuantificación de los NPs. (**A**) Fracción soluble (S) e Insoluble (I) de IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} obtenida post prueba de inducción con IPTG (O/N). **(B)** Nivel de pureza y comparación de la homogeneidad de IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} evaluados mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie. (**C**) IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} semi cuantificados mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-His-tag. Las concentraciones de proteína se calcularon a partir de una curva estándar de una proteína recombinante marcada con His utilizando el software Quantity One (Bio-Rad). La curva estándar osciló entre 125 y 15,6 ng y las diluciones de los NPs fueron de 1:40 a 1:400. (C) El rendimiento de IPNV-IFN^{NP} y IPNV-IFN-CCR5^{NP} fue calculado a partir de 2 lotes diferentes.

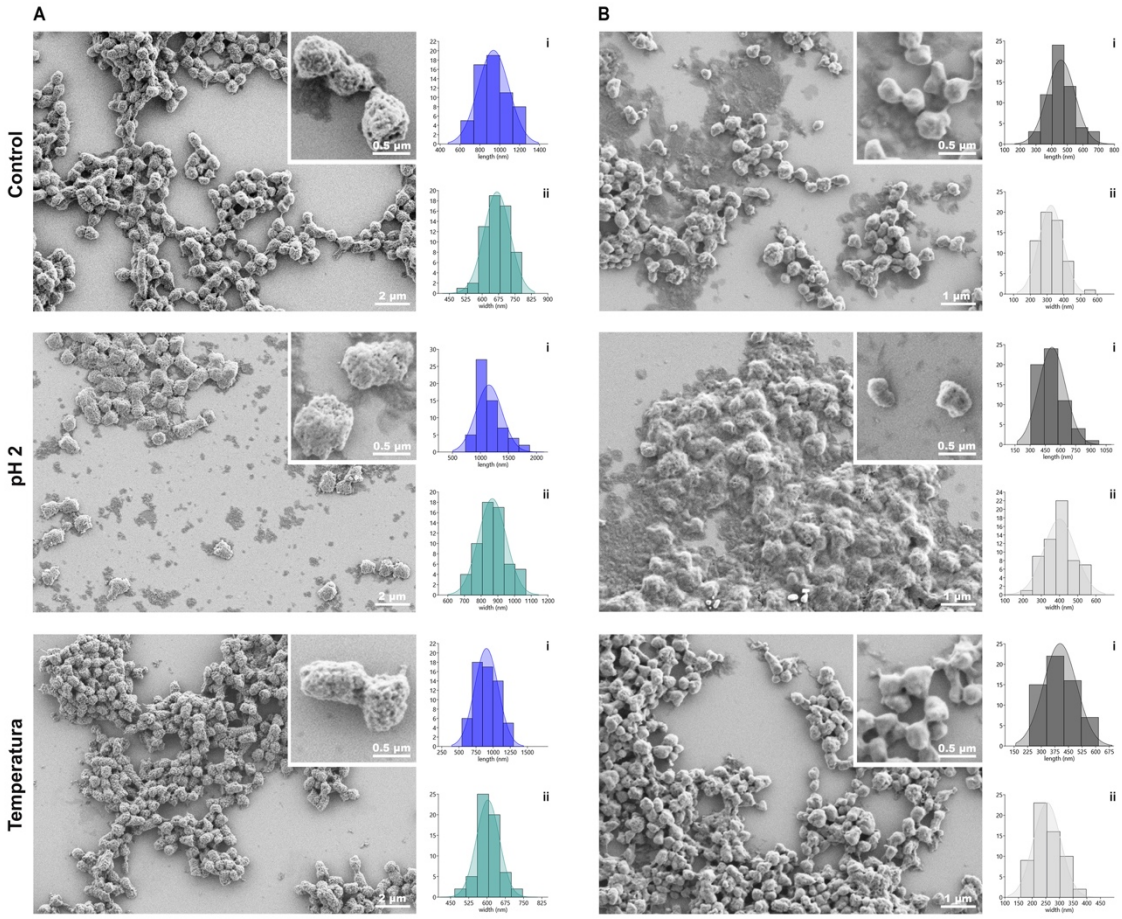


Figura 3. Caracterización comparativa de las proteínas nanoestructuradas IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} en condiciones extremas de pH y temperatura. Imágenes FESEM de (A) IPNV-IFN^{NP} y (B) IPNV-IFN-CCR5^{NP} expuestas a pH 2 y alta temperatura (100ºC). Histogramas de distribución de tamaños de longitud (i) y anchura (ii) (n=60) de IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP}.

3.1.2 Endocitosis del módulo antigénico viral nanoestructurado IPNV-IFN-CCR5^{NP} por células HKM

Los macrófagos de trucha (RT-HKM) endocitaron fácilmente IPNV-IFN-CCR5^{NP}. En los ensayos de dosis-respuesta, más del 70% de las células fueron positivas para la endocitosis de IPNV-IFN-CCR5^{NP} a todas las dosis, alcanzando una media de 87 ± 9%, 83 ± 3% y 80 ± 12% de células positivas a 5, 10 y 20 µg/ml, respectivamente. La intensidad de fluorescencia media (IFM) aumentó al aumentar las dosis, alcanzando las intensidades más altas a 20 y 50 µg/ml (**Figura 4A**), teniendo la capacidad de endocitar los NPs a medida que aumenta la dosis, similar a lo observado con IPNV-IFN^{NP} (**Capitulo 2**) y reportado en nuestros estudios previos [37]. La endocitosis comparativa entre IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} a 20 µg/ml mostró que IPNV-IFN-CCR5^{NP} fue endocitado más eficientemente que IPNV-IFN^{NP} (**Figura 4B**). Este patrón también se observó en los ensayos de tiempo-respuesta (**Figura 4C**) y podría explicarse porque IPNV-IFN-CCR5^{NP} es más compacto, y

esta característica permite una endocitosis más rápida y fácil. El tamaño es una característica importante que permite modular la endocitosis y el destino de las nanopartículas [44, 45]. Otra explicación sería que el ligando CCR5 de los NPs facilita la captación por los macrófagos mediante endocitosis mediada por receptor.

El receptor de quimiocina CCR5 es expresado en macrófagos, células T y células dendríticas y sirve como principal correceptor para la entrada del virus VIH en macrófagos [46] y se ha reportado la interacción con ligandos, en particular la quimiocina CCL8 (proteína quimioatrayente de monocitos MCP-2), la quimiocina CCL3 (proteína inflamatoria de macrófagos, MIP-1α), CCL4 (proteína inflamatoria de macrófagos, MIP-1β) y CCL5 (RANTES) [48, 49]. Además, se ha reportado que el receptor CCR5 se expresa preferentemente en el fenotipo de macrófago M1 (proinflamatorio) en respuesta a IFNγ y LPS apoyando el reclutamiento selectivo de células T y células efectoras específicas del tipo Th1 [47], lo que está en consonancia con nuestros resultados de sobreexpresión génica de CCR11 (tipo CCR5) observado en los macrófagos tratados con los NPs (IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP}) y LPS (**Figura 5**).

Qi y colaboradores identificaron y caracterizaron en *O. mykiss* cuatro receptores CCR específicos, denominados CCR4La, CCR4Lc1, CCR4Lc2 y CCR11 (receptor utilizado en el estudio), con un estrecho vínculo con los receptores CCR humanos, en términos de homología de aminoácidos y conservación sinténica en los cromosomas y con la capacidad de expresarse en macrófagos del riñón anterior así como en bazo e intestino de truchas en respuesta a Poly(I:C), Peptidoglicano (PGN) o citocinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6 e IFNγ) [27]. Adicionalmente, reportaron que la secuencia del receptor CCR11 de trucha es ortóloga a la secuencia del receptor CCR5 del salmón reportada por Grimholt et al., quienes identificaron 48 receptores de quimiocinas o receptores similares a la quimiocina en salmón del atlántico [26].

Se ha reportado que los receptores de quimiocinas sufren degradación en ausencia del ligando y pueden cambiar su funcionalidad en función del número de receptores que son activados [49], lo que parece no haber ocurrido en nuestro caso, mirando el alto porcentaje e intensidad media de células fluorescentes positivas en los macrófagos expuestos a IPNV-IFN-CCR5 en comparación a IPNV-IFN (**Figura 4**) y que podría ser reforzado observando la sobreexpresión génica del receptor CCR11 inducida por IPNV-IFN-CCR5 en macrófagos (**Figura 5**), la sobreexpresión de CCR11 en tejidos del intestino distal al día 3 post intubación oral de los NPs (**Figura 6A**) y el incremento significativo de CCR11 en el bazo al día 15 post intubación (**Figura 7B**). Estos resultados podrían explicar que el ligando de CCR5 humano puede unirse exitosamente al receptor CCR11 induciendo la internalización de los NPs antigénicos en macrófagos y probablemente estimular la respuesta inmune mediante la inducción de citocinas proinflamatorias (IL-1β y CCL4) (**Figura 5**) y con la capacidad

de inducir una respuesta inmune sistémica mediante la generación de anticuerpos de específicos de IPNV (**Figura 8**).

Observando los datos de expresión génica de la sección **3.1.3**, la integración del ligando parece mejorar ligeramente la inducción de los genes antivirales de los macrófagos, aunque las diferencias estadísticas no fueron significativas. Las imágenes de microscopía confocal también mostraron que IPNV-IFN^{NP} (**Figura 4D, ii)** e IPNV-IFN-CCR5^{NP} (**Figura 4D, iii**) fueron internalizados por los macrófagos tras 15 h de incubación. Estos resultados fueron coherentes con los obtenidos por citometría, que mostraron que más del 70% de las células eran positivas a la presencia de IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP}. De nuevo, observamos que las células expuestas al IPNV-IFN-CCR5^{NP} endocitaron más NPs, mostrando agregados más grandes en el citosol en comparación con el IPNV-IFN^{NP} (**Figura 4D, ii y iii**), lo que podría explicar la mayor intensidad de fluorescencia observada por citometría (**Figura 4B y 4C**).

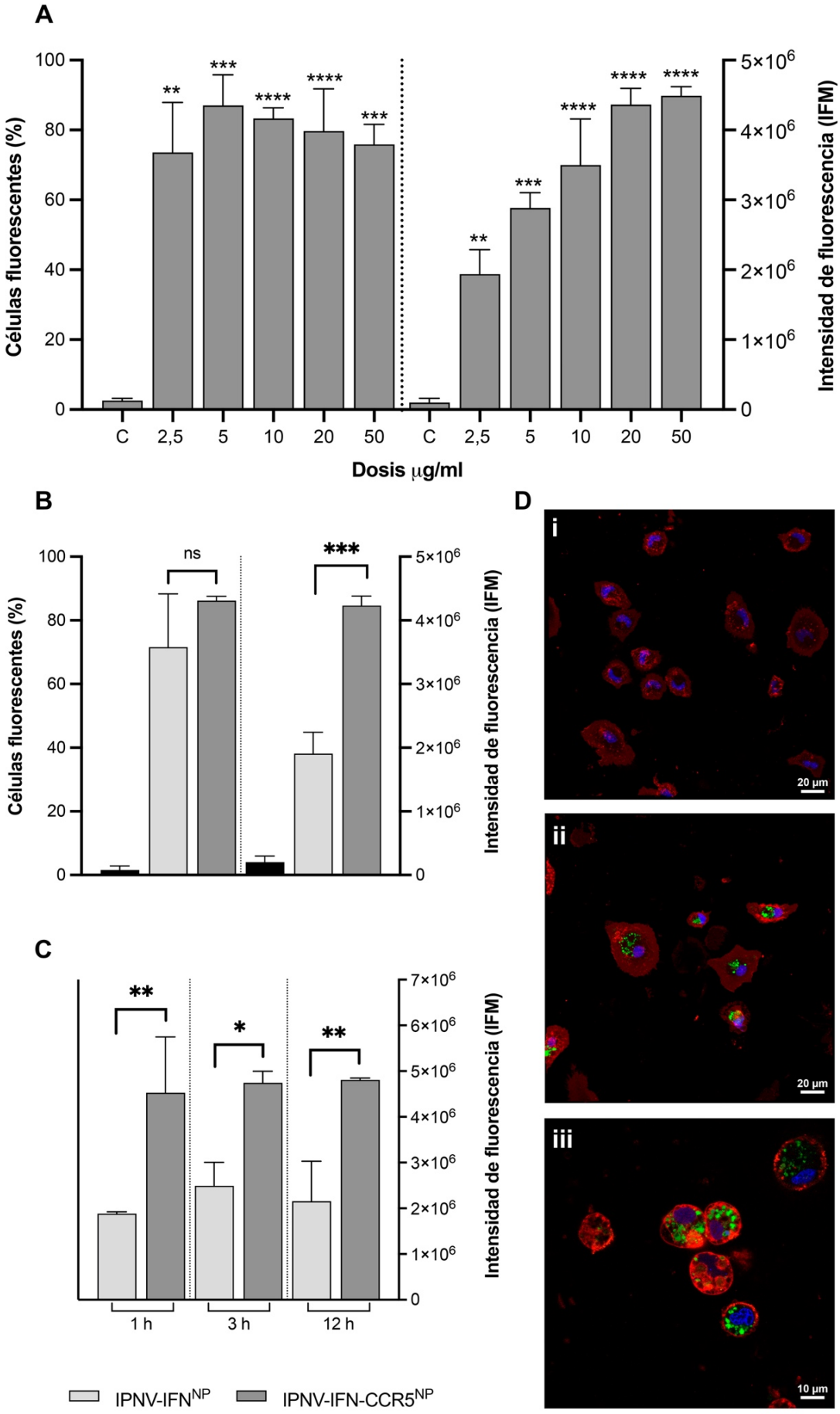

A
Células fluorescentes (%)
Intensidad de fluorescencia (IFM)
Dosis μg/ml
C
2,5
5
10
20
50
B
ns
***
C
**
*
**
1 h
3 h
12 h
IPNV-IFN^NP
IPNV-IFN-CCR5^NP
D
i
ii
iii
20 μm
20 μm
10 μm

Figura 4. Endocitosis de IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} por RT-HKM. Los macrófagos se trataron con NPs fluorescentes y se analizaron por citometría de flujo: (**A**) Dosis-respuesta, (**B**) endocitosis comparativa y (**C**) tiempo-respuesta. Para los ensayos de dosis-respuesta, se añadieron de 2,5 a 50 μg/ml de IPNV-IFN-CCR5^{NP} a células HKM y se incubaron durante 12 h. Para los ensayos de endocitosis comparativa, se añadieron 20 μg/ml de NPs (IPNV-IFN^{NP} frente a IPNV-IFN-CCR5^{NP}) a las células y se incubaron durante 12 h. Para los ensayos de tiempo-respuesta, los cultivos celulares se incubaron durante 1 h, 3 h y 12 h a 20 μg/ml. (**D**) Microscopía confocal de RT-HKM (40 μg/ml, 15 h); imagen confocal de (**i**) RT-HKM no tratado, (**ii**) RT-HKM tratado con IPNV-IFN^{NP} y (**iii**) RT-HKM tratado con IPNV-IFN-CCR5^{NP}. Las NPs se muestran en verde, la membrana celular en rojo y los núcleos en azul. Las diferencias entre medias se analizaron mediante un ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, tratamientos frente a control. Niveles de significancia: ns, no significativo; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

3.1.3 Análisis de la expresión génica en células RT-HKM tratadas con NPs

Con el objetivo de desglosar la funcionalidad de los dominios IPNV con IFNγ y ligando, se utilizaron genes marcadores de respuesta inmune antiviral del antígeno IPNV-VP2 (Vig-1 y Mx), genes proinflamatorios estimulados por restos bacterianos (IL-1β y CCL4) y el gen CCR11 para la actividad del ligando (CCR5). IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} (20 μg/ml) provocaron una fuerte respuesta antiviral en cultivos primarios de macrófagos. Los genes antivirales Vig-1 y Mx aumentaron significativamente en los macrófagos incubados con IPNV-IFN-CCR5^{NP} en comparación con los macrófagos expuestos a la proteína no inmune iRFP^{NP} (20 μg/ml). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de Vig-1 y Mx entre IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} (**Figura 5**). Asimismo, se observó una fuerte antiviralización (Vig-1 y Mx) y activación de la vía de señalización del interferón (IFNGR2 e IP-10) en RT-HKM tras la estimulación Poly(I:C). Thwaite et al informaron de una sobreexpresión significativa de los genes Vig-1 y Mx en RT-HKM estimuladas con IPNV^{NP} y Poly(I:C) [37]. También se ha informado de que los linfocitos transfectados con un plásmido que codifica para IFNγ mostraron sobreexpresión de IFNγ, Mx, IL-1β y Poly(I:C) [50]. La adición de un módulo IFNγ al antígeno SVCV (SVCV-IFN^{NP}), aumentó la expresión de Vig-1 y Mx en comparación con el SVCV sin el dominio IFNγ (**Capítulo 1**). Estos resultados son comparables a los del presente estudio. IFNγ es un regulador clave de la activación de macrófagos y es la citocina que estimula directamente la activación y diferenciación de linfocitos Th no activados CD4^{+} al fenotipo Th1 [36]. Además, tanto la IPNV-IFN^{NP} como la IPNV-IFN-CCR5^{NP} indujeron la expresión génica del receptor de IFN (IFNGR2*)* en macrófagos, a niveles significativamente más altos que la proteína de control (iRFP^{NP}), lo que sugiere que el IFNγ, dentro de la vacuna modular, se unirá al IFNR estimulando la sobreexpresión de IFNGR2. Sin embargo, la

proteína IP-10 inducible por Interferón gamma no fue regulada significativamente por los NPs de IPNV, principalmente IPNV-IFN-CCR5^{NP} en comparación al control iRFP^{NP}. En macrófagos de trucha se ha descrito la expresión del gen de la proteína IP-10 tras la estimulación con IFNγ recombinante [34] y con SVCV también hemos utilizado IP-10 como indicador de la función IFNγ en células ZFL de pez cebra. Sin embargo, aunque se ha informado de que IFNγ induce IP-10 en células de salmón, también se ha sugerido que la actividad antiviral de IFNγ induciendo IP-10 puede ser parcialmente dependiente de la inducción de IFN tipo I [36].

Se observó una sobreexpresión significativa del receptor CCR11 en RT-HKM estimulados con IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} en comparación con la proteína inmunológicamente irrelevante iRFP^{NP} y el control no tratado, y se observó un nivel similar de expresión del receptor CCR11 entre IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} (**Figura 5**). Se ha descrito la sobreexpresión de receptores CCR en macrófagos HK de trucha estimulados con citocinas proinflamatorias como IL-1β , IL-6 e IFNγ o PAMPs, peptidoglicano y bacterias [27]. Estos hallazgos sugieren que el dominio IFN y el ligando CCR5 podrían unirse a los receptores IFN y CCR en macrófagos, lo que en consecuencia puede potenciar las respuestas antivirales e inflamatorias en RT-HKM.

Las citocinas proinflamatorias IL-1β y CCL4 se sobreexpresaron en RT-HKM estimuladas por todas las NPs (iRFP^{NP}, IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP}), así como por LPS y Poly(I:C) en comparación con las células control no tratadas, pero no se observaron diferencias significativas en la expresión génica entre iRFP^{NP}, IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} (**Figura 5**). Se ha descrito que CCL4 se expresa significativamente en macrófagos de trucha tras la estimulación con lipopolisacáridos (LPS) y Poly(I:C) [37, 52, 53]. Estos resultados sugieren que el LPS y el Poly(I:C), así como el IPNV-IFN^{NP} y el IPNV-IFN-CCR5^{NP} que contienen pequeños restos de membrana de células como peptidoglicanos o LPS son suficientes para inducir una respuesta inmune proinflamatoria en macrófagos de HK.

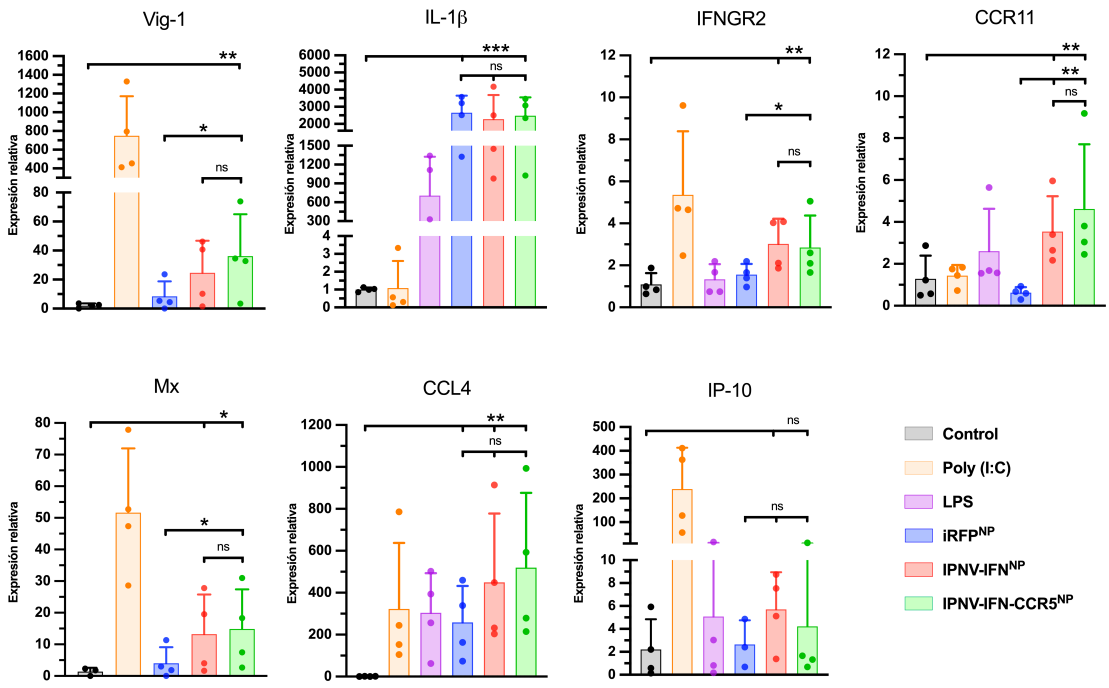


Figura 5. Análisis de la expresión génica de RT-HKM estimuladas con IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP}. Las células RT-HKM se expusieron a NPs durante 15 h: células de control no tratadas (gris), iRFP^{NP} 20 µg/ml (azul), Poly(I:C) 10 µg/ml (naranja), LPS 10 µg/ml (morado), IPNV-IFN^{NP} 20 µg/ml (rojo) e IPNV-IFN-CCR5^{NP} 20 µg/ml (verde). Los datos son la media ± DE (n=4). Las diferencias estadísticas entre tratamientos se analizaron mediante la prueba t unilateral por pares con corrección de Welch para varianzas desiguales o la prueba no paramétrica de Mann-Whitney por pares. Niveles de significancia: ns, no significativo; *p < 0,1; **p < 0,05; ***p < 0,01.

3.2.2 Caracterización funcional in vivo de la respuesta inmune en órganos linfoides de truchas arcoíris juveniles intubadas con los NPs

Durante tres días consecutivos se intubaron oralmente con IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} a 23 truchas arcoíris juveniles (~30 g) por tratamiento (~8,33 mg/kg pez/día) hasta alcanzar una dosis total de 25 mg/kg pez. A continuación, se tomaron muestras de tejido del intestino posterior, el bazo y el riñón anterior de 4 peces/tratamiento los días 1, 3, 15 y 21 después de las intubaciones. Los genes marcadores de la respuesta inmune innata se evaluaron en el intestino posterior y el riñón anterior los días 1 y 3 tras la intubación, mientras que los genes asociados a la respuesta inmune adaptativa se evaluaron en el riñón anterior y el bazo los días 15 y 21 tras la intubación oral. No se observó mortalidad, lesiones cutáneas, comportamiento natatorio anormal, pérdida de apetito, ni signos de toxicidad en las truchas a lo largo de los 21 días del estudio, incluidos los tres días en que se intubaron oralmente los mismos peces por tratamiento. Tanto IPNV-IFN-CCR5^{NP} como IPNV-IFN^{NP} no consiguieron aumentar la expresión de genes antivirales. Sin embargo, algunos genes de

quimioquinas relacionados con la respuesta inmune proinflamatoria, las células B IgM/IgT y el gen antiinflamatorio (IL-10) fueron estimulados. IPNV-IFN-CCR5^{NP}, así como IPNV-IFN^{NP} e iRFP^{NP}, fueron capaces de sobreexpresar el *gen* receptor de quimioquinas CCR11 en el bazo el día 15 después de la intubación, en contraste con los controles no tratados (**Figuras 6 y 7**). Estos resultados mostraron que el ligando incorporado a la vacuna (IPNV-IFN-CCR5^{NP}) no estimuló el gen CCR11, lo que sugiere que los componentes inmunoestimuladores adicionales contenidos en las NPs, como el lipopolisacárido (LPS), el peptidoglicano (PGN) o los residuos celulares de ADN-ARN están implicados en la inducción del receptor CCR11. Qi et al. informaron de una elevada sobreexpresión de receptores CCR en órganos de trucha, como el bazo, el intestino y el riñón anterior estimulados por citoquinas como IL-1β e IFNγ, así como por PAMPs, peptidoglicanos e infección bacteriana [27]. Esto concuerda con nuestro estudio y puede explicar la sobreexpresión del gen CCR11 en el bazo, así como la sobreexpresión significativa de CCR11 detectada el día 3 en el intestino posterior estimulado con IPNV-IFN-CCR5^{NP} e IRFP^{NP}. Asimismo, la quimioquina CCL4 fue sobreexpresada en el intestino posterior por IPNV-IFN^{NP} el día 3 tras la intubación en comparación con IRFP^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} (**Figura 6A**). Se ha descrito que esta quimioquina desempeña un papel clave en la coordinación del grado y la duración de la respuesta inflamatoria local [53]. Por otro lado, la proteína inducible por interferón-gamma (IP-10) quimioquina secretada por las células en respuesta a IFNγ, que en mamíferos desempeña un papel importante en la activación y regulación de las respuestas inflamatorias y de células inmunitarias, como macrófagos y linfocitos T [55, 56], también fue significativamente sobreexpresada en el intestino posterior y macrófagos de HK por IPNV-IFN^{NP} en el día 3 después de la intubación oral (**Figura 6A y 6B**). En la actualidad, la quimioquina IP-10 (CXCL10) ha mostrado una potencial aplicación en enfermedades humanas como el COVID-19, la tuberculosis y el cáncer, lo que sugiere que es un buen biomarcador de la respuesta inmunitaria en el huésped [51]. En humanos, diferentes estudios han sugerido que la orquestación de la expresión de CXCL10 desempeña un papel importante en el inicio de la respuesta inmune, que se asocia a una respuesta inflamatoria robusta caracterizada por la activación de células NK y células T CD4+ [52]. En un experimento *in vivo* con la tilapia del Nilo desafiada con Poly(I:C) y LPS, se observó un aumento significativo de la expresión de CXCL10 en hígado, bazo y riñón anterior [55]. También se ha observado que la CXCL10 desempeña un papel trascendente en la respuesta a la infección y en la regulación inmunitaria de monocitos/macrófagos mediada por el componente del complemento C1q de la respuesta inmune innata en peces teleósteos [25]. En conjunto, la sobreexpresión de IP-10 en el intestino sugiere que la vacuna de subunidad recombinante que contiene el módulo IFNγ (IPNV-IFN^{NP}) podría estar implicada en la mediación inicial de la respuesta inmunitaria e inducir el reclutamiento y el tráfico de células inmunitarias, como linfocitos T/macrófagos, entre los órganos linfoides secundarios y, presumiblemente, hacia los focos de infección.

En los teleósteos, los linfocitos B y las inmunoglobulinas secretoras desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria local, ayudando a mantener la homeostasis del organismo y a protegerlo contra los efectos de la infección por agentes patógenos [56]. Hemos detectado un ligero aumento de la expresión de células B IgM en el bazo de peces intubados con IPNV-IFN^{NP} e iRFP^{NP}, en contraste con el control y con IPNV-IFN-CCR5^{NP} el día 21 después de la intubación y también hemos observado una sobreexpresión significativa de células B IgT en el intestino posterior y en macrófagos HK expuestos a NPs recombinantes los días 1 y 15 después de la intubación oral, respectivamente (**Figura 6, 7A y 7B**). Los linfocitos B IgM de teleósteos son con diferencia el isotipo predominante en el suero de la trucha, siendo abundantes en sangre y bazo, representando entre el 20 y el 55% de todos los leucocitos, y el isotipo IgT, puede alcanzar el doble de concentración que el IgM en la mucosa intestinal [58, 59]. Se ha descrito que la capacidad de los linfocitos B IgM e IgT para proliferar y secretar anticuerpos en respuesta a la estimulación microbiana es muy similar, pero con una diferencia importante en la prevalencia en el intestino [59, 60]. En un experimento con truchas desafiadas con el virus de VHS, se detectaron células secretoras de IgM e IgT en el bazo y la mucosa, respectivamente, lo que sugiere una expansión clonal de las células Ig B en el hospedador [60]. Estos hallazgos son consistentes con las células Igs B detectadas en el bazo, HK e intestino posterior de truchas juveniles en el experimento, sugiriendo que nuestras NPs podrían tener propiedades inmunoestimulantes con la capacidad de inducir una respuesta inmune sistémica en la trucha, pero teniendo en cuenta que las células IgT B podrían jugar un papel en el mantenimiento de la homeostasis en la mucosa intestinal (**Figura 6A y 7**).

Observamos un aumento significativo de la sobrexpresión del gen antiinflamatorio IL-10 tanto en el riñón anterior como en el bazo de las truchas estimuladas con IPNV-IFN^{NP} en los días 15 y 21 posterior a la intubación, en contraste con IPNV-IFN-CCR5^{NP} y el control no tratado. Además, iRFP^{NP} también mostró una mayor sobreexpresión que el módulo IFNγ, pero ligeramente menor que el módulo IFNγ con ligando (**Figura 7**). IL-10 desempeña un rol importante en la tolerancia inmunológica manteniendo la homeostasis inmune y la inhibición de las respuestas inmunes a través de la inducción de células T y B reguladoras [61]. En humanos se ha reportado que IL-10 es producida por células T CD4 y macrófagos, y es un fuerte estimulador de las inmunoglobulinas secretadas por células B activas [62], lo que presumiblemente podría explicar el incremento en la expresión de genes asociados a células B IgM y CD4 observados el día 21 post intubación en el riñón anterior y en bazo de truchas intubadas con el módulo IFNγ (**Figura 7A y B**). La elevada sobreexpresión de IL-10 en macrófagos tratados con IPNV-IFN^{NP} (**Figura 7A**) también podría explicarse por una activación de macrófagos del fenotipo M2 que tienen una función reguladora antiinflamatoria secretando grandes cantidades de IL-10 y caracterizado por una disminución en la presentación de antígenos a las células T [63], lo cual también puede responder a la menor expresión

de títulos de anticuerpos específicos de IPNV en los macrófagos de peces tratados con IPNV-IFN^{NP} incluso en comparación a los grupos control (**Figura 8**). En paralelo, el aumento de células B IgT en macrófagos HK estimulados con el módulo IFN NPs (IPNV-IFN^{NP}) el día 15 después de la intubación oral también podría explicar la sobreexpresión de IL-10 (**Figura 7A**). Se ha informado de que las células B IgT en teleósteos expresan niveles altos de IL-10. Se ha sugerido que las células B IgT tienen funciones inmunorreguladoras únicas tanto en la mucosa como en los órganos sistémicos durante el desafío con patógenos, basándose en su alta capacidad para producir IL-10 [64]. Estos resultados demostraron que el módulo IFN combinado con un ligando (IPNV-IFN-CCR5^{NP}) no induce la citocina IL-10*,* la principal citocina antiinflamatoria producida por los leucocitos, y posiblemente podría explicar la significativa expresión de anticuerpos específicos del virus IPN en el suero de las truchas estimuladas por IPNV-IFN-CCR5^{NP}, resultados que se muestran y discuten en la siguiente sección (**3.3.**). También se debe tener en cuenta que la mucosa intestinal de los peces es rica en bacterias comensales y otros factores que podrían inducir tolerancia oral, que por sí solos o en conjunto pueden potencialmente prevenir o reducir las respuestas inflamatorias para preservar la homeostasis de la mucosa [58].

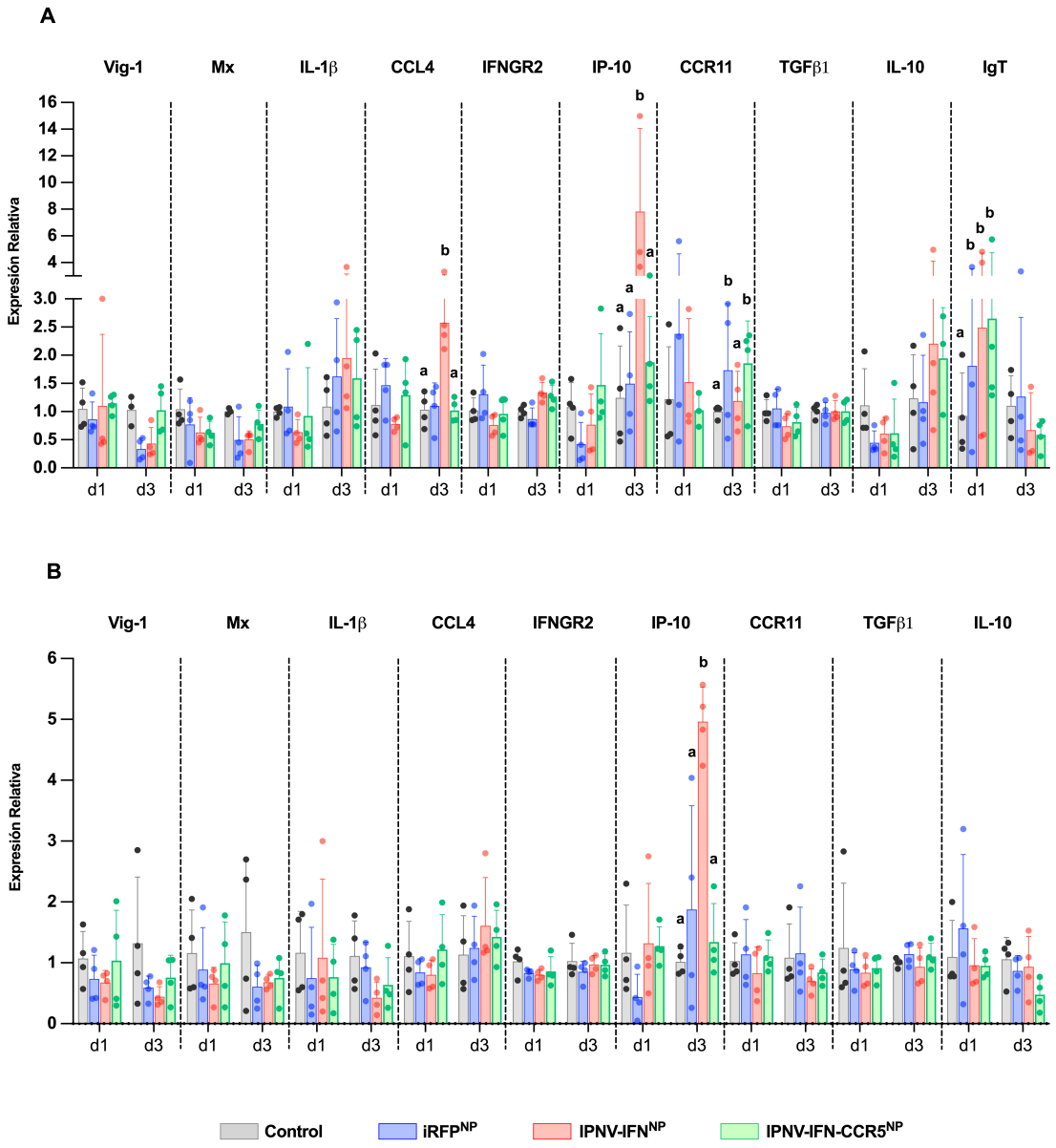


Figura 6. Análisis de expresión génica en intestino posterior (**A**) y riñón anterior (**B**) de truchas juveniles en los días 1 y 3 tras la intubación oral. Truchas arcoíris (~30 g) fueron intubadas oralmente con NPs durante 3 días consecutivos: Control PBS (100 µl) (gris), iRFP^{NP} (azul), IPNV-IFN^{NP} (rojo) e IPNV-IFN-CCR5^{NP} (verde). Los datos son la media ± DE (n=4). Las diferencias entre las medias se analizaron mediante un ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey o la prueba no paramétrica no apareada de Mann-Whitney. Letras distintas indican diferencias significativas y barras sin letras indican ausencia de significación entre tratamientos ($p \leq 0,1$).

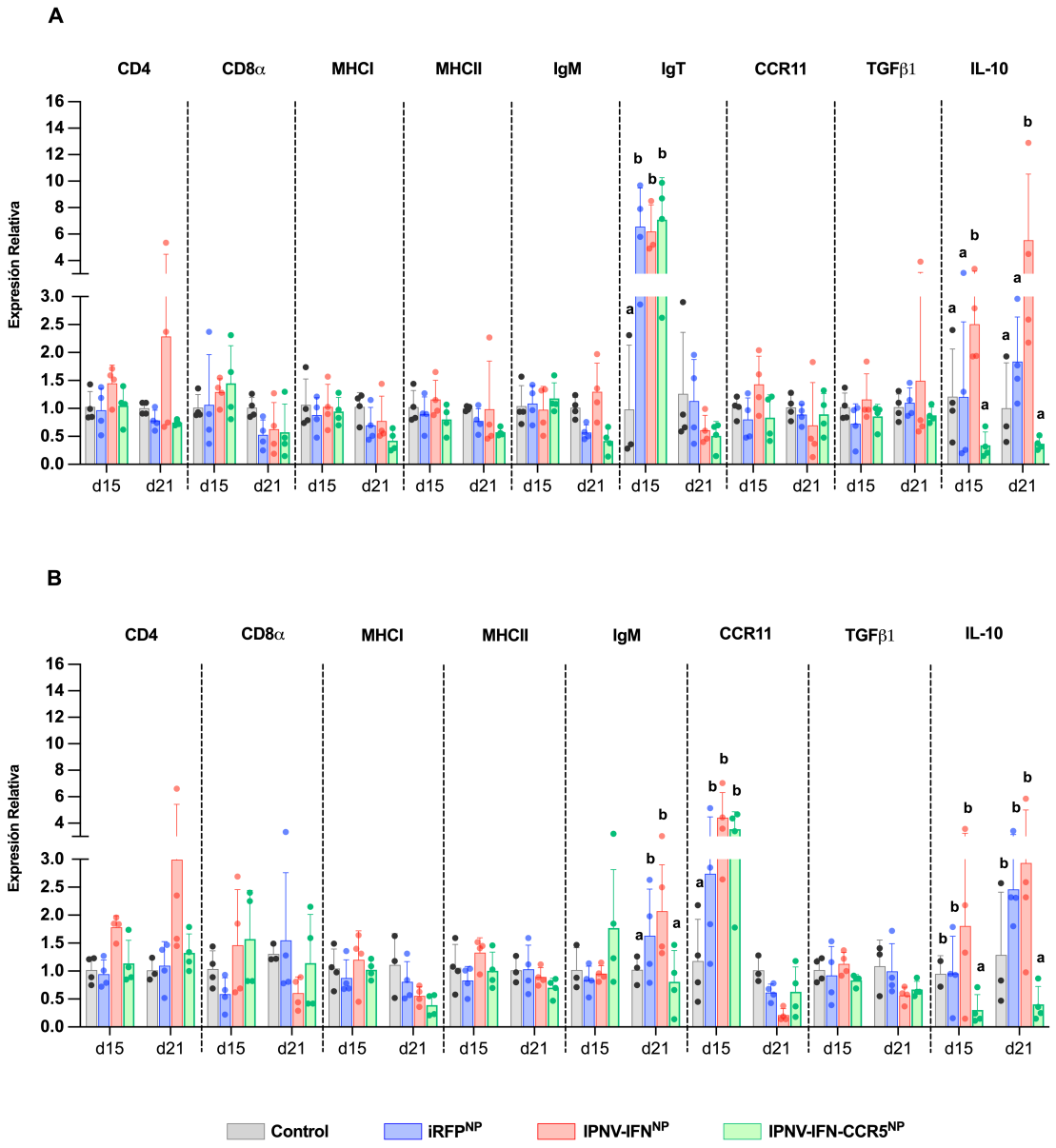


Figura 7. Análisis de expresión génica en riñón anterior (**A**) y bazo (**B**) de truchas juveniles en los días 15 y 21 tras la intubación oral. Truchas arcoíris (~30 g) fueron intubadas oralmente con NPs durante 3 días consecutivos: PBS (100 µl) (gris), iRFP^{NP} (azul), IPNV-IFN^{NP} (rojo) e IPNV-IFN-CCR5^{NP} (verde). Los datos son la media ± DE (n=4). Las diferencias entre las medias se analizaron mediante un ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey o la prueba no paramétrica no apareada de Mann-Whitney. Letras distintas indican diferencias significativas y barras sin letras indican ausencia de significación entre tratamientos ($p \leq 0,1$).

3.3 Respuesta de anticuerpos específicos

Las muestras de suero de los peces intubados con IPNV-IFN-CCR5^{NP} mostraron un aumento significativo de los títulos de anticuerpos específicos contra el virus de IPN (dilución 1:30) en comparación con iRFP^{NP}, IPNV-IFN^{NP} y los grupos control el día 21 después de la intubación. Sin embargo, los grupos de control (T_0, PBS e iRFP^{NP}) mostraron títulos de anticuerpos similares a los de IPNV-IFN^{NP}, lo que sugiere que los peces estuvieron expuestos previamente al virus IPN (**Figura 8**). Aunque las truchas presentaban un historial libre de IPNV desde la piscicultura de origen y no hubo signos de brote o enfermedad posterior al transporte ni durante el ensayo y, por tanto, fallamos en no realizar un análisis qPCR confirmatorio, no podemos descartar que los peces fueran portadores asintomáticos del virus y que la sintomatología (interna y externa) que genera el virus en los peces estuviera a niveles indetectables previamente y durante el ensayo. Debemos considerar que el virus de IPN se puede transmitir de un hospedador a otro mediante infección horizontal (entre peces o a través de las heces o tejidos) y de forma vertical (entre generaciones) [65] y que se ha reportado que los hospedadores de IPNV pueden convertirse en portadores asintomáticos y el virus mantenerse a niveles indetectables a menos que se produzcan episodios de estrés [1]. También se ha descrito la reducción de la replicación viral como consecuencia de la reducción de la transcripción de las células infectadas [66]. Además, la persistencia de la enfermedad se ha explicado porque el virus y el hospedador alcanzan un equilibrio en el que el virus reduce la replicación para evitar dañar al hospedador y, así, no desencadenar las defensas del hospedador. El virus IPN también tiene la capacidad de entrar en los leucocitos sanguíneos, escapando a las defensas inmunitarias del huésped y mostrando un perfil replicativo bajo [1]. Por lo tanto, basándonos en el alto nivel de títulos de anticuerpos específicos del IPNV detectados en todos los grupos de peces (incluidos los controles), sospechamos que las truchas juveniles fueron portadores asintomáticos del virus o que el transporte o la manipulación temprana de los animales previo al ensayo (muestreos de peso, traslados entre estanques etc.) pueden haber inducido un aumento de la replicación del virus, que en consecuencia puede estar interfiriendo en nuestro estudio. Sin embargo, IPNV-IFN-CCR5^{NP} fue capaz de estimular un aumento significativo en la expresión de anticuerpos IgM específicos de IPNV en contraste con los otros tratamientos, incluyendo IPNV-IFN^{NP}. Nuestra hipótesis es que el ligando CCR5 puede estar uniéndose al receptor CCR11 de los leucocitos intestinales, lo que podría estar promoviendo la migración de las células inmunitarias con el antígeno y, en consecuencia, induciendo una respuesta específica de anticuerpos. Estos resultados sugieren que la administración oral de la subunidad de vacuna IPNV-IFN-CCR5^{NP} que incluye un ligando humano puede estimular la respuesta inmune sistémica en truchas juveniles.

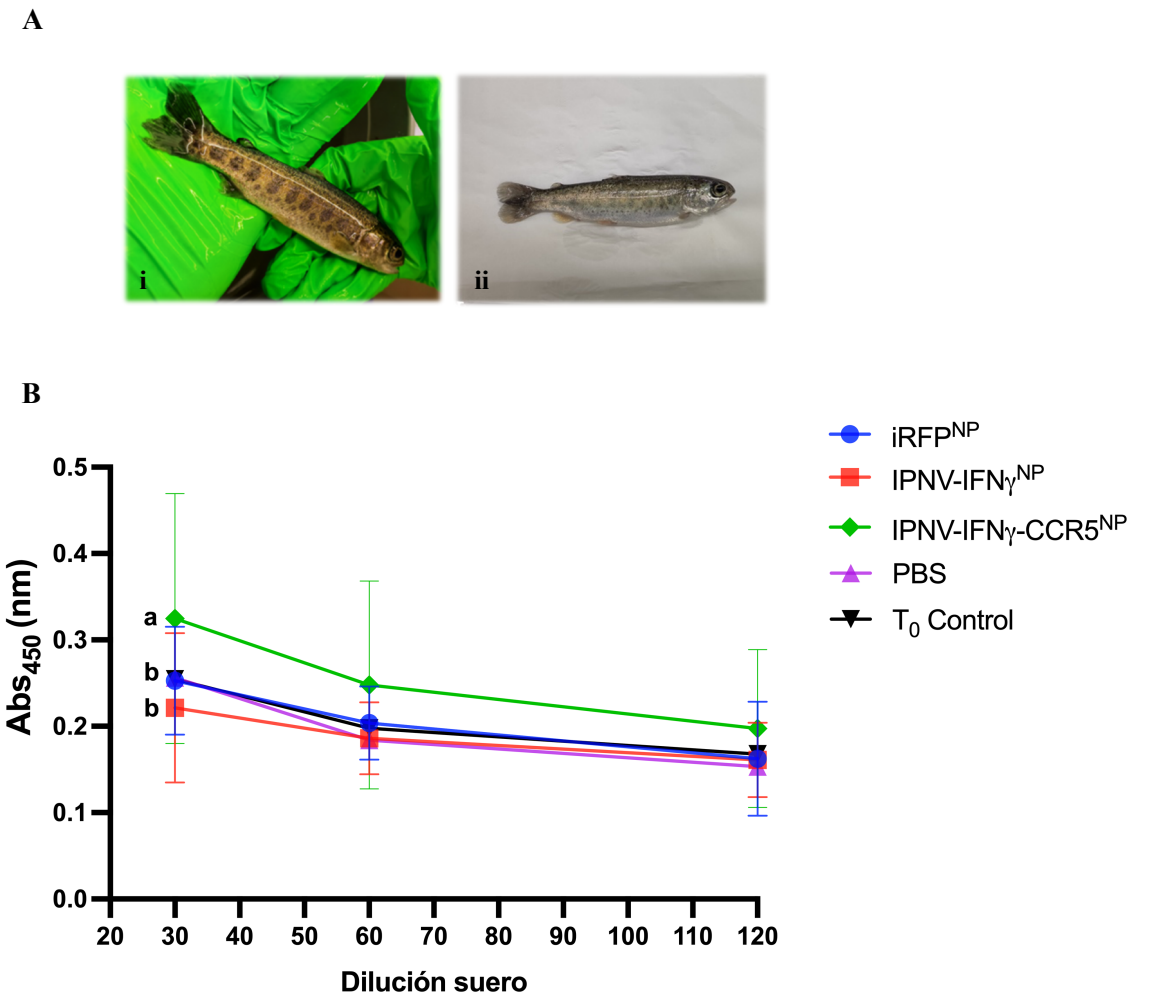


Figura 8. El módulo ligando (IPNV-IFN-CCR5^{NP}) induce la expresión de anticuerpos específicos del virus IPN en suero de truchas juveniles. (**A,i**) Imagen representativa de trucha juvenil durante intubación oral. (**A,ii**) Imagen representativa de trucha el día 21 posterior a la intubación oral. (**B**) Curvas de titulación de anticuerpos específicos de IPNV. Se evaluó el suero de truchas juveniles intubadas con IPNV-IFN^{NP} (rojo), IPNV-IFN-CCR5^{NP} (verde) e iRFP^{NP} (azul) (dosis de 25 mg/kg) 21 días después de la intubación mediante ELISA indirecto. Los peces control (púrpura) fueron intubados con PBS (100 µl) y también se recogió suero de peces no tratados (negro) (T_0 Control). Dilución del suero: 1:30, 1:60 y 1:120. Las diferencias estadísticas entre tratamientos se analizaron mediante la prueba t unilateral por pares con corrección de Welch para varianzas desiguales o la prueba no paramétrica de Mann-Whitney por pares. Letras distintas indican diferencias significativas. Niveles de significancia: ≤ p 0,05.

4. CONCLUSIONES

En el presente estudio, mostramos un nuevo enfoque diseñando y produciendo una vacuna recombinante de subunidad oral dirigida contra el virus IPN. La vacuna es segura, fácil de producir, escalable y altamente funcional sin necesidad de encapsulación, y resistente a temperaturas extremas

y pH bajo, y pueden ser administrada por vía oral. La vacuna ha sido diseñada con módulos de secuencia versátiles, incluyendo un componente inmunomodulador IFNγ y ligando de quimioquinas, que pueden potenciar la respuesta inmune local y sistémica en truchas juveniles, estimulando la migración de células inmunes desde el intestino a los sitios de infección u órganos linfoides, proporcionando de esta forma protección contra el virus IPN.

Sería atractivo intentar modelar una secuencia de ligando CCR5 de trucha arcoíris que tenga la capacidad de unirse a receptores de trucha (CCR11 u otros) para evaluar si el módulo ligando de trucha modelado induce similar o mejor respuesta antiviral que el módulo CCR5 humano. Esto, mediante experimentos de administración oral de las vacunas con pienso que nos permitan establecer el nivel de protección del módulo IFNγ-ligando en infecciones contra el virus de IPN en salmónidos juveniles sanos.

5. REFERENCIAS

[1] C. P. Dopazo, "The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and its virulence determinants: What is known and what should be known," *Pathogens*, vol. 9, no. 2. MDPI AG, Feb. 01, 2020. doi: 10.3390/pathogens9020094.

[2] B. Lakshmi, S. Syed, and V. Buddolla, "Current advances in the protection of viral diseases in aquaculture with special reference to vaccination," in *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, Elsevier, 2018, pp. 127–146. doi: 10.1016/B978-0-12-816328-3.00010-6.

[3] I. Ørpetveit, T. Küntziger, H. Sindre, E. Rimstad, and B. H. Dannevig, "Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) from salmonid fish enters, but does not replicate in, mammalian cells," *Virol J*, vol. 9, no. 1, p. 228, Dec. 2012, doi: 10.1186/1743-422X-9-228.

[4] T. E. Roberts and P. Dobos, "Studies on the Mechanism of Temperature Sensitivity of Infectious Pancreatic Necrosis Virus Replication," 1983.

[5] Ø. S. Nina. Evensen, "Infectious pancreatic necrosis virus," *Encyclopedia of virology*, 2008.

[6] F. Coulibaly, C. Chevalier, B. Delmas, and F. A. Rey, "Crystal Structure of an Aquabirnavirus Particle: Insights into Antigenic Diversity and Virulence Determinism," *J Virol*, vol. 84, no. 4, pp. 1792–1799, Feb. 2010, doi: 10.1128/jvi.01536-09.

[7] M. Godoy *et al.*, "Isolation of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant from Genetically Resistant Farmed Atlantic Salmon (Salmo salar) during 2021–2022," *Pathogens*, vol. 11, no. 11, Nov. 2022, doi: 10.3390/pathogens11111368.

[8] A. Adams, "Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 90, pp. 210–214, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.066.

[9] Ø. Evensen, "Development of Fish Vaccines: Focusing on Methods," in *Fish Vaccines*, Basel: Springer Basel, 2016, pp. 53–74. doi: 10.1007/978-3-0348-0980-1_3.

[10] A. Miccoli, M. Manni, S. Picchietti, and G. Scapigliati, "State-of-the-art vaccine research for aquaculture use: The case of three economically relevant fish species," *Vaccines*, vol. 9, no. 2. MDPI AG, pp. 1–29, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/vaccines9020140.

[11] J. Ma, T. J. Bruce, E. M. Jones, and K. D. Cain, "A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches," *Microorganisms*, vol. 7, no. 11. MDPI AG, Nov. 01, 2019. doi: 10.3390/microorganisms7110569.

[12] M. K. Bedekar and S. Kole, "Fundamentals of Fish Vaccination," 2022, pp. 147–173. doi: 10.1007/978-1-0716-1888-2_9.

[13] A. K. Dhar, S. K. Manna, and F. C. Thomas Allnutt, "Viral vaccines for farmed finfish," *Indian Journal of Virology*, vol. 25, no. 1. pp. 1–17, Jan. 2014. doi: 10.1007/s13337-013-0186-4.

[14] Ø. Evensen and J. A. C. Leong, "DNA vaccines against viral diseases of farmed fish," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 35, no. 6, pp. 1751–1758, 2013, doi: 10.1016/j.fsi.2013.10.021.

[15] M. Hansson, P. Nygren, and S. Sta˚hl, "Design and production of recombinant subunit vaccines," *Biotechnol Appl Biochem*, vol. 32, no. 2, pp. 95–107, Oct. 2000, doi: 10.1042/ba20000034.

[16] Y. Du, X. Hu, L. Miao, and J. Chen, "Current status and development prospects of aquatic vaccines," *Frontiers in Immunology*, vol. 13. Frontiers Media S.A., Nov. 10, 2022. doi: 10.3389/fimmu.2022.1040336.

[17] M. Srinivasarao and P. S. Low, "Ligand-Targeted Drug Delivery," *Chemical Reviews*, vol. 117, no. 19. American Chemical Society, pp. 12133–12164, Oct. 11, 2017. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00013.

[18] J. Bøgwald and R. A. Dalmo, "Protection of teleost fish against infectious diseases through oral administration of vaccines: Update 2021," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 20. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms222010932.

[19] S. Mutoloki, H. M. Munang'andu, and Ø. Evensen, "Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake, and immune induction," *Front Immunol*, vol. 6, no. OCT, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00519.

[20] X. Zhang and W. Wu, "Ligand-mediated active targeting for enhanced oral absorption," *Drug Discovery Today*, vol. 19, no. 7. Elsevier Ltd, pp. 898–904, 2014. doi: 10.1016/j.drudis.2014.03.001.

[21] B. Devriendt, B. G. De Geest, B. M. Goddeeris, and E. Cox, “Crossing the barrier: Targeting epithelial receptors for enhanced oral vaccine delivery,” *Journal of Controlled Release*, vol. 160, no. 3. pp. 431–439, Jun. 28, 2012. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.02.006.
[22] I. Tobar *et al.*, “Successive oral immunizations against Piscirickettsia salmonis and infectious salmon anemia virus are required to maintain a long-term protection in farmed salmonids,” *Front Immunol*, vol. 6, no. MAY, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00244.
[23] C. W. E. Embregts and M. Forlenza, “Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species,” *Dev Comp Immunol*, vol. 64, pp. 118–137, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.dci.2016.03.024.
[24] H. Gaertner *et al.*, “Highly potent, fully recombinant anti-HIV chemokines: Reengineering a low-cost microbicide,” 2008. [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/content/full/
[25] H. Xu and F. Liu, “Advances in chemokines of teleost fish species,” *Aquaculture and Fisheries*. KeAi Communications Co., Mar. 01, 2023. doi: 10.1016/j.aaf.2023.01.008.
[26] U. Grimholt, H. Hauge, A. G. Hauge, J. Leong, and B. F. Koop, “Chemokine receptors in Atlantic salmon,” *Dev Comp Immunol*, vol. 49, no. 1, pp. 79–95, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.dci.2014.11.009.
[27] Z. Qi, J. W. Holland, Y. Jiang, C. J. Secombes, P. Nie, and T. Wang, “Molecular characterization and expression analysis of four fish-specific CC chemokine receptors CCR4La, CCR4Lc1, CCR4Lc2 and CCR11 in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss),” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 68, pp. 411–427, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.fsi.2017.07.031.
[28] C. E. Samuel, “Antiviral actions of interferons,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 14, no. 4. pp. 778–809, 2001. doi: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001.
[29] Z. Gan, S. N. Chen, B. Huang, J. Zou, and P. Nie, “Fish type I and type II interferons: composition, receptor usage, production and function,” *Reviews in Aquaculture*, vol. 12, no. 2. Wiley-Blackwell, pp. 773–804, May 01, 2020. doi: 10.1111/raq.12349.
[30] P. Pereiro, A. Figueras, and B. Novoa, “Insights into teleost interferon-gamma biology: An update,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 90, pp. 150–164, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.002.
[31] G. Ding *et al.*, “Transcriptome Sequencing Reveals the Antiviral Innate Immunity by IFN-γ in Chinese Sturgeon Macrophages,” *Front Immunol*, vol. 13, Mar. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.854689.
[32] J. Zou and C. J. Secombes, “Teleost fish interferons and their role in immunity,” *Dev Comp Immunol*, vol. 35, no. 12, pp. 1376–1387, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.dci.2011.07.001.
[33] J. E. Darnell Jr, lan M. Kerr, and G. R. Stark, “Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins Stark is in the Cleveland Clinic Foundation,” 1994. [Online]. Available: https://www.science.org
[34] J. Zou *et al.*, “Identification and Bioactivities of IFN-γ in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss): The First Th1-Type Cytokine Characterized Functionally in Fish,” *The Journal of Immunology*, vol. 175, no. 4, pp. 2484–2494, Aug. 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2484.
[35] B. Robertsen, “The interferon system of teleost fish,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 20, no. 2, pp. 172–191, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.fsi.2005.01.010.
[36] B. Sun, I. Skjæveland, T. Svingerud, J. Zou, J. Jørgensen, and B. Robertsen, “Antiviral Activity of Salmonid Gamma Interferon against Infectious Pancreatic Necrosis Virus and Salmonid Alphavirus and Its Dependency on Type I Interferon,” *J Virol*, vol. 85, no. 17, pp. 9188–9198, Sep. 2011, doi: 10.1128/jvi.00319-11.
[37] R. Thwaite *et al.*, “Protein Nanoparticles Made of Recombinant Viral Antigens: A Promising Biomaterial for Oral Delivery of Fish Prophylactics,” *Front Immunol*, vol. 9, Jul. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01652.
[38] R. Thwaite *et al.*, “Nanostructured recombinant protein particles raise specific antibodies against the nodavirus NNV coat protein in sole,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 99, pp. 578–586, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.02.029.
[39] P. Argos, “An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion,” *J Mol Biol*, vol. 211, no. 4, pp. 943–958, Feb. 1990, doi: 10.1016/0022-2836(90)90085-Z.
[40] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.

[41] C. Sánchez and J. Domínguez, “Trout immunoglobulin populations differing in light chains revealed by monoclonal antibodies,” *Mol Immunol*, vol. 28, no. 11, pp. 1271–1277, Nov. 1991, doi: 10.1016/0161-5890(91)90014-B.
[42] C. Sánchez, P. López-Fierro, A. Zapata, and J. Dominguez, “Characterisation of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulin,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 3, no. 4, pp. 237–251, Jul. 1993, doi: 10.1006/fsim.1993.1024.
[43] Puente-Marin *et al.*, “Potential Role of Rainbow Trout Erythrocytes as Mediators in the Immune Response Induced by a DNA Vaccine in Fish,” *Vaccines (Basel)*, vol. 7, no. 3, p. 60, Jul. 2019, doi: 10.3390/vaccines7030060.
[44] Y. Li *et al.*, “A computational study of the influence of nanoparticle shape on clathrin-mediated endocytosis,” *J Mater Chem B*, vol. 11, no. 27, pp. 6319–6334, 2023, doi: 10.1039/D3TB00322A.
[45] S. Varma, S. Dey, and D. Palanisamy, “Cellular Uptake Pathways of Nanoparticles: Process of Endocytosis and Factors Affecting their Fate,” *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 23, no. 5, pp. 679–706, Apr. 2022, doi: 10.2174/1389201022666210714145356.
[46] M. Oppermann, “Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation,” *Cell Signal*, vol. 16, no. 11, pp. 1201–1210, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.cellsig.2004.04.007.
[47] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati, “The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization,” *Trends Immunol*, vol. 25, no. 12, pp. 677–686, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.
[48] Z. R. Shaheen, B. S. Christmann, J. D. Stafford, J. M. Moran, R. M. L. Buller, and J. A. Corbett, “CCR5 is a required signaling receptor for macrophage expression of inflammatory genes in response to viral double-stranded RNA,” *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 316, no. 5, pp. R525–R534, May 2019, doi: 10.1152/ajpregu.00019.2019.
[49] N. F. Neel, E. Schutyser, J. Sai, G.-H. Fan, and A. Richmond, “Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking,” *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 16, no. 6, pp. 637–658, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.008.
[50] M. K. Bedekar *et al.*, “Evaluation of interferon gamma (IFN-γ) of Labeo rohita as an immunomodulator: in vitro expression model,” *Aquaculture International*, vol. 26, no. 6, pp. 1401–1413, Dec. 2018, doi: 10.1007/s10499-018-0292-9.
[51] S. Madhurantakam, Z. J. Lee, A. Naqvi, J. B. Karnam, S. Muthukumar, and S. Prasad, “Multiplex sensing of IL-10 and CRP towards predicting critical illness in COVID-19 infections,” *Biosens Bioelectron X*, vol. 13, May 2023, doi: 10.1016/j.biosx.2023.100307.
[52] T. E. Lane, *Chemokines and Viral Infection. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
[53] S. MacKenzie, C. Liarte, D. Iliev, J. V. Planas, L. Tort, and F. W. Goetz, “Characterization of a highly inducible novel CC chemokine from differentiated rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) macrophages,” *Immunogenetics*, vol. 56, no. 8, pp. 611–615, Nov. 2004, doi: 10.1007/s00251-004-0698-6.
[54] J. H. Dufour, M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane, and A. D. Luster, “IFN-Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking 1,” 2002. [Online]. Available: http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/168/7/3195/1149047/3195.pdf
[55] M. Chen *et al.*, “Expression and functional characterization of chemokine CXCL10 from Nile tilapia (Oreochromis niloticus) in response to bacterial infection and C1q-mediated regulation of monocytes/macrophages activity,” *Aquac Rep*, vol. 21, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.aqrep.2021.100778.
[56] M. Stosik, B. Tokarz-Deptuła, and W. Deptuła, “Immunity of the intestinal mucosa in teleost fish,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 133, p. 108572, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.fsi.2023.108572.
[57] J. Li *et al.*, “B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities,” *Nat Immunol*, vol. 7, no. 10, pp. 1116–1124, Oct. 2006, doi: 10.1038/ni1389.
[58] Y.-A. Zhang *et al.*, “IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity,” *Nat Immunol*, vol. 11, no. 9, pp. 827–835, Sep. 2010, doi: 10.1038/ni.1913.

[59] I. Salinas, Á. Fernández-Montero, Y. Ding, and J. O. Sunyer, "Mucosal immunoglobulins of teleost fish: A decade of advances," *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 121. Elsevier Ltd, Aug. 01, 2021. doi: 10.1016/j.dci.2021.104079.

[60] R. Castro *et al.*, "Teleost Fish Mount Complex Clonal IgM and IgT Responses in Spleen upon Systemic Viral Infection," *PLoS Pathog*, vol. 9, no. 1, p. e1003098, Jan. 2013, doi: 10.1371/journal.ppat.1003098.

[61] K. Wolk, S. Kunz, K. Asadullah, and R. Sabat, "Cutting Edge: Immune Cells as Sources and Targets of the IL-10 Family Members?," *The Journal of Immunology*, vol. 168, no. 11, pp. 5397–5402, Jun. 2002, doi: 10.4049/jimmunol.168.11.5397.

[62] B. Abos, T. Wang, C. J. Secombes, and C. Tafalla, "Distinct modes of action of CD40L and adaptive cytokines IL-2, IL-4/13, IL-10 and IL-21 on rainbow trout IgM+ B cells," *Dev Comp Immunol*, vol. 111, p. 103752, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.dci.2020.103752.

[63] P. Ruytinx, P. Proost, J. Van Damme, and S. Struyf, "Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions," *Front Immunol*, vol. 9, Sep. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01930.

[64] O. Sunyer, "Evolution of Mucosal B Cell Immunity: Novel Roles of IgT+ B Cells in the Control of Host-pathogen Interactions." Accessed: Mar. 03, 2024. [Online]. Available: https://www.nsf.gov/awardsearch/showAward?AWD_ID=1457282

[65] R. S.-M. Chong, "Infectious pancreatic necrosis," in *Aquaculture Pathophysiology*, Elsevier, 2022, pp. 165–175. doi: 10.1016/B978-0-12-812211-2.00011-1.

[66] I. S. Marjara, B. J. Thu, and Ø. Evensen, "Differentially expressed genes following persistent infection with infectious pancreatic necrosis virus in vitro and in vivo," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 28, no. 5–6, pp. 845–853, May 2010, doi: 10.1016/j.fsi.2010.02.001.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN GENERAL

Plataforma modular de vacunas de subunidad

Nuevo enfoque para administración oral

Atendiendo a la necesidad de encontrar métodos profilácticos más seguros, eficaces y rentables para combatir las enfermedades virales que afectan a peces de cultivo, hemos desarrollado un nuevo enfoque de plataforma de vacuna de subunidad modular recombinante para ser administradas por vía oral y con propiedades inmunoestimulantes. Las enfermedades infecciosas, entre ellas las virales, causan perdidas que pueden alcanzar hasta los 10 billones de dólares anuales en la acuicultura global lo que se traduce en un 10% de pérdidas en la producción total [1]. Por lo tanto, el diseño de nuevas vacunas y más eficientes que establezcan estrategias de protección con métodos de administración no invasivos y económicamente viables es fundamental para asegura el bienestar de los animales y la sostenibilidad de la acuicultura.

El número de vacunas antivirales licenciadas a nivel global es limitado y prácticamente todas dirigidas a salmones (90%). Una revisión exhaustiva indica que existen alrededor de 39 (de 43 en total) vacunas disponibles para los mercados del salmón en Noruega, Canadá, Irlanda, UK, islas Feroe, USA y Chile. Las vacunas en su mayoría son del tipo inyectables (i.p.) con adyuvantes oleosos (con y sin mineral) que deben mantenerse en condiciones de refrigeración (entre 2 y 8°C) y someterse a incrementos de temperatura paulatino de temperatura previo a la inyección (de 15 a 20°C) y para especies salmónidas juveniles de entre 10 y 30 g, preferentemente a partir de 30 g. Además, varias de estas vacunas son polivalentes pudiendo contener entre cinco y siete antígenos diferentes y con antígenos inactivados. Sin embargo, estas vacunas por estar inactivadas presentan una respuesta inmune débil y con un corto periodo de inmunidad, requiriendo múltiples inyecciones para lograr una inmunidad fuerte y duradera [2, 3, 4]. También, se han diseñado otros tipos de vacunas comerciales para salmónidos juveniles, como son las vacunas con tecnología de ADN plasmídico administradas por inyección intramuscular para combatir el virus SAV-VP3 (Clynav™) en Europa y el virus IHN (Apex-IHN) en Canadá. Otras tres vacunas fueron diseñadas como vacunas subunitaria para salmónidos; una vacuna polivalente inyectable que contiene la vacuna subunitaria contra el virus ISA junto a vacunas inactivadas de IPN, SRS (*Piscirickettsia salmonis*) y VO (*Vibrio ordalii*) (Blueguard® SRS+ IPN+VO+ISA), 2) y dos vacunas de subunidad; una inyectable polivalente contra IPNV y SRS (Aquavac® SARISTIN 2) y una subunitaria oral encapsulada contra IPNV (Aquavac® IPN Oral). Solo cuatro vacunas dirigidas a especies distintas a los salmónidos están comercialmente disponibles; dos dirigidas a Lubina (*Dicentrarchus labrax*) disponibles en Europa, la vacuna inyectable inactivada contra el genotipo RGVNN (o VER) (ALPHA JECT micro 1 Noda),

y la vacuna inactivada frente a VNNV en emulsión inyectable (ICTHIOVAC® VNN) , una vacuna administrada por inmersión (KV3) del virus atenuado contra el virus del herpes Koi (KHVD) que afecta a la carpa común y disponible en Indonesia e Israel (Phibro Animal Health) y una última vacuna inyectable (Aquavac® IridoV) contra *Iridovirus* para la inmunización de especies de peces susceptibles de no menos de 5 g, como la tilapia y la lubina asiática A la fecha, no hemos encontrado vacunas licenciadas contra el virus de SVC. Sin embargo, algunas revisiones han mencionado que hubo dos vacunas inyectables por vía intraperitoneal para combatir el SVCV en la carpa común (*Cyprinus carpio*) [2, 4, 5]. Nuevas aproximaciones de vacunas experimentales orales contra el virus IPN y SVC se están desarrollando, las cuales discutiremos más adelante.

Las vacunas inyectables causan estrés en los peces y en general pueden provocar lesiones externas e internas en el sitio de inyección especialmente las vacunas adyuvadas con emulsiones de aceite [1]. Las lesiones intraabdominales pueden ser fácilmente reconocidas como melanización y adherencias entre los órganos internos o entre los órganos y la pared peritoneal [1, 6]. Además, en exámenes histológicos se ha observado la presencia de macrófagos, y la formación de células multinucleadas con un número variable de linfocitos y células granulares eosinofílicas [6, 7 ,8]. Un ejemplo de los efectos secundarios de la vacunación, es lo reportado por la Agencia Europea de Medicina (EMA), la cual menciona los efectos secundarios más comunes que puede producir la vacuna de ADN plasmídico recombinante Clynav, que pueden afectar a más de 1 de cada 10 animales; cambios en el comportamiento de natación (máximo dos días), alteración de la pigmentación (máximo siete días), falta de apetito (máximo nueve día) y las lesiones de la aguja en el lugar de la inyección que son comunes pudiendo durar al menos 90 días (www.ema.europa.eu). Además, se ha indicado que la respuesta inmune de los peces muestra asimetría en la respuesta inducida a través de la mucosa (intestino) en comparación a las vías parenterales de administración. Cuando los antígenos se administran a través del intestino, se provocan respuestas inmunes locales y sistémicas simbolizadas por altas cantidades de IgM circulante, y cuando los antígenos se administran por inyección, las respuestas sistémicas son más fuertes, pero con respuestas locales (intestino) casi ausentes [10]. Las vacunas inactivadas han sido menos eficientes contra infecciones virales y enfermedades bacterianas intracelulares, y una prueba de esto, es la poca efectividad de las vacunas disponibles contra las infecciones provocadas por el virus de SAV e IPN en salmónidos [1]. Por lo tanto, estrategias profilácticas integrales que no impacten los costos de producción, el bienestar de los peces y mejoren la eficacia de las vacunas necesitan urgentemente ser desarrolladas.

En esta dirección, el grupo de Inmunología Evolutiva (IE-IBB), desde hace una década ha estado desarrollando un nuevo concepto de vacunas para administración oral nanoestructurando antígenos virales recombinantes como cuerpos de inclusión (IBs) o Nanopellets (NPs). Los IBs son agregados de proteínas nanoestructurados estables y con la capacidad de penetrar a las células liberando proteína

funcional mientras mantiene su actividad biológica con una alta estabilidad mecánica, además de ser seguras, baratas y fáciles de producir en sistemas de producción bacteriano como *E. coli* [10, 11]. *E. coli* es el sistema de expresión más ampliamente utilizado para producir IBs. En el estudio, hemos utilizado la cepa BL21 (DE3) debido a que presenta una alta eficiencia de expresión de proteína recombinante basado en el promotor T7, y es un sistema escalable y que genera un alto rendimiento de proteína purificada por ejemplo en el uso de un biorreactor, además de económico y de fácil purificación mediante la aplicación de un versátil proceso de disrupción celular mecánica y enzimática [13] que permite mantener la conformación agregada de las proteínas y producir una alta cantidad de NPs. El desarrollo de nuevas vacunas para humanos, como es el caso de la producción y purificación de proteínas recombinantes del COVID producidas en *E. coli* BL21 (DE3) demandan mucho interés debido a que es un sistema de expresión eficiente, seguro y barato [13, 14]. Del mismo modo *E. coli* es un sistema de expresión utilizado en la acuicultura para el desarrollo de vacunas, como es el caso de la vacuna inyectable de subunidad registrada contra IPNV (Aquavac® SARISTIN 2) para la inmunización del salmón del atlántico, salmón coho y trucha arcoíris en Chile que fue expresada en *E. coli* BL21 (DE3).

Los estudios de Thwaite y colaboradores [15, 16] demostraron en ensayos *in vitro* e *in vivo* el potencial inmunológico de los antígenos virales recombinantes (IPNV-VP2^{NP}, VHSV G-frg16^{NP} y VNNV-C^{NP}) configurados como IBs. Brevemente, se demostró que los NPs son estables, fáciles de producir y funcionalmente activos, siendo fácilmente endocitados por células ZFL e intestinales del pez cebra cuando son administrados por intubación oral. Además, pueden inducir una respuesta inmune antiviral en células ZFL y en macrófagos de trucha (RT-HKM). Análisis preliminares por Espectroscopia Infrarroja Transformada De Fourier (FTIR) con el sincrotrón ALBA realizados con células ZFL y macrófagos de trucha estimulados con NPs (datos no publicados), demostraron que los NPs son capaces de inducir una respuesta global celular similar en tipo y magnitud a la estimulada con virus inactivados de VHSV o Poly(I:C), lo que sustenta el potencial modulador antiviral de los NPs recombinantes. Adicionalmente, ensayos *in vivo* demostraron que los NPs de VNNV^{NP} administrados a lenguado juveniles (*S. senegalensis*) de 15 g por inyección intraperitoneal (i.p.) inducen una significativa expresión de anticuerpos específicos del virus VNN en comparación a los peces intubados por vía oral el día 30 post inmunización. NPs de VHSV-G-frg16 administrados por inyección i.p. también indujeron una expresión significativa de anticuerpos específicos IgM y anticuerpos neutralizantes contra el virus VHS en truchas juveniles pequeñas 30 días post inmunización. En primer lugar, estos resultados demuestran la efectividad de administrar los NPs mediante inyección y, por otro lado, demuestra que ambos antígenos recombinantes nanoestructurados (VHSV^{NP} y VNNV^{NP}) tienen la habilidad de poder inducir una significativa respuesta antiviral adaptativa en truchas y lenguados juveniles contra los virus de VHS y VNN.

En este estudio, buscando perfeccionar la funcionalidad inmunomoduladora de las vacunas recombinantes antigénicas nanoestructuradas como IBs, estamos proponiendo un nuevo enfoque biotecnológico de plataforma modular uniendo los dominios de proteínas recombinantes antigénicas antivirales a módulos recombinantes de IFN o ligando con el objetivo de proporcionar características inmunomoduladoras adicionales a las vacunas de subunidad. En la Figura 1 de derecha a izquierda se observa el diseño de los tres módulos recombinantes diseñados: (1) antígeno viral recombinante con una etiqueta C terminal de polihistidinas (6xHis-tag); (2) antígeno viral recombinante unido a un módulo IFNγ que permite estimular la respuesta antiviral, y (3) antígeno viral recombinante unido a un módulo efector IFNγ y a un módulo ligando para dirigir los NPs a células/tejidos específicos. Todos los constructos finalizan con un dominio N terminal. Los módulos fueron unidos por un péptido (GGSSRSS) conector (*Linker*) que permitió separar los módulos y otorgar flexibilidad y movilidad entre los diferentes dominios [18].

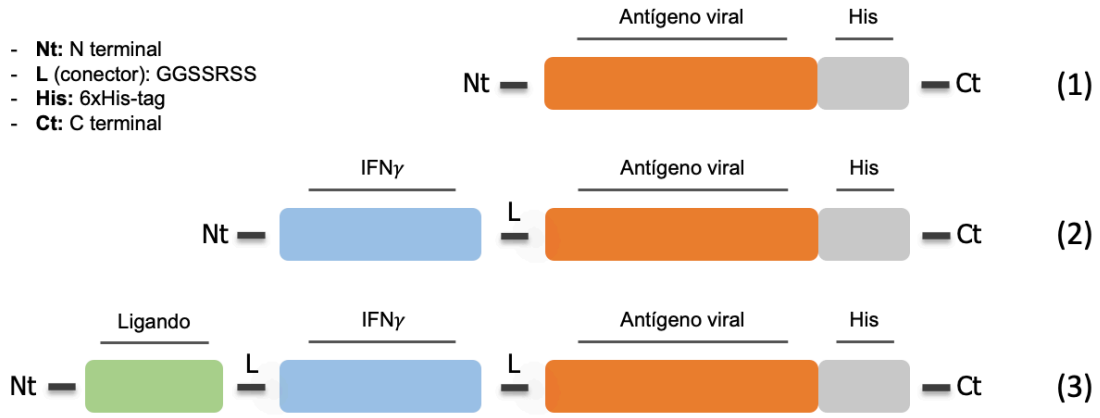


Figura 1. Diseño de plataformas modulares de vacunas de subunidad oral.

En la presente investigación, hemos diseñado, producido y purificado en *E. coli* (BL21) cuatro proteínas modulares de vacunas de subunidad antivirales para administración oral. Módulos recombinantes nombrados SVCV^{NP} y SVCV-IFN^{NP} diseñados para proteger a ciprínidos contra el virus de SVC y dos módulos de IPNV, nombrados IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} diseñados para combatir el virus de IPN que afecta a salmónidos.

La viremia primaveral de la carpa (SVCV) es una enfermedad altamente contagiosa que puede generar mortalidades de hasta un 90% en carpas jóvenes, especialmente en la carpa común, una de las especies de mayor producción acuícola a nivel mundial [18, 19] y sorpresivamente aun no existen vacunas comerciales disponibles contra el virus de SVC. Sin embargo, como mencionamos previamente, fue reportada la existencia de dos vacunas licenciadas para combatir el virus de SVC

en ciprínidos; una vacuna inyectable inactivada para su uso en República Checa, y una vacuna de subunidad recombinante inyectable de la glicoproteína G de SVCV expresada en bacoluvirus y registrada para su uso en Bélgica, de las cuales no tenemos información de su efectividad [2, 4, 5, 20]. Por otro lado, fueron diseñados dos módulos recombinantes de IPNV con funcionalidades adicionales (antiviral y ligando dirigido) para potenciar la inmunogenicidad de la vacuna oral. Aunque IPNV es la enfermedad con el mayor número de vacunas comerciales disponibles (**Tabla 1, Introducción general**), aún es una enfermedad con tratamientos poco efectivos que puede causar grandes pérdidas en los centros de cultivos de salmónidos (*O. mykiss – S. salar*), con prevalencia registradas de hasta un 90% de mortalidad, especialmente en la etapa de alevinaje y juveniles post smolt cuando ingresan a mar [21, 22]. No obstante, nuevas y funcionales aproximaciones de vacunas experimentales orales recombinantes o de subunidad se están desarrollando para combatir enfermedades infecciosas virales con el avance de la ingeniería genética como discutiremos más adelante.

Caracterización de las plataformas modulares

En el presente estudio, demostramos que el nuevo enfoque de plataforma modular de vacuna subunitaria para administración oral posee una amplia versatilidad estructural y funcional a nanoescala con la extraordinaria capacidad de otorgar características inmunomoduladoras adicionales a las proteínas recombinantes antigénicas. Podríamos aprovechar la versatilidad estructural de los módulos, nanoestructurando nuevas vacunas polivalente que contengan diversos antígenos en una sola administración que permitiría ahorrar costos y otorgar una protección ampliada contra múltiples enfermedades infecciosas.

Aquí hemos nanoestructurado módulos con tamaños que van de ~11 a 70 kDa, las cuales han sido eficientemente internalizadas por células ZFL, macrófagos y las células epiteliales de las truchas. La alta capacidad que tiene el intestino posterior de los salmónidos de absorber y transportar partículas y macromoléculas ha sido reportada [24]. La combinación de módulo con funcionalidad inmunológicas adicionales como moléculas de adyuvantes o ligandos inexorablemente incrementa el tamaño de las secuencias. Cui et al [25] en una nueva vacunal para administración oral combinaron y expresaron en *Lactobacillus* dos antígenos recombinantes con excelentes propiedades inmunoestimulantes con tamaño de proteína de alrededor de 86 kDa que encontraron fue apropiado. En humanos se han diseñado fármacos orales (Oradel^{TM}) en base a grandes proteínas dirigidos a la pared intestinal con tamaños de hasta 150 kDa [26]. Sin embargo, debemos considerar que la eficiencia de la administración de medicamentos puede estar directamente relacionada con el tamaño de las partículas porque el tamaño de las partículas puede mejorar la biodisponibilidad y permitir una orientación más precisa al nivel de administración intracelular directa [26]. En ese sentido, el diseño

de módulos de vacunas subunitaria que consideren incorporar péptidos inmunoestimulantes de pequeño tamaño como citocinas/quimiocinas o el diseño de vacunas polivalentes que combinen polipéptidos antigénicos es una viable estrategia que permita controlar el tamaño de los módulos y la funcionalidad inmunológica de nuestras vacunas modulares.

Las cuatro vacunas modulares diseñadas ($SVCV^{NP}$, $SVCV\text{-}IFN^{NP}$, $IPNV\text{-}IFN^{NP}$ e $IPNV\text{-}IFN\text{-}CCR5^{NP}$) fueron fáciles de producir y purificar en *E. coli* (BL21) y a bajo costo. Los NPs presentaron formas variables entre módulo recombinantes (oviformes/ovoides/circulares, porosas o sin poros), al igual como han reportado otros investigadores y nuestro grupo post purificación de IBs sobreexpresados en *E. coli* [12, 15, 26]. El rendimiento fue variable entre proteínas y escalable siendo potencialmente ajustable al alza con un fermentador (datos no mostrados). Adicionalmente, los NPs de las proteínas modulares, recombinantes antigénicas o combinados con los módulos recombinantes IFNγ o ligando, fueron altamente estables soportando pHs extremos y altas temperaturas sin presentar cambios morfométricos importantes manteniendo su funcionalidad, ideal para la vacunación por administración oral. La proteína antigénica requiere que sea encapsulada para no ser destruida durante el proceso de elaboración del pienso por extrusión (90-100°C) o degradada en el estómago por los ácidos digestivos al iniciar la alimentación (pH ~ 2,7 a 4,9 en truchas) y por las enzimas digestivas (como la pepsina que digieren proteínas) antes de llegar a la mucosa del intestino distal con función inmunológica, lugar donde endocitan macromoléculas y proteínas [9, 27, 28, 29, 30, 31]. La resistencia de los IBs a pH y temperatura extrema había sido demostrada en el grupo de investigación previamente con NPs de citocinas proinflamatorias de TNFα y CCL4 [27], sin embargo, hasta ahora desconocíamos si los NPs nanoestructurados de antígenos recombinantes antivirales combinados con módulos de IFNγ recombinante y ligando tendrían la misma resistencia a condiciones extremas unidos con péptidos conectores. El diseño de vacunas que consideren como adyuvantes a citocinas nativas como los IFNγ presentan dificultades al intentar mantener la estabilidad y su corta vida media, lo que ha obligado a aumentar la frecuencia de la administración y por tanto incrementar la posibilidad de genera efectos adversos [32, 33, 34], al contrario de nuestros módulos vacunales de proteínas recombinantes que son altamente estables, seguros y funcionales en condiciones ambientales gastrointestinales o al ser almacenados como alícuotas (pellets) a temperatura ambiente o en pienso (datos no mostrados). Adicionalmente, las vacunas administradas por vía oral son fáciles de entregar y más seguras que las vacunas suministradas por inyección intraperitoneal o intramuscular pez a pez, generando estrés, costos adicionales en personal especializado, equipos, tiempo de planificación y posiblemente lesiones irreversibles en los peces [4, 9].

Funcionalidad *in vitro*: Internalización y estimulación de la respuesta inmune antiviral

En el estudio, demostramos que los NPs de SVCV son eficientemente endocitados por cultivos celulares con la capacidad de montar una fuerte respuesta inmune antiviral. El módulo SVCV-IFN^{NP} indujo una fuerte y significativa expresión de genes antivirales en comparación al módulo SVCV sin IFNγ (SVCV^{NP}) en células ZFL, posiblemente atribuido a la inducción de las vías de señalización del receptor IFN, que podría estar conduciendo la sobreexpresión de la proteína Lmp-2. Lmp-2 es inducida por IFNγ y está encargada de la degradación de proteína citosólica que da lugar a la formación de péptidos, proceso esencial para la presentación de antígeno por las moléculas MHCI (http://hdl.handle.net/10803/3006). Previamente en el grupo de investigación habíamos reportado que los antígenos recombinantes antivirales de IPNV^{NP}, VHSV^{NP} y VNNV^{NP} tienen la habilidad de inducir la sobreexpresión de genes antivirales (Vig-1 y Mx) en células ZFL [16].

En el Capítulo 2 demostramos que las nanoestructuras del módulo IPNV-IFN^{NP} son eficientemente internalizadas y acumuladas en el citosol de las células RTgutGC y macrófagos HK, pero solo mostrando una respuesta antiviral consiste en los macrófagos. Previamente nuestro grupo había demostrado que citocinas recombinantes (TNFα^{NP} y CCL4^{NP}) y proteínas antigénicas recombinantes nanoestructuradas (IPNV^{NP}, VHSV^{NP} y VNNV^{NP}) son eficazmente internalizadas por macrófagos de trucha y células ZFL, con la funcionalidad de inducir una respuesta inmune antiviral [15, 26]. Adicionalmente, hemos demostrado que el antígeno recombinante antiviral de VHSV unido a un módulo IFNγ de trucha (VHSV-IFN^{NP}) también son internalizados por macrófagos con la habilidad de inducir la sobreexpresión de genes antivirales (datos no publicados). Por otro lado, en células RTgutGC tratadas con IPNV-IFN^{NP} se observó una leve respuesta antiviral, deducimos que es debido a la poca afinidad de nuestros NPs a la línea celular RTgutGC que procede de células epiteliales compuesta principalmente por enterocitos. Los enterocitos cumplen una importante función inmune en la pared intestinal como barrera contra patógenos e internalizando antígenos [10], sin embargo, estas necesitan de los otros componentes del sistema inmune para montar una fuerte respuesta inmune [24]. Por otro lado, se han reportado diferencias en la expresión de genes antivirales en leucocitos intestinales (GALT) y líneas celulares (RTS11, RTgutGC) tratados con Poly(I:C) [35] lo que también pueden reforzar nuestra hipótesis por lo menos en lo que respecta a la interacción con nuestras nanopartículas. Así mismo, la menor expresión del gen receptor IFN (IFNGR2) en las RTgutGC tratadas con el módulo IFN en comparación a la expresión del gen receptor de IFN observada en macrófagos también podría estar reflejando la menor afinidad. Sin embargo, los NPs de IPNV-IFNγ son eficientemente internalizados por las células intestinales RTgutGC, lo que puede

ser explicado por la gran capacidad que tienen las células epiteliales del intestino distal de internalizar macromoléculas y por la activación de las vías de señalización mediante el receptor de IFN (IFNGR2) o la sobrexpresión de la quimiocina IP-10 inducible por IFN gamma que también que se activa a través de las vías de señalización JAK/STAT. En el capítulo 3 también evaluamos comparativamente la internalización y la respuesta inmune antiviral en macrófagos tratados con los NPs de los módulos IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP}. En general de nuevo se observa que los NPs de IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFNγ-CCR5 fueron endocitados fácil y eficientemente por los macrófagos, observando una endocitosis más eficiente de parte de los NPs más compactos del módulo CCR5, lo cual se puede explicar por su menor tamaño que puede estar facilitando la endocitosis [36, 37]. IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} indujeron una fuerte respuesta antiviral en comparación a la proteína control iRFP^{NP}, pero sin detectar deferencias significativas entre los NPs, de nuevo posiblemente la activación de las vías de señalización de receptores de IFNγ (IFNGR2) y el receptor ligando (CCR11) que también pueden haber inducido en una internalización más eficiente de los NPs del módulo ligando (IPNV-IFN-CCR5) pueden estar implicados en la sobreexpresión de los genes antivirales. Los resultados demuestran que los módulos que contienen IFN gamma parecen estar directamente implicados en la activación de las vías de señalización de receptores de IFN. Seleccionamos IFNγ como modulo efector antiviral de todos los constructos porque IFNγ es un regulador clave en la activación de macrófagos y está encargada de modular la respuesta inmune innata y adaptativa mediante la inducción de un estado antiviral en respuesta a una infección viral, mediante la unión a receptores de IFNγ (IFNGRs) que interactúan con la superficie celular para activar las vías de señalización intracelular JAK/STAT que migran al núcleo y activan la expresión de genes dependientes de IFNγ [38, 39]. Por otra parte, respecto al receptor de ligando, buscando otorgar funcionalidades inmunológicas adicionales a los NPs, decidimos unir la molécula ligando de quimiocina CCR5 al módulo de IFNγ de trucha y al antígeno viral VP2 de IPNV (IPNV-IFN-CCR5^{NP}), con la intención de promover la migración del antígeno recombinante junto al módulo IFNγ antiviral (IPNV-IFN^{NP}) hacia células o tejidos infectados, situación que parece cumplirse mirando los resultados de sobreexpresión significativa de anticuerpos del virus de IPN en sueros de truchas tratadas con el módulo ligando, lo que es discutido más adelante. Las quimiocinas cumplen una importante función como quimioatrayentes y juegan un rol clave en la migración celular hacia los sitios de infección y en el tráfico intracelular, promoviendo la inducción de la respuesta inmune humoral y celular de los leucocitos [40, 41, 42]. Por lo tanto, bajo el contexto de la no disponibilidad de una molécula ligando de CCR5 de trucha o salmónido y considerando que las quimiocinas humanas son conservadas y comparten analogías con las quimiocinas de peces [43], decidimos explorar unir una molécula ligando del CCR5 humano que ha sido ampliamente descrito como el principal correceptor del virus VIH para infectar a células [44]. Adicionalmente, utilizamos como

receptor del ligando CCR5 humano un receptor CCR5 de trucha denominado CCR11 que tiene la habilidad de ser sobreexpresado en macrófagos HK, bazo e intestino de truchas en respuesta a diferentes estimulantes inmunológicos, tales como Peptidoglicanos, IFNγ y Poly(I:C) [39]. De esta manera, hipotetizamos que la respuesta antiviral inducida por el módulo ligando, puede deberse a que el receptor CCR11 de trucha está actuando como correceptor para la entrada del módulo ligando CCR5 humano (IPNV-IFN-CCR5) a los macrófagos como se ha descrito con el VIH en humanos [44, 45] ,y en paralelo señalando que los macrófagos podrían haber entrado a en un estado antiviral proinflamatorio M1 en respuesta a IFNγ [46]. En humanos se ha comprobado la inclusión de ligandos a nanopartículas administradas por vía oral mejoran el transporte de las nanopartículas a través del epitelio intestinal para que se dirijan a células inmunes [25, 51]. En esta dirección, los módulos recombinantes vacunales con IFNγ y ligando pueden potencialmente iniciar una respuesta inmunológica activando o dirigiendo células linfoides presentes en el GALT como macrófagos, células T y B hacia sitios de infección [47, 48]. Sin embargo, como fue discutido en el Capítulo 2, pruebas con otros ligandos o internar modelar un ligando de salmónidos, así como, estudios que nos permitan entender mejor los mecanismos de internalización de los NPs en las células y como estos inducen una repuesta antiviral en el citosol, necesitan ser testados y estudiados en profundidad.

En el estudio, utilizamos Poly(I:C) como control positivo, un análogo sintético ampliamente utilizado como inmunoestimulante en humanos y animales que imita el dsARN viral e inductor de IFN que tiene la capacidad de montar una fuerte respuesta antiviral [49, 50]. En el Capítulo 2 y 3 observamos que Poly(I:C) indujo una mayor respuesta antiviral en las células RTgutGC y en cultivos primarios de macrófagos en comparación a los módulos de IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP}, similar a los niveles de Poly(I:C) observados previamente por nuestro grupo de investigación en macrófagos y células ZFL testados con los NPs de antígenos recombinantes antivirales [16]. No obstante, en el Capítulo 1 los NPs del módulo SVCV-IFN^{NP} mostraron similares niveles de respuesta antiviral que Poly(I:C) en células ZFL, entreviendo que el módulo SVCV IFNγ presenta una potente propiedad inmunoestimuladora.

Respecto a la inducción de respuesta inflamatoria, se ha observado que todos los módulos recombinantes diseñados (IPNV y SVCV) tienen la habilidad de inducir la sobreexpresión de citocinas inflamatorias en los diferentes cultivos celulares tratados (células ZFL, macrófagos HK y RTgutGC) con los NPs, al igual como se ha reportado en los estudios previos con NPs recombinantes realizados por el grupo de investigación [15, 26, 52], seguramente principalmente debido a que nuestras vacunas recombinantes son nanoestructuradas como IBs, proteínas insolubles que pueden contener impurezas pero a niveles viables de contaminación, tales como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos (PGN) y trazas de proteínas de membrana y ácidos nucleicos (RNA/ADN) producto

del proceso de purificación con *E. coli*, los cuales actúan como PAMPs probablemente uniéndose a los receptores (PRRs) de la superficie tisular, lo que creemos incrementa aún más el potencial inmunoestimulante de nuestras vacunas debido a que estas impurezas son conocidos estimuladores[50].

Funcionalidad *in vivo*: Inmunomodulación antiviral de las vacunas modulares

En el Capítulo 1 utilizamos larvas del pez cebra para evaluar la absorción intestinal y respuesta antiviral de los NPs de SVCV. Las larvas de los peces cebra son ampliamente utilizadas debido a que son transparentes, tienen un rápido crecimiento y son fáciles de manipular y cultivar. Además, los peces cebra son susceptibles a SVCV, siendo el modelo de infección más ampliamente utilizado para evaluar respuesta inmune antiviral [53]. Los ensayos de endocitosis de NPs en larvas por inmersión, demostraron que las larvas internalizaron eficientemente los NPs de SVCV y SVCV-IFN en el tracto gastrointestinal y páncreas a las 48 h de incubación, pero no a las 24 h de incubación. Esto puede ser explicado probablemente debido a que su boca no estaba completamente desarrollada a las 24 h, se ha reportado que el pez cebra presenta la boca completamente abierta a los 3 dpf [54]. Nuestro grupo ha reportado previamente la capacidad que tiene el intestino de adultos y larvas del pez cebra de absorber NPs nanoestructurados fluorescentes ($TNF\alpha^{NP}$), y en el caso de adultos, los NPs cruzar la barrera de la mucosa y estimular una respuesta inmune local [52]. Los NPs de SVCV-IFNγ no logaron inducir la expresión de genes antivirales como se observó en las células ZFL. Cómo discutimos en el capítulo 1 nosotros lo atribuimos a que probablemente el sistema inmune de las larvas de pez cebra no estaba lo suficientemente maduro para montar una respuesta antiviral completa. Las etapas embrionaria y larvaria del pez cebra dependen únicamente de la inmunidad innata que es detectable y se activa en el primer día de la embriogénesis, mientras que el sistema adaptativo está completamente maduro entre 4 y 6 semanas después de la fertilización [53]. Dios et al caracterizando el progreso de la maduración antiviral de los peces cebra, recién detectaron IFNγ-1 a los 8 días post fecundación con estímulos virales. En ese sentido, podemos suponer en el peor de los casos que una respuesta antiviral adaptativa en peces cebra puede demorar 8 días en activarse [55]. López-Muñoz et al [56] en experimentos de infección con SVCV había reportado también que las larvas del pez cebra no son capaces de montar una respuesta antiviral contra SVCV tras 48 h de infección, evaluando entre otros, la expresión del mismo set genes antivirales que nosotros evaluamos (Vig-1 y Mx). Por otra parte, los NPs de SVCV post 24 h de incubación mataron al 100% de las larvas, pero con el doble de dosis (20 μg/ml) de la utilizada en los experimentos de expresión génica en células ZFL y en el ensayo de infección con peces cebra adultos. Aunque atribuimos que IFNγ puede presentar toxicidad tal como lo reportado por Muñoz et al [56] en embriones de pez cebra microinyectados, como el módulo SVCV sin IFN también generó mortalidad, no podemos descartar

completamente que la saturación de impurezas de los NPs a una dosis muy alta en un pequeño volumen de medio (6 larvas/1 ml de medio) podrían haber también provocado o impulsado la muerte de las larvas mediante la obstrucción de sus vías respiratorias o provocando hipoxia en el medio de cultivo. No obstante, tomando todos estos resultados y comparando con la proteína control inmuno no relevante iRFP^{NP}, podemos deducir que los NPs de SVCV, y más consistentemente SVCV sin IFN, fueron capaces de montar una respuesta antiviral e inflamatoria en larvas del pez cebra, aunque la estimulación de células ZF4 embrionarias del mismo origen que las larvas, indican que el módulo IFNγ también es capaz de estimular una fuerte respuesta antiviral al mismo nivel que SVCV^{NP} y Poly(I:C).

En el ensayo de infección contra el virus de SVC (Capítulo 1), demostramos que el módulo SVCV-IFN^{NP} brindó un excelente nivel de protección en peces cebra adultos desafiados con el virus de SVC, mostrando un 80% de sobrevivencia en comparación al 16,7% de sobrevivencia alcanzado por los peces control no vacunados 18 días después del desafío con el virus SVC, con un porcentaje relativo de supervivencia (RPS) de 76%, lo cual demuestra la capacidad que tienen nuestras vacunas modulares de inducir una protección eficaz contra el virus de SVC. Estos resultados podrían compararse a los reportados por Cui y colaboradores [25] que aprovechando la utilidad de la ingeniería genética desarrollaron una vacuna oral recombinante para proteger a peces ciprínidos contra el virus del SVC y del virus herpes Koi (KHV), sobreexpresando la glicoproteina G de SVCV y la proteína ORF81 del virus KHV de forma combinada en *Lactobacillus plantarum (L. plantarun)*. La vacuna oral con ambos antígenos indujo un aumento significativo de los niveles de anticuerpos específicos IgM de SVCV y KHV, y mostró una protección significativa contra SVCV y KHV que alcanzó el 71% en la carpa común y un 53% en la carpa koi de los peces vacunados después de 65 días post desafío [25]. Similar a nuestros módulos recombinantes, que en nuestro caso están compuestos de un antígeno viral combinado con un IFNγ y que a futuro podría ser combinado con otro antígeno viral, estos resultados evidencian la versatilidad y funcionalidad que tienen las vacunas de subunidad de incluir módulos o secuencias que potencien la respuesta inmune en un contexto de vacunación oral y en este caso demostrando la efectividad en la activación de una respuesta inmune sistémica desde la mucosa al combinar dos antígenos antivirales. También, una vacuna de subunidad para administración oral, pero contra el virus de VNN y expresada por separado en *E. coli* BL21 y en *Vibrio anguillarum* inactivado y encapsuladas con nauplios de *Artemia* para su administración oral fueron elaborados y comparada su inmunogenicidad. En general, comprobaron que la vacuna recombinante *V, anguillarium* indujo una mayor expresión antiviral (Mx), una tasa de supervivencia más alta y títulos de anticuerpos específicos levemente más altos contra VNN en la primera semana de inoculación en comparación a la vacuna oral expresada en *E. coli* [57]. Otro enfoque novedoso que no implican utilizar genes exógenos como en las vacunas de ADN es expresar la proteína SVCV-

G en la superficie externa de *Lactobacilus* (*Lactococcus lactis*). Zhang y colaboradores [58] reportaron que una vacuna subunitaria recombinante con el antígeno dispuesto en la superficie de un *Lactobacilus* indujo un significativo aumento de anticuerpos específicos IgM del virus de SVC y una baja mortalidad (13%) en carpa común de juveniles inmunizados con la vacuna subunitaria, después de ser desafiadas con SVCV en comparación a los grupos control (PBS y *L. lactis* sin vacuna) que presentaron mortalidades por sobre 92%. Estos resultados en conjunto evidencian que la inducción de un estado antiviral puede estar sujeto al sistema de expresión utilizado, y que *Lactobacillus* es un buen candidato como sistema de expresión con la capacidad de promover significativamente la inducción de una respuesta antiviral sistémica en un contexto de vacunación oral, y posiblemente en conjunto o en paralelo, cumpliendo un rol en el equilibrio de la microbiota intestinal de los peces [59]. Otra aproximación interesante, es una nueva vacuna oral recombinante realizada por González-Silvera y colaboradores para combatir el VNNV en juveniles de lubina europea. El antígeno viral de VNNV fue expresado en *E. coli*, y luego de procesos de lavado la bacteria completa sin purificar fue incluida en pienso para administración oral y lisada por sonicación para administración intraperitoneal [28]. Los sueros de peces inmunizados con la vacuna oral mostraron un aumento en la expresión de anticuerpos específicos del virus de VNN posterior a la infección con VNNV por inyección (2 días post infección) en comparación a las lubinas inmunizadas vía inyección, después de comprobar que ambos métodos de entrega de la vacuna producen anticuerpos específicos de VNNV en el suero de las lubinas juveniles 30 días después de la vacunación. Además, en la infección con VNNV no hubo mortalidad (RPS: 100%) en los peces inmunizados con la vacuna recombinante en ninguna de las dos rutas de administración después de 10 días de infección en comparación a los peces no vacunados, que presentaron un 33% de mortalidad. Los resultados evidencian que nuestras vacunas modulares otorgan una eficiente protección contra infecciones de SVC, y que el desarrollo de vacunas de proteínas recombinantes en conjunto son una potente alternativa profiláctica que ofrecen protección a peces juveniles de interés comercial afectados por enfermedades virales altamente contagiosas, bajo un contexto de administración oral vacunal dirigida a la mucosa. Por otro lado, la versatilidad de la ingeniería biotecnológica de proteínas recombinantes posibilita una infinidad de caminos alternativos de expresión de proteínas que podría permitirnos crear nuevos enfoques de vacunas recombinantes y/o potenciar la funcionalidad inmunomoduladora de nuestras vacunas subunitaria en un contexto de vacuna biosegura y rentable.

En el Capítulo 2 demostramos por intubación oral a truchas juveniles que los NPs del módulo IPN-IFNγ administrados pueden ser rápidamente absorbidos por las células del intestino y biodistribuidos a los macrófagos del riñón anterior a niveles significativamente más altos que los NPs de $IPNV^{NP}$. Estos resultados evidencian que la incorporación del módulo IPNV-IFN^{NP} podría mejorar la funcionalidad antiviral de la vacuna, probablemente mediante la unión al receptor IFN que activó las

vías de señalización, lo cual hemos planteado previamente, y que hipotetizamos podría estar facilitando la internalización de los NPs de IPNV-IFNγ en los macrófagos con la capacidad de inducir una respuesta antiviral. Además, estos hallazgos indican que los NPs de IPNV-IFN pueden resistir la degradación ante enzimas digestivas y el ambiente acido del estómago de los salmónidos al iniciar la alimentación (pH ~ 2,7) [31] no necesitando ser encapsulados y manteniendo su funcionalidad con un método de producción simple y barato. En el grupo de investigación se ha demostrado por intubación oral que los NPs pueden llegar al intestino, traspasar la mucosa intestinal de peces cebra y truchas juveniles de forma eficiente, e inducir una respuesta inmune proinflamatoria [26, 52]. En estudios posteriores con el objetivo de potenciar la funcionalidad antiviral modular, sería interesante incorporar un módulo ligando u otro módulo inmunoestimulante antiviral a la vacuna y ser administrada de forma oral a salmónidos en pienso para evaluar si tienen la misma habilidad de ser absorbidos y biodistribuidos a diferentes órganos linfoides. A su vez en este Capítulo, intubamos por vía oral tres truchas juveniles por tratamiento (IPNV-IFN^{NP}, control iRFP y control PBS) y tras 24 horas aislamos del intestino distal dos poblaciones de linfocitos mediante *cell sorting* (llamadas mieloides y linfoides) para evaluar si los NPs inducen una sobrexpresión de genes relacionados a respuesta inmune innata y adaptativa. En las poblaciones linfoides observamos la expresión de varios genes asociados a linfocitos de respuesta adaptativa. Entre ellos, CD8α, IgM y Lamp3 fueron los genes que presentaron mayores niveles de expresión, pero sin detectar diferencias significativas con los peces control (iRFP y PBS). Por otro lado, en las poblaciones mieloides, más asociadas a células presentadoras de antígenos (APC) por tamaño y complejidad, las truchas intubadas con IPNV-IFNγ indujeron un incremento significativo en la expresión de genes asociados a macrófagos (MCSFR2a, CD83), células dendríticas maduras (CD83) y de las moléculas MHCI e MHCII respecto a los peces intubados con los NPs de la proteína inmuno no relevante iRFP^{NP}. Las MHCI además de estar encargadas de monitorear patógenos intracelulares, se producen en casi todas las células y presentan antígenos a las células T CD8 citotóxicas [1, 27, 60], lo que podría explicar el incremento en la expresión de genes de CD8α observado en las células linfoides. Por otro lado, solo las células capaces de internalizar microbios/proteínas extracelulares expresan moléculas de MHCII, y estas incluyen macrófagos, células dendríticas y células B, las llamadas células profesionales presentadoras de antígenos (APC) [1, 61], lo que puede explicar los mayores niveles de los marcadores de MCSFR2a (macrófagos) y CD83 (células dendríticas) observados en las poblaciones mieloides. Además, los NPs del módulo IFNγ y control iRFP^{NP} indujeron la expresión del gen de la citocina CCL4; en humanos, CCL4 se ha asociado con la infiltración de células B y CD8^{+} [62], lo que podría estar relacionado a la sobrexpresión de CD8α en las poblaciones linfoides. El módulo IFNγ y la proteína control iRFP indujeron una sobreexpresión significativa de Lamp3 utilizado como marcador de células dendríticas en humanos y posiblemente implicado en el proceso de presentación de antígenos

[63]. Se ha reportado ampliamente la expresión de marcadores de genes de respuesta inmune innata y adaptativa en leucocitos aislados del GALT (intestino distal) asociados a linfocitos T y B, y células dendríticas en trucha arcoíris estimuladas con una variedad de PAMPs inflamatorios y antivirales y citocinas recombinantes [64, 65]. Los resultados de expresión génica de marcadores genéticos de respuesta inmune en las poblaciones de leucocitos permitieron entrever el potencial inmunogénico que tiene la vacuna modular de IFNγ (IPNV-IFN^{NP}) induciendo una activación local de la respuesta inmune innata-adaptativa antiviral en la mucosa del intestino de truchas juveniles, principal ruta de entrada del virus de IPN y donde es encontrado en los primeros estadios de infección [24].

En el experimento *in vivo* (Capítulo 3) donde evaluamos si IPNV-IFN^{NP} e IPNV-IFN-CCR5^{NP} intubados de forma oral a truchas juveniles inducen una respuesta inmune innata y adaptativa antiviral en órganos linfoides (intestino distal, riñón anterior y bazo) a diferentes tiempos (día 1, 3, 15 y 21), se observó que los NPs de ambos módulos de IPNV no indujeron la expresión de genes antivirales innatos, pero si la expresión de algunos genes de quimioquinas relacionados con la respuesta inmune inflamatoria, las células B IgM/IgT y el gen antiinflamatorio (IL-10). El módulo IFNγ sin ligando (IPNV-IFN^{NP}) estimuló de forma evidente y significativa la expresión de IP-10 el gen inducible por IFNγ el día 1 y 3 post intubación tanto en el intestino distal como en el riñón anterior de las truchas. Como hemos planteado en el Capítulo 3, investigaciones han reportado que la sobreexpresión de IP-10 en respuesta a infecciones está fuertemente asociado en el inicio de una robusta respuesta inmune que promueve la activación y movilidad de las células inmunológicas como macrófagos y linfocitos a los sitios de infección [43, 62, 66]. Por lo tanto, nosotros hipotetizamos que el aumento de la inducción de la quimiocina IP-10 puede estar asociada a un fuerte reclutamiento y tráfico de leucocitos entre el intestino distal y el riñón anterior de forma temprana (1° y 3° día post intubación), que a la larga podría haber promovido un estado de homeostasis inmunológica antiinflamatoria en las truchas intubadas con el módulo IFNγ, reflejado en el incremento de la expresión de IL-10 en el riñón anterior y bazo los días 15 y 21 después de la intubación. La quimiocina IL-10, es una citocina con propiedades antiinflamatorias que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis inmune, la regulación de la inflamación y la limitación de las respuestas inmunes robustas a los patógenos, que son importantes para frustrar las respuestas inmunes excesivas para prevenir el daño tisular, especialmente durante la infección [67]. También se ha descrito que la tolerancia de la mucosa es impulsada por la expresión de altos niveles locales de citocinas antiinflamatorias (IL-10 y TGFb) que sostienen la generación y el mantenimiento de células T reguladoras y células dendríticas (DC) [68]. La tolerancia a vacunas orales para peces se viene reportando hace un tiempo. Una vacuna oral para *Aeromona salmonicida* administrada a trucha arcoíris juveniles mostró una disminución de los títulos de anticuerpos en el tiempo en una dosis dependiente manera en comparación a los peces inyectados por la ruta intraperitoneal [69]. Por

otra parte, se ha indicado en humanos que IL-10 es principalmente producida por células T CD4 y macrófagos, y es un fuerte estimulador de los Igs secretados por células B [70], lo cual podría explicar la mayor expresión de genes de las células B IgM y CD4 observado en el riñón anterior y en bazo de truchas intubadas con IPNV-IFN^{NP} al día 21 posterior a la intubación (Figura 5A y B, Cap. 3). Sin embargo, en los ensayos ELISAs no detectamos la expresión de anticuerpos IgM específicos del virus de IPN en sueros de peces intubados con IPNV-IFN^{NP}, pero si una expresión significativa de anticuerpos IgM cuando combinamos el módulo IFNγ con el módulo ligando (IPNV-IFN-CCR5^{NP}). Abos y colaboradores [71] en ensayos de activación de células B IgM con citocinas recombinantes en esplenocitos aislados de trucha, reportaron que IL-10 incrementa el número de células B IgM, pero que no es capaz de inducir una proliferación de células B IgM por si sola, por el contrario, cuando IL-10 recombinante fue combinado con otra proteína recombinante (CD4) la proliferación de células IgM+ B, alcanzó valores significativamente más altos. Estos resultados de alguna manera podrían estar en consonancia con los nuestros y responder a la mayor expresión de anticuerpos específicos del virus IPN en el suero de las truchas cuando son estimuladas por el módulo IFNγ unido al módulo ligando (IPNV-IFN-CCR5^{NP}). Sin embargo, como se ha indicado, para diseñar una vacuna debemos tener en cuenta que la eficacia de las vacunas orales no solo debe lidiar con proteger al antígeno de la degradación gastrointestinal, sino también con un entorno gástrico altamente tolerante [72]. Romboult et al señalaron que la alimentación con dosis bajas de antígenos causa la inducción de células T reguladoras (Treg) y la expresión de receptores de células T *homing* intestinales. En este caso, las citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, TGFβ) hacen que las células T anérgicas (Treg) actúen como células supresoras para finalmente evocar la tolerancia. Por otro lado, una alta dosis de alimentación con antígenos provoca la inducción de la anergia de las células T y la susceptibilidad a la apoptosis, lo que resulta en la secreción y la regulación ascendente de TGFβ [73].

En los análisis de sueros de trucha expuestos a IPNV-IFN-CCR5^{NP} se observó que esta vacuna indujo una significativa expresión de anticuerpos específicos del virus de IPN en comparación a los grupos de peces control (T_0, PBS e iRFP^{NP}) y grupo de peces del módulo IFN (IPNV-IFN^{NP}) lo que puede ser explicado por la sobreexpresión de IP-10 discutida previamente. No obstante, para nuestra sorpresa en los peces no intubados que tomamos muestra de suero previo a la intubación (T_0), y en los sueros de peces intubados con PBS y la proteína control iRFP, los sueros mostraron similares niveles de anticuerpos. Las posibles causas las discutimos en el Capítulo 3. Brevemente, sospechamos que las truchas fueron portadores asintomáticos del virus, y que posiblemente, la manipulación de los animales previo al ensayo pudo haber inducido un aumento de la replicación del virus en las truchas. Por otro lado, fallamos en comprobar la presencia de la enfermedad en los peces mediante análisis qPCR debido a su historial limpio y que en ninguna etapa del ensayo detectamos síntomas o signos clínicos de enfermedad en los peces, presentando siempre buena condición, apetito

y comportamiento (datos no mostrados). La enfermedad por IPNV en general presenta signos comunes como son la natación anormal errática y en algunos casos anorexia [23]. No obstante, en lo que respecta al objetivo del experimento, el módulo ligando indujo un incremento significativo en los títulos de anticuerpos específicos del virus IPN en las muestras de suero menos diluida (1:30) en comparación a los tratamientos control y el módulo IFN sin ligando. Resultado que podría atribuirle al módulo ligando funcionalidad inmunológica sistémica con potencial de vacuna de refuerzo. Sin embargo, debemos destacar que la limitación de este estudio es que las truchas no fueron desafiadas contra el virus IPN por lo que el nivel de protección real de la vacuna quedará sujeta a estudios complementarios posteriores.

La mayoría de las vacunas disponibles contra IPNV son del tipo inactivadas y por administración intraperitoneal y se está trabajando fuertemente en la creación de promisorias vacunas experimentales de ADN para administración oral encapsuladas y por inyección intramuscular [74, 75, 76, 77]. Ballesteros et al en una vacuna encapsulada de DNA para administración oral con pienso en trucha arcoíris contra IPNV, reportaron un fuerte nivel de protección con sobrevivencias de hasta un 86% en los peces vacunados y detección de anticuerpos neutralizantes 90 días después de la vacunación [76]. En general, las vacunas de ADN presentan excelentes niveles de protección, pero con el problema del cuestionamiento por el uso de genes externos y por lo tanto la dificultad para licenciarlas [6]. Además, que por el momento solo parece presentar más viabilidad por vía intramuscular con los consecuentes costos asociados y problemas de seguridad para los peces. En el mercado, existen dos vacunas de subunidad recombinantes licenciadas para combatir el virus de IPN en salmónidos; 1) una vacuna subunitaria polivalente de emulsión inyectable expresadas en *E. coli* (BL21) contra IPNV y *Piscirickettsia salmonis* (SRS) (Aquavac® SARISTIN 2) y una única vacuna oral subunitaria encapsulada expresada en levadura (*Pichia pastoris*) (Cápside VP2 y VP3) contra IPNV (Aquavac® IPN Oral) para su uso como vacuna de refuerzo oral post inyección, la cual se ha reportado puede alcanzar niveles de protección variables en campo (European Patent: EP1334197B1) de hasta un 86% [75]. Chen y colaboradores [78], con una vacuna oral experimental contra IPNV evaluaron el efecto de entregar vacunas de refuerzo (*boosters*) encapsuladas en alginato y no encapsuladas soluble en pienso en dos tiempos a salmón del atlántico un año después de una inyección intraperitoneal. La vacuna encapsulada indujo un aumento de anticuerpos de IPNV en el suero de los peces posterior al 1° booster pero no en el 2° booster asociado a una sobrexpresión de los genes CD4 y GATA3. Por otro lado, la vacuna soluble indujo una disminución de los niveles de anticuerpos de IPNV después de la entrega en ambos boosters (1° y 2°), asociado a una sobreexpresión significativa de los genes FOXP3, TGF-β e IL-10, lo que sugiere que la vacuna soluble indujo una tolerancia inmune sistémica. Estos resultados pueden estar en consonancia con nuestros hallazgos, donde observamos señales de inducción de tolerancia provocada por el módulo

IFNγ asociado a una significativa sobreexpresión de IL-10 en bazo y riñón anterior el día 21 después de la intubación, y a la incapacidad de inducir anticuerpos específicos del virus IPN en el suero de truchas intubadas con el módulo. En general, los mecanismos asociados a la tolerancia aún no son muy bien comprendidos [9, 72] y, por lo tanto, el potencial riesgo de inducir tolerancia durante la vacunación oral especialmente en peces juveniles inmunológicamente inmaduros es un factor que se debe considerar para desarrollar vacunas dirigidas a la mucosa, y que va a depender también de la dosis del antígeno, la naturaleza del antígeno, la formulación y la vía de administración [9, 72, 80]. Por tanto, podemos especular que el módulo IFNγ indujo un estado de tolerancia oral para preservar la homeostasis de la mucosa intestinal de las truchas intubadas debido a alguna de las variables expuestas previamente. No obstante, el módulo IFNγ combinado con el ligando (IPNV-IFN-CCR5^{NP}) no indujo la expresión de IL-10, lo que puede explicar el aumento significativo de anticuerpos específicos IPNV en los sueros de las truchas intubadas con el módulo ligando, y deducir que el ligando probablemente se unió al receptor de los leucocitos presentes en el intestino promoviendo la migración de las células inmunes con el antígeno, y consecuentemente inducir una respuesta inmune específica de anticuerpos de IPNV en los peces. Estos resultados evidencian que la vacuna subunitaria oral que incluye un ligando puede estimular la respuesta inmune humoral en truchas juveniles.

CONCLUSIONES

A continuación, se presentan las principales conclusiones de la tesis doctoral:

Proteínas recombinantes modulares de antígenos virales de los virus IPN y SVC expresados como cuerpos de inclusión en *E. coli* unidos a un módulo de proteína recombinante de interferón gamma y/o a un módulo ligando fueron producidos y purificados exitosamente.

Las vacunas modulares de IPNV y SVCV son estructuralmente estables en condiciones extremas de pH y temperatura manteniendo su funcionalidad.

Los módulos de antígenos virales recombinantes de SVCV-G3 e IPNV-VP2 combinados con módulos de proteínas recombinantes de IFNγ y/o ligando (CCR5) son eficientemente endocitados por células, acumulados en el citosol y funcionalmente activos induciendo una respuesta antiviral en células ZFL y macrófagos.

Los módulos de SVCV son eficientemente absorbidos en el tracto gastrointestinal y se biodistribuyen al páncreas de larvas del pez cebra, sin embargo, no inducen una respuesta antiviral y presentan toxicidad dosis-dependiente en larvas del pez cebra de 5 días.

El módulo del antígeno viral G3 de SVCV combinado con un módulo de proteínas recombinantes de IFNγ del pez cebra (SVCV-IFNγ) protegen eficazmente a peces cebra adultos contra infecciones del virus SVC.

Los módulos recombinantes de IPNV administrados mediante intubación oral pueden traspasar la mucosa epitelial del intestino y biodistribuirse al riñón anterior de truchas arcoíris juveniles.

La proteína recombinante nanoestructuradas del antígeno viral VP2 de IPNV combinada con un módulo de proteínas recombinantes de IFNγ de trucha arcoíris (IPNV-IFNγ) estimuló la expresión de genes marcadores de la respuesta inmune adaptativa en las poblaciones de linfocitos aislados del intestino de juveniles de truchas juveniles intubadas de forma oral.

El módulo de IFNγ no induce la expresión de anticuerpos específicos contra IPNV, pero sí parece inducir un estado de tolerancia oral u homeostasis intestinal posiblemente dependiente de la dosis.

El módulo IPNV-IFNγ combinado con el módulo ligando humano (CCR5) estimuló la respuesta antiviral humoral mediante la inducción de anticuerpos específicos contra IPNV en sueros de juveniles de truchas intubadas oralmente.

REFERENCIAS

[1] Ø. Evensen, "Development of Fish Vaccines: Focusing on Methods," in *Fish Vaccines*, Basel: Springer Basel, 2016, pp. 53–74. doi: 10.1007/978-3-0348-0980-1_3.

[2] A. Bouazzaoui, A. A. H. Abdellatif, F. A. Al-Allaf, N. M. Bogari, S. Al-Dehlawi, and S. H. Qari, "Strategies for Vaccination: Conventional Vaccine Approaches Versus New-Generation Strategies in Combination with Adjuvants," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 2, p. 140, Jan. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13020140.

[3] M. K. Bedekar and S. Kole, "Fundamentals of Fish Vaccination," 2022, pp. 147–173. doi: 10.1007/978-1-0716-1888-2_9.

[4] Y. Du, X. Hu, L. Miao, and J. Chen, "Current status and development prospects of aquatic vaccines," *Frontiers in Immunology*, vol. 13. Frontiers Media S.A., Nov. 10, 2022. doi: 10.3389/fimmu.2022.1040336.

[5] A. K. Dhar, S. K. Manna, and F. C. Thomas Allnutt, "Viral vaccines for farmed finfish," *Virusdisease*, vol. 25, no. 1, pp. 1–17, Jan. 2014, doi: 10.1007/s13337-013-0186-4.

[6] J. Ma, T. J. Bruce, E. M. Jones, and K. D. Cain, "A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches," *Microorganisms*, vol. 7, no. 11. MDPI AG, Nov. 01, 2019. doi: 10.3390/microorganisms7110569.

[7] S. Mutoloki, S. Alexandersen, and Ø. Evensen, "Sequential study of antigen persistence and concomitant inflammatory reactions relative to side-effects and growth of Atlantic salmon (Salmo salar L.) following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 16, no. 5, pp. 633–644, May 2004, doi: 10.1016/j.fsi.2003.10.002.

[8] S. Mutoloki, S. Alexandersen, K. Gravningen, and Ø. Evensen, "Time-course study of injection site inflammatory reactions following intraperitoneal injection of Atlantic cod (Gadus morhua L.) with oil-adjuvanted vaccines," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 24, no. 4, pp. 386–393, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.fsi.2007.08.009.

[9] S. Mutoloki, B. Brudeseth, O. B. Reite, and Ø. Evensen, "The contribution of Aeromonas salmonicida extracellular products to the induction of inflammation in Atlantic salmon (Salmo salar L.) following vaccination with oil-based vaccines," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 20, no. 1, pp. 1–11, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.fsi.2005.01.005.

[10] S. Mutoloki, H. M. Munang'andu, and Ø. Evensen, "Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake, and immune induction," *Front Immunol*, vol. 6, no. OCT, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00519.

[11] F. Rueda *et al.*, "Production of functional inclusion bodies in endotoxin-free Escherichia coli," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 98, no. 22, pp. 9229–9238, Nov. 2014, doi: 10.1007/s00253-014-6008-9.

[12] E. Vázquez *et al.*, "Functional Inclusion Bodies Produced in Bacteria as Naturally Occurring Nanopills for Advanced Cell Therapies," *Advanced Materials*, vol. 24, no. 13, pp. 1742–1747, Apr. 2012, doi: 10.1002/adma.201104330.

[13] E. Rodríguez-Carmona, O. Cano-Garrido, J. Seras-Franzoso, A. Villaverde, and E. García-Fruitós, "Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies," *Microb Cell Fact*, vol. 9, no. 1, p. 71, Dec. 2010, doi: 10.1186/1475-2859-9-71.

[14] M. L. Bellone, A. Puglisi, F. Dal Piaz, and A. Hochkoeppler, "Production in Escherichia coli of recombinant COVID-19 spike protein fragments fused to CRM197," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 558, pp. 79–85, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.056.

[15] I. Akmayan, A. B. Ozturk, and T. Ozbek, "Recombinant proteins production in Escherichia coli BL21 for vaccine applications: a cost estimation of potential industrial-scale production scenarios," *Prep Biochem Biotechnol*, pp. 1–14, Jan. 2024, doi: 10.1080/10826068.2023.2299495.

[16] R. Thwaite *et al.*, "Protein Nanoparticles Made of Recombinant Viral Antigens: A Promising Biomaterial for Oral Delivery of Fish Prophylactics," *Front Immunol*, vol. 9, Jul. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01652.

[17] R. Thwaite *et al.*, "Nanostructured recombinant protein particles raise specific antibodies against the nodavirus NNV coat protein in sole," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 99, pp. 578–586, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.02.029.

[18] P. Argos, “An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion,” *J Mol Biol*, vol. 211, no. 4, pp. 943–958, Feb. 1990, doi: 10.1016/0022-2836(90)90085-Z.
[19] C. W. E. Embregts *et al.*, “Intramuscular DNA vaccination of juvenile carp against spring viremia of carp virus induces full p3wrotection and Establishes a Virus-Specific B and T Cell Response,” *Front Immunol*, vol. 8, no. OCT, Oct. 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01340.
[20] *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022*. FAO, 2022. doi: 10.4060/cc0461es.
[21] H. Mondal and J. Thomas, “A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture,” *Aquaculture International*, vol. 30, no. 4, pp. 1971–2000, Aug. 2022, doi: 10.1007/s10499-022-00884-w.
[22] B. Lakshmi, S. Syed, and V. Buddolla, “Current advances in the protection of viral diseases in aquaculture with special reference to vaccination,” in *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, Elsevier, 2018, pp. 127–146. doi: 10.1016/B978-0-12-816328-3.00010-6.
[23] C. P. Dopazo, “The infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and its virulence determinants: What is known and what should be known,” *Pathogens*, vol. 9, no. 2. MDPI AG, Feb. 01, 2020. doi: 10.3390/pathogens9020094.
[24] F. Jutfelt, “Barrier function of the gut,” *Encyclopedia of Fish Physiology. From Genome to Environment, volume 2, pp. 1322-1331. San Diego: Academic Press.*, 2011, doi: 10.1016/B978-0-1237-4553-8.00068-X.
[25] L.-C. Cui, X.-T. Guan, Z.-M. Liu, C.-Y. Tian, and Y.-G. Xu, “Recombinant lactobacillus expressing G protein of spring viremia of carp virus (SVCV) combined with ORF81 protein of koi herpesvirus (KHV): A promising way to induce protective immunity against SVCV and KHV infection in cyprinid fish via oral vaccination,” *Vaccine*, vol. 33, no. 27, pp. 3092–3099, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.vaccine.2015.05.002.
[26] Y. Yun, Y. W. Cho, and K. Park, “Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 65, no. 6, pp. 822–832, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.10.007.
[27] D. Torrealba *et al.*, “Nanostructured recombinant cytokines: A highly stable alternative to short-lived prophylactics,” *Biomaterials*, vol. 107, pp. 102–114, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.043.
[28] D. Gonzalez-Silvera, F. A. Guardiola, C. Espinosa, E. Chaves-Pozo, M. Á. Esteban, and A. Cuesta, “Recombinant nodavirus vaccine produced in bacteria and administered without purification elicits humoral immunity and protects European sea bass against infection,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 88, pp. 458–463, May 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.03.013.
[29] P. H. M. Joosten, “Immunological aspects of oral vaccination in fish,” Wageningen University, 1997. Accessed: Feb. 29, 2024. [Online]. Available: https://library.wur.nl/WebQuery/wda/abstract/941236
[30] J. Bravo, A. Hernandez, G. Morales, P. Dantagnan, and L. Marquez, “Digestive coordination of the gastric function in Atlantic salmon Salmo salar juveniles,” *Lat Am J Aquat Res*, vol. 46, no. 5, pp. 1083–1090, Nov. 2018, doi: 10.3856/vol46-issue5-fulltext-20.
[31] C. Bucking and C. M. Wood, “The effect of postprandial changes in pH along the gastrointestinal tract on the distribution of ions between the solid and fluid phases of chyme in rainbow trout,” *Aquac Nutr*, vol. 15, no. 3, pp. 282–296, Jun. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00593.x.
[32] A. Kawano *et al.*, “Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide,” *Aquac Nutr*, vol. 17, no. 2, pp. e241–e252, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00757.x.
[33] Å. Krogdahl, A. Sundby, and H. Holm, “Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (Salmo salar). Enzyme pH optima, chyme pH, and enzyme activities,” *Aquaculture*, vol. 449, pp. 27–36, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.02.032.
[34] F. Castro, A. P. Cardoso, R. M. Gonçalves, K. Serre, and M. J. Oliveira, “Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion,” *Front Immunol*, vol. 9, May 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00847.
[35] D. Porter, D. Peggs, C. McGurk, and S. A. M. Martin, “Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT) primary cells and stable cell lines as predictive models for intestinal health in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss),” *Front Immunol*, vol. 13, Oct. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.1023235.

[36] U. Rinas, E. Garcia-Fruitós, J. L. Corchero, E. Vázquez, J. Seras-Franzoso, and A. Villaverde, "Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half," *Trends Biochem Sci*, vol. 42, no. 9, pp. 726–737, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.tibs.2017.01.005.
[37] L. Mullen *et al.*, "Latent cytokines for targeted therapy of inflammatory disorders," *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 11, no. 1, pp. 101–110, Jan. 2014, doi: 10.1517/17425247.2014.863872.
[38] J. Zou and C. J. Secombes, "Teleost fish interferons and their role in immunity," *Dev Comp Immunol*, vol. 35, no. 12, pp. 1376–1387, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.dci.2011.07.001.
[39] Z. Qi, J. W. Holland, Y. Jiang, C. J. Secombes, P. Nie, and T. Wang, "Molecular characterization and expression analysis of four fish-specific CC chemokine receptors CCR4La, CCR4Lc1, CCR4Lc2 and CCR11 in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 68, pp. 411–427, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.fsi.2017.07.031.
[40] B. Robertsen, "The interferon system of teleost fish," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 20, no. 2, pp. 172–191, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.fsi.2005.01.010.
[41] B. Sun, I. Skjæveland, T. Svingerud, J. Zou, J. Jørgensen, and B. Robertsen, "Antiviral Activity of Salmonid Gamma Interferon against Infectious Pancreatic Necrosis Virus and Salmonid Alphavirus and Its Dependency on Type I Interferon," *J Virol*, vol. 85, no. 17, pp. 9188–9198, Sep. 2011, doi: 10.1128/jvi.00319-11.
[42] K. Schroder, P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume, "Interferon-γ: an overview of signals, mechanisms and functions," *J Leukoc Biol*, vol. 75, no. 2, pp. 163–189, Feb. 2004, doi: 10.1189/jlb.0603252.
[43] H. Xu and F. Liu, "Advances in chemokines of teleost fish species," *Aquaculture and Fisheries*. KeAi Communications Co., Mar. 01, 2023. doi: 10.1016/j.aaf.2023.01.008.
[44] H. Gaertner *et al.*, "Highly potent, fully recombinant anti-HIV chemokines: Reengineering a low-cost microbicide," 2008. [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/content/full/
[45] M. Oppermann, "Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation," *Cell Signal*, vol. 16, no. 11, pp. 1201–1210, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.cellsig.2004.04.007.
[46] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati, "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization," *Trends Immunol*, vol. 25, no. 12, pp. 677–686, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.
[47] A. des Rieux, V. Pourcelle, P. D. Cani, J. Marchand-Brynaert, and V. Préat, "Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 65, no. 6, pp. 833–844, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2013.01.002.
[48] Z. Gan, S. N. Chen, B. Huang, J. Zou, and P. Nie, "Fish type I and type II interferons: composition, receptor usage, production and function," *Reviews in Aquaculture*, vol. 12, no. 2. Wiley-Blackwell, pp. 773–804, May 01, 2020. doi: 10.1111/raq.12349.
[49] P. Pereiro, A. Figueras, and B. Novoa, "Insights into teleost interferon-gamma biology: An update," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 90, pp. 150–164, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.002.
[50] A. Ruyra *et al.*, "Targeting and stimulation of the zebrafish (Danio rerio) innate immune system with LPS/dsRNA-loaded nanoliposomes," *Vaccine*, vol. 32, no. 31, pp. 3955–3962, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.05.010.
[51] Y. Zhou *et al.*, "TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C," *Innate Immun*, vol. 19, no. 2, pp. 184–192, Apr. 2013, doi: 10.1177/1753425912459975.
[52] J. Ji, D. Torrealba, R. Thwaite, A.-C. Gomez, D. Parra, and N. Roher, "Nanostructured TNFα protein targets the zebrafish (Danio rerio) immune system through mucosal surfaces and improves the survival after Mycobacterium marinum lethal infection," *Aquaculture*, vol. 510, pp. 138–149, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.05.050.
[53] C. Streiff *et al.*, "Susceptibility and Permissivity of Zebrafish (Danio rerio) Larvae to Cypriniviruses," *Viruses*, vol. 15, no. 3, p. 768, Mar. 2023, doi: 10.3390/v15030768.
[54] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, and T. F. Schilling, "Stages of embryonic development of the zebrafish," *Developmental Dynamics*, vol. 203, no. 3, pp. 253–310, Jul. 1995, doi: 10.1002/aja.1002030302.
[55] S. Dios, A. Romero, R. Chamorro, A. Figueras, and B. Novoa, "Effect of the temperature during antiviral immune response ontogeny in teleosts," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 29, no. 6, pp. 1019–1027, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.fsi.2010.08.006.

[56] A. López-Muñoz, F. J. Roca, M. P. Sepulcre, J. Meseguer, and V. Mulero, “Zebrafish larvae are unable to mount a protective antiviral response against waterborne infection by spring viremia of carp virus,” *Dev Comp Immunol*, vol. 34, no. 5, pp. 546–552, May 2010, doi: 10.1016/j.dci.2009.12.015.

[57] Y.-M. Chen *et al.*, “An oral nervous necrosis virus vaccine using Vibrio anguillarum as an expression host provides early protection,” *Aquaculture*, vol. 321, no. 1–2, pp. 26–33, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.08.035.

[58] C. Zhang *et al.*, “Surface display of spring viremia of carp virus glycoprotein on Lactococcus lactis and its protection efficacy in common carp (Cyprinus carpio L.),” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 104, pp. 262–268, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.06.021.

[59] Amit, A. Pandey, A. Tyagi, and S. O. Khairnar, “Oral feed-based administration of Lactobacillus plantarum enhances growth, haematological and immunological responses in Cyprinus carpio,” *Emerging Animal Species*, vol. 3, p. 100003, May 2022, doi: 10.1016/j.eas.2022.100003.

[60] C. A. , T. P. , W. M. , et al. Janeway Jr, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science. The Front Line of Host Defense.*, 5th ed., vol. 5. 2001.

[61] K. M. Wegner, “Historical and contemporary selection of teleost MHC genes: did we leave the past behind?,” *J Fish Biol*, vol. 73, no. 9, pp. 2110–2132, Dec. 2008, doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.02051.x.

[62] R. Chen, L. Ma, C. Jiang, and S. Zhang, “Expression and potential role of CCL4 in CD8+T cells in NSCLC,” *Clinical and Translational Oncology*, vol. 24, no. 12, pp. 2420–2431, Aug. 2022, doi: 10.1007/s12094-022-02913-9.

[63] P. Johansson, Y. Corripio-Miyar, T. Wang, B. Collet, C. J. Secombes, and J. Zou, “Characterisation and expression analysis of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) homologue of the human dendritic cell marker CD208/lysosomal associated membrane protein 3,” *Dev Comp Immunol*, vol. 37, no. 3–4, pp. 402–413, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.dci.2012.02.012.

[64] A. Attaya, C. J. Secombes, and T. Wang, “Effective isolation of GALT cells: Insights into the intestine immune response of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) to different bacterin vaccine preparations,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 105, pp. 378–392, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.fsi.2020.06.051.

[65] A. Attaya *et al.*, “Gene expression analysis of isolated salmonid GALT leucocytes in response to PAMPs and recombinant cytokines,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 80, pp. 426–436, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.fsi.2018.06.022.

[66] T. E. Lane, *Chemokines and Viral Infection. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.

[67] L. Kunming, W. Xiumei, and J. Jialong, “Cytokine networks that suppress fish cellular immunity,” *Dev Comp Immunol*, vol. 147, p. 104769, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.dci.2023.104769.

[68] H. Y. Wu and H. L. Weiner, “Oral Tolerance,” *Immunol Res*, vol. 28, no. 3, pp. 265–284, 2003, doi: 10.1385/IR:28:3:265.

[69] G. A. Davidson, A. E. Ellis, and C. J. Secombes, “A preliminary investigation into the phenomenon of oral tolerance in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1792),” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 4, no. 2, pp. 141–151, Mar. 1994, doi: 10.1006/fsim.1994.1012.

[70] K. Wolk, S. Kunz, K. Asadullah, and R. Sabat, “Cutting Edge: Immune Cells as Sources and Targets of the IL-10 Family Members?,” *The Journal of Immunology*, vol. 168, no. 11, pp. 5397–5402, Jun. 2002, doi: 10.4049/jimmunol.168.11.5397.

[71] B. Abos, T. Wang, C. J. Secombes, and C. Tafalla, “Distinct modes of action of CD40L and adaptive cytokines IL-2, IL-4/13, IL-10 and IL-21 on rainbow trout IgM+ B cells,” *Dev Comp Immunol*, vol. 111, p. 103752, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.dci.2020.103752.

[72] C. W. E. Embregts and M. Forlenza, “Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species,” *Dev Comp Immunol*, vol. 64, pp. 118–137, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.dci.2016.03.024.

[73] J. H. W. M. Rombout, G. Yang, and V. Kiron, “Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 40, no. 2, pp. 634–643, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.fsi.2014.08.020.

[74] J. Bøgwald and R. A. Dalmo, “Protection of teleost fish against infectious diseases through oral administration of vaccines: Update 2021,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 20. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/ijms222010932.

[75] A. Cuesta, E. Chaves-Pozo, A. I. de las Heras, S. R. Saint-Jean, S. Pérez-Prieto, and C. Tafalla, “An active DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) with a different mode of action than fish rhabdovirus DNA vaccines,” *Vaccine*, vol. 28, no. 19, pp. 3291–3300, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.106.

[76] N. A. Ballesteros, S. Rodriguez Saint-Jean, and S. I. Perez-Prieto, “Food pellets as an effective delivery method for a DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum),” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 37, no. 2, pp. 220–228, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.fsi.2014.02.003.

[77] M. Reyes *et al.*, “A novel ‘in-feed’ delivery platform applied for oral DNA vaccination against IPNV enables high protection in Atlantic salmon (Salmon salar),” *Vaccine*, vol. 35, no. 4, pp. 626–632, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.vaccine.2016.12.013.

[78] L. Chen *et al.*, “Augmentation of the antibody response of Atlantic salmon by oral administration of alginate-encapsulated IPNV antigens,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, Oct. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0109337.

[79] A. M. C. Faria and H. L. Weiner, “Oral tolerance,” *Immunol Rev*, vol. 206, no. 1, pp. 232–259, Aug. 2005, doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00280.x.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer infinitamente a todas las personas que me han apoyado desde que era solo un niño, sin ellas no hubiese podido llegar hasta aquí, desde que leí mi primer libro “Mac, el microbio desconocido” nunca pensé que terminaría buscando a Mac o más bien pretender eliminarlo, quizás el inconsciente quien sabe.

La lista de personas al que le debo mi agradecimiento es interminable, tengo muchos recuerdos de cortas y largas conversaciones con personas cercanas e incluso desconocidos que me han inspirado y motivado, soy un agradecido de esos instantes, y por esto, no quise dejar fuera esta apreciación. Sin embargo, hay personas que han estado ahí desde siempre, quiero agradecer profundamente a mi tía Rita, prima madrina Claudia, primo Cristian, tío Roberto, tía Magda, Don Guillermo, sus ánimos, soporte y amor constante desde mi etapa escolar han sido claves para mí.

Tampoco puedo dejar fuera a mi familión siempre me han apoyado y sobre regaloneado, muchos años fui el más pequeño y ese amor incondicional de familia seguro calo en mí y me llevo a estas instancias.

No puedo dejar de agradecer fuertemente a mi hermana Mari y hermano adoptado Enzo, mucho de lo que soy ahora como persona se lo debo a ustedes, gracias por ese amor y soporte desmesurado, los quiero mucho.

A mis amigos de la vida, Miguel, Andrés, Walter, Marta, Héctor, Goyo, Ale, Ceci, Mafe, Fabian, y otros más, por su cariño y apoyo en las buenas y en las malas, y por esas largas tertulias donde arreglábamos el mundo, gracias por todo de verdad.

Tampoco puedo dejar de agradecer a mis sobrinos/sobrinas (Guille, Seba, Paloma, Coni, Alondris, Alonso, Tiago), los quiero mucho son los que te dan frescura y ese amor puro que recarga energías.

Menos tampoco puedo dejar de lado a mis amigos de Barcelona, Marlid, Ori, Borja, Ire, Mariana, el cariño y soporte constante durante estos años se siente y fuerte, de verdad muchas gracias, los quiero mucho también.

A mi segunda familia, los Aceituno Abarzúa, muchas gracias suegros (Eliana y Raúl) por esas largas conversas de sobremesa, también muy agradecido de mi cuñado/cuñada y concuñados/as, gracias por transmitirme siempre cariño y soporte, me adoptaron y mostraron desde otra perspectiva el amor de familia incondicional, los quiero mucho también.

No puedo dejar de estar muy agradecido de las mujeres que me permitieron entrar en la ciencia, gracias profe Mariel por permitirme entrar al laboratorio y darme la confianza para seguir en este camino, se le quiere mucho. Nerea, que decir, muchas gracias por darnos esta oportunidad de vida, estamos muy agradecidos de tu soporte en lo profesional y personal, siempre muy atenta y consciente del desafío de sacar los experimentos y el doctorado criando, de verdad muchas gracias por todo.

Terminando, no puedo dejar de agradecer a esos seres que te marcan. A mi abuela una mujer fuerte fuera de tiempo, revolucionaria y matriarca a su manera, marco mi ruta de vida y como enfrentarla, mucho de lo práctico y constante se lo debo a ella, tuve la fortuna de vivir con ella y recibir su amor incondicional, a ti donde estés.

A mi padre visionario, temple y sabio me supo guiar mostrándome con trabajo duro y con pocas, pero precisas palabras, que se puede conseguir lo que se desea, para ti donde éstes también va.

Al amor de madre infinito que no sabe que lo ha hecho todo bien, por ti estoy aquí Juanita, gracias por todo, eres la mejor, te quiero mucho.

Por último, a las mujeres de mi vida, sin ellas no hubiese sido nada de esto posible, muchas gracias Pati, soy muy afortunado de tenerte a mi lado, gracias por tu fuerza, soporte y amor incondicional, siempre en las buenas y en las malas, te amo mucho. A mi pequeña mujer Leito, su amor puro, abrazos y mimos son una fuente constante de energía y luz para mí, te amo hija.