



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales

ESTUDIO DE CASO

**“LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA CAPACIDAD INMUNITARIA Y SU
POTENCIAL PARA LA MEJORA DE LA PRODUCCIÓN EN ACUICULTURA DE
PECES”**

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

Previa a la obtención del Título de:

MÁSTER EN CIENCIAS – ACUICULTURA MARINA

Presentado por:

Patricia Castillo Briceño

Guayaquil - Ecuador

2016

AGRADECIMIENTOS

A todas (os) las colegas con quienes he tenido el privilegio de colaborar, intercambiar ideas y discutir perspectivas.

A las instituciones donde he tenido el privilegio de investigar en entornos académicos diversos y por tanto enriquecedores.

A mi familia y amigos por el soporte personal y logístico recibido.

A la Dra. Carla Ricaurte, Subdecana de FIMCBOR, y todo el equipo de la Facultad por su guía durante el proceso administrativo.

A la Cooperación Técnica Belga y al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), por el apoyo en su momento para participar en este programa de Maestría.

...

DEDICATORIA

*A las personas humanas y no-humanas con quienes tengo la fortuna
de compartir la experiencia de la vida.*

TRIBUNAL DE EXAMEN COMPLEXIVO

Dr. Marco Álvarez

EVALUADOR

Dr. Wilfrido Argüello

EVALUADOR

LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA CAPACIDAD INMUNITARIA Y SU POTENCIAL PARA LA MEJORA DE LA PRODUCCIÓN EN ACUICULTURA DE PECES

Patricia Castillo-Briceño^(1,2)

¹ Proyecto 'Equatorial Biome & Ocean Acidification' – EBiOAc

² Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales (FIMCBOR)

Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral

Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador

pat.castillo.briceno@gmail.com

Resumen

Los componentes de la matriz extracelular (MEC), durante largo tiempo, se consideraron como elementos solamente estructurales y de cohesión en los tejidos. Sin embargo, numerosos estudios publicados a lo largo de las dos últimas décadas han presentado evidencias significativas sobre las implicaciones directas de la MEC en diversos procesos fisiológicos, incluidas la señalización y regulación de la función inmunitaria. En peces teleósteos se probó que moléculas directamente relacionadas con el ambiente de la MEC, tales como; colágenos, integrinas y metaloproteasas de la matriz tienen un papel durante la respuesta inmune. Estudios con colágenos fibrilares, demuestran que estas proteínas y sus péptidos derivados son capaces de activar la respuesta inmune en modelos de peces teleósteos, con inducción de la producción de citoquinas proinflamatorias, la activación de fagocitos profesionales y la liberación de especies reactivas de oxígeno. Considerando el conjunto de evidencias, se sugiere que las moléculas asociadas y que forman la MEC tienen una funcionalidad potencial como fármacos para la mejora de la capacidad inmunitaria de peces, por lo tanto, del estado de salud y bienestar en general de estos animales. La acuicultura de peces es una actividad en rápido crecimiento alrededor del mundo; lo cual implica la diversificación de sistemas de cultivo, especies objetivo y ecosistemas, pero también el incremento de la incidencia y emergencia de enfermedades. El presente trabajo resalta el valor de las evidencias existentes y la necesidad de transferir este conocimiento a la investigación aplicada al desarrollo de nuevos fármacos inspirados en moléculas asociadas a la MEC y sus mecanismos de acción, como herramientas biotecnológicas para la mejora de la producción en la acuicultura de peces.

Palabras clave: *matriz extracelular, peces, inmunidad, colágeno, salud animal, acuicultura.*

Abstract

The extracellular matrix (ECM) components were, during long time, considered as merely structural and cohesion elements. However, the increasing studies over the last two decades provide significant evidence for ECM direct involvement in diverse physiological process, including signaling and regulation of the immune function. In teleost fish, it is now proven that molecules directly related to the ECM environment, such as collagen, integrins and matrix metalloproteases have a role during the immune response. In example, the studies demonstrate that fibrillar collagens and their derived peptides are able to activate the immune response in teleost fish models, by inducing: the production of proinflammatory cytokines, the activation of professional phagocytes and the release of reactive oxygen species. Thus, the existing data suggest that several ECM related molecules have the potential to be used as drugs to enhance fish immune capacity, therefore their general health status and welfare. Fish aquaculture is a rapidly rising activity around the world; that implies to diversify on culture systems, target species and environments, but also increases the potential for incidence and emergence of diseases. This work highlights the value of existing evidences and their potential application on translational research to develop novel drugs inspired on ECM related molecules and their mechanisms of action as biotechnological tools to improve the production in fish aquaculture.

Key words: *extracellular matrix, fish aquaculture, immunity, collagen, animal health.*

1. Introducción

La matriz extracelular (MEC) constituye el soporte fundamental de órganos y tejidos, forma parte de la membrana basal y funciona como un sustrato activo que permite la migración y adhesión celulares [1,2]. En la analogía de los tejidos animales como ecosistemas celulares complejos, formados por diferentes tipos celulares que interactúan entre sí y con los elementos de su microambiente [3]; es evidente el papel clave de la MEC y las moléculas presentes en el espacio extracelular para la generación de un microambiente que regule de forma precisa la actividad de las poblaciones celulares en los tejidos, y que se traduzca en un correcto funcionamiento a nivel de organismo.

La composición y organización de la MEC cambia según las necesidades del organismo durante el desarrollo y las interacciones con las células, desarrollando las propiedades estructurales específicas que permiten a los tejidos y órganos desempeñar sus funciones [4]. Los elementos estructurales de la MEC (e.g. colágeno, laminina y fibronectina) son degradados y modificados por las enzimas metaloproteasas de la matriz (MMPs). Estudios sobre las MMPs sugieren que estas enzimas tendrían un papel directo como reguladoras de la adaptación física de los tejidos en respuesta a factores ambientales, durante los procesos de desarrollo y en procesos patológicos [5].

En mamíferos se conoce que la expresión y la modulación de la actividad de proteínas de la MEC y de las MMPs intervienen en procesos inflamatorios. Por ejemplo, en ratones se demostró que los macrófagos, células inmuno-competentes, son activadas por proteoglicanos de la MEC (i.e. biglicano y ácido hialurónico) a través del receptor inmunitario clásico TLR4 [6], y por colágeno I (en su forma nativa y desnaturalizado) con inducción de la citoquina proinflamatoria interleuquina 1 β (IL1B) [7]. En peces, los estudios sobre la relación entre la MEC y la respuesta inmunitaria son escasos, pero prometedores. Los resultados obtenidos en un teleosteo marino (*Sparus aurata*) (**Figura 1**) demuestran que moléculas derivadas de colágenos fibrilares (tipo I, II y III) son capaces de inducir y regular la respuesta inmune a nivel molecular y celular, en células fagocíticas y fibroblastos, lo cual tiene además implicaciones en los procesos de reparación de heridas y regeneración de tejidos [1,7–10]. Otros estudios con diferentes aproximaciones apoyan la noción de la implicación de las moléculas asociadas a la MEC en la señalización de la respuesta inmune en peces, donde estarían implicadas las MMPs, sus inhibidores tisulares (TIMPs) y receptores de la familia de las integrinas (ITGs); incluyendo: procesos pro-inflamatorios desencadenados vía estimulación endocrina (fisiológica y exógena) o vía patrones moleculares de patógenos (PAMPs) [11–15], y transgénicos resistentes a enfermedades [16]. Sin embargo se necesitan más estudios que permitan

transferir estos conocimientos para su potencial aplicación, por ejemplo en el campo de salud animal para la acuicultura de peces.



Figura 1. Cultivo de doradas (*Sparus aurata*) en jaulas flotantes en el Mediterráneo. Foto cortesía del Laboratorio de Ecología Acuática, Universidad de Murcia.

En el presente trabajo, se hace una revisión de la información existente sobre la MEC y sus moléculas asociadas como actores en la respuesta inmunitaria de los peces, y se analizan los principales hallazgos con potencial de transferencia al sector productivo acuícola. Finalmente, se hace una propuesta como referencia de las potenciales aplicaciones de las moléculas del ambiente de MEC y los beneficios de su uso potencial como una alternativa a los fármacos tradicionales usados en acuicultura, muchos de uso restringido para cultivos destinados al consumo humano.

2. Análisis y Discusión

2.1. Entorno y funciones de la matriz extracelular (MEC)

Las perspectivas de estudio sobre la MEC evolucionaron notablemente con el descubrimiento de receptores transmembrana, e.g. las ITGs, los cuales evidenciaron que además de dar soporte, la MEC tiene diversas funciones en los procesos celulares y su señalización [4]. El ensamblaje de las proteínas de la MEC en superestructuras, como las microfibras y fibras elásticas de colágeno, es clave para la interacción en el entorno de la MEC (**Figura 2**) y para la señalización de las funciones celulares e.g. crecimiento, migración y proliferación; por lo cual se estima que las moléculas de la MEC tienen una importancia comparable o mayor a la de las señales solubles [2].

La MEC en los metazoos está compuesta mayoritariamente por colágenos, los cuales son una pieza clave de su evolución [17] y fisiología. Existen 30 tipos de colágenos, siete son capaces de formar fibras que dan la retractilidad y densidad a los tejidos, de ellos los colágenos tipo I y II (COL1 y COL2) son la forma mayoritaria de colágeno [18]. Varios tipos

celulares, incluyendo células inmunocompetentes como monocitos y endoteliales, secretan proCOL para ser procesado a COL y ensamblado en la superficie celular [19]. Las células interactúan con los colágenos de la MEC mediante receptores específicos, que a su vez pueden inducir la activación de otras moléculas como MMPs, TIMPs y citoquinas que señalizan procesos de remodelación, inflamación y respuesta inmune [10,17,20].

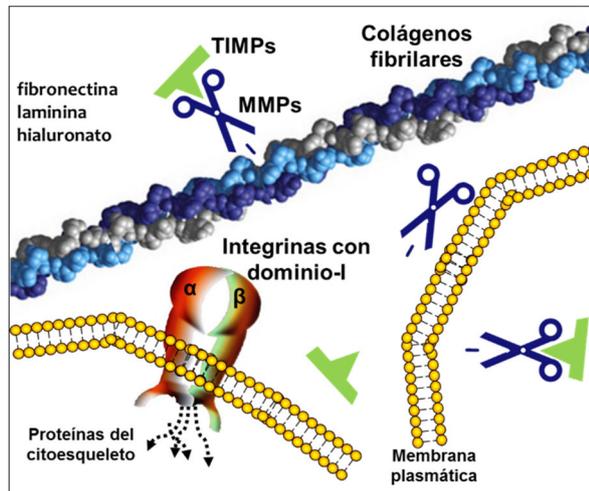


Figura 2. Esquema del entorno de la matriz extracelular (MEC) y sus moléculas asociadas.

Las ITGs son los principales receptores de superficie en células eucariotas y actúan como vínculos transmembrana célula-célula y célula-MEC. La diversificación de las ITGs tiene relación con grandes cambios en la evolución, como la aparición del sistema inmunitario dual (innato y adaptativo) propio de vertebrados [21]. Las ITGs son una superfamilia de $\alpha\beta$ heterodímeros que participan en varios procesos celulares (e.g. adhesión, fibrosis, tráfico leucocitario y respuesta inmunitaria) [17,20,21]. Los heterodímeros de ITGs beta 1 ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$ y $\alpha11\beta1$) actúan principalmente como receptores de colágenos mediante el dominio-I (tipo Von Willebrand factor A) único de vertebrados [20,21]. La unión ITG-COL durante la señalización de procesos de reparación tisular es clave para inducir la producción de MMPs y adhesión celular [22].

Las MMPs son clave en la regulación de la arquitectura de los tejidos, con una función principal en la degradación controlada de la MEC. La fragmentación de proteínas por las MMPs es uno de los pasos iniciales de la migración celular, donde se modifican aspectos mecánico-estructurales y de señalización, i.e. producción de fragmentos con actividad biológica, modificación de uniones intercelulares, y activación/desactivación de ligandos y receptores en rutas de señalización específicas [23]. La regulación de las MMPs ocurre a nivel de transcripcional y postranscripcional, de procesamiento de la forma inactiva (zimógeno) y de regulación vía TIMPs [24,25]. Los fragmentos

producidos por las MMP son acumulados en el microambiente de la MEC, donde funcionan como moléculas quimiotácticas y activan rutas de señalización diferentes a las moléculas nativas [26]. De las 29 MMPs identificadas, las gelatinasas MMP2 y MMP9, y la colagenasa MMP13, son de las más estudiadas en vertebrados por su acción sinérgica en diferentes procesos y rutas de señalización [8], como: respuesta inflamatoria, reclutamiento vascular, remodelación ósea y quimiotaxis [27]. El equilibrio en los niveles de expresión y actividad de MMPs/TIMPs es un elemento clave en procesos de activación de moléculas con función inmunitaria; y su desbalance se ha relacionado con condiciones clínicas como: cáncer, sepsis, artritis, úlceras tisulares y fibrosis [23].

En general se puede decir que en vertebrados, el ambiente de la MEC es un sistema altamente interactivo, con componentes funcionales capaces de regular la respuesta inmune y procesos asociados, pero que además poseen una alta plasticidad gracias a sus diversos mecanismos de modulación.

2.2. Implicaciones de la MEC en la respuesta inmunitaria de peces teleósteos

Los teleósteos poseen un sistema inmunitario dual (innato y adaptativo). La respuesta innata consta de las barreras físicas (epitelios y mucosas), efectores celulares (células fagocíticas y citotóxicas no específicas) y factores humorales (complemento y otras proteínas de la fase aguda); y, la respuesta adaptativa engloba un componente celular (linfocitos) y otro humoral (anticuerpos). El sistema inmunitario innato es la principal defensa en peces, donde el riñón en su porción cefálica constituye el principal tejido hematopoyético, mientras que el bazo es el segundo órgano linfóide más importante [8,28,29]. Las células fagocíticas (granulocitos y monocitos/macrófagos) tienen el papel principal en la inmunidad innata de peces y podrían iniciar la respuesta inmunitaria específica, entre ellos los granulocitos tendrían funciones similares a los neutrófilos de mamíferos como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) con capacidad bactericida [30]. Otro aspecto relevante en la respuesta inmunitaria de los teleósteos es el desgaste energético relacionado con factores reproductivos, especialmente en especies de puesta estacional y aquellas que cambian de sexo, procesos que con frecuencia implican un detrimento en la capacidad inmunitaria del individuo. Estudios en *S. aurata* muestran que durante la post-puesta e involución testicular ocurre una infiltración de granulocitos en la gónada, donde participarían en la remodelación testicular vía producción de IL1B, como factor proliferativo en las células germinales de testículo, y de dos gelatinasas activas (MMP2 y MMP9); mientras que durante el mismo período los granulocitos en el riñón cefálico solo presentan actividad de MMP2 [15]. Estos datos y el perfil de expresión transcripcional de MMP2, MMP9, MMP13,

TIMP2a, TIMP2b, COL1a, ITG1b e ITG1a de los granulocitos en el testículo, de gónada, hígado y otros órganos inmunocompetentes bajo condiciones fisiológicas o estimulados con 17 β -estradiol (E2) sugieren una estrecha vinculación e intercambio entre la respuesta inmunitaria, la función reproductiva y la MEC en estas especies [8,10,14,15].

El análisis de expresión transcriptómica de moléculas asociadas a la MEC (colágenos, MMPs, TIMPs e ITGs) bajo diferentes condiciones asociadas a la interacción inmuno-reproductora en *S. aurata* muestra: 1) un enriquecimiento fisiológico tejido-dependiente de MMP9, MMP13, TIMP2a e ITGB1a en los órganos inmunocompetentes internos, mientras que en los de barrera física (epidermis supramuscular y en aletas) hay además un enriquecimiento de MMP2 y COL1; sin embargo, ante una infección bacterial (*Vibrio anguillarum*) solo TIMP2b es consistentemente inducido; 2) la inducción de TIMP2a, TIMP2b y COL1a en granulocitos como parte de la respuesta inmune desencadenada por la estimulación con ADN bacteriano (como PAMP); 3) la inducción general de las moléculas de la MEC analizadas en hígado ante un proceso de inflamación inducido por disrupción endocrina estrogénica; 4) la regulación diferenciada en células inmunocompetentes aisladas durante procesos de reparación de tejidos, con una inducción específica de MMPs y TIMPs según el tipo de fagocitos (granulocitos y macrófagos), y una tendencia inhibitoria general en células endoteliales (endocardiales); y 5) la expresión coordinada de las moléculas de la MEC bajo condiciones fisiológicas y la disrupción diferenciada de la misma ante señales de patógenos (PAMPs, ADN bacteriano) o de daño (DAMPs, COL1 en suspensión) [10]. Estos hallazgos sugieren una implicación directa y precisa de las moléculas de la MEC estudiadas en los procesos de inflamación y respuesta inmunitaria innata, así como su potencial regulación endocrina, lo cual es apoyado por estudios en otras especies de peces (*Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Ctenopharyngodon idella*, *Ictalurus punctatus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar*, *Gadus morhua*) y desde diversas aproximaciones (e.g. pruebas en leucocitos aislados, expresión en tejidos in vivo, modelos de heridas estériles, desafíos por infección bacteriana) donde se reportan funciones asociadas a la respuesta inmune, inflamación, reparación y remodelación de tejidos, así como su regulación vía estimulación endocrina, para MMP2, MMP9, MMP12, TIMP2a y TIMP2b [12,13,31,32].

Estudios específicos *in vitro* sobre colágenos fibrilares y péptidos derivados como estímulos exógenos demuestran que estas moléculas asociadas a la MEC tienen una elevada capacidad regulatoria de la actividad inmunitaria de fagocitos y fibroblastos de *S. aurata* y *Danio rerio* [7,9]. Los resultados indican que el COL1 en su forma nativa, como en su forma desnaturalizada (gelatina), activa 1) la producción de ROS en fagocitos de *S. aurata*, y 2) la expresión transcriptómica de moléculas específicas asociadas a

la respuesta inmune: IL1B, CCL4, MMP9 y MMP13, pero no otras moléculas proinflamatorias típicamente inducidas por PAMPs i.e. IL6 y COX2 (PTGS2); estos efectos del COL1 que se verían exacerbados por acción de colagenasas y gelatinasas, pueden ser regulados mediante inhibidores específicos de estas enzimas (e.g. el inhibidor V para MMP2/MMP9) [8,9]. Asimismo, se ha sugerido que la detección celular de fragmentos de colágenos sería una adaptación ante la producción de colagenasas por bacterias patógenas, que facilitaría la respuesta temprana ante una infección; sin embargo, algunas bacterias podrían generar cantidades masivas de proteasas para generar fragmentos extracelulares que exacerben la actividades de los fagocitos como parte de su estrategia de invasión según lo propuesto para *Tenacibaculum maritimum* en rodaballo (*Psetta maxima* L.) y *Moritella viscosa* en salmón (*Salmo salar*) [33]. En conjunto, los estudios ponen de manifiesto el potencial del COL1 como un inmunoestimulante para peces, y muestran vías alternativas para la modulación de los procesos inflamatorios mediante inhibición/activación específica de MMPs, colagenasas/proteasas bacterianas o ambas.

A nivel de secuencia, la interacción entre los fibroblastos de *S. aurata* y los colágenos fibrilares es altamente específica, comparable a lo descrito en mamíferos. Los fibroblastos son células particularmente importantes durante la reparación de heridas y regeneración de tejidos, que facilitan una rápida cobertura inicial del área dañada a fin de proteger los tejidos internos del contacto directo con el medio acuático. El uso de librerías de péptidos que mimetizan los colágenos fibrilares y contienen secuencias GXX'GEX" (X, X' y X" = aminoácidos intercambiables), permite identificar sustratos de alta afinidad intrínseca con las ITGs que señalizan la adhesión y migración en tipos celulares específicos [20]. Mediante esta tecnología, se demostró que las secuencias GFOGER y GLOGEN (O = hidroxiprolina) como sustrato son las de mayor afinidad para la adhesión magnesio-dependiente de fibroblastos de *S. aurata*, adhesión que es inhibida en presencia de EDTA e inespecíficamente incrementada en presencia de ADN-bacteriano; mientras que en suspensión, GFOGER y GLOGEN inducen la expresión transcripcional de moléculas pro-inflamatorias (i.e. IL1B y COX2); efectos probablemente señalizados vía el dominio-I de la ITGB1 (**Figura 3**), según sugieren los datos experimentales y el análisis *in silico* de estabilidad electrostática [1,8]. Estos estudios resaltan las potenciales aplicaciones de las secuencias específicas GFOGER y GLOGEN (presentes en varios tipos de Colágenos fibrilares) para la regulación de la respuesta inflamatoria y de reparación de heridas en peces teleósteos, así como su refinamiento a nivel de la interacción ligando-receptor vía ITGs. Asimismo, se destaca el potencial de las librerías de péptidos de colágenos para el desarrollo de herramientas biotecnológicas, ya que permiten la identificación de secuencias funcionales específicas y su posterior

evaluación con diferentes tipos celulares y condiciones, facilitando la prospección de potenciales fármacos inspirados en secuencias de colágenos fibrilares.

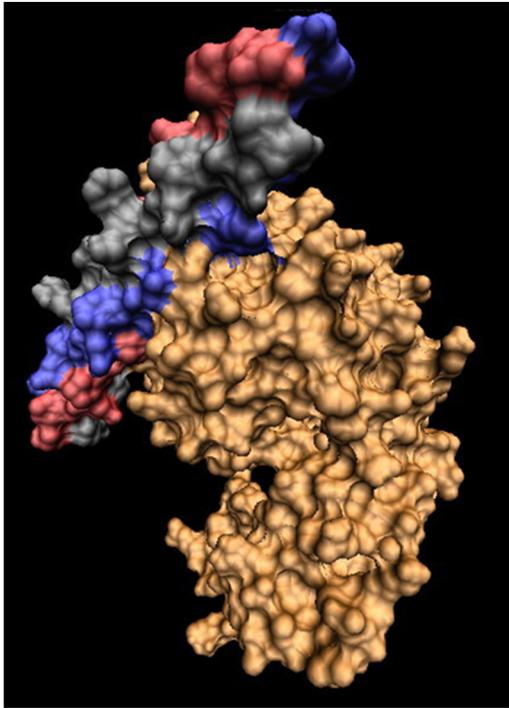


Figura 3. Modelo del complejo formado por la unión del dominio tipo-I de la ITGB1a de *Sparus aurata* y el péptido derivado de colágeno GFOGER de acuerdo con la metodología descrita en [1].

2.3. Potenciales aplicaciones de moléculas asociadas a la MEC como herramientas biotecnológicas para la mejora de la producción acuícola de peces

Considerando la alta ocurrencia de daños en los tejidos de peces por factores físicos, manipulación en acuicultura y enfermedades, y que la regeneración y reparación de tejidos es un proceso complejo pobremente descrito en peces [31]; la revisión de información existente sobre el entorno de la MEC, su regulación y potencial aplicación como herramientas de mejora de la salud animal en acuicultura es una necesidad.

Probablemente el grupo de moléculas asociadas a la MEC con mayor potencial de aplicación es el de los colágenos fibrilares y péptidos derivados, proteínas altamente conservadas a lo largo de la filogenia animal, que sin embargo mantienen rutas de señalización y reconocimiento ligando-receptor de alta especificidad. Entre las propiedades de interés de los colágenos está su capacidad de activación de fagocitos y otras células inmuno-competentes de forma diferenciada a la activación vía PAMPs o la desencadenada durante procesos infecciosos [1,9,10,16]. Además se conocen varios mecanismos de

modulación de los efectos de algunos colágenos fibrilares, desde aproximaciones básicas como el ajuste de concentraciones (el nivel de activación inmunitaria es dosis dependiente, con los mejores resultados a 10 $\mu\text{g/ml}$ en fagocitos de *S. aurata*) [9], hasta la regulación específica y funcional por medio de: 1) activación/inhibición de proteasas vía inhibidores específicos [9]; 2) enriquecimiento de secuencias específicas (e.g. GFOGER, GLOGEN) [1]; 3) presencia/ausencia de iones (e.g. Mg^{++}) [1,20]; 4) elección del tipo celular, tejido u órgano a estimular [1,9–11]; 5) activación/inhibición de receptores de la familia de las ITGs vía inhibidores o sustratos competitivos [1,11,20]; 6) forma nativa vs. desnaturalizada [9,15]; y 7) sustrato vs. estímulo en suspensión [1].

Cabe señalar que los colágenos fibrilares además de activar la respuesta inmunitaria en peces cuando son administrados como estímulos exógenos; tienen también una función inmunitaria como moléculas de señalización endógena. Durante la respuesta inmunitaria inicial en peces, la síntesis *de novo* de COL1 es inducida de forma consistente en células aisladas inmunocompetentes (granulocitos, macrófagos, fibroblastos, endoteliales) *in vitro* y en tejidos especializados *in vivo*, según se demuestra en procesos tan diversos como: activación vía PAMPs, infecciones bacterianas, inflamación inducida por disrupción endocrina e inmunoestimulantes [9,10,32]; lo cual en conjunto indica que funciona como una molécula de señalización de daño (DAMP) y un intermediario en la señalización de citoquinas inflamatorias. Considerando el alto grado de conservación en las secuencias y superestructura de los colágenos fibrilares COL1, COL2 y COL3 en vertebrados, es factible extrapolar las evidencias obtenidas sobre su capacidad estimulante de la respuesta inmunitaria (i.e activación de fagocitos, incremento de la producción de ROS y, síntesis *de novo* de citoquinas y otras moléculas de la respuesta inmune humoral) y de procesos de adhesión celular, con miras al diseño de pruebas experimentales con más especies de peces de interés acuícola, ya sea para su aplicación directa o en el desarrollo de herramientas biotecnológicas para su uso a escala de producción.

Asimismo, la implicación de MMP2, MMP9 y MMP13 en la respuesta inmunitaria ha sido demostrada en numerosas especies de teleósteos [9,10,12,15,31], lo cual las convierte en moléculas de interés. Las MMPs podrían usarse como potenciadoras de la respuesta inmunitaria; mientras que los inhibidores de MMPs podrían ayudar a controlar procesos inflamatorios exacerbados en casos de patógenos inductores de necrosis y degradación tisular. En esta línea, el patrón de inducción de TIMP2b durante la activación de la respuesta inmunitaria y especialmente ante la infección con *Vibrio anguillarum* [10], hace de este inhibidor un candidato factible como modelo para el desarrollo de

herramientas biotecnológicas que modulen la actividad de las MMPs.

Entre las posibles aplicaciones de las moléculas de la MEC analizadas (Colágenos, ITGs, MMPs y TIMPs) para el desarrollo de herramientas moduladoras de la capacidad inmunitaria y procesos afines en peces de cultivo (**Figura 4**), se propone su uso como:

- 1) Aditivos moduladores de procesos de inflamación, para el mejoramiento de los tiempos y calidad en la reparación de tejidos por daños físicos, manipulación, parásitos externos; lo cual reduce el riesgo de posteriores infecciones y de disminución de la calidad del producto final por aspecto o presencia de tejido fibroso infiltrado en el músculo;
- 2) Adyuvantes para vacunas, como una alternativa altamente biocompatible comparada con los métodos existentes (e.g. aluminio, PAMPs) y, por lo tanto, con menor probabilidad de producir efectos secundarios negativos;
- 3) Aditivos inmuno-estimulantes en protocolos profilácticos y durante tratamientos contra patógenos, para disminuir las fluctuaciones en el nivel de actividad inmunitaria del individuo, factor que normalmente beneficia a los parásitos [32].

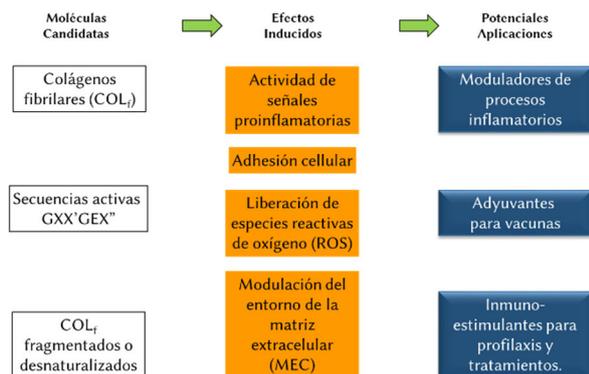


Figura 4. Resumen del potencial de los colágenos fibrilares y sus moléculas derivadas para su aplicación en el desarrollo de herramientas biotecnológicas para la mejora de la acuicultura de peces.

Entre las principales ventajas que tendría el uso de las moléculas de la MEC propuestas para su uso farmacológico como inmuno-moduladoras están: su elevada biocompatibilidad y el alto nivel de precisión para la regulación de su actividad, lo cual se traduciría en una baja incidencia de efectos secundarios negativos. Actualmente, las opciones de inmuno-estimulantes usados en la acuicultura de peces son limitadas; la mayoría se basa en derivados de patógenos, aceites minerales o mezclas de éstos, que con frecuencia tienen efectos secundarios indeseados [34]. Asimismo, existe poca innovación en el área, con escasos estudios sobre aditivos y adyuvantes con propiedades inmuno-moduladoras en acuicultura; la búsqueda en una importante base de publicaciones (PubMed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) arroja menos de 200 artículos en el tema durante los

últimos 20 años. Entre las opciones de inmuno-estimulantes emergentes se ha propuesto el uso de escualeno, ISCOMs (complejos inmuno-estimulantes, bajo patente Matrix™) y aluminio [34–36], principalmente como adyuvantes de vacunas para peces. En un estudio comparativo de vacunación contra un ciliado (*Philasterides dicentrarchi*) en rodaballo, el uso de Matrix-Q (un ISCOM) e hidróxido de aluminio dieron resultados comparables, con menores daños secundarios que los observados al usar aceite mineral o quitosano (un PAMP); pero en todos los casos se indujo angiogénesis en el área de depósito de la vacuna [35]. Otro estudio reporta que la mezcla de hidróxido de aluminio y escualeno en vacunas contra el Virus de Septicemia Hemorrágica en lenguado (*Paralichthys olivaceus*) no causaría efectos secundarios [36]; sin embargo, una desventaja del escualeno es que se extrae del hígado de tiburones, fuente que no es sustentable. Por su parte, las moléculas del entorno de la MEC aquí propuestas, en especial los colágenos fibrilares, son compuestos de alta disponibilidad; además los estudios con células endoteliales sugieren un potencial inhibitorio de angiogénesis, mientras que acelerarían la reparación de tejidos regulando la actividad de fibroblastos [1,10]. Otros beneficios derivados del uso de fármacos basados en moléculas asociadas a la MEC sería la sustitución, al menos parcial, del uso de sustancias contaminantes o de uso restringido en animales para consumo humano e.g. antibióticos, verde de malaquita, violeta de genciana, etc. disminuyendo el impacto ambiental de la producción acuícola y mejorando la calidad del producto, lo cual tiene además un efecto positivo en la percepción del público consumidor.

Por otra parte, aunque los hallazgos sobre las moléculas asociadas a la MEC y su implicación en la respuesta inmunitaria en peces son prometedores, se debe profundizar los estudios para una mejor comprensión de sus mecanismos de acción. Asimismo, se requieren investigaciones para determinar vías de administración adecuadas para su uso como fármacos en acuicultura, e.g. bioencapsulación, encapsulación para administración oral, levaduras modificadas para producir fragmentos específicos, implantes formadores de micropartículas *in situ*, transfección de genes y dominios funcionales, etc.; campo poco estudiado en peces y organismos acuáticos en general. Otro aspecto importante es el efecto de las condiciones ambientales del cultivo, considerando que numerosas moléculas asociadas a la MEC son activadas por iones específicos (e.g. zinc para las MMPs; calcio, magnesio y manganeso para las ITGs) y que los peces están sometidos a un intercambio iónico constante con su medio; es esperable que la disponibilidad de estos iones en el medio tenga un papel clave en la dinámica del entorno de la MEC y en la actividad de sus moléculas asociadas como moduladoras de la respuesta inmune en peces.

3. Conclusiones y Perspectivas

Los estudios en varias especies de peces de interés en acuicultura demuestran que en estos organismos, al igual que en aves y mamíferos, las moléculas asociadas a la MEC forman parte de la respuesta inmunitaria innata, destacándose la inducción de la expresión y actividad enzimática de MMPs que actúan sobre los colágenos y sus péptidos derivados.

Los colágenos fibrilares aparecen como excelentes candidatos para el desarrollo de inmuno-estimulantes en la acuicultura de peces, por su capacidad de activación de fagocitos profesionales y fibroblastos, los diversos mecanismos viables para la modulación de esta activación y su implicación en la señalización de la respuesta inflamatoria inicial. En peces, las secuencias específicas GFOGER y GLOGEN modulan procesos claves para la reparación de tejidos, como son la adhesión y activación de actividad pro-inflamatoria en fibroblastos de peces.

En conjunto, el presente trabajo resalta: 1) el valor de los conocimientos existentes sobre las moléculas asociadas al entorno de la MEC como fuente potencial de fármacos alternativos; 2) la necesidad de transferir estos conocimientos al desarrollo de nuevos fármacos inspirados en los mecanismos de acción de estas moléculas (como moduladores de la respuesta inmunitaria en peces) y su uso como herramientas biotecnológicas para la mejora de la producción en acuicultura; y 3) la idoneidad de los colágenos fibrilares tipo I, II y III, y los péptidos sintéticos GFOGER y GLOGEN para su uso en pruebas de inmuno-modulación relevantes para la acuicultura de peces, como el siguiente paso en la aplicación de estos conocimientos.

La acuicultura de peces es una actividad de alcance global y en constante crecimiento, lo cual aumenta la incidencia de enfermedades clásicas y emergentes, con las subsecuentes pérdidas de producción y económicas. Superar estos desafíos implica desarrollar tecnologías para la mejora del estado de salud y bienestar de los peces en cultivo. Se espera que el presente trabajo sea un aporte a este desarrollo tecnológico, y que sirva como un enlace entre los conocimientos generados en laboratorio – sobre la relación intrínseca de la MEC con la capacidad inmunitaria de los peces – para generar herramientas que respondan a las necesidades del sector productivo. La innovación hacia tecnologías eficientes de prevención y mitigación en el área de salud animal ayuda a mejorar el rendimiento y reducir costos de producción, lo cual a su vez es un factor clave para alcanzar una soberanía alimentaria a escala regional y global.

Abreviaturas

BSA, albúmina de suero bovino; CCL4, quimioquina (motivo C-C) ligando 4; COL, colágeno; COX, ciclooxigenasa; DAMPs, patrones moleculares

asociados a daño; MEC, matriz extracelular; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético; IL, interleuquina; ITG, integrina; MMP, metaloproteasa de la matriz; PAMPs, patrones moleculares asociados a patógenos; PTGS, prostaglandina 2; ROS, especies intermediarias de oxígeno; TIMP, inhibidor tisular de MMPs; TLR, receptor tipo-Toll.

Agradecimientos

Al proyecto Equatorial Biome & Ocean Acidification – EBIOAc por el apoyo logístico. Al DMV. L. Castillo B. y la Bioq. P. Briceño por su participación en la edición, y al Dr. F. Navarrete-Mier por sus aportaciones y revisión de contenidos del presente manuscrito.

Referencias

- [1] Castillo-Briceño P, Bihan D, Nilges M, Hamaia S, Meseguer J, García-Ayala A, et al. A role for specific collagen motifs during wound healing and inflammatory response of fibroblasts in the teleost fish gilthead seabream. *Mol Immunol*. 2011;48: 826–834. doi:10.1016/j.molimm.2010.12.004
- [2] Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009;326: 1216–1219. doi:10.1126/science.1176009
- [3] Castillo-Briceno P, Kodjabachian L. *Xenopus* embryonic epidermis as a mucociliary cellular ecosystem to assess the effect of sex hormones in a non-reproductive context. *Front Zool*. 2014;11: 9. doi:10.1186/1742-9994-11-9
- [4] Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol*. 2010;341: 126–140. doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.026
- [5] Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8: 221–233. doi:10.1038/nrm2125
- [6] Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2007;117: 2847–2859. doi:10.1172/JCI31008
- [7] Patricia Castillo-Briceño. El colágeno y sus moléculas derivadas como activadores de células fagocíticas en peces y mamíferos. Tesis de Máster, Universidad de Murcia. 2007.
- [8] Castillo-Briceño P. Regulación de la espermatogénesis y respuesta inmunitaria por moléculas de la matriz extracelular en peces teleosteos. España: Universidad de Murcia; 2010.
- [9] Castillo-Briceño P, Sepulcre MP, Chaves-Pozo E, Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V. Collagen

- regulates the activation of professional phagocytes of the teleost fish gilthead seabream. *Mol Immunol.* 2009;46: 1409–1415. doi:10.1016/j.molimm.2008.12.005
- [10] Castillo-Briceño P, Arizcun-Arizcun M, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala A. Correlated expression profile of extracellular matrix-related molecules during the inflammatory response of the teleost fish gilthead seabream. *Dev Comp Immunol.* 2010;34: 1051–1058. doi:10.1016/j.dci.2010.05.007
- [11] Castillo-Briceño P, Cabas I, Arizcun M, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala A. Identification of a $\beta 1$ integrin isoform with restricted tissue expression in a teleost fish. *Reprod Fertil Dev.* 2011;23: 654–664. doi:10.1071/RD10351
- [12] Castillo-Briceño P, Aguila-Martínez S, Liarte S, García Alcázar A, Meseguer J, Mulero V, et al. In situ forming microparticle implants for delivery of sex steroids in fish: Modulation of the immune response of gilthead seabream by testosterone. *Steroids.* 2012;78: 26–33. doi:10.1016/j.steroids.2012.10.013
- [13] Aguila S, Castillo-Briceño P, Sánchez M, Cabas I, García-Alcázar A, Meseguer J, et al. Specific and non-overlapping functions of testosterone and 11-ketotestosterone in the regulation of professional phagocyte responses in the teleost fish gilthead seabream. *Mol Immunol.* 2013;53: 218–226. doi:10.1016/j.molimm.2012.08.002
- [14] Cabas I, Chaves-Pozo E, García-Alcázar A, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala A. The effect of 17 α -ethynylestradiol on steroidogenesis and gonadal cytokine gene expression is related to the reproductive stage in marine hermaphrodite fish. *Mar Drugs.* 2013;11: 4973–4992. doi:10.3390/md11124973
- [15] Chaves-Pozo E, Castillo-Briceño P, García-Alcázar A, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala A. A role for matrix metalloproteinases in granulocyte infiltration and testicular remodeling in a seasonal breeding teleost. *Mol Immunol.* 2008;45: 2820–2830. doi:10.1016/j.molimm.2008.01.031
- [16] Lo JH, Lin C-M, Chen MJ, Chen TT. Altered gene expression patterns of innate and adaptive immunity pathways in transgenic rainbow trout harboring Cecropin P1 transgene. *BMC Genomics.* 2014;15: 887. doi:10.1186/1471-2164-15-887
- [17] Heino J, Huhtala M, Käpylä J, Johnson MS. Evolution of collagen-based adhesion systems. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41: 341–348. doi:10.1016/j.biocel.2008.08.021
- [18] Wess TJ. Collagen Fibril Form and Function. In: Chemistry B-A in P, editor. Academic Press; 2005. pp. 341–374. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065323305700103>
- [19] Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci.* 2005;118: 1341–1353. doi:10.1242/jcs.01731
- [20] Farndale RW, Lisman T, Bihan D, Hamaia S, Smerling CS, Pugh N, et al. Cell-collagen interactions: the use of peptide Toolkits to investigate collagen-receptor interactions. *Biochem Soc Trans.* 2008;36: 241–250. doi:10.1042/BST0360241
- [21] Johnson MS, Lu N, Denessiouk K, Heino J, Gullberg D. Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788: 779–789. doi:10.1016/j.bbamem.2008.12.013
- [22] Zweers MC, Davidson JM, Pozzi A, Hallinger R, Janz K, Quondamatteo F, et al. Integrin $\alpha 2\beta 1$ is required for regulation of murine wound angiogenesis but is dispensable for reepithelialization. *J Invest Dermatol.* 2007;127: 467–478. doi:10.1038/sj.jid.5700546
- [23] Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17: 463–516. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.463
- [24] Gardner J, Ghorpade A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMPed balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system. *J Neurosci Res.* 2003;74: 801–806. doi:10.1002/jnr.10835
- [25] Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002;4: 157–164.
- [26] Madri JA, Graesser D. Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases. *Dev Immunol.* 2000;7: 103–116.
- [27] Morrison CJ, Butler GS, Rodríguez D, Overall CM. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21: 645–653. doi:10.1016/j.ceb.2009.06.006
- [28] Roca FJ. Caracterización de la actividad biológica del factor de necrosis tumoral α de teleosteos. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia. 2009.
- [29] Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 2006;20: 137–151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006
- [30] Sepulcre MP, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J. Characterisation of gilthead seabream acidophilic granulocytes by a monoclonal

- antibody unequivocally points to their involvement in fish phagocytic response. *Cell Tissue Res.* 2002;308: 97–102. doi:10.1007/s00441-002-0531-1
- [31] Pedersen ME, Vuong TT, Rønning SB, Kolset SO. Matrix metalloproteinases in fish biology and matrix turnover. *Matrix Biol.* 2015;44–46: 86–93. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.009
- [32] Fast MD. Fish immune responses to parasitic copepod (namely sea lice) infection. *Dev Comp Immunol.* 2014;43: 300–312. doi:10.1016/j.dci.2013.08.019
- [33] Faílde LD, Losada AP, Bermúdez R, Santos Y, Quiroga MI. *Tenacibaculum maritimum* infection: Pathology and immunohistochemistry in experimentally challenged turbot (*Psetta maxima* L.). *Microb Pathog.* 2013;65: 82–88. doi:10.1016/j.micpath.2013.09.003
- [34] Tafalla C, Bøggwald J, Dalmo RA. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol.* 2013;35: 1740–1750. doi:10.1016/j.fsi.2013.02.029
- [35] Noia M, Domínguez B, Leiro J, Blanco-Méndez J, Luzardo-Álvarez A, Lamas J. Inflammatory responses and side effects generated by several adjuvant-containing vaccines in turbot. *Fish Shellfish Immunol.* 2014;38: 244–254. doi:10.1016/j.fsi.2014.03.020
- [36] Vinay T-N, Kim Y-J, Jung M-H, Kim W-S, Kim D-H, Jung S-J. Inactivated vaccine against viral hemorrhagic septicemia (VHS) emulsified with squalene and aluminum hydroxide adjuvant provides long term protection in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Vaccine.* 2013;31: 4603–4610. doi:10.1016/j.vaccine.2013.07.036