

RESUMEN DE TESIS DOCTORAL**Caracterización molecular del reflejo inflamatorio y modulación de la respuesta inmune frente a infecciones en peces.****Débora Torrealba Sandoval**Directores:

Dra. Nerea Roher Armentia

Dr. Simon A. Mackenzie

Defendida el 03/06/2016 en la Universidad de Barcelona.

Realizada en el Instituto de Biomedicina y Biotecnología (IBB), Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

Mención *Cum laude***Resumen**

El mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune innato es fundamental, ya que éste debe mantener una respuesta equilibrada frente a los patógenos. En mamíferos, uno de los mecanismos por el cual se mantiene la homeostasis es el reflejo inflamatorio, un circuito neural que modula la respuesta inflamatoria previniendo las consecuencias de una sobre activación. El primer objetivo de esta tesis fue establecer si el reflejo inflamatorio descrito en mamíferos también estaba presente en teleosteos, y para ello utilizamos como modelo la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). El reflejo inflamatorio funciona a través del nervio vago, la vía eferente también conocida como la vía colinérgica antiinflamatoria estimula el nervio esplénico en el bazo. Esto produce la liberación de norepinefrina por los nervios adrenérgicos. En consecuencia, la norepinefrina se une a los linfocitos presentes en el bazo, que expresan acetiltransferasa de colina, y que son capaces de sintetizar acetilcolina (ACh). La ACh derivada de los linfocitos se une a los receptores nicotínicos de acetilcolina alfa 7 ($\alpha 7$ nAChR) presentes en los macrófagos del bazo inhibiendo la liberación de citoquinas proinflamatorias. El receptor $\alpha 7$ nACh es una pieza clave del sistema del reflejo inflamatorio, es por ello que en este estudio describimos y caracterizamos una nueva secuencia de $\alpha 7$ nAChR en teleosteos. El análisis de la secuencia proteica muestra un alto grado de conservación en comparación con sus ortólogos en mamíferos. Además, el receptor $\alpha 7$ nACh de trucha presenta todas las características y aminoácidos que forman un receptor funcional. En estudios in vivo, la estimulación intraperitoneal con lipopolisacáridos (LPS) y un análogo del ARN de doble cadena (poly (I:C)), aumentan la expresión del receptor $\alpha 7$ nACh en diferentes tejidos y, además, modulan los niveles de ACh en plasma y en bazo. Adicionalmente, el receptor se expresa en macrófagos aislados de bazo y de riñón anterior, en ambos casos siendo capaz de unir α bungarotoxina, un antagonista del receptor $\alpha 7$ nACh. Nuestros resultados muestran que existe una modulación de la nicotina (un agonista del receptor) en la expresión génica de moléculas inflamatorias en macrófagos frente a una estimulación con poly (I:C) y no con LPS, a diferencia de estudios realizados en mamíferos. Esta modulación se realiza a través del receptor $\alpha 7$ nACh, ya que la adición de un antagonista específico, produce una disminución del efecto de la nicotina. En este trabajo describimos que el receptor $\alpha 7$ nACh presente en los macrófagos de trucha tiene la capacidad de modular la respuesta inflamatoria. Nuestros resultados demuestran por primera vez la conservación funcional del reflejo inflamatorio en teleosteos.

La industrialización de la producción de peces ha planteado numerosos problemas relacionados con la explotación intensiva. Uno de los retos más importantes en acuicultura es el control de las enfermedades infecciosas, que son fácilmente transmitidas en condiciones de alta densidad de cultivo y que producen importantes pérdidas económicas. Actualmente, las vacunas comerciales disponibles son producidas en base a patógenos vivos, atenuados o inactivados. Sin embargo, las vacunas basadas en bacterias atenuadas vivas no son ampliamente utilizadas por razones de seguridad, mientras que las vacunas existentes basadas en patógenos inactivados son generalmente débiles inmunoestimuladores. Esta limitación asociada con las vacunas inactivadas frecuentemente es superada con la administración de adyuvantes, aunque, pueden presentar importantes efectos secundarios. La segunda hipótesis de esta tesis es que nanopartículas proteicas, conocidas como cuerpos de inclusión (CI), pueden ser utilizados como

plataformas de entrega de inmunoestimulantes en peces. Los CI son nanopartículas proteicas, mecánicamente estables, no tóxicas producidas en *Escherichia coli*. Este biomaterial esta principalmente compuesto por la proteína heteróloga recombinante, pero también contiene diferentes componentes tales como restos de membrana, proteínas unidas a la membrana, ácidos nucleicos, fragmentos de la pared celular y en consecuencia LPS y peptidoglicanos (PGN). Cabe destacar que estos elementos han sido descritos como potentes estimulantes del sistema inmune en peces. Además, los CI presentan importantes características relacionadas con su producción, como una biofabricación completamente escalable, procesos simples y rentables. En este contexto, fueron desarrollados tres CI en base a proteínas fluorescentes sin una función inmunológica en peces como una prueba de concepto². Los CI producidos son internalizados in vitro por hepatocitos del pez cebra (*Danio rerio*) y por macrófagos de trucha, modulando la expresión génica de genes relacionados con la respuesta inflamatoria. Los CI al ser administrados intraperitonealmente, protegen al pez cebra frente a una infección bacteriana letal (*Pseudomonas aeruginosa*), obteniendo un RPS de hasta un 75 %. En base a estos prometedores resultados, nuestro siguiente paso fue el desarrollar CI con proteínas con una función inmunológica en peces que pudieran potenciar el efecto protector de los CI³. Desarrollamos dos nuevos CI en base a citoquinas, TNF α y CCL4. Al igual que los resultados anteriores estos CI son internalizados in vitro y son capaces de estimular la respuesta génica de genes relacionados con la respuesta inmune de forma más eficiente que los CI sin una función inmunológica. Los resultados de la biodistribución in vivo en trucha mostraron que los CI son acumulados en bazo y en riñón anterior, y son endocitados por células inmunes relevantes como los macrófagos. Los CI de citoquinas protegen al pez cebra frente a una infección bacteriana letal (*P. aeruginosa*), de forma más eficiente que los CI formados por proteínas fluorescentes (RPS de 100 % para CI de TNF α y RPS de 91 % para CI de CCL4). Adicionalmente, los CI mantienen su morfología y función frente a condiciones extremas de pH y temperatura, así como durante el proceso de liofilización. Al ser administrados oralmente en truchas, los CI llegan a los dos primeros tramos del intestino y son absorbidos por células presentes en la mucosa intestinal, las cuales, por su localización en la mucosa podrían corresponderse con linfocitos intraepiteliales (IELs). Nuestros resultados sugieren que los CI pueden ser una alternativa viable a los métodos de profilaxis actuales, como plataforma de entrega de inmunoestimulantes y proteínas por vía oral sin necesidad de encapsulación adicional.

Estos fueron proyectos multidisciplinarios que abarcaron tanto la ciencia básica, como la ciencia aplicada. El primer trabajo describe por primera vez el reflejo inflamatorio en peces, aportando a la mejor comprensión del sistema inmune en teleósteos. Este es el primer paso para el desarrollo de nuevos métodos profilácticos que permitan la optimización de la producción masiva de peces, específicamente la prevención de las elevadas pérdidas económicas debidas a enfermedades. Por otro lado, el desarrollo de nuevos inmunoestimulantes no siempre responde a la realidad de la industria, se necesitan profilácticos fáciles de producir, altamente estables y de bajo costo. Nosotros presentamos en este trabajo nanopartículas que pueden ser administradas por vía oral dejando de lado las desventajas de la administración por inyección o inmersión. Además, presentan una alta resistencia, pueden ser liofilizadas, pueden ser producidos de manera escalable y a bajo costo, siendo una opción viable para la acuicultura.

Palabras *clave*: reflejo inflamatorio, trucha arcoíris, nanopartículas, sistema inmune, pez cebra.

Publicaciones de la Tesis

Enlace al documento completo: <http://www.tdx.cat/handle/10803/398130>

Torrealba, D., Balasch, J.C., Criado, M., Tort, L., Mackenzie, S., Roher, N. (2017). Functional evidence for the inflammatory reflex in teleosts: A novel $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor modulates the macrophage response to dsRNA. *Journal of Leukocytes Biology* (under review).

Torrealba, D., Seras-Franzoso, J., Mamat, U., Wilke, K., Villaverde, A., Roher, N., Garcia-Fruitós, E. (2016). Complex amyloid nanoparticles as immunostimulant-delivery platforms for fish. *PLoS ONE* 11(10): e0164073. doi:10.1371/journal.pone.0164073.

Torrealba, D., Parra, D., Seras-Franzoso, J., Vallejos, E., Yero, D., Gibert, I., Villaverde, A., García-Fruitós, E., Roher, N. (2016). Nanostructured recombinant cytokines: a highly stable alternative to short-lived prophylactics. *Biomaterials*, 107: 102-104. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.043