UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Programa de Doctorado en Biotecnología Molecular

PÉPTIDOS COMO POTENCIALES INMUNOMODULADORES Y ADYUVANTES MOLECULARES EN SALMÓNIDOS

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la
Universidad de Concepción para optar al grado de
Doctor en Biotecnología Molecular

POR:

MILTON FERNANDO VILLEGAS VILLEGAS

Profesor Guía: Dra. Jannel Acosta

Profesor Co-Guía: Dra. Raquel Montesino

Concepción, Chile, 2026

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. La tesis fue financiada por ANID BECAS/DOCTORADO NACIONAL, folio 21241566.

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

Dr. Ariel Valenzuela
Profesor Evaluador Interno
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dr. Frank Camacho
Profesor Evaluador Interno
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Alex Romero
Profesor Evaluador Externo
Universidad Austral de Chile

Dra. Raquel Montesino
Directora del Programa de Doctorado en Biotecnología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

© 2026, Milton Fernando Villegas Villegas
Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS . . . . . **XIII**
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ASOCIADA . . . . . **XIV**
GLOSARIO . . . . . **XVII**
RESUMEN . . . . . **XX**
ABSTRACT . . . . . **XXI**
1. Introducción **1**
1.1. Relevancia económica y productiva 1
1.1.1. La salmonicultura en Chile 1
1.1.2. Principales enfermedades infecciosas 3
1.1.3. Estrategias de control y prevención 4
1.1.3.1. Desinfectantes 5
1.1.3.2. Antibióticos 5
1.1.4. Vacunas en la salmonicultura 7
1.2. Desafíos en el control de bacterias intracelulares 10
1.2.1. Impacto de *Piscirickettsia salmonis* 10
1.2.2. Limitaciones de vacunas actuales frente a SRS 11
1.3. Respuesta inmune de teleósteos 12
1.3.1. Órganos y células del sistema inmune 13
1.3.2. Respuesta inmune innata 13
1.3.3. Receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y TLR 14
1.3.4. Respuesta inmune adaptativa 15
1.4. Adyuvantes e inmunomoduladores en peces 16
1.5. Adyuvantes clásicos en vacunas de peces 16
1.6. Nuevos inmunomoduladores en investigación 17
1.7. HMGB1 como inmunomodulador y/o adyuvante molecular . . 19

1.7.1. Estructura y funciones de HMGB1 en mamíferos . . . 19
1.7.2. HMGB1 como DAMP y sus receptores asociados . . 20
1.7.3. Presencia y roles de HMGB en peces 23
1.7.4. HMGB1 y activación de TLR5 en teleósteos 24
1.7.5. Péptidos derivados de HMGB1 como posibles adyuvantes 25
1.7.6. Relevancia para *Salmo salar* y perspectivas 26
2. Hipótesis **27**
3. Objetivos **28**
3.1. Objetivo general 28
3.2. Objetivos específicos 28
4. Metodología **29**
4.1. Identificación de plantillas y modelado del ectodominio de TLR5 de *Salmo salar* (SsTLR5) 29
4.1.1. Búsqueda de homología y selección de plantilla . . . 29
4.2. Modelado por homología y validación 29
4.3. Diseño *in silico* de péptidos derivados de HMGB1 y cribado computacional 30
4.3.1. Diseño y selección computacional de péptidos 30
4.3.2. Síntesis de péptidos 31
4.3.3. Dicroísmo circular 32
4.4. Ensayos de activación de la vía NF-κB 33
4.4.1. Tratamiento celular con péptidos 33
4.4.2. Preparación de lisados celulares, SDS-PAGE y Western Blot. 33
4.4.3. Inmunofluorescencia e imágenes confocales 34
4.5. Producción recombinante de HMGB1 (rHMGB1) en *E. coli* . 35
4.5.1. Clonaje y verificación 35

4.5.2. Expresión del gen que codifica HMGB1 en *E. coli* . . 35
4.6. Caracterización e identificación de HMGB1 recombinante (rHMGB1) 36
4.6.1. HMGB1 por Western blot 36
4.6.2. Digestión de proteínas en gel y preparación para nLC-MS/MS 37
4.6.3. LC-MS/MS (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry) 38
4.6.4. Identificación de Proteínas 39
4.7. Purificación de la proteína HMGB1 mediante cromatografía de afinidad a quelatos metálicos 39
4.8. Aislamiento de leucocitos del riñón anterior 40
4.9. Evaluación del efecto biológico de rHMGB1 y péptidos derivados en la línea celular SHK-1 41
4.9.1. Tratamiento con rHMGB1 y péptidos derivados 41
4.9.2. Ensayo de desafío con *Piscirickettsia salmonis* 42
4.10. Evaluación del efecto inmunomodular de HMGB1 y péptidos derivados *in vivo* en *Salmo salar* 44
4.11. Evaluación del potencial adyuvante de rHMGB1 y 11W en *Salmo salar* 45
4.12. Extracción de ARN y PCR en tiempo real 46
5. Resultados **51**
5.1. Diseño *in silico* y selección de péptidos 51
5.1.1. Modelamiento de SsTLR5 51
5.1.2. Mapeo de HMGB1 y definición de regiones candidatas 56
5.1.3. Identificación de bolsillos de interacción en SsTLR5 . 58
5.1.4. Diseño y selección de SsOri y variantes peptídicas (6W y 11W) 58

5.1.5. Docking y métricas comparativas 60
5.1.6. Validación estructural por dicroísmo circular 61
5.2. Producción de HMGB1 recombinante 63
5.2.1. Clonación y expresión de HMGB1 recombinante en *E. coli* 63
5.2.2. Confirmación de identidad por LC–MS/MS 64
5.2.3. Escalado de producción de HMGB1 en *E. coli* 66
5.2.4. Purificación mediante cromatografía de afinidad . . . 67
5.2.5. Diálisis, concentración y evaluación de pureza 69
5.3. Ensayos de activación de la vía NF-κB con péptidos derivados de HMGB1 71
5.3.1. Activación de NF-kappaB en HeLa/TLR5 71
5.3.2. Análisis de translocación nuclear de p65 75
5.4. Ensayos en la línea celular SHK-1 76
5.4.1. Expresión de genes y citoquinas inducida por SsHP91, 6W y 11W 76
5.4.2. Expresión de genes y citoquinas inducida por rHMGB1 79
5.4.3. Ensayo de desafío con *Piscirickettsia salmonis* en SHK-1 81
5.5. Ensayos *in vivo* en *Salmo salar* 83
5.5.1. Tratamiento con rHMGB1 y péptidos derivados en *Salmo salar* 83
5.5.2. Expresión de genes inmunes inducida por rHMGB1 en *Salmo salar* 84
5.5.2.1. Bazo 84
5.5.2.2. Riñón anterior 86
5.5.3. Expresión de genes inmunes inducida por péptidos derivados en *Salmo salar* 88

5.5.3.1. Bazo 88
5.5.3.2. Riñón anterior 90
5.6. Ensayo de rHMGB1 y 11W como adyuvante molecular en *Salmo salar* 93
5.6.1. Expresión de genes inmunes en riñón anterior y bazo post-inmunización 93
5.6.2. Evaluación de respuesta inmune humoral 94
5.7. Evaluación de respuesta inmune celular 97
6. Discusión **101**
6.1. Diseño racional e identificación de péptidos candidatos . . . 101
6.2. Activación de la vía NF-κB mediada por TLR5 103
6.3. Modulación de la respuesta inmune en células SHK-1 104
6.4. Actividad inmunoprotectora frente a *Piscirickettsia salmonis* . 107
6.5. Respuesta inmune *in vivo* en *Salmo salar* 108
6.6. Potencial adyuvante en modelo de vacunación con VP2 de IPNV 110
7. Conclusión **115**
BIBLIOGRAFÍA **117**

Índice de tablas

1. Diferencias principales entre el sistema inmune de peces y mamíferos. 15
2. Partidores utilizados en los ensayos de RT-qPCR. 48
3. Puntuación DOPE de los cinco modelos de ectodominio de SsTLR5 generados con Modeller. 54
4. Identificación de la proteína recombinante HMGB1 mediante LC–MS/MS. 65
5. Resumen de la expresión génica inducida por los péptidos SsHP91, 6W y 11W en células SHK-1. 78
6. Resumen de la expresión génica inducida por rHMGB1 en células SHK-1. 81
7. Expresión diferencial de citoquinas y genes inmunes inducida por rHMGB1 en bazo y riñón anterior de *Salmo salar*. 87
8. Expresión diferencial de citoquinas y genes inmunes inducida por péptidos derivados de HMGB1 en bazo y riñón anterior de *Salmo salar*. 92
9. Comparación de la activación de vías inmunes tras reestimulación a las 3 y 12 horas. 100

Índice de figuras

1. Estructura de la proteína HMGB1. 20
2. Activación de la vía NF-κB mediada por receptores tipo Toll (TLRs). 21
3. HMGB1 como mediador de la comunicación entre células necróticas y el sistema inmune. 22
4. Esquema experimental del tratamiento de células SHK-1 con rHMGB1 y péptidos derivados. 43
5. Esquema experimental del tratamiento in vivo de *Salmo salar* con rHMGB1 y péptidos derivados. 45
6. Esquema de inmunización y muestreo en *Salmo salar*. 46
7. Resumen esquemático del flujo experimental y principales aproximaciones del estudio. 52
8. Alineamiento de secuencias de TLR5 entre *Danio rerio* y *Salmo salar*. 53
9. Diagramas de Ramachandran con PROCHECK. 54
10. Perfiles de energía local obtenidos con ProSA. 55
11. Comparación estructural del ectodominio de TLR5 entre el modelo de *Salmo salar* y la plantilla de *Danio rerio*. 56
12. Alineamiento de secuencias de HMGB1 entre *Homo sapiens* y *Salmo salar*. 57
13. Alineamiento de secuencias de HMGB1 entre *Salmo salar* y otros teleósteos. 58
14. Interacción de péptidos derivados de HMGB1 con SsTLR5. . 59
15. Resultados de acoplamiento proteína–péptido con SsTLR5. . 61
16. Espectros de dicroísmo circular (CD) en el ultravioleta lejano de los péptidos SsOri, 6W y 11W. 62

17. Mapa del plásmido de expresión pET-29a (+). 63
18. Análisis de expresión de HMGB1 mediante SDS-PAGE al 12,5 %. 64
19. Cobertura de péptidos obtenida por LC–MS/MS para la proteína recombinante HMGB1. 65
20. Espectro de fragmentación del péptido MHHHHHHGKDPR identificado por nLC–MS/MS. 66
21. Expresión de HMGB1 en fermentación a 5 L analizada mediante SDS-PAGE al 12,5 %. 67
22. Cromatograma de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC). 68
23. SDS-PAGE al 12,5 % de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC). 69
24. SDS-PAGE al 15 % de la proteína recombinante HMGB1 tras diálisis. 70
25. SDS-PAGE al 12,5 % de la muestra control negativo utilizada en ensayos in vitro. 71
26. Activación de NF-κB en células HeLa/TLR5 estimuladas con los péptidos 6W y 11W. 73
27. Inmunodetección de p65 fosforilado e IκBα en células HeLa/TLR5 estimuladas con péptidos derivados de HMGB1. 74
28. Translocación nuclear de p65 inducida por péptidos derivados de HMGB1 en células HeLa/TLR5. 75
29. Expresión relativa de genes inmunes inducida por péptidos derivados de HMGB1 en la línea celular SHK-1. 77
30. Expresión relativa de genes inmunes inducida por rHMGB1 en la línea celular SHK-1. 80

31. Efecto de los péptidos 6W y 11W en la citotoxicidad inducida por *Piscirickettsia salmonis* en células SHK-1. . . . 82
32. Expresión relativa de genes inmunes inducida por rHMGB1 en el bazo de *Salmo salar*. 85
33. Expresión relativa de genes inmunes inducida por rHMGB1 en el riñón anterior de *Salmo salar*. 86
34. Expresión relativa de genes inmunes inducida por péptidos derivados de HMGB1 en el bazo de *Salmo salar*. 89
35. Expresión relativa de genes inmunes inducida por péptidos derivados de HMGB1 en el riñón anterior de *Salmo salar*. . . 91
36. Expresión relativa de genes inmunes en *Salmo salar* tras la inmunización con rHMGB1 y el péptido 11W como adyuvantes moleculares. 94
37. Producción de IgM específica frente a VP2 recombinante en suero de *Salmo salar* tras la administración de rHMGB1 y 11W como adyuvantes moleculares. 95
38. Título de anticuerpos IgM específicos en suero de *Salmo salar* a los 35 días postinmunización. 96
39. Expresión génica en células del riñón anterior de *Salmo salar* tras reestimulación in vitro a las 3 horas. 98
40. Expresión génica en células del riñón anterior de *Salmo salar* tras reestimulación in vitro a las 12 horas. 99

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su amor, apoyo y compañía incondicional a lo largo de este camino. Gracias por estar siempre presentes y por darme la fuerza para seguir adelante en los momentos más difíciles.

A mis amigos, por su cariño, paciencia y por acompañarme durante este proceso, haciendo más llevadero cada desafío.

Y a mis tutoras, Jannel y Raquel, por confiar en mí desde el inicio, por su apoyo constante y por guiarme con dedicación durante el desarrollo de esta tesis.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ASOCIADA

La presente tesis de doctorado fue dirigido por la Dra. Jannel Acosta y la Dra. Raquel Montesino en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. A partir de la investigación desarrollada en esta tesis se realizaron las siguientes actividades y se generaron los siguientes productos.

Presentaciones en congresos:

- Vásquez Suárez, A., Villegas, M. F., Muñoz, C., Carrera, C., Ortega, L., & Acosta, J. (2023). *Design of TLR5 agonist peptides derived from the acid tail of HMGB1 in* Salmo salar *as potential immunostimulants*. XLII Congreso de Ciencias del Mar, Puerto Montt, Chile.
- Villegas, M. F. (2023). *Péptidos derivados de HMGB1 como potenciales inmunomoduladores y/o adyuvantes moleculares en salmónidos*. Expo Póster 2023, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Villegas, M. F., Vásquez, A., Muñoz, C., Carrera, C., Ortega, L., Salazar, S., & Acosta, J. (2023). *Potential immunostimulant of* Salmo salar*'s HMGB1 and derived peptides*. XLVI Annual Meeting of the Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology, La Serena, Chile.
- Villegas, M. F., Vásquez, A., Muñoz, C., Carrera, C., Ortega, L., Salazar, S., & Acosta, J. (2023). *HMGB1 de* Salmo salar *y péptidos derivados como potencial inmunoestimulante*. XI Encuentro de Investigación de Estudiantes de Postgrado, Universidad del Bío-Bío, Concepción, Chile.
- Villegas, M. F. (2023). *Potential immunostimulant of* Salmo salar*'s*

HMGB1 and derived peptides. Open Innovation in Life Sciences (OILS 2023), Zúrich, Suiza.

- Villegas, M. F., Vásquez, A., Muñoz, C., Carrera, C., Ortega, L., & Acosta, J. (2024). *Diseño y caracterización funcional de péptidos agonistas de TLR5 de* Salmo salar *derivados de la cola ácida del grupo B1 de alta movilidad*. I Jornada Internacional de Biotecnología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Villegas, M. F., Vásquez, A., Muñoz, C., Carrera, C., Ortega, L., Salazar, S., & Acosta, J. (2025). *Structure-guided design of HMGB1-derived peptides as potential TLR5 agonists in* Salmo salar. NDM research and innovation day, University of Oxford, Oxford, United Kingdom.
- Villegas, M. F., Vásquez, A., Muñoz, C., Carrera, C., Ortega, L., Salazar, S., & Acosta, J. (2025). *Structure-guided design of HMGB1-derived peptides as potential TLR5 agonists in* Salmo salar. Fragment-Based Lead Discovery Conference, Cambridge, United Kingdom.
- Villegas, M. F., Vásquez, A., Muñoz, C., Carrera, C., Ortega, L., Salazar, S., & Acosta, J. (2026). *Structure-guided design of HMGB1-derived peptides as potential TLR5 agonists in* Salmo salar. CCP4 Study Weekend 2026, Nottingham, United Kingdom.

Artículos científicos:

- Carrera C., Villegas M. F., et al. (2025). *Evaluating the Adjuvant Potential of NK-Lysin and HMGB1-Derived Peptides in Enhancing Immune Responses in* Salmo salar. Fish and Shellfish Immunology, 164, 110462.
- Vásquez-Suárez A., Muñoz-Flores C., Ortega L., Villegas M. F., et al. (2024). *Design and functional characterization of* Salmo salar *TLR5*

agonist peptides derived from High Mobility Group B1 acidic tail. Fish and Shellfish Immunology, 146, 109373.

Patente:

- Acosta Alba, J., Villegas, M. F., et al. (2024). *Use of HMGB1 and SsHP91 from* Salmo salar *as immunomodulators and molecular adjuvants* (Patent Application No. 202403250). Instituto Nacional de Propiedad Industrial (INAPI), Chile.

GLOSARIO

11W	Péptido derivado de la cola ácida de HMGB1 de *Salmo salar*, diseñado mediante sustitución de triptófano en la posición 12.
6W	Péptido derivado de la cola ácida de HMGB1 de *Salmo salar*, diseñado mediante sustitución de triptófano en la posición 7.
ANOVA	Análisis de varianza.
BSA	Albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin*).
CFU	Unidades formadoras de colonia (*colony-forming units*).
DAMP	Patrón molecular asociado a daño (*damage-associated molecular pattern*).
DC	Dicroísmo circular.
DOPE	Potencial estadístico discreto optimizado para energía proteica (*discrete optimized protein energy*).
drTLR5	TLR5 de *Danio rerio*.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay*).
HeLa/TLR5	Línea celular HeLa que expresa TLR5 de forma estable para ensayos funcionales.
HMGB1	Proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad (*high mobility group box 1*).
IκB	Inhibidor de NF-κB.
IKK	Complejo cinasa de IκB.
IMAC	Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (*immobilized metal affinity chromatography*).

IPNV	Virus de la necrosis pancreática infecciosa (*infectious pancreatic necrosis virus*).
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido.
IRAK	Cinasa asociada al receptor de interleucina-1.
IRF	Factor regulador de interferón.
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.
LDH	Lactato deshidrogenasa.
LRR	Repeticiones ricas en leucina (*leucine-rich repeats*).
MOI	Multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*).
MyD88	Proteína adaptadora de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88.
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NLS	Señal de localización nuclear (*nuclear localization signal*).
OD600	Densidad óptica medida a 600 nm.
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos (*pathogen-associated molecular pattern*).
PBS	Solución tampón fosfato salino (*phosphate-buffered saline*).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptor*).
PVDF	Fluoruro de polivinilideno.
RAGE	Receptor para productos finales de glicación avanzada (*receptor for advanced glycation end products*).
rHMGB1	HMGB1 recombinante.

RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media (*root mean square deviation*).
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real con transcripción reversa.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
SHK-1	Línea celular derivada de riñón anterior de *Salmo salar*.
SRS	Septicemia rickettsial del salmón.
SsHP91	Péptido derivado del dominio B-box de HMGB1 de *Salmo salar*, homólogo funcional de Hp91.
SsOri	Péptido original derivado de la cola ácida de HMGB1 de *Salmo salar*, usado como secuencia de referencia.
SsTLR5	TLR5 de *Salmo salar*.
TAK1	Cinasa activada por TGF-β 1.
TBST	Solución tampón Tris salina con Tween 20.
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta.
TIRAP/Mal	Proteína adaptadora que contiene dominio TIR, también denominada Mal (*MyD88-adaptor-like*).
TLR	Receptor tipo Toll (*Toll-like receptor*).
TLR5M	Isoforma de TLR5 unida a membrana.
TLR5S	Isoforma soluble de TLR5.
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF.
TRAM	Molécula adaptadora relacionada con TRIF.
TRIF	Adaptador que contiene dominio TIR inductor de interferón-β.
VP2	Proteína de la cápside viral usada como antígeno modelo en el ensayo vacunal de IPNV.

RESUMEN

La salmonicultura enfrenta dificultades persistentes para controlar las enfermedades infecciosas, lo que ha impulsado la búsqueda de inmunomoduladores y adyuvantes moleculares capaces de mejorar la eficacia vacunal y reducir el uso de antibióticos, en cuyo marco HMGB1 y los péptidos derivados de esta proteína surgen como candidatos de interés.

El objetivo de este estudio fue caracterizar el efecto de HMGB1 recombinante (rHMGB1) y de péptidos derivados sobre la respuesta inmune innata y adaptativa de *Salmo salar*. Para ello, se realizaron análisis *in silico*, ensayos *in vitro* en células SHK-1 y HeLa/TLR5, evaluaciones *in vivo* en bazo y riñón anterior, y un modelo vacunal con VP2 del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).

rHMGB1 actuó como un DAMP con actividad inmunomoduladora amplia, al inducir genes proinflamatorios y asociados a respuesta T_H1, con un efecto más marcado en bazo. Los péptidos derivados presentaron respuestas más selectivas. Entre ellos, 11W destacó por inducir tempranamente IFN-γ en células SHK-1, promover la translocación nuclear de NF-κB en células HeLa/TLR5, reducir la citotoxicidad inducida por *Piscirickettsia salmonis* en SHK-1 y potenciar la respuesta celular tras la reestimulación en peces inmunizados. En cambio, 6W mostró una actividad más acotada y no evidenció protección funcional frente a *P. salmonis* en este modelo.

rHMGB1 demostró ser un inmunomodulador de amplio espectro, mientras que 11W es el péptido derivado de HMGB1 con mayor respaldo funcional como adyuvante molecular en salmónidos.

ABSTRACT

Salmon farming faces persistent challenges in the control of infectious diseases, creating a need for immunomodulators and molecular adjuvants that improve vaccine efficacy while reducing antibiotic use. Against this background, HMGB1 and HMGB1-derived peptides emerge as promising candidates.

This study aimed to characterize the effects of recombinant HMGB1 (rHMGB1) and HMGB1-derived peptides on innate and adaptive immune responses in *Salmo salar*. To address this, *in silico* analyses, *in vitro* assays in SHK-1 and HeLa/TLR5 cells, *in vivo* evaluations in spleen and head kidney, and a vaccination model using VP2 from infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) were performed.

rHMGB1 behaved as a broad immunomodulatory DAMP by inducing proinflammatory and T_H1-associated genes, with a stronger effect in the spleen. The derived peptides displayed more selective responses. Among them, 11W showed the strongest functional profile by inducing early IFN-γ expression in SHK-1 cells, driving NF-κB nuclear translocation in HeLa/TLR5 cells, reducing *Piscirickettsia salmonis*-induced cytotoxicity in SHK-1 cells, and enhancing the cellular response after restimulation in immunized fish. By contrast, 6W showed more limited activity and did not provide functional protection against *P. salmonis* in this cellular model.

rHMGB1 emerged as a broad-spectrum immunomodulator, whereas 11W was identified as the HMGB1-derived peptide with the strongest functional support as a molecular adjuvant candidate in salmonids.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

1.1. Relevancia económica y productiva

La salmonicultura es una de las actividades de mayor crecimiento dentro de la acuicultura a nivel global y constituye un pilar estratégico tanto para la seguridad alimentaria como para las economías de los países productores. Desde la introducción del cultivo de salmónidos en Chile en la década de 1980, la industria ha experimentado un desarrollo acelerado que posicionó al país como el segundo productor mundial, después de Noruega, y como el mayor exportador de salmónidos del hemisferio sur (Soto et al., 2019; Quiñones et al., 2019). Este sector se ha consolidado además como una de las principales actividades exportadoras no mineras de Chile, generando divisas y empleo en regiones australes como Los Lagos, Aysén y Magallanes, donde se concentra la mayor parte de los centros de cultivo. En este escenario, resulta pertinente revisar la relevancia económica y productiva de la salmonicultura chilena y los principales desafíos sanitarios que enfrenta.

1.1.1. La salmonicultura en Chile

Desde finales de la década de 1980, la industria acuícola chilena ha experimentado un enorme crecimiento, atribuido en gran medida al aumento de la producción de salmónidos, concretamente salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Quiñones et al., 2019). A noviembre de 2025, la cosecha acumulada de estas especies alcanzó 739.600, 235.700 y 46.200 toneladas, respectivamente.

Estas cifras reflejan un repunte productivo para el salmón del Atlántico (+14,2 %) y del Pacífico (+26,2 %), en contraste con la trucha arcoíris, que disminuyó un 21,6 % respecto al año anterior. En el ámbito comercial, las exportaciones sectoriales acumuladas a septiembre de 2025 sumaron 1.567,2 miles de toneladas por un valor de US$ 6.874,5 millones, donde la acuicultura representó el 75,7 % de dicha valoración. Estos volúmenes reafirman la posición de Chile como potencia global en la industria (SUBPESCA, 2025).

En el plano sanitario, si bien el uso de antimicrobianos mostró una reducción histórica en 2022-2023, con el indicador más bajo desde que se llevan registros (White, 2023), esta tendencia se revirtió en el último periodo. El informe anual de SERNAPESCA (2025b) confirmó que en 2024 se utilizaron 351,1 toneladas de antimicrobianos, situando el indicador de consumo (ICA) en 340 g/t, lo que representa un aumento del 10,8 % respecto al mínimo previamente alcanzado. Este incremento estuvo impulsado casi en su totalidad por tratamientos contra *Piscirickettsia salmonis* (>96 % del uso) en las regiones de Los Lagos y Aysén (Soto, 2025; SERNAPESCA, 2025b).

Estos datos muestran que, pese a su relevancia estratégica, la acuicultura chilena sigue sometida a una presión constante por enfermedades infecciosas que ponen en riesgo la producción (Hill, 2005). Por ello, una gestión sanitaria eficaz, que incluya vigilancia, reducción de la exposición a patógenos, control del uso de fármacos y desarrollo de vacunas más eficaces, es indispensable para la sostenibilidad del sector (Hill, 2005; Zhang and Hayney, 2018; Biering et al., 2005). A medida que la producción acuícola se intensifica, los peces se vuelven más susceptibles a las enfermedades infecciosas, con el consiguiente aumento de la mortalidad, lo que hace indispensable comprender la organización y el funcionamiento del sistema inmune de los peces para sostener la acuicultura como actividad económica (Biller-Takahashi and Urbinati, 2014).

1.1.2. Principales enfermedades infecciosas

En el cultivo de salmónidos marinos en Chile, las mortalidades se deben a múltiples causas, incluidos factores ambientales, infecciosos y mecánicos, con una distribución variable entre especies. Según el reporte de SERNAPESCA (2025a), en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) el perfil del año 2024 cambió respecto a años anteriores: la principal causa de mortalidad clasificada correspondió a causas infecciosas (22,1 %) y daño mecánico (21,6 %), desplazando a la eliminación (15,3 %) y a las causas ambientales a posiciones secundarias.

En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se mantuvo la tendencia observada en años previos, donde la eliminación de peces (descarte productivo) concentró la mayor parte de las salidas con un 38,6 %, seguida de la mortalidad infecciosa (25,3 %) y del daño mecánico (11,0 %). En el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), en tanto, las causas infecciosas representaron el 16,3 % y las ambientales el 11,8 %; dentro de las infecciosas destacó el Síndrome Ictérico como el principal agente, al concentrar el 55,3 % de los casos en esta especie (SERNAPESCA, 2025a).

Dentro de las causas infecciosas, la Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS), provocada por la bacteria intracelular facultativa *Piscirickettsia salmonis*, continúa siendo el principal desafío sanitario. No obstante, su prevalencia relativa ha variado: según el reporte más reciente de SERNAPESCA (2025a), en el salmón del Atlántico la SRS fue responsable del 43,1 % de las mortalidades infecciosas durante el año 2024. A pesar de esta disminución porcentual respecto a años previos, se mantiene como el patógeno de mayor prevalencia en la etapa de engorda, consolidándose como uno de los problemas más persistentes para la industria (Happold et al., 2020).

Otras enfermedades bacterianas presentes en el país incluyen

la renibacteriosis, causada por *Renibacterium salmoninarum,* y la tenacibaculosis, causada por *Tenacibaculum maritimum*, aunque su impacto económico es menor que el de SRS. En el ámbito viral, destacan la necrosis pancreática infecciosa (IPNv) y la anemia infecciosa del salmón (ISAv), esta última responsable de brotes esporádicos en el sur de Chile con importantes pérdidas productivas (SERNAPESCA, 2022b, 2025a; SUBPESCA, 2025).

Finalmente, entre los parásitos, el piojo de mar (*Caligus rogercresseyi*) representa una amenaza constante, dado que sus infestaciones provocan lesiones dérmicas, predisposición a infecciones secundarias, mortalidad y elevados costos asociados al control mediante antiparasitarios (Bravo et al., 2010; SERNAPESCA, 2025a,b).

La Piscirickettsiosis (SRS) persiste como la principal limitante sanitaria para la salmonicultura chilena, especialmente en *S. salar*. Aunque los programas de vigilancia han permitido monitorear su impacto, el control efectivo de esta enfermedad sigue siendo un desafío. Esto se refleja en la dificultad para erradicar el patógeno durante la fase más crítica del cultivo: en 2024, el 63,6 % de los Centros de Alta Diseminación (CAD) se concentró en la etapa de término de engorda/cosecha, lo que maximiza su impacto económico (SERNAPESCA, 2025a). Esta persistencia, sumada a la influencia de factores ambientales, refuerza la necesidad de avanzar hacia estrategias terapéuticas y preventivas más sostenibles.

1.1.3. Estrategias de control y prevención

El control de enfermedades infecciosas en la salmonicultura chilena se ha basado históricamente en el uso de desinfectantes, antibióticos y vacunas (Zhang and Hayney, 2018). Si bien estas herramientas han permitido sostener la productividad de la industria, su eficacia es heterogénea, y cada una presenta limitaciones asociadas a seguridad, resistencia antimicrobiana,

impacto ambiental o cobertura inmunológica (Quiñones et al., 2019).

1.1.3.1. Desinfectantes

La implementación de principios sólidos de bioseguridad, descontaminación, desinfección y saneamiento desempeña un papel fundamental en la prevención y el control de la propagación de patógenos animales (Ford, 1995). En la acuicultura del salmón, los desinfectantes pueden garantizar la bioseguridad en las granjas, siendo utilizados para reducir o eliminar microorganismos patógenos en superficies y equipos (Ford, 1995; Quiñones et al., 2019).

En la acuicultura chilena se ha reportado el uso de desinfectantes, tales como Virkon®, yodo, Cloramina-T, hipoclorito ($HClO_2$), dióxido de cloro (ClO_2), cloruro de benzalconio, Superquats®, glutaraldehído, formalina 40 %, óxido de calcio (CaO), hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$), carbonato de sodio (Na_2CO_3), Creolin, fenoles sintéticos, halofenoles y etanol (95 % y 70 %). Estos productos químicos han sido utilizados para inactivar bacterias y virus patógenos en equipos de cría, tuberías de agua de mar, mangueras de aire, tanques, redes, así como en las manos y el calzado del personal (Quiñones et al., 2019).

1.1.3.2. Antibióticos

El suministro de antibióticos mediante piensos medicados es el principal método utilizado para controlar y tratar brotes de infecciones bacterianas en acuicultura, mientras que los baños de inmersión son poco frecuentes (Smith et al., 2009; SERNAPESCA, 2022b, 2025b). La normativa chilena, Resolución Exenta N° 8228, prohíbe su uso preventivo y los restringe a fines terapéuticos bajo prescripción veterinaria. Aun así, una parte importante de estos fármacos se libera al ambiente a través del alimento no consumido, la orina y las heces (Miranda et al., 2018). Esa liberación favorece su acumulación en sedimentos, con el consiguiente riesgo de resistencia bacteriana en especies bentónicas

(Shah et al., 2014) y de alteraciones en la composición y función de los ecosistemas (Quiñones et al., 2019).

El uso de antibióticos en la producción de salmón en Chile ha suscitado preocupación debido a sus altas tasas de uso en comparación con otros países (Ana Millanao et al., 2011; SUBPESCA, 2025). Esto se debe principalmente al desafío que representa abordar la presencia de *P. salmonis* a través de la vacunación (Figueroa et al., 2019). Según el reporte más reciente de SERNAPESCA (2025b), en la fase de engorda en agua de mar, el 96,15 % de los antibióticos utilizados se destinaron al tratamiento de la Piscirickettsiosis (SRS), seguido por un 2,63 % para Renibacteriosis y un 0,95 % para Tenacibaculosis.

En 2024, se registró que la industria salmonera en Chile utilizó aproximadamente 351,1 toneladas de principios activos de antibióticos, y el índice de consumo, que es la relación entre la cantidad de antibiótico utilizada y la tonelada de biomasa cosechada, fue del 0,034 %. En la fase de agua dulce, los antibióticos más utilizados fueron, oxitetraciclina (72,52 %), florfenicol (23,64 %) y doxiciclina (3,43 %). En cambio, en la fase de engorda marina, el 96,98 % de los antibióticos correspondió al florfenicol, seguido por el 2,56 % de oxitetraciclina y el 0,46 % de tiamulina. (SERNAPESCA, 2025b; SUBPESCA, 2025).

El uso en exceso de antibióticos en la acuicultura chilena puede favorecer el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos utilizados en medicina humana, como la oxitetraciclina, el ácido oxolínico y el florfenicol (Ana Millanao et al., 2011; Shah et al., 2014; Figueroa et al., 2019). A nivel global, se ha evidenciado que las bacterias presentes en zonas afectadas por la acuicultura son más resistentes a los antibióticos y pueden transferir dicha resistencia a bacterias de áreas no contaminadas. En Chile ya se ha reportado la presencia

de resistencia a antibióticos en *P. salmonis* (Quiñones et al., 2019). Estos antecedentes, sumados a los datos actuales, mantienen la alerta: si bien el volumen total ha disminuido respecto al máximo histórico de 2021 (463,4 t), en 2024 se registró un cambio de tendencia negativo con un aumento del consumo total a 351,1 toneladas y un incremento del índice de consumo (ICA) a 0,034 % (340 g/t) en comparación con el año 2023, interrumpiendo así la baja sostenida de los últimos periodos (SERNAPESCA, 2025a; SUBPESCA, 2025).

1.1.4. Vacunas en la salmonicultura

Las vacunas constituyen la herramienta preventiva más relevante en la acuicultura moderna. Suelen estar compuestas por un antígeno, diana de la respuesta inmunitaria, y un adyuvante, un compuesto coadministrado destinado a promover la respuesta inmunitaria al antígeno (Moyer et al., 2016).

En peces, las vacunas convencionales han consistido principalmente en bacterias inactivadas (bacterinas), aunque también se han comercializado vacunas vivas atenuadas y, más recientemente, algunas vacunas recombinantes formuladas con adyuvantes (Ulmer et al., 2012).

La mayoría de las vacunas autorizadas en acuicultura se producen mediante métodos clásicos de inactivación física, química o radiación, sin comprometer la antigenicidad del agente (Ma et al., 2019; Tlaxca et al., 2015). Estas vacunas inactivadas presentan varias ventajas: son estables en condiciones de campo, seguras para el medio ambiente y más económicas de producir (Biering et al., 2005; Mondal and Thomas, 2022).

Sin embargo, inducen predominantemente respuestas humorales con poca activación de la inmunidad celular, lo que conlleva títulos de anticuerpos de corta duración y eficacia limitada frente a patógenos intracelulares como *Piscirickettsia salmonis* (Zepp, 2016). Además, requieren adyuvantes o

múltiples refuerzos para alcanzar inmunidad protectora (Schijns et al., 2020).

Por otro lado, las vacunas vivas atenuadas se preparan a partir de virus o bacterias con virulencia reducida, obtenida mediante pases en cultivo celular, condiciones anormales o manipulación genética (Mondal and Thomas, 2022). A diferencia de las inactivadas, conservan la capacidad de ingresar y replicarse parcialmente en el huésped, lo que genera una respuesta más cercana a la infección natural, con fuerte inmunidad humoral y celular y memoria duradera (Ma et al., 2019; Tlaxca et al., 2015). Estas características explican su mayor eficacia y la menor necesidad de adyuvantes. No obstante, presentan riesgos potenciales: reversiones a la virulencia, efectos residuales en peces inmunocomprometidos y posibles contaminaciones con organismos indeseados, lo que puede afectar su seguridad y su aprobación regulatoria (Steinhagen et al., 2023).

Las vacunas de subunidades constituyen otra estrategia, basada en componentes antigénicos específicos en lugar del patógeno completo. Su principal ventaja radica en la seguridad, ya que no existe riesgo de patogenicidad para peces ni para especies no objetivo (Hansson et al., 2000; Mishra et al., 2023). Pueden producirse de manera estandarizada, liofilizarse y transportarse sin refrigeración, lo que las hace atractivas desde el punto de vista logístico (Zheng et al., 2023).

Sin embargo, al incluir un número limitado de antígenos y carecer de replicación, tienden a ser menos inmunogénicas y dependen de adyuvantes potentes para generar una respuesta adecuada (Moyer et al., 2016). Por esta razón, pese al interés académico, aún no se han implementado ampliamente en la acuicultura comercial (Mishra et al., 2023; Schijns et al., 2020).

En Chile, la oferta de vacunas comerciales para salmónidos se ha diversificado para incluir bacterinas inactivadas, vacunas vivas atenuadas y tecnologías

de subunidad, administradas principalmente vía intraperitoneal en la etapa de smolt (Rozas-Serri et al., 2017; Rozas-Serri, 2022), aunque existen estrategias complementarias de inmersión y orales en desarrollo.

Según el registro oficial del SAG (2025), entre las formulaciones vigentes destacan líneas consolidadas como ALPHA JECT® (Pharmaq), BLUEGUARD® (Centrovet), RICKEMUNE® (Veterquimica) y PENTIUMFORTE (Elanco), sumándose opciones más recientes como la línea PROVIDEAN AQUATEC (Tecnovax) y la vacuna viva LiVac® SRS (Pharmaq), diseñada para potenciar la respuesta inmune celular (Rozas-Serri et al., 2024; SAG, 2025; Rozas-Serri, 2022). No obstante, la eficacia de estas herramientas frente a *Piscirickettsia salmonis* sigue siendo un desafío complejo: investigaciones recientes advierten que la protección cruzada entre genogrupos (LF-89 y EM-90) es incompleta, lo que ha impulsado iniciativas como la “Alianza Yelcho” para acelerar el desarrollo de soluciones biotecnológicas más efectivas y reducir la dependencia de antibióticos (SalmonChile, 2024; Figueroa et al., 2022; Rozas-Serri et al., 2024).

La vacunación en salmonicultura enfrenta aún desafíos importantes: inducir respuestas inmunes celulares robustas y duraderas, garantizar la protección frente a patógenos intracelulares y reducir la dependencia de antibióticos. Una “vacuna ideal” para peces debería ser segura para el animal y el medio ambiente, económicamente viable para la producción masiva, fácil de administrar, capaz de inducir una inmunidad fuerte en los periodos críticos de susceptibilidad y con efectos adversos mínimos (Rozas-Serri, 2022).

El diseño de nuevas vacunas deberá incorporar no solo antígenos más efectivos, sino también adyuvantes innovadores que potencien la inmunidad adaptativa. Esta necesidad es el marco en el cual emergen moléculas endógenas como HMGB1 y sus derivados como posibles adyuvantes

alternativos.

1.2. Desafíos en el control de bacterias intracelulares

Las bacterias intracelulares representan un desafío significativo en medicina y en acuicultura, ya que se desarrollan y multiplican dentro de las células del hospedador, lo que les permite evadir los mecanismos inmunes humorales y reducir la eficacia de los antibióticos y de las vacunas convencionales (Rozas-Serri, 2022). Su control depende en gran medida de la capacidad del hospedador para generar una respuesta inmune celular eficaz, principalmente mediada por linfocitos T citotóxicos y por macrófagos activados. En peces, esta rama de la inmunidad adaptativa está menos caracterizada que en mamíferos, lo que dificulta el diseño de intervenciones preventivas efectivas (Irshath et al., 2023).

1.2.1. Impacto de *Piscirickettsia salmonis*

En la salmonicultura chilena, la bacteria intracelular facultativa *Piscirickettsia salmonis* es el patógeno de mayor impacto económico y sanitario. Es el agente causal de la Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS), responsable de aproximadamente el 43,1 % de las mortalidades infecciosas en *Salmo salar* durante el último periodo (SERNAPESCA, 2025b). Este microorganismo infecta macrófagos y otras células del sistema fagocítico-mononuclear, donde sobrevive y se multiplica, lo que le permite evadir la destrucción fagocítica y establecer infecciones crónicas (Cvitanich et al., 1991; Rozas-Serri et al., 2017).

El control de SRS se ha basado en el uso intensivo de antibióticos, particularmente florfenicol y oxitetraciclina (Happold et al., 2020; Caruffo et al., 2021). Sin embargo, la naturaleza intracelular de la bacteria limita la penetración de los fármacos, reduciendo su eficacia en peces infectados

(Shah et al., 2014; Jakob et al., 2014). Como resultado, Chile ha registrado históricamente los niveles más altos de uso de antibióticos en la acuicultura mundial (Bravo et al., 2010; SERNAPESCA, 2022a; SUBPESCA, 2025; SERNAPESCA, 2025b) con incrementos recientes en periodos de brotes severos (Soto, 2025).

En paralelo, se han desarrollado vacunas comerciales contra *P. salmonis* (bacterinas, vivas atenuadas y recombinantes). No obstante, los resultados en condiciones de campo han sido limitados, con protección parcial y variable, lo que no ha permitido reducir significativamente la dependencia de antibióticos (Rozas-Serri, 2022; Rozas-Serri et al., 2024). Estas limitaciones se explican por la necesidad de inducir una respuesta celular robusta, algo que las bacterias inactivadas actuales no logran en peces.

En consecuencia, *P. salmonis* representa un modelo paradigmático de patógeno intracelular en peces, que evidencia brechas en el desarrollo de vacunas más efectivas. Esto justifica la búsqueda de nuevas estrategias de inmunoestimulación, como el uso de adyuvantes innovadores dirigidos a potenciar la inmunidad celular y modular la respuesta adaptativa frente a infecciones intracelulares.

1.2.2. Limitaciones de vacunas actuales frente a SRS

La Piscirickettsiosis continúa siendo el principal desafío sanitario de la salmonicultura chilena a pesar de la disponibilidad de vacunas comerciales.

Las principales limitaciones de estas vacunas derivan de la naturaleza intracelular de *P. salmonis*. Al replicarse en macrófagos y otras células fagocíticas, la bacteria evade las respuestas humorales inducidas por las vacunas inactivadas, generando infecciones persistentes (Rozas-Serri et al., 2017). Por esta razón, la inmunidad protectora requiere la activación de respuestas celulares (linfocitos T y macrófagos activados), un aspecto en el

que las vacunas inactivadas actuales muestran escasa eficacia.

A estas limitaciones inmunológicas se suman otros factores que reducen la efectividad de la vacunación en campo:

- Variabilidad genética de las cepas de *P. salmonis* circulantes en Chile, lo que disminuye la cobertura de vacunas diseñadas con antígenos de cepas específicas (Pulgar et al., 2015; Fuentes et al., 2022).
- Condiciones ambientales y de manejo intensivo, que generan estrés fisiológico en los peces y comprometen la respuesta vacunal (Ji et al., 2020; Mishra et al., 2023).
- Duración limitada de la inmunidad inducida, que obliga a considerar refuerzos que no siempre son factibles en fases de engorda (Irshath et al., 2023).

Como resultado, la vacunación contra SRS no ha logrado un impacto significativo en la disminución del uso de antimicrobianos, lo que subraya la necesidad de desarrollar nuevas estrategias vacunales y adyuvantes que potencien la inmunidad celular y mejoren la protección en condiciones de cultivo reales.

1.3. Respuesta inmune de teleósteos

El estudio de la inmunidad en peces teleósteos es fundamental para comprender los mecanismos de defensa frente a patógenos y para desarrollar estrategias de prevención en la acuicultura, especialmente en la salmonicultura chilena. Aunque comparten una organización inmunitaria básica con los mamíferos, los teleósteos presentan particularidades anatómicas, celulares y moleculares que condicionan tanto la eficacia de las respuestas inmunes como el diseño de vacunas y adyuvantes.

Entre estas diferencias destacan la ausencia de médula ósea y de ganglios linfáticos, la dependencia de órganos linfoides alternativos, como el riñón anterior y el bazo, así como variaciones en los repertorios de inmunoglobulinas y de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Comprender estas características es esencial para explicar la susceptibilidad diferencial de los peces frente a bacterias intracelulares, como *Piscirickettsia salmonis*, y para diseñar intervenciones inmunológicas más efectivas.

1.3.1. Órganos y células del sistema inmune

A diferencia de los mamíferos, los peces teleósteos carecen de médula ósea y de ganglios linfáticos como órganos linfoides primarios y secundarios. En su lugar, el riñón anterior (o riñón cefálico), el timo y el bazo cumplen funciones hematopoyéticas e inmunológicas equivalentes (Rombout et al., 2005; Workenhe et al., 2010). El riñón anterior se asemeja a la médula ósea de los mamíferos en su rol hematopoyético; el timo participa en la maduración de linfocitos T y el bazo actúa como órgano linfoide secundario clave en la respuesta adaptativa (Magnadóttir, 2006; Rozas-Serri, 2022).

Los teleósteos cuentan con una amplia variedad de células inmunitarias, comparables a las de los mamíferos, entre ellas macrófagos, neutrófilos, monocitos, trombocitos, células dendríticas, linfocitos B y T, células plasmáticas y células natural killer (NK) (Workenhe et al., 2010). Sin embargo, sus mecanismos de maduración y activación presentan diferencias relevantes.

1.3.2. Respuesta inmune innata

Las barreras físicas y químicas, como la piel y las mucosas, constituyen la primera línea de defensa. Estas secretan mucus con péptidos antimicrobianos y lisozimas que impiden la colonización de patógenos (Bravo and Midtlyng, 2007). A nivel celular, participan macrófagos, granulocitos, células dendríticas

y células de tipo NK.

La inmunidad innata de peces depende en gran medida del reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP) (Branson and Díaz-Muñoz, 1991) y Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMP) (Cvitanich et al., 1991) mediante Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR) (Smith et al., 1997), entre los que se destacan los Receptores de Tipo Toll (TLR) (McCarthy et al., 2008). La activación de estos receptores inicia cascadas de señalización a través de MyD88 o TRIF, que culminan en la producción de citoquinas proinflamatorias e interferones tipo I (Magnadóttir, 2006; Biller-Takahashi and Urbinati, 2014). Esta respuesta rápida y general es esencial, ya que la inmunidad adaptativa de los peces se activa más lentamente que en los mamíferos.

1.3.3. Receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y TLR

Hasta la fecha se han descrito más de 20 TLR en teleósteos (Zhou et al., 2018b). Aunque comparten propiedades con los de mamíferos, presentan particularidades notables:

- TLR5 se encuentra en dos formas: de membrana (TLR5M) y soluble (TLR5S), ambas capaces de reconocer la flagelina bacteriana. TLR5S es único de peces y actúa como receptor secretado que potencia la activación inmune (Rebl et al., 2010).
- TLR4 no es funcional en teleósteos para el reconocimiento de lipopolisacárido (LPS), lo que sugiere la existencia de rutas alternativas para la detección de bacterias Gram negativas (Sepulcre et al., 2009).
- TLR3 presenta un espectro más amplio que en mamíferos, ya que reconoce tanto patrones virales como bacterianos (Abós et al., 2015).
- Los ortólogos de TLR6 y TLR10 están ausentes en peces (Zhou et al.,

2018b).

Estas diferencias reflejan adaptaciones evolutivas a ambientes acuáticos y explican, en parte, la variabilidad en la respuesta a patógenos intracelulares.

1.3.4. Respuesta inmune adaptativa

El sistema inmune adaptativo de los teleósteos incluye receptores de antígeno de células T, moléculas del MHC de clase I y II, y un repertorio limitado de inmunoglobulinas, representado por IgM, IgD e IgT/IgZ (Sunyer, 2013; Dornburg et al., 2021). Aunque expresan la enzima AID, esencial en la hipermutación somática, los peces no desarrollan centros germinales, lo que limita la afinidad y duración de la memoria inmunológica (Flajnik and Kasahara, 2009).

Por ello, en comparación con mamíferos, la respuesta adaptativa de peces es más lenta, presenta anticuerpos de menor afinidad y genera una memoria más débil. Estas diferencias están resumidas en la Tabla 1, que compara las características principales de la inmunidad adaptativa en peces y mamíferos.

Tabla 1: Diferencias principales entre el sistema inmune de peces y mamíferos.

Característica	Peces	Mamíferos
Afinidad de anticuerpos	Baja	Alta
Respuesta de anticuerpos	Lenta	Rápida
Respuesta de memoria	Débil	Fuerte
Dependencia de la temperatura	Alta dependencia	Baja dependencia

Comparación de parámetros inmunológicos clave entre peces y mamíferos. En peces, la afinidad y la respuesta de anticuerpos son más bajas y lentas, respectivamente, con una memoria inmunológica débil y una fuerte dependencia de la temperatura. En contraste, los mamíferos presentan una respuesta más

> eficiente, con anticuerpos de alta afinidad, memoria inmunológica robusta y menor influencia de la temperatura.

1.4. Adyuvantes e inmunomoduladores en peces

El éxito de una vacuna no depende únicamente del antígeno que la compone, sino también de la capacidad del adyuvante para potenciar la inmunidad inducida (Albers et al., 2007). En peces, este aspecto cobra especial relevancia debido a las particularidades de su sistema inmune, como la lenta maduración de la respuesta adaptativa y la limitada memoria inmunológica (Zhang and Hayney, 2018). Los adyuvantes no solo aumentan la magnitud de la respuesta inmunitaria, sino que también determinan su calidad (humoral vs. celular) y duración. En salmonicultura, donde los principales patógenos son bacterias intracelulares como *Piscirickettsia salmonis*, la selección de adyuvantes capaces de inducir respuestas celulares robustas es un desafío crítico (Schijns et al., 2020).

1.5. Adyuvantes clásicos en vacunas de peces

Los adyuvantes más empleados en vacunas comerciales para peces son las emulsiones oleosas, principalmente de tipo agua en aceite (w/o) o aceite en agua (o/w) (Tafalla et al., 2013). Estos adyuvantes prolongan la liberación del antígeno y estimulan la producción sostenida de anticuerpos (Mutoloki et al., 2015). En Chile, la gran mayoría de las vacunas aplicadas en smolts (pez joven) contra bacterias como *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *P. salmonis* están formuladas con adyuvantes oleosos (Rozas-Serri, 2022).

Si bien estas formulaciones han demostrado eficacia en la prevención de enfermedades extracelulares, presentan limitaciones importantes:

- Inducen principalmente respuestas humorales, con escasa activación de

la inmunidad celular (Mutoloki et al., 2015; Mokhtar et al., 2023).

- Su eficacia frente a patógenos intracelulares como *P. salmonis* es limitada (Moyer et al., 2016; Zhang and Hayney, 2018).
- Pueden generar efectos adversos locales, como inflamación crónica, melanización de la cavidad peritoneal, formación de granulomas y disminución del crecimiento (Mutoloki et al., 2015).

Otros adyuvantes clásicos utilizados incluyen el hidróxido de aluminio, con efecto principalmente sobre la producción de anticuerpos, y las sales minerales, aunque su uso en peces es mucho más restringido que en mamíferos debido a reacciones adversas y eficacia inconsistente (Tafalla et al., 2013).

1.6. Nuevos inmunomoduladores en investigación

En los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de inmunomoduladores como herramientas para fortalecer la respuesta inmune de los peces y mejorar su resistencia frente a patógenos en sistemas de cultivo intensivo. Entre los compuestos más estudiados se encuentran los β-glucanos, polisacáridos presentes en las paredes celulares de hongos y bacterias, que estimulan la inmunidad innata a través de receptores de lectinas tipo C y promueven la activación de macrófagos y neutrófilos. Asimismo, el lipopolisacárido (LPS), un componente de la membrana externa de bacterias Gram negativas, ha sido utilizado experimentalmente como inmunoestimulador, ya que activa la producción de citoquinas proinflamatorias y la señalización a través de PRR como los TLR (Das et al., 2016). Otro inmunomodulador explorado en acuicultura es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuyas fracciones celulares y derivados han demostrado mejorar parámetros inmunitarios y aumentar la resistencia de peces a infecciones

bacterianas (Ching et al., 2021).

El papel de los adyuvantes en este contexto es doble: (a) facilitar la entrega del antígeno a células presentadoras especializadas y (b) activar el sistema inmune innato de forma controlada para guiar la inmunidad adaptativa hacia un perfil deseado (Zhang and Hayney, 2018). Con este fin, los adyuvantes modernos suelen combinar sistemas de liberación, como emulsiones, liposomas o nanopartículas poliméricas, con inmunomoduladores que imitan PAMPs o DAMPs, capaces de interactuar directamente con PRR de las células inmunitarias. Entre estos se incluyen agonistas de TLR, receptores de lectina tipo C (CLR), receptores tipo Nod (NLR) y receptores tipo RIG (RLR) innatas (Schijns et al., 2020; Moyer et al., 2016).

En las vacunas vivas atenuadas, el propio patógeno actúa como antígeno y adyuvante, ya que sus ácidos nucleicos y patrones moleculares asociados al microbio estimulan directamente PRR. En contraste, muchas de las vacunas en desarrollo utilizan proteínas recombinantes definidas, que requieren adyuvantes específicos para inducir una respuesta protectora. Ejemplos de estos inmunomoduladores incluyen el monofosforil lípido A (MPLA), agonista de TLR4; los oligonucleótidos CpG, activadores de TLR9; y el ácido polinosínico:policidílico (poly I:C), análogo de ARN de doble hebra que activa TLR3 (Moyer et al., 2016).

Dependiendo de la naturaleza del antígeno y del adyuvante empleado, los epítopos derivados pueden procesarse y cargarse en moléculas del MHC de clase I o II. Los antígenos procesados por la vía endosomal son presentados en MHC-II, lo que conduce a la activación de linfocitos T CD4+ mediante la interacción con el TCR y moléculas coestimuladoras, mientras que los antígenos derivados de proteínas endógenas tienden a presentarse en MHC-I y estimulan linfocitos T CD8+ citotóxicos (Schijns et al., 2020).

De esta forma, el diseño de vacunas eficaces en peces requiere avanzar hacia la combinación estratégica de antígenos con inmunomoduladores dirigidos, capaces de inducir respuestas celulares y humorales equilibradas, maximizando la inmunogenicidad sin generar respuestas inflamatorias excesivas. Estos desarrollos representan un cambio de paradigma frente a los adyuvantes clásicos, orientando el uso de señales inmunológicas específicas para enfrentar patógenos complejos como *Piscirickettsia salmonis*.

1.7. HMGB1 como inmunomodulador y/o adyuvante molecular

1.7.1. Estructura y funciones de HMGB1 en mamíferos

La proteína *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) es una proteína cromosómica no histona altamente conservada, expresada de manera ubicua en la mayoría de los tipos celulares. El gen se localiza en el cromosoma 13q12.3 y codifica una proteína nuclear de 215 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 25 kDa (Landsman and Bustin, 1993; Verrijdt et al., 2002). Su estructura comprende dos dominios principales, la Caja A (residuos 9–79) y la Caja B (95–163), unidos por un péptido enlazador, y una cola C-terminal altamente ácida (Chen et al., 2022a; Ge et al., 2021).

En el núcleo, HMGB1 participa en la estabilización del nucleosoma, la reparación y replicación del ADN, así como en la recombinación V(D)J. En el citoplasma, regula procesos de apoptosis y autofagia (Chen et al., 2022a). De forma extracelular, HMGB1 actúa como una molécula de señalización que promueve la inflamación mediante la inducción de citocinas y el reclutamiento de leucocitos (Venereau et al., 2016; Saenz et al., 2010).

HMGB1 puede encontrarse en tres isoformas redox: sulfonilo, disulfuro y totalmente reducido. Solo la isoforma disulfuro posee propiedades proinflamatorias comparables a las de una citocina (Li et al., 2003).

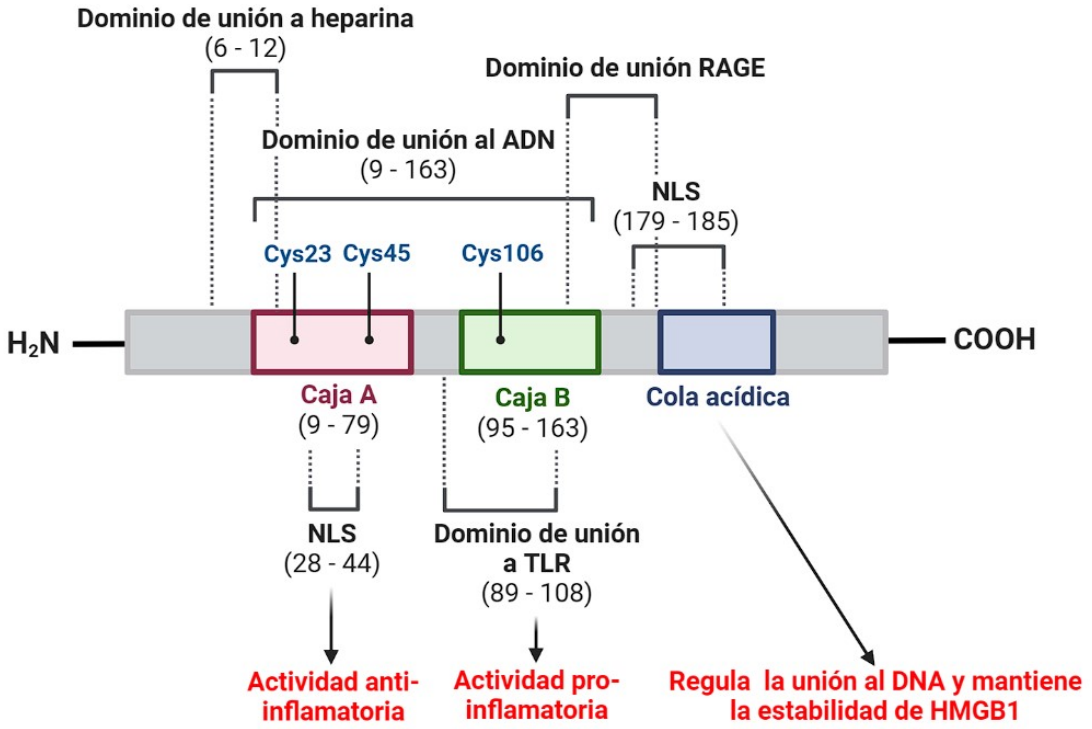

Figura 1: Estructura de la proteína HMGB1.

> La proteína HMGB1 está compuesta por 215 residuos de aminoácidos y presenta tres regiones principales: caja A (aa 9–79), caja B (aa 95–163) y una cola ácida C-terminal (aa 186–215). La caja A se asocia a funciones antiinflamatorias, mientras que la caja B participa en actividades proinflamatorias mediadas por citocinas. La cola ácida regula la unión al ADN y la estabilidad de la proteína. Se indican además los residuos de cisteína (Cys23, Cys45 y Cys106), los sitios de localización nuclear (NLS) y los dominios de interacción con receptores TLR y RAGE. Figura creada en BioRender.

1.7.2. HMGB1 como DAMP y sus receptores asociados

HMGB1, como DAMP es reconocida por distintos receptores, entre ellos:

- RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products): un receptor transmembrana de la superfamilia de inmunoglobulinas, implicado en inflamación, quimiotaxis y proliferación celular (Dong et al., 2022; (Teissier and Boulanger, 2019)).
- TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9, cuya interacción con HMGB1 activa vías de

señalización dependientes de NF-κB y MyD88, induciendo producción de citocinas como IL-6, TNF-α y TGF-β (Conti et al., 2013; (Venereau et al., 2016; Das et al., 2016)).

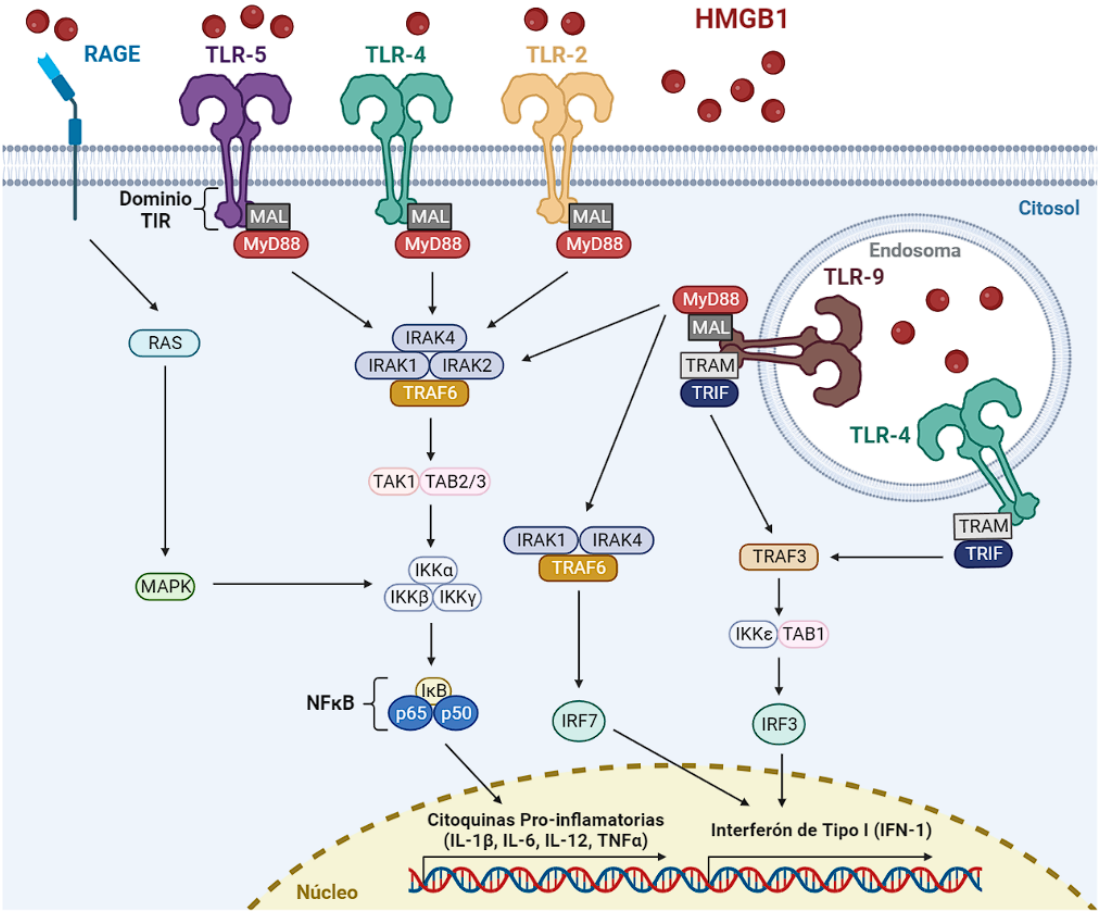

Figura 2: Activación de la vía NF-κB mediada por receptores tipo Toll (TLRs).

La proteína HMGB1 puede interactuar con distintos receptores de reconocimiento de patrones, incluyendo TLR2, TLR4, TLR5, TLR9 y RAGE. Tras la unión de HMGB1, estos receptores reclutan adaptadores intracelulares como MyD88, TIRAP/Mal, TRAM y TRIF, que a su vez activan cinasas asociadas (IRAK1, IRAK2, IRAK4, TRAF6, TAK1, entre otras). La cascada de señalización culmina en la activación de complejos como IKKα/β, que inducen la translocación nuclear de NF-κB (p65/p50). En paralelo, otras rutas llevan a la activación de factores IRF, promoviendo la producción de interferones de tipo I. Como resultado final, se estimula la transcripción de genes que codifican para citocinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α) y moléculas inmunomoduladoras, modulando la respuesta inmune innata. Figura creada en BioRender. Abreviaturas: HMGB1:

High Mobility Group Box 1; TLR: Receptor tipo Toll (Toll-like receptor); RAGE: Receptor para productos finales de glicación avanzada; MyD88: Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88; TIRAP/Mal: Proteína adaptadora que contiene dominio TIR / Adaptador similar a MyD88; TRAM: Molécula adaptadora relacionada con TRIF; TRIF: Adaptador que contiene dominio TIR inductor de interferón-β; IRAK: Cinasa asociada al receptor de interleucina-1; TRAF: Factor asociado al receptor de TNF; TAK1: Cinasa activada por factor de crecimiento transformante-β 1; IKK: Cinasa de IκB; NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; IRF: Factor regulador de interferón; IL: Interleucina; TNF: Factor de necrosis tumoral.

Respecto a la señalización vía TLR4, estudios en macrófagos han determinado que esta interacción depende estrictamente de su correceptor MD-2; de hecho, mutaciones en MD-2 reducen significativamente la translocación de NF-κB y la producción de TNF (Ge et al., 2021; Yanai et al., 2009).

Asimismo, se ha descrito que HMGB1 también estimula la maduración de células dendríticas y la activación de linfocitos T, modulando así tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa ((Gardella et al., 2002; Bell et al., 2006); Grover et al., 2014).

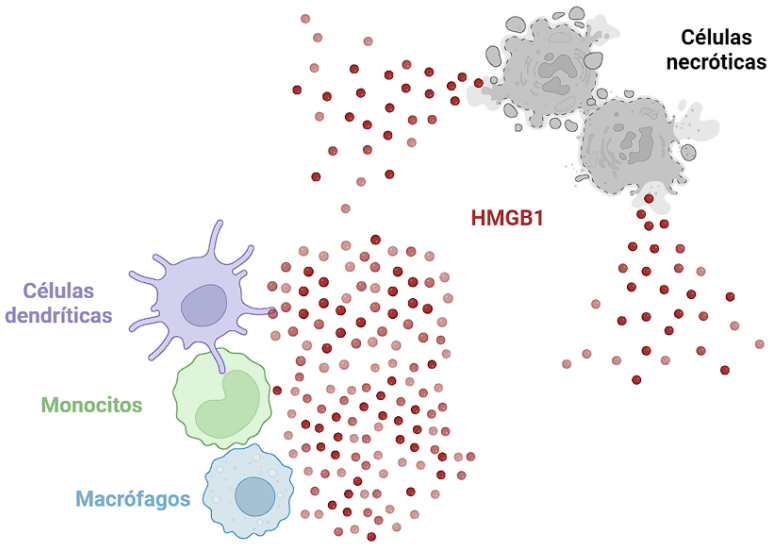

Figura 3: HMGB1 como mediador de la comunicación entre células necróticas y el sistema inmune.

Se muestra la liberación de HMGB1 al espacio extracelular tras la pérdida de integridad de la membrana en células necróticas. Una vez en el medio, HMGB1 interactúa con las células centinela del sistema inmune innato presentes en el tejido (macrófagos, monocitos y células dendríticas), señalizando el daño tisular para iniciar la respuesta defensiva. Figura creada en BioRender.

1.7.3. Presencia y roles de HMGB en peces

Diversos estudios han identificado proteínas de la familia HMGB (HMGB1, HMGB2 y HMGB3) en peces cartilaginosos y óseos (Wang et al., 2019). En carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), se caracterizaron dos homólogos de HMGB3 (CiHMGB3a y CiHMGB3b), los cuales median respuestas antivirales inducidas por poli(I:C) y virus de reovirus de carpa (GCRV), modulando cascadas de señalización de TLR y RLR ((Xin-peng et al., 2016; Wang et al., 2019); Yang, Peng, et al., 2013).

La expresión de HMGB1 se ha reportado en múltiples especies, incluyendo pez cebra (*Danio rerio*) (Zhao et al., 2011b), corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) (Zhao et al., 2011a), carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) (Yang et al., 2013), carpa dorada (*Carassius auratus*) (Xie et al., 2014), *Sebastes schlegelii* (Cai et al., 2014), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Cai et al., 2018), *Schizothorax prenanti* (Hong et al., 2018), rohu (*Labeo rohita*) (Lenka et al., 2018), bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Wang et al., 2021), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Niu et al., 2021) y esturión siberiano (*Acipenser baerii*) (Lu et al., 2023). En general, HMGB1 muestra una distribución ubicua, con mayor expresión en bazo, piel, cerebro, intestino y sangre (Zhao et al., 2011a).

En el contexto de infecciones bacterianas, HMGB1 desempeña un papel activo y no solo pasivo. Estudios de desafío con patógenos intracelulares y extracelulares, como *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus agalactiae* y *Vibrio anguillarum*, han demostrado una rápida regulación positiva de los transcritos

de HMGB1 en macrófagos de riñón anterior y bazo, alcanzando peaks de expresión significativos entre las 12 y 24 horas post-infección (Cai et al., 2014, 2018; Zhao et al., 2011a). Funcionalmente, este incremento es crítico para la defensa del hospedero: se ha evidenciado que la proteína HMGB1 liberada actúa como una potente alarmina capaz de inducir la expresión de citocinas proinflamatorias clave (TNF-α, IL-1β, IL-6) y estimular la actividad fagocítica de los leucocitos, orquestando así la eliminación bacteriana (Lu et al., 2023; Wang et al., 2021). Además, en algunas especies como el rodaballo, se ha descrito que HMGB1 posee actividad antibacteriana directa al unirse a la superficie de los patógenos y alterar su integridad celular (Cai et al., 2018). Estos hallazgos sugieren un papel central de HMGB1 en la inmunidad innata de peces.

1.7.4. HMGB1 y activación de TLR5 en teleósteos

El receptor TLR5 adquiere una relevancia crítica en el contexto de la infección por *Piscirickettsia salmonis*. Si bien esta bacteria ha sido descrita clásicamente como inmóvil, posee genes flagelares funcionales capaces de inducir una respuesta proinflamatoria mediada por este receptor en salmónidos (Cartes et al., 2017; Isla et al., 2014). En este mecanismo, HMGB1 actúa como agonista de TLR5, pero bajo requisitos estructurales específicos. Das et al. (2016) demostraron que el dominio de la cola ácida C-terminal de HMGB1 es indispensable para esta interacción; en sus ensayos, líneas celulares que expresaban formas truncadas de HMGB1 carentes de la porción C-terminal (HMGB1$\triangle$C) no lograron activar TLR5 ni desencadenar la señalización de NF-κB, confirmando que este dominio es esencial para la inducción de respuestas inflamatorias a través de esta vía.

Mediante resonancia magnética nuclear, Das et al. (2016) identificaron los residuos críticos para la interacción con TLR5 en la cola ácida C-terminal (185–215), el enlazador (170–184) y las cajas A y B. Para validar esta interacción

en peces, se utilizó el dominio extracelular recombinante de TLR5 de *Danio rerio* (drTLR5), confirmando que HMGB1 puede activar receptores TLR en teleósteos (Das et al., 2016).

1.7.5. Péptidos derivados de HMGB1 como posibles adyuvantes

Además de la proteína completa, se han identificado péptidos inmunomoduladores derivados de HMGB1. El más estudiado es Hp91, localizado en los aminoácidos 89–106 de la Caja B, capaz de activar células dendríticas, inducir citocinas como IL-12 e IFN-γ y promover respuestas tipo T_H1 (Saenz et al., 2010; Gnanasekar et al., 2013).

Sin embargo, en el contexto de la salmonicultura, el diseño de péptidos dirigidos específicamente al receptor TLR5 cobra una relevancia estratégica. En el estudio de Isla (2014) se demostró que, en *Salmo salar*, la infección por *Piscirickettsia salmonis* induce una sobreexpresión de TLR5, tanto la forma de membrana como la soluble, en riñón anterior y el bazo de los salmones infectados, convirtiendo a este receptor en una vía crítica de alerta temprana que a menudo es evadida o no modulada por el patógeno. A diferencia de los dominios de la Caja B, estudios como Das et al. (2016) han demostrado que es la cola ácida C-terminal de HMGB1 la responsable exclusiva de la activación de TLR5. Por consiguiente, diseñar péptidos sintéticos que mimeticen esta región C-terminal permitiría activar selectivamente esta ruta de defensa innata, potenciando la inmunogenicidad frente a SRS de manera más precisa que los adyuvantes genéricos. Estos candidatos pueden evaluarse mediante acoplamiento molecular con modelos de TLR5 de *S. salar* y validarse experimentalmente como potenciales adyuvantes en vacunas.

1.7.6. Relevancia para *Salmo salar* y perspectivas

A pesar de los múltiples estudios en diversas especies de peces, aún no se ha caracterizado en detalle la función inmunomoduladora de HMGB1 en (*S. salar*), principal especie cultivada en Chile y de alto valor económico. Considerando la importancia de mejorar la eficacia de las vacunas contra patógenos intracelulares como *P. salmonis*, la evaluación de HMGB1 y péptidos derivados como adyuvantes representa una estrategia prometedora.

La combinación de péptidos C-terminales de HMGB1 con Hp91 podría potenciar sinérgicamente la respuesta inmunológica, orientando la inmunidad adaptativa hacia perfiles más protectores frente a bacterias intracelulares.

Si bien en las últimas décadas se ha avanzado considerablemente en caracterizar HMGB1 en diversos peces teleósteos, evidenciando su rol en la inmunidad innata, la extrapolación directa de estos hallazgos al salmón del Atlántico no es automática. Existe una brecha funcional sobre cómo estos mecanismos operan específicamente frente a *Piscirickettsia salmonis*, lo que impide aplicar este conocimiento sin una validación previa.

La evidencia disponible en teleósteos sugiere que HMGB1, en particular su dominio C-terminal y péptidos derivados como Hp91, puede actuar como inmunomodulador y adyuvante al interactuar con receptores TLR, incluyendo TLR5. Sin embargo, la interrogante de si estas propiedades se conservan en *S. salar*, y de qué forma podrían aprovecharse en el diseño de adyuvantes vacunales capaces de inducir respuestas celulares protectoras, permanece sin respuesta en esta especie.

Esta brecha de conocimiento justifica la necesidad de estudiar y validar el potencial de HMGB1 y sus péptidos como adyuvantes en vacunas dirigidas contra *P. salmonis*, aportando nuevas herramientas para mejorar el control sanitario en la salmonicultura.

CAPÍTULO 2.

HIPÓTESIS

"La proteína HMGB1 y los péptidos derivados de la misma actúan como inmunomoduladores y adyuvantes moleculares en salmónidos, potenciando la respuesta inmune en formulaciones vacunales para uso en la acuicultura."

Descripción: Estudios previos en mamíferos indican que HMGB1 es un candidato promisorio como adyuvante molecular frente a patógenos que requieren respuestas efectoras de tipo T_H1. Además, se reconoce como una molécula DAMP endógena que promueve la inflamación, favorece la maduración de células dendríticas (DC) y estimula respuestas inmunitarias innatas y adaptativas mediante la activación de células T. Dentro de esta proteína, los primeros 18 aminoácidos del dominio B-box (89–106) corresponden al péptido Hp91, descrito como un potente inductor de respuestas T_H1 *in vitro* y *ex vivo* en mamíferos. En peces, se ha observado que la expresión de HMGB1 es inducible por estímulos bacterianos y virales, y que su forma recombinante activa macrófagos y promueve la producción de marcadores proinflamatorios y adaptativos clave, como IL-1β, TNF-α e IFN-γ, necesarios para el control de infecciones intracelulares.

CAPÍTULO 3.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Caracterizar el efecto de la proteína HMGB1 y de sus péptidos derivados sobre el sistema inmune innato y adaptativo, así como sobre la calidad y el tipo de respuesta inmune inducida por vacunas en salmónidos.

3.2. Objetivos específicos

- Diseñar y sintetizar péptidos derivados de la proteína HMGB1 con potencial de actividad inmunomoduladora y de adyuvante en salmónidos.
- Producir y purificar la proteína HMGB1 recombinante mediante un sistema de expresión en *Escherichia coli*.
- Caracterizar *in vitro* y *ex vivo* la respuesta inmune inducida por HMGB1 y por péptidos derivados en cultivo primario de leucocitos de riñón anterior de *Salmo salar* y/o en la línea celular SHK-1.
- Determinar el efecto como adyuvantes moleculares de HMGB1 y/o péptidos derivados en la potenciación de la respuesta inmune inducida por una vacuna modelo.

CAPÍTULO 4.

METODOLOGÍA

4.1. Identificación de plantillas y modelado del ectodominio de TLR5 de *Salmo salar* (SsTLR5)

4.1.1. Búsqueda de homología y selección de plantilla

Se empleó la herramienta BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool for Proteins) del NCBI para realizar una búsqueda de similitud local utilizando la secuencia de aminoácidos correspondiente al ectodominio de TLR5 de *Salmo salar* (GenBank: NM_001123691.1). La base de datos utilizada fue el Protein Data Bank (PDB). Los resultados se evaluaron en función del puntaje de alineamiento (score) y del porcentaje de identidad, y se seleccionó como plantilla la estructura de TLR5 con mayor similitud para su posterior uso en el modelado.

4.2. Modelado por homología y validación

El modelo de ectodominio de TLR5 de *Salmo salar* (SsTLR5) se construyó mediante modelado por homología en el software Modeller, utilizando la plantilla seleccionada en la etapa anterior (Šali and Blundell, 1993).

A partir de esta búsqueda, se seleccionó la estructura del ectodominio de TLR5 con mayor similitud con la secuencia de interés. Posteriormente, se empleó la clase AutoModel de Modeller para generar múltiples modelos estructurales, que fueron clasificados según la puntuación DOPE (Discrete Optimized Protein Energy).

La calidad de los modelos se evaluó mediante análisis estereoquímico

con PROCHECK (Laskowski et al., 1993) y validación energética mediante el servidor ProSA (Wiederstein and Sippl, 2007). Finalmente, los modelos mejor puntuados fueron inspeccionados visualmente en PyMOL, evaluando la integridad estructural del plegamiento, la correcta disposición de las repeticiones ricas en leucina (LRR) y la ausencia de colisiones estéricas, para seleccionar el modelo final. El modelo validado se empleó como receptor para el diseño *in silico* y el acoplamiento proteína–péptido.

4.3. Diseño *in silico* de péptidos derivados de HMGB1 y cribado computacional

Para el diseño de péptidos candidatos se siguió un enfoque computacional secuencial que integró el modelado estructural del receptor, el diseño racional de péptidos y su evaluación por acoplamiento molecular. Como punto de partida se utilizó el modelo del ectodominio de SsTLR5 obtenido en la sección anterior y la secuencia de la cola ácida C-terminal de HMGB1 de *Salmo salar* como ligando de referencia, dada su participación descrita en la activación de TLR5. A partir de esta secuencia se generaron variantes peptídicas y se evaluó de manera computacional su afinidad de unión al receptor. Los péptidos seleccionados se sintetizaron posteriormente y se caracterizaron por dicroísmo circular para determinar su viabilidad experimental.

4.3.1. Diseño y selección computacional de péptidos

Se diseñó *in silico* una serie de péptidos con potencial de interactuar con el modelo estructural del ectodominio de SsTLR5.

Para ello, se utilizó la secuencia C-terminal ácida de HMGB1 de *Salmo salar* (GenBank/EMBL: BT056506), compuesta por 23 aminoácidos y denominada SsOri. Mediante el análisis de las poses de acoplamiento y del área de interacción con el servidor PDBePISA (umbral de 4 Å), se identificaron los

aminoácidos de la cola ácida que más contribuían a la interacción con la superficie del ectodominio de SsTLR5. Luego se realizaron sustituciones puntuales por triptófano (W) en posiciones específicas de la secuencia, generando las variantes 6W y 11W, nombradas según la posición de la sustitución en SsOri. Los tres péptidos diseñados (SsOri, 6W y 11W) se evaluaron mediante acoplamiento proteína-péptido ciego (*blind docking*) en tres servidores web: HPEPDOCK (Zhou et al., 2018a), MDockPeP (Xu et al., 2018; Yan et al., 2016) y PiperFlexDock (Alam et al., 2017). Se seleccionaron las conformaciones con mejor orientación molecular sobre la superficie del receptor según la función de puntuación de cada servidor.

Adicionalmente, se evaluó teóricamente la afinidad de unión mediante el uso del servidor web Prodigy (Xue et al., 2016). Los valores de interacción de área de superficie y de afinidad de unión previstos para cada complejo proteína-péptido se compararon entre los péptidos de cada servidor mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Los péptidos mejor evaluados fueron seleccionados para su síntesis química y su posterior caracterización estructural mediante dicroísmo circular.

4.3.2. Síntesis de péptidos

Los péptidos fueron sintetizados químicamente por la compañía GenScript (https://www.genscript.com/). Los péptidos sintetizados corresponden a la secuencia original de la cola ácida C-terminal de HMGB1 de *Salmo salar* (SsOri: DDDDDDDDDDDDEDD) y dos variantes con sustituciones puntuales por triptófano: 6W (DDDDDDWDDDDDEDD) y 11W (DDDDDDDDDDWEDD). Los péptidos se purificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución hasta alcanzar un 90 % de pureza. Los péptidos liofilizados se almacenaron a -20 °C y se disolvieron en bicarbonato de amonio 20 mM antes de su uso. Una vez sintetizados, los

péptidos se caracterizaron mediante dicroísmo circular para estimar su contenido de estructura secundaria.

4.3.3. Dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular (CD) de todos los péptidos sintetizados se registró con un espectropolarímetro Jasco J-1500, en el rango de 185 a 250 nm. Todos los péptidos se prepararon a una concentración de 250 µg/ml en bicarbonato de amonio 20 mM. La solución se añadió a una cubeta de 1 mm de recorrido bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Para la recolección y el análisis de datos del espectro se utilizó el software Spectra Manager 1.5 (Jasco). Los parámetros de adquisición fueron: ancho de banda de 1,0 nm, resolución de 0,1 nm, tiempo de respuesta de 1,0 s, velocidad de escaneo de 50 nm/min y tres acumulaciones. En todos los casos, se restó el espectro del buffer solo del espectro de la muestra para garantizar que las señales analizadas provinieran únicamente de los péptidos.

Los datos obtenidos se enviaron a DichroWeb y se procesaron con el conjunto de referencia 6, optimizado para un rango de longitud de onda de 185 a 250 nm, con el fin de estimar el porcentaje de estructura secundaria de cada péptido. El algoritmo CONTIN se utilizó para ajustar los datos y predecir el contenido de estructura secundaria a partir del valor medio de elipticidad del residuo. Luego, los espectros de CD se emplearon como criterio de filtrado para seleccionar los péptidos destinados a los ensayos posteriores. Aquellos que cumplieron los criterios estructurales definidos se priorizaron para los ensayos celulares, en paralelo con la producción y caracterización de HMGB1 recombinante (rHMGB1).

4.4. Ensayos de activación de la vía NF-κB

4.4.1. Tratamiento celular con péptidos

Se utilizaron células HeLa control y una línea celular HeLa que expresa un TLR5 quimérico (HeLa/TLR5). Este TLR5 quimérico está conformado por el dominio extracelular del TLR5 de *Salmo salar* y los dominios intracelular y transmembrana del receptor humano. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a 1 × 10^5 células/pocillo en DMEM (Gibco) + 10 % FBS y se incubaron durante 2 días a 37 °C y 5 % CO_2 hasta alcanzar la confluencia. Para los tratamientos, el medio se reemplazó por DMEM sin suero ni antibióticos, y las células se expusieron a los péptidos 6W y 11W a 40 ng/mL durante 0, 15, 30 y 60 min. En paralelo se mantuvieron controles sin tratamiento. La activación de NF-κB se evaluó mediante la fosforilación de p65 y los niveles de IκBα en extractos totales.

4.4.2. Preparación de lisados celulares, SDS-PAGE y Western Blot.

Tras la exposición a los péptidos, se obtuvieron extractos proteicos totales (según protocolo previamente descrito) y se separaron por SDS-PAGE al 10 % bajo condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF mediante transferencia semihúmeda (TransBlot-Turbo, BioRad, EE. UU.). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5 % en TBS 1× (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM) durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios, diluidos 1:1000 en TBS 1× con leche descremada al 5 % y Tween-20 al 0,1 %: anti-phospho-p65 (SC-135769), anti-NF-κB p65 (SC-372) y anti-GAPDH (SC-47724) (Santa Cruz Biotechnology Inc., EE. UU.), durante 16 h a 4 °C con agitación. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con buffer TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1 %, SDS al 0,1 %) y se añadió el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 680 anti-

mouse (Jackson ImmunoResearch, EE. UU.) diluido 1:10.000 en TBS 1× con leche descremada al 5 % y Tween-20 al 0,1 %. Para la detección de IκBα se repitió el procedimiento utilizando el anticuerpo anti-IκBα C-21 (SC-371, Santa Cruz Biotechnology Inc., EE. UU.) diluido 1:1000 y el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 790 anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch, EE. UU.) diluido 1:10.000. La detección se realizó en el sistema Odyssey CLx (LI-COR Biosciences, EE. UU.) y el análisis densitométrico con el software Image Studio.

4.4.3. Inmunofluorescencia e imágenes confocales

Para visualizar la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF-κB, células HeLa/TLR5 (línea celular HeLa que expresa establemente el receptor TLR5 quimérico de *Salmo salar*, descrita por Vásquez-Suárez et al., 2024) se cultivaron en placas con fondo de vidrio (Corning Costar) hasta la confluencia y se trataron con los péptidos SsOri, 6W y 11W a una concentración de 5 µM. Tras la fijación/permeabilización, las células se incubaron toda la noche con el anticuerpo policlonal anti-p65 de conejo (SC-372, Santa Cruz) a una dilución de 1:200, seguido del anticuerpo secundario Alexa Fluor® 561 anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch). Los núcleos se tiñeron con DAPI (D9542, Sigma-Aldrich). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Zeiss LSM 780 con objetivo ApoChromat 63× OIL, NA 1,4; la fluorescencia de Alexa 561 se excitó a 561 nm y se detectó en 570–622 nm; la señal de DAPI se detectó con la línea 633 nm y ventana de 661–759 nm (ajustes según el reporte del estudio). Se analizaron ≥ 50 células por experimento. La normalidad se verificó con la prueba de Shapiro–Wilk y la comparación de medias se realizó con ANOVA de una vía.

4.5. Producción recombinante de HMGB1 (rHMGB1) en *E. coli*

4.5.1. Clonaje y verificación

La secuencia de ADN que codifica HMGB1 de *Salmo salar* (GenBank/EMBL: BT056506) fue sintetizada y clonada en el vector de expresión bacteriano pET-29a(+). Esta síntesis y clonación en el vector de expresión fue contratada a la empresa GenScript (https://www.genscript.com/). El diseño del vector incluyó el promotor T7/Operador Lac, seguido de la secuencia de HMGB1 fusionada a una etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal, y finalizó con el terminador T7 (Figura 17).

El plásmido pET-29a (+)–HMGB1 se amplificó en *E. coli* TOP10 y se purificó mediante el método de lisis alcalina (Bimboim and Doly, 1979). La correcta inserción del gen se comprobó mediante digestión con XhoI y NdeI. Posteriormente, el constructo se transformó en *E. coli* BL21(DE3) para estudios de expresión del gen que codifica HMGB1.

4.5.2. Expresión del gen que codifica HMGB1 en *E. coli*

Los cultivos transformados se realizaron en medio LB suplementado con kanamicina a 50 μg/mL. Se permitió el crecimiento hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0,5–0,6, punto en el que se indujo la expresión del gen de interés mediante la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) 0,4 mM.

- Cultivo a escala de 300 mL: se cultivaron 300 mL de medio LB a 37 °C, 150 rpm, y la inducción se llevó a cabo a 30 °C durante 4.
- Cultivo en fermentador de 5 L: se inocularon 400 mL de preinóculo en caldo LB con kanamicina, incubados a 37 °C hasta OD_{600} 0,5–0,6. Se añadió IPTG hasta 0,4 mM y se continuó la incubación a 30 °C, 200 rpm, 4 h.

Al finalizar, las células se recolectaron por centrifugación (5000 rpm, 10 min, 4 °C) y se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM, pH 8. La ruptura celular se realizó con tres pases en molino de bolas, seguida de una clarificación por centrifugación (5000 rpm, 10 min, 4 °C). La expresión del gen que codifica HMGB1 se evaluó mediante SDS-PAGE al 12,5 %, Western blot y espectrometría de masas.

4.6. Caracterización e identificación de HMGB1 recombinante (rHMGB1)

4.6.1. Evaluación de expresión del gen que codifica HMGB1 mediante SDS-PAGE y Western blot.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12,5 % (grosor 1,5 mm) para el análisis de las etapas de expresión, purificación y control negativo, y al 15 % para la evaluación de la proteína tras diálisis y concentración, con el fin de obtener mayor resolución en el rango de peso molecular correspondiente a rHMGB1 (~25 kDa). Las muestras obtenidas en las diferentes etapas del proceso de purificación se mezclaron con buffer de carga que contenía buffer de carga Laemmli reductor (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0,01 %). Estas mezclas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y posteriormente se cargaron en los pocillos del gel. Como marcador de peso molecular se utilizó el Blue Prestained Protein Marker, Broad Range (11–250 kDa, New England Biolabs, EE. UU.). Una vez completada la migración, los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich, EE. UU.) para visualizar las bandas de proteínas.

Tras la separación mediante SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa BA-85 (Schleicher & Schuell, Alemania) utilizando un sistema de transferencia semihúmedo (TransBlot-Turbo, BioRad, EE. UU.) a 0,3 A y 25 V durante 30 minutos. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5 % en TBS 1X (Tris buffer salino), incubada durante toda la

noche a 4 °C con agitación constante.

Para la detección, se emplearon dos anticuerpos primarios, seleccionados según el ensayo:

- Anti-histidina (6x monoclonal antibody, Clontech Laboratories, EE. UU.), diluido 1:5000 en leche descremada al 5 % en TBS 1X.
- Anti-hHMGB1 (DPH1.1, monoclonal, HMGBiotech, Italia), diluido 1:500 en leche descremada al 5 % en TBST 1X (TBS con Tween 20 al 0,1 %).

La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación continua. Luego, se efectuaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBST.

Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 680 (Jackson, EE. UU.), diluido 1:10000 en una mezcla de leche descremada al 5 % y TBS 1X, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Finalmente, se realizaron tres lavados adicionales de 10 minutos con TBST.

Las bandas obtenidas tanto en el gel de poliacrilamida como en la membrana de nitrocelulosa fueron visualizadas mediante el sistema de captura de imágenes Odyssey (LI-COR Biosciences, EE. UU.).

4.6.2. Digestión de proteínas en gel y preparación para nLC-MS/MS

Se agregaron 40 μg de proteínas totales en un volumen final de 40 μL con tampón de carga 1X. La muestra fue desnaturalizada durante 10 minutos a 95 °C y sometida a SDS-PAGE al 12 % bajo condiciones desnaturalizantes. La corrida se realizó a 100 V y se finalizó a 120 V en hielo. El gel se tiñó overnight con 50 mL de Coomassie R-250 biocompatible (#161-0786, Bio-Rad) en agitación a temperatura ambiente.

Se seleccionó la banda correspondiente a ~20 kDa, la cual fue sometida al protocolo de digestión en gel. En primera instancia, se eliminó la tinción mediante varios lavados con ACN al 50 % en bicarbonato de amonio. Posteriormente, la banda se deshidrató con ACN 100 % y se secó en un concentrador rotatorio. La muestra se rehidrató en bicarbonato de amonio con DTT para la reducción (1 h), y luego se realizó la alquilación con iodoacetamida en oscuridad por 1 h. Tras este paso, la banda se lavó nuevamente con ACN 50 % en bicarbonato de amonio, se deshidrató con ACN 100 % y se secó en el concentrador rotatorio.

La digestión se llevó a cabo con tripsina grado secuenciación (#V5071, Promega) en una proporción de 1:50 (proteasa:proteína, m/m), incubando durante 16 h a 37 °C. La reacción se detuvo ajustando el pH con ácido fórmico al 10 %. Los péptidos obtenidos se limpiaron con columnas Sep-Pak C18 Spin Columns (Waters), siguiendo las indicaciones del proveedor, y se secaron en un concentrador rotatorio a 1000 rpm, overnight, 10 °C.

4.6.3. LC-MS/MS (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

Se inyectaron 200 ng de péptidos en un sistema nanoUHPLC nanoElute (Bruker Daltonics) acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro (Trapped Ion Mobility Spectrometry–Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer, Bruker Daltonics), empleando una columna Aurora UHPLC (25 cm × 75 μm ID, 1,6 μm C18, IonOpticks, Australia).

La separación cromatográfica se realizó con un gradiente de 90 minutos del 2 % al 35 % de tampón B (0,1 % de ácido fórmico–acetonitrilo). La adquisición de datos se efectuó con TimsControl 2.0 (Bruker Daltonics), configurando 10 ciclos PASEF, un rango de masas de 100–1700 m/z, voltaje de ionización del capilar de 1,5 kV, temperatura de 180 °C, frecuencia del TOF de 10 kHz y una resolución de 50.000 FWHM.

4.6.4. Identificación de Proteínas

Los datos obtenidos fueron analizados en el software PEAKS Studio X+, ejecutado en un servidor con 96 núcleos y 512 Gb de memoria RAM. Los parámetros de búsqueda incluyeron tolerancia de masas de precursores de 50 ppm, tolerancia de fragmentos de 0,05 Da y digestión semiespecífica con un máximo de 2 escisiones perdidas por péptido ("missed cleavages per peptides").

Las modificaciones postraduccionales consideradas fueron la carbamidometilación de cisteínas (fija). Como variables, se incluyeron la oxidación de metionina (M) y la acetilación N-terminal. La base de datos utilizada correspondió al proteoma de *Salmo salar,* complementado con la secuencia de HMGB1 y su cola de histidina.

Se aplicó la estimación de error mediante una base de datos decoy, estableciendo como criterio de aceptación un FDR ≤ 1 % y al menos 1 péptido único por proteína para la identificación.

4.7. Purificación de la proteína HMGB1 mediante cromatografía de afinidad a quelatos metálicos

Antes de proceder con la purificación, el sobrenadante de ruptura se clarificó mediante tres rondas de centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos cada una.

La purificación de la proteína HMGB1 se realizó mediante cromatografía de afinidad a quelatos metálicos utilizando el sistema FPLC ÄKTA Prime Plus (Cytiva, EE. UU.). Se empleó una columna de Sepharose High Performance previamente cargada con 0,25 mM de sulfato de níquel ($NiSO_4$). Tanto el buffer de equilibrio como el buffer de la muestra consistieron en una solución de Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, urea 1 M, imidazol 5 mM y DTT 0,5 mM, pH

de 8. El lavado se realizó con imidazol 100 mM para eliminar proteínas de unión inespecífica, seguido de una elución escalonada con concentraciones crecientes de imidazol de 250 y 500 mM para recuperar la proteína de interés.

Para concentrar las fracciones, de elución que contenían rHMGB1, se utilizaron tubos Amicon® Ultra con membrana de corte de 10 kDa (Merck Millipore, EE. UU.). Posteriormente, se realizaron múltiples rondas de diálisis de manera gradual frente a PBS 1× (solución salina tamponada con fosfatos: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, pH 7,4) para eliminar progresivamente la urea, el imidazol y el DTT. Tras la diálisis, la proteína se concentró nuevamente mediante tubos Amicon® Ultra 10 kDa. La pureza se estimó por densitometría con ImageJ v1.48 (http://imagej.nih.gov/ij) y la concentración proteica se determinó mediante el método colorimétrico BCA (ácido bicinconínico) utilizando BSA (albúmina sérica bovina) como estándar de referencia.

4.8. Aislamiento de leucocitos del riñón anterior

A partir de *S. salar*, se aislaron leucocitos de riñón anterior (HKL) siguiendo el protocolo descrito por Secombes (1990). Los animales se sacrificaron por sobredosis de anestésico benzocaína al 20 % (BZ-20), a una concentración de 150 mg/L, y posteriormente fueron desangrados a través de la vena caudal. El riñón anterior fue removido asépticamente y homogeneizado por separado mediante mallas de nylon con tamaño de poro de 70 μm, utilizando medio de cultivo de Leibovitz (L-15) suplementado con penicilina/estreptomicina 1X, heparina sódica al 2 % (5000 UI/ml) y suero bovino fetal al 2 % (FBS).

Los homogenizados se lavaron con solución salina balanceada de Hank (HBSS 1X: NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, Na_2HPO_4 0,25 mM, KH_2PO_4 0,44 mM, $CaCl_2$ 1,3 mM, $MgSO_4$ 1,0 mM, $NaHCO_3$ 4,2 mM, pH 7,4). Luego se depositaron cuidadosamente sobre gradientes discontinuos de Percoll

previamente montados, con densidades de 34 %/51 % preparadas con buffer HBSS 1X.

Posteriormente, los gradientes junto con los homogenizados fueron centrifugados a 800 g por 40 minutos a 15 ºC en una centrífuga con rotor basculante. La fracción de leucocitos fue recogida con pipetas Pasteur plásticas estériles. Las fracciones se lavaron con buffer HBSS 1X y se centrifugaron a 1800 g por 5 minutos a 15 °C. Finalmente, se retiraron los sobrenadantes y se resuspendieron los leucocitos totales en 2 ml de medio de cultivo L-15 suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10 % y con penicilina/estreptomicina 1X.

La viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripán y los HKL se cultivaron en placas de 24 pocillos con una densidad de $1x10^6$ células por pocillo y se cultivaron a 18 °C hasta el día siguiente.

Los HKL obtenidos fueron utilizados en los ensayos de reestimulación *in vitro* descritos en la sección 4.10, para evaluar la expresión de genes inmunes tras la exposición a rHMGB1 y péptidos derivados de HMGB1.

4.9. Evaluación del efecto biológico de rHMGB1 y péptidos derivados en la línea celular SHK-1

La línea celular SHK-1, derivada de leucocitos de riñón anterior de *Salmo salar*, presentaba características fenotípicas y funcionales similares a las de macrófagos/monocitos. Por ello, fue utilizada como modelo *in vitro* para evaluar el efecto inmunomodulador de rHMGB1 y péptidos derivados, así como su capacidad de protección frente a la infección por *Piscirickettsia salmonis*.

4.9.1. Tratamiento con rHMGB1 y péptidos derivados

Las células SHK-1 se cultivaron en placas de 24 pocillos a una temperatura de 18 °C utilizando medio Leibovitz's L-15 suplementado con FBS al 10 %

y antibiótico-antimicótico 1X. Los distintos tratamientos se prepararon con concentraciones finales de 10 µg/mL para rHMGB1 y 25 µM para los péptidos SsHP91, 6W y 11W. Además, se incluyó un control negativo consistente en 2 µL por pocillo de proteínas no relacionadas de *E. coli*, y un blanco (sin tratar). Todos los tratamientos se llevaron a cabo en el mismo medio de cultivo.

Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 700 µL de medio suplementado con cada molécula. Este proceso se realizó en tres placas distintas, abarcando tiempos de tratamiento de 3, 6 y 12 horas a 18 °C. Al finalizar cada periodo de incubación, se retiró el medio, se agregaron 300 µL de reactivo TRIzol™ (Invitrogen, EE. UU.) y las células se desprendieron mecánicamente y se recolectaron en tubos de microcentrífuga, almacenados a −80 °C. Posteriormente se extrajo el ARN para evaluar la expresión de IL-1β, IL-8, IL-10, MyD88, TGF-β, NF-κB, TNF-α, GATA-3, IFN-γ, TLR5M y TLR5S mediante RT-qPCR. El detalle del procedimiento se describe en la sección 4.12.

4.9.2. Ensayo de desafío con *Piscirickettsia salmonis*

Las células SHK-1 fueron cultivadas en condiciones estándar y pretratadas durante 12 h con los péptidos 6W y 11W a concentraciones de 1 µg/mL y 10 µg/mL. Como control positivo se utilizó flagelina de *Salmonella typhimurium* (InvivoGen) a 1 µg/mL y 5 µg/mL. Posteriormente, las células se infectaron con *P. salmonis* (cepa EM90) a 10^3 bacterias/mL y se incubaron a 20 °C, realizando mediciones en los días 1, 3, 6, 8, 10, 13 y 15 post-infección. Se incluyeron controles de lisis total (células tratadas con Triton X-100 al 1 %), de liberación basal de LDH (células sin tratamiento ni infección) y de péptidos sin infección. Todas las condiciones se realizaron por cuadruplicado.

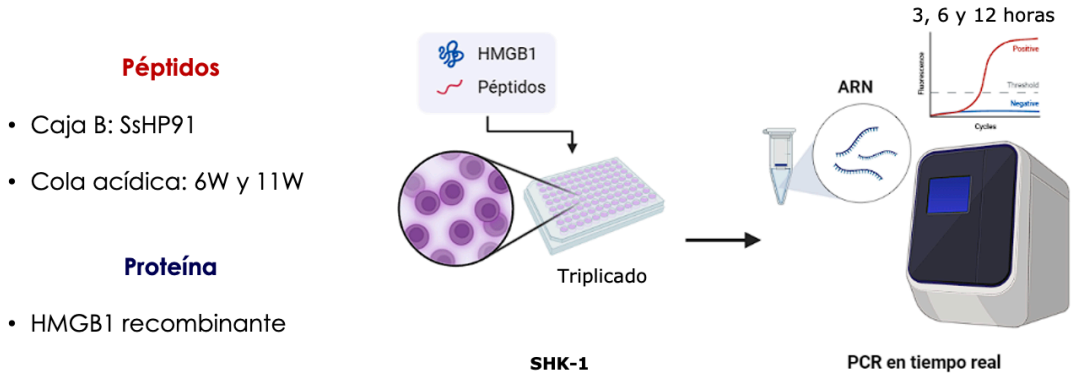

Figura 4: Esquema experimental del tratamiento de células SHK-1 con rHMGB1 y péptidos derivados.

> Las células SHK-1 de *Salmo salar* fueron estimuladas con la proteína rHMGB1 y con tres péptidos derivados (SsHP91, 6W y 11W). Los tratamientos se realizaron por triplicado y, tras la incubación, se extrajo ARN en distintos tiempos (3, 6 y 12 horas) para evaluar la expresión génica mediante PCR en tiempo real. El esquema resume la estrategia experimental empleada para analizar la activación de vías inmunes proinflamatorias y adaptativas en este modelo *in vitro*. Figura creada en BioRender.

La citotoxicidad se evaluó mediante liberación de LDH utilizando el kit LDH Cytotoxicity Detection (Takara). La absorbancia se midió a 490 nm en un lector de microplacas (ELX-800, BioTek Instruments, EE. UU.). El porcentaje de citotoxicidad se calculó según:

$$\%\ Citotoxicidad = \left(\frac{X_{muestra} - X_{control\ negativo}}{X_{Triton\ 1\%} - X_{control\ negativo}} \right) \times 100$$

Donde $X_{muestra}$ corresponde a cada condición experimental, $X_{control\ negativo}$ a células sin tratamiento ni infección, y $X_{Triton\ 1\%}$ al valor de lisis total. Los resultados se expresaron como porcentaje relativo al control de la infección.

4.10. Evaluación del efecto inmunomodular de HMGB1 y péptidos derivados *in vivo* en *Salmo salar*

Se utilizaron salmones (*Salmo salar*) de ambos sexos, no vacunados y libres de patógenos de aproximadamente 100 g que se dividieron en 5 grupos experimentales:

- 20 peces tratados con el péptido 6W.
- 20 peces tratados con el péptido 11W.
- 20 peces tratados con el péptido SsHp91.
- 20 peces tratados con HMGB1.
- 20 peces controles, tratados con PBS.

Los peces fueron suministrados por la empresa Marine Farm (Granja Marina Tornagaleones S.A.). Cada grupo se mantuvo en estanques de agua dulce (0,4 m^3), a 15 °C bajo un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales se alimentaron diariamente hasta saciedad con dieta comercial (Micro 200, EWOS).

Los péptidos y la proteína recombinante se administraron por vía intraperitoneal, disueltos en PBS. El día de las estimulaciones, los animales fueron anestesiados con metasulfonato de tricaína (MS-222) (80 mg/L de agua) y luego los grupos fueron inyectados i.p. con 100 µL de las moléculas correspondientes, a una concentración final de 20 µg/pez. Adicionalmente, se inyectaron i.p. 100 µL de PBS por animal para el grupo control.

A los 1, 3, 7, 14 y 21 días postestimulación, se sacrificaron cinco animales de cada grupo por sobredosis de benzocaína al 20 % (BZ®-20, Veterquimica, Chile) para realizar la extracción de riñón anterior y bazo, que se conservaron en RNAlater (Invitrogen) a -80 °C. A partir de estos tejidos se evaluó la

expresión de genes inmunes mediante RT-qPCR (IFN-γ, IFN-α1, TGF-β, IL-17, IL-4/13A, IL-22).

Figura 5: Esquema experimental del tratamiento in vivo de *Salmo salar* con rHMGB1 y péptidos derivados.

> Los peces fueron inoculados por vía intraperitoneal con rHMGB1 o péptidos (SsHP91, 6W y 11W). Se extrajeron muestras de riñón anterior y bazo en diferentes tiempos (1, 3, 7, 14 y 21 días) y el ARN obtenido se utilizó para analizar la expresión génica mediante PCR en tiempo real. Figura creada en BioRender.

4.11. Evaluación del potencial adyuvante de rHMGB1 y 11W en *Salmo salar*

Con el objetivo de evaluar el potencial adyuvante de rHMGB1 y del péptido 11W en *Salmo salar*, se diseñó un ensayo *in vivo* que integró la evaluación de parámetros celulares y humorales (Figura 6). Los peces fueron distribuidos en grupos experimentales y sometidos a una inmunización primaria por vía intraperitoneal (i.p.) al día 0, seguida de un refuerzo administrado a las 315 unidades térmicas acumuladas (UTA; días × temperatura del agua, 15 °C). La proteína recombinante VP2 del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) se administró a una dosis de 2 µg/g de peso corporal, en combinación con rHMGB1 (50 µg/pez) o el péptido 11W (20 µg/pez), formulados en emulsión con Montanide.

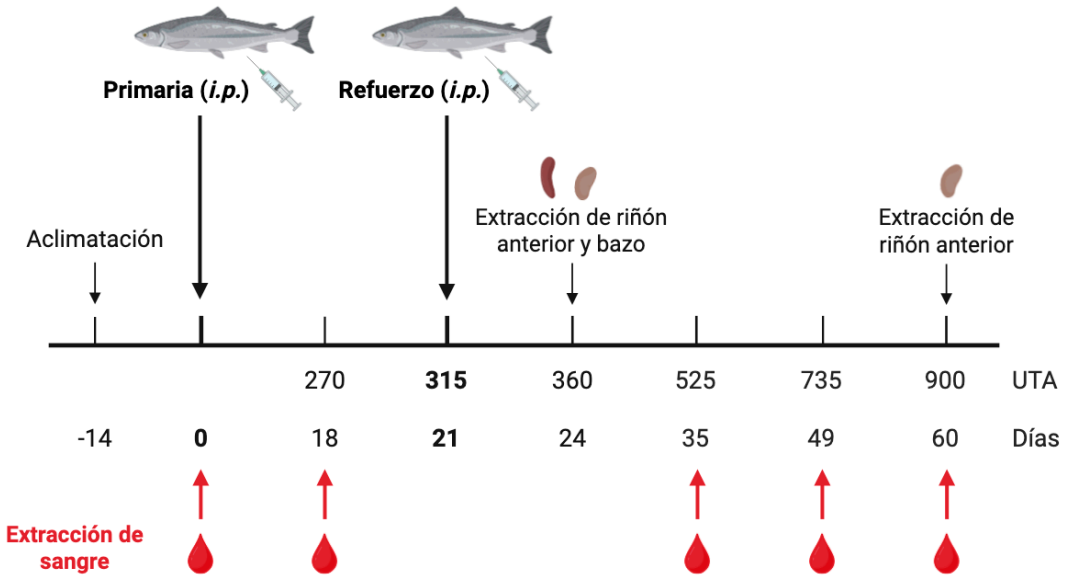

Figura 6: Esquema de inmunización y muestreo en *Salmo salar*.

> Los peces fueron distribuidos en grupos experimentales y sometidos a una inmunización primaria por vía intraperitoneal (i.p.) al día 0, seguida de un refuerzo administrado a las 315 unidades térmicas acumuladas (UTA; días × temperatura del agua, 15 °C). Se programaron muestreos en sangre (días 0, 18, 21, 24, 35, 49 y 60) para cuantificación de anticuerpos séricos, así como extracciones de riñón anterior y bazo (día 24, 360 UTA; tres días post-refuerzo) y de riñón anterior (día 60) para el análisis de expresión génica. Este diseño permitió evaluar de forma integrada la respuesta celular y humoral inducida por rHMGB1 y el péptido 11W en comparación con controles. Figura creada en BioRender.

4.12. Extracción de ARN y PCR en tiempo real

La extracción de ARN total se realizó a partir de células SHK-1 y leucocitos de riñón anterior (HKLs) obtenidos de los experimentos *in vitro* y *ex vivo*, así como de muestras de riñón anterior y bazo de los peces inmunizados en el experimento de adyuvancia. La extracción se realizó utilizando el reactivo TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de tejido fueron homogenizadas en el reactivo TRIzol antes de la extracción. La concentración y pureza del ARN se determinaron con el lector de microplacas Synergy® HTK Take3 (BioTek,

Agilent Technologies, EE. UU.), y la integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Las muestras de ARN se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Previo a la síntesis de ADN complementario (ADNc), las muestras de ARN fueron tratadas con DNasa I (#M0303, New England BioLabs, EE. UU.) para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico. La síntesis de ADNc se realizó utilizando el kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) con iniciadores hexaméricos aleatorios, según las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción consistió en: 11 µL del producto de tratamiento con DNasa I, 1 µL de iniciador hexamérico aleatorio, 4 µL de tampón de reacción 5X, 2 µL de mezcla de dNTPs (10 mM), 1 µL de inhibidor de RNasa Ribolock (20 U/µL) y 1 µL de RevertAid RT (200 U/µL), en un volumen final de 20 µL. Las reacciones se incubaron en un termociclador TProfessional Basic (Biometra, Alemania) a 25°C por 5 min, seguido de 42°C por 60 min y 70°C por 5 min. Se incluyó un control negativo sin retrotranscriptasa (No-RT) para cada muestra.

Para el análisis de expresión génica en células SHK-1 y HKLs tratados con los péptidos SsOri, 6W y 11W, se utilizó el kit Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix, 1-Step (Agilent, EE. UU.) en el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, EE. UU.). La mezcla de reacción consistió en: 2 µL de ARN (cantidades según la Tabla 4.1), 0,4 µL de mezcla enzimática RT/RNase block, 5 µL de Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Master Mix 2X, 2,36 µL de agua libre de nucleasas y 0,24 µL de mezcla de partidores forward y reverse (2,5 µM c/u), en un volumen final de 10 µL. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 50°C por 30 min (transcripción reversa), 95°C por 10 min (activación de la polimerasa), seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s (desnaturalización) y 58°C por 30 s (hibridación/extensión). Se incluyeron controles sin ARN (NTC) para todos los genes en todos los ensayos, y cada medición de muestra se repitió

tres veces. Se emplearon partidores específicos para estudiar la expresión relativa de TLR5S, TLR5M, MyD88, NF-κB, IFN-α1, IL-8, IL-1β, IFN-γ, IL-17, IL-22, TGF-β, IL-4/13A, IL-10 y TNF-α, así como el factor de transcripción GATA-3 asociado a la polarización T_H2. Las secuencias, tamaños de amplicón y números de acceso GenBank de todos los partidores utilizados se detallan en la Tabla 4.1.

Tabla 2: Partidores utilizados en los ensayos de RT-qPCR.

Gen	Sentido	Secuencia 5'3'	Amplicon (pb)	GenBank
SsTLR5S	F	AGCGTCCTTACACGACTCA	164	NM_001123691.1
	R	ACGTGTCATTTTCACGTCGT		
SsMyD88	F	TTCACAACACCGTAAGCCT	112	NM_001136545
	R	AGCGTCCTTACACGACTCA		
SsIFN-α1	F	CCTGCCATGAAACCTGAGAAGA	108	NM_001123710.1
	R	TTTCCTGATGAGCTCCCATGC		
SsIL-8	F	GGCCCTCCTGACCATTACT	102	NM_001140710
	R	ATGAGTCTACCAATTCGTCTGC		
SsIL-1β	F	ACATTGCCAACCTCATCATCG	91	AJ223954
	R	TTGTAGCAGGTCCTTGTCCTTG		
SsIFN-g	F	CCGTACACCGATTGAGGACT	133	FJ263446.1
	R	GCGGCATTACTCCATCCTAA		
SsIL-17	F	GCCAGTGCAGCTCTATTGTA	115	EU680097.1
	R	ACTTCCTGTGTGGCTGAAGTG		
SsIL-22	F	ATCTGCTGCCTGCATGCTAA	151	NM_001164064.1
	R	TAGCACAGCCGTGTTCCTTC		
SsTGF-b	F	GGCCATCCGTGGACAGATAC	92	XM_014196504.1
	R	GGGAGGTTGGGACTTTCTCG		
SsIL-4/13A	F	ACCACCACAAAATGCAAGGAGT	70	NM_001204895.1
	R	ACGTGGCATTTTTCACGGAG		
SsIL-10	F	CGCTATGGACAGCATCCTGAAGTTC	118	XM_014168417.1
	R	GTGGAAGATGTTTCCGATGGAGTCG		
SsTNF-a	F	TGTGTGGCGTCCTCTTAGTAGCAGCTT	101	NM_001123589.1
	R	CTCCATTTTGTCCTGCATCGTTGC		
SsEF-1a	F	CACCACCGGCCATCTGATCTACAA	78	AF321836
	R	TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC		

> Las abreviaciones Ss y Om corresponden a *Salmo salar* y *Oncorhynchus mykiss*, respectivamente. F: partidor forward; R: partidor reverse. El amplicón se expresa en pares de bases (pb).

Para evaluar el efecto adyuvante de los péptidos derivados de HMGB1 *in vivo*, se extrajo ARN total de muestras de riñón anterior y bazo de los peces inmunizados a los días 1, 3, 7, 14 y 21 post-inmunización, así como de HKLs estimulados con antígeno. Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron utilizando el kit Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent, EE. UU.) en el equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, EE. UU.), según el siguiente protocolo: 2 µL de ADNc (equivalente a 20 ng de ARN total de partida), 5 µL de Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix, 3 µL de agua libre de nucleasas y 2,4 µL de mezcla de partidores forward y reverse (200 nM c/u), en un volumen final de 12 µL. El ADNc fue sintetizado previamente mediante el kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, como se describe en la sección anterior. Las condiciones de ciclado fueron: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 65°C por 30 s y 95°C por 30 s. Se evaluó la expresión de IFN-γ, IL-17 e IL-4/13A. Se incluyeron controles sin ARN (NTC) en todos los ensayos y cada muestra se midió por triplicado. Para estandarizar y validar los ensayos, se determinaron los rangos dinámicos, la eficiencia de amplificación, la curva de disociación y se visualizaron los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

El gen de referencia EF-1α (SsEF-1α; GenBank: AF321836) se utilizó como normalizador para todos los ensayos de RT-qPCR. Para los experimentos con células y tejidos *in vivo*, los resultados de expresión génica relativa se determinaron mediante el método comparativo $\Delta\Delta$Ct (2^-$\Delta\Delta$Ct), utilizando células no tratadas o tejidos de animales no inmunizados como calibradores. Para el análisis de expresión constitutiva de los transcritos en tejido, la expresión relativa se determinó según el modelo matemático de Pfaffl (2001).

Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Todos los datos se evaluaron previamente respecto a la homogeneidad de varianzas y la distribución normal. Los datos de PCR en tiempo real se analizaron mediante análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA), seguido de la prueba de Dunnett para la comparación de grupos experimentales frente al grupo control, o la prueba de comparaciones múltiples de Šidák para comparaciones pareadas entre todos los grupos. La significancia estadística se definió como $p < 0,05$.

CAPÍTULO 5.

RESULTADOS

Para evaluar el potencial inmunomodulador de HMGB1 y de sus péptidos derivados en *Salmo salar*, se implementó una estrategia integrada que incluyó análisis *in silico*, ensayos *in vitro* y experimentos *in vivo* de inmunización (Figura 7).

5.1. Diseño *in silico* y selección de péptidos

5.1.1. Modelamiento de SsTLR5

Se realizó una búsqueda de proteínas homólogas en la base de datos Protein Data Bank (PDB) con el objetivo de identificar estructuras cristalográficas disponibles de TLR5 que pudieran ser utilizadas como template para el modelamiento por homología. Se consideraron secuencias de *Salmo salar* (NM_001123691.1), *Oncorhynchus mykiss* (NM_001124208.1), *Oncorhynchus kisutch* (XM_020496637.2) y *Danio rerio* (XM_001919017.8), identificándose como principales candidatos los códigos PDB: 3V47, 6BXA, 6BXC y 5GY2, todos correspondientes a estructuras cristalográficas del ectodominio de TLR5 de *Danio rerio*.

Específicamente, 3V47 corresponde a TLR5 de *D. rerio* en complejo con flagelina de *Salmonella* (resolución 2,47 Å), 6BXA y 6BXC corresponden a TLR5 de *D. rerio* en complejo con receptores linfocitarios variables (VLR) de lamprea, y 5GY2 corresponde a TLR5 de *D. rerio* en complejo con flagelina de *Bacillus subtilis* (resolución 2,10 Å).

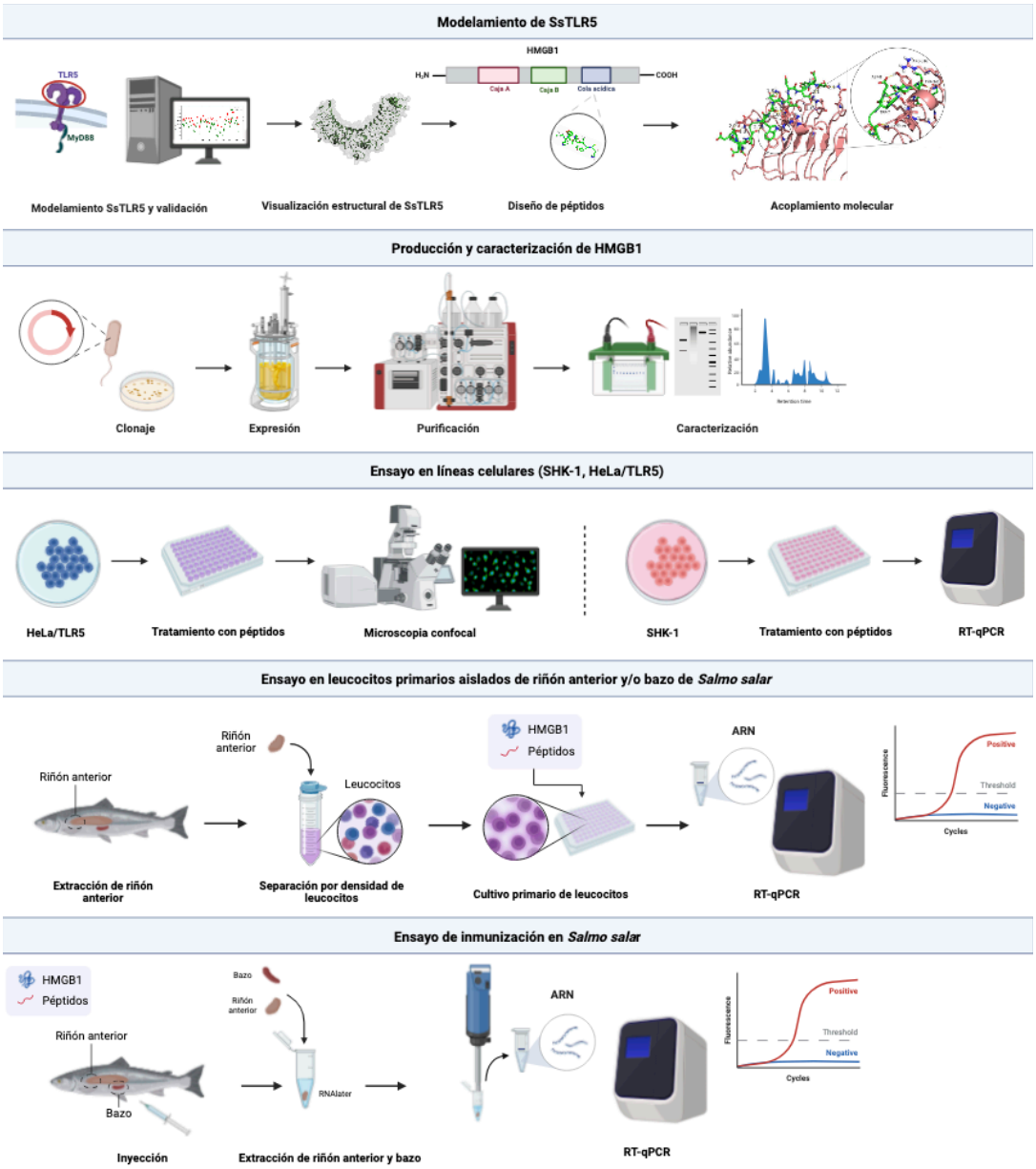

Figura 7: Resumen esquemático del flujo experimental y principales aproximaciones del estudio.

> El esquema integra las distintas etapas desarrolladas en este trabajo. Primero se realizó el modelamiento estructural de SsTLR5 y el diseño de péptidos derivados de HMGB1. Posteriormente, se llevó a cabo la producción y caracterización de HMGB1 recombinante mediante clonaje, expresión en sistema bacteriano, purificación y validación bioquímica. A continuación, se efectuaron ensayos *in vitro* en líneas celulares (SHK-1 y HeLa/TLR5) para analizar la activación génica y la localización celular, junto con la estimulación *ex vivo* de leucocitos primarios aislados de riñón cefálico de *Salmo salar*. Finalmente, se implementaron ensayos

de inmunización *in vivo* en salmónidos, con colecta de riñón cefálico y bazo post-tratamiento para la extracción directa de ARN, evaluando la expresión de genes inmunes y la respuesta adaptativa mediante RT-qPCR. Esta figura resume la estrategia experimental empleada y los puntos de análisis que dieron lugar a los resultados presentados en este estudio. Figura creada con BioRender.

De las estructuras evaluadas, 3V47 y 5GY2 fueron las que mostraron la mayor similitud con la secuencia de *Salmo salar*, superando el umbral del 30 % de identidad requerido para el modelamiento por homología (Figura 8). Finalmente, 5GY2 fue seleccionado como plantilla por su mayor resolución atómica.

```
TLR5Sslab   ----TPKCPIYGSIAACTSQSLHQVPALPPYITIVYMRDNYISEINETSFSGLEGLTELDLSWQQVNGLIIRTNTFQRLENLAVLYLGYNTGLQIEPDAF 96
5GY2_A      ADPGTSECSVIGYNAICINRGLHQVPELPAHVNYVDLSLNSIAELNETSFSRLQDLQFLKVE-QQTPGLVIRNNTFRGLSSLIILKLDYNQFLQLETGAF 100
3V47_A      ADPGTSECSVIGYNAICINRGLHQVPELPAHVNYVDLSLNSIAELNETSFSRLQDLQFLKVE-QQTPGLVIRNNTFRGLSSLIILKLDYNQFLQLETGAF 100
cons            *.:*.: *  * * .:.***** **.::. * :  * *:*:****** *:.*  *.:. **. **:**.***: *..* :* *.**  **:*..**


TLR5Sslab   VGLSNLRALSLYRCDLTESILQGDYLRPLVSLETLDLYGNQVKRIQPALFFVNITDFHELNVSLNQMEYICEEDLLGFQGKHFRLLKLNSLYLNSMTQYG 196
5GY2_A      NGLANLEVLTLTQCNLDGAVLSGNFFKPLTSLEMLVLRDNNIKKIQPASFFLNMRRFHVLDLTFNKVKSICEEDLLNFQGKHFTLLRLSSITLQDMNEYW 200
3V47_A      NGLANLEVLTLTQCNLDGAVLSGNFFKPLTSLEMLVLRDNNIKKIQPASFFLNMRRFHVLDLTFNKVKSICEEDLLNFQGKHFTLLRLSSITLQDMNEYW 200
cons         **:**..*:* :*:*  ::*.*::::**.*** * * .*::*:**** **:*:  ** *::::*::: *******.****** **:*.*: *:.*.:*


TLR5Sslab   FDWKRCGNPFRNMSMETLDLSSNGFDVDKAKLFFNAIRGTKIHHLILEHS-TMGKSFGFSNVKDPDRQTFEGLKNSSVKILDLSKCFIFTLQYAVFSPLR 295
5GY2_A      LGWEKCGNPFKNTSITTLDLSGNGFKESMAKRFFDAIAGTKIQSLILSNSYNMGSSFGHTNFKDPDNFTFKGLEASGVKTCDLSKSKIFALLKSVFSHFT 300
3V47_A      LGWEKCGNPFKNTSITTLDLSGNGFKESMAKRFFDAIAGTKIQSLILSNSYNMGSSFGHTNFKDPDNFTFKGLEASGVKTCDLSKSKIFALLKSVFSHFT 300
cons        :.*::*****:* *: *****.***. . ** **:** ****: ***.:* .**.***.:*.****. **:**: *.**  ****. **:*  :*** :


TLR5Sslab   EVEDITIAQNKINQIDREAFFGLQNLQKLNLSHNLIGEIYSYTFDKLPNILE-LDLSYNHIGALGYHAFKGLPNLQFLDLTGNSIRELGTYGSLAPLPNI 394
5GY2_A      DLEQLTLAQNEINKIDDNAFWGLTHLLKLNLSQNFLGSIDSRMFENLDK-LEVLDLSYNHIRALGDQSFLGLPNLKELALDTNQLKSV------------ 387
3V47_A      DLEQLTLAQNEINKIDDNAFWGLTHLLKLNLSQNFLGSIDSRMFENLDK-LEVLDLSYNHIRALGDQSFLGLPNLKELALDTNQLKSV------------ 387
cons        ::*::*:***:**:** :**:** :* *****:*::*.* *  *::* : ** ******** *** ::* *****: * *  *.::.:


TLR5Sslab   QHLRLADNKITSLEGLAGFADSTIILNIQNNRLTNLEDVYIVLAKLMHIKLLWYGNNFIKWCTVNNNISVPAVNYLKLLELRNIALQVIWARGECLHVFE 494
5GY2_A      ------------PDGI-------------FDRLTSLQ-------KI------WLHTN--PW-----DCSCPRIDYLS----------------------- 419
3V47_A      ------------PDGI-------------FDRLTSLQ-------KI------WLHTN--PW-----DCSCPRIDYLS----------------------- 419
cons                     :*:             :***.*:       *:      *  .*   *     : * * ::**.


TLR5Sslab   NLGNLFSLDLSLNSLQALPDGIFKGLISLEEMRSPLQLPHIPPTRHFPRDSQNTSPPLQFLASPDPAAFHSLSWINLYRNQFHCDCGLEDFLTWLKGTNV 594
5GY2_A      ---------RWLN-----------------------------------KNSQ--------------------------KEQGSAKCS---------GSG- 439
3V47_A      ---------RWLN-----------------------------------KNSQ--------------------------KEQGSAKCS---------GSG- 439
cons                  **                                    ::**                          ::*  ..*.         *:.


TLR5Sslab   TFPDPGVNEFSCEFPSDLHGISLLNYSSVISCEEDDERL---------------------------------------------------------------- 633
5GY2_A      ---KP-VR-------------------SII-CPTSASLVPR---------------------------------------------------------------- 456
3V47_A      ---KP-VR-------------------SII-CPTSASLVPR---------------------------------------------------------------- 456
cons           .* *.
```

Figura 8: Alineamiento de secuencias de TLR5 entre *Danio rerio* y *Salmo salar*.

El alineamiento muestra la comparación entre las secuencias de TLR5 de *Salmo salar* y las estructuras cristalográficas disponibles para *Danio rerio* (PDB: 5GY2 y 3V47).

De estas estructuras, se seleccionó como plantilla 5GY2 por su resolución

de 2,10 Å (Song et al., 2017; Yoon et al., 2012), lo que permitió maximizar la calidad del modelado. Con Modeller (clase AutoModel) se generaron 100 modelos del ectodominio de SsTLR5, priorizados según la puntuación DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) (Tabla **3**).

Tabla 3: Puntuación DOPE de los cinco modelos de ectodominio de SsTLR5 generados con Modeller.

Modelo	DOPE
TLR5Ss_1	-510,309,296
TLR5Ss_2	-507,131,210
TLR5Ss_3	-509,280,898
TLR5Ss_4	-506,505,000
TLR5Ss_5	-505,527,226

> Valores más negativos indican una mayor estabilidad y calidad estructural.

Los mejores modelos se refinaron mediante dinámica molecular (GROMACS) y fueron validados estereoquímicamente con PROCHECK (Figura 9) y energéticamente con ProSA (Figura 10).

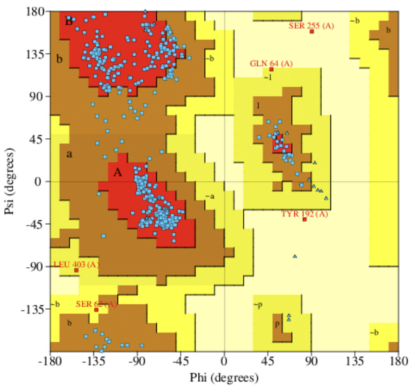

Figura 9: Diagramas de Ramachandran con PROCHECK.

Modelo inicial de SsTLR5 obtenido con Modeller. El análisis con PROCHECK muestra que la mayoría de los residuos se encuentran en regiones favorecidas y permitidas, lo que indica una buena calidad estereoquímica del modelo.

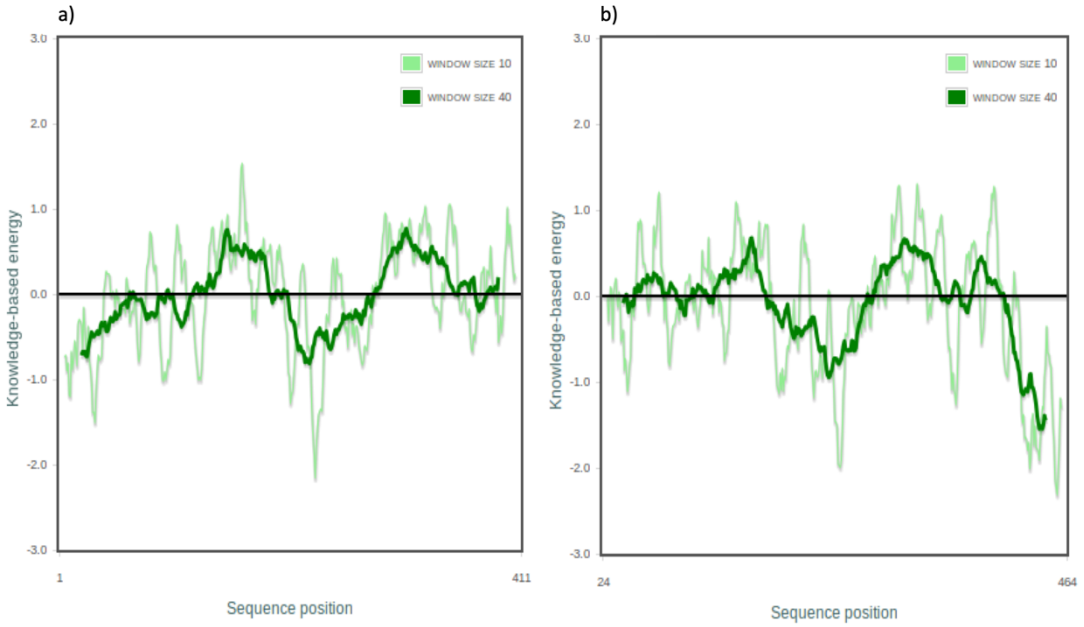

Figura 10: Perfiles de energía local obtenidos con ProSA.

En verde claro, se evalúan fragmentos de 10 aminoácidos, mientras que en verde oscuro se evalúan fragmentos de 40 aminoácidos. a) Modelo SsTLR5 luego de la dinámica molecular. b) Modelo cristalográfico 5GY2 de *D. rerio*.

Finalmente, la comparación visual con la plantilla cristalográfica (5GY2 de *D. rerio*) evidenció la conservación global del pliegue tipo LRR (Figura 11). El modelo validado de SsTLR5 se seleccionó como receptor para el diseño *in silico* de péptidos derivados de HMGB1.

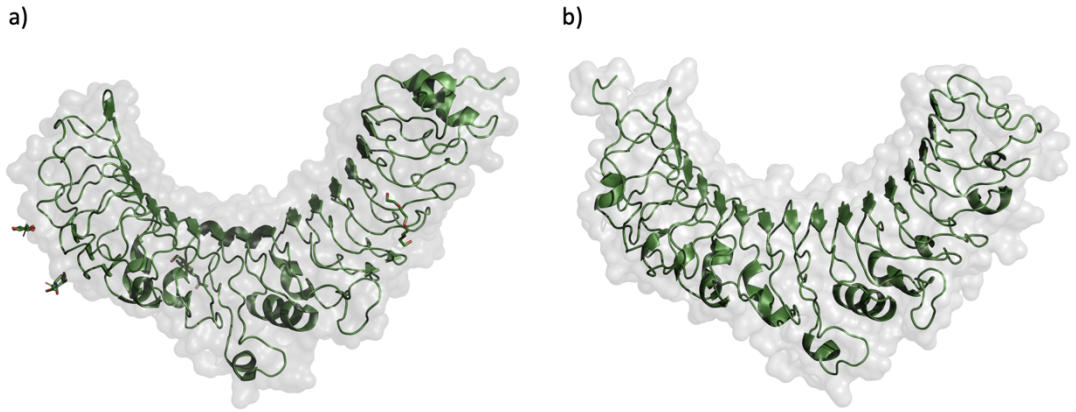

Figura 11: Comparación estructural de TLR5.

a) Estructura cristalográfica de TLR5 de *Danio rerio* (PDB: 5GY2). b) Modelo homológico de SsTLR5 generado con Modeller. Ambos ectodominios presentan la arquitectura tipo “herradura” de los receptores ricos en repeticiones de leucina (LRR), característica esencial para el reconocimiento de flagelina y la dimerización del receptor.

5.1.2. Mapeo de HMGB1 y definición de regiones candidatas

Se realizó un BLASTP (NCBI) utilizando como *query* HMGB1 humano (RefSeq: NP_002119.1) y como base de datos RefSeq Protein, restringiendo el organismo a *Salmo salar* (taxid: 8030). El mejor hit correspondió a HMGB1 de *S. salar* (RefSeq: NP_001140081.1). Con ambas secuencias se empleó el alineamiento par a par devuelto por BLAST para mapear la conservación dentro de la caja B y delimitar el motivo Hp91 utilizado en el diseño peptídico.

El alineamiento entre HMGB1 humano y HMGB1 de *S. salar* arrojó 279 bits (score), con un E-value de 3×10^{-94}, 84 % de identidad (141/167), 92 % de positivos (155/167) y 0,6 % de brechas. El tramo alineado correspondió a los residuos 1–167 en el humano frente a 143–308 en *S. salar*. Dentro de este segmento se mapeó la caja B y, en particular, el motivo central del péptido Hp91 (DPNAPKRPSSAFFIFCAD), evidenciando alta conservación y justificando su selección para el diseño de péptidos (Figura 12).

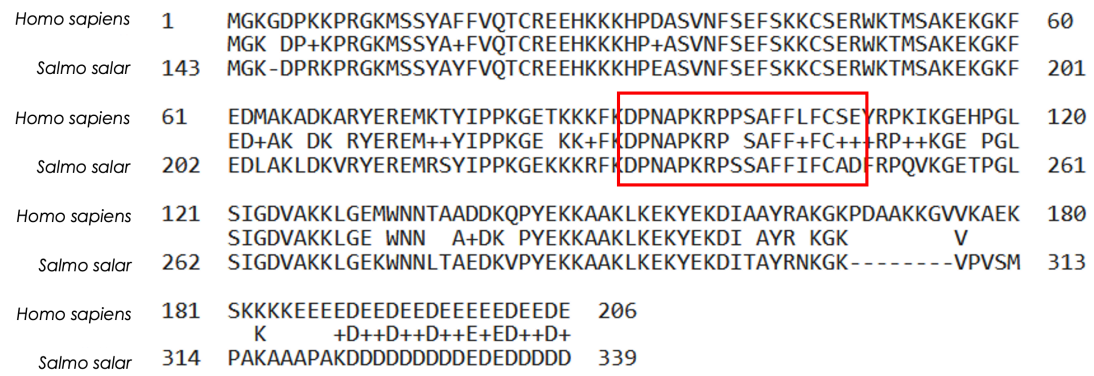

Figura 12: Alineamiento de secuencias de HMGB1 entre *Homo sapiens* y *Salmo salar*.

> El alineamiento muestra un alto grado de conservación a lo largo de la secuencia, con identidad superior al 80 % y similitud mayor al 90 %. En particular, en la caja B se observa la conservación del motivo Hp91 (recuadro), lo que respalda su selección como péptido candidato.

La proteína HMGB1 contiene, además, una cola C-terminal ácida rica en residuos Asp/Glu. El alineamiento múltiple de HMGB1 en peces mostró que esta región presenta un núcleo altamente conservado de residuos cargados negativamente, lo que sugiere un papel modulador en el reconocimiento por receptores del tipo Toll y en la polarización de citocinas. Con base en esta región, se seleccionó la cola ácida completa de HMGB1 de *S. salar* (23 aminoácidos: DDDDDDDDDDDEDDDDDDDEDE) como la segunda región de interés para el diseño peptídico (Figura 13).

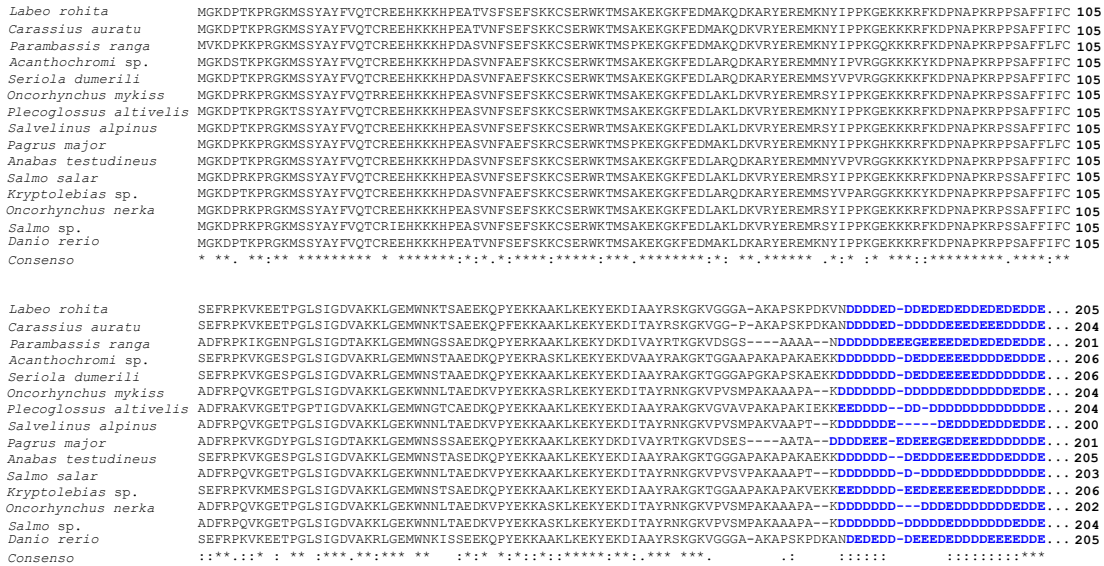

Figura 13: Alineamiento de secuencias de HMGB1 entre *Salmo salar* y otros teleósteos.

> El alineamiento evidencia la conservación de la cola ácida C-terminal, destacada en el recuadro, compuesta principalmente por residuos cargados negativamente (Asp y Glu).

5.1.3. Identificación de bolsillos de interacción en SsTLR5

Con el modelo de SsTLR5 validado, se empleó el servidor fpocket para identificar cavidades de interacción potenciales. Se localizó un surco en la superficie convexa C-terminal, adyacente a los bucles LRR7-LRR9 (Yoon et al., 2012). Esta región se consideró el sitio más probable para el reconocimiento de péptidos derivados de HMGB1 y constituyó el fundamento para la optimización *in silico*.

5.1.4. Diseño y selección de SsOri y variantes peptídicas (6W y 11W)

En mamíferos se han descrito péptidos derivados de HMGB1 con actividad inmunomoduladora, entre ellos Hp91, un péptido de 18 aminoácidos derivado del dominio B-box (residuos 89–106) que activa células dendríticas a través de TLR4. En *Salmo salar*, en cambio, se ha descrito la interacción de la cola

ácida C-terminal de HMGB1 con TLR5; por ello, este trabajo se centró en el diseño de péptidos derivados de esa región.

A partir de la cola ácida completa de HMGB1 de *S. salar* (23 aminoácidos), se aplicaron truncamientos progresivos en los extremos N- y C-terminal con el fin de conservar únicamente el núcleo cargado negativamente. Como resultado, se seleccionó un fragmento de 15 aminoácidos (DDDDDDDDDDDDEDD), denominado *Salmo salar* Original (SsOri), que conservaba el núcleo cargado negativamente de la secuencia original y cuya longitud era compatible con la síntesis química y con el acoplamiento en la superficie del ectodominio de SsTLR5.

Posteriormente, se realizó un escaneo de alanina sobre SsOri, sustituyendo individualmente cada residuo por alanina para estimar su contribución relativa a la interacción. Los cambios en la energía de unión y en la superficie de contacto se evaluaron con PRODIGY y PDBePISA v1.52, lo que permitió identificar que los residuos ácidos Asp y Glu son esenciales para mantener la afinidad.

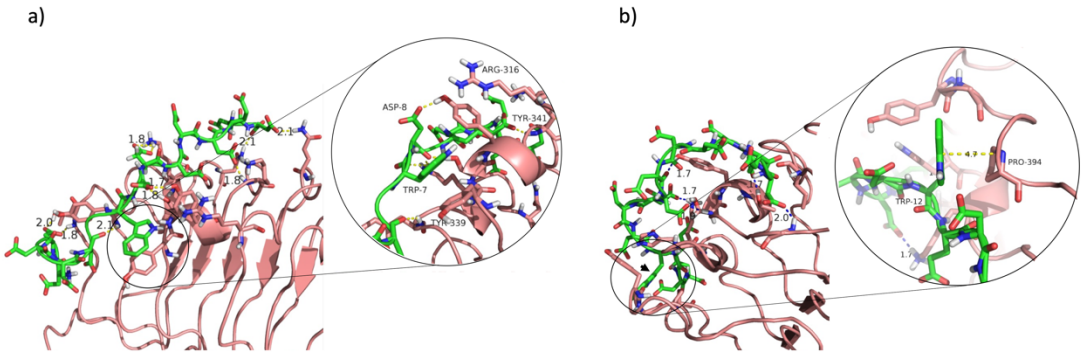

Figura 14: Interacción de péptidos derivados de HMGB1 con SsTLR5.

a) Detalle de las interacciones moleculares del péptido 6W con el sitio de unión en SsTLR5. b) Interacciones observadas del péptido 11W en la misma región. En ambos casos se muestran los residuos clave implicados en el contacto y los puentes de hidrógeno, destacando la contribución de residuos cargados en la estabilización del complejo.

Con base en estos resultados, se diseñaron dos variantes optimizadas: 6W (DDDDDDWDDDDDEDD) y 11W (DDDDDDDDDDDWEDD), en las que se introdujeron residuos de triptófano en posiciones críticas, con el fin de mejorar la interacción hidrofóbica y la estabilidad en la interfaz proteína–péptido. En la Figura 14 se observa el acoplamiento de los péptidos al modelo de SsTLR5.

5.1.5. Docking y métricas comparativas

Los péptidos SsOri, 6W y 11W se evaluaron mediante acoplamiento proteína–péptido en los servidores HPEPDOCK, MDockPeP y PiperFlexDock. En todos los algoritmos, 6W y 11W presentaron scores más favorables que SsOri, lo que indica orientaciones moleculares más estables.

De forma complementaria, el servidor PRODIGY predijo valores de $\triangle G$ más negativos y de Kd menores para 6W y 11W, mientras que PDBePISA mostró un aumento del área de interacción. El análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal–Wallis confirmó diferencias significativas en los valores de score de acoplamiento, $\triangle G$ y área de interacción de 6W y 11W en comparación con SsOri ($p < 0,05$) (Figura 15).

El proceso de diseño *in silico* permitió priorizar cuatro candidatos para evaluación experimental:

- Hp91, derivado de la caja B de HMGB1, seleccionado por su alta conservación entre el humano y *S. salar*.
- SsOri, fragmento de 15 aminoácidos de la cola ácida de HMGB1.
- 6W y 11W, variantes optimizadas de SsOri con sustitución de un residuo de aspartato por triptófano en la posición 7 (6W) y posición 12 (11W), respectivamente.

Estos péptidos fueron considerados para su síntesis y validación funcional.

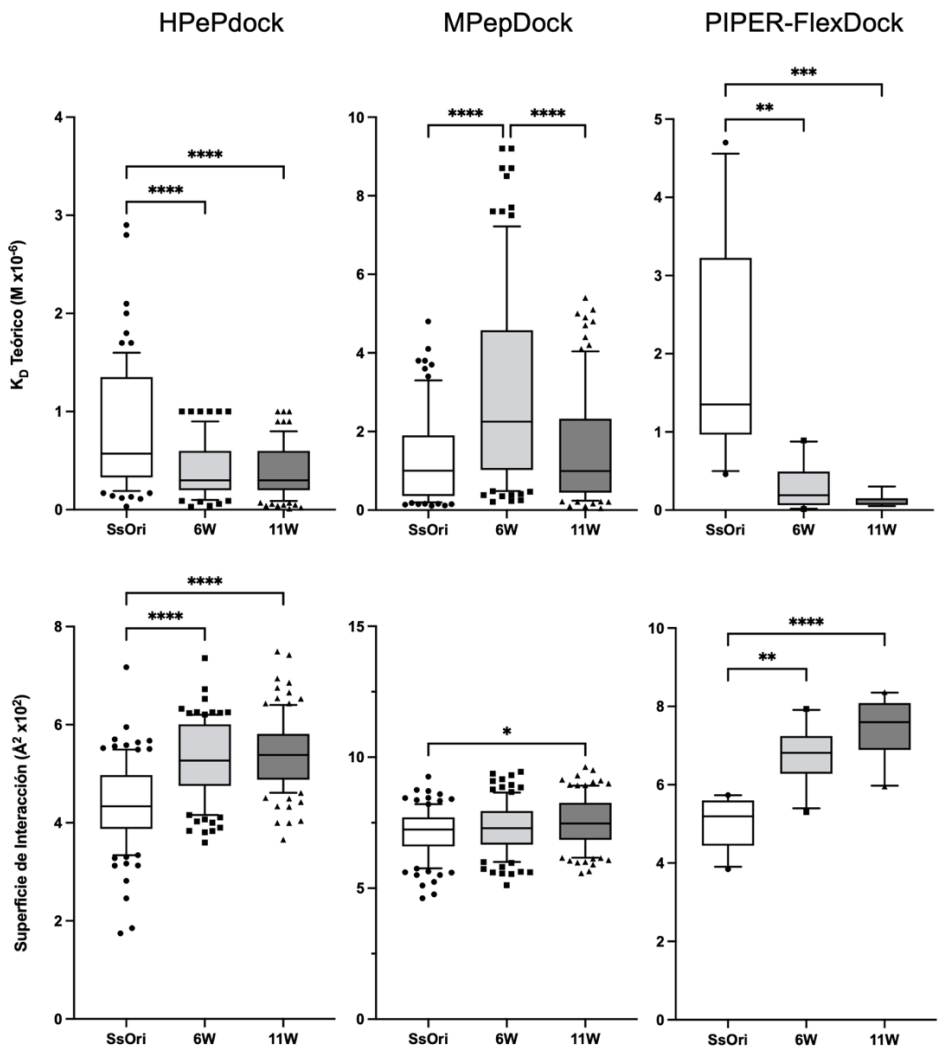

Figura 15: Resultados de acoplamiento proteína–péptido con SsTLR5.

Constantes de disociación teóricas (K_D, fila superior) y valores de superficie de interacción ($Å^2$, fila inferior) obtenidos para los péptidos SsOri, 6W y 11W mediante los algoritmos HPEPDOCK, MPepDock y PIPER-FlexDock. Los datos fueron analizados mediante el test de Kruskal–Wallis (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

5.1.6. Validación estructural por dicroísmo circular

Los péptidos SsOri, 6W y 11W fueron sintetizados y analizados mediante dicroísmo circular (CD) con el fin de caracterizar su estructura secundaria y utilizarla como criterio de selección para los ensayos funcionales posteriores.

Hp91 no fue incluido en este análisis dado que su estructura secundaria ha sido previamente caracterizada en estudios en mamíferos, donde se describió que su actividad inmunoestimulante reside en una porción helicoidal de la región C-terminal (Saenz et al., 2014b).

Los espectros CD de SsOri, 6W y 11W mostraron características de péptidos no estructurados, con un mínimo negativo por debajo de 198 nm y una elipticidad muy baja por encima de 210 nm. Se observó una señal positiva débil a 220 nm en 6W y 11W, pero no en SsOri (Figura 16). La ausencia de hélice α o láminas β como estructura secundaria principal confirmó el carácter intrínsecamente desordenado de los tres péptidos, criterio que justificó su selección para la evaluación funcional.

El análisis de la fracción de estructura secundaria mediante el algoritmo CONTIN reveló que 6W y 11W presentaron un mayor porcentaje de estructuras de vueltas (25,0 %) y desordenadas (43,0 %) que SsOri (20,0 % y 31,0 %, respectivamente). Este patrón es consistente con un estado aleatorio, aunque con un grado de desorden distinto bajo las condiciones experimentales, atribuible a la inserción de triptófano en 6W y 11W.

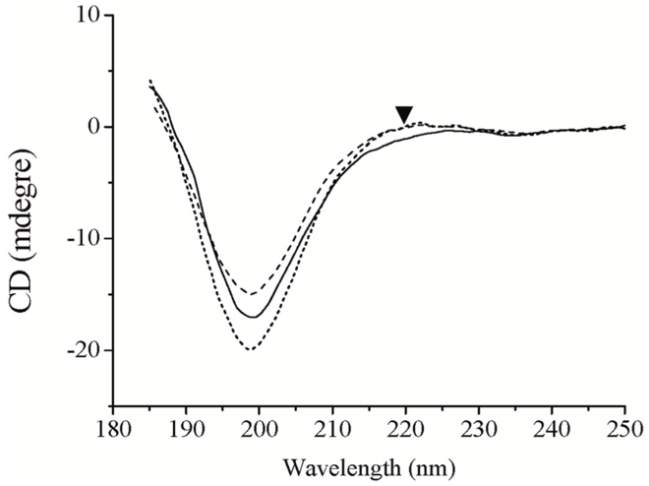

Figura 16: Espectros de dicroísmo circular (CD) en el ultravioleta lejano de los péptidos SsOri, 6W y 11W.

> Las curvas corresponden a SsOri (línea continua), 6W (línea punteada) y 11W (línea discontinua). La flecha indica una señal positiva débil alrededor de 220 nm observada en 6W y 11W, ausente en SsOri, lo que sugiere diferencias en la conformación secundaria entre los péptidos.

5.2. Producción de HMGB1 recombinante

5.2.1. Clonación y expresión de HMGB1 recombinante en *E. coli*

El gen que codifica la HMGB1 de *S. salar* (GenBank/EMBL: BT056506) fue sintetizado por la empresa GenScript y clonado en el vector de expresión pET-29a(+), generando la construcción denominada HMGB1-pET29a (Figura 17).

El vector HMGB1-pET29a se utilizó para transformar la cepa SHuffle de *E. coli*, optimizada para la expresión de proteínas recombinantes con puentes disulfuro correctamente formados. La expresión de rHMGB1 se indujo con IPTG durante 4 h a 30 °C. Las fracciones correspondientes al sobrenadante y al precipitado de ruptura celular fueron analizadas por SDS-PAGE al 12,5 %, constatándose que la proteína se encontraba principalmente en la fracción soluble (Figura 18).

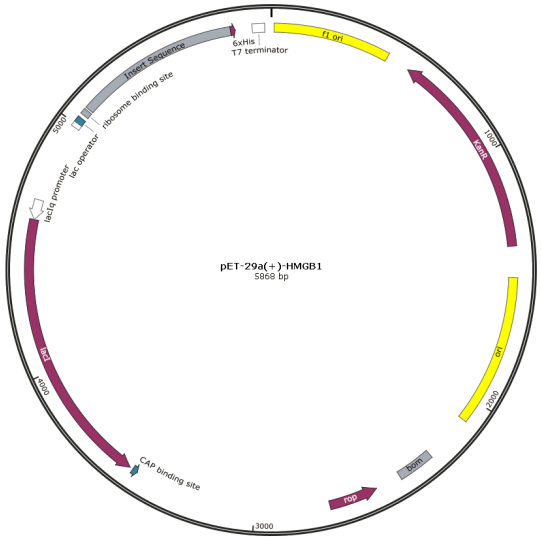

Figura 17: Mapa del plásmido de expresión pET-29a (+).

El plásmido fue diseñado para la clonación del gen que codifica la proteína HMGB1, bajo el control del promotor T7 y con una cola de histidina en el extremo N-terminal para su purificación.

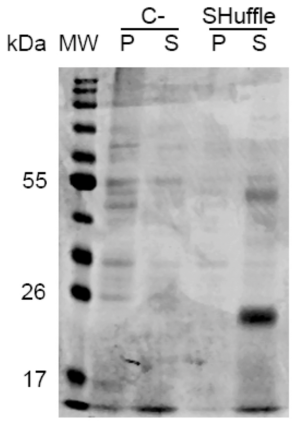

Figura 18: Análisis de expresión de HMGB1 mediante SDS-PAGE al 12,5 %.

Se muestra la inducción en *E. coli* SHuffle transformada con el plásmido HMGB1-pET29a. C-: control negativo, cepa SHuffle sin transformar. P: pellet de ruptura celular. S: sobrenadante de ruptura celular. La banda correspondiente a HMGB1 (~25 kDa) se observa principalmente en la fracción soluble (S).

5.2.2. Confirmación de identidad por LC–MS/MS

Con el fin de confirmar la identidad de la proteína, la banda de ~25 kDa observada en SDS-PAGE se sometió a digestión en gel y análisis mediante LC–MS/MS.

Los datos recolectados por el espectrómetro de masas fueron procesados en PEAKS Studio X+ (ver parámetros en Metodología), obteniéndose una cobertura del 96 % de la secuencia de HMGB1, con 159 péptidos identificados y una masa estimada de 24.197 Da (Tabla 4).

En la Figura 19 se muestra la cobertura de los péptidos identificados sobre la secuencia de HMGB1. En el recuadro se observa la extensión de la cola de histidina incorporada en el clon recombinante. En la Figura 20 se muestran el

cromatograma y el espectro del péptido MHHHHHHGKDPR, correspondiente a la etiqueta de polihistidina.

Tabla 4: Identificación de la proteína recombinante HMGB1 mediante LC–MS/MS.

ID	Cobertura	Nº de péptidos	Masa
HMGB1	96 %	159	24.197 Da

Cobertura de secuencia, número de péptidos detectados y masa molecular determinada para HMGB1. Los resultados muestran una cobertura del 96 %, con 159 péptidos identificados y una masa de 24.197 Da, confirmando la identidad de la proteína expresada.

Figura 19: Cobertura de péptidos obtenida por LC–MS/MS para la proteína recombinante HMGB1.

El análisis muestra la secuencia de HMGB1 cubierta por los péptidos identificados tras la digestión enzimática. La cobertura global alcanzó un 96 %, lo que confirma la identidad de la proteína. En el recuadro ampliado se observa la región N-terminal, donde se aprecia la presencia de la cola de histidina añadida en la construcción recombinante.

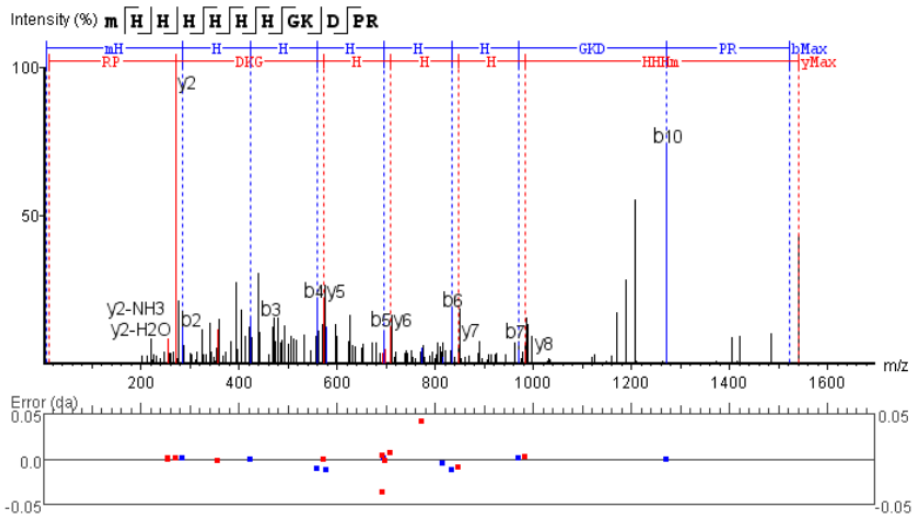

Figura 20: Espectro de fragmentación del péptido MHHHHHHGKDPR identificado por nLC–MS/MS.

El espectro muestra la serie de fragmentos iónicos correspondientes al péptido MHHHHHHGKDPR, derivado de la región N-terminal de HMGB1 recombinante. La presencia de la secuencia de histidinas confirma la incorporación de la etiqueta de purificación (His-tag) en la proteína expresada.

Estos datos confirmaron que la proteína expresada corresponde a HMGB1 recombinante y validaron la incorporación de la etiqueta de histidina, asegurando su identidad antes de la purificación.

5.2.3. Escalado de producción de HMGB1 en *E. coli*

Con la identidad confirmada, se realizaron preinóculos para la fermentación a escala de 5 L. Tras la inducción de la expresión del gen de interés y la ruptura celular en buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8), se observó nuevamente que la rHMGB1 (~24 kDa) se encontraba predominantemente en la fracción soluble

(Figura 21).

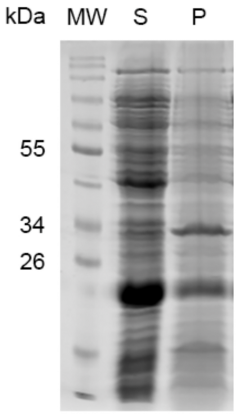

Figura 21: Expresión de HMGB1 en fermentación a 5 L analizada mediante SDS-PAGE al 12,5 %.

MW: marcador de peso molecular. S: fracción soluble (sobrenadante de ruptura celular). P: fracción insoluble (pellet de ruptura). La banda de aproximadamente 25 kDa se observa principalmente en la fracción soluble, lo que indica que la proteína recombinante se encuentra mayoritariamente en forma soluble tras la inducción y fermentación de 5 L.

5.2.4. Purificación mediante cromatografía de afinidad

El sobrenadante se purificó mediante cromatografía de afinidad (IMAC) en un sistema ÄKTA Prime Plus (Cytiva, EE. UU.). Para ello se utilizó una columna de Sepharose High Performance previamente cargada con 0,25 mM de sulfato de níquel ($NiSO_4$). En la Figura 22 se distinguen los peaks correspondientes a las distintas etapas del proceso. El primer peak (F) representa el flujo a través de la columna durante la fase de equilibrio. El peak más alto (L) corresponde al lavado con imidazol a 100 y 250 mM, donde eluyen proteínas no deseadas. Finalmente, el peak (E) corresponde a la elución de la proteína objetivo, rHMGB1, con una concentración mayor de imidazol (500 mM). Durante todo el procedimiento se registraron UV, conductividad (Cond), pH y presión para monitorear la pureza y la calidad de la proteína purificada.

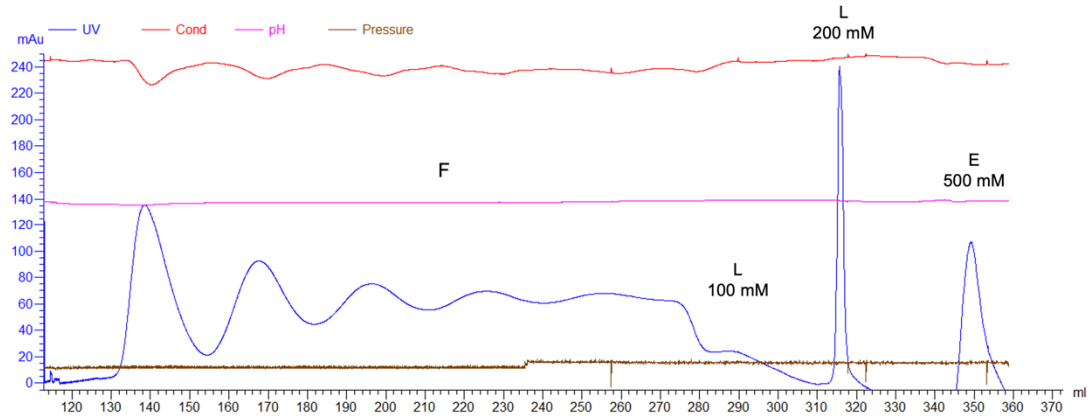

Figura 22: Cromatograma de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC).

El cromatograma muestra las etapas del proceso de purificación de HMGB1 recombinante. F: fracción no unida, correspondiente a proteínas que no interactuaron con la matriz de níquel. L: fracciones de lavado con 100 mM y 200 mM de imidazol, en las que se eliminan proteínas inespecíficas. E: fracción eluida con 500 mM de imidazol, correspondiente a la proteína de interés. Se registraron en paralelo las señales de absorbancia UV (azul), de conductividad (rojo), de pH (morado) y de presión (café). El buffer de equilibrio consistió en Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, urea 1 M, imidazol 5 mM y DTT 0,5 mM a pH 8.

En la Figura 23 se muestra que la mayor pureza de la proteína rHMGB1 se observa en la fracción eluida con 500 mM de imidazol (E), donde se presenta una banda intensa correspondiente al peso molecular aproximado de la rHMGB1, alrededor de 25 kDa. En comparación, las fracciones de lavado (L1 y L2) muestran múltiples bandas, lo que indica la presencia de proteínas no deseadas, mientras que la fracción no unida (F) contiene una gran cantidad de impurezas.

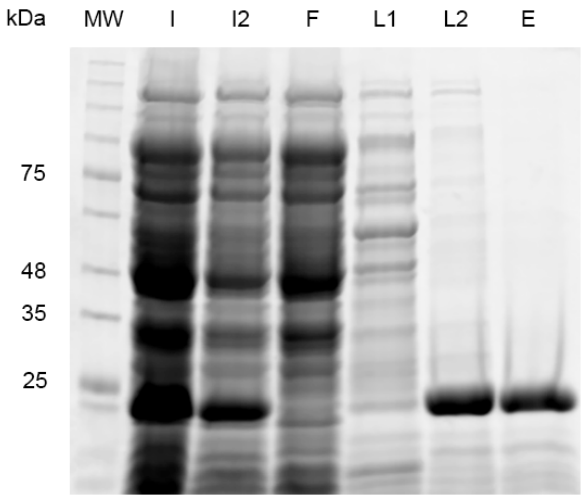

Figura 23: SDS-PAGE al 12,5 % de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC).

El gel muestra las distintas fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la proteína recombinante HMGB1. MW: marcador de peso molecular. I: muestra inicial previa a la purificación. I2: muestra inicial diluida 1:2. F: fracción no unida, correspondiente a proteínas que no interactuaron con la matriz de níquel. L1 y L2: fracciones de lavado con 100 mM y 200 mM de imidazol, respectivamente, en las que se observa la eliminación de proteínas inespecíficas. E: fracción eluida con 500 mM de imidazol, en la que aparece una banda definida alrededor de 25 kDa, correspondiente a la proteína de interés (rHMGB1).

5.2.5. Diálisis, concentración y evaluación de pureza

La fracción eluida con 500 mM de imidazol se concentró en tubos Amicon® Ultra de 10 kDa de cutoff. Posteriormente, se realizaron múltiples rondas de diálisis de manera gradual para eliminar progresivamente la urea y el DTT, hasta alcanzar un buffer final de PBS 1X. En la Figura 24, el carril 1 muestra la rHMGB1 previamente obtenida. En los carriles 2 y 3 se observa la rHMGB1 después de haber sido dializada y concentrada, evidenciando una mayor concentración y pureza.

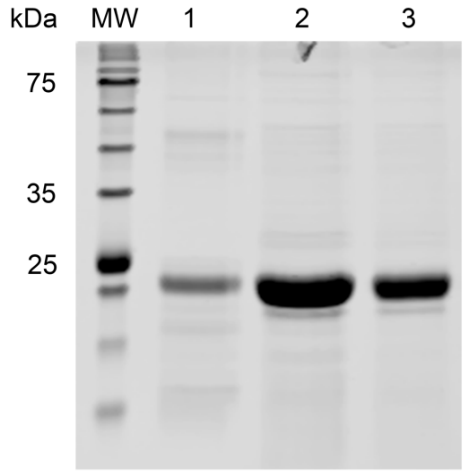

Figura 24: SDS-PAGE al 15 % de la proteína recombinante HMGB1 tras diálisis.

> MW: marcador de peso molecular. Carril 1: rHMGB1 antes del proceso de diálisis, donde se observa una menor pureza. Carril 2: rHMGB1 dializada en PBS 1X, evidenciando una banda más definida en torno a 25 kDa, correspondiente a la proteína recombinante. Carril 3: rHMGB1 dializada en PBS 1X (dilución 1:2), en la cual se mantiene la pureza de la proteína.

La proteína rHMGB1 en PBS 1X fue analizada mediante densitometría con el software ImageJ versión 1.48, lo que permitió estimar que el nivel de pureza de la proteína alcanza aproximadamente el 89 %.

Adicionalmente, se aplicó un método colorimétrico utilizando ácido bicinconínico (BCA) junto con albúmina sérica bovina (BSA) como estándar de referencia para la cuantificación de proteínas totales. Este análisis reveló una concentración total de proteínas de 993,50 µg/mL, y, en consecuencia, se determinó que la concentración específica de rHMGB1 es de 884,22 µg/mL.

En cuanto al control negativo empleado en los ensayos *in vitro*, se utilizaron proteínas totales obtenidas de la cepa *E. coli* SHuffle sin transformar, procesada bajo las mismas condiciones de cultivo, inducción y purificación que la cepa productora de rHMGB1. Tras cuantificar esta muestra, se obtuvo una concentración de proteínas totales de 406,37 µg/mL. El perfil electroforético de

esta preparación se presenta en la Figura 25.

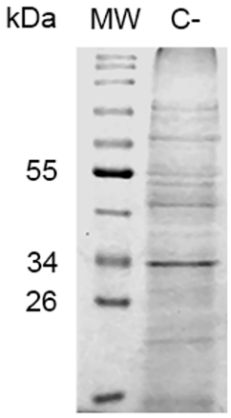

Figura 25: SDS-PAGE al 12,5 % de la muestra control negativo que se utilizó en ensayos in vitro.

> MW: marcador de peso molecular. C-: extracto proteico de *E. coli* SHuffle sin transformar, procesado bajo las mismas condiciones de cultivo y purificación que la cepa productora de rHMGB1. Se observa un patrón de bandas correspondiente a proteínas endógenas de la cepa, sin presencia de una banda definida en torno a 25 kDa, lo que confirma la ausencia de expresión de la proteína recombinante HMGB1.

5.3. Ensayos de activación de la vía NF-κB con péptidos derivados de HMGB1

Con el propósito de determinar la capacidad de los péptidos diseñados (6W y 11W) para inducir la activación de la vía de señalización NF-κB, se evaluó la fosforilación de la subunidad p65, la degradación del inhibidor IκBα y la localización intracelular de p65 en células HeLa/TLR5.

5.3.1. Evaluación de la activación de NF-κB en células HeLa/TLR5 mediante inmunoblot e inmunofluorescencia.

Para evaluar la capacidad de los péptidos derivados de HMGB1 para activar la vía de señalización de TLR5, se utilizaron células HeLa que expresan establemente el receptor TLR5 (HeLa/TLR5) como modelo celular. Esta línea

celular permite detectar específicamente la activación de TLR5 mediante el monitoreo de la fosforilación de la subunidad p65 de NF-κB y la degradación de su inhibidor IκBα, eventos característicos de la activación de la vía clásica de NF-κB downstream de TLR5.

El ensayo de Inmunoblot demostró que los péptidos 6W y 11W inducen una fosforilación temprana y sostenida de la subunidad p65 en células HeLa/TLR5 en comparación con las células HeLa control (Figura 26). La señal de p65 fosforilada fue detectable a los 15 minutos postratamiento, alcanzó su máximo a los 30 minutos y se mantuvo elevada hasta los 60 minutos. En paralelo, se observó una disminución transitoria de IκBα, consistente con la degradación de este inhibidor en respuesta a la activación de la vía clásica de NF-κB. El análisis densitométrico de tres experimentos independientes confirmó que las diferencias entre los grupos tratados y los controles fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Como validación adicional, se realizó un segundo análisis por inmunoblot que incluyó todos los péptidos (6W, 11W y SsOri) junto con los controles positivo (flagelina bacteriana) y negativo (Figura 27). El análisis densitométrico de p65 fosforilada mostró un incremento en las células tratadas con 6W y 11W respecto del control negativo, alcanzando niveles similares al control positivo. En paralelo, se observó una reducción significativa de IκBα tras la estimulación con 6W y 11W ($p < 0,05$), lo que confirmó la activación de la vía clásica de NF-κB. SsOri, en cambio, mostró una respuesta de menor magnitud.

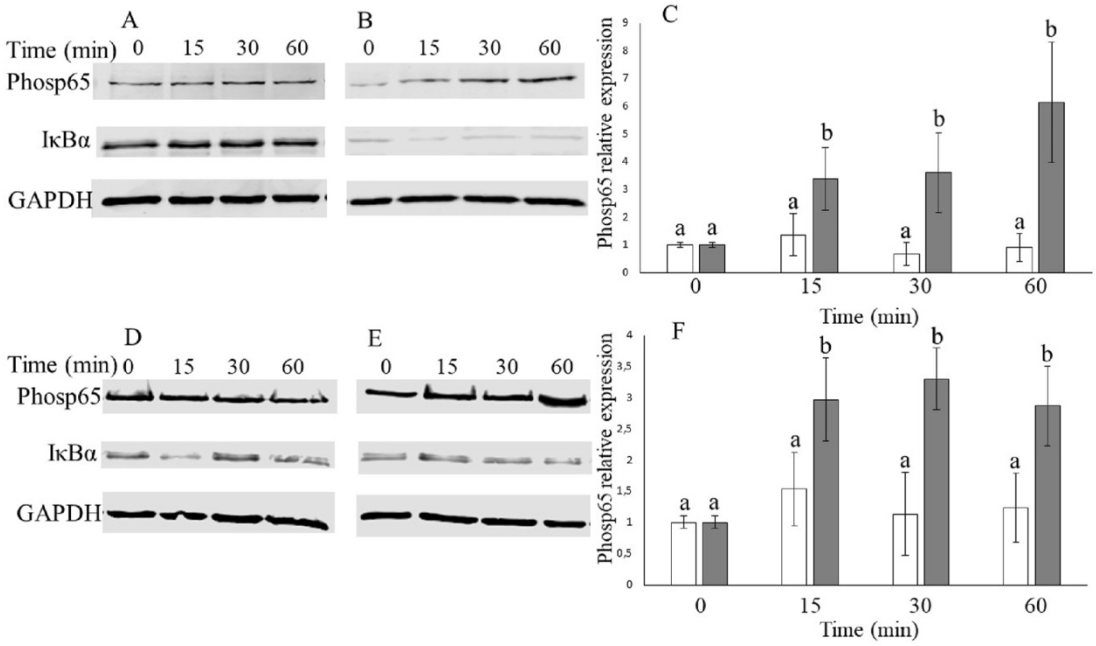

Figura 26: Activación de NF-κB en células HeLa/TLR5 estimuladas con los péptidos 6W y 11W.

> Análisis por Western blot de la subunidad fosforilada de NF-κB p65 (phos-p65), del inhibidor IκBα y de GAPDH en células HeLa control y HeLa/TLR5 tratadas con los péptidos 6W y 11W durante 0, 15, 30 y 60 minutos (A–B y D–E). La cuantificación densitométrica relativa de phos-p65 (C y F) mostró un incremento significativo en células HeLa/TLR5 estimuladas con ambos péptidos respecto a sus respectivos controles negativos. Se observó una degradación transitoria de IκBα en los tiempos de máxima activación, consistente con la activación de la vía clásica de NF-κB. Los valores representan la media ± desviación estándar (n = 3). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA de una vía). Barras grises = HeLa/TLR5; barras blancas = HeLa control.

La translocación nuclear de p65 NF-κB fue adicionalmente evaluada mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal en células HeLa/TLR5 (Figura 28). Las células tratadas con los péptidos 6W y 11W mostraron un aumento en la co-localización de la señal de p65 con el marcador nuclear DAPI, indicando una mayor translocación de NF-κB hacia el núcleo en comparación con las células no tratadas. Este efecto fue comparable al observado con el control positivo (flagelina bacteriana), mientras que el control negativo presentó

una distribución predominantemente citoplasmática de p65. Estos resultados complementan los datos del inmunoblot y confirman que los péptidos 6W y 11W activan la vía de NF-κB e inducen la translocación nuclear de su subunidad p65 en células HeLa/TLR5.

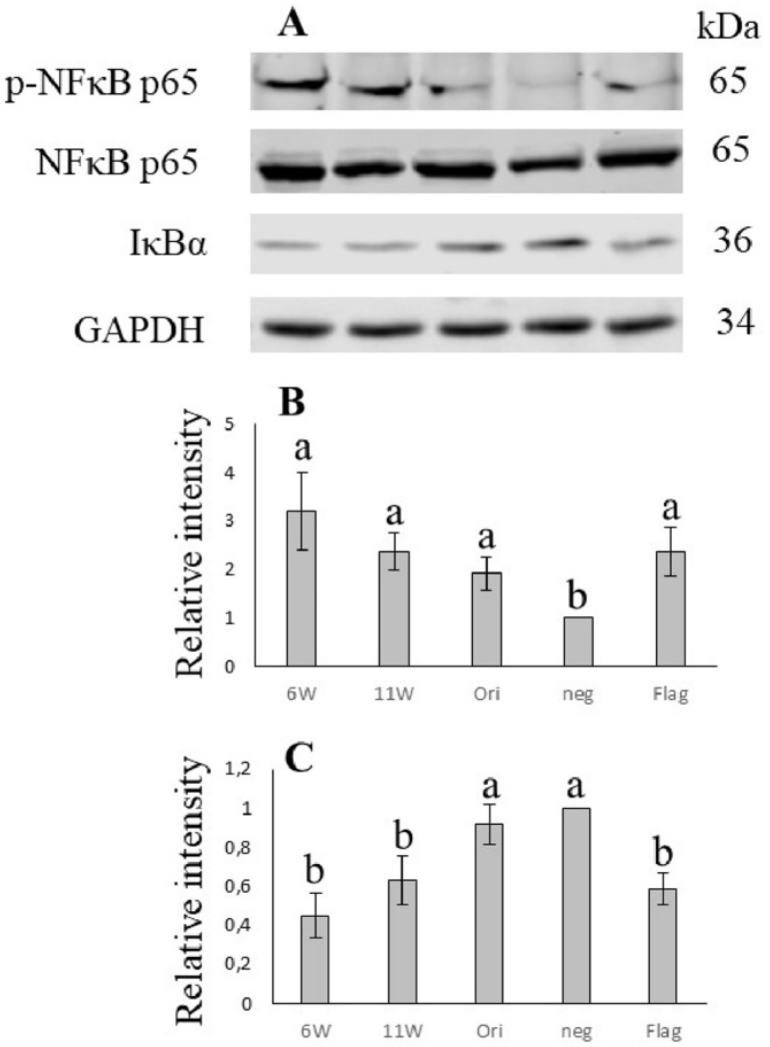

Figura 27: Inmunodetección de p65 fosforilado e IκBα en células HeLa/TLR5 estimuladas con péptidos derivados de HMGB1.

Western blot de p-NF-κB p65, NF-κB p65 total, IκBα y GAPDH en células HeLa/TLR5 tratadas con los péptidos 6W, 11W, SsOri y controles negativos y positivos (flagelina bacteriana) (A). El análisis densitométrico de p-p65 (B) mostró un incremento en las células tratadas con los péptidos en comparación con el control negativo, alcanzando niveles similares al control positivo. Paralelamente, la cuantificación de IκBα (C) reveló una reducción significativa tras la estimulación

con 6W y 11W, consistente con la degradación del inhibidor durante la activación de la vía clásica de NF-κB. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar (n = 3). Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$; ANOVA de una vía).

5.3.2. Análisis de translocación nuclear de p65

El análisis por microscopía confocal permitió evaluar la redistribución subcelular de p65 en células HeLa/TLR5 tratadas con los péptidos derivados de HMGB1 (Figura 28). Las células estimuladas con 6W y 11W presentaron una marcada translocación nuclear de p65, siendo este efecto más evidente con el péptido 11W y comparable al inducido por flagelina bacteriana (control positivo).

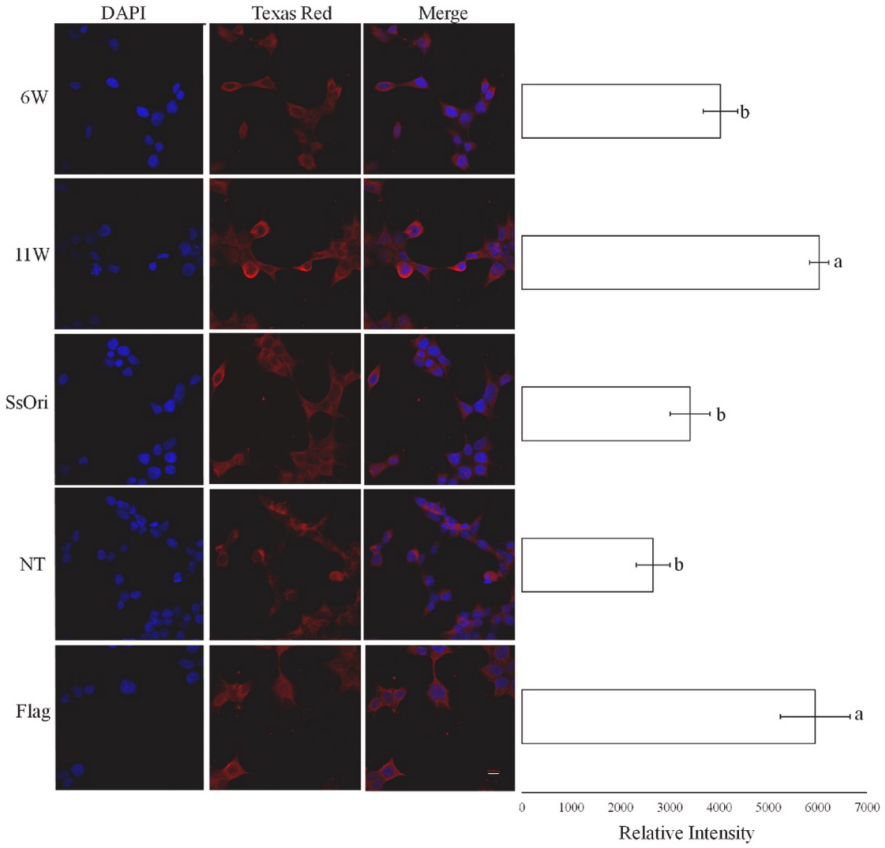

Figura 28: Translocación nuclear de p65 inducida por péptidos derivados de HMGB1 en células HeLa/TLR5.

Imágenes de microscopía confocal que muestran la localización subcelular de p65 (Texas Red, rojo) y núcleos teñidos con DAPI (azul) en células HeLa/TLR5 tratadas con los péptidos 6W, 11W y SsOri, además de los controles negativos (NT) y positivos (flagelina bacteriana, Flag). Las imágenes compuestas (Merge) evidencian la redistribución nuclear de p65 tras la estimulación con los péptidos, la cual es más marcada en las células tratadas con 11W. El análisis de intensidad relativa (gráficos a la derecha) confirmó que el tratamiento con 11W induce una translocación nuclear significativamente mayor de p65 en comparación con el control negativo ($p < 0,05$), mientras que 6W y SsOri mostraron una tendencia al aumento sin alcanzar significancia estadística. Los valores corresponden a la media de ≥ 50 células por condición; las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía). Barra de escala = 10 μm.

El análisis cuantitativo, realizado en más de 50 células por condición, confirmó un incremento significativo en la fracción nuclear de p65 únicamente tras la estimulación con 11W ($p < 0,05$). Los péptidos 6W y SsOri mostraron una tendencia al aumento sin alcanzar significancia estadística.

5.4. Ensayos en la línea celular SHK-1

Para evaluar el efecto inmunomodulador de rHMGB1 y sus péptidos derivados, se utilizó la línea celular SHK-1 de *Salmo salar* como modelo *in vitro*, y se analizó la expresión de genes asociados a vías proinflamatorias y adaptativas.

5.4.1. Expresión de genes y citoquinas inducida por SsHP91, 6W y 11W

La capacidad de los péptidos derivados de HMGB1 para modular la expresión génica en la línea celular SHK-1 se evaluó mediante RT-qPCR, analizando los niveles relativos de IL-1β, IL-8, MyD88, TGF-β, NF-κB, TNF-α, GATA-3, IFN-γ, TLR5M y TLR5S tras 3, 6 y 12 horas de estimulación con péptidos sintéticos (Figura 29).

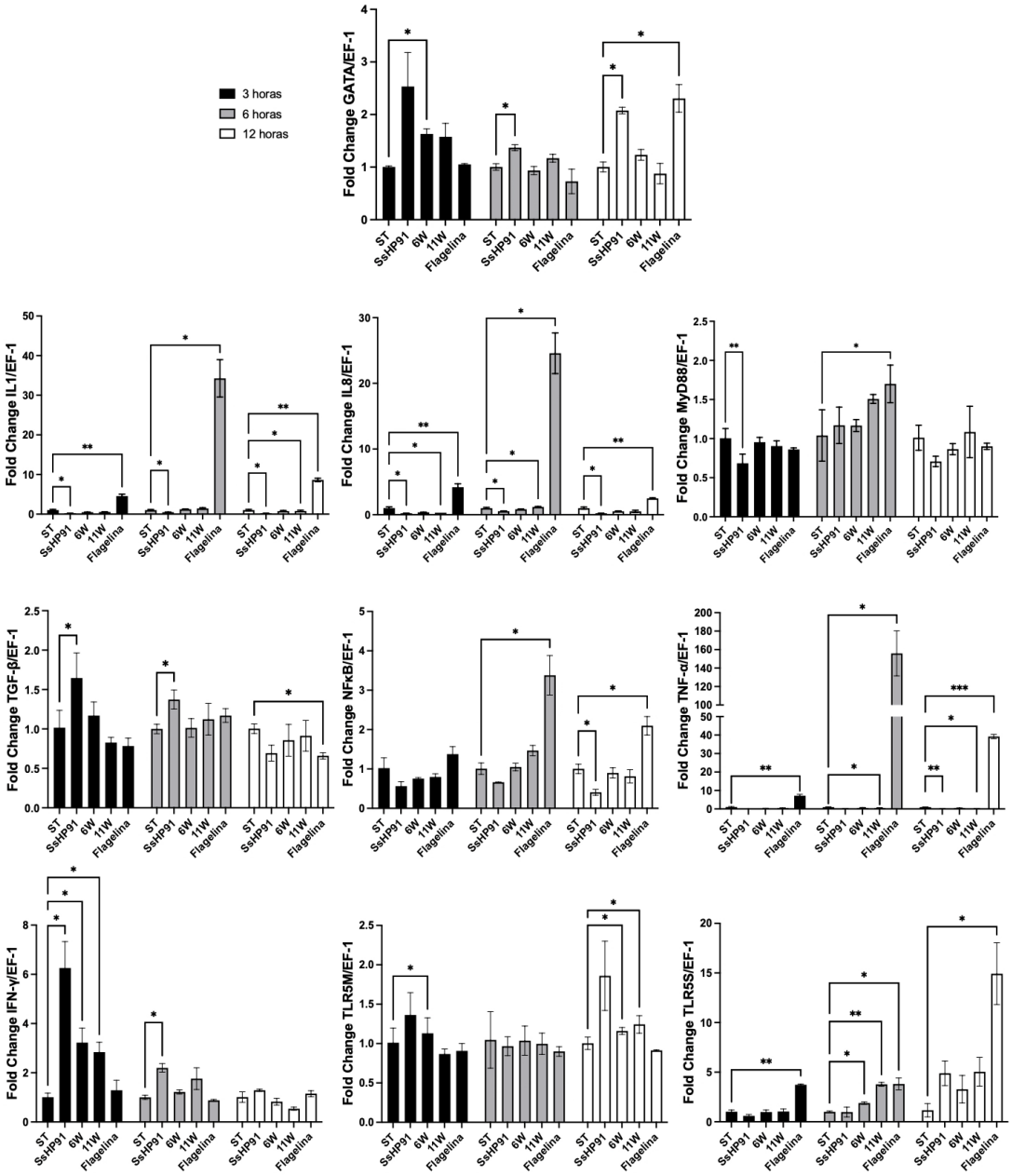

Figura 29: Expresión relativa de genes inmunes inducida por péptidos derivados de HMGB1 en la línea celular SHK-1.

Las células fueron estimuladas con 25 µM de los péptidos SsHp91, 6W y 11W durante 3, 6 y 12 horas. Se evaluó la expresión de IL-1β, IL-8, TNF-α, NF-κB, TGF-β, IL-10, IFN-γ, MyD88, TLR5M, TLR5S y GATA-3 mediante RT-qPCR. Los valores de expresión relativa se calcularon por el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, normalizando frente al gen constitutivo EF-1α. Los datos corresponden a la media ± D.E. de tres experimentos independientes, analizados en cinco condiciones experimentales y tres tiempos de incubación. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de

una vía con corrección de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001). Se incluyó como control células sin tratar (ST) y células estimuladas con flagelina (100 ng/mL).

Los tratamientos mostraron perfiles de activación diferenciados. La flagelina (control positivo) incrementó de forma consistente GATA-3 a las 12 h y los genes proinflamatorios IL-1β, IL-8, TNF-α, NF-κB y MyD88, con un máximo a las 6 h. SsHP91 aumentó GATA-3 a las 6 y 12 h, IFN-γ a las 3 y 6 h, y TGF-β a las 3 y 6 h, con un efecto limitado sobre IL-1β, IL-8 y MyD88. El péptido 6W indujo GATA-3 a las 6 h, TLR5S a las 6 h, TLR5M a las 12 h e IFN-γ a las 3 h. Por su parte, 11W aumentó TLR5S a las 6 h, TLR5M a las 12 h, IFN-γ a las 3 h, IL-8 a las 6 h e IL-1β a las 12 h.

La Tabla 5 sintetiza los cambios más relevantes en la expresión génica inducida por los distintos tratamientos.

Tabla 5: Resumen de la expresión génica inducida por los péptidos SsHP91, 6W y 11W en células SHK-1.

		SsHP91			**6W**			**11W**			**Flagelina**		
Actividad	**Genes**	**3h**	**6h**	**12h**	**3h**	**6h**	**12h**	**3h**	**6h**	**12h**	**3h**	**6h**	**12h**
Pro-inflamatorias	IL-1β									*	**	*	**
	IL-8								*		**	*	**
	TNF-α										**	*	***
	NF-κB											*	*
Anti-inflamatorias	TGF-β	*	*										
	IL-10												
T_H1 (Bacterias intracelulares y virus)	IFN-γ	*	*		*			*					
Otros mediadores de la respuesta inmune	MyD88											*	
	TLR5M				*		*			*			
	TLR5S					*			**		**	*	*
	GATA-3		*	*		*							*

La tabla resume los cambios observados en la expresión relativa de genes proinflamatorios (IL-1β, IL-8, TNF-α, NF-κB), antiinflamatorios (TGF-β, IL-10), asociados a respuesta T_H1 (IFN-γ) y mediadores de señalización inmunitaria

(MyD88, TLR5M, TLR5S, GATA-3) tras estimulación con 25 µM de los péptidos SsHp91, 6W y 11W durante 3, 6 y 12 h. Flagelina (100 ng/mL) se utilizó como control positivo. Los resultados corresponden a la integración de los datos mostrados en la Figura 29. Los asteriscos indican significancia estadística en la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

5.4.2. Expresión de genes y citoquinas inducida por rHMGB1

La capacidad de la proteína rHMGB1 para modular la expresión génica en células SHK-1 se evaluó mediante RT-qPCR en diferentes tiempos postestimulación (3, 6 y 12 horas). Se analizaron genes proinflamatorios (IL-1β, IL-8, TNF-α, NF-κB), antiinflamatorios (TGF-β, IL-10), asociados a la respuesta T_H1 (IFN-γ) y mediadores de señalización inmunitaria (MyD88, TLR5M, TLR5S y GATA-3) (Figura 30).

La Figura 30 muestra que rHMGB1 indujo cambios significativos y dependientes del tiempo en la expresión de genes inmunes en células SHK-1. A las 3 horas, se observó una activación temprana caracterizada por incrementos en IL-1β, IFN-γ y GATA-3. Además, se registró una mayor expresión de IL-8 respecto al control sin tratar.

A las 6 horas, rHMGB1 promovió una respuesta proinflamatoria robusta, evidenciada por la inducción simultánea de IL-1β, IL-8, TNF-α, NF-κB y MyD88. En este mismo intervalo también se incrementó la expresión de TLR5S.

A las 12 horas, rHMGB1 mantuvo una activación sostenida de genes proinflamatorios como IL-1β, IL-8, TNF-α y NF-κB, además de elevar GATA-3 y TLR5M. La expresión de TLR5S mostró una tendencia ascendente, aunque sin alcanzar significancia estadística frente a los controles.

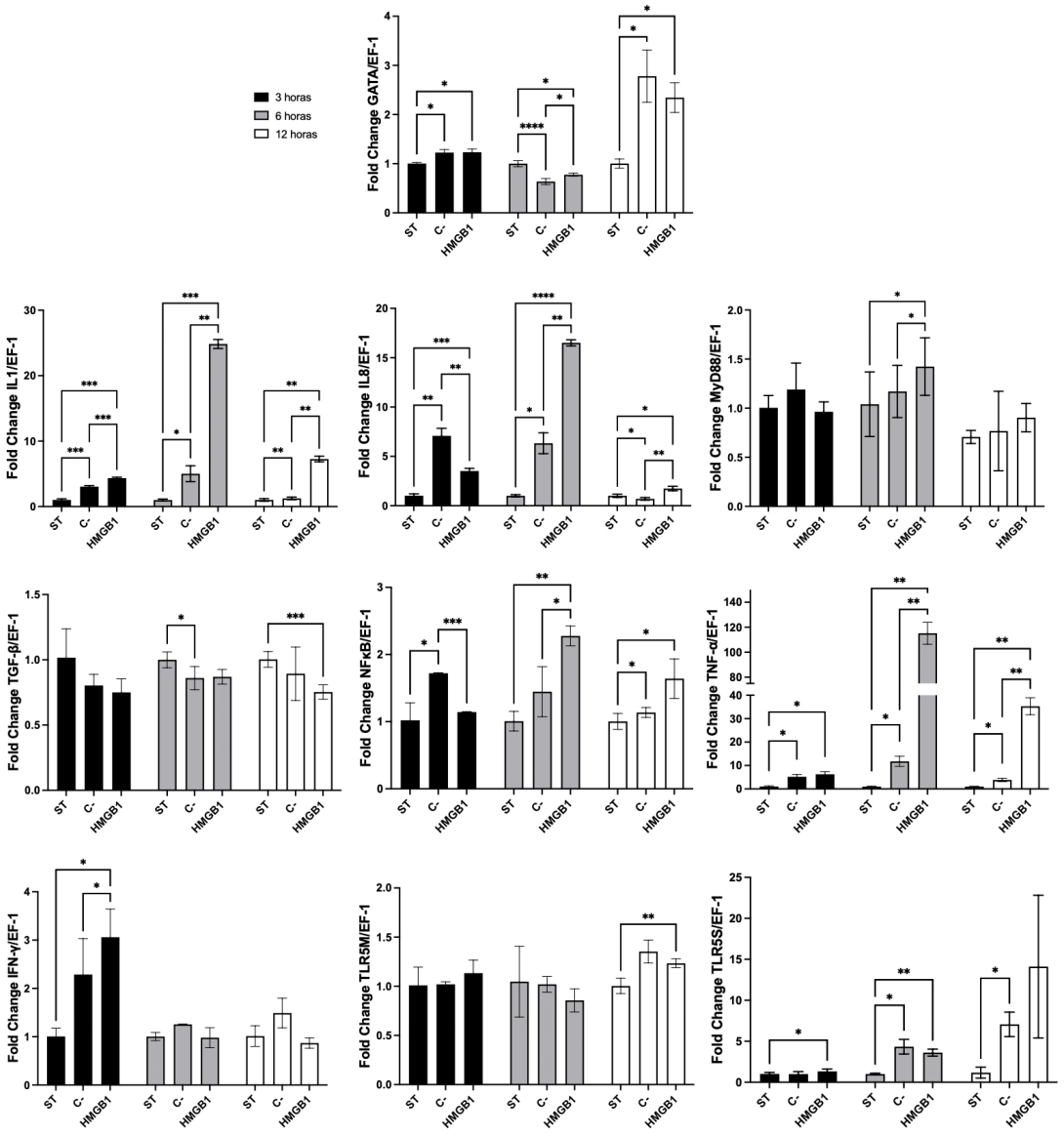

Figura 30: Expresión relativa de genes inmunes inducida por rHMGB1 en la línea celular SHK-1.

Las células fueron estimuladas con 10 µg/mL de proteína recombinante HMGB1 (rHMGB1) durante 3, 6 y 12 h. La expresión relativa de IL-1β, IL-8, TNF-α, NF-κB, TGF-β, IL-10, IFN-γ, MyD88, TLR5M, TLR5S y GATA-3 se determinó mediante RT-qPCR utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, normalizado con el gen constitutivo EF-1α. Los datos corresponden a la media ± D.E. de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de medidas repetidas de dos vías seguido de la prueba de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001). Se incluyó como control células sin tratar (ST) y proteínas no relacionadas de *E. coli* (control negativo).

Para integrar estos hallazgos, la Tabla 6 resume los cambios más relevantes en la expresión relativa de los genes evaluados bajo estimulación con rHMGB1, destacando la activación temprana de IL-1β e IFN-γ, la regulación sostenida de genes proinflamatorios y la participación de factores de señalización y transcripción en fases tardías.

Tabla 6: Resumen de la expresión génica inducida por rHMGB1 en células SHK-1.

		HMGB1		
Actividad	**Genes**	**3h**	**6h**	**12h**
Pro-inflamatorias	IL-1β	***	***	**
	IL-8	***	****	*
	TNF-α	*	**	**
	NF-κB		**	*
Anti-inflamatorias	TGF-β			
	IL-10			
T_H1 (Bacterias intracelulares y virus)	IFN-γ	*		
Otros mediadores de la respuesta inmune	MyD88		*	
	TLR5M			**
	TLR5S	*	**	
	GATA-3	*		*

La tabla sintetiza los cambios observados en genes proinflamatorios (IL-1β, IL-8, TNF-α, NF-κB), antiinflamatorios (TGF-β, IL-10), asociados a respuesta T_H1 (IFN-γ) y mediadores de señalización (MyD88, TLR5M, TLR5S y GATA-3) tras la estimulación con rHMGB1 durante 3, 6 y 12 h. Los resultados corresponden a la integración de los datos de la Figura 30. Los asteriscos indican significancia estadística según la prueba de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

5.4.3. Ensayo de desafío con *Piscirickettsia salmonis* en SHK-1

Para evaluar la capacidad protectora de los péptidos derivados de HMGB1 frente a la infección bacteriana, se realizó un ensayo de desafío en células SHK-1 pretratadas con 6W y 11W y, posteriormente, infectadas con *Piscirickettsia salmonis*. La citotoxicidad se midió mediante liberación de LDH en el sobrenadante celular durante un periodo de 15 días post-infección.

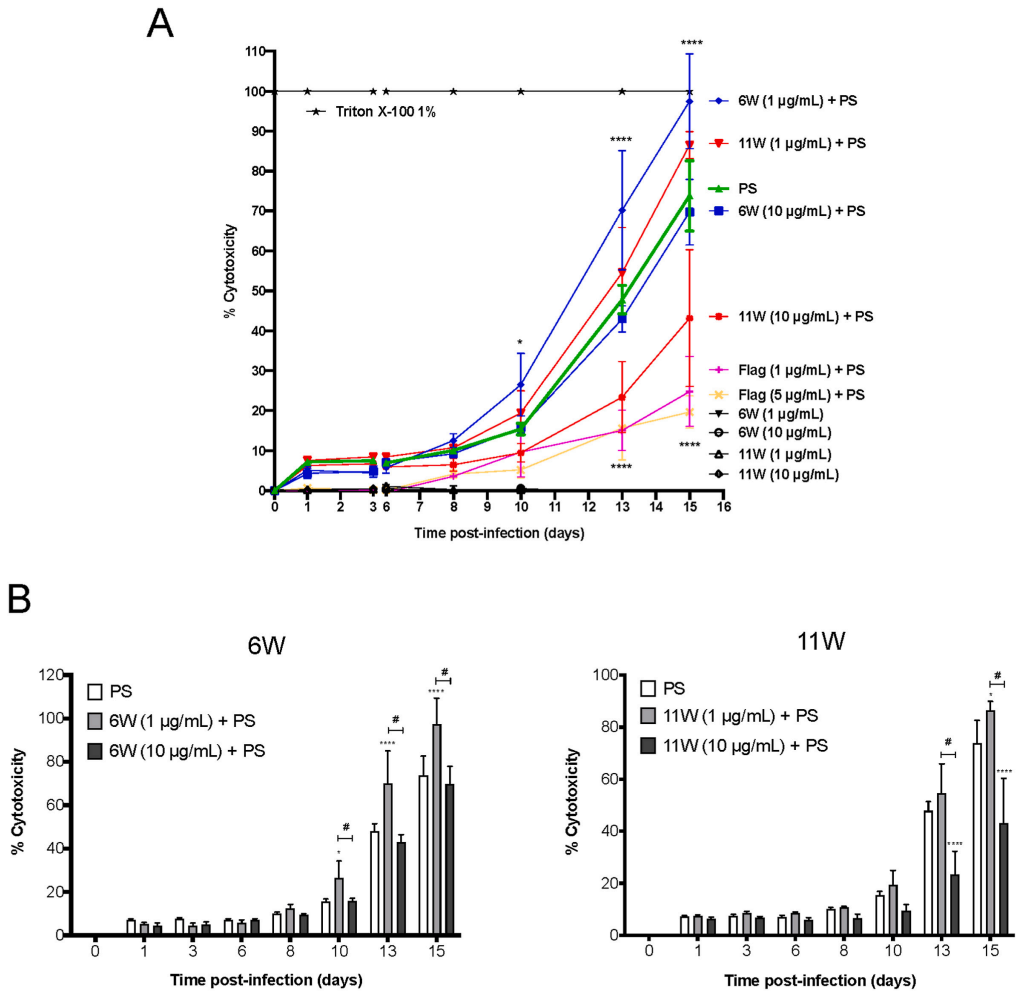

Figura 31: Efecto de los péptidos 6W y 11W en la citotoxicidad inducida por *Piscirickettsia salmonis* en células SHK-1.

(A) Curva comparativa de citotoxicidad medida como liberación de LDH en células SHK-1 infectadas con *P. salmonis* (PS) y pretratadas con péptidos 6W o 11W a diferentes concentraciones, en comparación con controles de flagelina (Flag) y control de infección sin tratamiento. (B) Análisis independiente del efecto dosis-dependiente de los péptidos 6W y 11W (1 μg/mL y 10 μg/mL) en células infectadas, mostrando que la mayor concentración de 11W confiere protección funcional, mientras que 6W no evidencia protección a ninguna concentración evaluada. Los datos corresponden a media ± error estándar (n = 4). Asteriscos indican diferencias significativas respecto al control de infección (*p < 0,05; ****p < 0,0001; ANOVA de dos vías, prueba post hoc de Tukey). El símbolo # indica diferencias significativas entre concentraciones dentro de cada tratamiento.

Los resultados mostraron que las células pretratadas con el péptido 11W a 10

µg/mL presentaron una reducción significativa en los niveles de citotoxicidad en comparación con las células infectadas sin tratamiento (Figura 31A). Este efecto protector fue evidente a partir del día 13 post-infección y se mantuvo hasta el día 15 ($p < 0,0001$). El pretratamiento con 6W no mostró efecto protector a ninguna de las concentraciones evaluadas; incluso, 6W a 1 µg/mL aumentó el efecto lítico de la bacteria en comparación con el control de infección no tratado. Por su parte, 11W a 1 µg/mL no redujo la citotoxicidad y mostró un aumento del efecto lítico en el último día del ensayo.

Al analizar las concentraciones de tratamiento, ambos péptidos mostraron un efecto dependiente de la dosis (Figura 31B): para 11W, la concentración de 10 μg/mL confirió protección significativa, alcanzando reducciones de citotoxicidad superiores al 40 % en días finales del ensayo ($p < 0,05$), mientras que 1 μg/mL resultó pro-lítico; para 6W, la concentración de 10 μg/mL redujo el efecto lítico observado a 1 μg/mL, aunque sin conferir protección funcional.

Estos resultados indican que, aunque 6W y 11W activan rutas inmunes en células SHK-1, solo 11W mostró un efecto protector funcional frente a *P. salmonis* bajo las condiciones evaluadas.

5.5. Ensayos *in vivo* en *Salmo salar*

5.5.1. Tratamiento con rHMGB1 y péptidos derivados en *Salmo salar*

Tras los ensayos en células SHK-1, se evaluó la respuesta inmunitaria inducida por rHMGB1 y sus péptidos derivados directamente en *Salmo salar*. Para ello, las moléculas se administraron por inyección intraperitoneal y se analizó la expresión relativa de genes asociados a respuestas proinflamatorias, antiinflamatorias y adaptativas (T_H1, T_H2 y T_H17) en dos órganos linfoides clave: bazo y riñón anterior. Las evaluaciones se realizaron a 1, 3, 7, 14 y 21 días postratamiento para caracterizar la cinética y magnitud de la respuesta

inmune en un modelo *in vivo*.

5.5.2. Expresión de genes inmunes inducida por rHMGB1 en *Salmo salar*

La respuesta inmune inducida por rHMGB1 se evaluó por separado en el bazo y en el riñón anterior de *Salmo salar*, con el fin de distinguir la magnitud y la cinética de activación en ambos órganos linfoides.

5.5.2.1. Bazo

La administración de rHMGB1 en el bazo indujo cambios temporales en la expresión de genes inmunes y generó una respuesta más intensa que la observada en el riñón anterior (Figura 32).

En este órgano, rHMGB1 desencadenó al día 1 una respuesta temprana con componentes antiinflamatorios y antivirales, evidenciada por el aumento de TGF-β e IFN-α1. Hacia el día 7, se detectó un incremento de IFN-γ tanto en el bazo como en el riñón anterior, lo que indica una respuesta tipo T_H1 en ambos tejidos. En ese mismo intervalo, el bazo mostró además un aumento de IFN-α1 e IL-22, compatible con una respuesta antiviral y T_H17 específica de este órgano.

En etapas posteriores, rHMGB1 promovió un aumento significativo de IL-4/13A en el día 14, lo que sugiere la incorporación de una respuesta T_H2 en el bazo, mientras que IFN-α1 permaneció elevado hasta el día 21. Este patrón muestra una respuesta antiinflamatoria y antiviral temprana, seguida de señales asociadas a respuestas T_H1, T_H17 y T_H2. IL-17, en cambio, no mostró cambios significativos en ninguno de los tiempos analizados, lo que indica que la respuesta inducida por rHMGB1 fue selectiva y dependiente del tiempo.

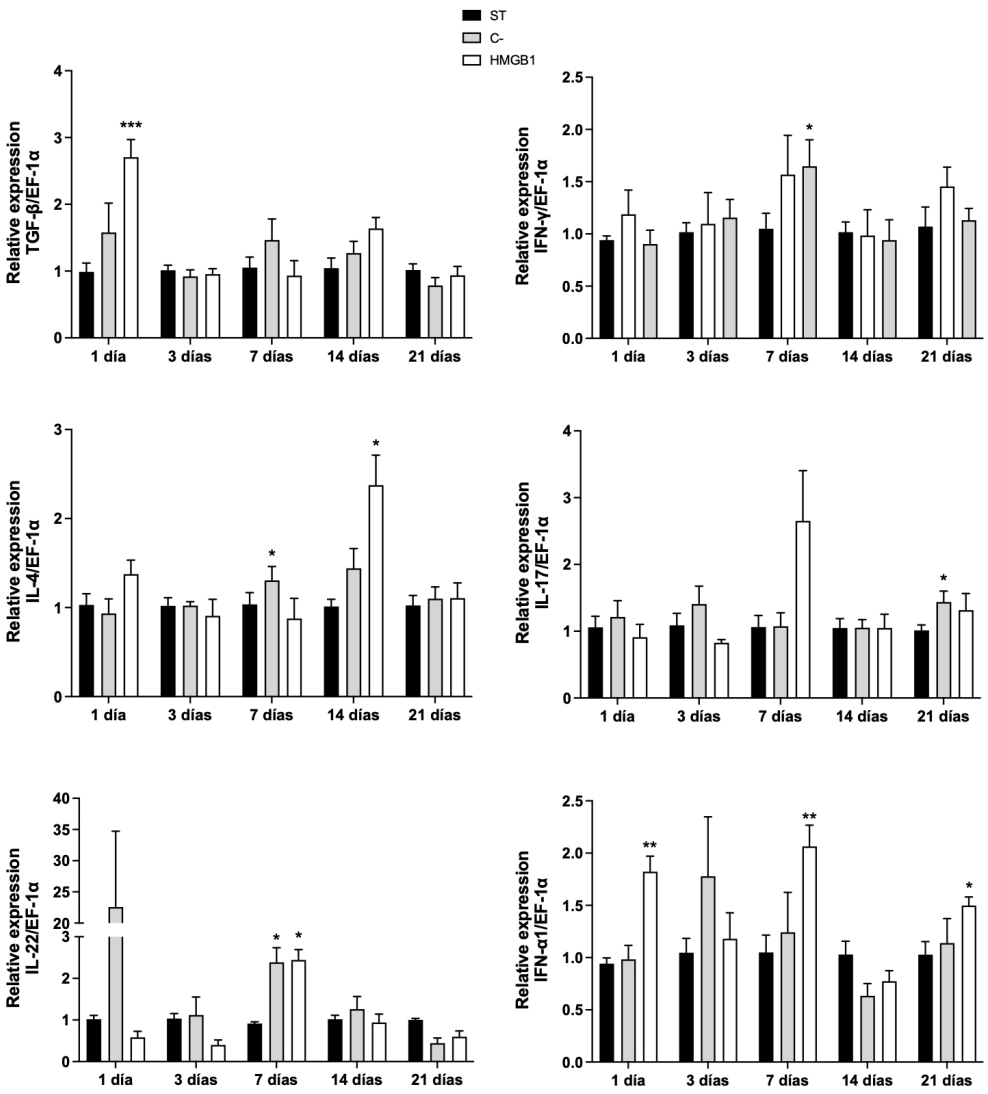

Figura 32: Expresión relativa de genes inmunes inducida por rHMGB1 en el bazo de *Salmo salar*.

Los peces fueron inyectados i.p. con 100 µL del tratamiento correspondiente a una concentración final de 20 µg/pez y evaluados en los días 1, 3, 7, 14 y 21 postinyección. Se compararon los grupos ST, C y rHMGB1. La expresión relativa de TGF-β, IFN-γ, IL-4/13A, IL-17, IL-22 e IFN-α1 se determinó mediante RT-qPCR utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, normalizado con EF-1α. Los resultados se expresan como media ± D.E. de cinco peces por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

5.5.2.2. Riñón anterior

En contraste, la respuesta inducida por rHMGB1 en el riñón anterior fue más restringida y se limitó a un único evento significativo a lo largo del periodo de evaluación (Figura 33).

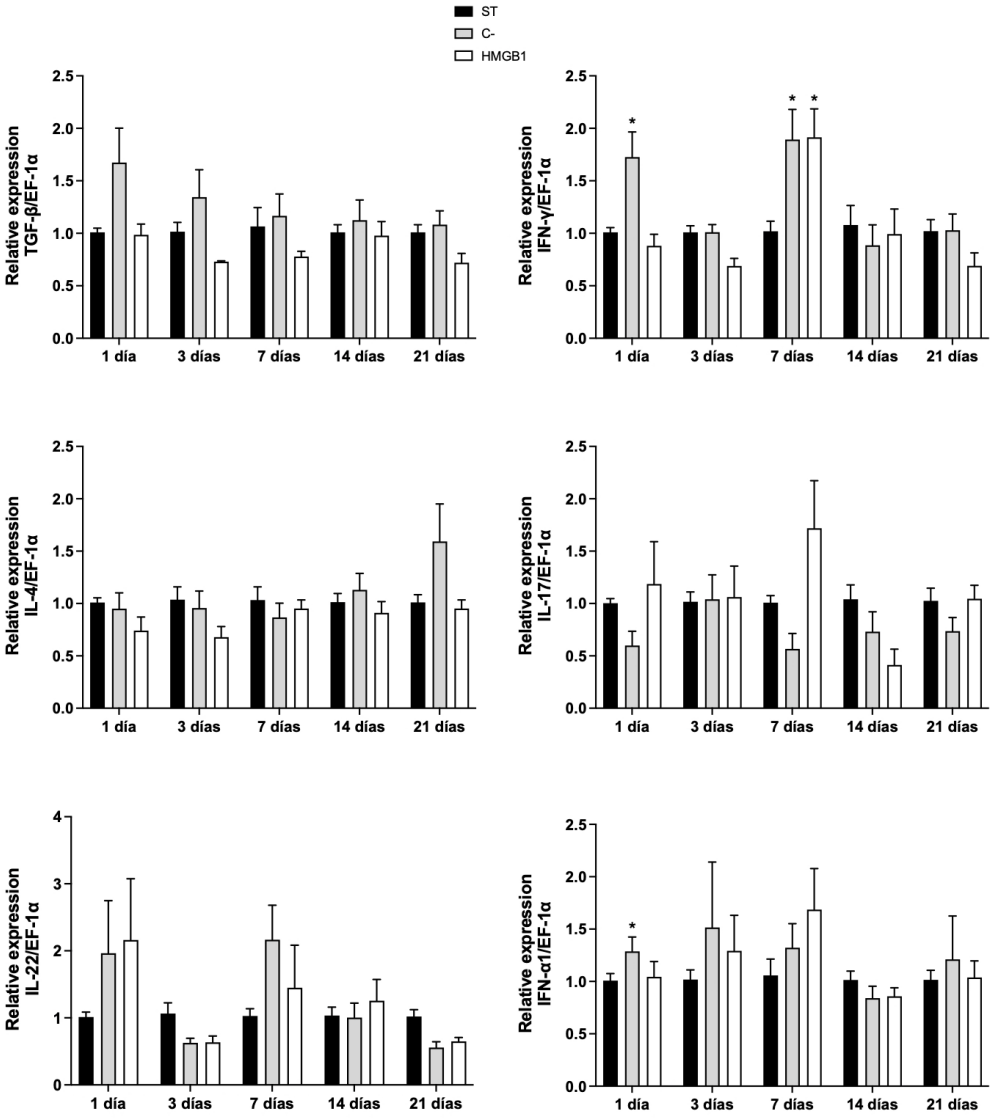

Figura 33: Expresión relativa de genes inmunes inducida por rHMGB1 en el riñón anterior de *Salmo salar*.

Los peces fueron inyectados i.p. con 100 µL del tratamiento correspondiente a una concentración final de 20 µg/pez y evaluados en los días 1, 3, 7, 14 y 21 postinyección. Se compararon los grupos ST, C y rHMGB1. La expresión relativa

de TGF-β, IFN-γ, IL-4/13A, IL-17, IL-22 e IFN-α1 se determinó mediante RT-qPCR utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, normalizado con EF-1α. Los resultados se expresan como media ± D.E. de cinco peces por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

El único cambio significativo detectado en este órgano fue el aumento de IFN-γ en el día 7. No se observaron diferencias significativas en TGF-β, IL-4/13A, IL-17, IL-22 ni IFN-α1 en ninguno de los demás intervalos evaluados.

Para integrar estos hallazgos, la Tabla 7 resume los cambios significativos inducidos por rHMGB1 en ambos órganos.

Tabla 7: Expresión diferencial de citoquinas y genes inmunes inducida por rHMGB1 en bazo y riñón anterior de *Salmo salar*.

			HMGB1				
Actividad	**Órgano**	**Genes**	**1d**	**3d**	**7d**	**14d**	**21d**
Antiinflamatorias	**Bazo**	TGF-β	***				
	Riñón						
T_H1 (Intracelulares y virus)	**Bazo**	IFN-γ			*		
	Riñón				*		
T_H2 (Helmintos y parásitos)	**Bazo**	IL-4/13A				*	
	Riñón						
T_H17 (Extracelulares y hongos)	**Bazo**	IL-17					
	Riñón						
	Bazo	IL-22			*		
	Riñón						
Antiviral	**Bazo**	IFN-α1	**		**		*
	Riñón						

La expresión relativa se determinó mediante RT-qPCR utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, normalizado respecto a EF-1α. Los datos se expresan como media ± D.E. de cinco peces por grupo. La tabla resume los cambios significativos observados en genes antiinflamatorios (TGF-β), asociados a respuesta T_H1 (IFN-

γ), T_H2 (IL-4/13A), T_H17 (IL-17, IL-22) y antiviral (IFN-α1) tras la administración intraperitoneal de 20 µg/pez de rHMGB1. Las evaluaciones se realizaron en bazo y riñón anterior a los días 1, 3, 7, 14 y 21 postinyección. Los resultados corresponden a la integración de los datos mostrados en las Figuras 32 y 33. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

5.5.3. Expresión de genes inmunes inducida por péptidos derivados en *Salmo salar*

Los péptidos derivados de HMGB1 se evaluaron en el mismo esquema *in vivo*, distinguiendo la respuesta inducida en el bazo de la observada en el riñón anterior.

5.5.3.1. Bazo

En el bazo, los péptidos SsHP91, 6W y 11W indujeron respuestas selectivas y dependientes del tiempo (Figura 34).

A nivel esplénico, SsHP91 indujo un aumento significativo de TGF-β en el día 1 y de IFN-α1 en el día 7. El péptido 11W promovió una respuesta temprana antiinflamatoria y T_H2, evidenciada por el incremento de TGF-β e IL-4/13A en el día 1, además de una respuesta antiviral en el día 3, reflejada en el aumento de IFN-α1. Por su parte, 6W indujo una respuesta T_H1 en el bazo, evidenciada por el aumento de IFN-γ a los 3 días.

Hacia el día 14 se observó un incremento de IL-4/13A tanto en SsHP91 como en 11W. No se detectaron cambios significativos en IL-17 o IL-22, lo que indica que, en el bazo, los péptidos promovieron perfiles de activación diferenciales y dependientes del compuesto administrado.

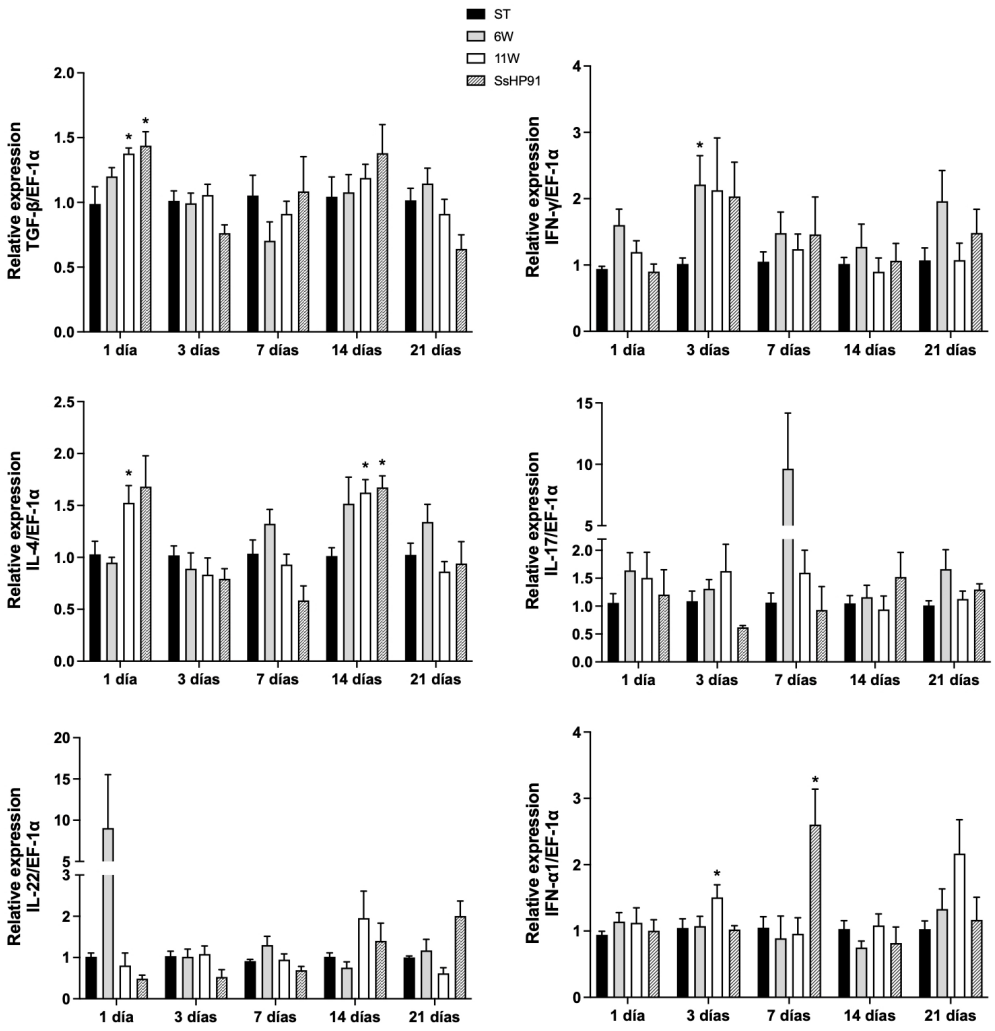

Figura 34: Expresión relativa de genes inmunes inducida por péptidos derivados de HMGB1 en el bazo de *Salmo salar*.

Los peces fueron inyectados i.p. con 100 µL del tratamiento correspondiente a una concentración final de 20 µg/pez y evaluados en los días 1, 3, 7, 14 y 21 postinyección. Se compararon los grupos ST, SsHP91, 6W y 11W. La expresión relativa de TGF-β, IFN-γ, IL-4/13A, IL-17, IL-22 e IFN-α1 se determinó mediante RT-qPCR utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, normalizado con EF-1α. Los resultados se expresan como media ± D.E. de cinco peces por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

5.5.3.2. Riñón anterior

En el riñón anterior, la respuesta inducida por los péptidos fue más limitada que en el bazo y se concentró en un único marcador de tipo T_H1 (Figura 35).

En este tejido, la única variación significativa correspondió al aumento de IFN-γ inducido por 6W en el día 7, lo que refuerza el sesgo T_H1 observado para este péptido. Para TGF-β, IL-4/13A, IL-17, IL-22 e IFN-α1 no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tiempos analizados.

Para sintetizar estos resultados, la Tabla 8 resume los cambios significativos inducidos por SsHP91, 6W y 11W en ambos órganos.

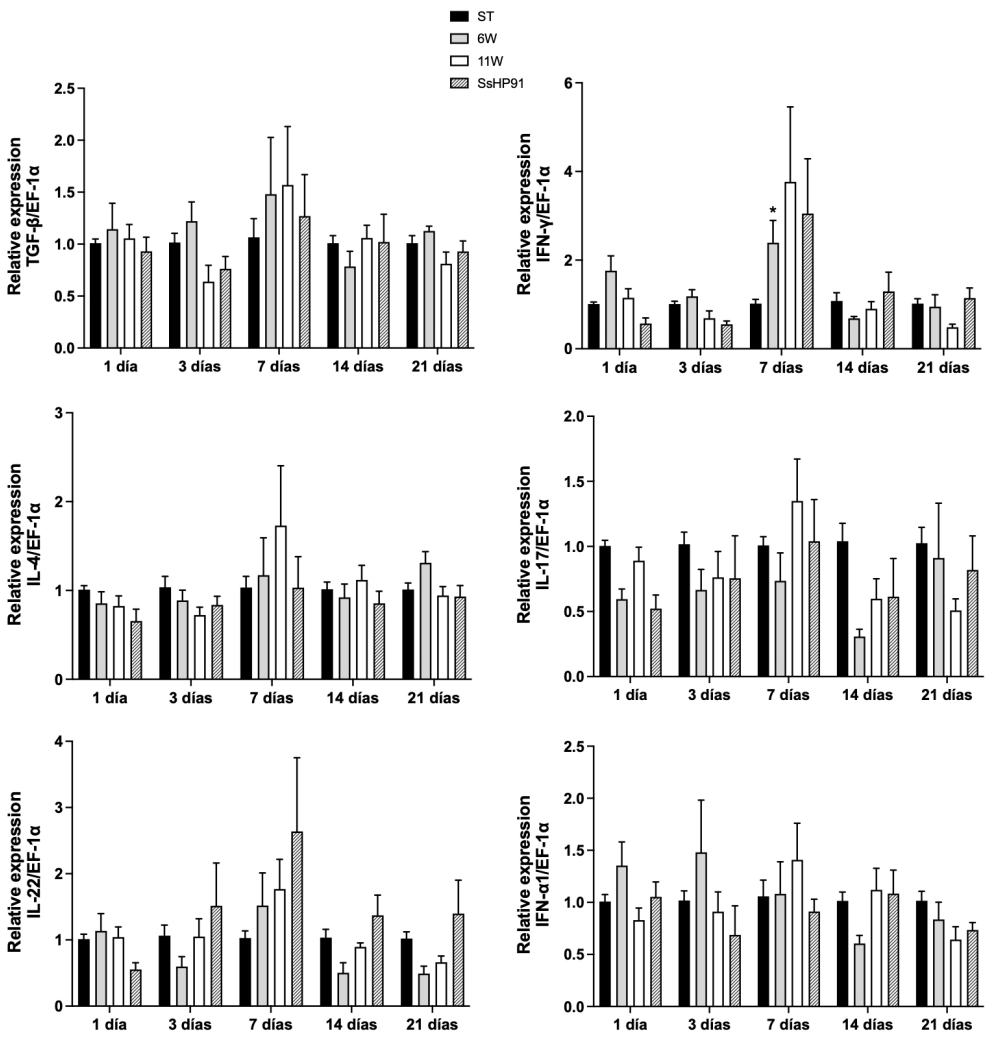

Figura 35: Expresión relativa de genes inmunes inducida por péptidos derivados de HMGB1 en el riñón anterior de *Salmo salar*.

Los peces fueron inyectados i.p. con 100 µL del tratamiento correspondiente a una concentración final de 20 µg/pez y evaluados en los días 1, 3, 7, 14 y 21 postinyección. Se compararon los grupos ST, SsHP91, 6W y 11W. La expresión relativa de TGF-β, IFN-γ, IL-4/13A, IL-17, IL-22 e IFN-α1 se determinó mediante RT-qPCR utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, normalizado con EF-1α. Los resultados se expresan como media ± D.E. de cinco peces por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

Tabla 8: Expresión diferencial de citoquinas y genes inmunes inducida por péptidos derivados de HMGB1 en bazo y riñón anterior de *Salmo salar*.

			SsHP91					6W					11W				
Actividad	**Órgano**	**Genes**	**1d**	**3d**	**7d**	**14d**	**21d**	**1d**	**3d**	**7d**	**14d**	**21d**	**1d**	**3d**	**7d**	**14d**	**21d**
Antiinflamatorias	**Bazo**	TGF-β	*										*				
	Riñón																
T_H1 (Bacterias intracelulares y virus)	**Bazo**	IFN-γ							*								
	Riñón									*							
T_H2 (Helmintos y parásitos extracelulares)	**Bazo**	IL-4/13A				*							*			*	
	Riñón																
T_H17 (Bacterias extracelulares y hongos)	**Bazo**	IL-17															
	Riñón																
	Bazo	IL-22															
	Riñón																
Antiviral	**Bazo**	IFN-α1			*									*			
	Riñón																

La expresión relativa se determinó mediante RT-qPCR utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, normalizado respecto a EF-1α. Los datos se expresan como media ± D.E. de cinco experimentos independientes. La tabla resume los cambios significativos observados en genes antiinflamatorios (TGF-β), asociados a respuesta T_H1 (IFN-γ), T_H2 (IL-4/13A), T_H17 (IL-17, IL-22) y antiviral (IFN-α1) tras la administración intraperitoneal de 20 µg/pez de los péptidos SsHP91, 6W y 11W. Las evaluaciones se realizaron en bazo y riñón anterior a los días 1, 3, 7, 14 y 21 postinyección. Los resultados corresponden a la integración de los datos mostrados en las Figuras 34 y 35. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

5.6. Ensayo de rHMGB1 y 11W como adyuvante molecular en *Salmo salar*

Con el objetivo de evaluar el potencial inmunomodulador de rHMGB1 y del péptido derivado 11W como adyuvantes moleculares en *Salmo salar*, se diseñó un ensayo *in vivo* que integró la evaluación de parámetros celulares y humorales. El enfoque consistió en caracterizar la expresión de genes inmunes en órganos linfoides (bazo y riñón anterior), orientados a identificar la activación de vías T_H1, T_H2 y T_H17, y en cuantificar anticuerpos séricos específicos frente al antígeno modelo VP2 de IPNV en distintos intervalos postinmunización.

5.6.1. Expresión de genes inmunes en riñón anterior y bazo post-inmunización

En la Figura 36 se evidencia que la coadministración de la proteína rHMGB1 y el antígeno indujo un aumento significativo en la expresión de IFN-γ, IL-17 e IL-4/13A en comparación con el grupo placebo.

En contraste, en el riñón anterior, la coadministración de la proteína rHMGB1 y el antígeno no generó diferencias significativas en la expresión de genes inmunes. Sin embargo, la coadministración del péptido 11W y el antígeno estimuló significativamente la expresión de IFN-γ e IL-4/13A.

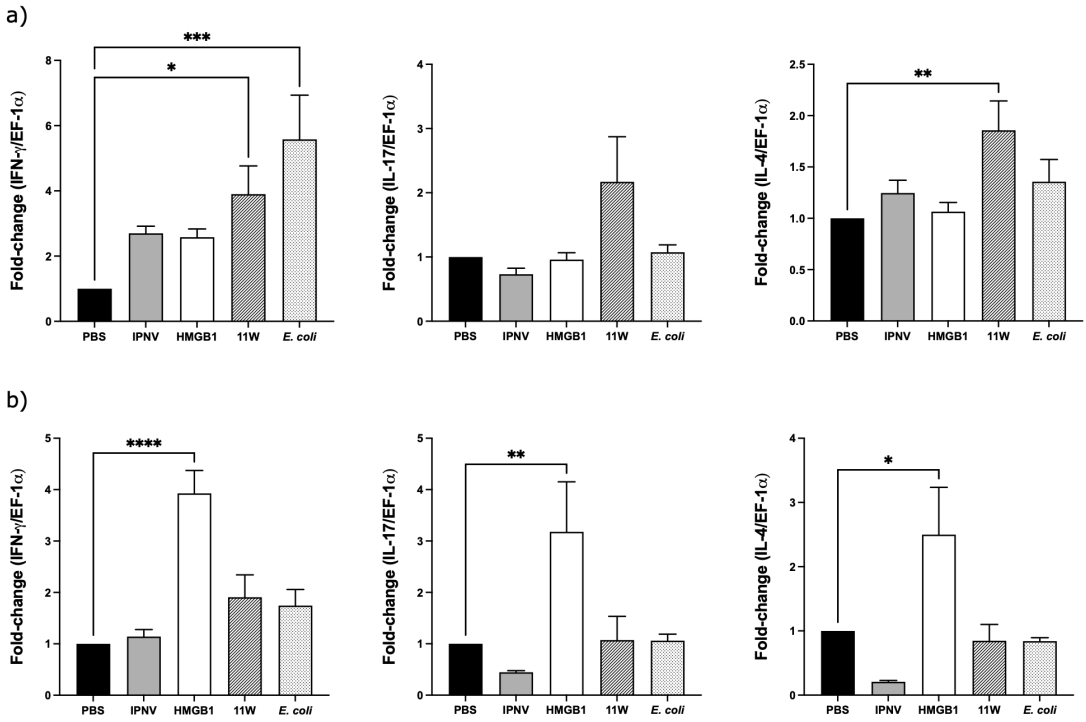

Figura 36: Expresión relativa de genes inmunes en *Salmo salar* tras la inmunización con rHMGB1 y el péptido 11W como adyuvantes moleculares.

a) Riñón anterior. b) Bazo. Los peces fueron inmunizados con la proteína recombinante VP2 del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) a una dosis de 2 µg/g de peso corporal, en combinación con rHMGB1 (50 µg/pez) o el péptido 11W (20 µg/pez). Las formulaciones se prepararon en una emulsión con fase acuosa (40 %) y fase oleosa (60 %) utilizando Montanide™ ISA 763A VG como adyuvante. La expresión relativa de IFN-γ, IL-17 e IL-4/13A se determinó en el día 24 postinmunización (360 UTA: Unidades Térmicas Acumuladas) mediante RT-qPCR, utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ y normalizando frente al gen constitutivo EF-1α. Los datos corresponden a la media ± D.E. de cinco peces por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

5.6.2. Evaluación de respuesta inmune humoral

Para evaluar la respuesta inmune humoral se realizó una cinética de anticuerpos en muestras de suero obtenidas a los 0, 18, 35, 49 y 60 días postinmunización.

En la Figura 37 se observa que, a los 18 días, rHMGB1 presentó valores significativamente superiores a los registrados en PBS y *E. coli*, mientras que el grupo inmunizado solo con VP2 recombinante también mostró un incremento en comparación con *E. coli*. En este mismo intervalo, *E. coli* fue significativamente mayor que PBS.

En el día 35, tanto rHMGB1 como 11W presentaron aumentos respecto a PBS, mientras que el grupo inmunizado solo con VP2 recombinante alcanzó los valores más altos y además superó a *E. coli*. En el día 49, todos los tratamientos evaluados mostraron incrementos significativos frente a PBS, con niveles de absorbancia aproximados de 0,4 para rHMGB1 y de 0,6 para 11W y VP2 recombinante.

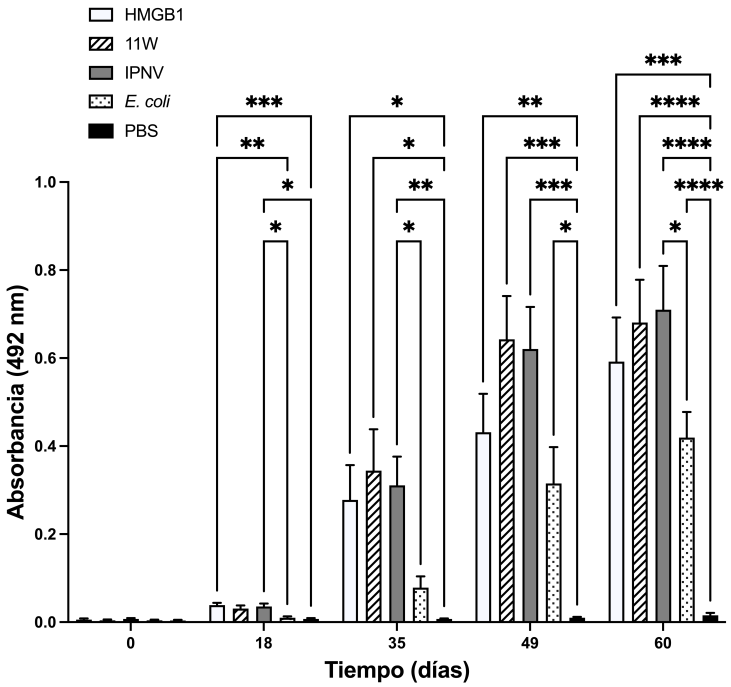

Figura 37: Producción de IgM específica frente a VP2 recombinante en suero de *Salmo salar* tras la administración de rHMGB1 y 11W como adyuvantes moleculares.

Los niveles de IgM específica se determinaron mediante ELISA en sueros recolectados a los 0, 18, 35, 49 y 60 días postinmunización. Los datos corresponden a la media ± D.E. de cinco peces por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de Šídák (*p<0,05; **p<0,01;

***p<0,001; ****p<0,0001).

A los 60 días postinmunización, se observó el nivel más alto de respuesta en todos los grupos estimulados. rHMGB1 alcanzó valores cercanos a 0,6, mientras que 11W y VP2 recombinante se aproximaron a 0,7. En este punto, el grupo inmunizado solo con VP2 recombinante fue significativamente superior a *E. coli*, aunque sin diferencias relevantes frente a los otros tratamientos.

Estos resultados indican que rHMGB1 y 11W promovieron la producción de IgM específica en una cinética similar a la observada en el grupo inmunizado solo con VP2 recombinante, sin diferencias significativas en la magnitud final de la respuesta.

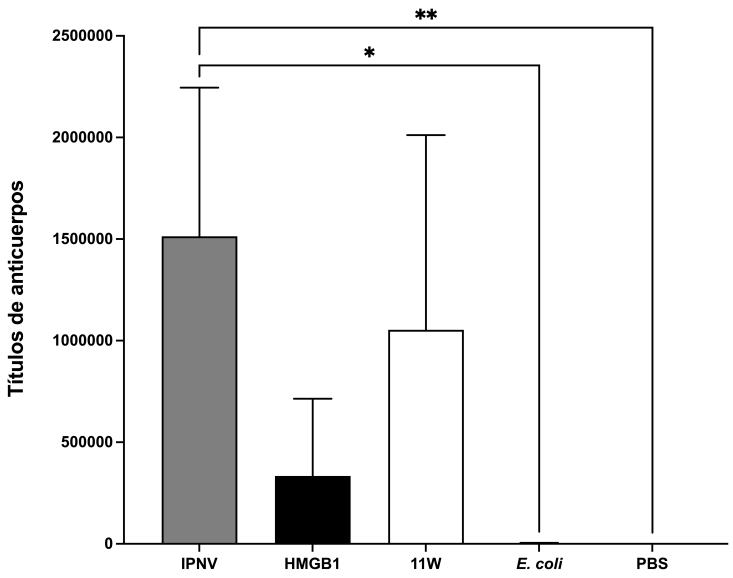

Figura 38: Título de anticuerpos IgM específicos en suero de *Salmo salar* a los 35 días postinmunización.

Los niveles de IgM se evaluaron mediante ELISA. El grupo inmunizado con VP2 recombinante de IPNV mostró un incremento significativo frente a PBS (**p<0,01) y respecto a *E. coli* (*p<0,05). Los tratamientos con rHMGB1 y 11W no presentaron diferencias significativas en comparación con los controles.

Por otro lado, la Figura 38 muestra que a los 35 días postinmunización el grupo

inmunizado solo con VP2 recombinante alcanzó los títulos de IgM más altos, cercanos a 1.500.000 unidades. En contraste, los grupos tratados con rHMGB1 y 11W presentaron títulos inferiores, con rHMGB1 alrededor de 500.000 y 11W ligeramente por encima del millón, aunque sin diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles.

5.7. Evaluación de respuesta inmune celular

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune celular inducida por los tratamientos, se realizó un ensayo de reestimulación con el antígeno en leucocitos de riñón anterior de *Salmo salar* a los 60 días postinmunización. Estas células fueron expuestas nuevamente a los estímulos (rHMGB1, 11W, VP2 y controles), y se analizó la expresión de genes representativos de distintas vías inmunológicas (T_H1, T_H2, T_H17 y proinflamatorias) mediante RT-qPCR a las 3 y 12 horas postestimulación.

En la Figura 39 se observan las diferencias entre los tratamientos con la reestimulación. En el grupo inmunizado solo con VP2 la reestimulación aumentó significativamente la expresión de IFN-γ a las 3 horas en comparación a las células sin estimular y a rHMGB1, mientras que el péptido 11W presentó la mayor inducción, aumentando significativamente la expresión de este gen en comparación a todos los grupos evaluados (VP2, rHMGB1, *E. coli*, PBS y su propio control). Además, HMGB1 disminuyó significativamente la expresión de IFN-γ a las 3 horas en comparación al grupo inmunizado con el antígeno VP2 solo, al grupo inmunizado con el antígeno en combinación con 11W y al grupo de PBS. Por otro lado, el péptido 11W exhibió niveles de expresión de IL-4/13A significativamente superiores en comparación con todos los grupos, incluyendo VP2, rHMGB1, *E. coli*, PBS y su control. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de IL-4/13A en el resto de los grupos experimentales respecto a sus controles. Para IL-17, el péptido

11W mostró niveles significativamente más altos que VP2, rHMGB1, *E. coli*, PBS y su control, mientras que los demás grupos no presentaron cambios significativos. Para IL-1β, VP2 presentó cambios significativos en la expresión de este gen, comparado con su control sin estimulación, con rHMGB1 y con PBS, mientras que 11W solo mostró un incremento significativo en relación con su control sin estimulación.

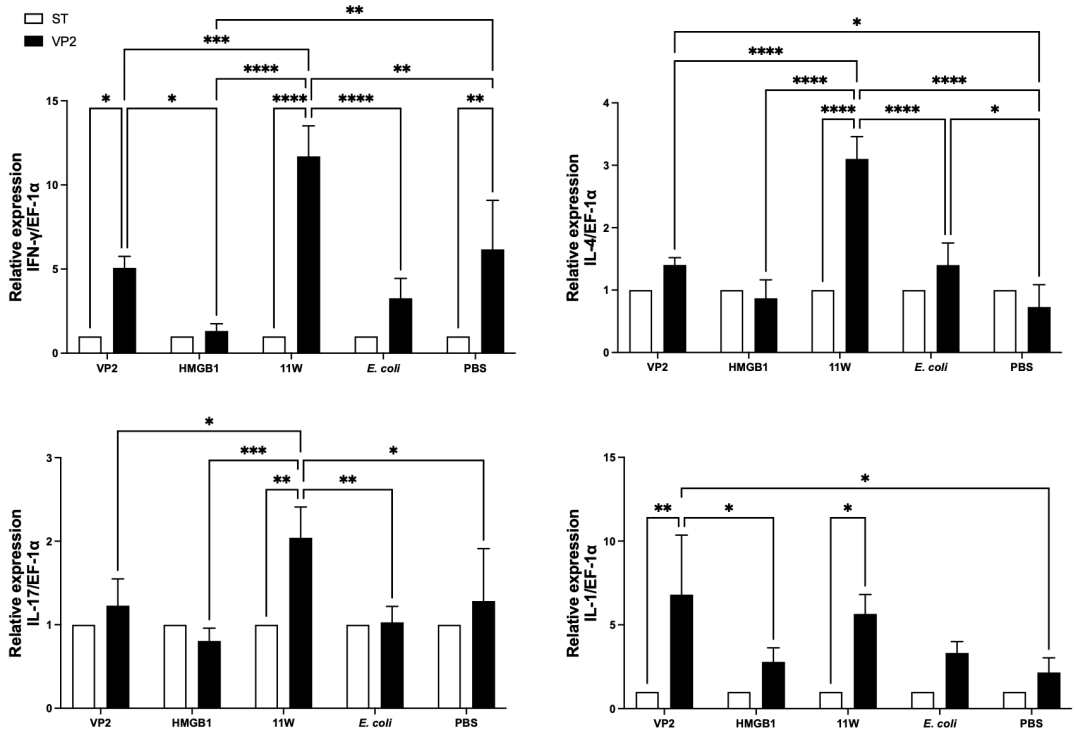

Figura 39: Expresión génica en células del riñón anterior de *Salmo salar* tras reestimulación in vitro a las 3 horas.

Las células se estimularon con 11W, VP2 y rHMGB1 (10 µg/mL), Concanavalina A (5 µg/mL, control positivo) o se mantuvieron sin tratamiento (PBS). Se evaluó la expresión de IFN-γ, IL-1β, IL-4/13A e IL-17 mediante RT-qPCR, normalizando los valores frente a EF-1α. Los resultados se expresan como media ± D.E. y se analizaron con ANOVA seguido de la prueba de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

En la Figura 40 se muestran los resultados a las 12 horas post-estimulación con VP2. Respecto a la expresión de IFN-γ, VP2 mostró incrementos frente a su

control sin estimulación, mientras que rHMGB1 aumentó significativamente la expresión de este gen en comparación a su control sin estimulación, a 11W, a *E. coli* y a PBS. Respecto a IL-17, VP2 aumentó significativamente su expresión en comparación a su control sin estimulación y a *E. coli*, mientras que 11W también mostró un incremento significativo en comparación a su control sin estimulación. Respecto a IL-1β, 11W mostró un aumento significativo en su expresión en comparación con su control sin estimulación y a PBS.

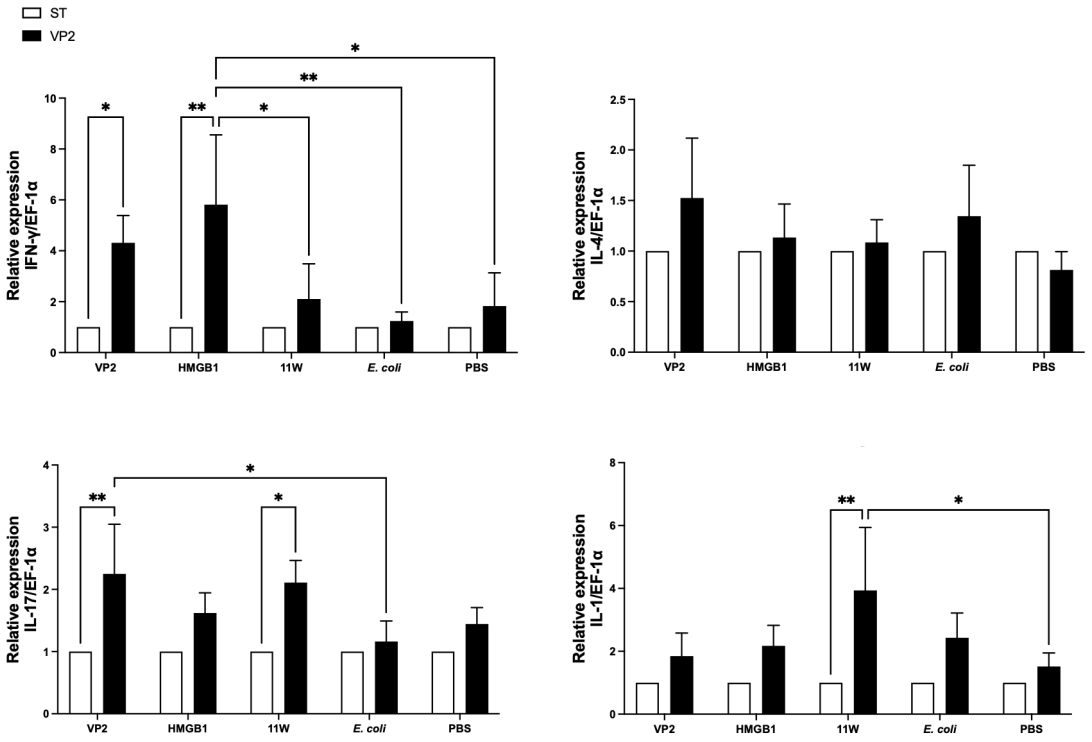

Figura 40: Expresión génica en células del riñón anterior de *Salmo salar* tras reestimulación in vitro a las 12 horas.

Las células se estimularon con 11W, VP2 y rHMGB1 (10 µg/mL), Concanavalina A (5 µg/mL, control positivo) o se mantuvieron sin tratamiento (PBS). Se evaluó la expresión de IFN-γ, IL-1β, IL-4/13A e IL-17 mediante RT-qPCR, normalizando frente a EF-1α. Los resultados se expresan como media ± D.E. y se analizaron con ANOVA seguido de la prueba de Šídák (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

Para facilitar la interpretación global de estos hallazgos, en la Tabla 9 se

sintetizan las comparaciones significativas observadas en ambos tiempos de reestimulación.

Tabla 9: Comparación de la activación de vías inmunes tras reestimulación (3 h y 12 h).

	Genes activados	
Tratamiento	**3 horas**	**12 horas**
VP2	IFN-γ ↑, IL-1β ↑	IFN-γ ↑, IL-17 ↑
HMGB1	–	IFN-γ ↑
11W	IFN-γ ↑, IL-4/13A ↑, IL-17 ↑, IL-1β ↑	IL-17 ↑, IL-1β ↑
E. coli	–	–
PBS	–	–

La tabla sintetiza los resultados obtenidos en el ensayo de reestimulación de células del riñón anterior de *Salmo salar* a los 60 días postinmunización. Se presentan las comparaciones significativas entre tratamientos para los genes IFN-γ (respuesta T_H1), IL-4/13A (respuesta T_H2), IL-17 (respuesta T_H17) e IL-1β (respuesta proinflamatoria), evaluados a las 3 y 12 horas tras la re-exposición a rHMGB1, 11W, VP2 y controles.

En términos generales, la reestimulación a las 3 h con 11W se caracterizó por la activación simultánea de las vías T_H1, T_H2 y T_H17, mientras que VP2 se asoció con respuestas T_H1 y proinflamatorias. En la evaluación a las12 h, rHMGB1 indujo una activación de la vía T_H1, mientras que VP2 y 11W favorecieron la respuesta T_H17, acompañada de un incremento proinflamatorio mediado por IL-1β en el caso de 11W.

CAPÍTULO 6.

DISCUSIÓN

HMGB1 es una proteína nuclear altamente conservada que, al liberarse al espacio extracelular, actúa como una señal de peligro endógena (DAMP) capaz de activar la respuesta inmune innata y adaptativa a través de receptores como TLR4 y RAGE (Yang et al., 2020; Rovere-Querini et al., 2004; Ge et al., 2021). En mamíferos, su potencial como adyuvante molecular está bien documentado, y fragmentos derivados de su dominio B-box, como el péptido Hp91, favorecen la polarización T_H1 *in vitro* e *in vivo* (Saenz et al., 2014b, 2010).

En teleósteos, y en particular en *Salmo salar*, esta línea de trabajo sigue siendo incipiente. En esta tesis se diseñaron y caracterizaron péptidos derivados de HMGB1 de *S. salar*, y además se produjo la proteína recombinante completa (rHMGB1) para evaluar su capacidad inmunomoduladora y adyuvante.

6.1. Diseño racional e identificación de péptidos candidatos

TLR5 es un receptor de reconocimiento de patrones conservado en vertebrados, desde peces hasta mamíferos, que responde a la forma monomérica de la flagelina (Wangkahart et al., 2019; Yoon et al., 2012). En teleósteos, se presenta en dos formas: TLR5M, unido a membrana, y TLR5S, una variante soluble que amplifica la señalización dependiente de MyD88 (Rebl et al., 2010; Muñoz-Flores et al., 2018; Dong et al., 2023). En los capítulos precedentes se mostró que la interacción de péptidos derivados de HMGB1 con TLR5 se asocia a la activación de la vía de NF-κB dependiente de MyD88, lo que destaca el papel funcional de la cola ácida C-terminal de HMGB1

en esta interacción. Sobre esa base, este trabajo utilizó una estrategia de diseño racional para identificar péptidos derivados de HMGB1 de *S. salar* con capacidad de interactuar con el ectodominio de SsTLR5.

El modelo del ectodominio de SsTLR5 se generó por modelamiento por homología con Modeller (Šali and Blundell, 1993), usando como plantilla la estructura cristalográfica del complejo zebrafish-flagelina (PDB-5GY2, 2,10 Å) (Song et al., 2017). Esta estructura ofreció la mejor resolución y una identidad de secuencia superior al 30 % con *S. salar*. La inspección visual confirmó el plegamiento en herradura característico de los dominios LRR, mientras que PROCHECK y ProSA indicaron una calidad estructural adecuada para ensayos de acoplamiento (Laskowski et al., 1993; Wiederstein and Sippl, 2007). Luego se identificó, mediante fpocket, un bolsillo de unión en la superficie convexa lateral del ectodominio, coherente con la zona descrita para la interacción de flagelina con TLR5 (Le Guilloux et al., 2009; Yoon et al., 2012).

A partir de la secuencia de HMGB1 de *S. salar* se definieron dos regiones de interés: el dominio B-box, altamente conservado (84 % de identidad con HMGB1 humano), del cual se derivó SsHP91 por homología con el péptido murino Hp91 (Saenz et al., 2014b,a); y la cola ácida C-terminal, a partir de la cual se diseñaron SsOri, 6W y 11W mediante escaneo de alanina y acoplamiento ciego con tres servidores independientes (Zhou et al., 2018a; Xu et al., 2018; Alam et al., 2017). Los resultados de docking mostraron una mejora consistente de las funciones de puntuación y de la afinidad de unión teórica para 6W y 11W respecto de SsOri, con reducciones en las constantes de disociación teórica y una propuesta de interacción compatible con un efecto directo sobre el receptor o con un componente alostérico.

La estructura secundaria de los péptidos sintetizados se validó mediante espectroscopía de dicroísmo circular (DC). Los espectros de 6W, 11W y SsOri

fueron compatibles con péptidos intrínsecamente desordenados: mostraron un mínimo negativo por debajo de 198 nm, muy baja elipticidad por encima de 210 nm y ausencia de α-hélices o láminas β como estructuras predominantes. En 6W y 11W, pero no en SsOri, se observó una señal positiva débil a 220 nm, atribuida a la inserción del triptófano. De acuerdo con el algoritmo CONTIN (Provencher and Glöckner, 1981), 6W y 11W presentaron un mayor porcentaje de giros (25,0 %) y contenido desordenado (43,0 %) que SsOri (20,0 % y 31,0 %, respectivamente).

Esta plasticidad conformacional no necesariamente constituye una limitación; por el contrario, podría facilitar interacciones versátiles con distintas superficies del receptor (Han et al., 2023). Además, coincide con lo descrito para la cola ácida nativa de HMGB1, que también presenta una naturaleza desordenada (Landsman and Bustin, 1993; Venereau et al., 2016). Por ello, junto con SsHP91, estos péptidos fueron seleccionados para los ensayos funcionales.

6.2. Activación de la vía NF-κB mediada por TLR5

La vía canónica de NF-κB es un eje central de la respuesta inmune innata. La unión de flagelina a TLR5 activa la proteína adaptadora MyD88, desencadena la fosforilación de IκBα por el complejo IKK, libera p65 para su translocación nuclear y promueve la transcripción de genes proinflamatorios (Muñoz-Flores et al., 2018; Yang et al., 2020). Para verificar que los péptidos diseñados activan esta vía a través de TLR5, se utilizó la línea HeLa/TLR5, que expresa de manera estable un TLR5 quimérico con el ectodominio de *S. salar*, como sistema heterólogo de validación (Vásquez-Suárez et al., 2024).

Los resultados mostraron que tanto 6W como 11W indujeron la fosforilación de p65 desde los 15 min de exposición a 40 ng/mL, con un máximo a los 30 min y niveles mantenidos hasta los 60 min. Este patrón se acompañó de una disminución de IκBα, principalmente en células HeLa/TLR5 y no en células

HeLa control. Además, no se detectaron diferencias significativas entre los niveles de phos-p65 inducidos por los péptidos y por flagelina ($p > 0,05$), lo que sugiere una magnitud de fosforilación comparable a la del agonista canónico. La concordancia entre la fosforilación de p65 y la disminución de IκBα es consistente con la activación de la vía canónica de NF-κB (Dong et al., 2023; Yang et al., 2020).

Sin embargo, en el análisis por microscopía confocal solo 11W alcanzó una translocación nuclear comparable a flagelina (grupo “a”), mientras que 6W mostró una tendencia al aumento que no alcanzó significancia estadística, similar a SsOri (grupo “b”, $p < 0,05$). Esta diferencia, pese a niveles semejantes de fosforilación de p65, sugiere que 11W actúa como un agonista de TLR5 más eficiente que 6W en una etapa tardía de activación del factor de transcripción, posiblemente en relación con su mayor fracción desordenada y su mayor afinidad de unión teórica al receptor (Vásquez-Suárez et al., 2024). Estos resultados vinculan las predicciones *in silico* con la señalización funcional y justifican la evaluación de 6W y 11W en modelos de células inmunes de salmón.

6.3. Modulación de la respuesta inmune en células SHK-1

La línea celular SHK-1, derivada del riñón anterior de *S. salar*, presenta características fenotípicas y funcionales de macrófagos/monocitos y constituye un modelo útil para estudiar la respuesta inmune innata frente a inmunoestimulantes y patógenos (Workenhe et al., 2010; Bjørgen and Olaf Koppang, 2022). En teleósteos, TLR5S es una forma soluble de TLR5 que amplifica la señalización dependiente de MyD88 del TLR5 unido a membrana (TLR5M) (Muñoz-Flores et al., 2022), y su expresión, junto con la de MyD88, aumenta en respuesta a flagelina (Hynes et al., 2011; Li et al., 2019; Dong et al., 2023). Por ello, la evaluación de estos componentes junto

con un panel de citocinas en SHK-1 permitió caracterizar con detalle los perfiles de activación inducidos por SsHP91, 6W, 11W y rHMGB1.

Los tres péptidos generaron perfiles de activación específicos y dependientes del tiempo, distintos de la respuesta amplia inducida por flagelina. El péptido 6W aumentó la expresión de IFN-γ a las 3 h, TLR5S y GATA-3 a las 6 h ($p<0,05$) y TLR5M a las 12 h. En cambio, 11W indujo TLR5S a las 6 h con mayor significancia estadística ($p<0,01$), TLR5M a las 12 h e IFN-γ a las 3 h; además, su activación proinflamatoria fue más acotada y se restringió a IL-8 a las 6 h e IL-1β a las 12 h.

SsHP91 mostró un comportamiento diferente, con aumentos tempranos de IFN-γ (3 h y 6 h), TGF-β (3 h y 6 h) y GATA-3 (6 h y 12 h), lo que sugiere un entorno inmunorregulador compatible con una modulación adaptativa controlada sin inflamación excesiva (Chi et al., 2022; Li et al., 2021). Este perfil recuerda al descrito para Hp91 en mamíferos, donde activa preferentemente células dendríticas y favorece la polarización T_H1 sin inducir un perfil proinflamatorio marcado (Saenz et al., 2014b,a). Por su parte, la flagelina indujo una respuesta robusta que incluyó aumentos significativos de IL-1β, IL-8, TNF-α, NF-κB, TLR5S y MyD88 en la mayoría de los tiempos, confirmando su papel como ligando natural de TLR5 (Wangkahart et al., 2019).

La inducción de GATA-3 por 6W y SsHP91 sugiere la participación de programas asociados a polarización T_H2 en teleósteos (Chi et al., 2022; Kanhere et al., 2012; Takizawa et al., 2011; Tian et al., 2023), mientras que la inducción de IFN-γ por 6W, 11W y SsHP91 es compatible con respuestas de tipo T_H1.

La diferencia funcional más clara entre 6W y 11W fue la mayor inducción de TLR5S por 11W a las 6 h ($p<0,01$ frente a $p<0,05$ en 6W), sumada a la ausencia de inducción significativa de GATA-3 por parte de 11W. El

componente antiinflamatorio mediado por TGF-β se observó solo en SsHP91 ($p<0,05$ a las 3 h y 6 h). Esto sugiere que SsHP91 posee el perfil regulador más definido, mientras que 6W y 11W modulan de forma más selectiva la vía TLR5; dentro de ellos, 11W muestra un sesgo más claro hacia respuestas de tipo T_H1.

rHMGB1 indujo una respuesta transcripcional más amplia y sostenida que la observada con los péptidos derivados. A 10 µg/mL, aumentó significativamente IL-1β, IL-8 y TNF-α desde las 3 h. El peak de activación se observó a las 6 h e involucró de manera simultánea IL-1β, IL-8, TNF-α, NF-κB, MyD88 y TLR5S; a las 12 h persistió una respuesta que incluyó IL-1β, IL-8, TNF-α, NF-κB, TLR5M y GATA-3.

La inducción temprana de IFN-γ a las 3 h, junto con la ausencia de un aumento significativo de TGF-β e IL-10, indica que rHMGB1 orienta la respuesta principalmente hacia vías proinflamatorias/T_H1, sin el componente regulador observado para SsHP91. Si bien se detectó un aumento de GATA-3 a las 3 h, su presencia aislada y la falta de otros marcadores T_H2 sugieren que no define la polarización dominante en este modelo. Esto concuerda con el papel descrito para HMGB1 en mamíferos, donde la proteína extracelular interactúa con TLR2, TLR4 y RAGE, favorece la activación de NF-κB, la liberación de citocinas y la maduración de células presentadoras de antígeno (Yang et al., 2020; Yanai et al., 2009; Chen et al., 2022a). En teleósteos, además, existe evidencia convergente en *Paralichthys olivaceus*, donde la HMGB1 recombinante activa genes inflamatorios y potencia respuestas antimicrobianas (Chen et al., 2022b; Schijns et al., 2020). Estos datos indican que rHMGB1 actúa como un DAMP potente y de alcance amplio en la célula macrofágica, mientras que SsHP91, 6W y 11W funcionan como moduladores más selectivos y con cinéticas diferentes.

6.4. Actividad inmunoprotectora frente a *Piscirickettsia salmonis*

Piscirickettsia salmonis es el agente causal de la Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS), la principal causa infecciosa de mortalidad en la salmonicultura chilena. En 2024 explicó el 43,1 % de las muertes de origen infeccioso y concentró más del 96 % de los antibióticos usados en acuicultura en el país (SERNAPESCA, 2025b). Se trata de un patógeno intracelular facultativo que infecta macrófagos y otras células del sistema fagocítico-mononuclear, donde sobrevive, se multiplica y establece infecciones crónicas (Cvitanich et al., 1991; Rozas-Serri et al., 2017, 2024). Por ello, la protección eficaz requiere inmunidad mediada por células y, en particular, respuestas de tipo T_H1 que favorezcan la eliminación del patógeno, ya que las vacunas inactivadas actuales inducen predominantemente respuestas humorales con eficacia limitada frente a este microorganismo (Rozas-Serri, 2022; Valenzuela-Avilés et al., 2022).

Además, *P. salmonis* posee genes flagelares funcionales capaces de activar TLR5 en salmónidos (Cartes et al., 2017; Isla et al., 2014; González-Stegmaier et al., 2021), y su infección induce sobreexpresión de TLR5M y TLR5S en bazo y riñón anterior de *S. salar* (Isla et al., 2014). Ese marco da sustento a la evaluación de agonistas de TLR5 como 6W y 11W frente a SRS, por lo que se analizó si el pretratamiento con ambos péptidos confería protección funcional a células SHK-1 desafiadas con *P. salmonis* EM90, cuantificando la citotoxicidad por liberación de LDH.

Los resultados mostraron que solo el pretratamiento con 11W a 10 µg/mL previno la citotoxicidad inducida por la infección. En esa condición se observó una reducción significativa de LDH en los días 13 y 15 postinfección en comparación con las células infectadas no tratadas y con 11W a 1 µg/mL ($p < 0,0001$). En cambio, 11W a 1 µg/mL, al igual que 6W a 1 µg/mL,

aumentó el efecto lítico en el último día del ensayo. El péptido 6W no mostró protección a ninguna de las concentraciones evaluadas; de hecho, 6W a 1 µg/mL incrementó significativamente el efecto lítico de la bacteria respecto al control infectado no tratado, lo que sugiere que dosis bajas podrían interferir con la respuesta celular inicial frente a este patógeno intracelular.

Esta diferencia entre ambos péptidos podría relacionarse con sus perfiles de expresión génica: tanto 6W como 11W indujeron IFN-γ de forma temprana (3 h, $p<0,05$ en ambos casos), pero 11W mostró una inducción más marcada de TLR5S ($p<0,01$ frente a $p<0,05$ de 6W) y no indujo GATA-3, mientras que 6W sí lo hizo a las 6 h. Ninguno de los dos péptidos indujo TGF-β de forma significativa en este modelo. El perfil de 11W sugiere una activación más eficiente de la señalización TLR5 sin el componente de polarización T_H2 asociado a GATA-3, lo que podría favorecer una respuesta T_H1 más eficaz para eliminar al patógeno intracelular (Rozas-Serri, 2022). La protección conferida por flagelina a ambas concentraciones, superior a la observada con 11W, refuerza la idea de que la activación de TLR5 puede contribuir al control de infecciones por *P. salmonis*, y de que 11W, como agonista parcial de esta vía, alcanza un efecto protector en un rango de concentración adecuado (Wangkahart et al., 2019; González-Stegmaier et al., 2015, 2021).

6.5. Respuesta inmune *in vivo* en *Salmo salar*

Los ensayos *in vitro* entregan información mecanística valiosa, pero evaluar la respuesta inmune en el organismo completo es indispensable para comprender su dinámica temporal y su distribución tisular (Stosik et al., 2021). En teleósteos, los órganos linfoides responden de manera diferencial a la estimulación intraperitoneal. El bazo, como órgano linfoide secundario, concentra linfocitos y células presentadoras de antígeno y sostiene respuestas adaptativas robustas (Bjørgen and Olaf Koppang, 2022). El riñón anterior, en

cambio, es un órgano linfoide primario con función hematopoyética y participa de forma importante en la organización de la respuesta inmune sistémica (Telusma et al., 2006; Li et al., 2021; Bjørgen and Olaf Koppang, 2022).

En *Lates calcarifer* se ha descrito que los cambios transcriptómicos del bazo aparecen de forma temprana, mientras que los del riñón anterior se observan después de tres semanas de la vacunación (Jiang et al., 2014; Tian et al., 2023), lo que sugiere una compartimentalización temporal de la respuesta entre ambos órganos.

En el bazo, rHMGB1 indujo la activación más amplia y sostenida de los cuatro inmunoestimulantes evaluados. Se observaron aumentos tempranos de IFN-α1 y TGF-β al día 1, seguidos de un nuevo incremento de IFN-α1 y de IFN-γ al día 7, IL-4/13A al día 14 y persistencia de IFN-α1 hasta el día 21. Este patrón, caracterizado por una respuesta antiinflamatoria y antiviral temprana, seguida de señales asociadas a respuestas T_H1, T_H17 y T_H2 a lo largo de tres semanas, es coherente con el papel de rHMGB1 como DAMP de amplio espectro y con el perfil multivía observado en SHK-1 (Yang et al., 2020; Chen et al., 2022a; Yanai et al., 2009). La respuesta de IFN-α1 en bazo respalda, además, la activación de vías antivirales mediadas por interferones tipo I, ampliamente descritas en teleósteos (Zou and Secombes, 2011; Sakai et al., 2021).

En este órgano, 11W mostró un perfil más acotado: TGF-β e IL-4/13A al día 1, IFN-α1 al día 3 e IL-4/13A al día 14. El péptido 6W indujo una respuesta de tipo T_H1, evidenciada por el aumento de IFN-γ al día 3. SsHP91, por su parte, mostró una respuesta temprana antiinflamatoria y antiviral, con inducción de TGF-β al día 1, IFN-α1 al día 7 e IL-4/13A al día 14.

En el riñón anterior, la respuesta fue más discreta y dependiente del inmunoestimulante. El péptido 6W estimuló un incremento significativo de IFN-γ al día 7, en línea con la inducción temprana de este gen observada *in*

vitro en células SHK-1, y ello respalda su capacidad para modular respuestas de tipo T_H1 en un tejido hematopoyético clave. rHMGB1 también mostró en este órgano una respuesta restringida, limitada a un aumento significativo de IFN-γ al día 7, en claro contraste con su activación más amplia en el bazo. Esta divergencia entre órganos es consistente con la compartimentalización funcional del sistema inmune descrita en teleósteos para bazo y riñón anterior tras la inmunización (Mokhtar et al., 2023; Tian et al., 2023).

6.6. Potencial adyuvante en modelo de vacunación con VP2 de IPNV

La Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), causada por IPNV, es una de las enfermedades virales de mayor impacto en la salmonicultura a nivel mundial (Tafalla et al., 2013; Tammas et al., 2024). La proteína VP2, principal componente de la cápside externa del virus, constituye el antígeno neutralizante más relevante y el blanco de las vacunas comerciales actuales contra IPN (Tafalla et al., 2013).

Como ocurre con otras vacunas de subunidad, las formulaciones basadas en antígenos recombinantes requieren adyuvantes capaces de aumentar la magnitud, amplitud y duración de la respuesta inmune, sobre todo cuando se busca potenciar inmunidad celular además de la humoral (Moyer et al., 2016; Reed et al., 2013; Wangkahart et al., 2023). En este trabajo, VP2 recombinante se utilizó como antígeno modelo para evaluar la eficacia de rHMGB1 y 11W como adyuvantes moleculares en formulaciones con Montanide ISA 763A VG, comparando la respuesta inmune con la de un grupo inmunizado con el antígeno solo.

El análisis de la expresión de IFN-γ, IL-17 e IL-4/13A en tejidos al día 24 postinmunización (360 UTA) mostró respuestas dependientes tanto del adyuvante como del tejido, un patrón también descrito para otros péptidos inmunomoduladores en salmonídeos (Tammas et al., 2024). En ese momento,

correspondiente a tres días después del refuerzo, se extrajeron bazo y riñón anterior para evaluar la respuesta inmune inducida por las distintas formulaciones.

En el bazo, rHMGB1 promovió aumentos significativos simultáneos de IFN-γ, IL-17 e IL-4/13A respecto del grupo placebo, lo que sugiere una activación coordinada de vías T_H1, T_H17 y T_H2 en este órgano linfoide secundario. Este comportamiento es coherente con observaciones en mamíferos, donde HMGB1 ha sido evaluado como adyuvante en distintas plataformas vacunales, incluidas vacunas de ADN contra influenza en ratón, en las que potencia la producción de IFN-γ y la activación de células T $CD8^+$ (Fagone et al., 2011; Saenz et al., 2010; Díaz-Dinamarca et al., 2022).

En el riñón anterior, rHMGB1 no generó diferencias significativas, mientras que 11W promovió aumentos significativos de IFN-γ e IL-4/13A, lo que indica que este péptido modula componentes de la inmunidad adaptativa celular y humoral en ese tejido. Esta distribución diferencial entre órganos coincide con los resultados del ensayo *in vivo* sin antígeno, donde rHMGB1 tuvo mayor impacto en bazo y 6W en riñón anterior, y también con la compartimentalización de células B, plasmáticas y T descrita en teleósteos (Mokhtar et al., 2023). Este patrón diferencial respalda la capacidad de 11W para activar múltiples ejes inmunitarios en riñón anterior y de rHMGB1 para inducir una respuesta más amplia en bazo.

Al analizar la respuesta inmune humoral inducida por las distintas formulaciones vacunales, se observó un aumento progresivo de los títulos de IgM específica contra VP2 en todos los grupos inmunizados desde el día 35 postvacunación, con una estabilización entre los días 49 y 60. En los momentos tempranos de la cinética, el grupo inmunizado solo con el antígeno recombinante VP2 mostró los títulos más elevados. Los grupos con rHMGB1 y

11W mostraron incrementos progresivos que, al día 49, resultaron significativos frente al control PBS.

Hp91, un adyuvante derivado del dominio B-box de HMGB1 en mamíferos, ha sido descrito como capaz de inducir respuesta humoral frente a ovoalbúmina en ratón (Saenz et al., 2010). En esta tesis, sin embargo, 11W no mostró una ventaja humoral significativa frente al grupo inmunizado solo con VP2. Al día 35, los títulos más altos correspondieron al grupo VP2, mientras que al día 60 11W alcanzó niveles de IgM comparables a los de ese mismo grupo, sin diferencias estadísticamente significativas. rHMGB1, por su parte, mostró valores levemente inferiores en la fase final, también sin diferencias significativas respecto a VP2. En conjunto, estos resultados sugieren que los adyuvantes moleculares evaluados ejercen su mayor efecto sobre la modulación de la inmunidad celular más que sobre la maximización de la producción de anticuerpos. Esto es coherente con la idea moderna de los adyuvantes peptídicos, compuestos menos reactogénicos y más biodegradables, orientados a dirigir la respuesta inmune más que a incrementarla de manera inespecífica (Hemmati et al., 2024).

Además, las emulsiones oleosas como Montanide generan un efecto de depósito que prolonga la liberación del antígeno y puede atenuar las diferencias entre adyuvantes coadministrados (Wangkahart et al., 2023); por eso, las divergencias observadas entre rHMGB1 y 11W en sus perfiles celulares y humorales resultan especialmente informativas.

La respuesta celular se evaluó mediante la reestimulación *ex vivo* de leucocitos del riñón anterior (HKL) aislados de peces vacunados y controles al día 60 postinmunización. En peces, la reexpresión de citocinas tras un segundo estímulo *in vitro* es una aproximación útil para evaluar el estado funcional de activación de células sensibilizadas (Stosik et al., 2021). Este enfoque puede

contextualizarse con la evidencia disponible sobre linfocitos T de memoria en teleósteos (Yamaguchi et al., 2019), sin equipararlo de forma directa con la memoria clásica de mamíferos. Estudios más recientes también han descrito estados celulares de memoria y diferenciación plasmática en teleósteos, lo que refuerza la pertinencia de analizar respuestas secundarias funcionales en este grupo (Chan et al., 2024).

En este ensayo, la reestimulación antigénica indujo la expresión significativa de genes asociados a respuestas T_H1, T_H2 y T_H17 en el grupo inmunizado con VP2 en combinación con 11W. A las 3 h post-reestimulación, 11W produjo la activación más marcada y amplia, con aumentos simultáneos de IFN-γ, IL-4/13A, IL-17 e IL-1β, lo que define un perfil temprano multivía. Esto coincide con observaciones previas de nuestro grupo (Carrera et al., 2025) y sugiere una mayor capacidad de respuesta inmediata ante un nuevo estímulo, una característica deseable en un adyuvante.

En contraste, el grupo VP2 sin adyuvante molecular mostró principalmente IFN-γ e IL-1β a las 3 h, un patrón predominantemente T_H1 y proinflamatorio, sin los componentes T_H2 y T_H17 observados en el grupo 11W. rHMGB1 tuvo una respuesta menos marcada a las 3 h, pero promovió un incremento significativo de IFN-γ a las 12 h respecto de los demás grupos, lo que refuerza su tendencia a consolidar una polarización T_H1 más tardía. Estos resultados son coherentes con la respuesta tisular observada en el ensayo de vacunación e indican que tanto rHMGB1 como 11W favorecen un estado funcional reforzado en los leucocitos del riñón anterior. Aunque la memoria adaptativa en teleósteos difiere en ciertos aspectos de la observada en mamíferos, la respuesta más vigorosa y diversificada de estas células frente a un segundo estímulo sugiere un estado inmunológico funcionalmente potenciado, relevante para el desarrollo de vacunas acuícolas de nueva generación.

Los resultados de este estudio muestran que rHMGB1 y el péptido 11W son los candidatos con respaldo experimental más sólido como adyuvantes moleculares en *S. salar*. rHMGB1 demostró la activación más amplia en modelos celulares y en bazo, mientras que 11W mostró mayor especificidad funcional en contextos infeccioso y vacunal. Por su parte, 11W destaca por su capacidad de inducir respuestas tempranas en SHK-1 y por conferir protección funcional frente a *P. salmonis*; sus efectos sobre inmunidad tisular y reestimulación deben interpretarse dentro del contexto específico de los ensayos vacunales.

En paralelo, 6W y SsHP91 exhiben actividad inmunomoduladora selectiva, aunque con perfiles funcionales más restringidos bajo las condiciones evaluadas en esta tesis. La complementariedad entre rHMGB1 y 11W podría aprovecharse en el diseño de formulaciones adyuvantes que combinen eficacia con un perfil inflamatorio controlado, contribuyendo al desarrollo de vacunas acuícolas más seguras y sostenibles (Zhao et al., 2023; Stosik et al., 2021).

CAPÍTULO 7.

CONCLUSIÓN

La proteína recombinante HMGB1 de *Salmo salar* actúa como un inmunomodulador de amplio espectro. Su efecto fue especialmente notorio en células SHK-1 y en el bazo, donde indujo perfiles de activación robustos con predominio de mediadores proinflamatorios y adaptativos. Este comportamiento es consistente con el carácter de DAMP funcional descrito para HMGB1 y respalda su potencial como adyuvante molecular en formulaciones vacunales para acuicultura.

Los péptidos derivados de HMGB1 mostraron perfiles funcionales distintos entre sí y frente a la proteína completa. SsHP91 presentó un comportamiento regulador, con inducción combinada de IFN-γ y TGF-β, compatible con una modulación adaptativa controlada. El péptido 11W fue el candidato con mayor actividad funcional: indujo IFN-γ de forma temprana en células SHK-1, promovió la translocación nuclear de NF-κB en células HeLa/TLR5, moduló la respuesta inmune en el riñón anterior y confirió protección funcional *in vitro* frente a *P. salmonis* en células SHK-1 a 10 µg/mL. En cambio, 6W mostró una actividad inmunomoduladora más limitada y no confirió protección en el modelo bacteriano *in vitro*; además, a dosis bajas (1 µg/mL) se asoció a un aumento del efecto lítico inducido por la bacteria, lo que subraya la relevancia de la concentración en el diseño de aplicaciones.

Los resultados obtenidos respaldan la hipótesis central de la tesis: HMGB1 y algunos de sus péptidos derivados actúan como inmunomoduladores en salmónidos y pueden potenciar componentes de la inmunidad innata y adaptativa. La comparación sistemática entre rHMGB1, SsHP91, 6W y

11W muestra que pequeñas variaciones estructurales dentro de HMGB1 se traducen en perfiles funcionales distintos, lo que aporta una base conceptual útil para el diseño racional de inmunoestimulantes.

En el modelo vacunal con VP2 de IPNV, rHMGB1 favoreció una activación adaptativa más amplia en el bazo, mientras que 11W destacó principalmente por su perfil celular temprano y por la reestimulación multivía en leucocitos del riñón anterior. Estos patrones sugieren que ambos inmunoestimulantes actúan de forma complementaria en el plano celular: rHMGB1 con un perfil más amplio y sostenido, y 11W con una respuesta más rápida y focalizada, sin evidenciar una ventaja humoral significativa frente a VP2 solo.

Este trabajo aporta evidencia experimental para el desarrollo de adyuvantes moleculares en acuicultura. rHMGB1 y 11W son los candidatos con mayor respaldo funcional y deberían seguir evaluándose en estudios de desafío *in vivo* en *Salmo salar*, incluyendo modelos de infección con *P. salmonis* e IPNV y formulaciones con distintos sistemas de administración. La complementariedad funcional entre ambas moléculas justifica explorar estrategias combinadas que integren la amplitud de respuesta de rHMGB1 con la rapidez y selectividad de 11W, contribuyendo al desarrollo de vacunas acuícolas más eficaces y con menor dependencia de antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

Abós, B., Castro, R., González Granja, A., Havixbeck, J. J., Barreda, D. R., and Tafalla, C. (2015). Early activation of teleost b cells in response to rhabdovirus infection. *Journal of Virology*, 89(3):1768–1780.

Alam, N., Goldstein, O., Xia, B., Porter, K. A., Kozakov, D., and Schueler-Furman, O. (2017). High-resolution global peptide-protein docking using fragments-based piper-flexpepdock. *PLOS Computational Biology*, 13(12):e1005905.

Albers, J., Lennon, J., and Mccartney, P. (2007). The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology 2007 5:7*, 5(7):396–397.

Ana Millanao, B., Marcela Barrientos, H., Carolina Gómez, C., Tomova, A., Buschmannh, A., Dölz, H., and Cabello, F. C. (2011). Injudicious and excessive use of antibiotics: Public health and salmon aquaculture in chile. *Revista médica de Chile*, 139(1):107–118.

Bell, C. W., Jiang, W., Reich, C. F., and Pisetsky, D. S. (2006). The extracellular release of hmgb1 during apoptotic cell death. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 291(6):1318–1325.

Biering, E., Villoing, S., Sommerset, I., and Christie, K. E. (2005). Update on viral vaccines for fish. *Developments in Biologicals*, 121:97–113.

Biller-Takahashi, J. D. and Urbinati, E. C. (2014). Fish immunology. the modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86(3):1484–1506.

Bimboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acids Research*, 7(6):1513–1523.

Bjørgen, H. and Olaf Koppang, E. (2022). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Principles of Fish Immunology: From Cells and Molecules to Host Protection*, pages 1–30.

Branson, E. J. and Díaz-Muñoz, D. N. (1991). Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, oncorhynchus kisutch (walbaum), in south america. *Journal of Fish Diseases*, 14(2):147–156.

Bravo, S. and Midtlyng, P. J. (2007). The use of fish vaccines in the chilean salmon industry 1999-2003. *Aquaculture*, 270(1-4):36–42.

Bravo, S., Treasurer, J., Sepulveda, M., and Lagos, C. (2010). Effectiveness of hydrogen peroxide in the control of caligus rogercresseyi in chile and implications for sea louse management. *Aquaculture*, 303(1-4):22–27.

Cai, J., Xia, H., Huang, Y., Lu, Y., Wu, Z., and Jian, J. (2014). Molecular cloning and characterization of high mobility group box1 (ls-hmgb1) from humphead snapper, lutjanus sanguineus. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(2):539–544.

Cai, X., Gao, C., Su, B., Tan, F., Yang, N., and Wang, G. (2018). Expression profiling and microbial ligand binding analysis of high-mobility group box-1 (hmgb1) in turbot (scophthalmus maximus l.). *Fish & Shellfish Immunology*, 78:100–108.

Carrera, C., Villegas, M. F., Muñoz-Flores, C., Ortega, L., Salazar, S., Valenzuela, A., Agurto, N., Montesino, R., Couso, B., Saavedra, J., Maura, R., Parra, N., Reyes, F., Sánchez, O., Toledo Alonso, J. R., and Acosta, J. (2025). Evaluating the adjuvant potential of NK-lysin and HMGB1-derived peptides in enhancing immune responses in Salmo salar. *Fish & Shellfish Immunology*, 164:110462.

Cartes, C., Isla, A., Lagos, F., Castro, D., Muñoz, M., Yañez, A., Haussmann, D., and Figueroa, J. (2017). Search and analysis of genes involved in antibiotic resistance in chilean strains of piscirickettsia salmonis. *Journal of Fish Diseases*, 40(8):1025–1039.

Caruffo, M., Vidal, S., Santis, L., Siel, D., Pérez, O., Huenchullan, P. R., and Sáenz, L. (2021). Effectiveness of a proteoliposome-based vaccine against salmonid rickettsial septicaemia in oncorhynchus mykiss. *Veterinary research*, 52(1):111.

Chan, J. T. H., Picard-Sánchez, A., Dedić, N., Majstorović, J., Rebl, A., Holzer, A. S., and Korytář, T. (2024). Immunological memory in a teleost fish: common carp igm+ b cells differentiate into memory and plasma cells. *Frontiers in Immunology*, 15:1493840.

Chen, R., Kang, R., and Tang, D. (2022a). The mechanism of hmgb1 secretion and release. *Experimental & Molecular Medicine 2022 54:2*, 54(2):91–102.

Chen, Y., Yu, C., Jiang, S., and Sun, L. (2022b). Japanese flounder hmgb1: A damp molecule that promotes antimicrobial immunity by interacting with immune cells and bacterial pathogen. *Genes*, 13(9).

Chi, H., Meng, X., and Dalmo, R. A. (2022). Gata-3 in atlantic salmon (salmo salar): Tissue distribution and its regulation of il-4/13a promoter. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12:1063600.

Ching, J. J., Shuib, A. S., Abdul Majid, N., and Mohd Taufek, N. (2021). Immunomodulatory activity of β-glucans in fish: Relationship between β-glucan administration parameters and immune response induced. *Aquaculture Research*, 52(5):1824–1845.

Cvitanich, J. D., O. Garate, N., and Smith, C. E. (1991). The isolation of a

rickettsia-like organism causing disease and mortality in chilean salmonids and its confirmation by koch's postulate. *Journal of Fish Diseases*, 14(2):121–145.

Das, N., Dewan, V., Grace, P. M., Gunn, R. J., Tamura, R., Tzarum, N., Watkins, L. R., Wilson, I. A., and Yin, H. (2016). Hmgb1 activates proinflammatory signaling via tlr5 leading to allodynia. *Cell Reports*, 17(4):1128–1140.

Dong, J., Li, R., Deng, Z., Chen, Y., Lei, L., Wu, Z., Guo, B., Wang, B., Li, F., and Liang, J. (2023). TLR5M cooperates with TLR5S to activate NF-κB in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 562:738773.

Dornburg, A., Ota, T., Criscitiello, M. F., Salinas, I., Sunyer, J. O., Magadán, S., Boudinot, P., Xu, Z., Flajnik, M. F., Singer, A., Gambón-Deza, F., Hansen, J. D., and Yoder, J. A. (2021). From igz to igt: A call for a common nomenclature for immunoglobulin heavy chain genes of ray-finned fish. *Zebrafish*, 18(6):343.

Díaz-Dinamarca, D. A., Salazar, M. L., Castillo, B. N., Manubens, A., Vasquez, A. E., Salazar, F., and Becker, M. I. (2022). Protein-based adjuvants for vaccines as immunomodulators of the innate and adaptive immune response: Current knowledge, challenges, and future opportunities. *Pharmaceutics 2022, Vol. 14, Page 1671*, 14(8):1671.

Fagone, P., Shedlock, D. J., Bao, H., Kawalekar, O. U., Yan, J., Gupta, D., Morrow, M. P., Patel, A., Kobinger, G. P., Muthumani, K., and Weiner, D. B. (2011). Molecular adjuvant hmgb1 enhances anti-influenza immunity during dna vaccination. *Gene therapy*, 18(11):1070.

Figueroa, C., Torrealba, D., Morales-Lange, B., Mercado, L., Dixon, B., Conejeros, P., Silva, G., Soto, C., and Gallardo, J. A. (2022). Commercial vaccines do not confer protection against two genogroups of piscirickettsia salmonis, lf-89 and em-90, in atlantic salmon. *Biology*, 11(7):993.

Figueroa, J., Cárcamo, J., Yañez, A., Olavarria, V., Ruiz, P., Manríquez, R., Muñoz, C., Romero, A., and Avendaño-Herrera, R. (2019). Addressing viral and bacterial threats to salmon farming in chile: historical contexts and perspectives for management and control. *Reviews in Aquaculture*, 11(2):299–324.

Flajnik, M. F. and Kasahara, M. (2009). Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature Reviews Genetics 2010 11:1*, 11(1):47–59.

Ford, W. B. (1995). Disinfection procedures for personnel and vehicles entering and leaving contaminated premises. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 14(2):393–401.

Fuentes, D. E., Acuña, L. G., Calderón, I. L., Fuentes, D. E., Acuña, L. G.,

and Calderón, I. L. (2022). Stress response and virulence factors in bacterial pathogens relevant for chilean aquaculture: current status and outlook of our knowledge. *Biological Research*, 55(1):21.

Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L., Torrisi, M. R., Bianchi, M. E., and Rubartelli, A. (2002). The nuclear protein hmgb1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO reports*, 3(10):995–1001.

Ge, Y., Huang, M., and Yao, Y. M. (2021). The effect and regulatory mechanism of high mobility group box-1 protein on immune cells in inflammatory diseases. *Cells 2021, Vol. 10, Page 1044*, 10(5):1044.

Gnanasekar, M., Kalyanasundaram, R., Zheng, G., Chen, A., Bosland, M. C., and Kajdacsy-Balla, A. (2013). Hmgb1: A promising therapeutic target for prostate cancer. *Prostate Cancer*, 2013:1–8.

González-Stegmaier, R., Guzmán, F., Albericio, F., Villaroel-Espíndola, F., Romero, A., Mulero, V., and Mercado, L. (2015). A synthetic peptide derived from the D1 domain of flagellin induced the expression of proinflammatory cytokines in fish macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 47(1):239–244.

González-Stegmaier, R., Peña, A., Villarroel-Espíndola, F., Aguila, C., Oliver, D., MacLeod-Carey, M., Rozas-Serri, R., Enríquez, J., and Figueroa, J. (2021). Full recombinant flagellin B from *Vibrio anguillarum* (rFLA) and its recombinant D1 domain (rND1) promote a pro-inflammatory state and improve vaccination against *P. salmonis* in Atlantic salmon (*S. salar*). *Developmental & Comparative Immunology*, 117:103988.

Han, B., Ren, C., Wang, W., Li, J., and Gong, X. (2023). Computational prediction of protein intrinsically disordered region related interactions and functions. *Genes*, 14(2):432.

Hansson, M., Nygren, P.-A., and Sta˚hl, S. (2000). Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32(2):95–107.

Happold, J., Meyer, A., Sadler, R., Cowled, B., Mackenzie, C., Stevenson, M., Ward, M. P., Gallardo Lagno, A. L., and Cameron, A. (2020). Effectiveness of antimicrobial treatment of salmonid rickettsial septicaemia in commercial salmon and trout farms in chile. *Aquaculture*, 525:735323.

Hemmati, S., Saeidikia, Z., Seradj, H., and Mohagheghzadeh, A. (2024). Immunomodulatory peptides as vaccine adjuvants and antimicrobial agents. *Pharmaceuticals*, 17(2):201.

Hill, B. J. (2005). The need for effective disease control in international aquaculture. *Developments in Biologicals*, 121:3–12.

Hong, W., Shuang, P., JiaXi, L., DeFang, C., Yan, W., Yi, G., KaiYu, W., ZhiQiong, L., XiaoLi, H., and Ping, O. (2018). Cloning of hmgb1 gene from schizothorax prenanti and its response to aeromonas hydrophila stress. *Journal of Fisheries of China*, 42(12):1957–1966.

Hynes, N. A., Furnes, C., Fredriksen, B. N., Winther, T., Bøgwald, J., Larsen, A. N., and Dalmo, R. A. (2011). Immune response of atlantic salmon to recombinant flagellin. *Vaccine*, 29(44):7678–7687.

Irshath, A. A., Rajan, A. P., Vimal, S., Prabhakaran, V. S., and Ganesan, R. (2023). Bacterial pathogenesis in various fish diseases: Recent advances and specific challenges in vaccine development. *Vaccines 2023, Vol. 11, Page 470*, 11(2):470.

Isla, A., Haussmann, D., Vera, T., Kausel, G., and Figueroa, J. (2014). Identification of the clpb and bipa genes and an evaluation of their expression as related to intracellular survival for the bacterial pathogen piscirickettsia salmonis. *Veterinary Microbiology*, 173(3-4):390–394.

Jakob, E., Stryhn, H., Yu, J., Medina, M. H., Rees, E. E., Sanchez, J., and St-Hilaire, S. (2014). Epidemiology of piscirickettsiosis on selected atlantic salmon (salmo salar) and rainbow trout (oncorhynchus mykiss) salt water aquaculture farms in chile. *Aquaculture*, 433:288–294.

Ji, Q., Wang, S., Ma, J., and Liu, Q. (2020). A review: Progress in the development of fish vibrio spp. vaccines. *Immunology Letters*, 226:46–54.

Jiang, J., Miyata, M., Chan, C., Ngoh, S. Y., Liew, W. C., Saju, J. M., Ng, K. S., Wong, F. S., Lee, Y. S., Chang, S. F., and Orbán, L. (2014). Differential transcriptomic response in the spleen and head kidney following vaccination and infection of Asian seabass with Streptococcus iniae. *PLOS ONE*, 9(7):e99128.

Kanhere, A., Hertweck, A., Bhatia, U., Gökmen, M. R., Perucha, E., Jackson, I., Lord, G. M., and Jenner, R. G. (2012). T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nature Communications*, 3:1268.

Landsman, D. and Bustin, M. (1993). A signature for the hmg-1 box dna-binding proteins. *BioEssays*, 15(8):539–546.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993). Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2):283–291.

Le Guilloux, V., Schmidtke, P., and Tuffery, P. (2009). Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics*, 10:168.

Lenka, S. S., Paichha, M., Basu, M., and Samanta, M. (2018). Lrhmgb1 shares structural similarities with human hmgb1, and its expression

is induced in bacterial infection, antiviral vaccination, and pathogen-associated molecular patterns stimulation. *https://home.liebertpub.com/dna*, 37(8):708–723.

Li, H., Liang, X., Yu, W., Peng, J., He, L., Fu, H., Lin, Y., Zhang, D., and Lu, V. (2019). *Vibrio parahaemolyticus* flagellin induces cytokines expression via Toll-like receptor 5 pathway in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 87:573–581.

Li, J., Kokkola, R., Tabibzadeh, S., Yang, R., Ochani, M., Qiang, X., Harris, H. E., Czura, C. J., Wang, H., Ulloa, L., Wang, H., Warren, H. S., Moldawer, L. L., Fink, M. P., Andersson, U., Tracey, K. J., and Yang, H. (2003). Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Molecular Medicine*, 9(1-2):37–45.

Li, Y., Xiao, T., and Zou, J. (2021). Fish tnf and tnf receptors. *Science China. Life sciences*, 64(2):196–220.

Lu, L., Dai, S., Liu, L., Liu, J., Zhang, X., Huang, X., Ouyang, P., Geng, Y., Li, Z., and Chen, D. (2023). Identification and characterization of high mobility group box 1 and high mobility group box 2 in siberian sturgeon (acipenser baerii). *Gene*, 850:146932.

Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., and Cain, K. D. (2019). A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. *Microorganisms 2019, Vol. 7, Page 569*, 7(11):569.

Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2):137–151.

McCarthy, Ú. M., Bron, J. E., Brown, L., Pourahmad, F., Bricknell, I. R., Thompson, K. D., Adams, A., and Ellis, A. E. (2008). Survival and replication of piscirickettsia salmonis in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(5):477–484.

Miranda, C. D., Godoy, F. A., and Lee, M. R. (2018). Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the chilean salmon farms. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN):1284.

Mishra, S., Seshagiri, B., Rathod, R., Sahoo, S. N., Choudhary, P., Patel, S., Behera, D. K., Ojha, D. K., Jena, A., Namburu, P. K., and Swain, P. (2023). Recent advances in fish disease diagnosis, therapeutics, and vaccine development. *Frontiers in Aquaculture Biotechnology*, pages 115–145.

Mokhtar, D. M., Zaccone, G., Alesci, A., Kuciel, M., Hussein, M. T., and Sayed, R. K. (2023). Main components of fish immunity: An overview of the fish immune system. *Fishes 2023, Vol. 8, Page 93*, 8(2):93.

Mondal, H. and Thomas, J. (2022). A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. *Aquaculture*

International : Journal of the European Aquaculture Society, 30(4):1971–2000.

Moyer, T. J., Zmolek, A. C., and Irvine, D. J. (2016). Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(3):799–808.

Muñoz-Flores, C., Astuya, A., Roa, F. J., Romero, A., Acosta, J., Sánchez, O., and Toledo, J. R. (2018). Activation of membrane-bound and soluble Toll-like Receptors 5 in *Salmo salar* depends on the MyD88 signalling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1862(10):2215–2225.

Muñoz-Flores, C., Astuya-Villalón, A., Romero, A., Acosta, J., and Toledo, J. R. (2022). Salmonid MyD88 is a key adapter protein that activates innate effector mechanisms through the TLR5M/TLR5S signalling pathway and protects against *Piscirickettsia salmonis* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 121:387–394.

Mutoloki, S., Munang'andu, H. M., and Evensen, Ø. (2015). Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake, and immune induction. *Frontiers in Immunology*, 6(OCT):152781.

Niu, J., Wu, F., Huang, Y., Tang, J., Wang, B., Lu, Y., Cai, J., and Jian, J. (2021). Identification and characterization of high-mobility group box 1 (hmgb1) from nile tilapia (oreochromis niloticus). *Aquaculture Reports*, 19:100573.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time rt–pcr. *Nucleic Acids Research*, 29(9):e45–e45.

Provencher, S. W. and Glöckner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 20(1):33–37.

Pulgar, R., Travisany, D., Zuñiga, A., Maass, A., and Cambiazo, V. (2015). Complete genome sequence of piscirickettsia salmonis lf-89 (atcc vr-1361) a major pathogen of farmed salmonid fish. *Journal of biotechnology*, 212:30–31.

Quiñones, R. A., Fuentes, M., Montes, R. M., Soto, D., and León-Muñoz, J. (2019). Environmental issues in chilean salmon farming: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(2):375–402.

Rebl, A., Goldammer, T., and Seyfert, H. M. (2010). Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 134(3-4):139–150.

Reed, S. G., Orr, M. T., and Fox, C. B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, 19(12):1597–1608.

Rombout, J. H., Huttenhuis, H. B., Picchietti, S., and Scapigliati, G. (2005).

Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(5):441–455.

Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Scaffidi, P., Valentinis, B., Catalanotti, F., Giazzon, M., Dumitriu, I. E., Müller, S., Iannacone, M., Traversari, C., Bianchi, M. E., and Manfredi, A. A. (2004). Hmgb1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO reports*, 5(8):825–830.

Rozas-Serri, M. (2022). Why does piscirickettsia salmonis break the immunological paradigm in farmed salmon? biological context to understand the relative control of piscirickettsiosis. *Frontiers in Immunology*, 13.

Rozas-Serri, M., Ildefonso, R., Peña, A., Enríquez, R., Barrientos, S., and Maldonado, L. (2017). Comparative pathogenesis of piscirickettsiosis in atlantic salmon (salmo salar l.) post-smolt experimentally challenged with lf-89-like and em-90-like piscirickettsia salmonis isolates. *Journal of Fish Diseases*, 40(10):1451–1472.

Rozas-Serri, M., Kani, T., Jaramillo, V., Correa, R., Ildefonso, R., Rabascall, C., Barrientos, S., Coñuecar, D., and Peña, A. (2024). Current vaccination strategy against piscirickettsia salmonis in chile based only on the em-90 genogroup shows incomplete cross-protection for the lf-89 genogroup. *Fish & Shellfish Immunology*, 154:109893.

Saenz, R., Futalan, D., Leutenez, L., Eekhout, F., Fecteau, J. F., Sundelius, S., Sundqvist, S., Larsson, M., Hayashi, T., Minev, B., Carson, D., Esener, S., Messmer, B., and Messmer, D. (2014a). Tlr4-dependent activation of dendritic cells by an hmgb1-derived peptide adjuvant. *Journal of Translational Medicine*, 12(1):1–11.

Saenz, R., Messmer, B., Futalan, D., Tor, Y., Larsson, M., Daniels, G., Esener, S., and Messmer, D. (2014b). Activity of the hmgb1-derived immunostimulatory peptide hp91 resides in the helical c-terminal portion and is enhanced by dimerization. *Molecular Immunology*, 57(2):191–199.

Saenz, R., Souza, C. d. S., Huang, C. T., Larsson, M., Esener, S., and Messmer, D. (2010). Hmgb1-derived peptide acts as adjuvant inducing immune responses to peptide and protein antigen. *Vaccine*, 28(47):7556–7562.

SAG (2025). Medicamentos autorizados.

Sakai, M., Hikima, J.-I., and Kono, T. (2021). Fish cytokines: current research and applications. *Fisheries Science*, 87:1–9.

SalmonChile (2024). Proyecto yelcho.

Schijns, V., Fernández-Tejada, A., Barjaktarović, Ž., Bouzalas, I., Brimnes, J., Chernysh, S., Gizurarson, S., Gursel, I., Jakopin, Ž., Lawrenz, M., Nativi, C., Paul, S., Pedersen, G. K., Rosano, C., Ruiz-de Angulo, A., Slütter,

B., Thakur, A., Christensen, D., and Lavelle, E. C. (2020). Modulation of immune responses using adjuvants to facilitate therapeutic vaccination. *Immunological Reviews*, 296(1):169–190.

Secombes, C. J. (1990). Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *Techniques in fish immunology*, 1:137–155.

Sepulcre, M. P., Alcaraz-Pérez, F., López-Muñoz, A., Roca, F. J., Meseguer, J., Cayuela, M. L., and Mulero, V. (2009). Evolution of lipopolysaccharide (lps) recognition and signaling: Fish tlr4 does not recognize lps and negatively regulates nf-κb activation. *The Journal of Immunology*, 182(4):1836–1845.

SERNAPESCA (2022a). Informe sanitario con información sanitaria de agua dulce y mar.

SERNAPESCA (2022b). Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional.

SERNAPESCA (2025a). Informe con antecedentes sanitarios de agua dulce y mar.

SERNAPESCA (2025b). Informe sobre uso de antimicrobianos y antiparasitarios en la salmonicultura nacional.

Shah, S. Q., Cabello, F. C., L'Abée-Lund, T. M., Tomova, A., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H., and Sørum, H. (2014). Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environmental Microbiology*, 16(5):1310–1320.

Smith, P. A., Contreras, J. R., Larenas, J. J., Aguillon, J. C., Garces, L. H., Perez, B., and Fryer, J. L. (1997). Immunization with bacterial antigens: piscirickettsiosis. *Developments in Biological Standardization*, 90:161–166.

Smith, P. R., Breton, A., Horsberg, T. E., and Corsin, F. (2009). Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. *Guide to Antimicrobial Use in Animals*, pages 207–218.

Song, W. S., Jeon, Y. J., Namgung, B., Hong, M., and Yoon, S.-I. (2017). A conserved TLR5 binding and activation hot spot on flagellin. *Scientific Reports*, 7:40878.

Soto, D., León-Muñoz, J., Dresdner, J., Luengo, C., Tapia, F. J., and Garreaud, R. (2019). Salmon farming vulnerability to climate change in southern chile: understanding the biophysical, socioeconomic and governance links. *Reviews in Aquaculture*, 11(2):354–374.

Soto, F. (2025). Chilean salmonid sector's antibiotic use rose by 22

Steinhagen, J. E. ., Readman, D. ., Daly, J. ., Adamek, J. M. ., Tilapia, M., Virus, L., Kembou-Ringert, J. E., Steinhagen, D., Readman, J., Daly, J. M.,

and Adamek, M. (2023). Tilapia lake virus vaccine development: A review on the recent advances. *Vaccines 2023, Vol. 11, Page 251*, 11(2):251.

Stosik, M., Tokarz-Deptuła, B., and Deptuła, W. (2021). Immunological memory in teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 115:95–103.

SUBPESCA (2025). Informe sectorial de pesca y acuicultura.

Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature Immunology 2013 14:4*, 14(4):320–326.

Tafalla, C., Bøgwald, J., and Dalmo, R. A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6):1740–1750.

Takizawa, F., Koppang, E. O., Ohtani, M., Nakanishi, T., Hashimoto, K., Fischer, U., and Dijkstra, J. M. (2011). Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin suggests these tissues form Th2-skewed immune environments. *Molecular Immunology*, 48(12–13):1360–1368.

Tammas, I., Bitchava, K., and Gelasakis, A. I. (2024). Advances in vaccine adjuvants for teleost fish: Implications for aquatic welfare and the potential of nanoparticle-based formulations. *Vaccines 2024, Vol. 12, Page 1347*, 12(12):1347.

Teissier, T. and Boulanger, É. (2019). The receptor for advanced glycation end-products (rage) is an important pattern recognition receptor (prr) for inflammaging. *Biogerontology*, 20(3):279–301.

Telusma, G., Datta, S., Mihajlov, I., Ma, W., Li, J., Yang, H., Newman, W., Messmer, B. T., Minev, B., Schmidt-Wolf, I. G., Tracey, K. J., Chiorazzi, N., and Messmer, D. (2006). Dendritic cell activating peptides induce distinct cytokine profiles. *International Immunology*, 18(11):1563–1573.

Tian, H., Xing, J., Tang, X., Sheng, X., Chi, H., and Zhan, W. (2023). Cytokine networks provide sufficient evidence for the differentiation of cd4+ t cells in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 141:104627.

Tlaxca, J. L., Ellis, S., and Remmele, R. L. (2015). Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: Potential and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 93:56–78.

Ulmer, J. B., Mason, P. W., Geall, A., and Mandl, C. W. (2012). Rna-based vaccines. *Vaccine*, 30(30):4414–4418.

Valenzuela-Avilés, P., Torrealba, D., Figueroa, C., Mercado, L., Dixon, B., Conejeros, P., and Gallardo-Matus, J. (2022). Why vaccines fail against Piscirickettsiosis in farmed salmon and trout and how to avoid it: a review. *Frontiers in Immunology*, 13:1019404.

Venereau, E., Leo, F., Mezzapelle, R., Careccia, G., Musco, G., and Bianchi, M. E. (2016). Hmgb1 as biomarker and drug target. *Pharmacological research*, 111:534–544.

Verrijdt, G., Haelens, A., Schoenmakers, E., Rombauts, W., and Claessens, F. (2002). Comparative analysis of the influence of the high-mobility group box 1 protein on dna binding and transcriptional activation by the androgen, glucocorticoid, progesterone and mineralocorticoid receptors. *Biochemical Journal*, 361(1):97–103.

Vásquez-Suárez, A., Ortega, L., González-Chavarría, I., Valenzuela, A., Muñoz-Flores, C., Altamirano, C., Acosta, J., and Toledo, J. R. (2024). Agonistic effect of peptides derived from a truncated hmgb1 acidic tail sequence in tlr5 from salmo salar. *Fish & Shellfish Immunology*, 144:109219.

Wang, G. h., Wang, J. j., Yue, B., Du, X., Du, H. h., Zhang, M., and Hu, Y. h. (2019). High mobility group box 2 of black rockfish sebastes schlegelii: Gene cloning, immunoregulatory properties and antibacterial effect. *Fish & Shellfish Immunology*, 84:719–725.

Wang, Y., Xiao, X., Wang, F., Yang, Z., Yue, J., Shi, J., Ke, F., Xie, Z., and Fan, Y. (2021). An identified pfhmgb1 promotes microcystin-lr-induced liver injury of yellow catfish (pelteobagrus fulvidraco). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207:111266.

Wangkahart, E., Secombes, C. J., and Wang, T. (2019). Studies on the use of flagellin as an immunostimulant and vaccine adjuvant in fish aquaculture. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN):433770.

Wangkahart, E., Thongsrisuk, A., Vialle, R., Pholchamat, S., Sunthamala, P., Phudkliang, J., Srisapoome, P., Wang, T., and Secombes, C. J. (2023). Comparative study of the effects of montanide™ isa 763a vg and isa 763b vg adjuvants on the immune response against streptococcus agalactiae in nile tilapia (oreochromis niloticus). *Fish & Shellfish Immunology*, 134:108563.

White, C. (2023). Antimicrobial use in chile's salmon-farming industry dropped 32 percent in 2022.

Wiederstein, M. and Sippl, M. J. (2007). Prosa-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2):W407–W410.

Workenhe, S. T., Rise, M. L., Kibenge, M. J., and Kibenge, F. S. (2010). The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Molecular Immunology*, 47(16):2525–2536.

Xie, J., Hodgkinson, J. W., Li, C., Kovacevic, N., and Belosevic, M. (2014). Identification and functional characterization of the goldfish (carassius

auratus l.) high mobility group box 1 (hmgb1) chromatin-binding protein. *Developmental & Comparative Immunology*, 44(1):245–253.

Xin-peng, Z., Yong-hua, H., Yong, L., Jing-jing, W., Guang-hua, W., Ren-jie, W., and Min, Z. (2016). A high-mobility group box 1 that binds to dna, enhances pro-inflammatory activity, and acts as an anti-infection molecule in black rockfish, sebastes schlegelii. *Fish & Shellfish Immunology*, 56:402–409.

Xu, X., Yan, C., and Zou, X. (2018). Mdockpep: An ab-initio protein–peptide docking server. *Journal of Computational Chemistry*, 39(28):2409–2413.

Xue, L. C., Rodrigues, J. P., Kastritis, P. L., Bonvin, A. M., and Vangone, A. (2016). Prodigy: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. *Bioinformatics*, 32(23):3676–3678.

Yamaguchi, T., Quillet, E., Boudinot, P., and Fischer, U. (2019). What could be the mechanisms of immunological memory in fish? *Fish & Shellfish Immunology*, 85:3–8.

Yan, C., Xu, X., and Zou, X. (2016). Fully blind docking at the atomic level for protein-peptide complex structure prediction. *Structure*, 24(10):1842–1853.

Yanai, H., Ban, T., Wang, Z., Choi, M. K., Kawamura, T., Negishi, H., Nakasato, M., Lu, Y., Hangai, S., Koshiba, R., Savitsky, D., Ronfani, L., Akira, S., Bianchi, M. E., Honda, K., Tamura, T., Kodama, T., and Taniguchi, T. (2009). Hmgb proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature 2009 462:7269*, 462(7269):99–103.

Yang, C., Peng, L., and Su, J. (2013). Two hmgb1 genes from grass carp ctenopharyngodon idella mediate immune responses to viral/bacterial pamps and gcrv challenge. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(3):133–146.

Yang, H., Wang, H., and Andersson, U. (2020). Targeting inflammation driven by hmgb1. *Frontiers in Immunology*, 11:526761.

Yoon, S., Kurnasov, O., Natarajan, V., Hong, M., Gudkov, A., Osterman, A. L., and Wilson, I. A. (2012). Structural basis of tlr5-flagellin recognition and signaling. *Science*, 335(6070):859–864.

Zepp, F. (2016). Principles of vaccination. *Methods in Molecular Biology*, 1403:57–84.

Zhang, Y. and Hayney, M. S. (2018). Vaccine adjuvants: Key components of some new vaccines. *Journal of the American Pharmacists Association*, 58(2):220–222.

Zhao, L., Hu, Y. H., Sun, J. S., and Sun, L. (2011a). The high mobility group box 1 protein of sciaenops ocellatus is a secreted cytokine that stimulates

macrophage activation. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(10):1052–1058.

Zhao, T., Cai, Y., Jiang, Y., He, X., Wei, Y., Yu, Y., and Tian, X. (2023). Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8:283.

Zhao, X., Kuja-Panula, J., Rouhiainen, A., Chen, Y. C., Panula, P., and Rauvala, H. (2011b). High mobility group box-1 (hmgb1; amphoterin) is required for zebrafish brain development. *Journal of Biological Chemistry*, 286(26):23200–23213.

Zheng, Y.-Y., Li, Y., Sun, T.-Z., Wei, X.-F., Liu, M.-Z., Li, P.-F., Wang, G.-X., and Zhu, B. (2023). Inulin acetate as a novel recombinant subunit vaccine carrier for immunization of tilapia against tilapia lake virus. *Aquaculture*, 571:739439.

Zhou, P., Jin, B., Li, H., and Huang, S. Y. (2018a). Hpepdock: a web server for blind peptide–protein docking based on a hierarchical algorithm. *Nucleic Acids Research*, 46(W1):W443–W450.

Zhou, Z., Lin, Z., Pang, X., Shan, P., and Wang, J. (2018b). Microrna regulation of toll-like receptor signaling pathways in teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 75:32–40.

Zou, J. and Secombes, C. J. (2011). Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12):1376–1387.

Šali, A. and Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234(3):779–815.