



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Biotecnología

Molecular

**“Caracterización funcional de péptidos
antimicrobianos de NK-Lisina de *Salmo salar*”**

Tesis para optar al grado de Doctora en Biotecnología
Molecular

CRISLERI DAYAN CARRERA NAIPIL
CONCEPCIÓN-CHILE
2026

Profesor Guía: Dra. Jannel Acosta Alba
Profesor Co-Guía: Dra. Raquel Montesino
Departamento de Fisiopatología, Facultad
de Cs. Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. Jannel Acosta Alba
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Raquel Montesino
Profesor Co-Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Ariel Valenzuela
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Dra. Allison Astuya
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Dr. Alex Romero
Profesor Evaluador Externo
Universidad Austral Valdivia

Dr. Jorge Toledo
Director (S) Programa
Doctorado en Biotecnología Molecular

Presentación

Esta tesis de doctorado fue dirigida por la Dra. Jannel Acosta Alba en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Durante el periodo de permanencia en el Doctorado se realizaron las siguientes actividades y se generaron los siguientes productos:

Presentaciones a congresos nacionales e internacionales:

- **Carrera Crisleri**, Ortega Leonardo, Acosta Jannel **(2023)**. Evaluación de la función inmunomoduladora de péptidos de NK-lisina de *Salmo salar*. Expo Póster, Universidad de Concepción, 15 junio 2023, Concepción, Chile.
- **Carrera Crisleri**, Ortega Leonardo, Muñoz-Flores Carolina, Acosta Jannel **(2023)**. Caracterización de la función inmunomoduladora de péptidos antimicrobianos derivados de NK-lisina en *Salmo salar in vivo*. XLII Congreso de Ciencias del Mar, 22 al 26 de mayo de 2023, Puerto Montt, Chile.
- Ortega Rivas Leonardo, **Carrera Naipil Crisleri**, Muñoz-Flores Carolina, Stark Mendez M. Francisca, Acosta Jannel **(2023)**. Caracterización biológica de péptidos derivados de NK-lisina de *Salmo salar* con capacidad antimicrobiana contra patógenos en peces *in vitro*. XLII Congreso de Ciencias del Mar, 22 al 26 de mayo de 2023, Puerto Montt, Chile.

- Ortega Rivas, L., **Carrera Naipil**, C., Muñoz Flores, C., Acosta Alba, J. **(2022)**. INF- α I recombinante como adyuvante biológico para enfermedades virales en acuicultura. Argentina.

Publicaciones:

- **Crisleri Carrera**, MiltonF. Villegas, Carolina Muños Flores, Leonardo Ortega, Santiago Salazar, Ariel Valenzuela, Niza Agurto, Raquel Montesino, Alex Romero, Bastian Couso, Jorge Saavedra, Rafael Maura, Natalie Parra, Fátima Reyes, Alfredo Saavedra, Oliberto Sánchez, Jorge R. Toledo, Jannel Acosta. **(2025)** “Evaluating the adjuvant potential of NK-lysin and HMGB1-derived peptides in enhancing immune responses in *Salmo salar*”. Fish & Shellfish Immunology. DOI:10.1016/j.fsi.2025.110462.
- Vicente Arriagada, Alberto Osorio, **Crisleri Carrera-Naipil**, Carlos A. Villacis-Aguirre, Cristian Escobar, Nicolás Morales, Danthe Villa, Lien Mardones, Dafne Pérez, Macarena Jara, Raúl E. Molina, Ítalo Ferrari, Sebastián Azocar, Leonardo A. Gómez and Ángel A. Oñate. **(2025)** “In Silico Design and Characterization of a Multi-epitope Vaccine Candidate against *Brucella canis* using a Reverse Vaccinology Approach”. Journal of Immunology Research. DOI: 10.1155/jimr/6348238.
- Leonardo Ortega, **Crisleri Carrera**, Carolina Muñoz-Flores, Santiago Salazar,

Milton F. Villegas, María F. Starck, Ariel Valenzuela, Niza Agurto, Raquel Montesino, Allisson Astuya, Natalie Parra, Ercilia T. Pérez, Natacha Santibáñez, Alex Romero, Pamela Ruíz, Emilio Lamazares, Fátima Reyes, Oliberto Sánchez, Jorge R. Toledo and Jannel Acosta. **(2024)** New insight into the biological activity of *Salmo salar* NK-lysin antimicrobial peptides. *Frontiers in Immunology*. DOI: 10.3389/fimmu.2024.

- Antonio Casuso, Bárbara P Benavente, Yeny Leal, **Crisleri Carrera-Naipil**, Valentina Valenzuela-Muñoz, Cristian Gallardo-Escárate **(2024)**. Sex-Biased Transcription Expression of Vitellogenins Reveals Fusion Gene and MicroRNA Regulation in the Sea Louse *Caligus rogercresseyi*. *Marine Biotechnology Mar Biotechnol* (NY). DOI: 10.1007/s10126-024-10291-2

Becas

Durante la permanencia en el doctorado, la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) otorgó las siguientes becas:

- Beca ANID Folio 21220839 para Estudios de Doctorado en Chile, convocatoria 2022.
- Beneficio complementario Beca ANID Folio 24250611 para Gastos Operacionales del Proyecto de Tesis Doctoral. Febrero 2025.
- Beneficio complementario Beca ANID 23260150 Extensión para Redacción de Tesis Doctoral. Enero de 2026.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT REGULAR 120057.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta tesis doctoral. En primer lugar, agradezco profundamente a mi tutor de tesis Dra. Jannel Acosta, por su orientación, confianza, y su constante apoyo durante este proceso, así como por brindarme la oportunidad de crecer tanto en el ámbito científico como personal. Extiendo también mi gratitud a los académicos, investigadores, profesionales y compañeros del Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, por sus valiosos aportes, disposición y colaboración a lo largo de estos años. Agradezco especialmente a quienes compartieron conmigo el trabajo cotidiano en el laboratorio, las largas jornadas de experimentación, las dificultades, los aprendizajes y también las satisfacciones que acompañaron este camino.

A mi familia, mi esposo y mis hijos, y a todas las personas que estuvieron a mi lado durante esta etapa, les agradezco profundamente por su cariño, comprensión y apoyo incondicional.

A todos quienes, de una u otra manera, fueron parte de este camino, mi más profundo y sincero agradecimiento.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS.....	14
INDICE DE FIGURAS	15
RESUMEN	19
ABSTRACT	20
I. INTRODUCCION	21
Acuicultura en Chile	21
Vacunas en cultivo de salmones.....	22
SISTEMA INMUNE EN PECES	25
2.1 Órganos linfoides.....	25
2.3 Sistema inmune adaptativo	29
2.4 Respuesta inmune adaptativa humoral	30
2.5 Respuesta inmune adaptativa celular.....	31
2.6 Péptidos antimicrobianos (AMP).....	34
II. HIPÓTESIS	44
III. OBJETIVOS	45
Objetivo general	45
Objetivos específicos	45
IV. METODOLOGÍA	46
4.1 Mantenimiento de ejemplares de <i>S. salar</i>	46
4.2 Síntesis de péptidos.....	46
4.3 Extracción de RNA.....	47
4.4 Transcripción inversa.....	47
4.5 Estandarización de primers.....	48
4.6 Análisis de expresión constitutiva de genes de NK-lisina	49
4.7 Actividad fagocítica	51
4.8 Ensayo de respuesta inmune a PAMP en células SHK-1 estimuladas con LPS y Poli (I:C).....	52
4.9 Ensayo antimicrobiano.....	52
4.10 Actividad hemolítica de los péptidos derivados de NK-lisina.	53
4.11 Análisis de las propiedades fisicoquímicas	54
4.12 Aislamiento y cultivo de leucocitos de riñón anterior (HKL)	54

4.13 Citotoxicidad de NK-lisina en células de HKL y SHK-1.....	55
4.14 Ensayo <i>in vitro</i>	56
4.15 Ensayo <i>in vivo</i>	56
4.16 Real-time PCR para ensayos <i>in vitro e in vivo</i>	58
4.17 Antígeno recombinante	58
4.18 Formulación de la vacuna	59
4.19 Estimulación antigénica a leucocitos de riñón anterior de peces vacunados.	61
4.20 Detección de anticuerpos en sangre.....	62
4.21 Análisis estadísticos.....	63
V. RESULTADOS	65
5.1 Análisis de expresión constitutiva de genes de NK-lisina en diferentes tejidos de <i>S. salar</i>	65
5.2 Citotoxicidad de péptidos derivados de NK-lisina en leucocitos de riñón anterior y SHK-1.	66
5.3 Estimulación de la actividad fagocítica de leucocitos de riñón anterior con péptidos derivados de NK-lisina.....	67
5.4 Expresión de citocinas inducidas por péptidos derivados de NK-lisina en leucocitos de riñón anterior.	68
5.5 Los péptidos derivados de NK-lisina regulan la expresión de citocinas inducida por PAMP.	71
5.6 Actividad antibacteriana de los péptidos derivados de NK-lisina	74
5.7 Actividad hemolítica de los péptidos derivados de NK-lisina.	76
5.8 Análisis de las propiedades fisicoquímicas de péptidos derivados de NK-lisina	78
5.9 Perfil de expresión de citocinas en riñón anterior de <i>Salmo salar</i> inyectado con péptidos derivados de NK-lisina.....	79
5.10 Los péptidos inmunomoduladores de NK-lisina potencian la respuesta inmune humoral a VP2 en <i>Salmo salar</i>	82
5.11 Expresión de genes relacionados con la inmunidad en tejidos post-inmunización	84
5.12 Expresión de citocinas inducida por VP2 en leucocitos de riñón anterior de <i>Salmo salar</i> vacunados con VP2 en presencia de péptidos inmunomoduladores.	85
VI. DISCUSIÓN	89
VII. CONCLUSIONES	103
VIII. REFERENCIAS	105

INDICE DE TABLAS

Tabla I: Secuencias de primers utilizados para los análisis de RT-PCR.	50
Tabla II: Espectro antimicrobiano de péptidos sintéticos derivados de NK-Lisina.	76
Tabla III: Propiedades fisicoquímicas de péptidos derivados de NK-Lisina calculadas utilizando la base de datos de “Actividad antimicrobiana y estructura de péptidos” (https://dbaasp.org/home).	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Órganos inmunes en salmón Atlántico. A. Timo, B. Riñón anterior, C. Tronco riñón, D. Bazo, E. Branquias, órgano linfoide asociado a Inter branquial (ILT), F. Bursa, G. órgano olfatorio, asociado al tejido linfoide de la nasofaringe (NALT). Imagen de: Bjorgen & Olaf 2021 [1].....	27
Figura 2: Diferenciación de células T y participación de las citocinas en la regulación de la función inmunológica en peces teleósteos. Las células T CD4+ pueden diferenciarse en células Th1, Th2, Th17 y Treg. Las células Th1 pueden expresar T-bet, secretar IL-2 e IFN- γ y desempeñar un papel importante en la defensa frente a parásitos, virus y bacterias. Las células Th2 pueden expresar Gata3, secretar IL-4/IL-13A e IL-4/IL-13B y desempeñar un papel importante en la resistencia a la invasión por parásitos. Las células Th17 pueden secretar IL-17A/F y desempeñan un papel en la respuesta a parásitos y bacterias. En la respuesta inflamatoria, las células Treg pueden expresar Foxp3, secretar TGF- β e IL-10 y suprimir la respuesta inflamatoria. Imagen editada de Cao et al., 2023 [32].....	33
Figura 3: Estructura modelada de péptidos de NK-lisina de <i>S. salar</i> (SWISS-MODELserver). Se indica la región correspondiente a los péptidos derivados de NK-Lisina en color morado. También se indican las cisteínas implicadas en los enlaces disulfuro (Ortega et al., 2024).	43
Figura 4: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de los genes de NK-lisina 1,2,3,4,5 6. Se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas SsNK1, SsNK2, SsNK3, SsNK4, SsNK5 y SsNK6. Los recuadros resaltan regiones estructurales conservadas entre las secuencias: el péptido señal en el extremo N-terminal (recuadro rojo), el péptido derivado de NK-lisina (recuadro verde) y el dominio de saponina B (recuadro amarillo). El sombreado de los residuos indica el grado de conservación de las posiciones aminoacídicas entre las secuencias analizadas, mientras que los guiones representan posiciones introducidas para optimizar el alineamiento.....	43
Figura 5: Diseño experimental y esquema de muestreo para la evaluación de la respuesta de <i>Salmo salar</i> a la estimulación con los péptidos derivados de NK-lisina. Se muestran las dos etapas principales del experimento: (1) inyección, en la que los peces fueron administrados con 100 μ L de PBS (grupo control), SsSNK1 ₂₇ (grupo 2), SsSNK2 ₂₇ (grupo 3) y SsSNK4 ₂₇ (grupo 4), según el tratamiento experimental; y (2) muestreo, realizado a los 0, 1, 3, 7, 14 y 21 días post-estimulación. En cada punto temporal se obtuvieron muestras de riñón anterior para los análisis posteriores. El número de individuos analizados en cada punto temporal se indica como “n”.	57
Figura 6: Cronograma experimental y esquema de muestreo de los peces vacunados durante el ensayo de estimulación. Se representa la secuencia temporal del experimento, incluyendo el período de aclimatación, la administración de la primera dosis al día 0 (n= 25) y de la segunda dosis a los 21 días post-primera dosis (n= 20). Se realizaron extracciones de sangre en los días -3, 18, 35, 49 y 60, correspondientes a 3 días antes de la primera dosis y a los días 18, 35, 49 y 60 posteriores a la primera dosis, respectivamente (n= 15 por punto de muestreo). Adicionalmente, se realizaron extracciones de riñón y bazo a los 24 días (n= 5) y de riñón a los 60 días (n= 5). La escala superior indica el tiempo transcurrido desde la primera dosis en días, mientras que la	

escala inferior corresponde al tiempo experimental en unidades térmicas acumuladas (UTA).	61
Figura 7: Perfiles de expresión relativa de ARNm de SsNK-Lisina 1, 2 y 4 en nueve tejidos de salmón Atlántico no infectados. El gen EF-1 α se utilizó como normalizador y el estómago como calibrador. La expresión relativa se determinó según el modelo matemático de Paff [82]. Los datos se presentaron como media $\pm$ DE n=3 réplicas técnicas de un pool de 5 peces.	66
Figura 8: Efectos de péptidos derivados de NK-Lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇) sobre la viabilidad celular (ensayo MTT) en (A) leucocitos de riñón anterior y (B) SHK-1, luego de 24 y 48 horas de tratamiento a una concentración de 50 μ M. Los datos representan el promedio $\pm$ DE, n = 6.	67
Figura 9: Efectos sobre la actividad fagocítica de los leucocitos de riñón anterior (HKL) de S. salar estimulados con los péptidos derivados de NK-lisina. Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes realizados en triplicado. Los datos se analizaron mediante ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak (**p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).	68
Figura 10: Niveles de expresión relativa de ARNm de citoquinas antiinflamatorias en leucocitos de riñón anterior de salmón Atlántico estimulados con péptidos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇). El gen EF-1a se usó como normalizador y el grupo control se usó como calibrador. Los datos se representan como media $\pm$ DE (pool de 3 experimentos con 3 réplicas). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones se realizaron entre tratamientos en función del tiempo.	70
Figura 11: Niveles de expresión relativa de ARNm de citoquinas proinflamatorias de leucocitos de riñón anterior de salmón Atlántico estimulados con péptidos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇). El gen EF-1a se usó como normalizador y el grupo de control como calibrador. Los datos se representan como media $\pm$ DE (pool de 3 experimentos con 3 réplicas). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones se hicieron entre tratamientos en función del tiempo.	70
Figura 12: Niveles de expresión relativa de ARNm de genes de respuesta inmune en leucocitos de riñón de salmón Atlántico estimulados con péptidos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇). El gen EF-1a se usó como normalizador y el grupo de control como calibrador. Los datos se representan como media $\pm$ DE (pool de 3 experimentos con 3 réplicas). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones se realizaron entre tratamientos en función del tiempo.	71
Figura 13: Modulación de las respuestas inmunitarias inducidas por LPS mediante la coadministración de péptidos derivados de NK-lisina en SHK.1. (A) IL-1β, (B) IL-8, (C) TNF-α. Los datos se expresaron mediante la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes, cada uno analizado por triplicado, y mediante ANOVA seguido de una Prueba de comparaciones múltiples de Sidak (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).	73
Figura 14: Modulación de las respuestas inmunitarias inducidas por poli (I:C) mediante la coadministración de péptidos derivados de NK-lisina en SHK-1. (A) IFN-1α, (B) Mx. Los datos se expresaron mediante la media $\pm$ DE de tres experimentos	

independientes, cada uno analizado por triplicado, y mediante ANOVA seguido de una Prueba de comparaciones múltiples de Sidak (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).....	74
Figura 15: Viabilidad celular de <i>F. psychrophilum</i> en presencia de péptidos derivados de NK-lisina. (A) SsNK1₂₇, (B) SsNK2₂₇, (C) SsNK4₂₇. El porcentaje de viabilidad se definió con respecto a la viabilidad obtenida en bacterias sin incubación de péptidos de NK-lisina (100% de viabilidad).....	75
Figura 16: Viabilidad celular de <i>P. salmonis</i> en presencia de péptidos derivados de NK-lisina. (A) SsNK1₂₇, (B) SsNK2₂₇, (C) SsNK4₂₇. El porcentaje de viabilidad se definió con respecto a la viabilidad obtenida en bacterias sin incubación de péptidos de NK-lisina (100% de viabilidad).	76
Figura 17: Actividad hemolítica de los tres péptidos derivados de NK-Lisina (NK1 = SsNK1₂₇, NK2 = SsNK2₂₇ y NK4 = SsNK4₂₇) de <i>S. salar</i> contra eritrocitos de (A) peces y (B) humano. El porcentaje de hemólisis se definió con respecto a la hemólisis obtenida con la suspensión de eritrocitos tratada con SDS al 0,1% (100% de hemólisis).	77
Figura 18: Nivel de expresión relativa de genes de respuesta inmune en riñón anterior de salmón Atlántico a los 1, 3, 7, 14 y 21 días posteriores a la inyección intraperitoneal con péptidos derivados de NK-lisina (SsNK, 20 µg/pez).(A) SsNK1₂₇, (B) SsNK2₂₇, (C) SsNK4₂₇. Control: peces inyectados con PBS. Los datos se expresaron como media ± S.D. y se analizaron mediante ANOVA seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001) (n = 5). La prueba post hoc de Dunnett comparó las medias de los grupos experimentales con la del grupo control.....	81
Figura 19: Respuesta inmune humoral a formulaciones de vacunas con antígeno VP2 que contienen péptidos derivados de NK-lisina como adyuvantes moleculares. (A) Niveles de anticuerpos IgM específicos de VP2 en el suero de animales inmunizados a los días 1, 18, 35, 49 y 60 posteriores a la vacunación. (B) Título de anticuerpos IgM específicos del antígeno a los 35 días posteriores a la inmunización. *= P < 0,05; **= P < 0,01; *** = P < 0,001; **** = P < 0,0001 (ANOVA de dos vías, prueba de comparación múltiple de Tukey).....	83
Figura 20: Respuesta adaptativa en riñón anterior y bazo de <i>Salmo salar</i> inmunizados con el antígeno VP2 y con los péptidos inmunomoduladores SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇. Expresión relativa mediante RT-qPCR de interferón gamma, interleucina 17 e interleucina 4 en (A) riñón anterior y (B) bazo, 3 días después de la segunda inmunización. La cuantificación relativa se determinó utilizando al grupo PBS como control y la expresión del gen EF-1α como gen normalizador. (Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).	84
Figura 21: Respuesta adaptativa en HKL de <i>Salmo salar</i> inmunizados con el antígeno VP2 y los péptidos inmunomoduladores SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇. Se aislaron células HKL de animales inmunizados 60 días post vacunación se re-estimularon con el antígeno VP2. Expresión relativa mediante RT-qPCR de (A) IFN-γ, (B) IL-17, (C) IL-4/13A, a las 3 horas post estimulación con VP2. La cuantificación relativa se determinó utilizando el grupo PBS como control y la expresión del gen EF1α como gen normalizador. Los valores representan el cambio relativo normalizado con respecto a la estimulación con ConA, como se describe en Materiales y Métodos (por lo tanto, no se muestran los datos de ConA). * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001; **** = P <	

0,0001 (ANOVA bidireccional, prueba LSD de Fisher sin corrección).	87
Figura 22: Respuesta adaptativa en HKL de Salmo salar inmunizados con el antígeno VP2 y los péptidos inmunomoduladores SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇. Se aislaron células HKL de animales inmunizados 60 días post vacunación se re-estimularon con el antígeno VP2. Expresión relativa mediante RT-qPCR de (A) IFN- γ , (B) IL-17, (C) IL-4/13A, a las 12 horas post estimulación con VP2. La cuantificación relativa se determinó utilizando el grupo PBS como control y la expresión del gen EF1 α como gen normalizador. Los valores representan el cambio relativo normalizado con respecto a la estimulación con ConA, como se describe en Materiales y Métodos (por lo tanto, no se muestran los datos de ConA). * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001; **** = P < 0,0001 (ANOVA bidireccional, prueba LSD de Fisher sin corrección).	88

RESUMEN

El desarrollo de vacunas eficaces para la acuicultura es crucial para prevenir enfermedades infecciosas y mejorar la salud de los peces. En la salmonicultura, se utilizan comúnmente vacunas inactivadas y de subunidades; sin embargo, su inmunogenicidad suele ser limitada, por lo que requieren adyuvantes para aumentar su eficacia.

En este contexto, se identificaron y caracterizaron variantes adicionales de NK-lisina en *Salmo salar*, así como su distribución en tejidos inmunes como branquias, bazo y riñón cefálico, donde presentan alta expresión, lo que sugiere un papel relevante en la defensa inmunológica.

Los péptidos derivados de NK-lisina mostraron actividad antimicrobiana contra patógenos relevantes en acuicultura, como *Piscirickettsia salmonis* y *Flavobacterium psychrophilum*, además de actividad inmunomoduladora tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos péptidos regulan la expresión de citoquinas asociadas a respuestas inmunes innata y adaptativa, incluyendo perfiles Th1, Th2 y Th17.

Asimismo, pueden modular respuestas inducidas por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), potenciando la expresión de genes antivirales como IFN- γ y Mx frente a poli (I:C), y regulando la respuesta inflamatoria frente a LPS. También se ha observado un aumento en la actividad fagocítica de leucocitos del riñón cefálico, aunque con efectos variables según el péptido evaluado.

Debido a su baja toxicidad relativa y a su capacidad de modular la respuesta inmune, estos péptidos también han sido evaluados como adyuvantes vacunales. En formulaciones con el antígeno VP2 del virus IPNV, los péptidos SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ incrementaron la producción de IgM y potenciaron respuestas inmunes humorales y celulares, sugiriendo la activación coordinada de respuestas Th1, Th2 y Th17.

En conjunto, estos resultados indican que los péptidos derivados de NK-lisina no solo poseen actividad antimicrobiana directa, sino también un fuerte potencial inmunoestimulante y adyuvante, lo que los posiciona como candidatos prometedores para mejorar vacunas y el control de enfermedades en la acuicultura del salmón.

ABSTRACT

The development of effective vaccines for aquaculture is crucial to prevent infectious diseases and improve fish health. In salmon farming, inactivated and subunit vaccines are commonly used; however, their immunogenicity is often limited, requiring adjuvants to enhance their efficacy.

In this context, additional NK-lysin variants were identified and characterized in *Salmo salar*, as well as their distribution in immune tissues such as gills, spleen, and head kidney, where they show high expression levels, suggesting an important role in immune defense.

NK-lysin-derived peptides showed antimicrobial activity against relevant aquaculture pathogens, such as *Piscirickettsia salmonis* and *Flavobacterium psychrophilum*, as well as immunomodulatory activity both in vitro and in vivo. These peptides regulate the expression of cytokines associated with innate and adaptive immune responses, including Th1, Th2, and Th17 profiles.

Furthermore, they can modulate responses induced by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), enhancing the expression of antiviral genes such as IFN- γ and Mx in response to poly(I:C), and regulating inflammatory responses to LPS. An increase in the phagocytic activity of head kidney leukocytes has also been observed, although with variable effects depending on the peptide evaluated.

Due to their relatively low toxicity and their ability to modulate immune responses, these peptides have also been evaluated as vaccine adjuvants. In formulations containing the VP2 antigen of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), the peptides SsNK1₂₇ and SsNK4₂₇ increased IgM production and enhanced humoral and cellular immune responses, suggesting the coordinated activation of Th1, Th2, and Th17 responses.

Overall, these findings indicate that NK-lysin-derived peptides not only possess direct antimicrobial activity but also strong immunostimulatory and adjuvant potential, positioning them as promising candidates to improve vaccines and disease control in salmon aquaculture.

I. INTRODUCCION

Acuicultura en Chile

Chile es el segundo mayor productor mundial de salmón después de Noruega, convirtiéndose en una de las principales potencias de la acuicultura [2]. Durante el año 2024 se cosecharon 1.511.898,70 toneladas de salmónidos, siendo la principal especie de cultivo el salmón Atlántico (*Salmo salar*), abarcando un 72% de la producción del año 2024. Otras especies de interés comercial son salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) [3]. Uno de los principales problemas que presenta el cultivo del salmón Atlántico en Chile son las mortalidades que causan significativas pérdidas económicas. Una de las principales causas de mortalidad reportadas durante el año 2025 fue la infecciosa con un 8,4% de las mortalidades en cultivos en fase de agua dulce. Del total de mortalidad atribuida a causas infecciosas un 60,2% fue clasificada como Micosis y un 24,9% como Flavobacteriosis [4]. En fase agua de mar el 66% de los centros cultivaron salmón del Atlántico. Para los centros de cultivo en agua de mar, durante el año 2025 se asoció un 25,7% de mortalidad por causa infecciosa, de la cual un 52,8% fue clasificada como Piscirickettiosis (SRS) y un 31,5% como Tenacibaculosis [4].

Dado los antecedentes anteriores la salmonicultura se encuentra amenazada continuamente por la existencia de enfermedades infecciosas generando enormes pérdidas económicas en la acuicultura del salmón chileno [4]. Las enfermedades infecciosas provocan varios signos clínicos y una alta mortalidad de los peces, lo que

afecta la salud, las tasas de crecimiento y la reproducción, lo que sin duda conduce a una baja cosecha y fuertes pérdidas económicas. Hay varias formas generales de prevenir y tratar tales amenazas, como la prevención de infecciones mediante buenas prácticas de manejo, regímenes estrictos de higiene veterinaria, tratamiento de enfermedades mediante desinfección. Por otra parte, una de las soluciones que se ha implementado ha sido el uso de antibióticos, según el último reporte entregado por SERNAPESCA (enero-diciembre 2025), se utilizaron 415,4 toneladas de principio activo, del cual el 98,83% fue administrado en fase productiva (agua de mar), el principal antibiótico utilizado fue florfenicol (97,57%), para combatir Piscirekettsiosis (97,51%) [5]. El uso de antibióticos es una problemática, su uso inadecuado ha provocado la aparición de cepas bacterianas resistentes y daño ambiental [6], es por este motivo que se han reconocido a las vacunas como una alternativa segura, ecológica y eficiente para controlar las enfermedades infecciosas [7-9].

Vacunas en cultivo de salmones

La vacunación es el mejor método para prevenir enfermedades. Una vacuna es una preparación antigénica destinada a producir inmunidad frente a las enfermedades mediante la estimulación de la producción de anticuerpos y de células de memoria [9]. Una “vacuna ideal para peces” debería tener la capacidad de generar una respuesta inmune específica, protección y memoria. Existen varios métodos para el desarrollo y aplicación de vacunas. Las vacunas se pueden clasificar según el método de preparación como vacuna viva atenuada, vacuna inactivada o vacuna de subunidades.

Las vacunas inactivadas se elaboran a partir de virus y bacterias que se inactivan mediante métodos físicos o químicos. Son vacunas seguras ya que no conllevan el riesgo de mutar a su estado causante de la enfermedad. Induce principalmente inmunidad humoral y puede no inducir respuestas celulares ni de las mucosas [7, 9].

Las vacunas de subunidades no contienen componentes vivos; se basan en la administración de antígenos recombinantes, por lo que no hay riesgo de transmisión de enfermedades. Estas son incapaces de replicarse en el huésped y se consideran seguras. Sin embargo, suelen inducir una inmunidad protectora débil, ya que sus antígenos presentan baja inmunogenicidad. Es necesario el uso de adyuvantes y la aplicación de dosis de refuerzo [7, 9].

Las vacunas vivas atenuadas utilizan organismos patógenos atenuados, cuya virulencia ha sido reducida mediante procesos como pases seriados o modificación genética, manteniendo su antigenicidad. Estas vacunas pueden inducir una respuesta estable y duradera de la inmunidad humoral, celular y mucosal. Al ser autorreplicable, no requiere vacunación de refuerzo. Proporciona al huésped inmunidad protectora duradera. Se puede administrar fácilmente por vía oral o por inmersión. Sin embargo, conlleva el riesgo de recombinación entre diferentes cepas, lo que puede dar lugar a nuevas cepas. Tiene el riesgo de volver a una cepa virulenta que representa una grave amenaza para los animales no objetivo y el medio ambiente acuático [7, 9].

La mayoría de las vacunas inscritas en Chile son para combatir SRS, sin embargo, la baja eficiencia de estas vacunas sigue siendo un problema [10]. La baja protección que brindan las vacunas contra *P. salmonis* podría explicarse por diversos factores extrínsecos (bióticos, abióticos y relacionados con el manejo de los peces) e intrínsecos

(de los peces, del patógeno y relacionados con las vacunas) que pueden actuar de forma independiente o sinérgica [10].

Las vacunas generalmente no pueden conferir protección por sí solas; especialmente aquellas vacunas basadas en antígenos recombinantes o patógenos inactivados. Por lo tanto, a menudo es necesario el uso de adyuvantes o inmunoestimulantes para aumentar la eficacia de la vacuna. Los adyuvantes se han definido como un grupo de compuestos estructuralmente heterogéneos capaces de modular la inmunogenicidad intrínseca de un antígeno [11-13]. Se pueden clasificar según su naturaleza química o propiedades físicas, sin embargo, dado que incluso los compuestos relacionados pueden tener capacidades inmunomoduladoras muy diferentes, las nuevas clasificaciones se han centrado en los eventos inmunológicos que inducen.

Existen antecedentes de que algunos adyuvantes utilizados en las vacunas para peces, presentan efectos secundarios, por ejemplo, en adyuvantes en base a aceite se observan adherencias y reducción del crecimiento en peces inmunizados [11]. En el bacalao atlántico se ha observado peritonitis en sitios de inyección intraperitoneal con adyuvante incompleto de Freund [12]. También se ha observado lesiones intraperitoneales y granulomas en vacunas contra *Aeromonas salmonicida* en salmón Atlántico [13]. La búsqueda de moléculas alternativas o ciertas combinaciones de ellas como adyuvantes es deseable para aumentar el bienestar animal sin reducir los niveles de protección. Por otra parte, la gran falta de vacunas antivirales eficaces para peces también evidencia la importancia de identificar combinaciones óptimas de una estrategia de vacunación con el uso de un adyuvante que dirija la respuesta inmune hacia un tipo de respuesta celular mediada por linfocitos Th1 y linfocitos T citotóxicos.

La elección del adyuvante de la vacuna puede dirigir selectivamente la respuesta inmunitaria hacia respuestas de tipo 1 (Th1), caracterizadas por una mayor secreción de interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-2 e IL-12. Una respuesta de tipo Th1 ayudará a combatir los microbios intracelulares [14]. Por tanto, la identificación de nuevos adyuvantes que puedan mejorar y modular eficazmente la respuesta inmunitaria específica frente al antígeno es de gran importancia para el desarrollo exitoso de vacunas con aplicaciones tanto humanas como veterinarias [14, 15].

El desarrollo de vacunas eficaces debe abordarse combinando la búsqueda de antígenos protectores con la aplicación de adyuvantes específicos y dirigidos que maximicen la inmunogenicidad y favorezcan la respuesta inmune deseada. Estos adyuvantes específicos de vacunas pueden desencadenar procesos inmunológicos específicos sin provocar respuestas con efectos secundarios graves.

SISTEMA INMUNE EN PECES

2.1 Órganos linfoides

El sistema inmunológico de los peces consta de órganos linfoides primarios como el timo y el riñón anterior, y órganos linfoides secundarios, que comprenden el bazo, el tronco del riñón y los tejidos linfoides asociados a las mucosas (MALT) presentes en los tejidos inmunitarios periféricos (Fig. 1). Los MALT se pueden dividir en cuatro tejidos

linfoides principales: tejido linfoide asociado a la piel (SALT), tejido linfoide asociado a las branquias (GIALT), tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y tejido linfoide asociado al órgano olfativo (NALT) [16].

El timo es un órgano de diferenciación y selección de linfocitos T. Los linfocitos T maduran en el timo, donde presentan una alta tasa de mitosis, y migran a otros tejidos. En el timo se pueden observar dos tipos de linfocitos T, linfocitos T citotóxicos (CTL), y linfocitos T colaboradores (Th). Los CTL expresan CD8 e interactúan con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) mientras que los linfocitos Th expresan CD4 e interactúan con moléculas del MHC II [9, 17]. Los linfocitos T poseen receptores de células T (TCR) con los cuales reconocen péptidos presentados por el MHC [9].

El riñón anterior es el principal órgano hematopoyético, equivalente a la médula ósea en los mamíferos. El tronco del riñón, o mesonefro, también cumple funciones hematopoyéticas además de la función renal. Los macrófagos del riñón se agrupan formando centros melano-macrófagos (MMC), que contienen células germinales primordiales. El riñón anterior también actúa como órgano endocrino y secreta corticosteroides y otras hormonas que regulan la osmorregulación, el estrés y la respuesta inmune. El riñón anterior es el principal órgano linfoide productor de anticuerpos, contiene una gran cantidad de linfocitos B en diferentes etapas de desarrollo [9].

El bazo es el único órgano similar a un ganglio linfático y uno de los principales órganos linfoides secundarios. Consta de pulpa roja y blanca, vasos sanguíneos y elipsoides. Los centros germinales están ausentes en el bazo, pero el bazo posee MMC, donde los linfocitos B maduros son activados por antígenos, lo que da como resultado

el desarrollo de células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células de memoria [16]. El bazo contiene una gran cantidad de eritrocitos y linfocitos, tiene la capacidad de atrapar partículas en circulación. La estructura de la pulpa esplénica es similar a la del riñón anterior y, tras una estimulación antigénica, un gran número de linfocitos B secretan anticuerpos [16].

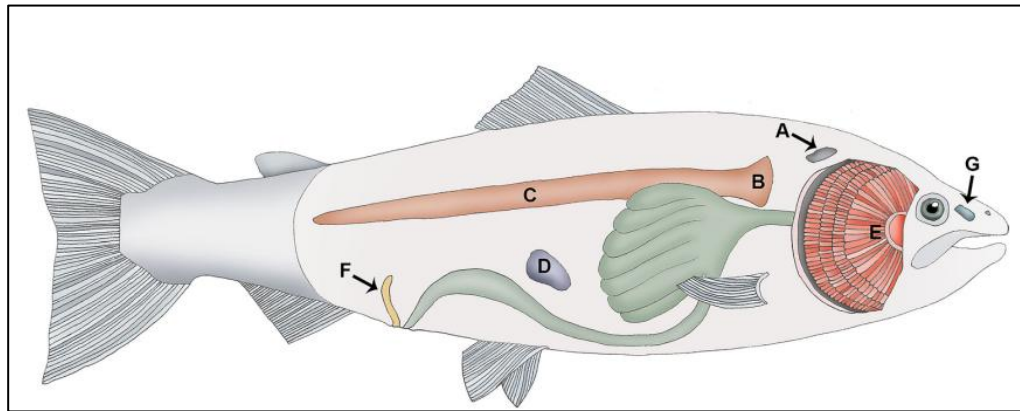


Figura 1: Órganos inmunes en salmón Atlántico. A. Timo, B. Riñón anterior, C. Tronco riñón, D. Bazo, E. Branquias, órgano linfoide asociado a Inter branquial (ILT), F. Bursa, G. órgano olfatorio, asociado al tejido linfoide de la nasofaringe (NALT). Imagen de: Bjorgen & Olaf 2021 [1].

2.2 Sistema inmune innato

El sistema inmune innato representa la primera línea de defensa contra los patógenos en los peces, que puede dividirse en barreras físicas, componentes celulares y respuestas humorales [18]. Dentro de las barreras físicas, las superficies epiteliales y la barrera mucosa de la piel, las branquias y el tubo digestivo actúan como barreras contra la invasión de patógenos en los peces [19]. Mientras que la epidermis y el epitelio branquial actúan principalmente como una interface con el ambiente externo, también proporcionan un sustrato para la actividad antimicrobiana. El mucus previene la

adherencia de patógenos debido a su continua producción y posterior desprendimiento [20]. Además, la mucosidad sirve como reservorio químico de una amplia variedad de componentes del sistema inmune innato, entre ellos lisozimas, lectinas, inmunoglobulinas, proteasas y péptidos antimicrobianos [20-22]. Por otra parte, existe una variedad de células involucradas en la respuesta innata, incluidas macrófagos, monocitos, células asesinas naturales (NK), células citotóxicas no específicas (NNC), granulocitos y neutrófilos [9]. Entre las funciones que destacan de este grupo de células se encuentran la fagocitosis, la actividad antimicrobiana, la quimiotaxis y la respuesta proinflamatoria o antiinflamatoria [17].

El sistema inmunitario innato depende en gran medida de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) [23, 24]. Estas proteínas son expresadas por células del sistema inmunitario y su función es el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados a daño (DAMP). Los PAMP bacterianos comunes incluyen lipopolisacárido (LPS), manosa, ADN/ARN bacteriano, flagelina, peptidoglucanos y ácidos lipoteicoicos [25]. Los cuatro tipos principales de PRR descritos en peces incluyen receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores de lectina tipo C (CLR) y proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRP), que pueden clasificarse según su función o su asociación con un ligando específico [23].

El sistema inmune innato humoral se compone de tres elementos principales: el sistema del complemento, las proteínas de fase aguda y los péptidos antimicrobianos. En los peces teleósteos, el sistema del complemento está formado por más de 35 proteínas, tanto circulantes como de superficie celular. Este sistema se activa por tres

vías: la alternativa, la clásica y la vía de las lectinas, que generan funciones como la opsonización y la lisis celular [26]. Los péptidos antimicrobianos (AMP) son los componentes más importantes de los mecanismos de defensa de las mucosas de los peces. Las principales clases de AMP presentes en peces son las piscidinas, defensinas, hepcidinas, catelicidinas, derivados de histonas [9] y NK-lisinas [27]. Las proteínas séricas de fase aguda (APPs), contribuyen a la defensa del huésped frente a infecciones [28].

2.3 Sistema inmune adaptativo

El sistema inmunológico de todos los vertebrados con mandíbula se compone de dos subsistemas principales: el inmunitario innato (no específico) y el adaptativo (específico). La inmunidad innata es la primera respuesta frente a los agentes infecciosos; sin embargo, no proporciona una protección duradera. El sistema inmunitario adaptativo se activa más tarde y responde a patógenos con especificidad y memoria. Los componentes principales de la respuesta inmune adaptativa en peces con mandíbula son los receptores de células T (TCR), el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), inmunoglobulinas (Igs) y el gen activador de la recombinación (RAG) [29].

2.4 Respuesta inmune adaptativa humoral

La inmunidad humoral adaptativa está mediada por las Igs, que tienen funciones como la neutralización de virus, la activación del complemento y la opsonización de patógenos. Las inmunoglobulinas, juegan un papel importante en la inmunidad de las mucosas [9]. Se han identificado tres tipos de Igs en peces; IgM, IgD e IgZ/T. IgM es la primera en identificarse y la más abundante en plasma; puede encontrarse como proteína de superficie o como anticuerpo secretado [30]. IgM puede activar el sistema del complemento, induce aglutinación, media la citotoxicidad celular, e induce la capacidad fagocítica en los macrófagos a través de la opsonización específica de antígeno [30]. La IgD se expresa en tejidos linfoides y mucosas, incluyendo la piel y las branquias, donde se cree que participa en la inmunidad mucosa, aunque sus funciones aún no están completamente dilucidadas. La IgT constituye la principal inmunoglobulina especializada en la inmunidad mucosal de los peces, particularmente en el intestino, la piel, las branquias y la cavidad nasal, desempeñando un papel funcional análogo al de la IgA de los mamíferos. A diferencia de los mamíferos, los peces teleósteos no realizan cambio de isotipo (class-switch recombination), por lo que los linfocitos B mantienen el isotipo con el que se desarrollan. Además, aunque presentan hipermutación somática, la maduración por afinidad de los anticuerpos es menos eficiente debido a la ausencia de centros germinales organizados [9, 31].

2.5 Respuesta inmune adaptativa celular

Los linfocitos T y B son células efectoras inmunitarias que desempeñan funciones críticas en la inmunidad adaptativa, la cual se asocia con la expresión de citocinas, quimiocinas, interferones, interleucinas, linfoquinas y factores de necrosis tumoral como respuesta a la invasión de un patógeno [32]. Los antígenos de grupos de diferenciación (CD) son moléculas de superficie celular expresadas en leucocitos y otras células del sistema inmune. En peces, las moléculas CD3 y TCR (T cell receptor) coexisten en células T, formando una estructura básica para el reconocimiento específico de antígenos por medio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y la transmisión de señales para la activación celular. Los linfocitos T se pueden dividir en T auxiliares (Th) y células T citotóxicas (CTL), que se distinguen por la expresión de las glicoproteínas CD4 y CD8, respectivamente [33]. Las células CD4⁺ interactúan con el MHC II y las células citotóxicas que expresan moléculas de CD8 interactúan con el MHC I [32].

Las células T CD4⁺ en peces pueden diferenciarse en células Th1, Th2, Th17 y Treg, con la participación de citocinas en la regulación de la función inmunológica [33]. Las células Th1 pueden expresar el factor de transcripción Tbet, secretar interleucina-2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ) y desempeñan un papel importante en la defensa frente a parásitos, virus y bacterias intracelulares. Las células Th2 pueden expresar el factor de transcripción asociado al gen 3 (Gata3), secretar interleucina 4/13A (IL-4/13A) y desempeñar un papel en la resistencia a la invasión de parásitos. Las células Th17 pueden secretar interleucina 17 (IL-17A/F) y desempeñan un papel en la respuesta

frente a parásitos y bacterias extracelulares. En respuesta inflamatoria, las células Treg pueden expresar el factor de transcripción forkhead 3 (Foxp3), secretar el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e interleucina 10 (IL-10), y suprimir la respuesta inflamatoria [31, 33] (Fig. 2).

Los interferones (IFN) son un grupo de citocinas con funciones importantes en la defensa contra los virus. En la respuesta inmune innata, el IFN- γ es producido por células asesinas naturales (NK) estimuladas con IL-12 y/o IL-18, así como por fagocitos mononucleares y otras APC infectadas por patógenos. Durante las respuestas inmunes adaptativas, el IFN- γ es producido por las células Th1 CD4⁺ y los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ [30, 34]. Dentro de las citocinas que participan en la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ encontramos a interleucina 4 (IL-4). IL-4 en mamíferos es una citocina característica del subgrupo Th2; actúa como citocina inductora y efectora. IL-4, junto con la interleucina 13 (IL-13), contribuye a una forma alternativa de activación del macrófago, distinta de la respuesta al IFN- γ [35-37]. En peces se han encontrado genes similares a IL-4 con alta similitud con IL-13; por este motivo, en peces se les denomina IL-4/13A e IL-4/13B [34]. Por otra parte, IL-22 estimula la secreción de quimiocinas que reclutan neutrófilos y macrófagos hacia los sitios de inflamación [38]. Entre las principales citocinas proinflamatorias se encuentran la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF). IL-1 β es producida principalmente por fagocitos mononucleares activados, neutrófilos, células epiteliales y endoteliales [39]. TNF- α mejora la actividad fagocítica de los leucocitos de peces, promueve la supervivencia de los macrófagos y también restringe el crecimiento bacteriano en macrófagos infectados. TNF- α también promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [38]. Entre las

citocinas con función regulatoria se encuentran la interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). IL-10 es una citocina antiinflamatoria que suprime las respuestas inmunitarias [38]. En los peces, es crucial para la homeostasis branquial [30]. En peces, TGF- β 1 actúa como una molécula que induce la diferenciación de Th17 en combinación con otras citoquinas (como IL-6), pero también es una citoquina inmunosupresora clave secretada por las células Treg [38]. Interleucina 18 (IL-18) es una citocina importante que inicialmente induce la producción de IFN- γ y promueve la inmunidad de tipo Th1, pertenece a la familia de las IL-1 y juega un papel importante en la regulación de la inflamación en los tejidos de la mucosa como la piel y el intestino [38].

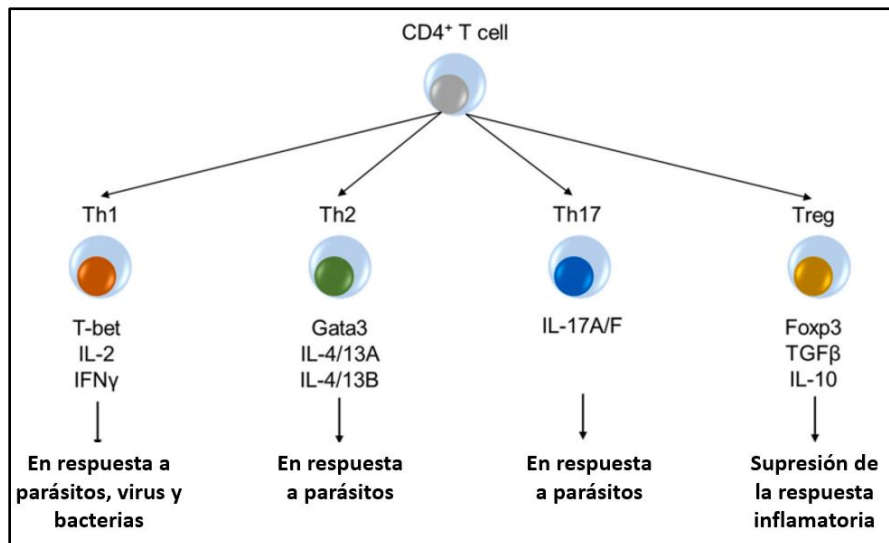


Figura 2: Diferenciación de células T y participación de las citocinas en la regulación de la función inmunológica en peces teleósteos. Las células T CD4+ pueden diferenciarse en células Th1, Th2, Th17 y Treg. Las células Th1 pueden expresar T-bet, secretar IL-2 e IFN- γ y desempeñar un papel importante en la defensa frente a parásitos, virus y bacterias. Las células Th2 pueden expresar Gata3, secretar IL-4/IL-13A e IL-4/IL-13B y desempeñar un papel importante en la resistencia a la invasión por parásitos. Las células Th17 pueden secretar IL-17A/F y desempeñan un papel en la respuesta a parásitos y bacterias. En la respuesta inflamatoria, las células Treg pueden expresar Foxp3, secretar TGF- β e IL-10 y suprimir la respuesta inflamatoria. Imagen editada de Cao et al., 2023 [32].

2.6 Péptidos antimicrobianos (AMP)

Los AMP son péptidos anfipáticos que desempeñan un papel importante en la defensa innata [40-42]. Se han aislado de una amplia variedad de organismos, incluidos insectos [43], anfibios [44], mamíferos [45], bacterias [46] y peces [42]. Se definen comúnmente como aquellos que tienen entre 12 y 50 aminoácidos, de los cuales el 50 % o más son hidrofóbicos y catiónicos [41]. Estos péptidos están codificados por genes y se expresan constitutivamente y/o se regulan positivamente durante una infección. Además, la regulación transcripcional de los AMP suele ser específica de la especie y depende del tipo de célula [47, 48]. Los péptidos antimicrobianos se pueden clasificar según su estructura secundaria y su composición, como lineales, α -helicoidales, enriquecidos en uno o dos aminoácidos, los que contienen cisteínas y forman puentes disulfuro, y los que provienen de fragmentos de otras proteínas más grandes con actividad antibacteriana [47-49]. Si bien existe homología entre la clasificación estructural de los AMP, los péptidos exhiben una alta variabilidad entre las secuencias, lo que a menudo se asocia con los roles multifuncionales de estos péptidos, así como con la variedad de patógenos altamente específicos que encuentra en cada huésped [50]. Los modos de acción antimicrobiana incluyen; modelo de barril, modelo poro toroidal, modelo de capa lipídica o alfombra [51]. Estos modelos se basan en la carga positiva de los AMP y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de las paredes, ya sea por los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en las bacterias Gram positivas o los lipopolisacáridos en las Gram negativas [52]. También se ha reportado que algunos AMP no tienen una función directa sobre la membrana y son capaces de traspasarlas, acumularse internamente y

unirse al ADN mediante motivos de unión relacionados con las histonas [53], e incluso mediante la unión a enzimas como la topoisomerasa I y la ARN polimerasa [54]. Los AMP también tienen la capacidad de modular la respuesta inmune frente a patógenos, mejorando la fagocitosis, induciendo quimiocinas, modulando la expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, promoviendo la diferenciación de células dendríticas y mejorando el reclutamiento de monocitos, mastocitos y macrófagos [55].

Dadas las múltiples funciones de los AMP, identificar las vías de señalización de los AMP de teleósteos será de gran interés para que la comunidad científica comprenda los mecanismos mediante los cuales estos péptidos modulan la respuesta inmune en peces.

2.6.1 Péptidos antimicrobianos de NK-Lisina

NK-lisina es un tipo de granulicina que se aisló por primera vez del intestino delgado de cerdo como efector peptídico de las células CTL y NK, con propiedades antimicrobianas [56]. Está presente en las células CD8+, CD2+ y CD4+, y es producido por las células CTL y NK después de una sobreestimulación con interleucina 2 [56]. Estos péptidos tienen 74-78 residuos de aminoácidos y contienen seis residuos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro. Tienen una estructura globular tridimensional. La NK-lisina porcina exhibe una potente actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Bacillus megaterium*, y una actividad moderada contra *Acinetobacter calcoaceticus* y *Streptococcus pyogenes*. El péptido también es lítico contra varios tipos de células tumorales, pero no es lítico para los eritrocitos [56]. NK-lisina se une al LPS de varias

especies bacterianas a través de la interacción con la parte lipídica del LPS, y esta unión inhibe la unión del LPS a los granulocitos de ratón y los efectos producidos por el LPS en las células de la médula ósea del ratón [57]. Algunos investigadores estudiaron si los péptidos derivados de NK-lisina de pollo modulan la respuesta inmunitaria en la línea celular de macrófagos de pollo HD11 y en cultivo primario de monocitos de pollo mediante la evaluación de la inducción de quimiocinas, las propiedades antiinflamatorias y la activación de las vías de señalización. cNK-2 indujo la expresión de CCL4, CCL5 e IL-1 β en células HD11 y CCL4 y CCL5 en cultivo primario monocitos. Además, cNK-2 suprime la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacárido al anular la expresión de IL-1 β . La actividad inmunomoduladora de cNK-2 involucra la vía de señalización mediada por proteínas quinasas activadas por mitógeno, que incluye p38, MEK1/2 y quinasas N-terminales c-Jun [58]. Estos resultados posicionaron a cNK-2 como un nuevo agente inmunomodulador potencial en lugar de un agente antimicrobiano.

2.6.2 Péptidos antimicrobianos de NK-lisina en peces

En teleósteos, se ha identificado NK-lisina en *Ictalurus punctatus* [59], *Paralichthys olivaceus* [60], *Cynoglossus semilaevis* [61], *Salmo salar* [27], *Larimichthys crocea* [62], *Danio rerio* [63], *Cyprinus carpio* [64], *Oreochromis niloticus* [65, 66], *Oncorhynchus mykiss* [67], *Trachinotus ovatus* [68], *Pangasianodon hypophthalmus* [69], entre otros. En humanos, cerdos y caballos se ha reportado un único gen para NK-lisina, sin embargo, en peces se ha reportado una triplicación/cuadruplicación de genes para NK-lisina [63, 64, 71, 72]. Los péptidos NK-lisina descritos en peces tienen 120-150 residuos

de aminoácidos, cada gen está compuesto por 3-4 intrones, una región 3'UTR y 5'UTR, con marco de lectura que presenta un péptido señal, dominio Saponina B y una señal de poliadenilación, además de 6 cisteínas altamente conservadas [63, 64, 67]. Los genes están ubicados en diferentes cromosomas como por ejemplo en *Oncorhynchus mykiss*, tiene 6 genes para NK-lisina distribuidos en los cromosomas 25 y 19 [67]. Un estudio en salmón atlántico demostró que NK-Lisina se encuentra secretada en el mucus asociando su función con una actividad bacteriostática [73]. Además, de manera constitutiva, los genes de NK-Lisina se expresan principalmente en tejidos asociados a órganos linfoides de la respuesta inmune en peces, como bazo, branquias y riñón anterior [66, 72, 74], y también se ha observado una modulación de la expresión génica de estos genes frente a un estímulo o patógeno [66, 72, 74, 75].

Por otra parte, existen antecedentes de la función antibacteriana e inmunomoduladora de un péptido derivado de NK-lisina, de 27-29 aminoácidos, que está compuesto por las α -hélices H2 y H3 del dominio Saponina B [27, 68, 76-78]. Un péptido derivado de NK-lisina de *Hemibarbus labeo* mostró actividad antibacteriana contra *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *Listeria monocytogenes* [79], además de presentar protección de los peces después de una infección con *A. hydrophila*, aumentando la expresión relativa de IL-1 β y TNF- α en riñón anterior y bazo [79]. Por otra parte, péptidos derivados de NK-lisina de *Oreochromis niloticus* inhiben el crecimiento bacteriano de *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Aeromonas hydrophila*, además de mejorar la función fagocítica de monocitos/macrófagos y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, se observó una sobreexpresión de IL-12, IFN- γ , TLR9, Myd88 y JAK1, y una disminución de la expresión de IL-10 y TGF- β en

monocitos/macrófagos tratados con péptidos derivados de NK-lisina [66]. También se ha observado en *Carassius cuvieri* y *Carassius auratus*, después de una infección con *A. hydrophila*, una sobreexpresión de NK-lisina en hígado, riñón anterior y bazo. Además, 5 días post-inyección de NK-lisina en los peces se observó una sobreexpresión de IL-1 β y TNF- α [74]. Un estudio con un péptido de 27 aminoácidos derivados del péptido de NK-lisina de *Paralichthys olivaceus* mostró actividad antimicrobiana contra varias bacterias Gramnegativas [60]. Además, se demostró que después de la exposición a *Edwardsiella ictaluri*, la expresión de NK-lisina de *Ictalurus punctatus* se redujo inicialmente a las 4 h después del desafío, pero se detectó una expresión elevada de NK-lisina 3 días después del desafío y continuó aumentando hasta 7 días post-desafío [59]. Otro estudio demostró que la expresión de NK-lisina en *Cynoglossus semilaevis* ocurre en múltiples tejidos y aumenta con infecciones bacterianas y virales, de manera dependiente del tiempo [61]. Estos estudios de expresión sugieren una implicación de NK-lisina en la respuesta inmune del huésped frente a infecciones bacterianas y virales. Por otra parte, cuando se sobreexpresa NK-lisina en *Cynoglossus semilaevis*, se observa una sobreexpresión de IL-1 e IL-8 en el bazo y el riñón anterior, lo que sugiere una activación de la respuesta proinflamatoria [61]. Además de IL-1 e IL-8, la expresión de CsCXCe1 y CD28 también aumentó significativamente. CsCXCe1 es una quimioquina que promueve la migración de linfocitos y estimula la respuesta inmune innata frente a la infección bacteriana, mientras que CD28 es un receptor de B7-1/B7-2 en las células presentadoras de antígenos y es esencial para la activación de las células T [61]. El aumento de la expresión de estos genes sugiere la posible activación de los linfocitos T. Además, las cargas de patógenos tras infecciones bacterianas y virales en tejidos de peces que sobre

expresaban NK-lisina fueron significativamente más bajas que en los peces del grupo control [61]. Además, NKLP27, derivado de la NK-lisina de *Cynoglossus semilaevis* y compuesto por 27 aminoácidos, posee actividad bactericida frente a bacterias Gramnegativas y Grampositivas, incluidos los patógenos acuícolas comunes. Durante su interacción con las células bacterianas objetivo, NKLP27 destruyó la integridad de la membrana celular, penetró en el citoplasma e indujo la degradación del ADN genómico. El estudio *in vivo* mostró que la administración de *Cynoglossus semilaevis* con NKLP27 antes de la infección bacteriana y viral redujo significativamente la diseminación y la replicación de patógenos en los tejidos. Un estudio adicional reveló que los peces a los que se les administró NKLP27 presentaron una expresión significativamente mayor de genes inmunitarios, incluidos aquellos conocidos por estar involucrados en la defensa antibacteriana y antiviral. Estos resultados indican que NKLP27 es un nuevo antimicrobiano frente a patógenos bacterianos y virales [80]. Un estudio identificó un gen de NK-lisina, llamado Lc-NK-lisina, en *Larimichthys crocea*, que puede estar implicado en la respuesta inmunitaria de los peces, ya que su expresión génica aumentó significativamente durante una infección por parásitos y bacterias. Se sintetizaron dos tipos de péptidos derivados del péptido maduro Lc-NK-Lisina, que mostraron actividad bactericida frente a diversas bacterias patógenas de peces [62]. Estudios recientes en tilapia y carpa común también demostraron el importante papel de las NK-lisina frente a bacterias [64, 65].

2.6.3 NK-Lisina de *Salmo salar*

En Chile, el salmón Atlántico es la principal especie producida, seguido del salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) [3]. El segmento salmonero chileno se ha posicionado como el segundo mayor productor a nivel mundial. Sin embargo, la principal limitación para la acuicultura son las enfermedades infecciosas [4]. Es por esta razón que el *Salmo salar* será el modelo de estudio en este trabajo.

Se han descrito 4 péptidos similares a la NK-lisina de *Salmo salar* identificados desde la base de datos EST [27, 81]. Las cuatro transcripciones identificadas se denominaron SsNK-lisina-1 (GenBank: NM_001141110.1), Ss-NK-lisina-2 (GenBank: XM_014139176.2), SsNK-lisina-3 (GenBank: EG810337.1) y SsNK-lisina-4 (GenBank: XM_014210204.2). El ORF de SsNK-lisina 1 consta de 384 pb y codifica una proteína de 127 residuos de aminoácidos, con un peso molecular teórico de 12041,04 Da y un punto isoeléctrico (pI) de 6,76. El ORF de SsNK-lisina-2 consta de 390 pb y codifica una proteína de 129 residuos de aminoácidos, con una masa molecular teórica de 12200,33 Da y un Pi de 8,67. El ORF de Ss-NK-lisina-3 consta de 390 pb y codifica una proteína de 129 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 12208,42 Da y un pI de 9,10. El ORF de SsNK-lisina-4 consta de 411 pb y codifica una proteína de 136 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 12992,35 Da y su punto isoeléctrico es de 8,18. Los primeros 22 aminoácidos en cada secuencia corresponden a un péptido señal, además de un dominio asociado al dominio tensioactivo de la proteína B (saposina B) que se encuentra entre los aa 44–117 en SsNK-lisina 1, aa 47–119 en SsNK-lisina 2, aa 47–119 para SsNK-lisina 3 y aa 54–116 para SsNK-lisina 4 [27]. Por otra parte, *in vitro*,

los péptidos cortos derivados de NK-lisina fueron capaces de inducir la expresión de IL-1 β e IL-8 en leucocitos de riñón anterior de *Salmo salar*. Estos resultados indican que los péptidos derivados de NK-lisina son capaces de modular la respuesta inmune, lo que sugiere su potencial uso como inmunomodulador en peces [27]. Por otra parte, recientemente se publicaron 2 nuevos genes denominados; SsNK-lisina-5 (GenBank: XM_014125754.1) y Ss-NK-lisina-6 (GenBank: XM_014129907.1) [81]. Los alineamientos múltiples revelaron seis residuos de cisteína en los dos péptidos maduros de SsNK-lisina aquí descritos, altamente conservados entre las especies de peces. Sin embargo, todas las NK-lisinas de *S. salar* contienen al menos un residuo adicional de cisteína, conservado entre ellas. SsNK-lisina-1 y SsNK-lisina-6 comparten ocho residuos de cisteína en el péptido maduro, y SsNK-lisina-5 posee ocho residuos de cisteína, uno de los cuales no se conserva entre las secuencias de NK-lisina de *S. salar*. El marco abierto de lectura (ORF) de la SsNK-lisina-5 tiene 402 pb y codifica una proteína de 133 residuos de aminoácidos. Contiene un péptido señal N-terminal (1-22 aa) y un dominio SapB (49-123 aa). La masa molecular teórica de la SsNK-lisina-5 es de 12578,83 Da y el punto isoeléctrico (pI) es de 8,14. El ORF de la SsNK-lisina-6 tiene 402 pb y codifica una proteína de 133 residuos de aminoácidos. Contiene un péptido señal N-terminal (1-22 aa) y un dominio SapB (49-123 aa). La masa molecular teórica de la SsNK-lisina-6 madura es de 12615,85 Da y el pI es de 8,14 (Fig. 3).

Dado que la longitud de los NK-lisina dificulta su obtención por síntesis química, se han diseñado y estudiado péptidos cortos derivados de estas moléculas. Se ha demostrado que estos péptidos poseen actividades inmunomoduladoras y antimicrobianas. Anteriormente diseñamos y sintetizamos dos pequeños péptidos, SsNK1₂₇ y SsNK2₂₇, derivados de SsNK-lisina 1 y SsNK-lisina 2, basándonos en alineamientos entre secuencias de NK-lisina identificadas en *S. salar* y NKLP27, un péptido derivado de la NK-lisina de *Cynoglossus semilaevis* [61]. SsNK1₂₇ y SsNK2₂₇ se componen de 27 residuos que forman las α -hélices H2 y H3 del dominio SapB de SsNK-lisina-1 y SsNK-lisina-2, respectivamente [27]. Los péptidos SsNK3₂₇, SsNK4₂₇, SsNK5₂₇ y SsNK6₂₇ derivados de los genes SsNK-lisina-3, 4, 5 y 6 se diseñaron a partir de la alineación de secuencias entre secuencias de NK-lisina identificadas en *S. salar*. El péptido derivado SsNK3₂₇ resultó idéntico en un 96% a SsNK2₂₇, mientras que el péptido SsNK5₂₇ y SsNK6₂₇ fueron idénticos a SsNK1₂₇ (Fig. 4). Por lo tanto, caracterizamos tres péptidos derivados de la NK-lisina, denominados SsNK-1₂₇, SsNK-2₂₇ y SsNK-4₂₇ para el desarrollo de la presente tesis.

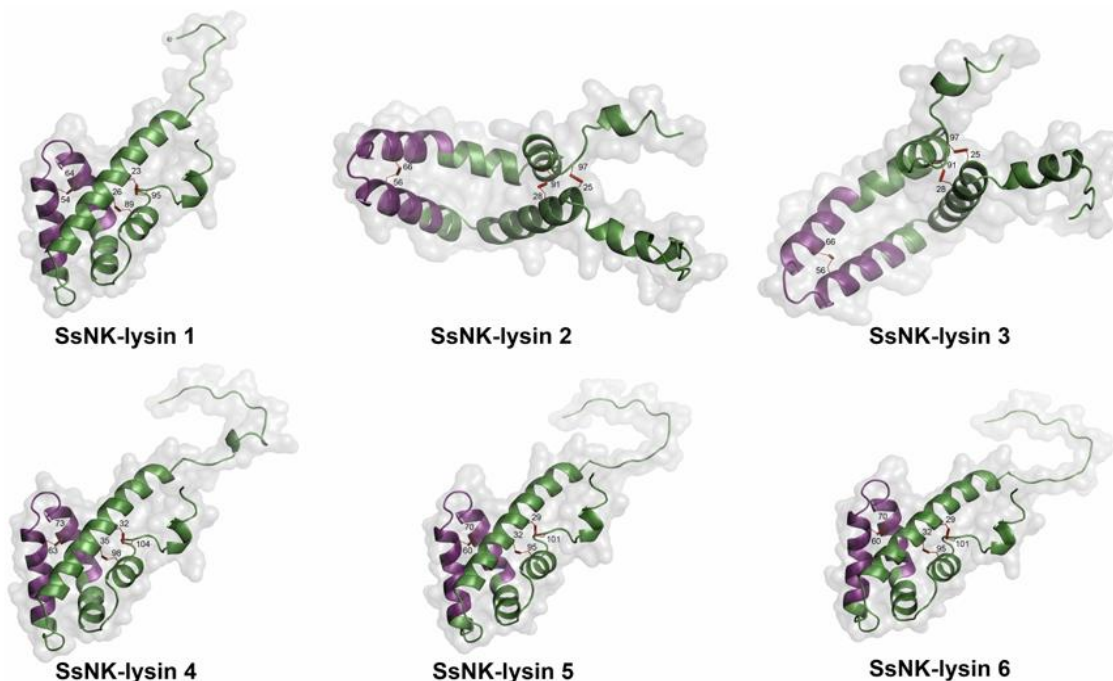


Figura 3: Estructura modelada de péptidos de NK-lisina de *S. salar* (SWISS-MODELserver). Se indica la región correspondiente a los péptidos derivados de NK-Lisina en color morado. También se indican las cisteínas implicadas en los enlaces disulfuro (Ortega et al., 2024).

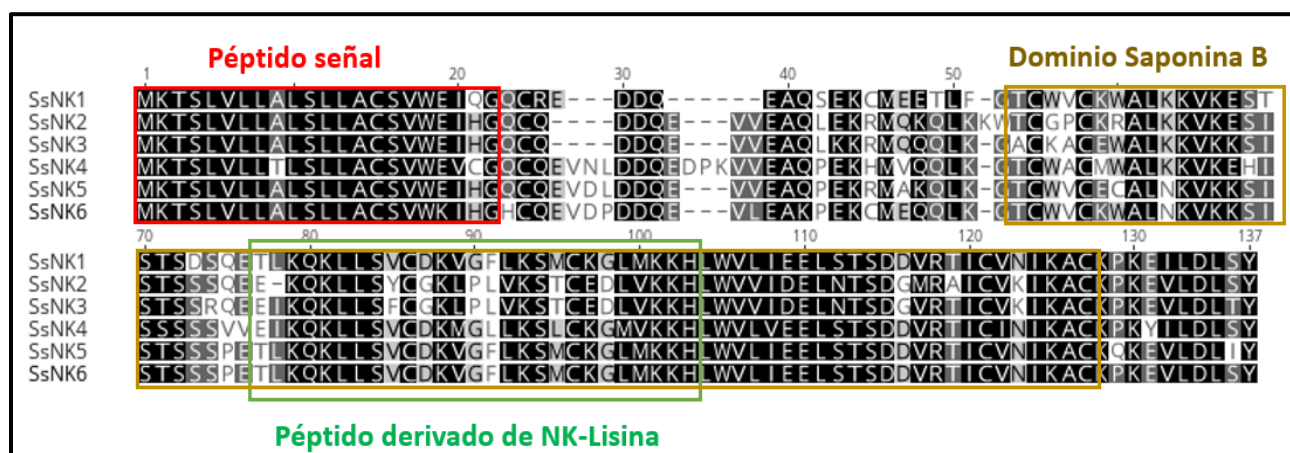


Figura 4: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de los genes de NK-lisina 1,2,3,4,5 6. Se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas SsNK1, SsNK2, SsNK3, SsNK4, SsNK5 y SsNK6. Los recuadros resaltan regiones estructurales conservadas entre las secuencias: el péptido señal en el extremo N-terminal (recuadro rojo), el péptido derivado de NK-lisina (recuadro verde) y el dominio de saponina B (recuadro amarillo). El sombreado de los residuos indica el grado de conservación de las posiciones aminoacídicas entre las secuencias analizadas, mientras que los guiones representan posiciones introducidas para optimizar el alineamiento

II. HIPÓTESIS

"Los péptidos derivados de las NK-lisinas de *Salmo salar* presentan actividad antimicrobiana frente a patógenos bacterianos de relevancia en la salmonicultura y modulan la respuesta inmune innata y adaptativa de *Salmo salar*, potenciando la respuesta frente a un antígeno vacunal, lo que les otorgaría potencial de uso como inmunomoduladores y como adyuvantes moleculares en la salmonicultura."

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el potencial de los péptidos derivados de las NK-lisinas de *Salmo salar* como inmunomoduladores y como adyuvantes moleculares en salmónidos, mediante la caracterización de su actividad antimicrobiana y de su efecto sobre la respuesta inmune innata y adaptativa frente a un antígeno vacunal.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1. Analizar *in vitro* la capacidad inmunomoduladora de péptidos derivados de NK-lisina de *S. salar* en la modulación de la respuesta inmune.

Objetivo específico 2. Evaluar la actividad antimicrobiana de péptidos derivados de NK-lisinas de *S. salar* frente a microorganismos patógenos.

Objetivo específico 3. Determinar *in vivo* las acciones inmunomoduladoras de péptidos de NK-lisina de *S. salar* y su potencial uso como adyuvantes moleculares en vacunas de subunidades.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Mantenimiento de ejemplares de *S. salar*

Los peces donados por la piscicultura de Rauco MOWI, fueron mantenidos en las dependencias del laboratorio de Piscicultura y patología acuática del departamento de oceanografía de la Universidad de Concepción (código 80126). Los peces fueron mantenidos en tanques de 0,4 m³ en agua dulce, con aireación y alimentación a saciedad (dieta comercial Micro, EWOS). Los peces se aclimataron durante 2 semanas antes de cada ensayo experimental. Los ejemplares se mantuvieron bajo un ciclo luz: oscuridad de 12:12 horas.

El estudio con animales fue aprobado por el Comité de ética y bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepcion CEBU 6973-2020. El manejo de residuos se realizó según los reglamentos de la Universidad de Concepcion a través de MATPEL, respetando las cláusulas del Manual de Normas de Bioseguridad editado por CONICYT en 2008.

4.2 Síntesis de péptidos

Los péptidos derivados de NK-lisina de *S. salar*; SsNK1₂₇ (TLKQKLLSVCDKVGFLKSMCKGLMKKH), SsNK2₂₇ (EIKQKLLSYCGKLPLVKSTCEDLVKKH) y SsNK4₂₇ (EIKQKLLSVCDKMGLLKS LCKGMVKKH) se diseñaron mediante el análisis del

alineamiento de secuencias de péptidos derivados de NK-lisina (Sección 2.63). Los péptidos fueron enviados a sintetizar a la empresa Genscript (<https://www.genscript.com>). Estos péptidos son más cortos compuestos por 27 residuos que forman las α -hélices H2 y H3 del dominio SapB de péptidos de NK-lisina de *S. salar*. Los péptidos fueron resuspendidos en DMSO a una concentración de 4 mg/ml y almacenados a -20°C.

4.3 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación del RNA fue realizada por medio de un equipo Synergy HTX microplate reader (BioTek Instruments, USA). La concentración y pureza de las muestras de ARN se evaluaron por espectrofotometría. En el caso del ARN, la relación de absorbancias A260/280 con un valor entre 1.8 y 2.0 se consideró indicativa de un ARN de pureza óptima. Por otra parte, la integridad del ARN fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE; aquellas muestras que presentaban las bandas resultantes del ARN ribosómico (ARNr) fueron consideradas de buena calidad para los futuros análisis de qPCR.

4.4 Transcripción inversa

Las muestras fueron tratadas con ADNasa I #M0303 (New England BioLabs), utilizando 2 μ g de ARN en un volumen final de 11 μ L, según protocolos del fabricante.

La reacción contenía 1 µL de Buffer 10X con MgCl₂, 0,5 µL de DNase I (1 U), 0,5 µL de Ribolock, agua de grado biología molecular hasta completar 11 µL. Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 10 minutos. Para la inactivación de la enzima, se añadió 1 µL de 50 mM EDTA y se incubó por 10 minutos a 75 °C.

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific), utilizando como plantilla de ARN todo el volumen de las muestras tratadas con ADNasa (11 µL). A las muestras se les añadió; 1 µL Random primer hexamer, 4 µL Buffer 5X, 2 µL dNTPs (10 mM), 1 µL Ribolock RNase Inhibitor (20 U/µL), 1 µL RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL); volumen final de reacción: 20 µL. Las reacciones se incubaron en el Termociclador Básico Professional (Biometra) a 25 °C durante 5 minutos, luego a 42 °C durante 60 minutos y, finalmente, a 70 °C durante 5 minutos. Para cada muestra se realizó un control negativo sin retrotranscriptasa (control No-RT).

4.5 Estandarización de primers

La herramienta Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) se utilizó para el diseño del cebador. Se seleccionaron oligonucleótidos específicos, que no amplificaban variantes de transcripción y estaban alineados con una unión exón-exón, para los productos deseados. Las secuencias y la información de los cebadores utilizados en todos los ensayos de RT-qPCR se muestran en la Tabla I. Para la estandarización de primer mediante PCR convencional se utilizó el kit GoTaq G2 Green Master Mix (Promega). La eficiencia de los primers se determinó mediante el rango dinámico en el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, EE.UU.), utilizando el kit

Brilliant II SYBR ® Green QRT-PCR Master Mix, 1-Step y 2-Step para los diferentes experimentos (Agilent, EE.UU.).

4.6 Análisis de expresión constitutiva de genes de NK-lisina

Para los análisis de expresión constitutiva de genes de NK-lisina en tejido de *S. salar*, se analizaron 5 peces al azar; a cada pez se le extrajeron 9 tejidos (piel, músculo, branquias, corazón, riñón anterior, hígado, bazo, estómago e intestino), los cuales fueron almacenados en RNALater (Invitrogen) a -80 °C. La extracción y cuantificación del ARNm se realizó a cada muestra por separado de acuerdo con el punto 4.3. Los análisis de los genes de NK-lisina de *Salmo salar* se realizaron en muestras de ARNm procedentes de un pool de tejido de 5 peces.

Para las reacciones de q-PCR se utilizó el kit KAPA SYBR FASTOne-Step qRT-PCR MasterMix (KapaBiosystems, USA) de acuerdo con el siguiente protocolo; 5 µL de Qpcr Master Mix (2X), 200 mM primer reverse, 200m mM primer forward, 1 µL cDNA (Punto 4.4), 3,6 µL de agua grado biología molecular, volumen final de reacción de 10 µL. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 30 s a T° de alineamiento (de acuerdo con cada gen, Tabla I), seguidos de la curva de melting (95 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 95 °C por 30 s). Se incluyó un control negativo sin ADNc. Los qPCR se realizaron con 3 réplicas técnicas. Para todos los ensayos de qPCR se utilizó el gen EF-1 de *S. salar* como gen housekeeping para normalizar los datos de expresión. Se utilizó el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, EE.UU.) y la expresión relativa se determinó según el modelo matemático de Paff [82].

Tabla I: Secuencias de primers utilizados para los análisis de RT-PCR.

Gen		Secuencia	Tamaño	Tm °C	Número de Acceso
SsEF1	F	CACCACCGGCCATCTGATCTACAA	78	58	AF321836
	R	TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC			
OmIL-1β	F	ACATTGCCAACCTCATCATCG	91	58	AJ223954
	R	TTGAGCAGGTCCTTGTCTTG			
SsIL-8	F	GGCCCTCCTGACCATTACT	102	58	NM_001140710
	R	ATGAGTCTACCAATTCGTCTGC			
SsTGF-β1	F	GGCCATCCGTGGACAGATAC	92	58	XM_014196504.1
	R	GGGAGGTTGGGACTTTCTCG			
SsTNF-α	F	TGTGTGGCGTCTCTTAGTAGCAGCTT	101	58	NM_001123589.1
	R	CTCCATTTTGTCTGCATCGTTGC			
SsIL-10	F	CGCTATGGACAGCATCCTGAAGTTC	118	58	XM_014168417.1
	R	GTGGAAGATGTTTCCGATGGAGTCG			
SsIFN-γ	F	CCGTACACCGATTGAGGACT	133	58	FJ263446.1
	R	GCGGCATTACTCCATCCTAA			
SsIL-17	F	CGGGAGTCTGTGGAGACCTA	83	58	XM_014193546.2
	R	TACCAAACCCGACAGTGAGC			
SsIL-4/13A	F	ACCCACCACAAAATGCAAGGAGT	71	58	NM_001204895.1
	R	ACGTGGCATTTCACGGAG			
OmIL-22	F	ATCTGCTGCCTGCATGTAA	151	58	NM_001164064.1
	R	TAGCATAGTGAGGCGGAAG			
SsMx	F	TCGGGAAATGGAAGGCACAA	99	58	XM_014133087.2
	R	CCCTCCACGGTACGTCTTC			
SsNK-Lisina 1	F	ATTGCAGTACATTTTGTATCATCTCCAAATG	119	58	NM_001141110.1
	R	TGAGCTTTATTTTGTAGTAGCC			
SsNK-Lisina 2	F	GTGTCAGTCTTAGTCTTAACTG	144	58	XM_014130176.1
	R	TACTATCAAATTGAGGTTTATTTTTTGC			
SsNK-Lisina 4	F	GTGTATAGTCATTCTAAATTGCAGT	115	58	XM_014210204.2
	R	TTCACACAAACATAAAACATTCG			
SsIL-18	F	AGCAGATGATTGCCGGTTCA	129	58	NM_001141408.1
	R	TTCTTCTCGCAGCACACCAT			
SsIFN-1α	F	CCTGCCATGAAACCTGAGAAGA	108	58	NM_001123710.1
	R	TTTCCTGATGAGCTCCCATGC			
SsEF-1α	F	GCATCAAGCAGTGGTCGAGT	140	58	NM_001124339.1
	R	AGATCAGATGGCCTGTGGTG			

Ss: Salmo salar, Om: Oncorhynchus mykiss

4.7 Actividad fagocítica

La actividad fagocítica se analizó mediante un ensayo fluométrico de microplaca utilizando pHrodo™ Green *E. coli* Bioparticles™ conjugate (Molecular Probes/Thermo Fisher Scientific), compuesto por *E. coli* inactivado marcado con un fluoróforo sensible al pH. El ensayo se basó en el aumento de la fluorescencia de las partículas en el entorno ácido de los fagosomas, lo que permitió cuantificar la captación fagocítica. Las partículas se suspendieron en un buffer Live Cell Imaging Solution (Molecular Probes/Thermo Fisher Scientific) suplementado con glucosa al 0,2% (p/v) (LCIS-glu) a una densidad de 1 mg/ml, agitando en vórtex durante 2 minutos y sonicando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los leucocitos de riñón anterior se sembraron a una densidad de 1×10^6 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio L-15 suplementado con 2% FBS, e incubaron a 18 °C por 24 horas. Luego las células se lavaron con HBSS y la población enriquecida con fagocitos se incubó durante 30 minutos a 18 °C con 50 µL de LCIS-Glu, y luego con 50 µL de biopartículas. Los péptidos derivados de NK-lisina fueron evaluados a 0, 10 y 50µM. Se utilizaron como control pocillos sin células; solo contenían biopartículas para permitir restar la fluorescencia del fondo de las partículas a pH neutro. Las células, el péptido y las biopartículas se incubaron durante 3 y 6 horas a 18°C. La fluorescencia se registró en el equipo Synergy HTX microplate reader (BioTek Instruments, USA) en modo de escaneo de área de pozo, con longitudes de onda de excitación y emisión de 488 y 528 nm, respectivamente. Los datos se calcularon como porcentaje de fagocitosis en relación con las muestras de células de control incubadas con biopartículas en ausencia de estímulos, tras sustracción de la fluorescencia de fondo

de las partículas (control sin células).

4.8 Ensayo de respuesta inmune a PAMP en células SHK-1 estimuladas con LPS y Poli (I:C).

Se sembraron 3×10^6 células/pocillo de SHK-1 en medio L15 (suplementado con 10% de suero bovino fetal). Luego de 24 horas, las células fueron estimuladas con 1 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolisacárido (LPS de *E. coli*, 0111:B4) (Sigma) y poli (I:C) (Sigma), además de 50 μM de NK-lisina (SsNK-1₂₇, SsNK-2₂₇, SsNK-4₂₇) durante 6 y 12 horas. Se usaron como controles células tratadas únicamente con LPS o con poli (I:C), y células tratadas únicamente con los péptidos. Se determinó la expresión relativa de TNF- α , IL-1 β e IL-8 en respuesta a LPS mediante qRT-PCR. Para poli I:C, se determinó la expresión de IFN- α 1 y Mx que están involucrados en la respuesta antiviral. La RT-PCR se realizó de acuerdo con el punto 4.6.

4.9 Ensayo antimicrobiano

Se evaluó la actividad antimicrobiana directa de los péptidos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇) frente a *Piscirickettsia salmonis* (LF-89) y *Flavobacterium psychrophilum*. La MIC y la IC₅₀ de los péptidos se determinaron mediante el método de microdilución en caldo con modificaciones [83]. *P. salmonis* se cultivó en medio Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, Darmstadt, Alemania) suplementado con NaCl 3 g/L, suero bovino fetal (SBF) al 2,5%, L-cisteína al 0,05% y FeCl₃ 0,01 g/l a 18°C [84] y *F.*

psychrophilum se cultivó en un caldo compuesto por Triptona 4g/L, MgSO₄ 0,5g/L, CaCl₂ 0,5g/L, extracto de levadura 0,4g/L, pH 7.2 a 15°C [85]. El cultivo de bacterias en fase de crecimiento logarítmico se diluyó en medio de cultivo hasta una absorbancia de 0,001 a 600 nm, que es equivalente a 10⁵ ufc/ml. El microorganismo diluido (90 µL) se mezcló en una placa de 96 pocillos de polipropileno (Greiner Bio-One, Alemania) con 10 µL de medio (control de crecimiento microbiano) o con 10 µL de los péptidos antimicrobianos derivados de NK-lisina diluidos en serie 1/2, partiendo de una concentración de 200 µM. El crecimiento fue monitoreado midiendo el cambio en la absorbancia del cultivo a 600 nm utilizando un lector de microplacas, tras 2 y 5 días de incubación a 15 °C y 18 °C, para *F. psychrophilum* y *P. salmonis*, respectivamente. La MIC se determinó mediante la verificación visual de la sedimentación microbiana y la lectura de la absorbancia a 600 nm. Además, se determinó la concentración inhibitoria media (IC₅₀), que es una medida de la eficacia de un compuesto en inhibir una función biológica o bioquímica e indica qué cantidad de un determinado fármaco u otra sustancia (inhibidor) se necesita para inhibir a la mitad un proceso biológico.

4.10 Actividad hemolítica de los péptidos derivados de NK-lisina.

Se determinó la actividad hemolítica de péptidos sintéticos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇) en eritrocitos humanos y de *S. salar* siguiendo el método descrito previamente [86]. Brevemente, eritrocitos humanos y de *S. salar* frescos (5 ml) se lavaron con PBS. Finalmente fueron resuspendidos en PBS suplementado con glucosa (0,2%, p/v). Se agregaron los péptidos derivados de NK-lisina (concentraciones

finales de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μM) diluidos en PBS a 90 μL de la suspensión de eritrocitos (1%). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y luego se centrifugaron durante 10 minutos a 3500 rpm a temperatura ambiente. Los sobrenadantes (70 μL) fueron transferidos a una placa de microtitulación de 96 pocillos y la densidad óptica se determinó a 405 nm en el lector de microplacas Synergy HTX (BioTek Instruments, USA). El porcentaje de hemólisis se calculó en relación con la hemólisis observada con la suspensión de eritrocitos tratada con SDS al 0,1% (100% de hemólisis). Se realizaron dos experimentos individuales, con réplicas de las muestras para cada péptido.

4.11 Análisis de las propiedades fisicoquímicas

La hidrofobicidad, el momento hidrofóbico, la carga neta total, el punto isoeléctrico teórico y los pesos moleculares de cada péptido se calcularon utilizando la base de datos de actividad antimicrobiana y estructura de péptidos (<https://dbaasp.org/home>) y la plataforma ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/). Las propiedades fisicoquímicas de los tres péptidos derivados de NK-lisina seleccionados se enumeran en la Tabla III.

4.12 Aislamiento y cultivo de leucocitos de riñón anterior (HKL)

Los HKL se aislaron de *S. salar* según el método descrito previamente [87]. Brevemente, los especímenes se sacrificaron mediante sobreexposición a benzocaína

(20%) y el riñón anterior se extrajo asépticamente y se homogenizó a través de una malla de nylon de 40 μm utilizando medio Leibovitz (L-15, Gibco, EE.UU.) suplementado con penicilina (100 UI/ml, Gibco, EE.UU.), estreptomicina (100 $\mu\text{g/ml}$, Gibco, EE.UU.), y suero bovino fetal (SBF, Hyclone, EE.UU.) al 2%. La suspensión celular resultante se depositó en gradientes de Percoll con densidades de 51%/34% y, a continuación, se a 800 g durante 40 min a 15 °C. La fracción correspondiente a los leucocitos fue recolectada, y lavada dos veces (1800 g durante 5 min a 15 °C). Finalmente, el pellet celular fue resuspendido en medio L-15 suplementado con un 10% de SBF, penicilina (100 UI/ml, Gibco, EE.UU.), estreptomicina (100 $\mu\text{g/ml}$, Gibco, EE.UU.). La concentración de células viables se determinó por el método de exclusión con azul tripán. El número de células a sembrar se calculó según el diseño experimental.

4.13 Citotoxicidad de NK-lisina en células de HKL y SHK-1.

Se determinó la citotoxicidad de los péptidos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇) en leucocitos de riñón anterior previamente extraído de acuerdo con el punto 4.12 y en células SHK-1 de *S. salar*. Se utilizó el kit Cell Proliferation Kit I (MTT, Roche) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembraron 500.000 células por pocillo de leucocitos de riñón anterior y 100.000 células por pocillo de SHK-1 en placas de 96 pocillos. Luego de 24 horas, se incubaron con 50 μM de SsNK1₂₇, SsNK2₂₇ y SsNK4₂₇ durante 24 y 48 horas a 20 °C. Posterior a la incubación, las células fueron incubadas con 1 mg/ml de MTT a 20 °C, durante 6 horas. Finalmente se eliminó todo el MTT y se resuspendieron las sales de formazán en 100 μL de isopropanol. Las

placas fueron medidas a 570nm en el equipo Synergy HTX microplate reader (BioTek Instruments, USA).

4.14 Ensayo *in vitro*

Los HKL se mantuvieron en placas de 24 pocillos a una densidad de 4×10^6 células por pocillo, a 18 °C, en medio L-15 de Leibovitz (Gibco) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10 % y penicilina (100 UI/ml, Gibco, EE.UU.), estreptomycin (100 µg/ml, Gibco, EE.UU.). Previo al tratamiento, se cultivaron monocapas de HKL y se dejaron en reposo durante al menos 24 horas. Para el tratamiento, el sobrenadante que contiene macrófagos y monocitos no adheridos fue eliminado. Las monocapas que contenían macrófagos adheridos se incubaron en medio L15 en presencia o ausencia de los péptidos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇, 50 µM) durante 6, 12 y 48 h. El ensayo se realizó por triplicado, en el que cada réplica correspondía a un pez individual. Tras la estimulación, se extrajo el ARN total de acuerdo con el punto 4.3 y, para los análisis por qPCR, se evaluó la expresión relativa de los genes IL-1β, IL-8, IL-18, TNF-α, IL-10, IFN-γ, TGF-β y Mx (Tabla I).

4.15 Ensayo *in vivo*

Veinticinco *S. salar* por grupo de aproximadamente 50 g de peso corporal se aclimataron durante dos semanas a 10-12 °C. Los peces fueron mantenidos en tanques de 0,18 m³ en agua dulce, con aireación y alimentación a saciedad (dieta comercial Micro,

EWOS), bajo un ciclo luz: oscuridad de 12:12 horas. Tras este periodo, se inyectaron 100 μ L a los animales por vía intraperitoneal con los péptidos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇ y SsNK4₂₇) a una dosis de 20 μ g por pez. Los peces del grupo control fueron inyectados con 100 μ L de PBS. A los 1, 3, 7, 14 y 21 días de la inyección, se practicó la eutanasia a los peces (n = 5 por grupo de tratamiento y punto temporal) y se recolectaron los riñones anteriores en RNAlater, los cuales fueron almacenados a -80 °C hasta su posterior análisis (Fig. 5).

La extracción y cuantificación del ARNm se realizaron de acuerdo con el punto 4.3. Los análisis de expresión génica de los genes asociados a respuestas inmunitarias (IL-1 β , IL-8, Mx, IFN- γ , IL-4/13A e IL-22) se realizaron mediante primers específicos para cada gen (Tabla I).

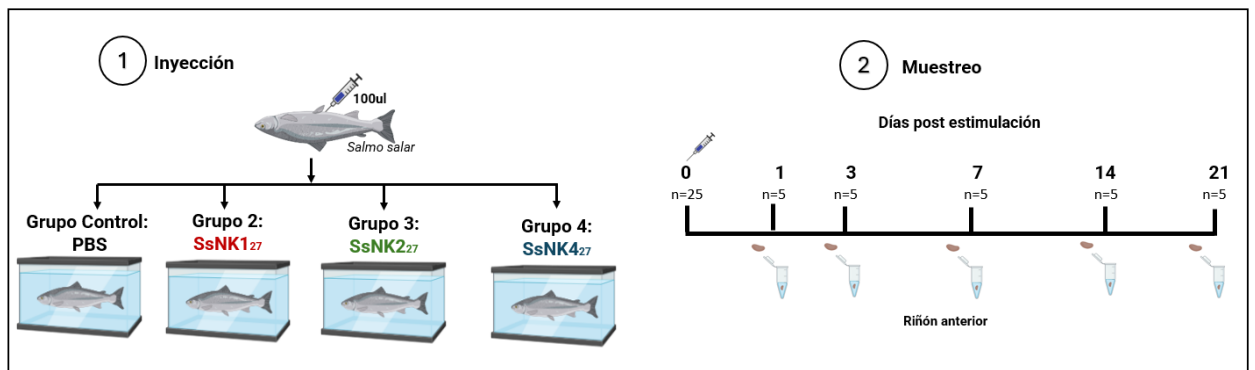


Figura 5: Diseño experimental y esquema de muestreo para la evaluación de la respuesta de *Salmo salar* a la estimulación con los péptidos derivados de NK-lisina. Se muestran las dos etapas principales del experimento: (1) inyección, en la que los peces fueron administrados con 100 μ L de PBS (grupo control), SsNK1₂₇ (grupo 2), SsNK2₂₇ (grupo 3) y SsNK4₂₇ (grupo 4), según el tratamiento experimental; y (2) muestreo, realizado a los 0, 1, 3, 7, 14 y 21 días post-estimulación. En cada punto temporal se obtuvieron muestras de riñón anterior para los análisis posteriores. El número de individuos analizados en cada punto temporal se indica como "n".

4.16 Real-time PCR para ensayos *in vitro* e *in vivo*

Las qPCR de los ensayos *in vitro* (Punto 4.14) e *in vivo* (Punto 4.15) a partir de muestras de ARN se realizaron utilizando el kit Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix, 1-Step (Agilent, EE.UU.) en un volumen final de reacción de 10 µL. La reacción consistía en 2 µL de ARN, 0,4 µL de enzima bloqueante de ARNasas (RT/RNase), 5 µL de Brilliant II SYBR Green qRT-PCR Master Mix (2X), 200 mM primer forward, 200 mM primer reverse y agua de grado biología molecular hasta completar volumen final 10 µL. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 30 s a T° de alineamiento (de acuerdo con cada gen, Tabla I), seguidos de la curva de melting (95 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 95 °C por 30 s). Se incluyó un control negativo sin ARN. Los qPCR se realizaron con 3 réplicas técnicas. Para cuantificar la expresión génica de los genes de interés, se utilizó el método $\Delta\Delta C_t$ comparativo [88].

4.17 Antígeno recombinante

VP2 es la proteína de mayor tamaño y el principal determinante inmunogénico del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) [89, 90]. La secuencia de ADN del antígeno VP2 (RV06, serotipo 5, GenBank: KF964930.1) se clonó en el vector de expresión pET28a(+) de GenScript (<https://www.genscript.com/>). El vector se verificó mediante análisis de restricción con las enzimas NcoI y EcoRI (New England BioLabs, Ipswich, MA, EE. UU.), obteniéndose una banda de aproximadamente 1,4 kb,

correspondiente a la esperada para el gen VP2. La cepa *E. coli* BL21 (DE3) se transformó con el plásmido pET28a (+): RV06. Las bacterias transformadas se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) (10 g de triptona (Gibco), 10 g de NaCl (Winkler), 5 g de extracto de levadura Bacto (Gibco) por 1 L de caldo) con 50 µg/mL de kanamicina (PhytoTech LABS) a 37 °C y 150 rpm. La inducción de la proteína VP2 se realizó añadiendo isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, USBiological Life Sciences) al caldo a una concentración final de 0,4 mM. El cultivo se mantuvo durante 4 horas a 30 °C y 150 rpm. Se determinó mediante SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones reductoras y no reductoras, y se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie R-250 (GE Healthcare, Suecia), que la proteína VP2 (RV06) se expresaba como cuerpos de inclusión, los cuales se separaron por centrifugación (4260 g durante 10 min) para su posterior purificación. Los cuerpos de inclusión previamente aislados se desnaturalizaron con urea al 8 M (Winkler) durante 6 horas. A continuación, el sobrenadante y el precipitado se separaron mediante centrifugación a 4260 g durante 10 min. El sobrenadante se sometió a un proceso de renaturalización mediante dilución gota a gota en tampón PBS durante 12 horas y, posteriormente, se filtró con un Amicon con una membrana de 100 kDa (Merck Millipore Ltd., Irlanda).

4.18 Formulación de la vacuna

Las vacunas se formularon utilizando una fase acuosa al 40% que contenía el antígeno (VP2, 1 µg por gramo de peso corporal del salmón) y los péptidos inmunomoduladores seleccionados: péptidos SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇, y una combinación de

ellos, SsNK1₂₇+SsNK4₂₇ (20 µg por pez), y un 60% de adyuvante comercial (MONTANIDE™ ISA50). Se utilizaron PBS y *E. coli* con adyuvante comercial como grupos de control negativo. Los salmones del Atlántico (95 gramos) se dividieron en seis grupos de 30 peces y se aclimataron durante 14 días en agua dulce (15 °C) con alimentación periódica. Posteriormente, se les inyectó 200 µL de la formulación con los péptidos estimulantes o de la formulación control, de forma intraperitoneal. Tras 315 unidades térmicas acumuladas (UTA), equivalentes a 21 días, los peces recibieron una dosis de refuerzo mediante el mismo procedimiento. Tres días después de la dosis de refuerzo, se sacrificaron cinco *Salmo salar* por grupo debido a la sobreexposición a benzocaína al 20 %. Se recogieron muestras de riñón anterior y bazo, que se fijaron con el reactivo de estabilización de ARN RNAlater® (Invitrogen) y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción del ARN. Para el análisis de anticuerpos específicos IgM mediante ELISA, se extrajo sangre de la vena caudal a los 3 días antes de la primera vacunación, 18, 35, 49, 60 días post vacunación. El suero se preparó mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 min y las muestras de suero se almacenaron a -20 °C. Tras finalizar el experimento a 900 UTA (60 días), se recolectaron riñones anteriores de cinco peces de 180-200 g por grupo para el cultivo de leucocitos y el ensayo de reestimulación *in vitro*.

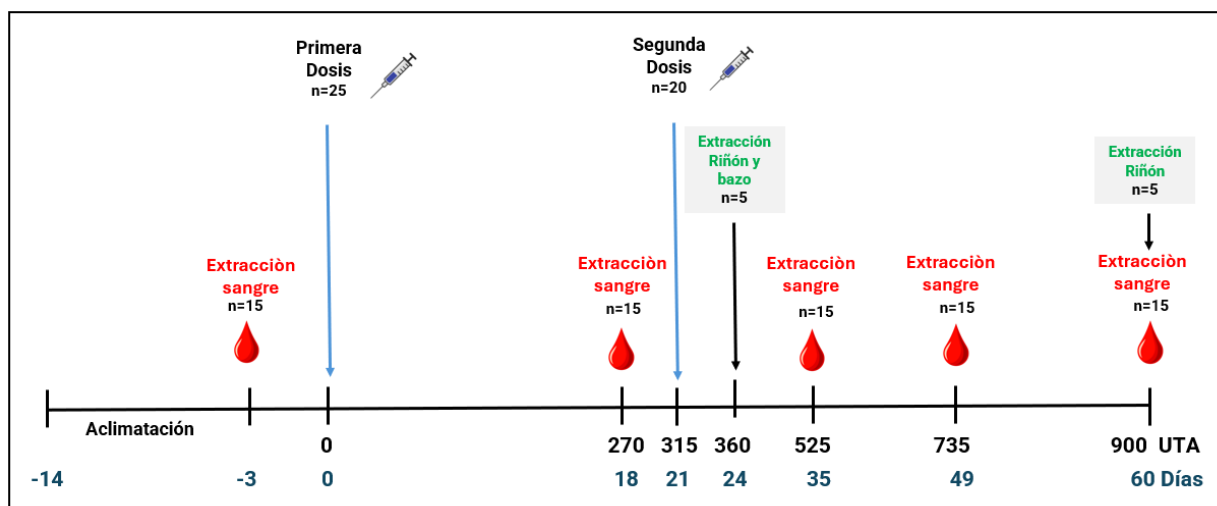


Figura 6: Cronograma experimental y esquema de muestreo de los peces vacunados durante el ensayo de estimulación. Se representa la secuencia temporal del experimento, incluyendo el período de aclimatación, la administración de la primera dosis al día 0 (n= 25) y de la segunda dosis a los 21 días post-primera dosis (n= 20). Se realizaron extracciones de sangre en los días -3, 18, 35, 49 y 60, correspondientes a 3 días antes de la primera dosis y a los días 18, 35, 49 y 60 posteriores a la primera dosis, respectivamente (n= 15 por punto de muestreo). Adicionalmente, se realizaron extracciones de riñón y bazo a los 24 días (n= 5) y de riñón a los 60 días (n= 5). La escala superior indica el tiempo transcurrido desde la primera dosis en días, mientras que la escala inferior corresponde al tiempo experimental en unidades térmicas acumuladas (UTA).

4.19 Estimulación antigénica a leucocitos de riñón anterior de peces vacunados.

Al finalizar el ensayo de vacunación (900 UTA), se recolectó el riñón anterior de cinco peces de 180-200 g por grupo para el cultivo de leucocitos. Se sembraron leucocitos de *Salmo salar* de cinco peces vacunados por grupo en placas de cultivo de 24 pocillos en medio L-15 con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y se cultivaron a 18 °C. Cada réplica experimental correspondió a células procedentes de diferentes animales y se dividió en tres grupos: células incubadas con concanavalina A (5 µg/ml), con proteína recombinante VP2 (10 µg/ml) o con medio de cultivo como control negativo. Las células se recolectaron

a las 3 y 12 horas después de la estimulación. En todos los tratamientos, las células se mantuvieron en incubación a 18 °C. La expresión de IFN- γ , IL-17 e IL-4/13A se determinó mediante qRT-PCR.

4.20 Detección de anticuerpos en sangre

Se realizaron extracciones de sangre a los 3 días antes de la primera dosis y a los días 18, 35, 49 y 60 posteriores a la vacunación, todos los peces de cada grupo fueron anestesiados con benzocaína y se obtuvieron muestras de sangre de la vena caudal. Las muestras de suero se recolectaron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 min y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Los anticuerpos específicos para VP2 se detectaron mediante ELISA indirecto. Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con VP2 (RV06, 20 μ g/ml en 50 μ L de PBS) y se incubaron a 4 °C durante la noche. Posteriormente se realizaron lavados con PBS/Tween-20 (PBS-T) al 0,05 % y se incubaron las placas con leche descremada al 3 % en PBS a temperatura ambiente (TA) durante 2 h. Tras el bloqueo, las placas se lavaron con 200 μ L de PBS-T. Tras el lavado, se añadieron a cada pocillo 50 μ L de diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ de suero obtenido a partir de la sangre de salmones previamente vacunados y controles y se incubaron las placas a 4 °C durante la noche. A continuación, se añadió el anticuerpo monoclonal anti-IgM (MyBioSource.com; diluido 1:1000) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Tras el lavado con PBS-T, se añadieron 50 μ L de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (diluido 1:13000) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Tras lavar con PBS-T, el sustrato OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina, Thermo Scientific) se preparó disolviendo 5 mg de OPD en 12,5 mL

de tampón de sustrato y añadiendo 5 μL de H_2O_2 a este volumen justo antes de su uso. A continuación, se añadieron 50 μL de esta solución a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se detuvo al añadir 25 μL de H_2SO_4 2 M a cada pocillo. La densidad óptica (DO) se midió a 492 nm con un lector de microplacas Sinergy® HTK Take3 (BioTek, Agilent Technologies). Los títulos de anticuerpos se expresaron como el recíproco de la mayor dilución, que resultó en un valor dos veces superior al del suero preinmune de cada animal.

4.21 Análisis estadísticos

Los grupos de animales tratados y control fueron seleccionados y conformados al azar. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Bartlett (para comparaciones entre más de dos grupos) o la prueba F (para comparaciones entre dos grupos). De acuerdo con estos resultados, se aplicaron pruebas paramétricas o no paramétricas según correspondiera.

Para los ensayos de actividad fagocítica y de modulación de la respuesta inducida por LPS y poli(I:C), los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak. Para los ensayos de expresión de citoquinas en leucocitos de riñón anterior estimulados *in vitro* con los péptidos los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones se realizaron entre tratamientos en función del tiempo. Para el análisis de la cinética de expresión génica *in vivo* tras la inyección de los

péptidos, se utilizó ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, dado que las comparaciones se realizaron frente a un único grupo control (PBS). Para los títulos de anticuerpos IgM se utilizó ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para el ensayo de expresión de genes en riñón anterior y bazo post vacunación se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para el ensayo de reestimulación con el antígeno VP2, se utilizó un Modelo de efectos mixtos.

V. RESULTADOS

5.1 Análisis de expresión constitutiva de genes de NK-lisina en diferentes tejidos de *S. salar*.

Se analizó la expresión constitutiva de tres genes de NK-lisina, SsNK-lisina 1, SsNK-lisina 2 y SsNK-lisina 4, de *S. salar* en nueve tejidos (Fig. 7). SsNK-lisina 1 mostró los mayores niveles de expresión en piel, riñón anterior, bazo y branquias, con su mayor nivel en branquias. Además, SsNK-lisina 1 también se expresó en músculo, intestino, hígado y corazón. SsNK-lisina 2 se expresó en todos los tejidos analizados, pero mostró un mayor nivel de expresión en el riñón anterior y el bazo; sin embargo, presentó los niveles de expresión más bajos entre los tres transcritos analizados. Por otro lado, SsNK-lisina 4 mostró su nivel de expresión más alto en las branquias, el bazo y el riñón anterior. Además, SsNK-lisina 4 también se expresó en músculo, piel, hígado, corazón e intestino. Los tejidos de intestino y estómago mostraron los niveles de expresión más bajos para todos los transcritos analizados.

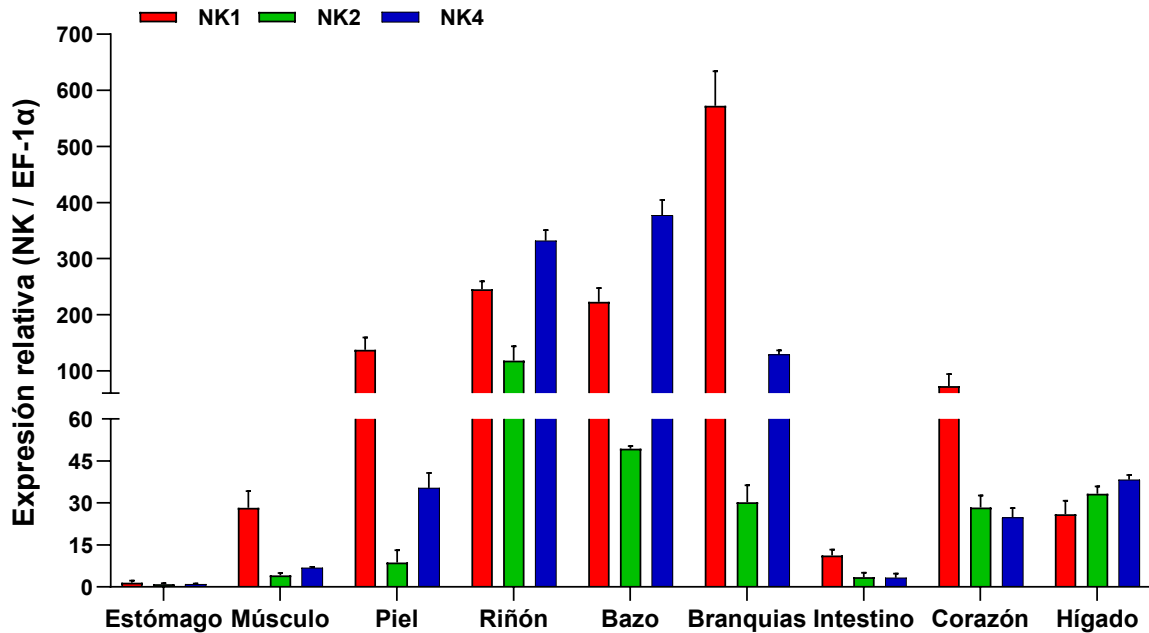
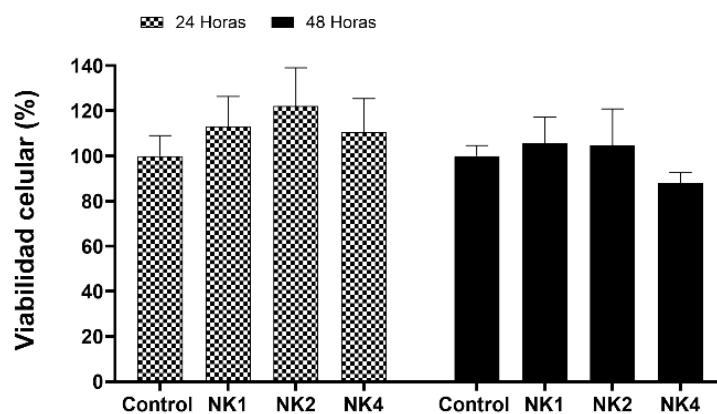


Figura 7: Perfiles de expresión relativa de ARNm de SsNK-lisina 1, 2 y 4 en nueve tejidos de salmón Atlántico no infectados. El gen EF-1 α se utilizó como normalizador y el estómago como calibrador. La expresión relativa se determinó según el modelo matemático de Paff [82]. Los datos se presentaron como media $\pm$ DE n=3 réplicas técnicas de un pool de 5 peces.

5.2 Citotoxicidad de péptidos derivados de NK-lisina en leucocitos de riñón anterior y SHK-1.

La citotoxicidad de los péptidos derivados de NK-lisina en HKL y SHK-1 fue evaluada por el ensayo de viabilidad celular MTT. Los resultados se muestran en la figura 8. Ninguno de los péptidos estudiados tuvo una toxicidad significativa a 50 μ M, luego de 24 y 48 horas de tratamiento. La viabilidad más baja para HKL fue de 87% para SsNK4₂₇ y un 82% para SsNK1₂₇ en SHK-1.

A.



B. No se encuentran elementos de tabla de ilustraciones.

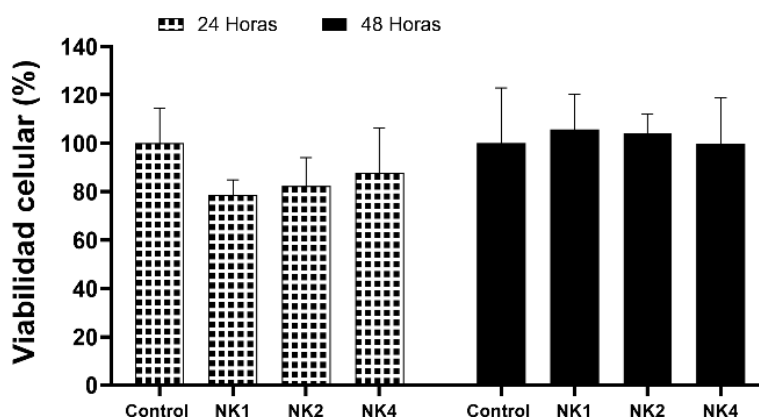


Figura 8: Efectos de péptidos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇) sobre la viabilidad celular (ensayo MTT) en (A) leucocitos de riñón anterior y (B) SHK-1, luego de 24 y 48 horas de tratamiento a una concentración de 50 µM. Los datos representan el promedio ± DE, n = 6.

5.3 Estimulación de la actividad fagocítica de leucocitos de riñón anterior con péptidos derivados de NK-lisina.

Se evaluó la capacidad de los péptidos SsNK1₂₇, SsNK2₂₇ y SsNK4₂₇ para estimular la fagocitosis en leucocitos del riñón anterior (Fig. 9). Los resultados mostraron que los péptidos SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ aumentan la capacidad fagocítica de HKL a la concentración

más alta estudiada, independientemente del tiempo evaluado. El péptido SsNK2₂₇ no tuvo efecto sobre la capacidad de fagocitosis de HKL (Fig. 9).

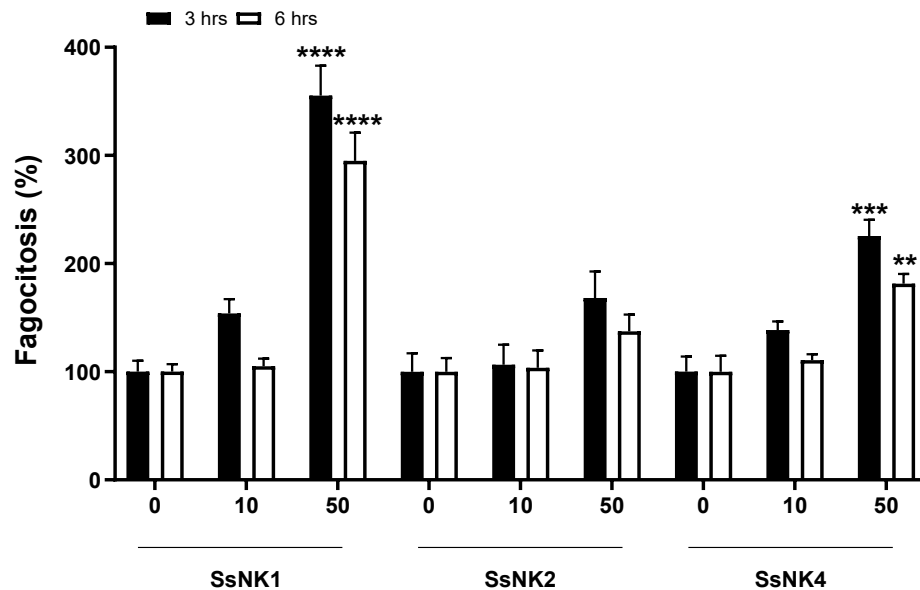


Figura 9: Efectos sobre la actividad fagocítica de los leucocitos de riñón anterior (HKL) de *S. salar* estimulados con los péptidos derivados de NK-lisina. Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes realizados en triplicado. Los datos se analizaron mediante ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

5.4 Expresión de citocinas inducidas por péptidos derivados de NK-lisina en leucocitos de riñón anterior.

La capacidad de los péptidos derivados de NK-lisina para inducir la expresión de citocinas se evaluó *in vitro* en HKL de *S. salar*. Se evaluaron los niveles de expresión de dos citocinas antiinflamatorias, IL-10 y TGF- β , en respuesta a la estimulación con los péptidos derivados de NK-lisina *in vitro*. En la figura 10 se observa que ningún péptido aumentó la expresión de IL-10 a las 6 horas, mientras que a las 12 horas todos aumentaron la expresión de IL-10 en comparación con el control. Este aumento también

se observó a las 48 horas en los péptidos SsNK2₂₇ y SsNK4₂₇. Para el gen TGF- β se observó un aumento significativo de expresión a las 12 y 48 horas para la estimulación con SsNK4₂₇ en comparación con el control de células sin estimular.

También se evaluaron los niveles de expresión de citocinas proinflamatorias (IL-8, TNF- α , IL-18, IL-1 β) (Fig. 11). En los niveles de expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-8 y TNF- α se observa un aumento significativo a las 12 horas de estimulación con los péptidos SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇, mientras que a las 6 y 48 horas no se observan diferencias significativas con respecto al control. IL-18 no presenta cambios en los niveles de expresión a las 6 y 12 horas de estimulación; sin embargo, se observa un aumento significativo en los niveles de expresión tras una estimulación con SsNK1₂₇ a las 48 h.

Además, SsNK1₂₇ a 50 μ M indujo un aumento significativo en la expresión de la citocina de tipo Th1, IFN- γ , a las 48 horas posteriores al tratamiento. Mientras que SsNK4₂₇ indujo un aumento significativo en la expresión de la citocina IFN- γ a las 12 y 48 horas post-estimulación. SsNK1₂₇ también indujo un aumento significativo en la expresión de la proteína citosólica inducible por IFN- γ , Mx, a las 6 horas, mientras que SsNK4₂₇ indujo un aumento en los niveles de expresión a las 12 horas post-estimulación (Fig. 12).

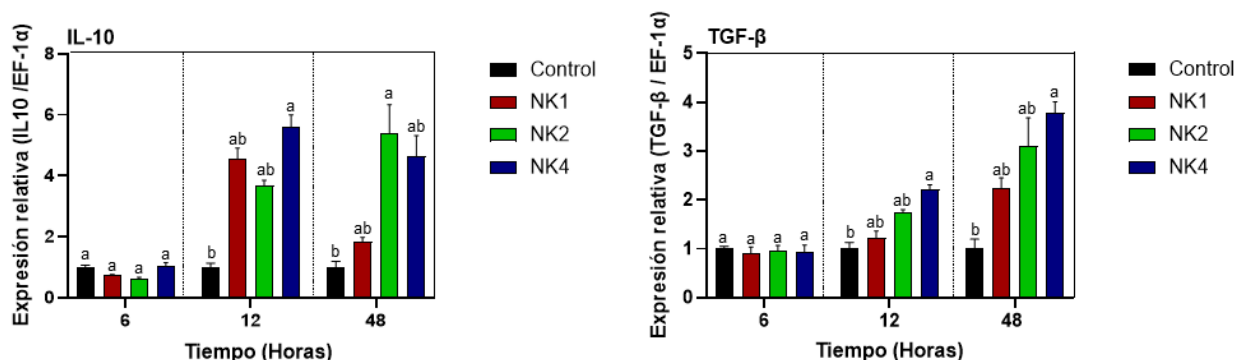


Figura 10: Niveles de expresión relativa de ARNm de citoquinas antiinflamatorias en leucocitos de riñón anterior de salmón Atlántico estimulados con péptidos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇). El gen EF-1a se usó como normalizador y el grupo control se usó como calibrador. Los datos se representan como media ± DE (pool de 3 experimentos con 3 réplicas). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones se realizaron entre tratamientos en función del tiempo.

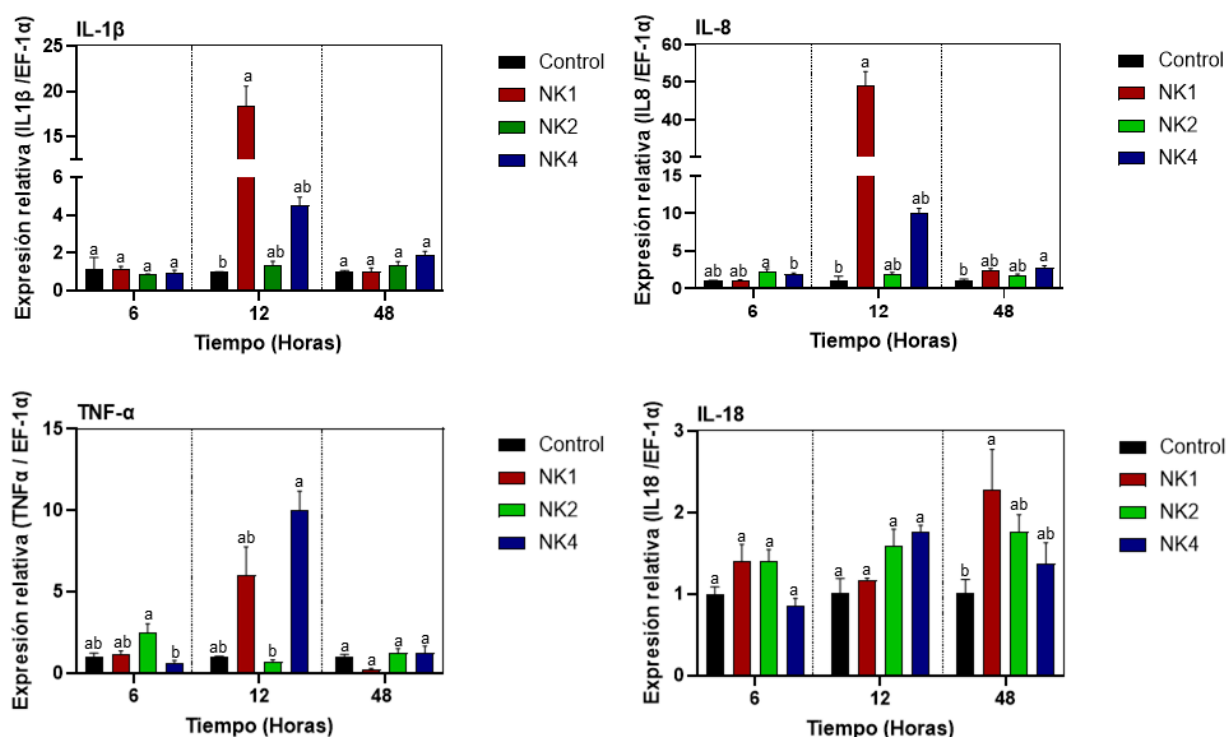


Figura 11: Niveles de expresión relativa de ARNm de citoquinas proinflamatorias de leucocitos de riñón anterior de salmón Atlántico estimulados con péptidos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇). El gen EF-1a se usó como normalizador y el grupo de control como calibrador. Los datos se representan como media ± DE (pool de 3 experimentos con 3 réplicas). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones se realizaron entre tratamientos en función del tiempo.

comparaciones se hicieron entre tratamientos en función del tiempo.

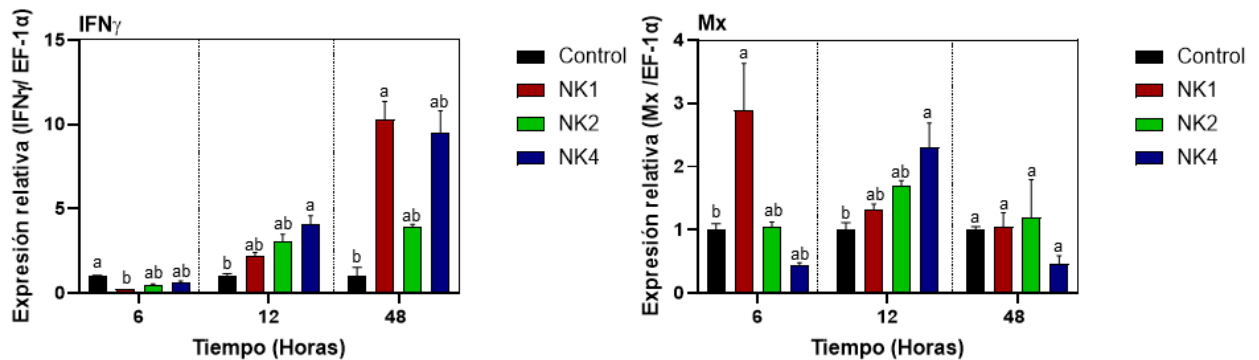


Figura 12: Niveles de expresión relativa de ARNm de genes de respuesta inmune en leucocitos de riñón de salmón Atlántico estimulados con péptidos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇). El gen EF-1 α se usó como normalizador y el grupo de control como calibrador. Los datos se representan como media $\pm$ DE (pool de 3 experimentos con 3 réplicas). Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones se realizaron entre tratamientos en función del tiempo.

5.5 Los péptidos derivados de NK-lisina regulan la expresión de citocinas inducida por PAMP.

Se evaluaron las propiedades inmunomoduladoras de los péptidos derivados de NK-lisina mediante la modulación de las respuestas inducidas por LPS y poli (I:C) en la línea celular SHK-1. El efecto de los péptidos derivados de NK-lisina sobre los genes relacionados con las respuestas inflamatorias y antivirales se muestra en las figuras 13 y 14, respectivamente. Se observó que la exposición a LPS elevó significativamente los niveles de expresión de citocinas inflamatorias, como IL-1 β , TNF α e IL-8, en las células SHK-1 a las 6 y 12 horas posteriores al tratamiento. Sin embargo, el cotratamiento con LPS y los péptidos derivados de NK-lisina disminuyó significativamente los niveles de expresión de IL-1 β y TNF- α a las 12 horas tras el tratamiento. A las 12 horas, solo el cotratamiento con LPS y SsNK2₂₇ mostró una disminución significativa de la expresión

de IL-8. SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ no mostraron cambios significativos en el nivel de expresión de IL-8 en presencia de LPS. A las 6 horas, el cotratamiento con LPS y péptidos derivados de NK-lisina aumentó los niveles de expresión de IL-1 β e IL-8 en comparación con el grupo tratado únicamente con LPS. El cotratamiento de SsNK1₂₇ o SsNK2₂₇ con LPS durante 6 horas no mostró diferencias significativas en la expresión de TNF- α . Sin embargo, el cotratamiento de SsNK4₂₇ y LPS durante 6 horas redujo significativamente el nivel de expresión de TNF- α en comparación con el tratamiento con LPS solo.

Además, determinamos si el cotratamiento con péptidos derivados de NK-lisina modulaba la respuesta inmunitaria antiviral a poli (I:C), un ligando sintético de TLR3 y un mimético viral en células SHK-1. Se analizaron los niveles de expresión de los genes IFN-1 α y Mx a las 6 y 12 horas posteriores al tratamiento. El poli (I:C) aumentó la expresión de Mx solo a las 6 horas posteriores al tratamiento (Fig. 14.B). La coincubación con péptidos derivados de NK-lisina durante 12 horas aumentó significativamente la transcripción de IFN- α 1 y Mx en comparación con las células tratadas con poli (I:C) (Fig. 14). A las 6 horas, el cotratamiento de SsNK2₂₇ y poli (I:C) redujo significativamente el nivel de expresión de Mx. SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ no afectaron el nivel de expresión de Mx en presencia de poli (I:C). Además, a las 6 horas, SsNK1₂₇ y SsNK2₂₇ redujeron la transcripción de IFN- α 1, mientras que SsNK4₂₇ aumentó significativamente este nivel en presencia de poli (I:C).

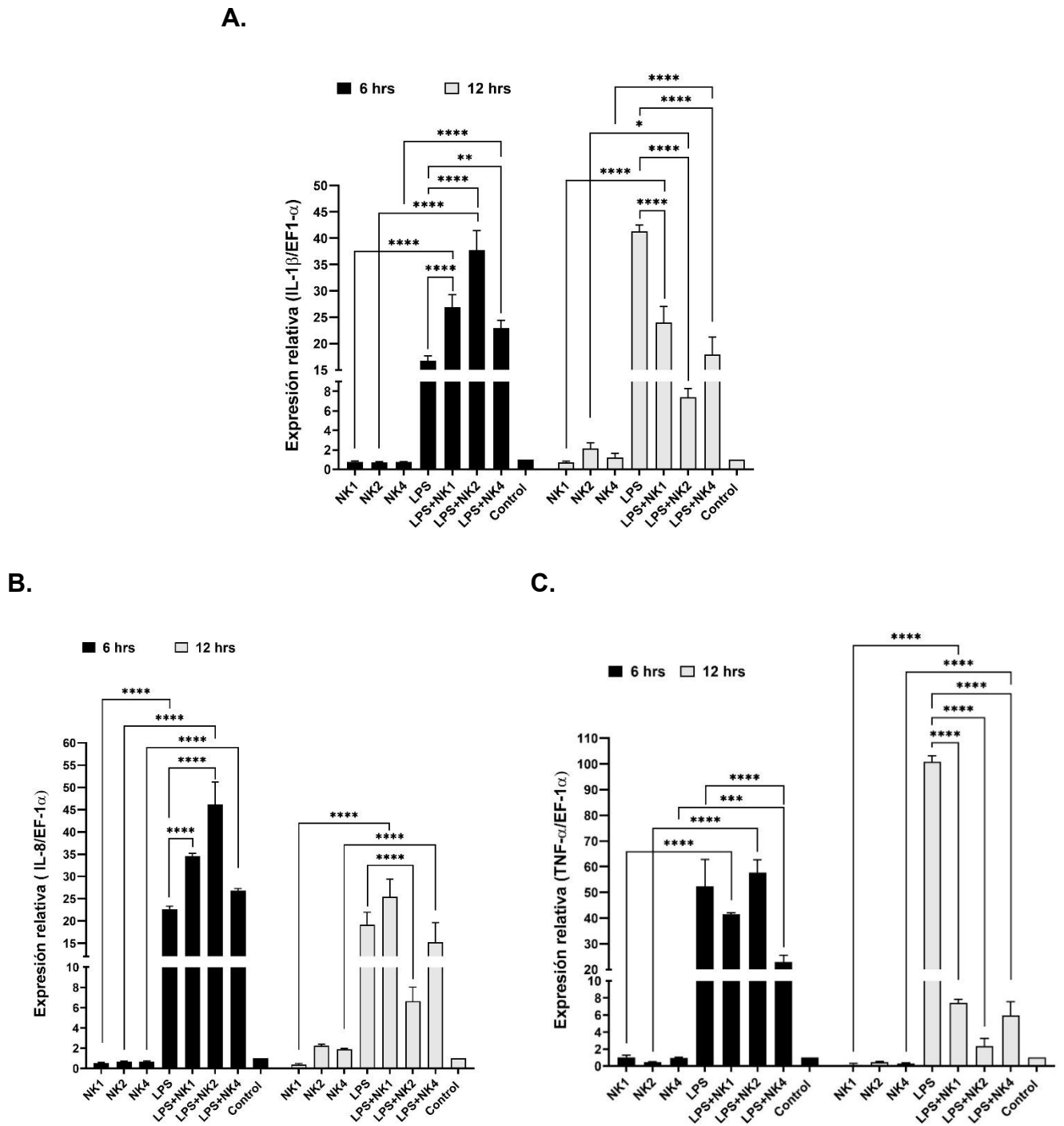
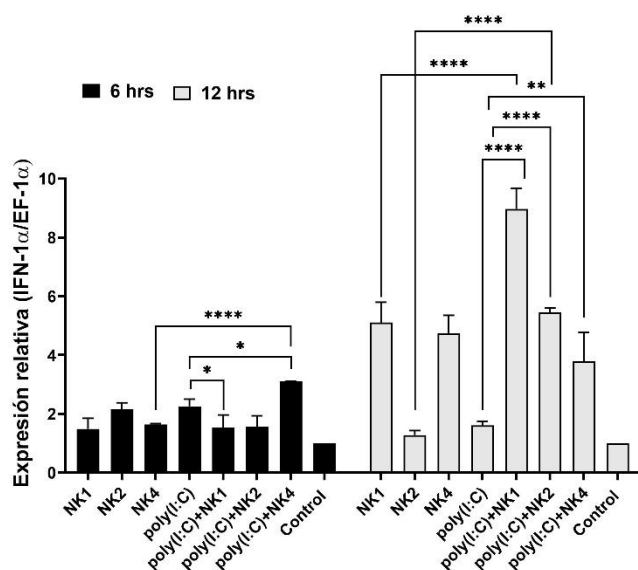


Figura 13: Modulación de las respuestas inmunitarias inducidas por LPS mediante la coadministración de péptidos derivados de NK-lisina en SHK.1. (A) IL-1 β , (B) IL-8, (C) TNF- α . Los datos se expresaron mediante la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes, cada uno analizado por triplicado, y mediante ANOVA seguido de una Prueba de comparaciones múltiples de Sidak (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

A.



B.

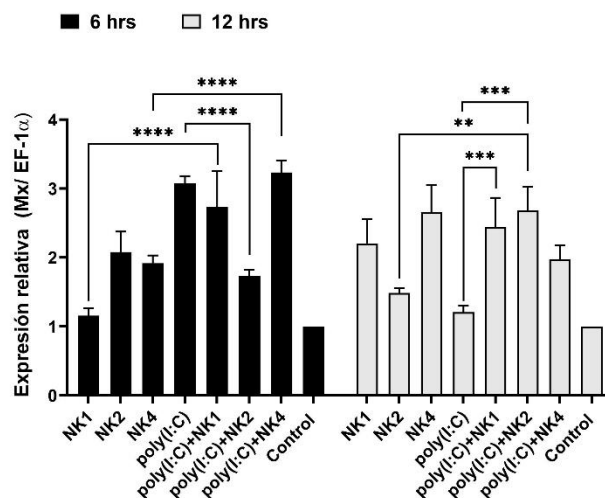


Figura 14: Modulación de las respuestas inmunitarias inducidas por poli (I:C) mediante la coadministración de péptidos derivados de NK-lisina en SHK-1. (A) IFN-1α, (B) Mx. Los datos se expresaron mediante la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes, cada uno analizado por triplicado, y mediante ANOVA seguido de una Prueba de comparaciones múltiples de Sidak (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).

5.6 Actividad antibacteriana de los péptidos derivados de NK-lisina

La actividad antimicrobiana de los péptidos derivados de NK-lisina (SsNK-1₂₇, SsNK-2₂₇, SsNK-4₂₇) fue determinada contra bacterias que representan importantes patógenos de peces: *F. psychrophilum* (Fig. 15) y *P. salmonis* (Fig. 16).

Los resultados muestran que los 3 péptidos derivados de NK-lisina (SsNK-1₂₇, SsNK-2₂₇, SsNK-4₂₇) tienen actividad antibacteriana contra *F. psychrophilum* (Fig. 15), observándose una inhibición del crecimiento bacteriano en la concentración más alta evaluada de 200 μ M en un 80% para los 3 péptidos evaluados. Se determinó una MIC de 12,5 μ M, 100 μ M y 50 μ M para SsNK1₂₇, SsNK2₂₇ y SsNK4₂₇ respectivamente (Tabla

II).

Los resultados muestran que SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ son activos contra *P. salmonis* (Fig. 16A y 16C), observándose una inhibición del crecimiento bacteriano en la concentración más alta evaluada de 200 µM en un 70% para los 2 péptidos. Para el caso de SsNK-2₂₇ no mostró actividad antibacteriana contra *P. salmonis* (Fig. 16.B). Se determinó una MIC de 6,25 µM, > 200 µM y 12,5 µM para SsNK1₂₇, SsNK2₂₇ y SsNK4₂₇ respectivamente (Tabla II).

SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ fueron los péptidos más activos contra estos patógenos críticos para los peces. Por el contrario, SsNK2₂₇ exhibió un espectro de actividad más limitado contra estos patógenos.

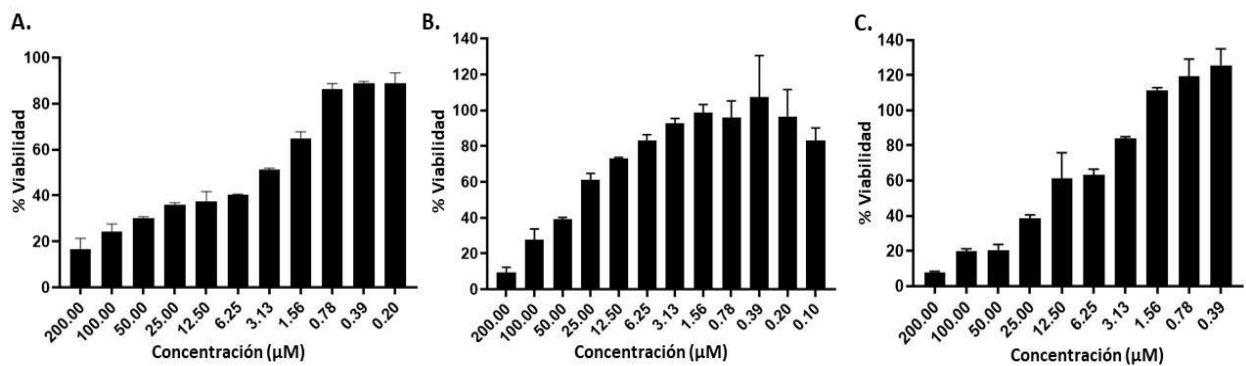


Figura 15: Viabilidad celular de *F. psychrophilum* en presencia de péptidos derivados de NK-lisina. (A) SsNK1₂₇, (B) SsNK2₂₇, (C) SsNK4₂₇. El porcentaje de viabilidad se definió con respecto a la viabilidad obtenida en bacterias sin incubación de péptidos de NK-lisina (100% de viabilidad).

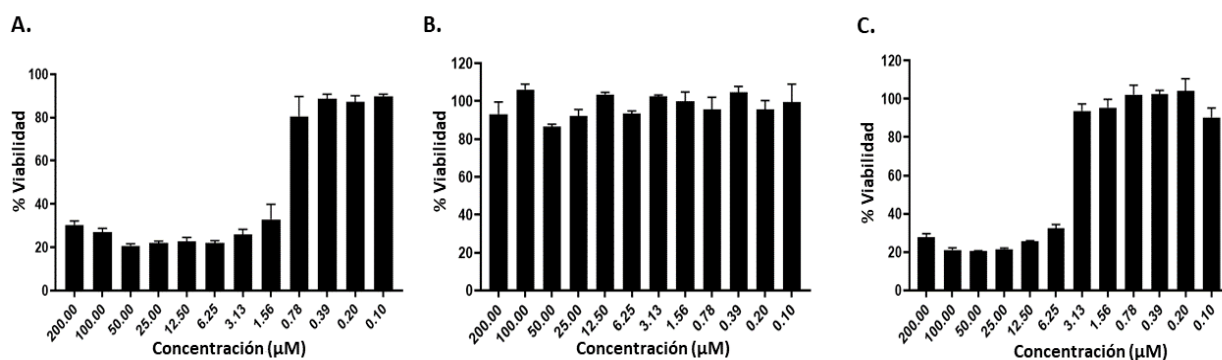


Figura 16: Viabilidad celular de *P. salmonis* en presencia de péptidos derivados de NK-lisina. (A) SsNK1₂₇, (B) SsNK2₂₇, (C) SsNK4₂₇. El porcentaje de viabilidad se definió con respecto a la viabilidad obtenida en bacterias sin incubación de péptidos de NK-lisina (100% de viabilidad).

Tabla II: Espectro antimicrobiano de péptidos sintéticos derivados de NK-lisina.

Patógeno	<i>P. salmonis</i>		<i>F. psychrophilum</i>	
	MIC (µM)	IC50 (µM)	MIC (µM)	IC50 (µM)
SsNK1₂₇	6,25	1,3	12,5	2,02
SsNK2₂₇	>200	-	100	35
SsNK4₂₇	12,5	5,03	50	6,3

5.7 Actividad hemolítica de los péptidos derivados de NK-lisina.

La actividad hemolítica de los péptidos sintéticos derivados de NK-lisina (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇, SsNK4₂₇) fue determinada en glóbulos rojos humanos y de peces (Fig. 17). SsNK2₂₇ y SsNK4₂₇ no fueron hemolíticos para los glóbulos rojos de peces en concentraciones inferiores a 100 µM (Fig. 17.A). Por el contrario, SsNK1₂₇ fue hemolítico en los eritrocitos de peces, alcanzando el 50% de hemólisis aproximadamente a los 30 µM (Fig. 17.A). Además, se observó actividad hemolítica en los glóbulos rojos humanos

para SsNK1₂₇ de forma dosis-dependiente, alcanzando el 50% de hemólisis a 25 μ M aproximadamente. Por otro lado, SsNK4₂₇ alcanzó un 33% de hemólisis en la concentración más alta analizada (Fig. 17.B). Por el contrario, SsNK2₂₇ no fue hemolítico para los eritrocitos humanos en concentraciones inferiores a 100 μ M (Fig. 17.B).

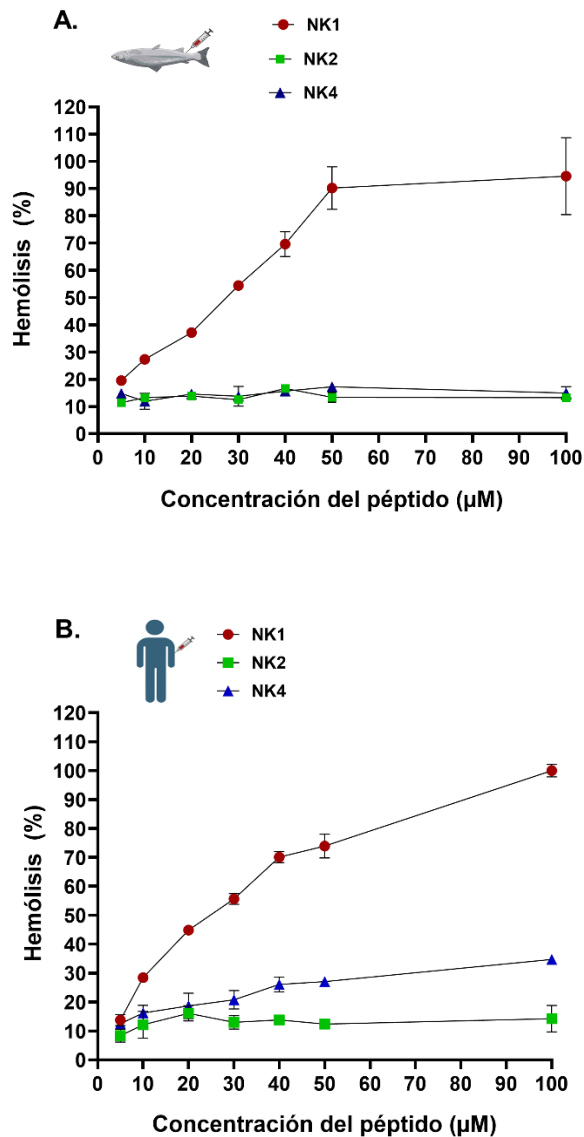


Figura 17: Actividad hemolítica de los tres péptidos derivados de NK-Lisina (NK1 = SsNK1₂₇, NK2 = SsNK2₂₇ y NK4 = SsNK4₂₇) de *S. salar* contra eritrocitos de (A) peces y (B) humano. El porcentaje de hemólisis se definió con respecto a la hemólisis obtenida con la suspensión de eritrocitos tratada con SDS al 0,1% (100% de hemólisis).

5.8 Análisis de las propiedades fisicoquímicas de péptidos derivados de NK-lisina

Por otra parte, se determinaron las propiedades fisicoquímicas de péptidos derivados de NK-lisina calculadas utilizando la base de datos de “Actividad antimicrobiana y estructura de péptidos” datos resumidos en la Tabla III.

Estos resultados muestran que SsNK1₂₇ presenta una carga neta de +6, mayor que los otros dos péptidos estudiados, también presenta un mayor momento hidrofóbico de 0,53. Por otra parte, SsNK2₂₇ es el péptido que presenta menores valores en parámetros como carga neta e hidrofobicidad. El péptido que presenta menor valor para el parámetro momento hidrofóbico es SsNK4₂₇ con un valor de 0.51.

Tabla III: Propiedades fisicoquímicas de péptidos derivados de NK-lisina calculadas utilizando la base de datos de “Actividad antimicrobiana y estructura de péptidos” (<https://dbaasp.org/home>).

ID	Momento hidrofóbico	Hidrofobicidad	Carga neta	Punto isoeléctrico	Amphiphilicity Index
SsNK1 ₂₇	0.53	0.07	6.00	10.56	0.94
SsNK2 ₂₇	0.52	-0.09	3.00	9.52	1.00
SsNK4 ₂₇	0.51	0.09	5.00	10.32	0.93

5.9 Perfil de expresión de citocinas en riñón anterior de *Salmo salar* inyectado con péptidos derivados de NK-lisina

En el experimento *in vivo*, se evaluaron los efectos inmunomoduladores de péptidos sintéticos derivados de NK-lisinas. Para ello, se inyectaron por vía intraperitoneal péptidos derivados de NK-lisina (20 µg por pez) a *S.salar* (50 g). El grupo control solo recibió 100 µl de PBS. A los 1, 3, 7, 14 y 21 días después de la inyección, se sacrificaron los peces (n = 5 por grupo de tratamiento por punto temporal) y se recolectó el riñón anterior para analizar la respuesta inmunitaria mediante RT-qPCR.

Los genes inmunorrelacionados (IL-8, Mx, IL-4, IL-22 e IFN-γ) mostraron una sobreexpresión en el riñón anterior del grupo inyectado con SsNK1₂₇ en comparación con el grupo control (Fig. 18.A). La expresión de IL-8 aumentó en los días 1, 14 y 21. La expresión de Mx aumentó el día 3. La expresión de IL-4 aumentó en los días 3 y 14. La expresión de IL-22 aumentó en los días 3 y 14. La expresión de IFN-γ aumentó el día 14 (Fig. 18.A).

Cuando se inyectó SsNK2₂₇ a los peces, los niveles de expresión de los genes del sistema inmunitario (IL-1β, IL-8, IL-4, IL-22 e IFN-γ) aumentaron en el riñón anterior (Fig. 18.B). La expresión de IL-1β aumentó únicamente el día 1. La expresión de IL-8 aumentó en los días 7 y 21. La expresión de IL-4 aumentó en los días 1 y 7. La expresión de IL-22 aumentó el día 14. La expresión de IFN-γ aumentó el día 7 (Fig. 18.B).

Los genes relacionados con el sistema inmunitario (IL-1β, IL-8, Mx, IL-4, IL-22 e IFN-γ) aumentaron en el riñón anterior del grupo inyectado con SsNK4₂₇ en comparación con el grupo control (Fig. 18.C). La expresión de IL-1β aumentó en los días 14 y 21. La

expresión de IL-8 aumentó en los días 1, 14 y 21. La expresión de Mx aumentó el día 21. La expresión de IL-4 aumentó en los días 1 y 21. Por otra parte la expresión de IL-22 aumentó el día 21, mientras que la expresión de IFN- γ aumentó los días 14 y 21 (Fig. 18.C).

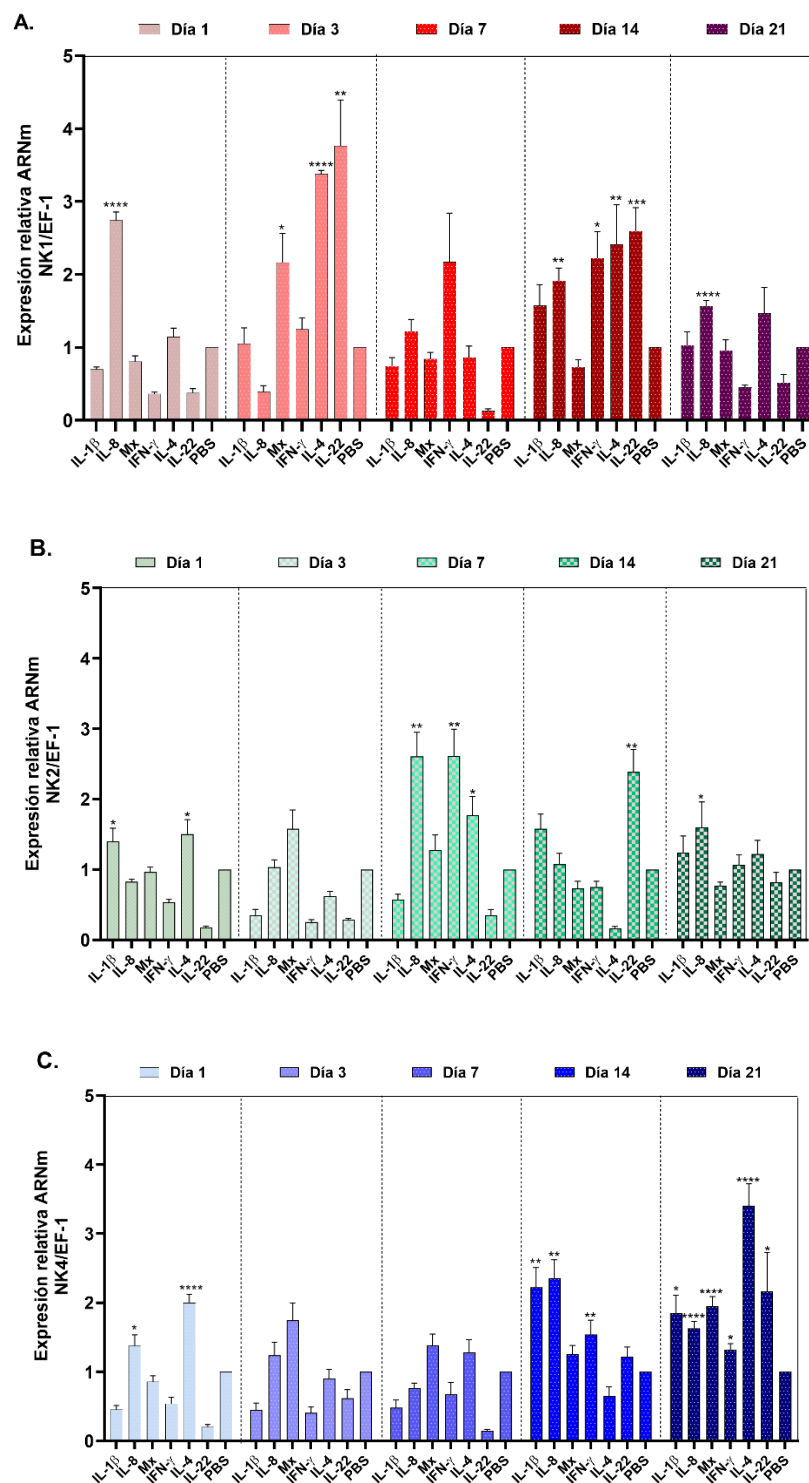


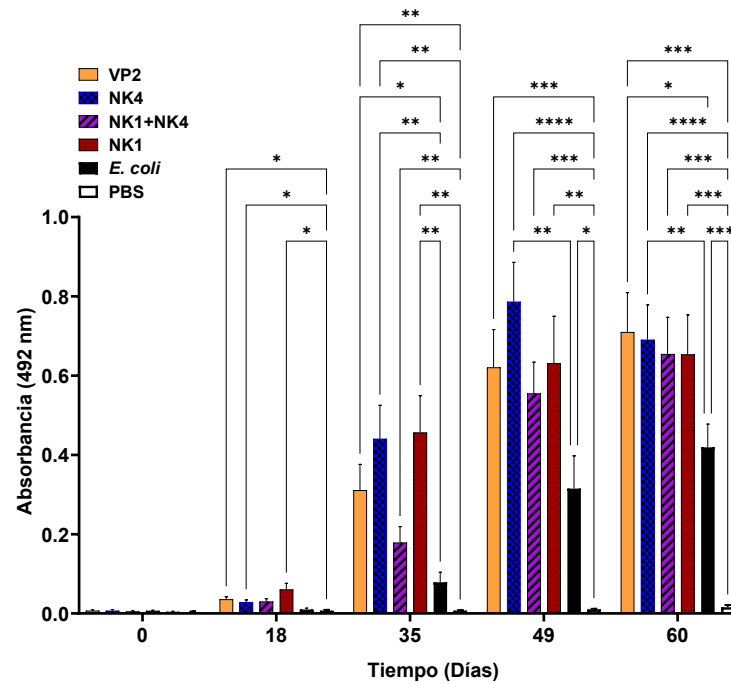
Figura 18: Nivel de expresión relativa de genes de respuesta inmune en riñón anterior de salmón Atlántico a los 1, 3, 7, 14 y 21 días posteriores a la inyección intraperitoneal con péptidos derivados de NK-lisina (SsNK, 20 μ g/pez). (A) SsNK1₂₇, (B) SsNK2₂₇, (C) SsNK4₂₇. Control: peces inyectados con PBS. Los datos se expresaron como media $\pm$ S.D. y se analizaron mediante ANOVA seguida de la prueba

de comparaciones múltiples de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) ($n = 5$). La prueba post hoc de Dunnett comparó las medias de los grupos experimentales con la del grupo control.

5.10 Los péptidos inmunomoduladores de NK-lisina potencian la respuesta inmune humoral a VP2 en *Salmo salar*

Se realizó un esquema de inmunización en salmón del Atlántico para evaluar la acción inmunopotenciadora de los péptidos inmunomoduladores SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇. Mediante ELISA indirecto se evaluó el suero de salmón en diferentes días tras la inmunización. Los peces inmunizados con VP2 en presencia o ausencia de los péptidos inmunomoduladores desarrollaron una respuesta de anticuerpos específica contra VP2 tras la inmunización intraperitoneal, en comparación con los grupos control. Los niveles de anticuerpos en el suero de los salmones vacunados aumentaron progresivamente entre los 35 y 49 días posteriores a la vacunación (dpi), y luego se mantuvieron constantes hasta los 60 dpi (Fig. 19A). Los peces inmunizados con VP2 en presencia de SsNK1₂₇ o SsNK4₂₇ desencadenaron las respuestas de IgM más potentes. Cabe destacar que el tratamiento combinado de SsNK1₂₇ + SsNK4₂₇ resultó en una respuesta de IgM menor que la de cualquiera de los componentes administrados individualmente. Como se esperaba, los controles negativos, *E. coli* y PBS, produjeron los niveles más bajos de IgM (Fig. 19A). A los 35 días posteriores a la inmunización, determinamos el título de anticuerpos IgM. Los títulos de anticuerpos de los peces inmunizados con VP2 en presencia de SsNK1₂₇ o SsNK4₂₇ fueron superiores a los de los peces inmunizados solo con VP2, sin diferencias estadísticamente significativas (Fig. 19B).

A.



B.

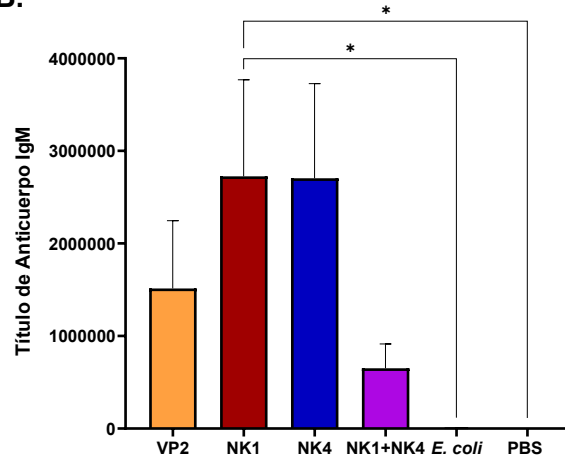


Figura 19: Respuesta inmune humoral a formulaciones de vacunas con antígeno VP2 que contienen péptidos derivados de NK-lisina como adyuvantes moleculares. (A) Niveles de anticuerpos IgM específicos de VP2 en el suero de animales inmunizados a los días 1, 18, 35, 49 y 60 posteriores a la vacunación. (B) Título de anticuerpos IgM específicos del antígeno a los 35 días posteriores a la inmunización. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$ (ANOVA de dos vías, prueba de comparación múltiple de Tukey).**

5.11 Expresión de genes relacionados con la inmunidad en tejidos post-inmunización

Para explorar las posibles funciones de los péptidos inmunomoduladores como adyuvantes moleculares de vacunas, se detectaron los niveles de expresión relativa de genes relacionados con la inmunidad en el riñón anterior (Fig. 20A) y en el bazo (Fig. 20B) de cada grupo mediante qPCR a los 3 días de la segunda vacunación.

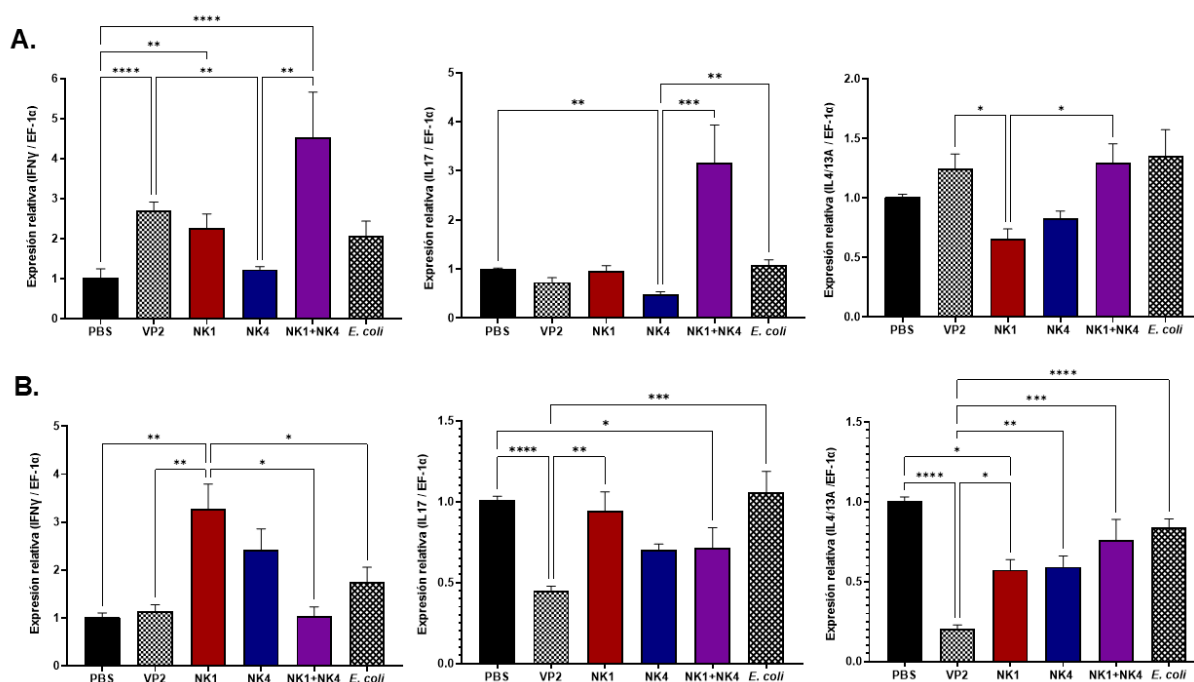


Figura 20: Respuesta adaptativa en riñón anterior y bazo de *Salmo salar* inmunizados con el antígeno VP2 y con los péptidos inmunomoduladores SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇. Expresión relativa mediante RT-qPCR de interferón gamma, interleucina 17 e interleucina 4 en (A) riñón anterior y (B) bazo, 3 días después de la segunda inmunización. La cuantificación relativa se determinó utilizando al grupo PBS como control y la expresión del gen EF-1 α como gen normalizador. (Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

En el riñón anterior, se observó un aumento significativo de IFN- γ e IL-17 en los peces vacunados con VP2 en presencia de la combinación de péptidos SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇, en comparación con el grupo control (PBS) (Fig. 20A). Por otro lado, en el riñón anterior no se observaron diferencias significativas en el gen IL-4/13. En el bazo, el IFN- γ aumentó significativamente en los peces vacunados con VP2 en presencia del péptido SsNK1₂₇, en comparación con los grupos control (peces inyectados con PBS, VP2 y *E. coli*) (Fig. 20B). El gen IL-17 aumentó significativamente en el grupo de peces vacunados con SsNK1₂₇ en comparación con los vacunados únicamente con el antígeno VP2 (Fig. 20B).

5.12 Expresión de citocinas inducida por VP2 en leucocitos de riñón anterior de *Salmo salar* vacunados con VP2 en presencia de péptidos inmunomoduladores.

Mediante RT-qPCR se evaluó la capacidad del antígeno proteico recombinante VP2 de inducir la expresión de citocinas en HKL de *S. salar* previamente vacunados con el antígeno en presencia de los péptidos inmunomoduladores SsNK1₂₇, SsNK4₂₇ de *Salmo salar*. Los leucocitos extraídos de cada grupo se dividieron en tres tratamientos: estimulación con VP2 o con concanavalina A, y un grupo control sin estimulación (ST). El ensayo de estimulación se realizó durante 3 (Fig. 21) y 12 horas (Fig. 22). Tras 3 horas de estimulación con VP2, se observó un aumento en la expresión de IFN- γ en HKL de peces vacunados con la combinación de los péptidos SsNK1₂₇+SsNK4₂₇, significativamente mayor que en las células sin estimulación (ST) y en los grupos control (HKL de peces inyectados con PBS, VP2 y *E. coli*) estimulados con

el antígeno (Fig. 21A). Además, se observó un aumento en la expresión de IL-4/13A en el HKL estimulado con VP2 en los grupos de peces vacunados con todos los péptidos estudiados: SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ y la combinación de SsNK1₂₇ + SsNK4₂₇, en comparación con HKL sin estimulación. Este aumento también fue significativo en comparación con HKL estimulados con VP2 de los grupos control (PBS, *E. coli* y VP2) (Fig. 21C).

Tras 12 horas de estimulación con VP2, se observó un aumento de la expresión de IFN- γ en HKL de peces vacunados con SsNK1₂₇, SsNK4₂₇ y la combinación SsNK1₂₇ + SsNK4₂₇, en comparación con las células no estimuladas y los grupos control (HKL extraídos de peces inyectados con PBS y *E. coli*). Además, se observó un aumento en los niveles de expresión de IFN- γ en HKL de peces vacunados con SsNK1₂₇ y SsNK1₂₇ + SsNK4₂₇ en comparación con HKL de peces inmunizados únicamente con VP2 (Fig. 22A). La expresión de IL-17 aumentó en HKL de los peces vacunados con la combinación de péptidos SsNK1₂₇ + SsNK4₂₇ estimulados con el antígeno (aumento de 5,31 veces) en comparación con las células no estimuladas y los grupos control (HKL de peces inyectados con PBS, VP2 y *E. coli* y estimulados con VP2) (Fig. 22B). La expresión de IL-17 también aumentó en HKL estimuladas con VP2 de los peces vacunados con SsNK1₂₇, siendo estadísticamente significativa en comparación con HKL no tratadas y el grupo control de peces inyectados con *E. coli* (Fig. 22B). Se observó un aumento en la expresión de IL-4/13A en HKL estimuladas con VP2 en el grupo de peces vacunados con la combinación de péptidos SsNK1₂₇ + SsNK4₂₇ en comparación con HKL no tratadas. Este aumento también fue significativo en comparación con HKL estimuladas con VP2 de los grupos control (PBS, *E. coli* y VP2) (Fig. 22C).

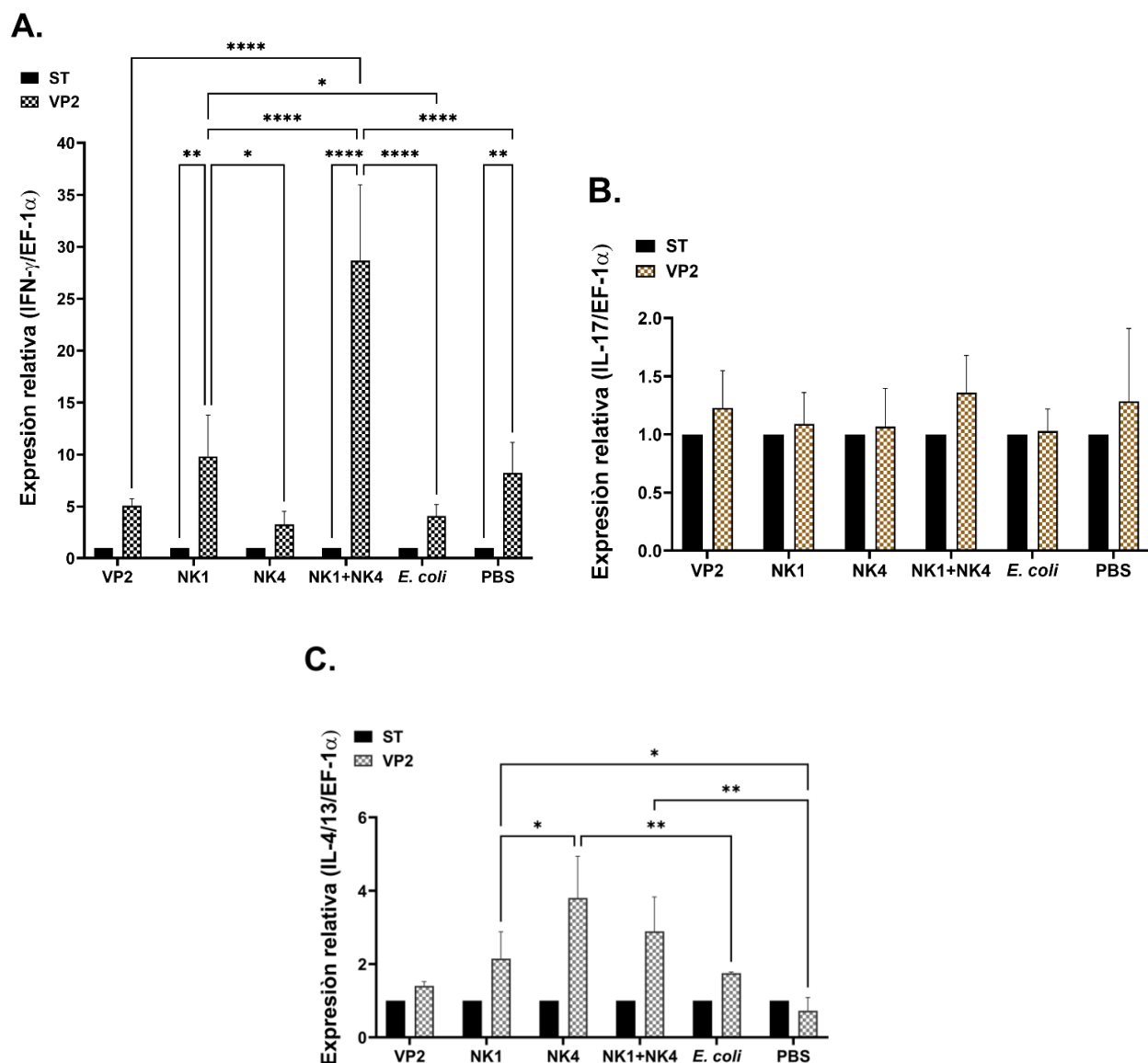


Figura 21: Respuesta adaptativa en HKL de *Salmo salar* inmunizados con el antígeno VP2 y los péptidos inmunomoduladores SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇. Se aislaron células HKL de animales inmunizados 60 días post vacunación se re-estimularon con el antígeno VP2. Expresión relativa mediante RT-qPCR de (A) IFN- γ , (B) IL-17, (C) IL-4/13A, a las 3 horas post estimulación con VP2. La cuantificación relativa se determinó utilizando el grupo PBS como control y la expresión del gen EF1 α como gen normalizador. Los valores representan el cambio relativo normalizado con respecto a la estimulación con ConA, como se describe en Materiales y Métodos (por lo tanto, no se muestran los datos de ConA). * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$ (Modelo de efectos mixtos).

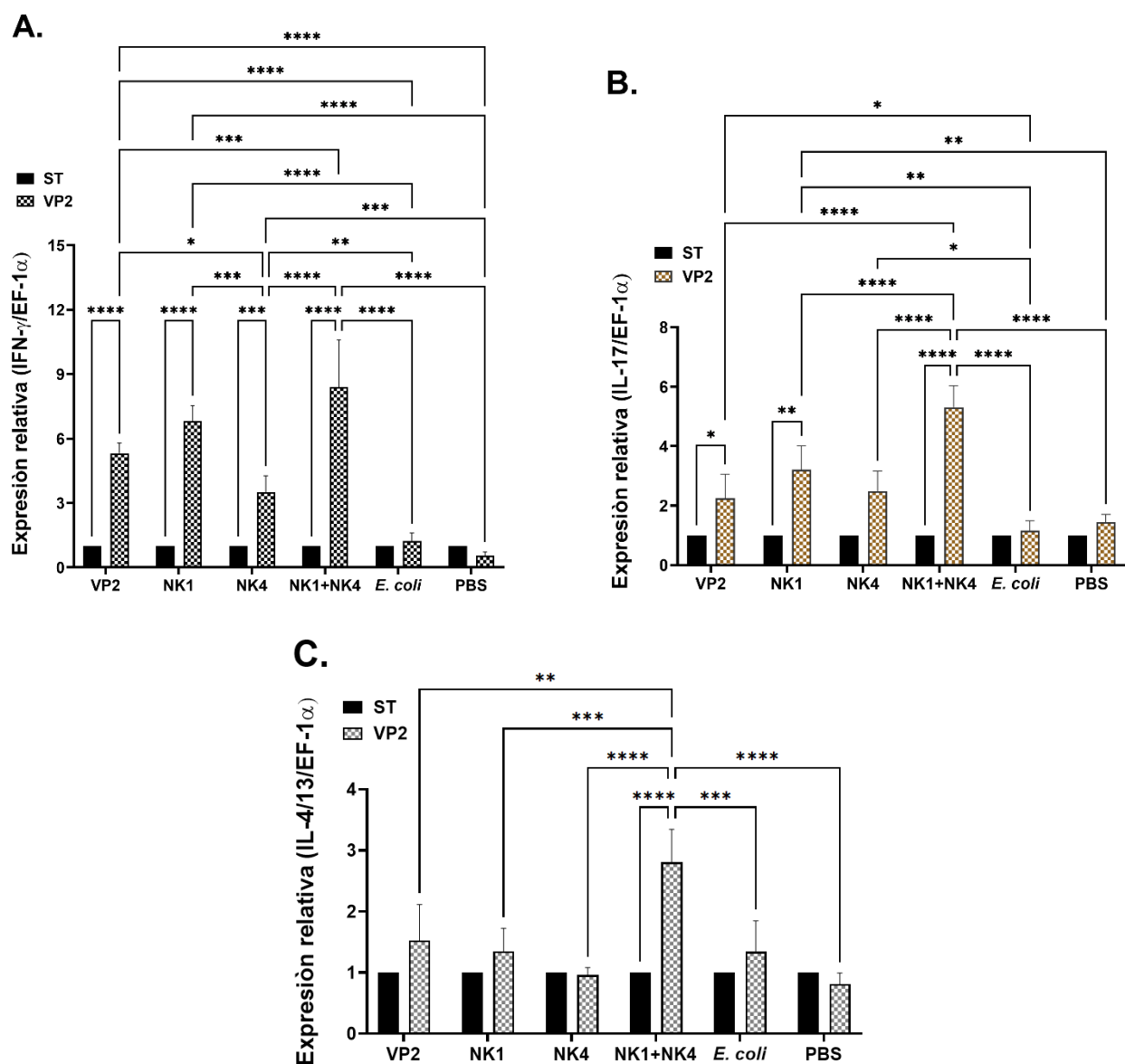


Figura 22: Respuesta adaptativa en HKL de *Salmo salar* inmunizados con el antígeno VP2 y los péptidos inmunomoduladores SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇. Se aislaron células HKL de animales inmunizados 60 días post vacunación se re-estimularon con el antígeno VP2. Expresión relativa mediante RT-qPCR de (A) IFN-γ, (B) IL-17, (C) IL-4/13A, a las 12 horas post estimulación con VP2. La cuantificación relativa se determinó utilizando el grupo PBS como control y la expresión del gen EF1α como gen normalizador. Los valores representan el cambio relativo normalizado con respecto a la estimulación con ConA, como se describe en Materiales y Métodos (por lo tanto, no se muestran los datos de ConA). * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$ (Modelo de efectos mixtos).

VI. DISCUSIÓN

Los tejidos inmunitarios más relevantes en peces teleósteos son el timo, el riñón cefálico, el riñón caudal, la piel, las branquias, el hígado, el bazo y el intestino. Las branquias son tejidos linfoides asociados a mucosas que constituyen una barrera física esencial y están constantemente expuestas a patógenos. Por lo tanto, muchas moléculas relacionadas con la inmunidad pueden detectarse en las branquias. Además, el riñón cefálico y el bazo son sitios importantes de actividad del sistema inmunológico y desempeñan un papel clave en la defensa contra la invasión de patógenos [62]. La proteína NK-lisina ha sido ampliamente estudiada en mamíferos [91, 92]. Asimismo, la expresión constitutiva más abundante de NK-lisina se ha identificado en tejidos y células linfoides en mamíferos [91, 93-95].

En algunos peces teleósteos, se ha detectado una mayor expresión de NK-lisinas en las branquias, el bazo y/o el riñón cefálico [62, 64, 65, 71, 96]. En condiciones fisiológicas normales, las NK-lisinas 1, 2 y 4 de *S. salar* presentan diferentes patrones de expresión y abundancia. Sin embargo, la mayor expresión de todas las SsNK-lisinas analizadas se ha detectado en branquias, bazo y/o riñón cefálico. En la trucha arcoíris, una especie de salmónido, los transcritos nkl1 y nkl3 se expresaron en todos los tejidos examinados. El nkl1 mostró los niveles más altos de expresión en las branquias y el bazo, mientras que nkl3 presentó niveles más altos en las branquias [67]. La distribución de los transcritos nkl2 y nkl4 estuvo principalmente restringida al sistema nervioso central (cerebro y glándula pineal) y a los ovocitos, pero los niveles de expresión fueron generalmente bajos [67].

En resumen, las NK-lisinas 1, 2 y 4 de *S. salar* se expresan principalmente en tejidos

inmunitarios, lo que sugiere que desempeñan un papel en la defensa inmunológica del hospedador.

Las NK-lisinas son moléculas de hasta 100 aminoácidos, lo que dificulta su síntesis química. Por esta razón, se han estudiado péptidos cortos derivados de NK-lisina con actividades inmunomoduladoras y antimicrobianas. En un estudio previo, diseñamos dos péptidos de 27 aminoácidos derivados de SsNK-lisina 1 y SsNK-lisina 2. Este diseño se basó en alineamientos de secuencia entre las NK-lisinas identificadas en *S. salar* y NKLP27, un péptido derivado de la NK-lisina de *C. semilaevis* [27]. En el presente estudio, SsNK4₂₇, derivado de SsNK-lisina 4, fue diseñado basándose en SsNK1₂₇ y SsNK2₂₇ de *S. salar*. Las secuencias de los péptidos diseñados corresponden a las hélices alfa H2 y H3 del dominio SapB de la NK-lisina [27, 60, 80, 97-100]. Se ha reportado que estos péptidos derivados de NK-lisina son capaces de modular la respuesta inmune en diferentes organismos [27, 66, 97, 101, 102]. Este dominio es esencial para la actividad antibacteriana de las NK-lisinas [61, 65, 101, 103].

La fagocitosis en vertebrados ha sido reconocida como un componente crítico de las respuestas inmunes innata y adaptativa frente a patógenos, y es crucial para la homeostasis y remodelación tisular [104]. Las células responsables de la fagocitosis en peces teleósteos incluyen neutrófilos, monocitos de órganos hematopoyéticos y macrófagos libres y fijos del bazo y riñón. Estas células logran la eliminación de patógenos mediante el estallido respiratorio y producción de especies reactivas de oxígeno [105]. En peces teleósteos, el riñón cefálico es un órgano linfoide esencial en la proliferación y diferenciación de linfocitos B [106] y en la producción de macrófagos [107]. Actúa como un sitio de captura y procesamiento de patógenos y sustancias extrañas

[108].

En el presente trabajo, evaluamos los efectos de los péptidos derivados de NK-lisina sobre la actividad fagocítica en leucocitos del riñón cefálico de *S. salar*. Se observó que la tasa de fagocitosis de las células tratadas con SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ a 50 µM aumentó significativamente a las 3 y 6 horas postestimulación en comparación con el control. Los resultados previos sobre la actividad fagocítica de péptidos NK-lisina en peces son controvertidos. Un estudio de 2019 investigó los efectos de un péptido derivado de NK-lisina de *Boleophthalmus pectinirostris* (BpNKLP40) sobre la fagocitosis en monocitos/macrófagos de dicha especie, y observó que el tratamiento con BpNKLP40 no tuvo un efecto significativo sobre la fagocitosis de *E. tarda* marcada con FITC por estas células [97]. Otro estudio en tilapia del Nilo (*O. niloticus*) evaluó si la actividad fagocítica de monocitos/macrófagos del riñón anterior podía ser aumentada mediante estimulación con proteína NK-lisina de tilapia. Para ello, las células se incubaron con microesferas fluorescentes (0,5 y 1,0 µm) y biopartículas (*S. agalactiae* y *A. hydrophila*) y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados sugieren que la proteína NK-lisina mejora la actividad fagocítica de los monocitos/macrófagos, y que este efecto es dependiente de la dosis [66]. Además, se evaluó la actividad fagocítica de leucocitos del riñón anterior y del bazo de *P. olivaceus* expuestos a rPoNKL, observándose que esta actividad no varió significativamente en comparación con células no tratadas [101].

En el presente estudio, mostramos que los péptidos derivados de NK-lisina de *S. salar* (SsNK1₂₇, SsNK2₂₇ y SsNK4₂₇) son potentes estimuladores de leucocitos del riñón anterior de *Salmo salar* y pueden regular al alza numerosas citoquinas de la respuesta

inmune innata y adaptativa. Los péptidos de NK-lisina y sus péptidos derivados que modulan la expresión génica han sido investigados previamente en peces, pero solo se ha estudiado un número limitado de genes de citoquinas [27, 66, 109], y los estudios sobre las funciones inmunomoduladoras de la NK-lisina en salmónidos son escasos [27, 67]. En nuestra investigación, los tratamientos con péptidos derivados de NK-lisina en leucocitos de riñón anterior aumentaron la expresión de la mayoría de los genes inmunes analizados. SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ presentaron los efectos más destacados en la inducción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-8). Además, estos péptidos aumentaron la expresión de la citoquina IFN- γ , un potente marcador de diferenciación celular de tipo Th1 y de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β . Aunque SsNK2₂₇ induce la expresión de la mayoría de los genes analizados, su efecto es más moderado en comparación con los péptidos SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇. Se ha demostrado que, además de la capacidad antimicrobiana directa de las NK-lisinas, estas moléculas también pueden tener efectos reguladores sobre las células inmunitarias. Un estudio mostró que un péptido derivado de NK-lisina de pollo (cNK-2) indujo la expresión de CCL4, CCL5 e IL-1 β en células HD11, y CCL4 y CCL5 en monocitos primarios de pollo [58]. Además, la granulicina humana aumentó las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-8, TNF- α e IL-12 en poblaciones de células T colaboradoras [110].

Asimismo, reportamos los efectos de los péptidos derivados de NK-lisina 1 y 2 sobre la expresión de IL-1 β , IL-8 e IFN- γ en leucocitos del riñón cefálico tras 4 horas de tratamiento [27]. Existen algunas diferencias entre nuestros resultados previos y los obtenidos en el presente trabajo. Estas diferencias pueden deberse a los distintos tiempos de tratamiento utilizados y al hecho de que los ensayos se realizaron en cultivos

primarios del riñón anterior de diferentes peces. Por lo tanto, las respuestas inmunes pueden variar según diferencias genéticas entre los animales y factores intrínsecos como el sexo, la edad y el historial inmunológico [89].

En el presente trabajo, determinamos el efecto de los péptidos derivados de NK-lisina de *S. salar* sobre la respuesta de células SHK-1 frente a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), LPS y poli (I:C). Demostramos que los péptidos modulan la respuesta inmune al LPS inhibiendo la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α a las 12 horas de estimulación. Hasta donde sabemos, no existen estudios en peces que describan la regulación ejercida por NK-lisina sobre la respuesta inmune inducida por PAMPs. El único reporte existente es en pollo. Kim et al. (2017) demostraron que un péptido derivado de NK-lisina de pollo (cNK-2) modula la respuesta inflamatoria inducida por LPS, reduciendo la expresión de IL-1 β en células HD11 y monocitos [58]. Numerosos estudios demuestran que los péptidos antimicrobianos inhiben las respuestas proinflamatorias inducidas por diversos ligandos de receptores tipo Toll, incluido LPS, mediante la reducción de mediadores proinflamatorios [111-117].

Por otro lado, demostramos que los péptidos modulan la respuesta inmune al poli (I:C) al aumentar la expresión de genes antivirales como IFN- α 1 y Mx a las 12 horas de estimulación. Los estudios que describen el papel de los péptidos antimicrobianos en la regulación de la respuesta inmune inducida por poli (I:C) son más controvertidos. Por ejemplo, LL37 un péptido antimicrobiano catiónico humano, aumentó los niveles de IL-6 e IFN- β inducidos por poli (I:C) en comparación con poli (I:C) solo en células epiteliales

bronquiales [118]. Además, el tratamiento de PBMC humanas con LL37 o poli (I:C) por separado tuvo efectos modestos sobre los niveles de IL-1 α , MCP-1 (Proteína quimioatrayente de monocitos-1) e IP-10 (proteína inducida por interferón gamma de 10 kD, CXCL10) pero la combinación de LL37 y poli (I:C) aumentó los niveles de IL-1 α , MCP-1 e IP-10 al menos diez veces por encima de los observados con cada uno por separado [118]. Estos resultados demuestran que la combinación de LL37 y poli (I:C) potencia la producción de citoquinas en células primarias, así como en líneas celulares inmortalizadas. Otro estudio evaluó el efecto de poli (I:C) en la línea celular RAW 264.7 en presencia o ausencia del péptido BMAP-28 (péptido antimicrobiano mielóide bovino de 28 residuos de aminoácidos) [112]. Poli (I:C) aumentó la expresión del gen IFN- β en células estimuladas durante 3 horas. BMAP-28 incrementó significativamente esta respuesta. Aunque poli (I:C) por sí solo fue un inductor débil de los genes IL-1 β , TNF- α e IL-6 en comparación con el efecto producido por LPS, su efecto aumentó de forma detectable en presencia de BMAP-28 [112]. Otro estudio determinó el efecto de la defensina humana hBD3 sobre la respuesta de macrófagos primarios a poli (I:C). Como resultado, se observó que poli (I:C) en presencia de hBD3 provoca una respuesta exacerbada de IFN- β y disminuye la producción de CXCL10, tanto *in vitro* en células humanas primarias como *in vivo* en ratones [119]. Sin embargo, los resultados de otros estudios contradicen los descritos anteriormente [111, 120]. Se evaluó el efecto del péptido antimicrobiano LL-37 sobre las respuestas proinflamatorias de fibroblastos gingivales humanos (HGF) estimulados con compuestos activadores de receptores tipo Toll (TLR) microbianos como poli (I:C). LL-37 suprimió la expresión inducida por poli (I:C) de IL-6, IL-8 y CXCL10 [111]. Otro estudio mostró que macrófagos RAW 264.7

produjeron TNF- α , IL-6 e IL-1 β tras la estimulación con poli (I:C), y que esta respuesta fue inhibida de manera dependiente de la dosis por los péptidos mCRAMP o LL37. Este estudio mostró que la señalización TLR3 no fue potenciada, sino drásticamente inhibida por LL37 o el péptido antimicrobiano relacionado con catelicidina de ratón (mCRAMP) en macrófagos, células microgliales y células dendríticas, y que esta inhibición se correlacionó con la formación de un complejo fuerte entre los péptidos antimicrobianos y poli (I:C), lo que inhibió parcialmente la unión de poli (I:C) a TLR3 [120].

Considerando los resultados anteriores, se requieren estudios adicionales para investigar más a fondo el efecto de los péptidos de NK-lisina sobre la respuesta inducida por PAMPs y su mecanismo de acción. Es importante señalar que los genes antivirales IFN1a y Mx fueron seleccionados debido a que existen estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, que demuestran que poli (I:C) induce la expresión de estos genes en varias especies [119, 121-124]. En la mayoría de los estudios *in vitro* previos se utilizó una dosis de poli (I:C) de 10, 25 o 50 $\mu\text{g/ml}$ [111, 119, 125]. El efecto de poli (I:C) a estas dosis es mucho mayor que el obtenido en el presente trabajo. Sin embargo, para evaluar mejor los efectos inmunorreguladores de los péptidos sobre la expresión de genes antivirales inducidos por poli (I:C), decidimos utilizar una dosis mucho menor (1 $\mu\text{g/ml}$) en nuestros ensayos. Sugerimos que la dosis es la razón fundamental por la cual el efecto de poli (I:C) es mucho menor que el reportado en estudios previos.

Como se mencionó anteriormente las secuencias de los péptidos diseñados corresponden a las hélices alfa H2 y H3 del dominio SapB de la NK-lisina [27, 60, 80, 97-100]. Este dominio es esencial para la actividad antibacteriana de las NK-lisinas [27, 60, 80, 97-100]. Se ha demostrado que las NK-lisinas de peces teleósteos poseen actividad

antimicrobiana contra diversos microorganismos [61, 62, 68, 69, 97, 126-128]. Sin embargo, no existen estudios que demuestren el efecto antimicrobiano de estos péptidos contra *P. salmonis* y *F. psychrophilum*. Estos dos patógenos críticos causan importantes pérdidas económicas en la acuicultura del salmón en Chile [4]. En este estudio, evaluamos las actividades antibacterianas de los péptidos derivados de NK-lisina de *Salmo salar* frente a *P. salmonis* y *F. psychrophilum*. SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ demostraron actividad antibacteriana contra ambas bacterias Gram negativas. Sin embargo, SsNK2₂₇ solo fue activo contra *F. psychrophilum*. Estos resultados sugieren que estos péptidos podrían ser eficaces en la eliminación de dichas bacterias.

La capacidad de los péptidos antimicrobianos (AMPs) para lisar células eucariotas es uno de los principales obstáculos para su uso. En el presente trabajo, evaluamos la actividad hemolítica de péptidos sintéticos derivados de NK-lisina. Como resultado, obtuvimos que SsNK1₂₇ fue el péptido más hemolítico en eritrocitos humanos y de peces, en comparación con SsNK2₂₇ y SsNK4₂₇. Este péptido, en comparación con los otros dos, presenta la mayor carga neta (+6) y el mayor momento hidrofóbico (0,53), así como un valor intermedio de hidrofobicidad (0,07). Diversos estudios muestran que la actividad hemolítica de los AMPs alfa-helicoidales está relacionada con las características hidrofóbicas del péptido [86, 129, 130]. Otros estudios han demostrado que la carga neta modula la especificidad y eficacia de la actividad antimicrobiana y hemolítica de estos péptidos [86, 131]. Además, el aumento del momento hidrofóbico, que representa una medida cuantitativa de la anfipaticidad, incrementa la actividad hemolítica [86, 132]. Sin embargo, es importante destacar que no existe un único factor que determine la actividad antimicrobiana y citotóxica de un AMP; más bien, estas actividades están influenciadas

por una combinación de factores como la secuencia, la carga neta, la hidrofobicidad y la posición de los residuos catiónicos [133]. Existen relativamente pocos estudios que evalúen la actividad hemolítica de los péptidos derivados de NK-lisina. La mayoría de estos estudios muestran una baja actividad hemolítica para estos péptidos [60, 100, 103, 134-137].

Los péptidos antimicrobianos pueden utilizarse como inmunoestimulantes o adyuvantes moleculares. Sin embargo, para utilizar un péptido antimicrobiano como inmunoestimulante o adyuvante de vacunas para peces, es necesario primero comprender los eventos de la respuesta del hospedador, la activación de las respuestas inflamatorias y los mecanismos de defensa adaptativa.

Entre los posibles péptidos antimicrobianos (AMPs) de peces, los péptidos derivados de NK-lisina han mostrado actividades antibacterianas, antivirales y antiparasitarias directas o indirectas [60, 61, 63, 77, 79, 80, 102, 138, 139]. Sin embargo, solo unos pocos estudios han evaluado la actividad inmunomoduladora de la NK-lisina en peces *in vivo* [61, 74, 78, 80]. No tenemos conocimiento de otros informes que demuestren directamente los efectos de la NK-lisina sobre citoquinas de la respuesta inmune adaptativa.

En el presente estudio, utilizamos un enfoque dirigido para determinar el impacto de los péptidos derivados de NK-lisina de *Salmo salar* sobre genes inmunes relevantes seleccionados, con el fin de obtener información detallada sobre estos eventos en nuestra especie modelo, el salmón del Atlántico (*Salmo salar*). A diferentes niveles de intensidad y en distintos tiempos posteriores a la inyección, los péptidos derivados de NK-lisina de *S. salar* indujeron la expresión de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-8; la

proteína antiviral Mx; la citoquina Th1 IFN- γ [34]; la citoquina Th17 IL-22 [34] y la citoquina Th2 IL-4/13 [34]. Nuestros resultados en salmón del Atlántico muestran que las respuestas inmunes innatas y adaptativas se activan tras la inyección de péptidos derivados de NK-lisina, activando múltiples vías. Todos estos datos sugieren que NK-lisina puede utilizarse como un potente inmunoestimulante o como adyuvante de vacunas en la acuicultura de peces.

Los adyuvantes son materiales estructuralmente heterogéneos capaces de modular la inmunogenicidad intrínseca de un antígeno, mejorando así la eficacia de diferentes tipos de vacunas [8, 140]. En la acuicultura, las vacunas comerciales para peces se basan principalmente en patógenos inactivados; sin embargo, estas presentan limitaciones en su capacidad para inducir respuestas inmunes robustas y duraderas, lo que a menudo requiere dosis de refuerzo. Por otro lado, las vacunas de subunidades, que incorporan únicamente componentes inmunogénicos, ofrecen una alternativa con menos efectos adversos [7, 15, 141]. Sin embargo, su inmunogenicidad es generalmente baja y no pueden generar protección mucosal ni celular, por lo que requieren el uso de adyuvantes. Por lo tanto, el uso de adyuvantes se asocia con una mejora en la potencia, amplitud y duración de las respuestas inmunes, aumentando así la eficacia de las vacunas [142, 143]. Tradicionalmente, en la piscicultura se han utilizado principalmente adyuvantes en emulsión o basados en sales de aluminio [7]. Sin embargo, estos adyuvantes también presentan desventajas, como la dificultad para inducir una fuerte respuesta inmune celular (respuesta Th1) [144] y la posibilidad de reacciones adversas, como adherencias tisulares [11], lo que puede afectar negativamente el bienestar de los peces y la calidad del producto final.

La investigación de péptidos inmunomoduladores como adyuvantes (inmunoadyuvantes) representa una alternativa prometedora de amplio espectro, ya que fortalecen el sistema inmunológico y pueden presentar otras actividades antimicrobianas o antitumorales [145]. Además, se consideran efectivos, seguros y económicamente viables para el diseño de vacunas de nueva generación [142, 146].

En este trabajo, utilizamos una formulación de vacuna de subunidad para IPNV (Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa), que contenía la proteína recombinante VP2 expresada como cuerpos de inclusión en *E. coli*, junto con un adyuvante en emulsión como modelo para estudiar el efecto de los péptidos inmunomoduladores SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ como adyuvantes. Nuestros resultados mostraron que los niveles de IgM en todos los grupos inmunizados fueron similares al día 60 postvacunación. Sin embargo, al día 35 post-inmunización, se observó una tendencia, aunque no significativa, hacia un aumento de los niveles de IgM en los peces inmunizados con VP2 en presencia de SsNK1₂₇ o SsNK4₂₇. Aunque estos resultados no son concluyentes, sugieren que los péptidos adyuvantes podrían potenciar la respuesta humoral. Resultados similares se observaron en un estudio que evaluó el papel del péptido NK-lisina 2 de pollo o de IL-7 como adyuvantes en la vacunación con el factor de elongación-1 α de *Eimeria* contra la infección por *E. maxima*. La inmunización con NK2 solo o combinado con IL-7 produjo los niveles séricos más altos de IgY, lo que sugiere una potenciación de la producción de anticuerpos, correlacionada con una mejor eficacia vacunal [147, 148]. Además, de manera interesante, nuestros resultados mostraron que la combinación de SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ (20 μ g cada uno) produjo títulos de IgM más bajos a los 35 dpi que cuando se administraron como formulaciones individuales (20 μ g cada uno por separado).

Resultados similares se observaron en un estudio en ratones vacunados con formulaciones que contenían dos péptidos antimicrobianos como adyuvantes (Oreoch-1/Oreoch-2, de *Oreochromis niloticus*). Este estudio planteó que la combinación de adyuvantes podría disminuir la inmunogenicidad debido a interacciones físicas entre los componentes de la vacuna, afectando su estabilidad, consistencia o inmunogenicidad [149]. Además, resultados previos demostraron que SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ inducen la expresión de IL-1 β a través de la vía p38 MAPK [81]. Por lo tanto, la respuesta observada podría estar relacionada con la regulación a la baja de vías de señalización compartidas inducidas por ambos péptidos en etapas tempranas, lo que podría resultar en una disminución de la activación de células B y de la producción de anticuerpos. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar esta hipótesis.

El análisis de la expresión de las citoquinas IFN- γ , IL-17 e IL-4/13A en tejidos a los 3 días de la segunda inmunización mostró aumentos significativos de estas citoquinas. Sin embargo, estos resultados variaron dependiendo de la formulación del péptido adyuvante y del tejido evaluado. La inducción de citoquinas relacionadas con la activación de respuestas Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4/13A) y Th17 (IL-17) se asocia con adyuvantes inmunomoduladores que son agonistas de distintos tipos de receptores de reconocimiento de patrones [144]. Los resultados de expresión de citoquinas en tejidos de animales inmunizados con VP2 más péptidos inmunomoduladores adyuvantes son consistentes con nuestros resultados previos, donde caracterizamos la función y el potencial adyuvante de estos compuestos. Estudios de expresión de IFN- γ , IL-4/13A e IL-22 en el riñón cefálico de salmón del Atlántico estimulado con SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ mostraron aumentos significativos de estos genes [81]. Por otro lado, a diferencia del

efecto inhibidor de la combinación SsNK1₂₇ + SsNK4₂₇ sobre la respuesta humoral, estos péptidos mostraron un efecto sinérgico en la activación de las respuestas Th1 y Th17 en el riñón anterior. Este resultado diferencial puede reflejar el perfil inmunomodulador de los péptidos combinados, favoreciendo la inmunidad celular por sobre la producción de anticuerpos. Además, la expresión de citoquinas se evaluó a los 3 días posterior a la segunda inmunización, mientras que los niveles de IgM se midieron al día 35, lo que indica que ambas respuestas podrían no estar alineadas temporal ni mecanísticamente. Cabe destacar que la expresión de IL-4/13A no aumentó significativamente en el grupo SsNK1₂₇ + SsNK4₂₇, lo que podría ser consistente con la reducción en la producción de IgM. Sin embargo, estudios previos en trucha arcoíris también han demostrado que las isoformas de IL-4/13A pueden aumentar las células B secretoras de IgM sin afectar los niveles de transcripción de IgM [150]. Esto sugiere que la expresión de citoquinas no siempre se correlaciona directamente con los títulos de anticuerpos. Además, se observaron diferencias en la expresión de citoquinas inducidas por los distintos grupos inmunizados entre los dos tejidos analizados. En teleósteos, se ha descrito que órganos linfoides como el bazo y el riñón cefálico responden de manera diferencial a la vacunación intraperitoneal. En un estudio en *Lates calcarifer*, se observaron cambios tempranos en el perfil transcriptómico del bazo y, posteriormente, tres semanas después de la vacunación, cambios en el transcriptoma del riñón cefálico. Se ha planteado que esto podría deberse a la compartimentalización diferencial de células B, células plasmáticas y células T en el bazo y el riñón cefálico [151]. La respuesta observada en este estudio a los 3 días después de la segunda inmunización podría estar relacionada con una respuesta retardada en el riñón cefálico y con variaciones en la expresión de

genes asociados a la respuesta inmune. Estos factores pueden generar diferencias en la eficacia con la que los péptidos adyuvantes inducen una respuesta.

Finalmente, se evaluó la respuesta inmune mediada por células en leucocitos del riñón cefálico (HKLs), aislados al día 60 postvacunación, reestimulados con VP2. Los resultados mostraron que la estimulación con el antígeno indujo una expresión significativa de genes relacionados con la activación de respuestas Th1, Th2 y Th17 en células aisladas de los grupos inmunizados con péptidos adyuvantes. Los resultados indicaron que la respuesta más alta fue la Th1 en el tiempo más temprano de estimulación. Los péptidos inmunomoduladores SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ estimularon eficientemente respuestas Th1, Th17 y Th2 a las 12 h de reestimulación con el antígeno, mediante el aumento de la expresión de IFN- γ , IL-17 e IL-4/13A, respectivamente.

Estos resultados son consistentes con lo observado en la respuesta tisular, con inducción de todas las citoquinas evaluadas. De manera similar, en un estudio donde esplenocitos de ratones inmunizados previamente con los péptidos adyuvantes Oreoch-1 y Oreoch-3 fueron reestimulados con antígeno, se observó un aumento en la secreción de IFN- γ , lo que demuestra una activación de la respuesta Th1 [149].

Por lo tanto, los resultados de este modelo *in vitro* de HKL aislados de peces inmunizados sugieren que los péptidos inmunomoduladores adyuvantes SsNK1₂₇, SsNK4₂₇ activan la inmunidad adaptativa a través de respuestas Th1, Th2 y Th17, tras la vacunación previa y la reestimulación con el antígeno, lo que sugiere un efecto potenciador sobre la eficacia de las vacunas.

VII. CONCLUSIONES

1. Los péptidos derivados de NK-lisina de *Salmo salar*, especialmente SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇, modulan la respuesta inmune innata y adaptativa *in vitro*: estimulan la actividad fagocítica de leucocitos del riñón anterior, inducen la expresión de citoquinas proinflamatorias, antivirales y reguladoras, y regulan diferencialmente la respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) bacterianos y virales. Estos resultados evidencian su potencial inmunoestimulante a nivel celular.
2. Los péptidos SsNK1₂₇ y SsNK4₂₇ presentan actividad antibacteriana frente a *Piscirickettsia salmonis* y *Flavobacterium psychrophilum*, dos patógenos críticos para la salmonicultura chilena, mientras que su actividad hemolítica varía según sus propiedades fisicoquímicas (carga neta, hidrofobicidad y momento hidrofóbico), siendo SsNK1₂₇ el péptido con mayor efecto citotóxico sobre eritrocitos. En conjunto, estos resultados definen un perfil de eficacia y seguridad biológica diferencial entre los péptidos estudiados.
3. La administración *in vivo* de péptidos derivados de NK-lisina indujo la expresión de genes asociados a respuestas Th1, Th2 y Th17, y potenció la respuesta inmune humoral y celular frente al antígeno VP2, respaldando su uso como adyuvantes moleculares en vacunas de subunidades para peces. Esta capacidad es consistente con su expresión constitutiva en tejidos inmunitarios clave, como branquias, bazo y riñón cefálico.

4. En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis planteada y demuestran que los péptidos derivados de NK-lisina de *Salmo salar* poseen propiedades inmunomoduladoras y antimicrobianas relevantes, constituyendo candidatos prometedores para el desarrollo de inmunoestimulantes y adyuvantes vacunales en la acuicultura del salmón.

VIII. REFERENCIAS

1. Bjørgen, H. and E.O. Koppang, *Anatomy of teleost fish immune structures and organs*. Principles of fish immunology: from cells and molecules to host protection, 2022: p. 1-30.
2. Carrasco-Bahamonde, D. and A. Casellas, *Evolving blue development discourses and policies: Salmon farming industry and regional making in Chile*. Marine Policy, 2024. **163**: p. 106111.
3. SERNAPESCA, *Informe ambiental de la acuicultura, periodo 2023-2024*. Subsecretaria de pesca y acuicultura. . 2025.
4. SERNAPESCA, *Informe con antecedentes sanitarios de agua dulce y mar 2025*. 2025.
5. SERNAPESCA, *Informe sobre uso antimicrobianos en la salmonicultura nacional*. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. 2025.
6. Avendaño-Herrera, R., M. Mancilla, and C.D. Miranda, *Use of antimicrobials in Chilean Salmon farming: Facts, myths and perspectives*. Reviews in Aquaculture, 2023. **15**(1): p. 89-111.
7. Du, Y., et al., *Current status and development prospects of aquatic vaccines*. Frontiers in immunology, 2022. **13**: p. 1040336.
8. Adams, A., *Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development*. Fish & shellfish immunology, 2019. **90**: p. 210-214.
9. Makesh, M. and K. Rajendran, *Fish immune system and vaccines*. Vol. 2. 2022: Springer.
10. Valenzuela-Aviles, P., et al., *Why vaccines fail against Piscirickettsiosis in farmed salmon and trout and how to avoid it: A review*. Frontiers in immunology, 2022. **13**: p. 1019404.
11. Li, J., et al., *The efficacy and side-effects of oil-based adjuvants emulsified *Vibrio anguillarum* bivalent inactivated vaccine in turbot (*Scophthalmus maximus*) under production mode*. Aquaculture, 2020. **524**: p. 735259.
12. Gjessing, M.C., et al., *A sequential study of incomplete Freund's adjuvant-induced peritonitis in Atlantic cod*. Fish & shellfish immunology, 2012. **32**(1): p. 141-150.
13. Mutoloki, S., et al., *High gene expression of inflammatory markers and IL-17A correlates with severity of injection site reactions of Atlantic salmon vaccinated with oil-adjuvanted vaccines*. BMC genomics, 2010. **11**(1): p. 336.
14. Kovacs-Nolan, J., et al., *The novel adjuvant combination of CpG ODN, indolicidin and polyphosphazene induces potent antibody-and cell-mediated immune responses in mice*. Vaccine, 2009. **27**(14): p. 2055-2064.
15. Mondal, H. and J. Thomas, *A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture*. Aquaculture international, 2022. **30**(4): p. 1971-2000.
16. Secombes, C. and T. Wang, *The innate and adaptive immune system of fish*, in *Infectious disease in aquaculture*. 2012, Elsevier. p. 3-68.
17. Kordon, A.O., A. Karsi, and L. Pinchuk, *Innate immune responses in fish: antigen presenting cells and professional phagocytes*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2018. **18**(9): p. 1123-1139.
18. Uribe, C., et al., *Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review*. Veterinární medicína, 2011. **56**(10): p. 486-503.
19. Magnadottir, B., *Immunological control of fish diseases*. Marine biotechnology, 2010. **12**(4): p. 361-379.
20. Subramanian, S., S.L. MacKinnon, and N.W. Ross, *A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007. **148**(3):

- p. 256-263.
21. Braga, R.R., H. Bornatowski, and J.R.S. Vitule, *Feeding ecology of fishes: an overview of worldwide publications*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2012. **22**(4): p. 915-929.
 22. Subramanian, S., N.W. Ross, and S.L. MacKinnon, *Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008. **150**(1): p. 85-92.
 23. Rebl, A., T. Goldammer, and H.-M. Seyfert, *Toll-like receptor signaling in bony fish*. Veterinary immunology and immunopathology, 2010. **134**(3-4): p. 139-150.
 24. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nature Reviews Immunology, 2001. **1**(2): p. 135-145.
 25. Magnadóttir, B., *Innate immunity of fish (overview)*. Fish & shellfish immunology, 2006. **20**(2): p. 137-151.
 26. Bavia, L., et al., *Advances in the complement system of a teleost fish, Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology, 2022. **123**: p. 61-74.
 27. Acosta, J., et al., *In vitro immunomodulatory activities of peptides derived from Salmo salar NK-lysin and cathelicidin in fish cells*. Fish & shellfish immunology, 2019. **88**: p. 587-594.
 28. Charlie-Silva, I., et al., *Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model*. Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 4776.
 29. Kordon, A.O., L. Pinchuk, and A. Karsi, *Adaptive immune system in fish*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2021. **22**(4).
 30. Buchmann, K. and C.J. Secombes, *Principles of fish immunology*. Principles Fish Immunol, 2022.
 31. Ashfaq, H., et al., *CD4: a vital player in the teleost fish immune system*. Veterinary research, 2019. **50**(1): p. 1.
 32. Cao, J., et al., *Regulatory roles of cytokines in T and B lymphocytes-mediated immunity in teleost fish*. Developmental & Comparative Immunology, 2023. **144**: p. 104621.
 33. Tian, H.-f., et al., *Cluster of differentiation antigens: essential roles in the identification of teleost fish T lymphocytes*. Marine Life Science & Technology, 2022. **4**(3): p. 303-316.
 34. Wang, T. and C.J. Secombes, *The cytokine networks of adaptive immunity in fish*. Fish & shellfish immunology, 2013. **35**(6): p. 1703-1718.
 35. Junttila, I.S., *Tuning the cytokine responses: an update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes*. Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 888.
 36. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
 37. PALUDAN, *Interleukin-4 and interferon-γ: the quintessence of a mutual antagonistic relationship*. Scandinavian journal of immunology, 1998. **48**(5): p. 459-468.
 38. Zou, J. and C.J. Secombes, *The function of fish cytokines*. Biology, 2016. **5**(2): p. 23.
 39. Dinarello, C.A., *Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity*. Immunological reviews, 2018. **281**(1): p. 8-27.
 40. Rakers, S., et al., *Antimicrobial peptides (AMPs) from fish epidermis: perspectives for investigative dermatology*. Journal of Investigative Dermatology, 2013. **133**(5): p. 1140-1149.
 41. Masso-Silva, J.A. and G. Diamond, *Antimicrobial peptides from fish*. Pharmaceuticals, 2014. **7**(3): p. 265-310.
 42. Ravichandran, S., et al., *Antimicrobial peptides from the marine fishes*. Res J Immunol, 2010. **3**(2): p. 146-156.
 43. Bulet, P., et al., *Antimicrobial peptides in insects; structure and function*. Developmental & Comparative Immunology, 1999. **23**(4-5): p. 329-344.
 44. Barra, D. and M. Simmaco, *Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides*. Trends in biotechnology, 1995. **13**(6): p. 205-209.

45. Lehrer, R.I. and T. Ganz, *Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence*. Current opinion in immunology, 1999. **11**(1): p. 23-27.
46. Nes, I.F. and H. Holo, *Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria*. Peptide Science, 2000. **55**(1): p. 50-61.
47. Hancock, R.E. and H.-G. Sahl, *Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies*. Nature biotechnology, 2006. **24**(12): p. 1551-1557.
48. Li, Y., et al., *Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application*. Peptides, 2012. **37**(2): p. 207-215.
49. Brogden, K.A., et al., *Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences*. International journal of antimicrobial agents, 2003. **22**(5): p. 465-478.
50. Epand, R.M. and H.J. Vogel, *Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1999. **1462**(1-2): p. 11-28.
51. Li, X., et al., *Antimicrobial mechanisms and clinical application prospects of antimicrobial peptides*. Molecules, 2022. **27**(9): p. 2675.
52. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. nature, 2002. **415**(6870): p. 389-395.
53. Park, C.B., H.S. Kim, and S.C. Kim, *Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions*. Biochemical and biophysical research communications, 1998. **244**(1): p. 253-257.
54. Marchand, C., et al., *Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicidin to DNA abasic sites*. Nucleic acids research, 2006. **34**(18): p. 5157-5165.
55. Mba, I.E. and E.I. Nweze, *Antimicrobial peptides therapy: an emerging alternative for treating drug-resistant bacteria*. The Yale journal of biology and medicine, 2022. **95**(4): p. 445.
56. Andersson, M., et al., *NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity*. The EMBO journal, 1995. **14**(8): p. 1615-1625.
57. Andersson, M., R. Girard, and P.-A. Cazenave, *Interaction of NK lysin, a peptide produced by cytolytic lymphocytes, with endotoxin*. Infection and immunity, 1999. **67**(1): p. 201-205.
58. Kim, W.H., H.S. Lillehoj, and W. Min, *Evaluation of the immunomodulatory activity of the chicken NK-lysin-derived peptide cNK-2*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 45099.
59. Wang, Q., et al., *Characterization of a NK-lysin antimicrobial peptide gene from channel catfish*. Fish & shellfish immunology, 2006. **20**(3): p. 419-426.
60. Hirono, I., et al., *Characterization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) NK-lysin, an antimicrobial peptide*. Fish & Shellfish Immunology, 2007. **22**(5): p. 567-575.
61. Zhang, M., H. Long, and L. Sun, *A NK-lysin from *Cynoglossus semilaevis* enhances antimicrobial defense against bacterial and viral pathogens*. Developmental & Comparative Immunology, 2013. **40**(3-4): p. 258-265.
62. Zhou, Q.-J., et al., *Identification, expression and antibacterial activities of an antimicrobial peptide NK-lysin from a marine fish *Larimichthys crocea**. Fish & shellfish immunology, 2016. **55**: p. 195-202.
63. Pereiro, P., et al., *Zebrafish Nk-lysins: first insights about their cellular and functional diversification*. Developmental & Comparative Immunology, 2015. **51**(1): p. 148-159.
64. Wang, G.L., et al., *Identification, expression analysis, and antibacterial activity of NK-lysin from common carp *Cyprinus carpio**. Fish & Shellfish Immunology, 2018. **73**: p. 11-21.
65. Huang, Y., et al., *NK-lysin from *Oreochromis niloticus* improves antimicrobial defence against bacterial pathogens*. Fish & shellfish immunology, 2018. **72**: p. 259-265.
66. Chen, J., et al., *Study on the expression of Nk-lysin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in *Pichia pastoris* and its biological function*. Aquaculture, 2022. **557**: p. 738321.

67. Ma, H., et al., *Structure and regulation of the NK-lysin (1–4) and NK-lysin like (a and b) antimicrobial genes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Developmental & Comparative Immunology, 2021. **116**: p. 103961.
68. Zhang, H., et al., *Antimicrobial activity and mechanisms of a derived antimicrobial peptide TroNKL-27 from golden pompano (Trachinotus ovatus) NK-lysin*. Fish & Shellfish Immunology, 2022. **126**: p. 357-369.
69. Ruan, Z.-h., et al., *The antibacterial activity of a novel NK-lysin homolog and its molecular characterization and expression in the striped catfish, Pangasianodon hypophthalmus*. Fish & Shellfish Immunology, 2022. **127**: p. 256-263.
70. Lee, M.O., et al., *Genomic structure and tissue expression of the nk-lysin gene family in bison*. Journal of Heredity, 2018. **109**(5): p. 598-603.
71. Wang, Q., et al., *NK-lysin of channel catfish: gene triplication, sequence variation, and expression analysis*. Molecular immunology, 2006. **43**(10): p. 1676-1686.
72. Zhang, M., et al., *Identification and characterization of five Nk-lysins from Pseudocrossocheilus bamaensis and their diverse expression patterns in response to bacterial infection*. Fish & Shellfish Immunology, 2019. **94**: p. 346-354.
73. Valero, Y., J. Cortés, and L. Mercado, *NK-lysin from skin-secreted mucus of Atlantic salmon and its potential role in bacteriostatic activity*. Fish & shellfish immunology, 2019. **87**: p. 410-413.
74. Luo, S.-W., et al., *A novel NK-lysin in hybrid crucian carp can exhibit cytotoxic activity in fish cells and confer protection against Aeromonas hydrophila infection in comparison with Carassius cuvieri and Carassius auratus red var*. Fish & shellfish immunology, 2021. **116**: p. 1-11.
75. Liu, M.-Y., et al., *Molecular characterization and antimicrobial activity of NK-lysin in black scraper (Thamnaconus modestus)*. Fish & Shellfish Immunology, 2023. **136**: p. 108703.
76. Wang, C.-b., et al., *NKHs27, a sevenband grouper NK-Lysin peptide that possesses immunoregulatory and antimicrobial activity*. Fish & Shellfish Immunology, 2023. **136**: p. 108715.
77. Lama, R., et al., *Turbot (Scophthalmus maximus) Nk-lysin induces protection against the pathogenic parasite Philasterides dicentrarchi via membrane disruption*. Fish & shellfish immunology, 2018. **82**: p. 190-199.
78. Valero, Y., et al., *NK-lysin peptides ameliorate viral encephalopathy and retinopathy disease signs and provide partial protection against nodavirus infection in European sea bass*. Antiviral Research, 2021. **192**: p. 105104.
79. Chen, R.-Y., et al., *Barbel steed (Hemibarbus labeo) NK-lysin protects against Aeromonas hydrophila infection via immunomodulatory activity*. Developmental & Comparative Immunology, 2021. **122**: p. 104114.
80. Zhang, M., M.-f. Li, and L. Sun, *NKLP27: a teleost NK-lysin peptide that modulates immune response, induces degradation of bacterial DNA, and inhibits bacterial and viral infection*. PLoS one, 2014. **9**(9): p. e106543.
81. Ortega, L., et al., *New insight into the biological activity of Salmo salar NK-lysin antimicrobial peptides*. Frontiers in Immunology, 2024. **15**: p. 1191966.
82. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR*. Nucleic acids research, 2001. **29**(9): p. e45-e45.
83. Otvos, L. and M. Cudic, *Broth microdilution antibacterial assay of peptides*, in *Peptide characterization and application protocols*. 2007, Springer. p. 309-320.
84. Santibañez, N., et al., *Biofilm produced in vitro by Piscirickettsia salmonis generates differential cytotoxicity levels and expression patterns of immune genes in the Atlantic salmon cell line SHK-1*. Microorganisms, 2020. **8**(10): p. 1609.
85. Leyton, A., et al., *Inhibitory activity of Antarctic bacteria Pseudomonas sp M19B on the*

- biofilm formation of Flavobacterium psychrophilum* 19749. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 2015. **50**(2): p. 375-381.
86. Acosta, J., et al., *Cloning and functional characterization of three novel antimicrobial peptides from tilapia (Oreochromis niloticus)*. *Aquaculture*, 2013. **372**: p. 9-18.
 87. D'Este, F., et al., *Antimicrobial and host cell-directed activities of Gly/Ser-rich peptides from salmonid cathelicidins*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016. **59**: p. 456-468.
 88. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method*. *methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
 89. Wong-Benito, V., et al., *Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) recombinant viral protein 1 (VP1) and VP2-Flagellin fusion protein elicit distinct expression profiles of cytokines involved in type 1, type 2, and regulatory T cell response in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022. **131**: p. 785-795.
 90. Ballesteros, N.A., et al., *Trout oral VP2 DNA vaccination mimics transcriptional responses occurring after infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)*. *Fish & shellfish immunology*, 2012. **33**(6): p. 1249-1257.
 91. Bruhn, H. and M. Leippe, *Comparative Modeling of amoebapores and granulysin based on the nk-lysin structure structural and functional implications*. 1999.
 92. Endsley, J.J., et al., *Characterization of bovine homologues of granulysin and NK-lysin*. *The Journal of Immunology*, 2004. **173**(4): p. 2607-2614.
 93. Andersson, M., et al., *An amphipathic helical motif common to tumourolytic polypeptide NK-lysin and pulmonary surfactant polypeptide SP-B*. *FEBS letters*, 1995. **362**(3): p. 328-332.
 94. Kandasamy, S. and A. Mitra, *Characterization and expression profile of complete functional domain of granulysin/NK-lysin homologue (buffalo-lysin) gene of water buffalo (Bubalus bubalis)*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2009. **128**(4): p. 413-417.
 95. Davis, E.G., et al., *Molecular cloning and characterization of equine NK-lysin*. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2005. **105**(1-2): p. 163-169.
 96. Liu, B., et al., *Functional characterization of NK-lysin in golden pompano Trachinotus ovatus (Linnaeus 1758)*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020. **107**: p. 103658.
 97. Ding, F.-F., C.-H. Li, and J. Chen, *Molecular characterization of the NK-lysin in a teleost fish, Boleophthalmus pectinirostris: Antimicrobial activity and immunomodulatory activity on monocytes/macrophages*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019. **92**: p. 256-264.
 98. Shan, Z., et al., *NKL-24: A novel antimicrobial peptide derived from zebrafish NK-lysin that inhibits bacterial growth and enhances resistance against Vibrio parahaemolyticus infection in Yesso scallop, Patinopecten yessoensis*. *Fish & shellfish immunology*, 2020. **106**: p. 431-440.
 99. Lee, M.O., et al., *Chicken NK-lysin is an alpha-helical cationic peptide that exerts its antibacterial activity through damage of bacterial cell membranes*. *Poultry science*, 2014. **93**(4): p. 864-870.
 100. Schröder-Borm, H., et al., *Molecular basis for membrane selectivity of NK-2, a potent peptide antibiotic derived from NK-lysin*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2003. **1612**(2): p. 164-171.
 101. Li, X., et al., *Anti-microbial activity and immunomodulation of recombinant hepcidin 2 and NK-lysin from flounder (Paralichthys olivaceus)*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023. **253**: p. 127590.
 102. Valero, Y., et al., *NK-lysin, dicentracin and hepcidin antimicrobial peptides in European sea bass. Ontogenetic development and modulation in juveniles by nodavirus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020. **103**: p. 103516.

103. Dassanayake, R.P., et al., *Synthetic bovine NK-lysin-derived peptide (bNK2A) does not require intra-chain disulfide bonds for bactericidal activity*. Plos one, 2019. **14**(6): p. e0218507.
104. Esteban, M.Á., et al., *Phagocytosis in teleosts. Implications of the new cells involved*. Biology, 2015. **4**(4): p. 907-922.
105. Mokhtar, D.M., *Fish histology: from cells to organs*. 2021: Apple Academic Press.
106. Petrie-Hanson, L. and A.J. Ainsworth, *Ontogeny of channel catfish lymphoid organs*. Veterinary immunology and immunopathology, 2001. **81**(1-2): p. 113-127.
107. Meseguer, J., M. Esteban, and B. Agulleiro, *Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (Dicentrarchus labrax L.). An ultrastructural study*. Archives of Histology and Cytology, 1991. **54**(3): p. 299-309.
108. Press, C.M. and Ø. Evensen, *The morphology of the immune system in teleost fishes*. Fish & shellfish immunology, 1999. **9**(4): p. 309-318.
109. Hao, D.-f., et al., *Antimicrobial and immunoregulatory activities of the derived peptide of a natural killer lysin from black rockfish (Sebastes schlegelii)*. Fish & Shellfish Immunology, 2022. **123**: p. 369-380.
110. Tewary, P., et al., *Granulysin activates antigen-presenting cells through TLR4 and acts as an immune alarmin*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2010. **116**(18): p. 3465-3474.
111. Into, T., et al., *Effect of the antimicrobial peptide LL-37 on Toll-like receptors 2-, 3-and 4-triggered expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 in human gingival fibroblasts*. Cellular immunology, 2010. **264**(1): p. 104-109.
112. D'Este, F., et al., *Modulation of cytokine gene expression by cathelicidin BMAP-28 in LPS-stimulated and-unstimulated macrophages*. Immunobiology, 2012. **217**(10): p. 962-971.
113. Hou, J., et al., *The truncated human beta-defensin 118 can modulate lipopolysaccharide mediated inflammatory response in RAW264. 7 macrophages*. Peptides, 2021. **136**: p. 170438.
114. Wu, W., et al., *Cathelicidin-WA attenuates LPS-induced inflammation and redox imbalance through activation of AMPK signaling*. Free Radical Biology and Medicine, 2018. **129**: p. 338-353.
115. Xie, K., et al., *The immunomodulatory function of the porcine β -defensin 129: Alleviate inflammatory response induced by LPS in IPEC-J2 cells*. International journal of biological macromolecules, 2021. **188**: p. 473-481.
116. Alalwani, S.M., et al., *The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils*. European journal of immunology, 2010. **40**(4): p. 1118-1126.
117. van Dijk, A., et al., *Immunomodulatory and anti-inflammatory activities of chicken cathelicidin-2 derived peptides*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0147919.
118. Lai, Y., et al., *LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs*. PLoS one, 2011. **6**(10): p. e26632.
119. Semple, F., et al., *Human β -D-3 exacerbates MDA5 but suppresses TLR3 responses to the viral molecular pattern mimic polyinosinic: polycytidylic acid*. PLoS genetics, 2015. **11**(12): p. e1005673.
120. Hasan, M., et al., *Antimicrobial peptides inhibit polyinosinic-polycytidylic acid-induced immune responses*. The Journal of Immunology, 2011. **187**(11): p. 5653-5659.
121. Yu, L., et al., *Pattern recognition receptor-initiated innate antiviral response in mouse adipose cells*. Immunology and Cell Biology, 2014. **92**(2): p. 105-115.
122. Levast, B., et al., *Synthetic cationic peptide IDR-1002 and human cathelicidin LL37 modulate the cell innate response but differentially impact PRRSV replication in vitro*. Frontiers in Veterinary Science, 2019. **6**: p. 233.

123. Lee, S.H., et al., *Hydrogen peroxide attenuates rhinovirus-induced anti-viral interferon secretion in sinonasal epithelial cells*. *Frontiers in immunology*, 2023. **14**: p. 1086381.
124. Avunje, S. and S.-J. Jung, *Poly (I: C) and imiquimod induced immune responses and their effects on the survival of olive flounder (Paralichthys olivaceus) from viral haemorrhagic septicaemia*. *Fish & shellfish immunology*, 2017. **71**: p. 338-345.
125. Chen, Q., et al., *Identification of type I IFN in Chinese giant salamander (Andrias davidianus) and the response to an iridovirus infection*. *Molecular Immunology*, 2015. **65**(2): p. 350-359.
126. Xu, H., Z. Yuan, and L. Sun, *A non-canonical teleost nk-lysin: Antimicrobial activity via multiple mechanisms*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(21): p. 12722.
127. Zhou, Q.-J., et al., *Molecular structure, expression and antibacterial characterization of a novel antimicrobial peptide NK-lysin from the large yellow croaker Larimichthys crocea*. *Aquaculture*, 2019. **500**: p. 315-321.
128. Zhu, R., et al., *Membrane disruptive antimicrobial potential of NK-lysin from yellow catfish (Pelteobagrus fulvidraco)*. *Fish & shellfish immunology*, 2020. **97**: p. 571-580.
129. Chen, Y., et al., *Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2007. **51**(4): p. 1398-1406.
130. Polyansky, A.A., et al., *N-terminal amphipathic helix as a trigger of hemolytic activity in antimicrobial peptides: a case study in laticins*. *FEBS letters*, 2009. **583**(14): p. 2425-2428.
131. Tossi, A., L. Sandri, and A. Giangaspero, *Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides*. *Peptide Science*, 2000. **55**(1): p. 4-30.
132. Yeaman, M.R. and N.Y. Yount, *Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance*. *Pharmacological reviews*, 2003. **55**(1): p. 27-55.
133. Khandelia, H., J.H. Ipsen, and O.G. Mouritsen, *The impact of peptides on lipid membranes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2008. **1778**(7-8): p. 1528-1536.
134. Hao, G., et al., *A synthetic peptide derived from NK-lysin with activity against Mycobacterium tuberculosis and its structure–function relationship*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2011. **17**(4): p. 301.
135. Fan, K., et al., *Expression and purification of the recombinant porcine NK-lysin in Pichia pastoris and observation of anticancer activity in vitro*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2016. **46**(1): p. 65-70.
136. Dassanayake, R.P., et al., *Antimicrobial activity of bovine NK-lysin-derived peptides on Mycoplasma bovis*. *PLoS One*, 2018. **13**(5): p. e0197677.
137. Yan, J.-x., et al., *Membrane active antitumor activity of NK-18, a mammalian NK-lysin-derived cationic antimicrobial peptide*. *Biochimie*, 2012. **94**(1): p. 184-191.
138. Valero, Y., E. Chaves-Pozo, and A. Cuesta, *NK-lysin is highly conserved in European sea bass and gilthead seabream but differentially modulated during the immune response*. *Fish & shellfish immunology*, 2020. **99**: p. 435-441.
139. Leon, R., et al., *Exploring small cationic peptides of different origin as potential antimicrobial agents in aquaculture*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020. **98**: p. 720-727.
140. Cui, Y., et al., *Vaccine adjuvants: current status, research and development, licensing, and future opportunities*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2024. **12**(17): p. 4118-4137.
141. Priya, T.J. and S. Kappalli, *Modern biotechnological strategies for vaccine development in aquaculture—prospects and challenges*. *Vaccine*, 2022. **40**(41): p. 5873-5881.
142. Hemmati, S., et al., *Immunomodulatory peptides as vaccine adjuvants and antimicrobial agents*. *Pharmaceuticals*, 2024. **17**(2): p. 201.
143. Reed, S.G., M.T. Orr, and C.B. Fox, *Key roles of adjuvants in modern vaccines*. *Nature*

- medicine, 2013. **19**(12): p. 1597-1608.
144. Zhao, T., et al., *Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms*. Signal transduction and targeted therapy, 2023. **8**(1): p. 283.
 145. Wang, Z.-B. and J. Xu, *Better adjuvants for better vaccines: Progress in adjuvant delivery systems, modifications, and adjuvant–antigen codelivery*. Vaccines, 2020. **8**(1): p. 128.
 146. Dong, J.C. and G.P. Kobinger, *Hypothesis driven development of new adjuvants: short peptides as immunomodulators*. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2013. **9**(4): p. 808-811.
 147. Lee, Y., et al., *Co-administration of chicken IL-7 or NK-lysin peptide 2 enhances the efficacy of Eimeria elongation factor-1 α vaccination against Eimeria maxima infection in broiler chickens*. Poultry science, 2022. **101**(9): p. 102013.
 148. Lee, Y., I. Park, and H.S. Lillehoj, *Oral administration of chicken NK-lysin or recombinant chicken IL-7 improves vaccine efficacy of Eimeria tenella elongation factor-1 α (EF-1 α) against coccidiosis in commercial broiler chickens*. Poultry Science, 2023. **102**(5): p. 102611.
 149. Acosta, J., et al., *Co-administration of tilapia alpha-helical antimicrobial peptides with subunit antigens boost immunogenicity in mice and tilapia (Oreochromis niloticus)*. Vaccine, 2014. **32**(2): p. 223-229.
 150. Wang, T., 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, 2016. **7**(10): p. 10917.
 151. Jiang, J., et al., *Differential transcriptomic response in the spleen and head kidney following vaccination and infection of Asian seabass with Streptococcus iniae*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e99128.