



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**“Deacilsaponina (*Quillaja saponaria*) como agente de absorción del péptido
inmunomodulador hepcidina (Hep20) en la administración oral a trucha
arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).”**

PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
Doctor en Biotecnología

DINA ANGÉLICA BELTRÁN CONTRERAS

Director(a) de Tesis
Dr. Luis Mercado Vianco

Co-Director(a) de Tesis
Dra. Fanny Guzmán Quimbayo

Noviembre, 2025



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): ☐ Memoria o trabajo de título ☒ Tesis de Postgrado

Título del trabajo: "Deacilsaponina (*Quillaja saponaria*) como agente de absorción del péptido inmunomodulador hepcidina (Hep20) en la administración oral a trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)."

Nombre del candidato(a): Dina Angélica Beltrán Contreras

Carrera / Grado: Dra. en Biotecnología

Campus: PUCV, Curauma

Departamento: Biología

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, **Luis mercado Vianco**, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente

DEJO CONSTANCIA que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

☒ El trabajo **NO contiene** información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

☐ El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (**embargo**) por (**marcar una opción**):

☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 2 años ☐ 3 años ☐ 5 años ☐ 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: 2/07/2026

Firma:



Estudiante o Candidato(a):

Fecha: 1/07/2026

Firma:

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

Agradecimientos

Quiero comenzar expresando mi profundo agradecimiento a Dios por las innumerables bendiciones que he recibido a lo largo de este arduo pero gratificante proceso. Su guía y protección han sido mi sostén en cada paso del camino.

A mi amada familia, les dedico un agradecimiento especial. Su apoyo incondicional y su amor inquebrantable han sido mi roca en los momentos más difíciles. Sin ustedes, nada de esto habría sido posible.

A mis queridos amigos, Musu, MJ, Nicolás, Felipe y Tanya, les estoy profundamente agradecido por su constante ánimo en los días de fracaso y por su compañía en los momentos de alegría. Su amistad ha sido un regalo invaluable que atesoro con todo mi corazón.

A mis compañeros de laboratorio, Cristian y Carolina, les agradezco sinceramente por compartir sus conocimientos, por su infinita paciencia y por integrarme de manera tan cálida en este maravilloso equipo. Su colaboración ha sido esencial en mi crecimiento profesional y personal.

Al Dr. Luis Mercado, quiero expresar mi más sincera gratitud por brindarme la oportunidad de crecer y desarrollarme profesionalmente en su laboratorio. Su apoyo constante y su confianza en mi trabajo para llevar a cabo mi tesis y mi pasantía han sido de un valor incalculable.

A mis queridas doctoras Constanza y Johana, les agradezco de todo corazón por su constante apoyo, por sus palabras de aliento y por ser como una segunda familia para mí. Su guía y orientación han sido fundamentales en mi trayectoria académica y personal.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi estimada profesora Fanny, quien para mí es mucho más que una investigadora: es como una segunda madre. Reconozco y valoro profundamente sus innumerables consejos, su constante estímulo para perseverar y su firme convicción de que los errores son parte natural del aprendizaje. Gran parte del éxito de este trabajo se lo debo a su orientación y apoyo incondicional.

La Dr. Fanny es una profesora excepcional que deja una marca indeleble en todos aquellos que tienen el privilegio de pasar por su laboratorio. Su carácter admirable, su valentía, su fortaleza y su inteligencia son cualidades que la hacen destacar como un verdadero modelo a seguir para mí y para muchos otros.

Agradezco sinceramente por creer en mí y por confiar en mis capacidades. Su influencia ha sido fundamental en mi desarrollo académico y personal. Siempre estaré agradecida por su dedicación y compromiso.

COMISIÓN EVALUADORA INTEGRADA POR

DR.: Dr. Sergio Almonacid

DR.: Dr. Raúl Conejeros

DR.: Dr Jurij Wacyk

DR.: Dr. Claudio Álvarez

RESUMEN

La salmonicultura chilena, segunda a nivel mundial, enfrenta el desafío del aumento de patógenos y del uso excesivo de antibióticos, lo que genera impactos ambientales y resistencia microbiana. En este contexto, los péptidos de defensa del huésped (HDPs) surgen como una alternativa sostenible para fortalecer la inmunidad de los peces. Entre ellos, la hepcidina 20 (Hep20), un péptido inmunomodulador derivado de *Oncorhynchus mykiss*, representa un modelo adecuado para estudiar estrategias que optimicen su administración oral. Dado que los péptidos pueden presentar una absorción limitada por degradación digestiva y barreras intestinales, este estudio propone evaluar el uso de la fracción deacilsaponina (Ds), obtenida de hojas de *Quillaja saponaria*, como un coadyuvante natural capaz de mejorar la estabilidad, absorción y efecto inmunomodulador de Hep20 administrado por vía oral.

La fracción Ds fue obtenida mediante extracción acuosa, purificación y posterior hidrólisis alcalina, alcanzando un rendimiento total del 3% de 100 gramos de hojas de quillay y mostrando baja hemólisis ($HD_{50} > 100 \mu M$) y sin citotoxicidad en concentraciones $< 20 \mu M$, validando su seguridad. La combinación Ds/hep20 incrementó el traspaso de hep20 en un 33% en células RTGutGC y promovió una mayor internalización del péptido en células inmunes RTS11. A nivel funcional, DS indujo una exacerbada respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria temprana (*il-1 β* , *tnfa* e *il10*), en contraste de la coadministración se observó una regulación exacerbada de una regulación compensatoria mediada por *il-10*, evidenciando una modulación inmunitaria equilibrada en todos los tiempos evaluados.

En trucha arcoíris juveniles, la inyección de Hep20/Ds estimuló significativamente *il1b* e *il-10* en riñón anterior y bazo, mientras que la administración oral produjo una activación predominante en el riñón anterior, principal órgano hematopoyético en peces. Durante el ensayo oral, se registraron mortalidades en grupos control y tratados individuales, posiblemente por infección oportunista no confirmada, mientras que los peces alimentados con Ds/Hep20 no presentaron mortalidad, sugiriendo un efecto protector.

En conjunto, la fracción Ds de hojas de quillay constituye una fuente sustentable y segura que mejora la biodisponibilidad e inmunoestimulación de Hep20, ofreciendo una alternativa innovadora para fortalecer la salud de peces y reducir el uso de antibióticos en acuicultura.

Palabras clave: Hepcidina 20, deacilsaponina, inmunomodulación, disponibilidad.

ABSTRACT

Chilean salmon farming, the second largest worldwide, faces growing challenges due to the increasing prevalence of pathogens and the excessive use of antibiotics, which leads to environmental impacts and antimicrobial resistance. In this context, host defense peptides (HDPs) have emerged as a sustainable alternative to strengthen fish immunity. Among them, hepcidin 20 (Hep20), an immunomodulatory peptide derived from *Oncorhynchus mykiss*, represents an appropriate model to explore strategies aimed at optimizing its oral delivery. Since peptides often exhibit limited absorption due to digestive degradation and intestinal barriers, this study proposes evaluating the use of the deacylated saponin fraction (Ds), obtained from *Quillaja Saponaria* leaves, as a natural coadjuvant capable of improving the stability, absorption, and immunomodulatory effect of orally administered Hep20.

The Ds fraction was obtained through aqueous extraction, purification, and alkaline hydrolysis, yielding a total of 3% from 100 g of *Quillaja* leaves and displaying low hemolytic activity ($HD_{50} > 100 \mu M$) with no cytotoxicity at concentrations $< 20 \mu M$, supporting its safety. The Ds/Hep20 combination increased Hep20 translocation by 33% in RTGutGC cells and enhanced peptide internalization in RTS11 immune cells. Functionally, the coadministration induced an early pro-inflammatory response (*il-1 β* , *tnfa*), followed by compensatory regulation mediated by *il-10*, demonstrating a balanced immunomodulatory profile across all evaluated time points.

In juvenile rainbow trout, injection of Hep20/Ds significantly stimulated *tnfa* and *il-10* expression in the head kidney and spleen, while oral administration resulted in a predominant activation in the head kidney, the main hematopoietic organ in fish. During the feeding trial, mortalities were recorded in the control and single-treatment groups, possibly due to an opportunistic infection not confirmed, whereas fish fed with Hep20/Ds showed no mortality, suggesting a protective effect.

Overall, the Ds fraction from *Quillaja* leaves represents a sustainable and safe source that enhances the bioavailability and immunostimulatory activity of Hep20, offering an innovative alternative to strengthen fish health and reduce antibiotic use in aquaculture.

Keywords: Hepcidin 20, deacylsaponin, immunomodulation, bioavailability.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INDICE DE FIGURAS	10
INDICE DE TABLAS	11
CAPITULO 1	12
1. INTRODUCCION	12
CAPITULO 2	15
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Panorama productivo y sanitario del cultivo de salmónidos en Chile.....	15
2.2. Péptidos de defensa del huésped (HDPs): Características estructurales y diversidad funcional	17
2.3. Estrategias antimicrobianas e inmunomoduladores de los HDPs para la eliminación de patógenos.....	20
2.4. Péptido Hecpidina: modelo biológico para estudios de inmunoestimulación	22
2.5. Síntesis química y aplicaciones de péptidos derivados de Hecpidina (Hep20)	25
2.6. Vías de incorporación de péptidos bioactivos en peces.....	29
2.7. Saponinas: estructura, función y propiedades bioactivas	31
2.8. Estructura y función de las saponinas	35
2.9. Aplicaciones de saponinas extraída desde quillay.....	38
2.10. Fracción deacilsaponina: propiedades y potencial biotecnológico en acuicultura...	35

2.11. Planteamiento del problema.....	37
2.12. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	38
2.13. OBJETIVOS.....	38
2.14. Estrategia experimental utilizada para el objetivo 1.....	39
2.15. Estrategia experimental utilizada para el objetivo 2.....	40
2.16. Estrategia experimental utilizada para el objetivo 3.....	41
CAPITULO 3.....	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
3.1.MATERIALES.....	42
3.1.1. Material biológico.....	42
3.1.1.1. Material vegetal.....	42
3.1.1.2. Animales de experimentación	42
3.1.1.3. Líneas celulares.....	42
3.1.2. Reactivos.....	43
3.1.2.1. Reactivos utilizados para obtención de la fracción deacilsaponina.....	43
3.1.2.2. Reactivos de Síntesis Química.....	43
3.1.2.3. Medios de Cultivo utilizados para mantenimiento de líneas Celulares.....	43
3.1.2.4. Soluciones y tampones.....	43
3.1.2.5. Anticuerpos.....	43
3.1.2.6. Kits comerciales.....	43
3.1.3 Equipos.....	44
3.2. MÉTODOS.....	45
3.2.1. Extracción de saponinas desde hojas	45
3.2.1.1. Purificación de saponinas	45
3.2.1.2. Hidrolisis alcalina.....	45
3.2. 2. Síntesis química de péptidos	46

3.2.2.1. Síntesis química de péptidos mediante estrategia Fmoc.....	46
3.2.2.2. Preparación de las “bolsas de té”	46
3.2.2.3. Desprotección.....	46
3.2.2.4. Acoples.....	46
3.2.2.5. Clivaje.....	47
3.2.2.6. Purificación de los péptidos.....	47
3.2.2.7. Liofilización de péptidos.....	48
3.2.2.8. Oxidación del péptido Hepcidina	48
3.2.2.9. Caracterización de los péptidos sintetizados	49
3.2.3. Ensayo de Hemólisis.....	50
3.2.4. Mantenimiento de líneas celulares.....	51
3.2.4.1 Línea celular RTS11.....	51
3.2.4.2. Línea celular RTGutGC.....	51
3.2.5. Ensayo de Viabilidad en la línea Celular RTS11.....	51
3.2.6 Ensayo de citotoxicidad en la línea Celular RTGutGC.....	52
3.2.7 Traspaso de Hep20 en presencia de DS por la monocapa RTGutGC	52
3.2.8. Detección de Hep20 mediante inmunofluorescencia en las líneas celulares RTS11 y RTGutGC.....	53
3.2.9. Estimulación de la línea RTS11 con la combinación Hep20/Ds.....	54
3.2.9.1. Extracción ARN.....	54
3.2.9.2. Síntesis de cadena completaría de ADN (ADNc).....	54
3.2.9.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	55
3.2.10. Coadministración de Ds/hep20 vía inyección intraperitoneal en trucha arcoíris	56
3.2.10.1. Homogenización y extracción de RNA desde muestras de órganos de trucha ar- coíris (Método Trizol).....	56

3.2.11. Efecto en modulación trucha arcoíris alimentado con dieta suplementada con la coadministración Ds/hep20	57
3.2.11.1. Formulación de la dieta.....	57
3.2.11.2. Administración de la combinación Hep20/Ds.....	58
3.2.11.3. Homogenización y extracción de ARN desde muestras de órganos de trucha arcoíris (método kit E.Z.N.A).....	58
3.2.12. Análisis estadístico.....	59
CAPITULO 4	60
4. RESULTADOS	60
4.1. Caracterización de la fracción deacilsaponina desde hojas de quillay.....	60
4.2. Síntesis en fase sólida y caracterización por HPLC/MS del péptido Hecidina 20 de trucha arcoíris	63
4.3. Optimización de la dosis de deacilsaponina mediante ensayos de hemólisis y citotoxicidad	65
4.3.1. Actividad Hemolítica.....	65
4.3.2. Ensayo citotóxico.....	66
4.4. Diponinibilidad <i>in vitro</i> de la hep20 mediada por deacilsaponina.....	67
4.4. 1. Ensayo de traspaso de hep20 en la línea celular RTGutGC.....	67
4.5. Cinética de internalización de hepcidina 20 en células RTGutGC y RTS11 en presencia de deacilsaponina.....	70
4.6. Efecto inmunomodulador de la hepcidina 20 en presencia de deacilsaponina en la línea celular RTS11: Análisis de la expresión de citoquinas.....	74
4.7. Evaluación del perfil de expresión de citoquinas en trucha arcoíris bazo y riñón cefálico inyectada intraperitoneal con Hep 20 en ausencia y presencia de deacilsaponina...76	76
4.7. Supervivencia y perfil de expresión de citoquinas en el bazo y riñón de trucha arcoíris con la administración de Hep20/Ds en dieta.....	76
4.8. Evaluación del perfil de expresión de citoquinas en trucha arcoíris bazo y riñón cefálico alimentada con dieta suplementada con Hep20 en ausencia y presencia de deacilsaponina.....	78

4.9. Supervivencia de peces alimentada con dieta suplementada con Hepcidina20 en ausencia y presencia de deacilsaponina.

CAPITULO 5.....83

5. DISCUSION73

5.1. Producción sustentable de la fracción deacilsaponina desde hojas de Qui-lay.....83

5.2. 5.1. Interacción del grupo acilo con la membrana y toxicidad de saponinas aciladas versus deaciladas85

5.3. Aumento de la disponibilidad y captación celular de Hep20 mediado por la fracción Ds.....88

5.4. Acción sinérgica de la fracción Ds sobre la respuesta inmunomodulador inducida por Hep20 en la línea monocítica (RTS11).....90

5.5. Efecto potenciador de Ds sobre la actividad inmunomodulador de Hep20 en administraciones oral e inyectable.....93

5.6. Efecto protector de la combinación Hep20/Ds en ensayos *in vivo*.....96

CAPITULO 6.....97

CONCLUSION98

NOMENCLATURA99

REFERENCIAS101

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Antimicrobianos utilizado por la industria salmonera durante el periodo del 2007-2023.....	12
Figura 2.1. Clasificación de los péptidos de defensa del huésped (HDPs)	18
Figura 2.2. Estructuras comunes de los HDPs	19
Figura 2.3 Modelos de mecanismos antimicrobiano de los HDPs	20
Figura 2.4. Mecanismos de los péptidos HDPs.....	21
Figura 2.5. Representación esquemática del procesamiento de Hepsidina.....	22
Figura 2.6. Estructura molecular de la hepsidina 25.....	23
Figura 2.7. Perfil de expresión de ARNm de citoquinas en la línea celular RTS11.....	26
Figura 2.8. Perfil proteico de citoquinas IL-1 β , TNF α e IL-10 en células RTS11 después de 24 h después del tratamiento con Hep20.....	27
Figura 2.9. Perfil de expresión de ARNm de citoquinas riñón cefálico de lubina europea post-inyección intraperitoneal de Hep20.....	28
Figura 2.10. Perfil de expresión de ARNm de citoquinas del bazo de lubina europea post-inyección intraperitoneal de Hep20.....	30
Figura 2.11. Estructura general de saponinas proveniente de <i>Quilaje saponaria</i>	31
Figura 2.12. Modelos de mecanismos de interacción saponina con la membrana.....	37
Figura 2.13. Esquema de estrategia experimental para el objetivo general 1.....	42
Figura 2.14. Esquema de Estrategia experimental para el objetivo general 2.....	43
Figura 4.1. Análisis cromatográfico de la purificación y caracterización de deacilsaponina de hojas.....	62
Figura 4.2. Cromatogramas RP-HPLC comparativos del péptido Hepsidina-20 de trucha arcoíris en su forma reducida y oxidada.....	64
Figura 4.3. Espectros de Masas (MS) del Péptido Hepsidina 20.....	64
Figura 4.4. Actividad hemolítica y determinación del HD 50.....	65
Figura 4.5. Evaluación de la citotoxicidad de deacilsaponina y la coadministración de deacilsaponina más hepsidina 20 en líneas celulares de trucha arcoíris.....	67

Figura 4.6. Evaluación del flujo Transepitelial de hep20 potenciado por deacilsaponina en monocapa celulares y validación microscópica de la formación y estado de la monocapa tras las 24 horas	69
Figura 4.7. Evaluación por inmunofluorescencia de la localización celular de hep20 en presencia y ausencia de deacilsaponina a lo largo del tiempo.....	71
Figura 4.8. Evaluación por inmunofluorescencia de la localización celular del hep20 en presencia y Ausencia de DS a lo largo del tiempo (RTS11)	73
Figura 4.9. Modulación de la expresión génica de citoquinas por hep20, Ds y coadministración de hep20 con Ds en células monocito/macrófago RTS11.....	75
Figura 4.10. Expresión génica de citoquinas en riñón cefálico de trucha arcoíris juvenil tras inyección intraperitoneal de hep20	77
Figura 4.11. Expresión génica de citoquinas en riñón cefálico de trucha arcoíris juvenil tras inyección intraperitoneal de hep 20	78
Figura 4.12. Expresión génica de citoquinas en riñón cefálico de trucha arcoíris juvenil tras administración oral de hep 20	79
Figura 4.13. Expresión génica de citoquinas en Bazo de trucha arcoíris juvenil administración oral hep 20.....	80

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Rangos de hemólisis y citotoxicidad reportados para saponinas de <i>Quillaja saponaria</i>	34
Tabla 3.1. Partidores utilizados para evaluar citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias.....	55
Tabla 3.2. Formulación de dietas.....	57
Tabla 4.1 Rendimiento de obtención de la fracción deacilsaponina desde hojas de <i>Quillaja saponaria</i>	60

CAPITULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La salmonicultura chilena se ha consolidado como un sector clave en la economía nacional, con una cosecha que superó las 1.080.915 toneladas en 2023 (SERNAPESCA, 2024). Dentro de esta industria, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es una especie de cultivo estratégico para Chile, posicionándose consistentemente entre los principales productores mundiales (Pepe-Victoriano., *et al* 2024). Este desarrollo intensivo, caracterizado por sistemas de cultivo de alta densidad, ha incrementado la vulnerabilidad de los peces a la proliferación de patógenos. Esto resulta en pérdidas económicas multimillonarias, impulsadas especialmente por enfermedades infecciosas como la piscirickettsiosis (SRS), la cual sigue siendo una de las principales causas de mortalidad en salmónidos cultivados, afectando al 38,8% de las muertes en trucha arcoíris en 2024 (SERNAPESCA, 2024). Históricamente, el control de estas infecciones se ha basado en la aplicación masiva de antibióticos (Figura 1.1). Sin embargo, esta práctica ha generado un problema de salud pública y ecológica de escala global, promoviendo la resistencia antimicrobiana y la contaminación ambiental (Chen *et al.*, 2020). Por consiguiente, existe una necesidad urgente de implementar estrategias terapéuticas y profilácticas que sean a la vez altamente efectivas, sostenibles y respetuosas con el medio ambiente acuático.

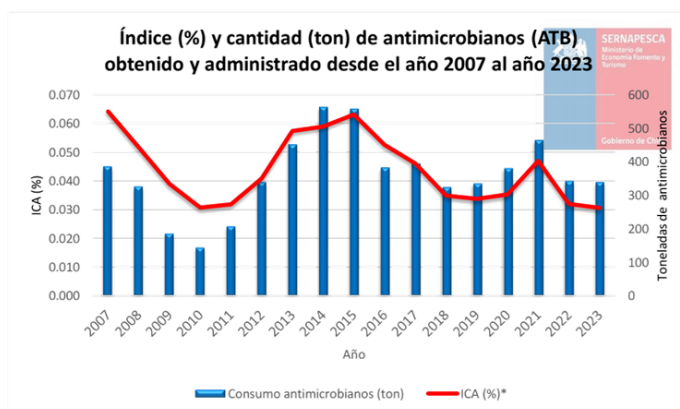


Figura 1.1. Antimicrobianos utilizado por la industria salmonera durante el periodo del 2007-2023. Índice de consumo de antimicrobianos (ICA) (porcentual) y cantidad (tonelada) (Serna pesca b. 2023).

Frente a las limitaciones impuestas por el uso de antibióticos y la eficacia variable de otras estrategias profilácticas y terapéuticas (como vacunas y otros inmunoestimulantes) contra patologías persistentes como el SRS (Figuerola *et al.*, 2020; Thorarinsson *et al.*, 2021), la investigación actual se ha reorientado hacia el potenciamiento intrínseco de la inmunidad de los peces. Los

péptidos antimicrobianos (HDPs) han emergido como una alternativa biológica prometedora (Drayton *et al.*, 2021). Estas moléculas endógenas actúan como la primera línea de defensa de los teleósteos, exhibiendo una acción dual que incluye la lisis directa de patógenos y una potente actividad inmunomoduladora capaz de orquestar las respuestas inmunes (Valero *et al.*, 2020; Hancock *et al.*, 2022; Asensio-Calavia *et al.*, 2023; Elgendy *et al.*, 2024). Dentro de esta familia de moléculas, la Hecpidina 20 (Hep20), una isoforma de hepcidina derivada de la trucha arcoíris, se ha destacado por su robusta actividad antimicrobiana e inmunomoduladora *in vitro* e *in vivo* (Liu *et al.*, 2022; Álvarez *et al.*, 2022; Jin *et al.*, 2023:). Por su perfil, Hep20 constituye un candidato idóneo para la formulación de inmunoestimulantes que fortalezcan la resiliencia sanitaria en el cultivo de salmónidos. El potencial inmunomodulador de Hep20 ha sido validado mediante ensayos de administración directa. Diversos estudios han administrado el péptido sintético tanto por inyección intraperitoneal como por vía oral en modelos de peces para evaluar sus efectos *in vivo*, confirmando su capacidad para modular la expresión de citoquinas clave en tejidos inmunes como el riñón anterior y el bazo (Álvarez *et al.*, 2022)

Esta comprobación experimental establece una base sólida para su uso terapéutico. En el contexto de la salmonicultura intensiva, siendo la administración oral de inmunoestimulantes el método preferido debido a su viabilidad económica, escalabilidad y a la reducción del estrés en los peces, lo que la convierte en la única vía práctica para el control sanitario a gran escala.

Sin embargo, la aplicación efectiva de estos compuestos en condiciones reales se ve críticamente limitada, ya que la eficacia de los péptidos administrados por vía oral se ve comprometida por su baja biodisponibilidad, producto de la rápida degradación enzimática en el intestino y de la escasa permeabilidad a través de la barrera intestinal (Chettri *et al.*, 2017; Embregts *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2021; Masloh *et al.*, 2023). Para contrarrestar esta degradación intestinal, se han empleado estrategias protectoras como la encapsulación.

En este ámbito, Hecpidina 20 ha sido incorporada exitosamente en dietas orales para salmo salar en dosis de 150 y 300 µg/kg de pez. La dieta suplementada con 300 µg/kg mostró una mayor modulación en la expresión de las citoquinas *il-1β* e *il-10*, genes fundamentales en la activación y regulación de la respuesta inmune (Mercado *et al.*, 2017; Proyecto FIE-2015-V014). Estos resultados confirman que hepcidina 20 puede ser administrada eficazmente por vía oral, constituyendo un compuesto inmunoactivo con potencial para optimizar estrategias de administración oral en peces. Su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria equilibrada la posiciona como un candidato prometedor en el desarrollo de dietas funcionales e inmunoestimulantes, orientadas a fortalecer la salud de peces en sistemas de cultivo intensivo.

La incorporación de compuestos bioactivos en dietas orales constituye una estrategia altamente prometedora, no obstante, la eficacia de estos compuestos depende directamente de su estabilidad y capacidad de absorción intestinal, procesos condicionados por la estructura de la mucosa intestinal y por las propiedades de permeabilidad y transporte del epitelio, que limitan el paso de moléculas bioactivas de mayor tamaño o naturaleza hidrofílica (Chettri *et al.*, 2017). En este contexto, el uso de saponinas hidrolizadas, en particular deacilsaponinas obtenidas desde hojas de Quillaja saponaria (quillay), se presenta como una alternativa biotecnológica innovadora y ambientalmente responsable. A diferencia de la extracción tradicional desde corteza que genera una presión significativa sobre el bosque nativo las hojas constituyen una biomasa renovable y de recolección no destructiva, lo que permite obtener fracciones bioactivas sin comprometer la integridad del árbol ni la sostenibilidad del ecosistema (Schlotterbeck *et al.*, 2015).

Las saponinas y sus derivados presentan una estructura anfipática que les confiere la capacidad de interactuar de manera reversible con los lípidos de las membranas celulares. Esta interacción favorece la formación de microporos transitorios que incrementan la permeabilidad del epitelio intestinal sin comprometer su integridad estructural ni la viabilidad celular. En peces teleósteos, diversos estudios han demostrado que la inclusión de saponinas en la dieta puede modificar las propiedades de la barrera intestinal, aumentando la permeabilidad del epitelio y facilitando el transporte de nutrientes y biomoléculas a través de la mucosa intestinal (Knudsen, 2008; Krogh, 2015). Este efecto se ha asociado principalmente a la interacción de las saponinas con el colesterol presente en las membranas epiteliales, lo que induce cambios temporales en la organización lipídica y en la función de las uniones intercelulares.

En este contexto, el uso de deacilsaponinas surge como una estrategia prometedora para potenciar la absorción intestinal de péptidos bioactivos administrados por vía oral. A diferencia de otras aproximaciones tecnológicas, estos compuestos conservan propiedades fisicoquímicas que permiten modular la permeabilidad intestinal de forma controlada y reversible. Estudios recientes han evidenciado que la suplementación dietaria con saponinas puede influir en la morfología intestinal y en los procesos de absorción de nutrientes en distintas especies de peces cultivados, reforzando su potencial como agentes promotores de absorción intestinal (Wang *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023; Yin *et al.*, 2023). En conjunto, estos antecedentes respaldan el empleo de deacilsaponinas como una herramienta funcional para mejorar la biodisponibilidad oral de péptidos inmunoactivos en sistemas acuícolas.

Sin embargo, el uso de saponinas en la alimentación de peces representa un desafío debido a su potencial toxicidad a altas concentraciones (Liao *et al.*, 2021). Aun así, estudios en mamíferos han demostrado que ciertas fracciones purificadas, como DS-1 una deacilsaponina obtenida por

hidrólisis de la fracción QS-21, una saponina triterpenoide presente en Quillaja saponaria presentan baja toxicidad y alta eficacia como agentes permeabilizantes (Guerra *et al.*, 2020). DS-1 ha mostrado incrementar significativamente la absorción de fármacos administrados por vías nasal, ocular y oral en modelos de mamíferos (Chuke *et al.*, 1976; Oakenfull *et al.*, 1979; Zheng *et al.*, 2022).

Hasta la fecha, no se han reportado estudios sobre el uso de deacilsaponinas en peces, lo que abre una línea de investigación completamente innovadora. En este contexto, el presente trabajo busca desarrollar un sistema eficiente, sustentable y económicamente viable, capaz de maximizar la biodisponibilidad del péptido y garantizar que cada dosis administrada ejerza su efecto.

CAPITULO 2

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. Panorama productivo y sanitario del cultivo de salmónidos en Chile

La salmonicultura chilena se ha consolidado como uno de los pilares de la economía nacional y como el segundo mayor productor mundial de salmónidos, después de Noruega (FAO, 2023). En 2023, Chile alcanzó una producción de 1,08 millones de toneladas, lo que representó un incremento del 6% respecto al año anterior y generó exportaciones superiores a US\$ 6.000 millones, equivalentes al 10% de las exportaciones totales del país (SERNAPESCA, 2024; Salmon-Chile, 2024). Entre las especies cultivadas, el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) representa aproximadamente el 74% de la producción nacional, seguido del salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) con un 17% y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con cerca del 8% (Lorena *et al.*, 2020; Bachmann-Vargas *et al.*, 2021). A pesar de su menor participación, *O. mykiss* mantiene una alta relevancia por su adaptabilidad, rápido crecimiento y valor agregado en mercados internacionales, posicionando a Chile como uno de los principales exportadores mundiales de esta especie (FAO, 2023). Sin embargo, el desarrollo intensivo de la industria salmonera ha traído consigo importantes desafíos sanitarios, siendo las enfermedades infecciosas uno de los principales factores que limitan la productividad y sostenibilidad del sector. En los últimos años, la mortalidad asociada a infecciones bacterianas, virales y parasitarias ha representado más del 60% de las pérdidas productivas en centros de cultivo del sur de Chile (SERNAPESCA, 2024). Estas patologías generan efectos acumulativos que incluyen reducción del crecimiento, aumento en los costos operacionales, deterioro del bienestar animal y pérdidas económicas que superan

los US\$ 800 millones anuales (SalmonChile, 2023). Este escenario evidencia la vulnerabilidad sanitaria del sistema productivo actual.

Históricamente el manejo de enfermedades infecciosas en la salmonicultura chilena ha dependido del uso intensivo de antibióticos, particularmente frente a patologías bacterianas recurrentes. Chile concentra más del 90% del uso total de antimicrobianos reportado por la industria salmonera mundial, empleando principalmente florfenicol y oxitetraciclina (SERNAPESCA, 2023). Aunque esta práctica ha contribuido a controlar brotes agudos, su efectividad frente a infecciones crónicas es limitada, y su aplicación prolongada ha derivado en consecuencias sanitarias y ambientales significativas.

En este contexto, la industria enfrenta el desafío de mantener la competitividad productiva sin comprometer la sostenibilidad ambiental ni la salud pública, lo que ha impulsado la búsqueda y desarrollo de estrategias terapéuticas y profilácticas alternativas, basadas en mecanismos naturales de defensa y estimulación inmunitaria en los peces.

La vacunación se ha consolidado como la herramienta profiláctica más utilizada en la industria salmonera (Portigo *et al.*, 2021). Sin embargo, su efectividad ha sido variable, particularmente en enfermedades de curso crónico como el SRS, donde la protección conferida por las vacunas comerciales no ha logrado erradicar la enfermedad ni disminuir significativamente las pérdidas (Figueroa *et al.*, 2020; Thorarinsson *et al.*, 2021).

En este contexto, se han desarrollado e investigado estrategias complementarias, como el uso de inmunoestimulantes (β -glucanos, extractos vegetales, nucleótidos, levaduras), que buscan potenciar la inmunidad innata de los peces (Porter *et al.*, 2023). Si bien estos compuestos naturales son menos invasivos, su eficacia depende de factores como la especie, la dosis, la formulación y la vía de administración (Barbosa *et al.*, 2023). Asimismo, el uso de probióticos y prebióticos ha mostrado efectos beneficiosos sobre el microbiota intestinal y la respuesta inmune local, aunque su implementación comercial enfrenta restricciones regulatorias (Jankovic *et al.*, 2010; Elgendy *et al.*, 2024).

Los suplementos dietarios funcionales también se han propuesto como herramientas de apoyo, contribuyendo a la mejora del estado fisiológico general, aunque su acción es principalmente preventiva y requiere de mayor evidencia experimental para validar su aplicación terapéutica (Elgendy *et al.*, 2024). A pesar de los avances, los resultados obtenidos con estas estrategias han sido insuficientes para controlar de manera efectiva patologías persistentes. Por ello, la búsqueda de soluciones innovadoras continúa siendo una prioridad científica y productiva.

En este escenario, los péptidos de defensa del huésped (HDPs) han emergido como una alternativa prometedora, dado su papel clave en la inmunidad innata de los peces teleósteos. Estas moléculas endógenas actúan como la primera línea de defensa frente a patógenos bacterianos y virales, combinando funciones antimicrobianas e inmunomoduladoras que las posicionan como candidatos de alto potencial para el desarrollo de inmunoestimulantes orales sostenibles (Valero *et al.*, 2020; Bhat *et al.*, 2022;).

2.2. Péptidos de defensa del huésped (HDPs): Características estructurales y diversidad funcional

El sistema inmunitario de los peces teleósteos presenta una notable plasticidad, que les permite responder eficazmente frente a la diversidad de patógenos presentes en el medio acuático. A diferencia de los mamíferos, su inmunidad adaptativa es más lenta y menos específica, por lo que la inmunidad innata cumple un papel central como primera línea de defensa frente a las infecciones (Magnadóttir, 2010). Esta respuesta innata involucra barreras físicas, células fagocíticas y moléculas efectoras (Salinas, 2015), entre las que destacan las citoquinas, las lisozimas y, particularmente, los péptidos antimicrobianos, actualmente denominados péptidos de defensa del huésped (HDPs) (Katzenback, 2015). El cambio de nomenclatura de “péptidos antimicrobianos” a “péptidos de defensa del huésped” refleja una comprensión más amplia de su función biológica. Originalmente se les atribuyó una acción microbicida directa; sin embargo, hoy se reconoce su papel multifuncional como moduladores de la respuesta inmune, participando en procesos de señalización celular, regulación inflamatoria y reparación tisular (Hancock & Sahl, 2006; Mansour *et al.*, 2014).

Los HDPs constituyen componentes bioactivos esenciales de la inmunidad innata en una amplia variedad de organismos (Figura 2.1) como, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Drayton *et al.*, 2021). En los peces, estos péptidos actúan como una barrera química de amplio espectro frente a bacterias, virus y hongos, desempeñando un doble rol: como efectores antimicrobianos directos y como reguladores inmunológicos que contribuyen a mantener la homeostasis frente a los desafíos infecciosos (Huan *et al.*, 2020; Johnstone *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021).

Estas moléculas se agrupan en distintas familias estructurales y funcionales, entre las que destacan las defensinas, catelicidinas, piscidinas (exclusivas de peces) y hepcidina (Drayton *et al.*, 2021). A pesar de su diversidad, todas ellas comparten motivos conservados de aminoácidos, lo que refleja

su importancia evolutiva y su papel fundamental en la defensa del hospedador (Masso-Silva & Diamond, 2014; Drayton et al., 2021).

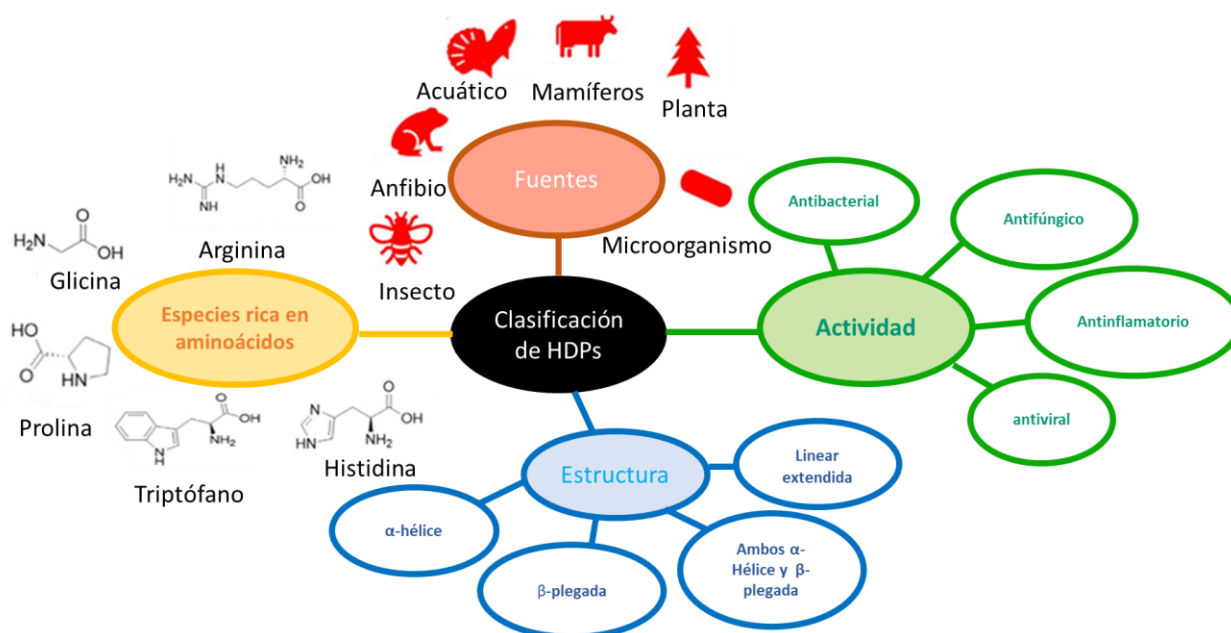


Figura 2.1. Clasificación de los péptidos de defensa del huésped (HDPs) según su origen biológico, tipo de actividad, estructura secundaria y composición en residuos característicos. Modificada de Huan et al. (2020).

Desde un punto de vista estructural, los HDPs son péptidos relativamente cortos, formados por 12 a 50 aminoácidos. En la mayoría de los casos presentan una carga neta positiva que oscila entre +1 y +2, atribuida a la abundancia de residuos básicos como lisina, arginina y triptófano (Drayton *et al.*, 2021). No obstante, también se han identificado péptidos aniónicos (−1 a −7) y neutros, cuya existencia evidencia la amplia diversidad funcional dentro de esta familia (Wang *et al.*, 2019).

Estos péptidos contienen una alta proporción de residuos hidrofóbicos (aproximadamente 40–50%), característica que les confiere solubilidad en medios acuosos y facilita su interacción con membranas biológicas (Wang, 2023). Su naturaleza anfipática resultado del balance entre regiones hidrofóbicas e hidrofílicas está estrechamente vinculada a su conformación estructural (Huang & Li, 2023).

De acuerdo con su estructura secundaria predominante, los HDPs pueden clasificarse en diversas configuraciones estructurales (Figura 2.1), entre las que se incluyen las α -hélices, las β -láminas, las estructuras extendidas y los bucles (Kumar *et al.*, 2020).

- **Péptidos con estructuras α -helicoidales (α):** No mantienen una estructura definida en solución, pero muestran un comportamiento anfipático al interactuar con membranas biológicas. Ejemplo: catelicidinas o las piscidinas.
- **Péptidos con estructuras Hojas β (β):** Están estabilizadas por puentes disulfuros. Esta característica les permite organizarse en moléculas anfipáticas, lo que los mantiene organizado en solución. Ejemplo: hepcidina y defensinas.
- **Péptidos con estructuras extendida:** corresponden a aquellos que no adoptan una estructura secundaria ordenada estable en solución acuosa; pueden contener un alto número de residuos de prolina, histidina, arginina y triptófano; y suelen adquirir una estructura definida cuando están en contacto con membrana biológicas.

En resumen, la estructura y estabilidad conformacional de los HDPs determinan su función biológica y su capacidad para interactuar con membranas celulares. Estas moléculas, presentes en una amplia variedad de organismos, han evolucionado para cumplir funciones tanto antimicrobianas como inmunomoduladoras. Su versatilidad estructural y funcional las convierte en biomoléculas con gran potencial para el desarrollo de aplicaciones terapéuticas innovadoras, especialmente en el fortalecimiento de la salud y la resistencia frente a infecciones.

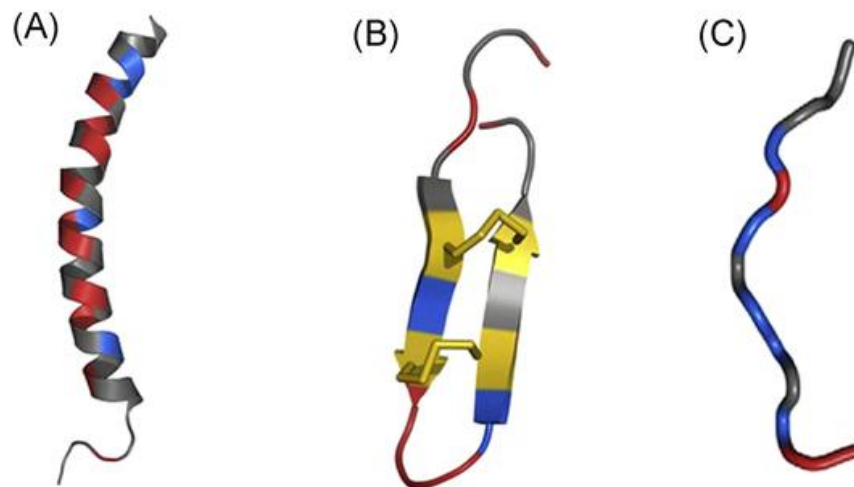


Figura 2.2. Estructuras comunes de los HDPs: A: Hélice α ; B: Lámina β ; y C: Estructuras extendidas (Wang *et al.*, 2019).

2.3. Estrategias antimicrobianas e inmunomoduladores de los HDPs para la eliminación de patógenos

Los HDPs presentan dos mecanismos principales de acción: actividad antimicrobiana directa e inmunomodulación.

1. **Actividad antimicrobiana:** Los HDPs eliminan patógenos alterando la integridad de sus membranas celulares (figura 2.3), mediante interacciones electrostáticas entre sus residuos cargados positivamente (lisina, arginina, triptófano) y los fosfolípidos aniónicos de la membrana bacteriana (Drayton *et al.*, 2021; Pirtskhalava *et al.*, 2021). Esta interacción genera despolarización y formación de poros, provocando la pérdida del control osmótico y la lisis celular (Mahlapuu *et al.*, 2016). Además, algunos HDPs pueden atravesar la membrana e interferir con procesos intracelulares esenciales como la síntesis de ADN, ARN y proteínas, o la formación de la pared celular, bloqueando así la replicación y el crecimiento microbiano (Kumar *et al.*, 2018; Haney *et al.*, 2019).

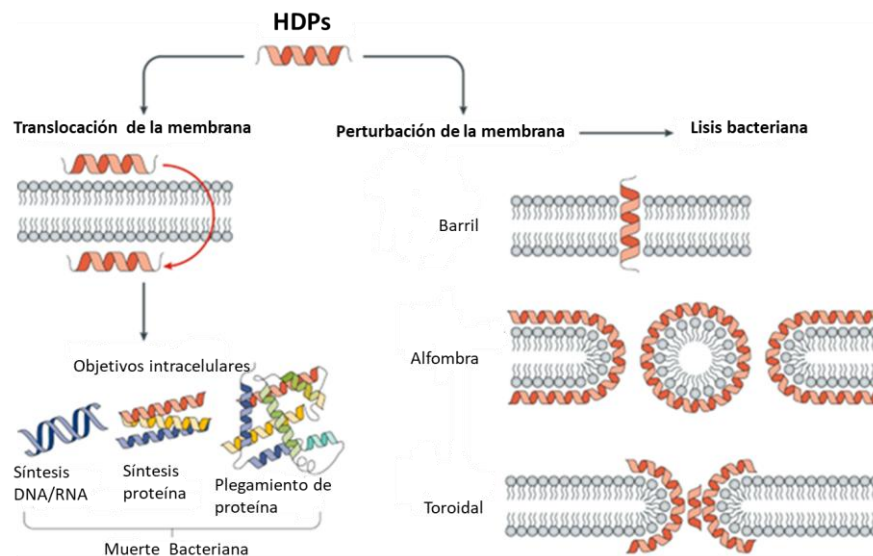


Figura 2.3 Modelos de mecanismos antimicrobiano de los HDPs: Interacción de los péptidos con la membrana bacterianas. A la izquierda, se representa la entrada directa del péptido al citoplasma mediante translocación y su posterior acción sobre blancos intracelulares. A la derecha, se ilustran los mecanismos clásicos de perturbación de membrana, incluyendo la formación de poros toroidales, poros de tipo barril y desestabilización superficial de la bicapa. Estos mecanismos, dependientes de la estructura anfipática del péptido y de la organización lipídica de la

membrana, determinan tanto su actividad biológica como su potencial para modular respuestas celulares. modificado de Mookherjee *et al.*, (2020)

2. Actividad inmunomoduladora: Los HDPs también regulan la respuesta inmune del hospedador mediante la activación de diversas células inmunitarias como macrófagos, neutrófilos y células T, promoviendo la liberación de citoquinas y quimioquinas que coordinan la inflamación (Pirtskhalava *et al.*, 2021) uniéndose a receptores específicos localizados en la membrana celular, como FPR2 (receptor acoplado a proteína G), P2X7 (canal iónico activado por ATP) y EGFR (receptor tirosina quinasa), entre otros, a través de los receptores pueden activar distintas rutas de señalización intracelular (NF- κ B, MAPK, PI3K/Akt y STAT3) que controlan la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias (Mookherjee *et al.*, 2006; Prantner *et al.*, 2017; Zhang, *et al.* 2021; Kim *et al.*, 2023). Durante las etapas tempranas de infección, los HDPs estimulan mediadores proinflamatorios como *il-1 β* , *tnf- α* e *il-6*, que facilitan el reclutamiento de células inmunes. Posteriormente, inducen la expresión de citoquinas antiinflamatorias como *il-10*, promoviendo la resolución del proceso inflamatorio y la reparación tisular (Merkle *et al.*, 2015). Sin embargo, no todos los HDPs actúan mediante estos mecanismos, ya que su modo de acción puede variar considerablemente según su estructura, origen y tipo celular involucrado. En algunos casos, los receptores o vías específicas a través de los cuales ejercen sus efectos inmunomoduladores aún no han sido completamente caracterizados, lo que refleja la complejidad y diversidad funcional de estos péptidos.

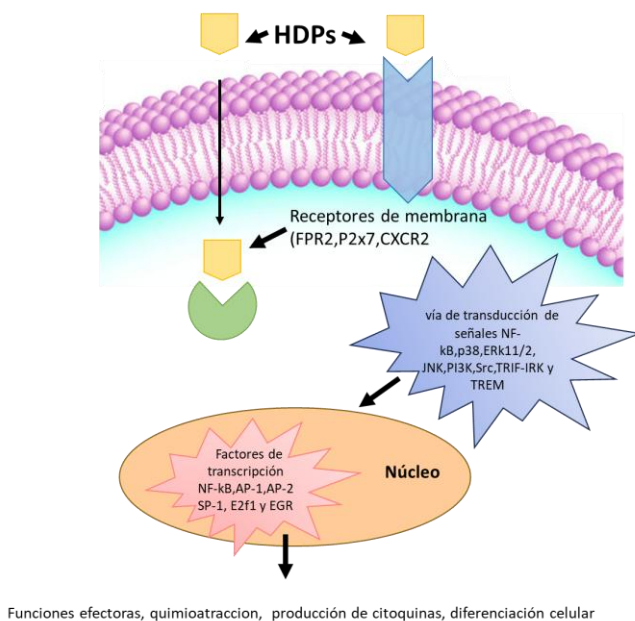


Figura 2.4. Posibles mecanismos de los péptidos de defensa del huésped (HDPs). Modelo esquemático de la activación de receptores de membrana y vías de señalización asociadas. La figura muestra la interacción de péptidos o ligandos con receptores de membrana como FPR2, P2X7 y CXCR2, lo que desencadena la activación de múltiples rutas de transducción de señales, incluyendo NF- κ B, p38, ERK1/2, JNK, PIK, Src, TRIF-IRF y TREM. La activación de estas cascadas conduce a la translocación de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, AP-2, SP-1, E2F1 y EGR hacia el núcleo, donde regulan la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, inmunomodulación y procesos de defensa celular imagen modificada Hilchie *et al.*, (2013)

Los mecanismos utilizados por los péptidos de defensa del huésped (HDPs) son esenciales para la eliminación de patógenos, haciéndolos componentes clave de la inmunidad innata en una amplia variedad de organismos. Entre estos péptidos, la hepcidina destaca por su particular versatilidad funcional, combinando propiedades antimicrobianas, inmunorreguladoras en diferentes organismos (Álvarez *et al.*, 2016; Shirdel *et al.*, 2019; Ghodsi *et al.*, 2020; Barroso *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022; Jin *et al.*, 2023)

2.4. Péptido Hepcidina: modelo biológico para estudios de inmunoestimulación

La Hepcidina es un péptido sintetizado en el hígado, que fue aislado por primera vez de la sangre y la orina humana (Krause *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001a; Ghodsi *et al.*, 2020). inicialmente denominado como LEAP-1 (Péptido antimicrobiano expresado en el hígado) debido a su actividad antimicrobiana. Sin embargo, se renombró como "hepcidina," donde "hep-" se refiere al hígado, su sitio principal de síntesis en los hepatocitos, y "-cidina" alude a sus propiedades antimicrobianas (Malera, 2018).

La hepcidina es generada en forma de preprohepcidina, una molécula compuesta por 84 aminoácidos, que luego se transforma en prohepcidina, que tiene 60 aminoácidos. Por la acción de las enzimas furina y alfa-1 antitripsina convertasa, la prohepcidina se convierte en hepcidina-25, que es la forma madura y activa biológicamente (Figura 2.5) (Rauf *et al.*, 2020).

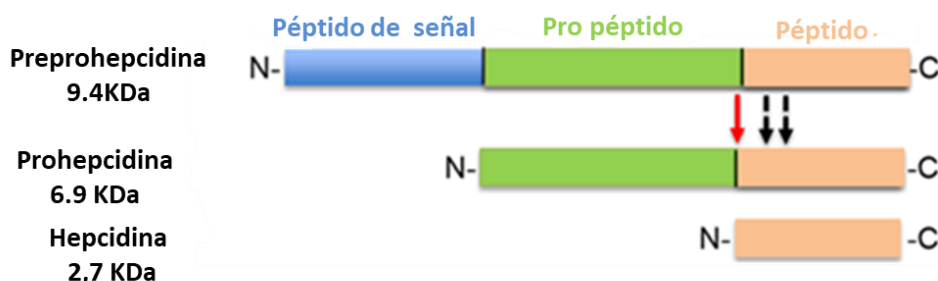


Figura 2.5. Representación esquemática del procesamiento de Hepcidina. preprohepcidina se escinde y libera su péptido de señal, dando origen a prohepcidina. Luego a través de furina convertasa (flecha

roja) da lugar al péptido maduro Hepcidina 25 el cual puede cortarse nuevamente y producir las isoformas 20 y 22. Modificada de Malerba *et al.*, (2018)

Hepcidina 25 (Hep25) puede sufrir procesos adicionales que generan dos isoformas truncadas en el extremo amino-terminal: Hepcidina 22 (Hep22) y Hepcidina 20 (Hep20) (Ilkowska *et al.*, 2016). Esta última se distingue de Hep25 por la ausencia del motivo amino-terminal ATCUN (Amino-Terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding motif), responsable de la unión específica a iones metálicos como cobre (Cu^{2+}) y níquel (Ni^{2+}), los cuales participan en su función biológica y estabilidad estructural (Subha *et al.*, 2013). A pesar de esta diferencia, ambas isoformas mantienen una conformación que presenta aproximadamente un 32 % de láminas β y una estructura tipo horquilla β estabilizada por cuatro puentes disulfuro formados entre ocho residuos de cisteína (Rauf *et al.*, 2020; Campostrini *et al.*, 2012; Kemna *et al.*, 2008). Estas características estructurales son esenciales para conservar la actividad antimicrobiana y la capacidad de regulación del metabolismo del hierro propias de la hepcidina.

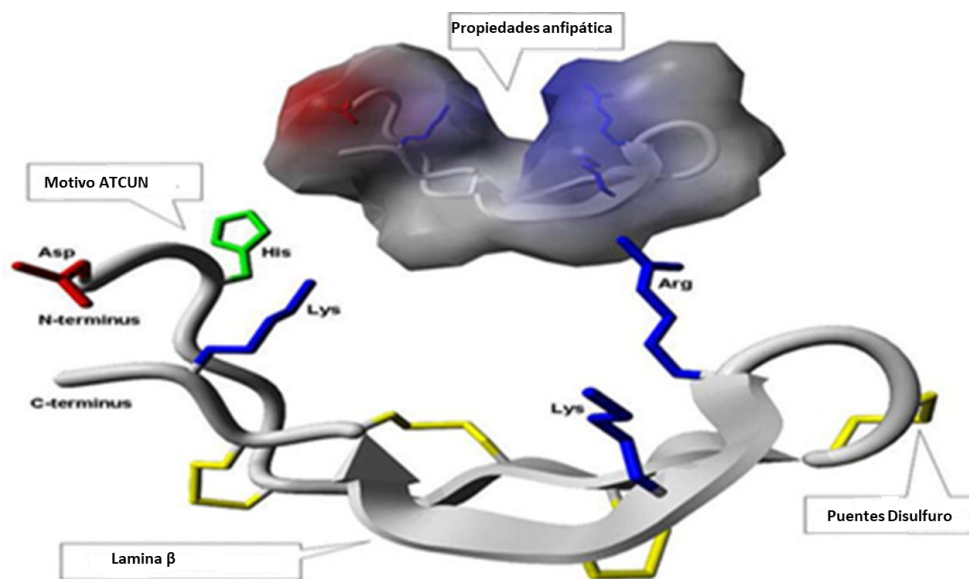


Figura 2.6. Estructura molecular de la hepcidina 25. Las flechas grises son láminas β y las de color gris son la columna vertebral del péptido. El color amarillo es un enlace disulfuro, el azul indica residuos positivos de lisina y arginina, el rojo indica el residuo negativo de ácido aspártico y el color verde indica histidina que contiene amino-terminal. (Faraj *et al.*, 2022)

La Hep25 circula en el torrente sanguíneo y actúa como un péptido regulador clave en la homeostasis del hierro, en hepatocitos, enterocitos y macrófagos (Peña-Montes *et al.*, 2014). Su principal función consiste en controlar la expresión y actividad de la ferroportina (FPN-1), la única

proteína exportadora de hierro conocida en vertebrados. Al unirse a FPN-1, la hepcidina induce su internalización y degradación, reduciendo así la absorción intestinal de hierro y su liberación desde los macrófagos hacia el torrente sanguíneo (Neneh *et al.*, 2021). Este proceso mantiene el equilibrio sistémico de hierro y previene su acumulación excesiva (Ganz *et al.*, 2003; Peña-Montes *et al.*, 2014; Bachini *et al.*, 2020; Rauf *et al.*, 2020; Neneh *et al.*, 2021).

Además de su función como principal reguladora de la homeostasis del hierro, hepcidina también participa activamente en la modulación de la respuesta inmunitaria. Durante infecciones o procesos inflamatorios, su expresión aumenta en respuesta a citoquinas proinflamatorias como la interleucina-6 (*il-6*), lo que conduce a una disminución de los niveles séricos de hierro al promover la degradación de la ferroportina, el único exportador conocido de hierro celular (Nemeth *et al.*, 2004; Ganz & Nemeth, 2015). Este mecanismo, conocido como inmunidad nutricional, constituye una estrategia de defensa del hospedador para restringir la disponibilidad de hierro a los microorganismos patógenos, limitando así su proliferación. De este modo, la hepcidina vincula la regulación metabólica del hierro con la respuesta inmune innata, desempeñando un papel dual como péptido antimicrobiano directo y como modulador del metabolismo del hierro y la inflamación (Galesloot *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2021). Las isoformas truncadas de hepcidina no solo complementan, sino que también diversifican la función de la Hep25 en la regulación del metabolismo del hierro y en la respuesta inmunitaria. Aunque las isoformas truncadas de hepcidina presentan una menor eficacia en el control del transporte de hierro debido a la ausencia de regiones estructurales críticas (Campostrini *et al.*, 2001), diversos estudios han sugerido que estas variantes adquieren funciones más especializadas, particularmente en la modulación de la respuesta inmune y en la defensa frente a microorganismos patógenos (Malerba *et al.*, 2018).

Hep25 ejerce su actividad inmunomoduladora principalmente a través de su unión a la ferroportina, una proteína exportadora de hierro expresada en macrófagos, hepatocitos, enterocitos y monocitos, provocando su internalización y degradación lisosomal (Nemeth *et al.*, 2013). Esta interacción reduce la liberación de hierro al plasma y genera un entorno intracelular hipoférrico, que limita la disponibilidad de este metal para los patógenos. Sin embargo, la acumulación transitoria de hierro dentro de los macrófagos también promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales actúan como segundos mensajeros que activan rutas de señalización dependientes del estado redox y del metabolismo férrico (Cronin *et al.*, 2019).

En una primera etapa, estas condiciones estimulan la activación del factor nuclear kappa B (*NF- κ B*), un regulador central de la respuesta inflamatoria, que induce la transcripción de genes proinflamatorios y la producción de citoquinas como interleucina 1 beta (*il-1 β*), *il-6* y factor de necrosis tumoral alfa (*tnf α*) (Morgan *et al.*, 2011). Estas moléculas favorecen la activación de macrófagos,

la quimiotaxis celular y la amplificación de la respuesta inmune, promoviendo la eliminación de patógenos intracelulares y el reclutamiento de otras células inmunes hacia el sitio de infección. Posteriormente, una vez controlado el estímulo inflamatorio, se activa de manera regulada la vía del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (*stat3*), la cual está asociada a la inducción de citoquinas antiinflamatorias, especialmente interleucina 10 (*il-10*). Esta citoquina actúa como un modulador negativo de la inflamación, inhibiendo la expresión de *il-1 β* , *il-6* y *tnf α* , y restaurando la homeostasis inmunológica. (Abreu *et al.*, 2018)

En este contexto de regulación fina entre inflamación y resolución, destaca la hepcidina, un péptido clave de la inmunidad innata. En peces, la hepcidina fue identificada por primera vez en la lubina blanca (*Morone chrysops*), y posteriormente se ha detectado en al menos 37 especies, incluyendo lubina rayada híbrida (*Morone saxatilis* $\times$ *M. chrysops*) (Shike *et al.*, 2002), pez cebra (*Danio rerio*) (Shike *et al.*, 2004), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Zhang *et al.*, 2004), platija (*Paralichthys olivaceus*) (Kim *et al.*, 2005) y trucha del Caspio (*Salmo caspius*) (Shirdel *et al.*, 2019). La presencia de múltiples isoformas de hepcidina en distintos teleósteos ha permitido realizar estudios comparativos que revelan su alto grado de conservación y su rol central en la defensa antimicrobiana. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la hepcidina cumple funciones fundamentales frente a bacterias, virus y hongos. En trucha del Caspio, por ejemplo, los desafíos con *Streptococcus iniae* y *Yersinia ruckeri* indujeron incrementos significativos de la expresión del gen *hepcidna* en hígado, riñón anterior, bazo y piel, lo que evidencia su participación directa en la respuesta inmune de los peces (Shirdel *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2011; Barroso *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). En este escenario, la isoforma sintética Hep20 adquiere especial relevancia ya que podría contribuir también al mantenimiento del equilibrio inmunológico. Para profundizar en la comprensión de sus funciones, una estrategia ampliamente utilizada es la síntesis química, que permite obtener péptidos con secuencias definidas, alta pureza y estabilidad controlada. Esto facilita tanto su caracterización estructural como la evaluación de su actividad funcional en diversos modelos biológicos.

2.5. Síntesis química y aplicaciones de péptidos derivados de Hepcidina (Hep20)

La síntesis química de hepcidina 20 (Hep20) proveniente de trucha arcoíris, se ha consolidado como una herramienta esencial para estudiar las funciones biológicas de esta molécula en peces. La estrategia más empleada para su obtención corresponde a la síntesis de péptidos en fase Sólida (SPPS), descrita por Merrifield en 1963, la cual permite ensamblar la cadena peptídica de manera secuencial mediante la adición controlada de aminoácidos sobre un soporte sólido inerte. En este procedimiento, el primer aminoácido se ancla a la resina desde su extremo C-terminal, y la cadena se va extendiendo hacia el extremo N-terminal mediante reacciones de acoplamiento activadas químicamente. Para evitar reacciones secundarias, los grupos reactivos de los aminoácidos se mantienen protegidos mediante el sistema Fmoc/tBu, en el cual el grupo 9-fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc) bloquea el extremo α -amino y los grupos tert-butilo (tBu) protegen las cadenas laterales. La formación de los enlaces peptídicos se favorece mediante activadores como DIC, HBTU o TBTU, que permiten una condensación eficiente y minimizan la racemización. Una vez completada la síntesis, el péptido se libera del soporte y se eliminan los grupos protectores mediante una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA), triisopropilsilano (TIS) y 1,2-etanoditiol (DOT). El producto resultante se purifica mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) y su identidad se confirma por espectrometría de masas (MALDI o ESI), garantizando su pureza estructural y funcional.

La síntesis controlada y purificación de Hep20 ha permitido disponer de un péptido funcionalmente activo para evaluar su papel como agente antimicrobiano e inmunomodulador en peces teleósteos. Tras la síntesis, el péptido fue sometido a un proceso de oxidación controlada destinado a favorecer la formación de los cuatro puentes disulfuro característicos de la estructura nativa de la hepcidina, los cuales son esenciales para estabilizar su conformación tridimensional tipo β -hairpin y conferirle su actividad biológica.

El péptido sintético Hep20 ha sido ampliamente utilizado para evaluar su actividad inmunomoduladora. Ensayos realizados en células de la línea monocito/macrófago RTS11 han demostrado que Hep20 es capaz de inducir una modulación basal de la respuesta inmune, incluso en ausencia de un estímulo infeccioso, lo que evidencia su potencial como agente inmunoestimulante en peces. La exposición a 10 μ M de Hep20 durante 6 a 24 horas, generó un aumento significativo a las 24 horas, en la expresión de *il1 β* , *tnfa* e *il10*, (figura 2.7). Acompañado de la detección intracelular de las proteínas IL-1 β y TNF- α mediante inmunofluorescencia (figura 2.8) (Álvarez et al., 2022). Este patrón de expresión sugiere que Hep20 activa de manera coordinada las vías proinflamatorias y antiinflamatorias en macrófagos, promoviendo inicialmente la producción de

IL-1 β y TNF- α para desencadenar una respuesta inflamatoria efectiva, seguida por la inducción de IL-10 como mecanismo regulador que atenúa la inflamación y restablece la homeostasis inmunológica.

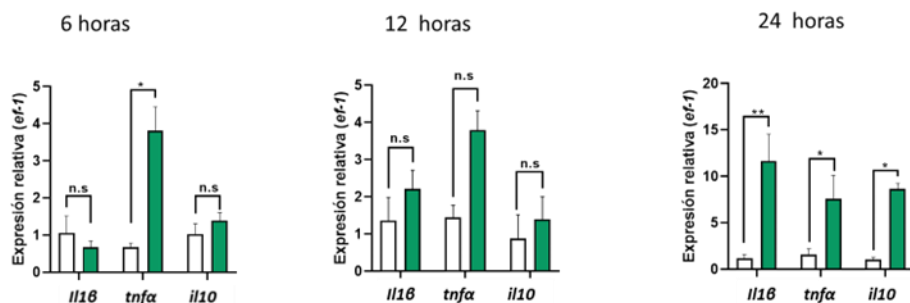


Figura 2.7. Perfil de expresión de ARNm de citoquinas en la línea celular RTS11. Expresión relativa de ARNm de *il1 β* , *tnf α* e *il10* en la línea celular RTS-11 tratada con Hep20 durante 6, 12 y 24 h (verde). células no tratadas que corresponden al control (Blanco). Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar, con $n = 4$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ de la prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney; n.s (diferencias no significativas). (Álvarez *et al.*, 2022)

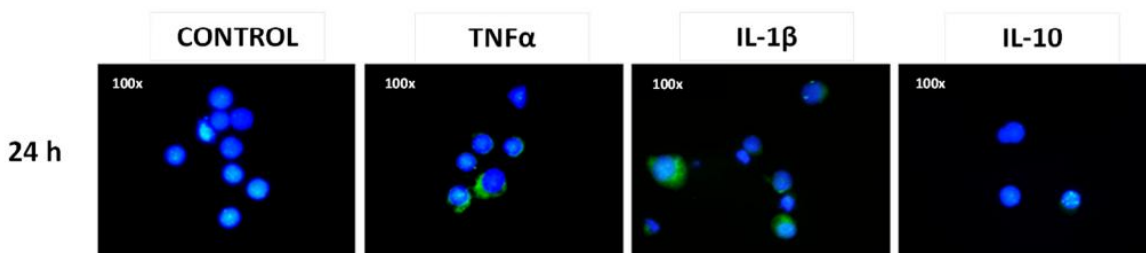


Figura 2.8. Perfil proteico de citoquinas IL-1 β , TNF α e IL-10 en células RTS11 después de 24 h después del tratamiento con Hep20. Las citoquinas se detectaron utilizando antisuero específico de ratón y el anticuerpo conjugado anti-IgG de ratón Alexa-488 (verde). Además, se utilizó DAPI como tinción de núcleos (azul). (Álvarez *et al.*, 2022)

En concordancia con los resultados obtenidos *in vitro*, el efecto inmunomodulador de Hep20 fue posteriormente evaluado *in vivo*. En este ensayo, se administraron 20 μ g de Hep20 por vía intraperitoneal a ejemplares de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), y la expresión génica se analizó a los 1, 3, 7, 14 y 21 días postinyección. En el riñón cefálico, se observó una modulación significativa en la expresión de citoquinas proinflamatorias (*il-1 β* y *tnf- α*) y del marcador antiinflamatorio *il-10* durante los días 1, 3, 7 y 14 (Figura 2.9). En contraste, en el bazo se detectaron

diferencias significativas en *il-1 β* y *il-10*, con variaciones más marcadas en los días 1, 7 y 14 postinyección (Figura 2.10) (Álvarez *et al.*, 2022).

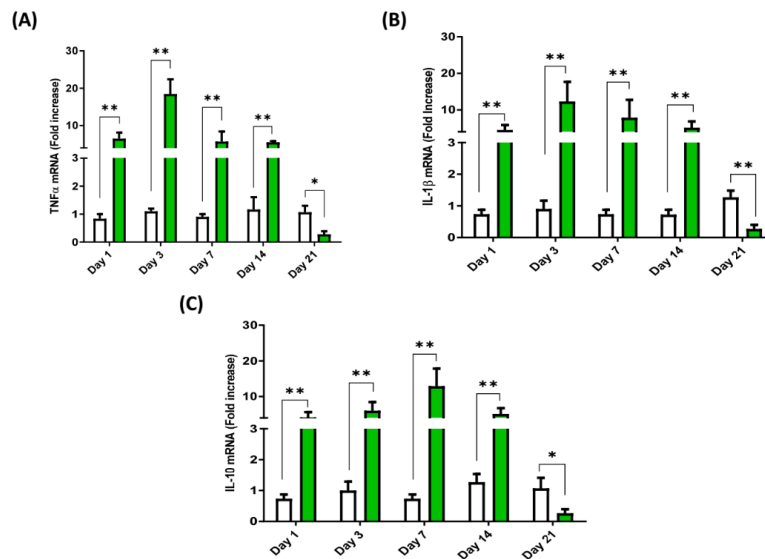


Figura 2.9. Perfil de expresión de ARNm de citoquinas riñón cefálico de lubina europea post-inyección intraperitoneal de Hep20. Expresión de ARNm de *tnfa* (A), *il1b* (B) e *il10* (C). Peces inyectadas con hep 20 (barras verdes) y Control peces inyectados con solución salina tamponada con fosfato (blanco barras). Las diferencias significativas ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) entre grupos en cada momento se indican con (*) o (**) respectivamente ($n = 6$), ns (diferencias no significativas). (Álvarez *et al.*, 2022).

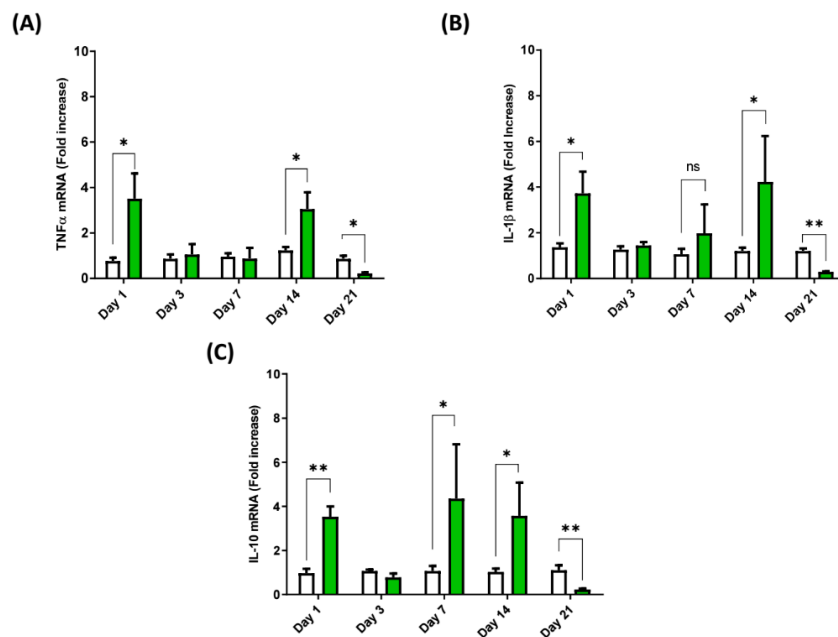


Figura 2.11. Perfil de expresión de ARNm de citoquinas del bazo de lubina europea post-inyección intraperitoneal de Hep20. Expresión de ARNm de *tnfa* (A), *il1b* (B) e *il10* (C). Peces inyectados con hep 20 (barras verdes) y Control peces inyectados con solución salina tamponada con fosfato (blanco barras). Las diferencias significativas ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) entre grupos en cada momento se indican con (*) o (**) respectivamente ($n = 6$), ns (diferencias no significativas). (Álvarez *et al.*, 2022).

En salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la suplementación dietaria con hep20 sintética ha demostrado efectos inmunomoduladores relevantes. En un ensayo experimental, se incorporaron dosis de 150 y 300 $\mu\text{g}/\text{k}$ de pez en la dieta, alimentando a los peces durante 20 días (Mercado *et al.*, 2017; Proyecto FIE-2015-V014). Los resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de las citoquinas *il-1 β* e *il-10* en el bazo y el riñón cefálico, órganos clave en la respuesta inmune de los peces. La inducción de *il-1 β* refleja la activación de una respuesta proinflamatoria inicial, mientras que el incremento de *il-10* evidencia la activación de mecanismos reguladores destinados a mantener la homeostasis inmunológica. Los peces alimentados con la dosis más alta presentaron una mayor resistencia frente a la infección y una respuesta inmune más equilibrada, confirmando que Hep20 actúa como un inmunoestimulante dietario eficaz, capaz de modular de forma coordinada la inflamación y potenciar la inmunidad inespecífica en Salmon del atlántico.

En conjunto, los estudios desarrollados en diversas especies demuestran que Hep20 constituye un potente inmunoestimulante capaz de inducir respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias equilibradas que fortalecen la inmunidad innata y aumentan la resistencia frente a infecciones bacterianas. Su eficacia ha sido comprobada en diferentes modelos de peces, tanto marinos como de agua dulce, y mediante distintas vías de administración, incluyendo la inyección intraperitoneal y la suplementación dietaria, lo que confirma la versatilidad biológica de este péptido sintético. Estos resultados respaldan el potencial de la Hep20 como herramienta inmunoproláctica en acuicultura y abren el camino hacia el estudio de nuevas estrategias de incorporación de péptidos bioactivos, orientadas a optimizar su estabilidad, absorción intestinal y efectividad en condiciones de cultivo intensivo.

2.6. Vías de incorporación de péptidos bioactivos en peces

La hep20 ha demostrado ser un inmunoestimulante eficaz en la lucha contra infecciones que afectan a la industria acuícola. Sin embargo, el uso de péptidos sintéticos en esta industria presenta importantes desafíos. En la práctica, resulta difícil y costoso obtener las cantidades necesarias para controlar eficazmente las enfermedades presentes en la acuicultura (Tsang *et al.*, 2020). Por lo tanto, es fundamental desarrollar estrategias de administración efectiva.

Actualmente, existen tres tipos de administración de medicamentos en acuicultura: inyección, inmersión y administración oral. La inyección intramuscular o intraperitoneal es el método más popular, ya que proporciona una dosis exacta. No obstante, este método genera estrés en los peces, consume mucho tiempo y es laborioso, lo que lo convierte en una opción relativamente costosa (Su *et al.*, 2021). La administración por inmersión consiste en sumergir los peces en una solución diluida del medicamento, generalmente durante un período de 30 a 60 segundos (Brudeseth *et al.*, 2013). Sin embargo, la eficacia de este método puede verse afectada por varios factores, como la concentración del medicamento, el tiempo de inmersión, el tamaño de los peces, la presencia de adyuvantes y la temperatura del agua (Su y Su, 2018).

Por otro lado, la administración oral es un método sencillo y ampliamente utilizado que permite realizar tratamientos de forma masiva. Este enfoque implica incorporar el medicamento en el alimento de los peces. A diferencia de los métodos anteriores, la administración oral requiere una manipulación mínima, lo que reduce el estrés asociado a la aplicación de tratamientos. Sin embargo, su administración oral se ve significativamente obstaculizada por la degradación enzimática, la inestabilidad y la baja permeabilidad a través del epitelio gastrointestinal (GI), lo que resulta en una baja biodisponibilidad (Baral *et al.*, 2025).

Es necesario utilizar cantidades considerables de medicamento para garantizar que, tras la ingestión, se absorba la cantidad suficiente para producir el efecto deseado. (Chettri *et al.*, 2017; Embregts *et al.*, 2019). Para abordar este problema, se utilizan compuestos naturales que permiten mejorar la absorción de moléculas bioactivas. Una de ellas es la fracción denominada deacilsaponina obtenida a partir de la hidrólisis de saponinas proveniente del árbol Quillay.

2.7. Saponinas: estructura, función y propiedades bioactivas

Las saponinas son compuestos naturales ampliamente distribuidos en el reino vegetal y, en menor medida, en algunos organismos marinos. Estas moléculas se dividen en dos grandes grupos esteroidales y triterpenoides según la naturaleza de su aglicona (de Groot *et al.*, 2016). Entre las principales fuentes de saponinas triterpenoides destaca el Quillay (Quillaja saponaria), un árbol perenne endémico de Chile, cuya distribución abarca desde la Región de Valparaíso (30° S) hasta La Araucanía (38° S) (Schlotterbeck *et al.*, 2015). Este árbol contiene saponinas en su corteza, hojas y parte del tronco (Donoso *et al.*, 2011; Schlotterbeck *et al.*, 2015), aunque tradicionalmente su extracción se ha centrado en la corteza (Guerra *et al.*, 2020).

Las saponinas de quillay han sido ampliamente estudiadas, aisladas y comercializadas, debido a su gran versatilidad y a su aplicación en múltiples sectores, como las industrias agrícola, cosmética, alimentaria y farmacéutica (Zúñiga *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Barhate *et al.*, 2013;

Harrer *et al.*, 2014). Esta creciente demanda ha generado una presión considerable sobre los recursos naturales: entre 2019 y 2020, se estimó un requerimiento de 40.000 a 48.000 toneladas de biomasa de quillay, superando los límites sostenibles del bosque nativo (Schlotterbeck *et al.*, 2015). La sobreexplotación de la corteza ha producido impactos ecológicos significativos y amenaza la disponibilidad futura de este recurso.

En los procesos industriales de obtención de saponinas, las hojas han sido históricamente excluidas por su baja proporción en la biomasa total (solo entre el 4% y el 6% del peso del árbol) y por la presencia de compuestos interferentes, como la clorofila. Además, los métodos de extracción a partir de hojas no se encuentran integrados en la cadena productiva convencional. Sin embargo, estudios recientes como el de Schlotterbeck y colaboradores han demostrado que las hojas de árboles jóvenes contienen fracciones ricas en saponinas, lo que representa una fuente alternativa y sostenible de materia prima, capaz de reducir la presión sobre la corteza y contribuir a una producción más ecológica.

2.8. Estructura y función de las saponinas

La estructura de las saponinas está compuesta por una aglicona triterpenoide, denominada ácido quillaico, a la cual se enlazan distintos oligosacáridos tales como D-glucosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico, D-fucosa, D-xilosa, L-ramnosa o L-arabinosa. En la mayoría de los casos, la cadena de azúcares se une al carbono C-3 del esqueleto triterpénico, dando origen a las saponinas monodesmosídicas. En otros casos, se presenta una segunda cadena de azúcares unida en C-26 o C-28, conformando las saponinas bidesmosídicas (Figura 2.11). Además, algunas moléculas poseen una cadena lateral con un grupo acilo, característica estructural que desempeña un papel relevante en determinadas actividades biológicas (Sun *et al.*, 2009).

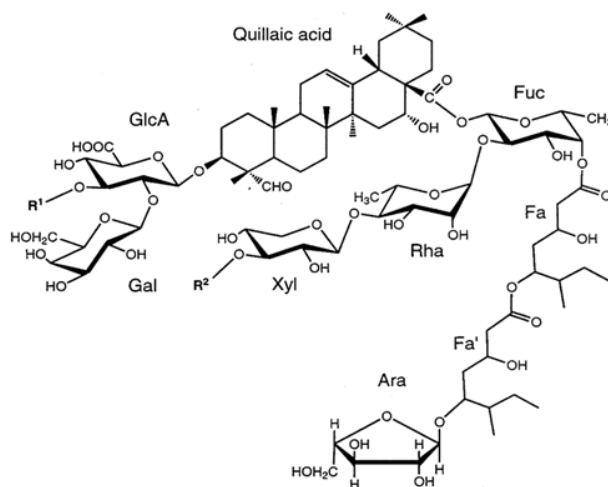


Figura 2.11. Estructura general de saponinas triterpenoides proveniente de *Quillaja saponaria*. su estructura se compone ácido quillaico, unido a un trisacárido ramificado o un disacárido, Un residuo de fucosa enlazado a éster en C-28 y por un residuo de monosacárido y por un grupo acilo. (Sun et al., 2009)

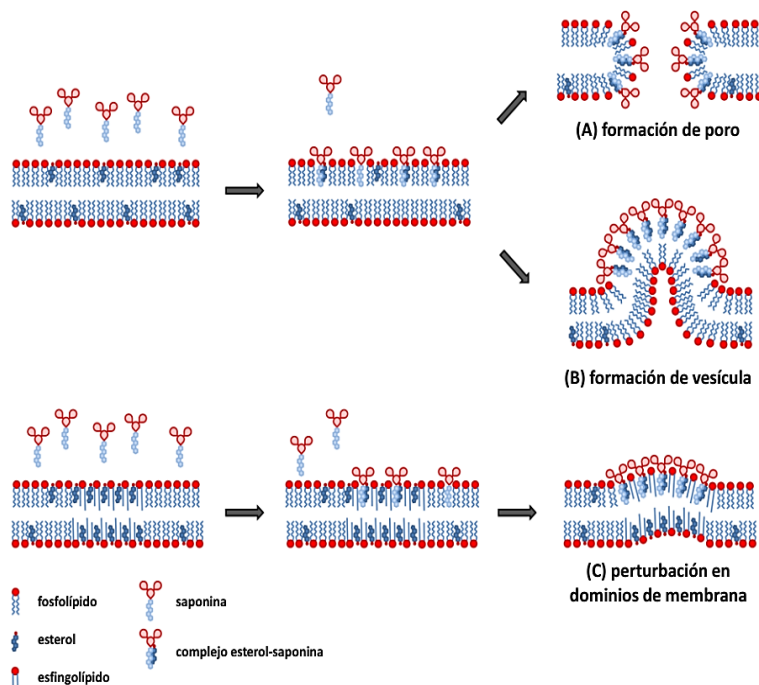
Las saponinas pueden diferenciarse según variaciones en su estructura, las cuales dependen del nivel de oxidación del esqueleto del ácido quillaico, el número y tipo de azúcares, su posición de enlace y la presencia o ausencia de grupos acilo (Roner et al., 2014). Esta complejidad estructural les confiere una naturaleza anfipática, compuesta por una región hidrofóbica (la aglicona) y una región hidrofílica (los azúcares) (de Groot et al., 2016; Fleck et al., 2019). Esta dualidad explica su capacidad para formar espuma y, especialmente, para interactuar con el colesterol de las membranas celulares, generando poros que aumentan la permeabilidad de la membrana (Lacaille-Dubois et al., 2017). Este fenómeno fue descrito por primera vez en 1962 por Dourmashkin, quien observó, mediante microscopía electrónica, la formación de poros en la envoltura del virus del sarcoma de Rous inactivado con saponinas. A partir de este hallazgo, la capacidad de las saponinas para alterar la integridad de las membranas biológicas se ha estudiado extensamente y se conoce comúnmente como actividad hemolítica de las saponinas, considerada la base molecular de su acción lítica sobre células y microorganismos (Agustín et al., 2011)

En la actualidad, no se han podido determinar completamente los procesos utilizados por la saponina para generar esta interacción, aunque se han planteado un modelo de acción de las saponinas hacia las membranas (Figura 2.12) El primer modelo se centra en la formación espontánea de complejos entre saponinas y colesterol en las membranas, y a continuación se encuentra la asociación de estos complejos en "estructuras bidimensionales de tipo micelar" en la membrana. Las cadenas de azúcar hidrófilas de las saponinas, que se rumorea que están ubicadas centralmente en el complejo de tipo micelar, conducen a la formación de un poro acuoso. Los poros citados representan un incremento en la permeabilidad de la membrana. En el segundo modelo descrito se aprecia una incorporación de la saponina en la monocapa de la membrana, dentro de la membrana las saponinas se ensamblan con los esteroides, lo cual puede convertirse en curvatura tras la acumulación de esteroides, lo cual puede conducir a la eliminación de esteroides a través de la formación de vesículas. El modelo más reciente descrito, se usó saponinas de quillay, las cuales provocaron una perturbación adicional de los sistemas de membrana a partir de simulaciones de dinámica molecular (so Lin y Wang, 2010). En este modelo, las saponinas migran en la membrana a los dominios de membrana enriquecidos en esfingomielina y colesterol,

las denominadas balsas lipídicas, En consecuencia, este nuevo modelo no requiere de la acumulación de complejos, más bien solo se da la interacción y se produce una perturbación directa.

Figura 2.12. Modelos de mecanismos de interacción saponina con la membrana. Las saponinas se internalizan a través de su región hidrofóbica, posteriormente se produce una interacción con los esteroides a través de su región hidrofílica, dicha interacción produce una curvatura de la membrana tras la acumulación de saponinas. Para finalmente dar lugar **A:** poros en la membrana **B:** o a la formación de vesículas que se desprenden de la membrana. **C:** es el mecanismo donde no hay una reorganización de la membrana, más bien hay una disrupción directa de la membrana. Las saponinas se integran a la membrana hasta las balsas lipídicas e interfieren con la funcionalidad de estos dominios modificada de Agustín *et al.*, (2011)

Es importante destacar que la capacidad de las saponinas para permeabilizar las membranas puede tener efectos beneficiosos cuando se incorporan en pequeñas cantidades a la dieta. Esto se debe a que faciliten la absorción de nutrientes, fármacos y toxinas al aumentar la permeabilidad de la mucosa del intestino delgado (Chuke. 1976; Oakenfull *et al.*, 1979; Zheng *et al.*, 2022) En peces existen varios estudios que han demostrado el efecto de las saponinas sobre la membrana celular, el crecimiento animal y la ingesta de alimento, la digestión de proteínas, el metabolismo del colesterol, la reproducción animal y el sistema inmunológico (Francis *et al.*, 2002; abarca *et al.*, 2021).



2.9. Aplicaciones de saponinas extraída desde quillay

Los extractos obtenidos de la corteza de *Quillaja saponaria* han sido ampliamente utilizados en diversas industrias, especialmente en la farmacéutica y veterinaria, debido a sus propiedades adyuvantes e inmunoestimulantes. Entre las fracciones más estudiadas se encuentra QuilA, una mezcla heterogénea de saponinas triterpenoides con alto potencial biológico. La purificación fraccionada de QuilA permite aislar componentes específicos, tales como QS-7, QS-18 y QS-21, que difieren notablemente en su estructura, potencia inmunológica y grado de toxicidad (Rajput *et al.*, 2007).

Dentro de estas, QS-18 ha mostrado una toxicidad elevada en modelos murinos, mientras que QS-7 y QS-21 presentan menor toxicidad y conservan una potente capacidad adyuvante (Kensil y Marciani, 1991; Marty-Roix *et al.*, 2016). En particular, QS-21 ha sido objeto de numerosos estudios debido a su abundancia relativa en los extractos de quillay y a su extraordinaria capacidad para potenciar la respuesta inmune adaptativa, razón por la cual se utiliza actualmente en formulaciones vacunales aprobadas, como AS01 (Zhu *et al.*, 2016).

Dado que las saponinas pueden presentar efectos hemolíticos y citotóxicos dependientes de su concentración y estructura, se han realizado numerosos estudios para determinar los rangos de seguridad biológica de estas fracciones. En la tabla 2.1 se resumen los valores reportados de

hemólisis (HD₅₀) y citotoxicidad (IC₅₀) para las principales saponinas derivadas de *Quillaja saponaria*.

Tabla 2.1 Rangos de hemólisis y citotoxicidad reportados para saponinas de *Quillaja saponaria*

Fracción	Parámetro	Concentración	Modelo	Referencia
QS-21	HD ₅₀ (hemólisis 50 %)	3,5-4,5 μM	Eritrocitos de oveja	Zhu <i>et al.</i> , 2015
	HD ₅₀ (hemólisis 50 %)	6,5-9 μM	Eritrocitos de conejo	Sun <i>et al.</i> , 2006
	IC ₅₀ (citotoxicidad)	7 μM	Células humanas SNU-1	Guzmán <i>et al.</i> , 2020
QuilA	HD ₅₀ (hemólisis 50 %)	15 μM	Eritrocitos de conejo	Zhu <i>et al.</i> , 2015
QS-7	Toxicidad baja	≤40 μM	modelos murinos	Kensil & Marciani, 1991
QS-18	Toxicidad alta	>5 μM	modelos murinos	Cao <i>et al.</i> , 2025

La fracción QS-21 se ha utilizado en vacunas veterinarias y humanas como adyuvante ya que induce una inmunidad equilibrada Th1 / Th2, característica importante para incluirla en una amplia gama de aplicaciones en la lucha contra diversos patógenos microbianos, cánceres y otras enfermedades (Zhu *et al.*, 2016; Wang., 2021). Sin embargo, la toxicidad y el efecto hemolítico indeseable representan un problema para el uso de esta fracción, ya que existe una limitación en la dosis para evitar efectos secundarios. De esta manera se ha estudiado estrechamente la relación entre la estructura y función, donde se ha visto que al modificar parte de la estructura se produce un cambio en la actividad adyuvante y toxicidad (Liu *et al.*, 2002; Wang. 2021).

2.10. Fracción deacilsaponina: propiedades y potencial biotecnológico en acuicultura

Si bien las fracciones purificadas del quillay, como QS-21, poseen un alto potencial inmunoestimulante y adyuvante, su aplicación directa en organismos acuáticos o en formulaciones orales presenta limitaciones importantes debido a su citotoxicidad y efecto hemolítico. En ensayos *in vitro*, QS-21 provoca un 50 % de hemólisis (HD₅₀) a concentraciones entre 3,5–4,5 μM, restringiendo su uso en sistemas biológicos sensibles, incluidos los peces. Esta elevada reactividad ha impulsado el desarrollo de derivados estructuralmente modificados que conserven la actividad bioactiva de QS-21, pero con mayor seguridad y estabilidad biológica. En este contexto, las fracciones deacilsaponinas han surgido como alternativas promisorias para el diseño de agentes permeabilizantes y adyuvantes de nueva generación.

Mediante hidrólisis alcalina controlada, Pillon y colaboradores lograron eliminar el grupo acilo de QS-21, originando la fracción deacilsaponina 1 (DS-1). Esta variante exhibe una toxicidad significativamente menor que su precursor, con una reducción drástica de la hemólisis: DS-1 no alcanza niveles del 50 % de hemólisis en los rangos donde QS-21 ya es fuertemente hemolítica y requiere concentraciones mucho mayores (superiores a 40 μM) para inducir efectos comparables (Pillon *et al.*, 1996; Chao *et al.*, 1998). Esta menor citotoxicidad permite que DS-1 sea utilizada en concentraciones más altas, ampliando su margen de aplicación sin comprometer la viabilidad celular. En modelos de mamíferos, DS-1 ha demostrado mejorar la absorción nasal, ocular y oral de diversos compuestos hidrofílicos, como insulina, manitol, decapeptidos y antibióticos aminoglucósidos, cuando se administra entre 650 y 1320 μM (Recchia *et al.*, 1995; Chao *et al.*, 1998; Araújo *et al.*, 2017). Estos efectos dependen estrictamente de la coadministración simultánea, ya que su aplicación previa no genera mejoras en la biodisponibilidad. Además, la eficacia de DS-1 como potenciador de absorción quedó demostrada en estudios *in vivo* donde, combinado con un principio activo, aumentó la supervivencia de ratones infectados experimentalmente con *Escherichia coli*. Posteriormente, se confirmó que su mecanismo de acción involucra un aumento reversible de la permeabilidad transepitelial a través de rutas mayoritariamente transcelulares en cultivos Caco-2, sin alterar la morfología ni la viabilidad del epitelio, lo que subraya su carácter seguro y su potencial como agente de permeación (Chao *et al.*, 1998; Francis *et al.*, 2002).

Desde una perspectiva molecular, no existe evidencia de que las saponinas incluidas fracciones deaciladas como DS-1 formen enlaces covalentes o complejos estables con péptidos bioactivos. En cambio, su actividad se basa en interacciones transitorias de naturaleza hidrofóbica y electrostática con los lípidos y el colesterol de la membrana, produciendo microporos reversibles que facilitan el paso de moléculas hidrofílicas a través del epitelio intestinal (Pillon *et al.*, 1996; Podolak *et al.*, 2010). Esta combinación de permeabilización eficiente y baja citotoxicidad convierte a DS-1 en una herramienta altamente atractiva para aplicaciones biotecnológicas.

En peces, el uso de saponinas derivadas de *Quillaja saponaria* ha cobrado especial relevancia. Diversos estudios han mostrado que extractos de quillay pueden modular la expresión de genes inmunes, aumentar la actividad fagocítica y mejorar la resistencia frente a infecciones bacterianas como *Piscirickettsia salmonis*, uno de los patógenos más importantes en salmonicultura (Cortés *et al.*, 2021; Diógenes *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2022). Además de su efecto inmunológico directo, las saponinas de quillay actúan sobre la barrera intestinal, facilitando la captación y el transporte de antígenos o compuestos bioactivos administrados por vía oral, lo que las posiciona como herramientas versátiles para estrategias de inmunonutrición.

La transición hacia fracciones deaciladas como DS-1 representa un avance significativo para su aplicación en especies acuícolas, ya que combina los beneficios inmunomoduladores característicos de las saponinas con un perfil de seguridad adecuado para peces, cuyo epitelio intestinal es especialmente sensible a compuestos tensioactivos. Así, las deacilsaponinas incluyendo aquellas obtenidas desde hojas de Quillay emergen como plataformas sustentables y de alta compatibilidad fisiológica para el desarrollo de formulaciones orales destinadas a mejorar la biodisponibilidad y el efecto inmunomodulador de moléculas bioactivas, como el péptido Hep20.

En conjunto, estos antecedentes confirman que la fracción deacilsaponina actúa como un agente de permeación eficaz, seguro y reversible, con un papel estratégico en el diseño de nuevas formulaciones orales para la acuicultura moderna, orientadas a potenciar la salud intestinal, mejorar la inmunidad y reducir la dependencia de antibióticos en peces cultivados.

2.11. Planteamiento de problema

La salmonicultura chilena enfrenta importantes desafíos sanitarios derivados de su producción intensiva, destacando la alta incidencia de enfermedades infecciosas una de las principales causas de mortalidad en salmónidos. A pesar de los avances en vacunación y manejo, el uso de antibióticos continúa siendo la herramienta predominante de control, generando impactos ambientales y promoviendo la resistencia antimicrobiana. Esta situación evidencia la necesidad de desarrollar estrategias inmunoprolácticas más sostenibles y seguras que fortalezcan las defensas naturales de los peces.

En este contexto, los péptidos de defensa del huésped, como la Hecidina 20, surgen como alternativas biotecnológicas prometedoras por su doble acción antimicrobiana e inmunomoduladora, capaces de mejorar la respuesta inmunitaria de los peces cultivados. Sin embargo, su aplicación por vía oral presenta desafíos asociados a la limitada absorción intestinal de estos compuestos, lo que restringe su eficacia en condiciones de cultivo.

Para superar esta limitación, se propone el uso de deacilsaponina del quillay, moléculas naturales que pueden incrementar la permeabilidad intestinal de manera reversible y segura, favoreciendo la absorción de biomoléculas como la Hecidina 20. La falta de estudios en peces sobre esta

interacción representa una oportunidad científica relevante para desarrollar formulaciones orales innovadoras, eficientes y ambientalmente sostenibles que fortalezcan la salud y resiliencia de los salmónidos en la acuicultura moderna.

2.12. HIPOTESIS

La fracción deacilsaponina (DS) obtenida a partir de hojas de *Quillaja saponaria* (quillay) incrementa la absorción del péptido Hepcidina 20 (Hep20) a través de la barrera epitelial, respecto a su administración sin Ds, lo que se traduce en un aumento de su actividad inmunomoduladora en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

2.13. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la fracción deacilsaponina (DS) obtenida de *quillay* sobre la absorción y la actividad inmunomoduladora del péptido Hepcidina 20 (Hep20) en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Objetivos Específicos

- 1.- Estandarizar la extracción de la fracción deacilsaponina y su concentración no tóxica, para disponer de una fracción segura para su uso en ensayos *in vitro* e *in vivo*
- 2.-Evaluar el efecto de la fracción deacilsaponina sobre el traspaso e internalización de Hep20 en líneas celulares epiteliales intestinales (RTGutGC) y monocito/macrófagos (RTS11, con el propósito de determinar si Ds, puede favorecer el ingreso de hep20 a distintos tipos celulares
- 3.-Determinar la modulación de la expresión de citoquinas mediante la coadministración de la fracción deacilsaponina (DS) y el péptido Hepcidina 20 (Hep20) en modelos *in vitro* e *in vivo*, a fin de establecer su acción inmunomoduladora y su viabilidad como estrategia de administración oral en peces.

2.14. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA PARA EL OBJETIVO 1

El primer objetivo se enfocó en la obtención de deacilsaponina (Ds) y la síntesis del péptido Hepcidina 20, con el fin de emplearlos en ensayos posteriores. Para ello, se realizó una extracción acuosa de saponinas a partir de hojas del árbol *Quillaja saponaria* (Quillay), purificación y hidrólisis que permitieron obtener la fracción Ds.

La determinación del perfil del extracto de saponina y la fracción hidrolizada se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

De forma paralela, se sintetizó químicamente el péptido Hepcidina 20, el cual además fue oxidado y acoplado a fluoresceína. La pureza y composición fueron confirmadas mediante RP-HPLC y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

La concentración óptima de la fracción Ds se estableció a partir de ensayos de hemólisis en eritrocitos de trucha arcoíris y pruebas de citotoxicidad en líneas celulares de peces.

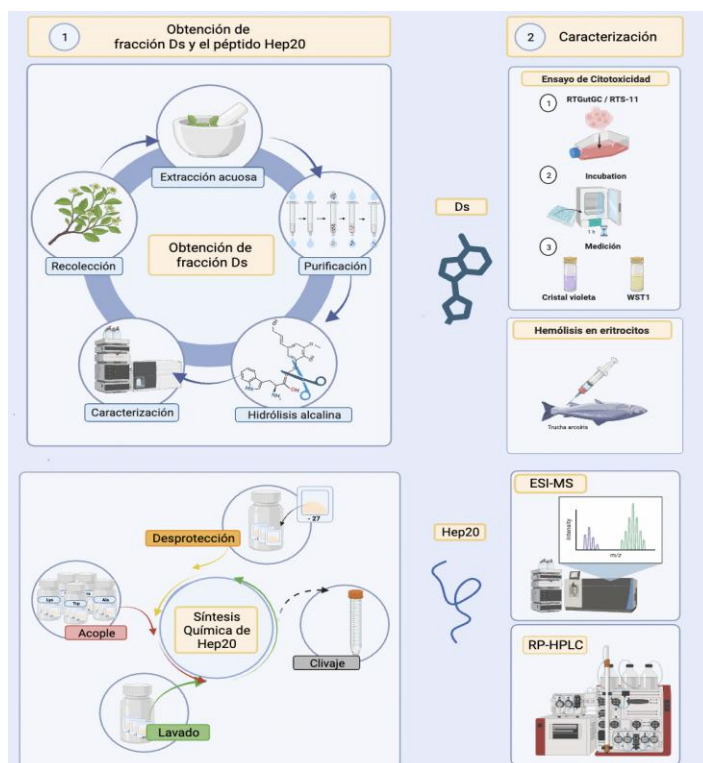


Figura 2.12. Esquema de estrategia experimental para el objetivo general 1

2.15. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA PARA EL OBJETIVO 2

El segundo objetivo específico se enfocó en evaluar la biodisponibilidad del péptido Hepcidina 20 coadministrado con la fracción deacilsaponina, utilizando líneas celulares de trucha arcoíris RTgutGC (epitelial intestinal) y RTS11 (monocito/macrofágica).

Para cuantificar la biodisponibilidad, se realizó un ensayo de translocación en monocapa de células RTgutGC, en el cual se midió el paso del péptido Hepcidina 20, previamente marcado con fluoresceína (FITC-Hep20), a través del epitelio celular, tanto en presencia como en ausencia de la fracción deacilsaponina. Este enfoque permitió determinar si la coadministración favorecía el transporte y disponibilidad del péptido hacia el compartimento basal.

Adicionalmente, se emplearon técnicas de inmunofluorescencia en las líneas celulares RTgutGC y RTS11 con el propósito de confirmar la presencia y distribución del péptido Hepcidina 20 en las

células, aportando evidencia complementaria sobre el posible efecto de la deacilsaponina en su biodisponibilidad.

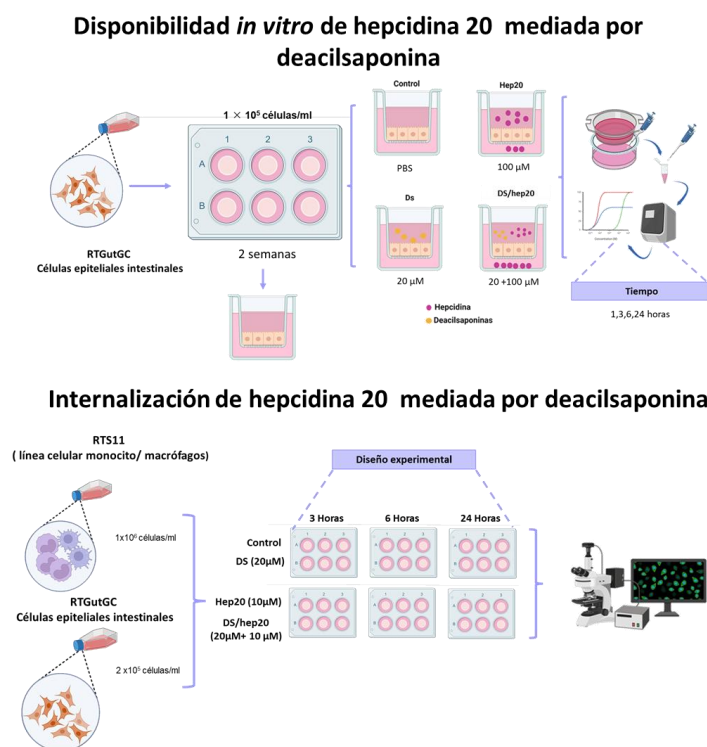


Figura 2.13. Esquema de Estrategia experimental para el objetivo general 2

2.16. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA PARA EL OBJETIVO 3

Para evaluar el efecto inmunomodulador de la coadministración de la fracción deacilsaponina y el péptido Hepcidina 20, se desarrollaron tres ensayos experimentales complementarios.

En el primer ensayo, se utilizó la línea celular macrofagia RTS11, la cual fue expuesta a la combinación de deacilsaponina y Hepcidina 20. Tras 6, 12 y 24 horas de incubación, se analizó la expresión de genes asociados a la respuesta inmune mediante cuantificación del ARN mensajero por PCR en tiempo real (qPCR), enfocándose en citoquinas proinflamatorias (*tnf-α*, *il-1β*) y anti-inflamatorias (*il-10*).

El segundo ensayo se realizó en trucha arcoíris y consistió en la administración intraperitoneal de cuatro tratamientos: control (PBS), fracción deacilsaponina, péptido Hepcidina 20 y la combi-

nación Hep20/Ds. Transcurridas 24 horas post inyección, se recolectaron muestras de bazo y riñón anterior para analizar la expresión génica de las mismas citoquinas (*tnf- α* , *il-1 β* e *il-10*).

Finalmente, en el tercer ensayo, se evaluó la administración oral mediante la formulación de cuatro dietas correspondientes a los tratamientos mencionados: control, fracción Ds, péptido Hep20 y combinación Hep20/Ds. Los peces fueron alimentados durante 21 días, y se tomaron muestras de bazo y riñón anterior en los días 7, 14 y 21, con el objetivo de determinar la expresión temporal de las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias previamente señaladas.

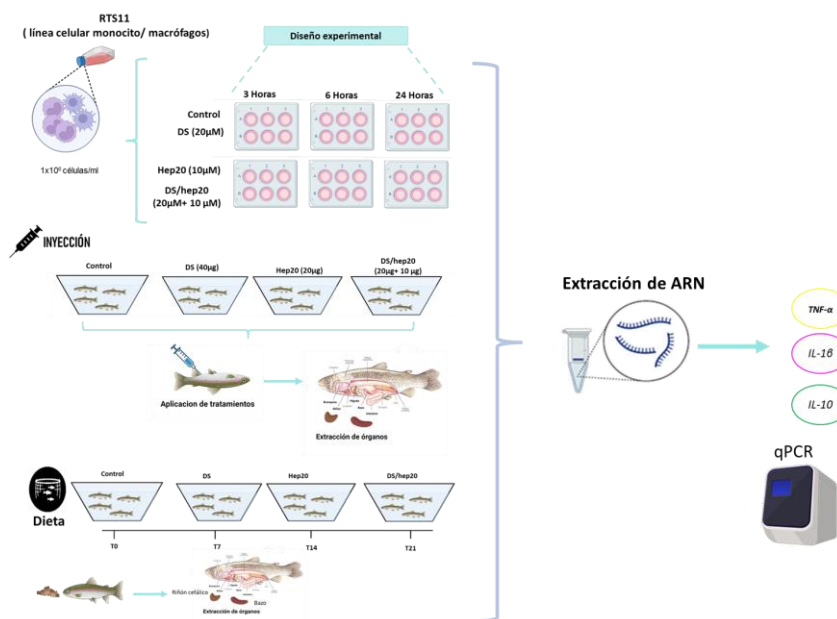


Figura 2.14. Esquema de Estrategia experimental para el objetivo general 3

CAPITULO 3

3.1. Materiales y Métodos

3.1.1. Material Biológico

3.1.1.1. Material vegetal: Se recolectaron hojas de *Quillaja saponaria* (Mol.) en el campus Cu-rauma de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso de un árbol, las hojas colectadas fueron sacadas de ramas previamente podadas. Esta especie fue seleccionada de acuerdo a parámetros morfológicos característico como hojas coriáceas, de superficie brillante y margen entero y Frutos tipo cápsula seca con folículos en forma de “estrella” que contienen semillas aladas.

3.1.1.2. Animales de Experimentación: En los ensayos *in vivo* de inyección se utilizaron ejemplares de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en diferentes estadios de desarrollo. Para los ensayos inmunológicos, se emplearon peces juveniles con un peso promedio entre 40 y 50 g, correspondientes al estadio juvenil avanzado, provenientes de la Piscicultura de Río Blanco (Los

Andes, Región de Valparaíso, Chile). Los peces fueron trasladados y mantenidos en el Laboratorio del Grupo de Marcadores Inmunológicos de Organismos Acuáticos, del Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, bajo condiciones controladas se mantuvieron en estanques de 500 L con flujo circulante, a una temperatura de 14 ± 1 Celsius con un rango de 8 ± 1 mg L⁻¹ de oxígeno disuelto, en ciclos de 12 horas día/12 horas noche.

Por otro lado, para los ensayos de dieta, se utilizaron 52 peces trucha arcoíris con un peso entre 10 y 15 g, correspondientes al estadio juvenil temprano, provenientes de la piscicultura comercial Mundova – Cultivo Integral de Trucha (Riópar, Albacete, España). Estos ejemplares fueron mantenidos en las instalaciones del Bioterio de la Universidad Miguel Hernández (UMH), donde se realizaron las pruebas experimentales bajo condiciones controlada a temperatura de 14 Celsius, con un sistema de recirculación de agua de clorada y fotoperiodo. Un lote anterior de peces presentaba signos de saprolegnia, por lo cual como medidas preventivas se les realizaba baños cortos con NaCl previamente al comienzo del ensayo.

3.1.1.3. Líneas Celulares: "El estudio se llevó a cabo utilizando dos modelos celulares clave del sistema inmune y de barrera de la trucha arcoíris. Se empleó la línea celular epitelial intestinal (RTgutGC) y la línea celular monocito/macrófago (RTS11), derivada del bazo. Se destaca que, si bien son ampliamente utilizadas en investigación, estas líneas celulares fueron establecidas en laboratorios específicos y no poseen un número de catálogo ATCC. Ambas fueron obtenidas mediante donación al Laboratorio de Marcadores Inmunológicos en Organismos Acuáticos."

3.1.2. Reactivos

3.1.2.1. Reactivos utilizados para obtención de la fracción deacilsaponina: Agua MilliQ, metanol, unidades de filtración (0,45 y 0,22 μ m), MeOH grado HPLC, Columnas de extracción preparativa C18, Acetonitrilo grado HPLC, ácido trifluoroacético (TFA) grado HPLC, Hidroxido de sodio (NaOH) y Acido Acético (CH₃COOH), columnas de Sephadex G10 (Sigma)

3.1.2.2. Reactivos de Síntesis Química del péptido Hecidina 20

Malla de polipropileno (Cole–Palmer, tamaño de poro 105 μ m), Resina Rink amida, sustitución 0,59 meq/g, N,N,N',N'-Tetrametil-O- (1H-benzotriazol-1-il) uronio hexafluorofosfato (HBTU), O- (1H-6-Clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HCTU) y OxymaPure® provienen de Iris Biotech GmbH; N,N-diisopropiletilamina (DIPEA), azul de bromofenol, N,N-di-metilformamida (DMF), 2-propanol (IPA), diclorometano (DCM), metanol (MeOH), acetonitrilo

(ACN), y dietil eter grado HPLC, piperidina (PP), ácido trifluoroacético (TFA), triisopropilsilano (TIS) (Merck)

3.1.2.3. Medios de Cultivo utilizados para mantenimiento de líneas Celulares: Medio leibovitz L-15 con glutamina (Gibco), suero fetal bovino (FBS, de sus siglas en inglés; Biological Industries), solución de antibiótico Penicilina/Streptomycin (Biological Industries) y Gentamicina (HyCLONE). Gibco™ Tripsina-EDTA (0,25%), rojo de fenol

3.1.2.4. Soluciones y tampones: Tampón fosfato salino (PBS): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,0. Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE): 40mM Tris, 20mM ácido acético (Merck), 1mM de EDTA, pH 8. Buffer Tris-Salino (TBS): Tris 20 mM y NaCl: 150 mM benzocaína (BZ-20, Veterquímica) Triton X-100, Albumina de suero bovino (BSA, de sus siglas en inglés; CALBIOCHEM), Tween (Bio-Rad), DMSO (Dimetilsulfóxido), marcaje de membrana se realizó con Cloruro de octadecil rodamina B, solución de montaje DAPI, solución de quenching (50mM de Cloruro de amonio), solución de bloqueo y permeabilización (TBS 1x, 0,3% de triton, 3% BSA) solución de cristal violeta al 0,5%

3.1.2.5. Anticuerpos utilizados para el desarrollo de inmunofluorescencia: Anticuerpo primario anti-hepcidina (Anticuerpos realizados en el Laboratorio de marcadores inmunológicos en organismos acuáticos). anti-IgG de ratón conjugado Alexa fluor 488 (Thermo Fisher Scientific).

3.1.2.6. Kits comerciales: Extraction de RNA (E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit, Omega Biotek). kit RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit (thermo Scientific). 2X Takyon for SYBR Assay-No ROX (Eurogentec). kit Cell Proliferation Reagent WST-1

3.1.3 Equipos:

Equipo utilizado para la obtención y caracterización de deacilsaponina y hepcidina 20: Concentrador de vacío SpeedVac (Thermo Scientific), liofilizador (Labconco), Cromatógrafo marca Jasco con detector UV-2075 Plus, bomba cuaternaria PU-2089 Plus y autosampler AS-2055 Plus, en una columna Water Corp XBridge™ BEH C18 (100 x 4.6 mm, 3.5 μm) y UFLC-ESI Shimadzu LCMS-2020.

Equipos utilizados para el desarrollo y análisis de muestra en ensayos *in vitro* e *in vivo*: Microscopio de EPI fluorescencia (Leica), Cabina de flujo laminar (LabTech), incubadora celular LBI - 250E (LabTech), Termociclador en tiempo real Ariamx, Termociclador de efecto Peltier AERIS, sistema de electroforesis horizontal (Labnet), Cabina de flujo laminar (LabTech), incubadora celular LBI - 250E (LabTech), Incubadora Orbital (Stuart Scientific), pHmetro EZDO PL-6. micros-

copio invertido Nikon ECLIPSE TS100. lector de microplacas VERSmax (Molecular Devices). Nanodrop (ThermoFisher).

3.2. MÉTODOS

Obtención de la fracción deacilsaponina y síntesis química del péptido hepcidina 20

3.2.1 Extracción de saponinas desde hojas

La extracción de saponinas se efectuó siguiendo la metodología propuesta por Wallace *et al.*, (2016), con modificaciones. Las hojas de *Quillaja saponaria* recolectadas fueron pesadas inmediatamente después de la recolección para determinar su peso húmedo previo a la etapa de secado y posterior extracción. Luego, estas hojas se sometieron a liofilización a -52°C y 0,090 mbar. Las hojas liofilizadas se pesaron nuevamente y se trituraron. Se agregó agua ultra pura a las hojas trituradas en una proporción de 10:1 (agua/peso seco) a temperatura ambiente, con agitación suave durante 4 horas. El extracto resultante se filtró a través de una tela y se sometió

a centrifugación a 5000 g durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, se pasó por unidades de filtración de 0,22 µm, el extracto obtenido se liofilizó. Cuando se logro estandarizar el protocolo de extracción se realizo un lote de 45 g peso seco.

3.2.1.1 Purificación de saponinas

Del extracto liofilizado se pesaron 200 mg, los cuales fueron purificados mediante columnas una fase sólida de gel de sílice C-18 dispuestas en paralelo a un sistema de vacío (Columna Waters SepPak C-18 (1000mg)). La elución se realizó utilizando un gradiente de metanol (desde 0% hasta 100%) en agua. Para eliminar por completo el metanol, las muestras se sometieron a un concentrador de vacío SpeedVac durante 4 horas. Una vez eliminado el metanol, se procedió a la liofilización de las muestras.

Para la caracterización se pesaron 5 mg/ml del estándar QuilA y de cada fracción obtenida durante el proceso de purificación y 2mg/ml de cada fracción purificada. Estas muestras se analizaron a través de RT-HPLC. Se empleó una columna de Water CorpX Bridge™ BEH C4 (100 x 4.6 mm, 3.5 µm) y se aplicó un gradiente de acetonitrilo (ACN) desde 0% hasta 85% en un período de 25 minutos. La detección se realizó a 214 nm.

3.2.1.2. Hidrolisis alcalina

Tras la purificación del extracto de saponina se trabajó de manera conjunta las fracciones 80 y 100% MeOH debido a que mostraron un perfil similar al estándar Quil A. La hidrolisis alcalina se efectuó siguiendo la metodología propuesta pillon *et al.*, (1996). Se pesó 20 mg del extracto de saponina y fueron disueltos en 1 ml de la solución de NaOH 2M, se dejó en agitación suave durante una hora, la reacción se detuvo con la adición de 400 µl de Ácido acético. Posteriormente la solución fue rotavaporada para la eliminación del ácido acético, finalmente fue liofilizada. se pesó 10 mg de la fracción obtenida los cuales fueron disuelto en 1 mL de agua MilliQ para ser desalinizados mediante filtración en gel usando columnas de Sephadex G10. Una vez cargada la columna fue lavada con 4 mL de agua. La fracción obtenida fue liofilizada y utilizada para los ensayos *in vitro*. Tras la estandarización de la hidrolisis, se realizó el método el método con las saponinas obtenidas desde hojas (3,7 gramos)

3.2.2. Síntesis química de péptidos

La síntesis de péptidos se realizó de acuerdo a los Procedimientos Operativos Estandarizados (POE) del Laboratorio de Péptidos del Núcleo de Biotecnología Curauma (NBC) de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile (Guzmán *et al.*, 2021). Para la síntesis de los péptidos desde sus extremos C-terminal, se empleó una resina Rink amida MBHA. Los aminoácidos se

acoplaron distintos agentes activadores, TBTU, HBTU o HCTU; Oxima para evitar racemización y N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) para basificar el medio (Guzmán *et al.*, 2020, 2021).

Para la construcción de las bolsas se usaron láminas de malla de polipropileno (Número en catalogo F7221030-72 – www.lumiteinc.com) y todos los aminoácidos utilizados corresponden a L-aminoácidos protegidos con Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonil).

3.2.2.1. Síntesis química de péptidos mediante estrategia Fmoc

La metodología reportada por (Guzmán *et al.*, 2020, 2021; Luna *et al.*, 2016), fue utilizada para la síntesis de péptidos. Se ingresaron las secuencias peptídicas a sintetizar, sus respectivas familias, secuencia, numero de bolsa, número de residuos, y demás datos solicitados por el programa ACUAPEPTIDE SÍNTESIS (disponible en: <http://www.acuapeptide.cl/programas.html>) de síntesis simultánea de péptidos, desarrollado por el Laboratorio de Péptidos del NBC (Guzmán *et al.*, 2021).

3.2.2.2. Preparación de las “bolsas de té”: Se imprimieron cuadrados de 2.5 × 2.5 cm en la malla de polipropileno, posteriormente se sellaron y cortaron individualmente. Las bolsas se rellenan con aproximadamente 40 mg de resina (0.55 mmol/g de sustitución) (Guzmán *et al.*, 2021).

3.2.2.3. Desprotección: Las bolsas se agregaron en un solo recipiente de reacción, y se adicionó piperidina al 20% en DMF hasta cubrirlas. Se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 10 minutos. El procedimiento se realizó dos veces descartando las soluciones en cada paso. Posteriormente, la resina se lavó tres veces con DMF (1 min), una vez con IPA (1 min), una vez con azul de bromofenol (2 min) para monitorear el acople (azul indica presencia de aminas libres, amarillo indica ausencia de amina libre), dos veces con DMF (1 min), y dos veces con diclorometano (1min) (Guzmán *et al.*, 2021).

3.2.2.4. Acoples: Se realizó un primer acople, utilizando botellas plásticas etiquetadas y para cada aminoácido se agregó el volumen necesario de aminoácido indicado en la pauta de síntesis. A continuación, se agregó la cantidad del activador (TBTU). Cada paso fue realizado por dos profesionales, tal como está estipulado por el protocolo organizado estándar (POEs) del Laboratorio de Péptidos del NBC, para garantizar la supervisión y doble chequeo en la preparación de los aminoácidos (Guzmán *et al.*, 2021).

Se hizo la distribución de las bolsas en las botellas plásticas que contienen aminoácido y activador de manera horizontal en orden alfabético. Los POEs del Laboratorio de Péptidos del NBC recomiendan que este procedimiento sea realizado por dos profesionales, uno que distribuye las

bolsas y otro que, guiándose por el documento, le indique su ubicación según el correspondiente aminoácido, y así evitar errores. Seguidamente, se introducen las bolsas a sus respectivos frascos se agrega la base DIPEA y se deja en agitación por 2 horas (Guzmán *et al.*, 2021).

Posteriormente se realizó un doble acople con un activador distinto al utilizado en el primer acople (HBTU), para asegurar el acoplamiento del aminoácido en la secuencia. En algunos casos fue necesario realizar un tercer acople con un activador distinto a los utilizados previamente (HCTU o DIC). Finalizada la síntesis de péptidos, se tomó unas 2 bolsas con 40 mg de resina para el acoplamiento de fluoresceína.

3.2.2.5. Clivaje: Finalizada la elongación del péptido, se realizó el procedimiento de clivaje con ácido trifluoroacético/agua/trihidroxipropilsilano (TFA/H₂O/TIS) (95:2.5:2.5) con el fin de desanclarlo de la resina y quitar todos los grupos protectores de las cadenas laterales. Se incorporaron utilizaron tubos de 15 mL. Una vez incorporada la solución de clivaje, se dejaron en agitación durante 3 horas, luego se precipitó la con 3 mL éter frío. La aparición de un sólido blanco lechoso correspondiente al péptido deseado fue centrifugado a 7000 rpm a 4 °C durante 15 minutos y lavado sucesivamente con éter. El sólido obtenido fue secado, disuelto en agua y finalmente liofilizado.

3.2.2.6. Purificación de los péptidos

Purificación mediante extracción en fase sólida (SPE): Para la purificación se utilizaron columnas que contienen una fase sólida de gel de sílice C-18 (Columna Waters SepPak C-18). La C-18 es una fase sólida para purificar péptidos entre 1000 y 6000 Da, y se eluye con diferentes porcentajes ascendentes de acetonitrilo en agua. Las moléculas hidrofílicas, eluyen a porcentaje de acetonitrilo bajos, y los más hidrofóbicos con el incremento en el porcentaje de acetonitrilo. Con este procedimiento se separan péptidos de diferente hidrofobicidad, contaminantes del péptido de interés y péptidos con grupos protectores, los cuales son productos de las síntesis de péptido (Guzmán *et al.*, 2021).

Cada columna Waters Sep-Pak C-18 (de 500 mg) se activó con 2 mL de metanol (grado HPLC) con un flujo de 1 ml/min, la que posteriormente se lavó con 2 mL de agua ultra pura. Cada péptido se disolvió en menos de 1 mL de agua ultra pura y se pasó cuatro veces por la columna para asegurar su retención en la misma. Para la elución, se utilizó acetonitrilo (grado HPLC) y soluciones de acetonitrilo en concentraciones de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 60% y 100%. Posteriormente, el acetonitrilo de cada una de las eluciones fue evaporado por centrifugación en un concentrador al vacío SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, Estados Unidos).

3.2.2.7. Liofilización de péptidos

Una vez desalinizados y purificados, los péptidos fueron congelados utilizando nitrógeno líquido (congelación rápida), permitiendo la formación de pequeños cristales de agua, que no suponen un peligro para la estructura del péptido, a diferencia de lo que ocurriría con una congelación lenta. Además, este proceso protege al péptido de posible daño microbiológico producido por bacterias u hongos para ser posteriormente liofilizados empleando un Liofilizador Labconco Free-Zone (Labconco Corporation, Kansas City, MO, Estados Unidos).

3.2.2.8. Oxidación del péptido Hecpidina

Un total de 10 mg del péptido crudo se disolvieron en una solución de ácido acético al 50 % (v/v) en agua, y posteriormente se diluyeron en 32 mL de buffer de oxidación compuesto por 10 % de alcohol isopropílico y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO). El pH de la solución se ajustó a 5,8 mediante la adición de NH_4OH , y la mezcla se sometió a oxidación por exposición al aire a temperatura ambiente durante 18 horas. Antes del proceso de purificación con cartucho Sep-Pak C18, el pH se redujo a 2,5 para estabilizar el péptido oxidado.

Las sales remanentes del péptido crudo se eliminaron mediante elución en una columna Sephadex G-10. Posteriormente, las fracciones obtenidas se aplicaron a un cartucho Sep-Pak C18 Vac, previamente equilibrado con agua acidificada (0,05 % de ácido trifluoroacético en agua ultrapura, UPW). Tras un lavado con agua acidificada, los péptidos se eluyeron a un caudal de 1 mL/min utilizando acetonitrilo (ACN) en gradientes de 5 %, 20 %, 40 %, 60 % y 80 % en agua. Las fracciones correspondientes se recolectaron y el ACN se eliminó mediante evaporación centrífuga en un SpeedVac.

3.2.2.9. Caracterización de los péptidos sintetizados

Caracterización por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS): Se utilizó la técnica de LC-MS para determinar el peso molecular (PM) de los péptidos sintéticos y así comprobar su identidad. El equipo empleado fue un Espectrómetro de Masas LCMS-2020 Shimadzu, compuesto por: sistema binario de bombas LC-20AD Shimadzu; autosampler SIL-20A HT Shimadzu; módulo de comunicación CBM-20A Shimadzu; detector de arreglo de diodos SPD-M20A Shimadzu; horno de columna CTO-20AC; bomba de alto vacío Edwards E2M28; lámpara de deuterio Shimadzu; generador de nitrógeno Mistral LCMS V-1, software Lab Solutions v5.42 SP3 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón). El tipo de ionización empleado fue electrospray (ESI). La muestra se ionizó por aplicación de voltaje de 3-5kV y pasó por un nebulizador generando microgotas, las cuales se someten a temperaturas de 200-250°C. El solvente, al evapo-

rarse, concentra los iones cargados hasta que ocurre una explosión coulombica por repulsión de cargas, y los iones ahora en estado libre entran por vacío al analizador de masas (cuadrupolo) y llegan al detector de masas. La señal que generan es intensidad de corriente y una misma muestra, si tiene grupos ácidos o básicos (sitios de protonación/deprotonación) múltiples, puede generar un espectro con varias señales, cada una representa una relación masa carga (m/z) en donde el peso molecular original está dividido por la carga (+1, +2, +3, -1, -2, -3, etc).

Se tomaron entre 0.1 – 0.5 mg de cada péptido sintético y se disolvió en agua ultra pura a 1 mg/mL. Las muestras se corrieron según los parámetros establecidos por el Laboratorio de Péptidos del NBC en sus POE de la siguiente manera: la fase móvil fue ácido fórmico al 0.1% en agua (A) y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (B); la condición inicial de gradiente fue 100% de A cambiando linealmente a 100% de B en 12 min, y el volumen de inyección fue 10 μ L. La longitud de onda del detector de arreglo de diodos fue de 214 nm. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de m/z 100 – 1900.

Caracterización por cromatografía líquida (RP-HPLC): Se realizó cromatografía líquida de fase reversa de alta eficacia (RP-HPLC) con un equipo HPLC JASCO (Jasco Corporation, Tokio, Japón) compuesto por: autosampler con capacidad para 50 muestras, modelo AS-2055 Plus; bomba cuaternaria, modelo PU-2089 Plus; detector UV-Visible, modelo UV-2075 Plus; interfase con capacidad para cuatro canales, modelo LC-Net II/ADC, para determinar la pureza de los péptidos sintetizados utilizando una columna Waters C-18 (tamaño de partícula 3.5 μ m y dimensiones 4.6 mm x 100 mm) como fase estacionaria. Las muestras fueron diluidas a razón de 1 mg de péptido en 1 mL de agua ultra pura y corridas a un flujo de 1 mL/min con una fase móvil constituida por: (A) acetonitrilo (ACN) con ácido trifluoroacético (TFA) 0.05% (v/v), y (B) H₂O con 0.05% (v/v) de (TFA). Se utilizó un método en gradiente de 0-70% (v/v) de ACN durante 8 minutos; volumen de inyección 100 μ L; la detección fue monitoreada a una longitud de onda de 214 nm.

Determinación de la concentración no toxica para el uso de la coadministración de deacilsaponina con Hepcidina 20 (Ds/Hep20)

3.2.3. Ensayo de Hemólisis

Para determinar la capacidad hemolítica de la fracción Ds, Se obtuvieron eritrocitos a partir de sangre de peces trucha arcoíris. El cual fue sacrificado a través de una sobredosis de benzocaína, se agregó 1 ml de benzocaína en 1L de agua. Se recolectó 1 ml de sangre del arco hemal en el pedúnculo caudal usando jeringas de 3 ml (agujas 21Gx 11/2) la cual fue agregada en un

tubo falcón de 15 ml que contenía anticoagulante heparina (20 unid/ml), se mezcló por inmersión e inmediatamente se centrifugo a 2000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y al pellet (eritrocitos) se le adicionó un volumen equivalente de PBS 1X. El ciclo de centrifugación fue repetido 3 veces. Los eritrocitos obtenidos son resuspendido en PBS 1X (10 veces el volumen inicial de la muestra de sangre). En paralelo se preparó una solución stock de deacilsaponina (2 mg/mL) disuelta en PBS1X, a partir del stock se prepararon las concentraciones finales de 5, 20, 50, 100, 200 y 450 µM, de acuerdo con el método descrito por Pillon et al. (1996) con modificaciones. En un tubo eppendorf se agregan 65 µl de eritrocito y 65 de la solución que contiene deacilsaponina por triplicado. Como control positivo fue usado 0,5% Triton X-100. Las soluciones fueron incubadas en agitación suave (100 rpm) a 37°C por 1 hora, transcurrido el tiempo de incubación se realizó una centrifugación a 3000 x g por 5 min. Se tomó 80 µl del sobrenadante y se adicionó la misma cantidad de agua ultrapura en una placa de 96 pocillos (Costar-Corning Life Sciences)., luego se midió la absorbancia 540 nm. Finalmente, para calcular la actividad hemolítica se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ AH} = ((A_m/A_{100\%}) - A_0\%)*100\%$$

Donde:

A_m = Absorbancia de la muestra

$A_{100\%}$ = Absorbancia control 100% hemólisis

3.2.4. Mantenimiento de líneas Celulares

3.2.4.1 Línea celular RTS11: Se compone de dos tipos celulares: Células en suspensión (monocito y tipo macrófago) y células Adherente (macrófagos) trucha arcoíris (Ganassin *et al.*, 1998). Se tomaron 3 viales que contenía el stock de RTS11 desde el - 80, una vez descongelado se tomaron y se adicionaron a un tubo de 15 ml que contenía medio L-15 con FBS al 30%, se realizó una centrifugación de 180 g por 5 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con 10 ml de medio L-15 con FBS al 30% se tomaron los 10 ml y fueron adicionados a una botella de cultivo de 25 cm² (Corning). Las células se incubaron a 20°C en una incubadora celular. El crecimiento del cultivo fue monitoreado mediante un microscopio invertido. Una vez alcanzada un 60% de la confluencia, las células fueron despegada usando un raspador celular, luego la mitad del medio con células se traspasó a una nueva botella de cultivo de 25 cm² (Corning) y completado con medio fresco.

3.2.4.2. Línea celular RTGutGC: Línea celular proveniente de intestino de trucha arcoíris se caracterizan por ser células del tipo adherentes (Minghetti *et al.*, 2017). Para el mantenimiento de esta línea celular RTGutGC se utilizó botellas de cultivo T 75 cm² (Corning) y medio L-15 con FBS al 10 %, se mantuvo a una temperatura de incubación 20°C. Para la generación de subcultivos, una vez alcanzada la confluencia, se quitó el medio de cultivo y fue lavado 3 veces con PBS 1X, con la finalidad de remover los restos de medios. Realizado los lavados, las células fueron separadas en adición tripsina 0,25% en PBS con un periodo de incubación de 5 min. Finalmente, la reacción de la en fue detenida con la adición de medio L-15 suplementado. La suspensión celular fue centrifugada a 180 g a 17°C durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante, el pellet fue suspendido en medio L-15 suplementado y llevado a una botella de cultivo de T175 cm² (Corning).

3.2.5. Ensayo de Viabilidad en la línea Celular RTS11

Para el ensayo de viabilidad se utilizó el kit Cell proliferación Regent WST-1 siguiendo las instrucciones del proveedor. Para este ensayo fueron necesaria 5x10⁴ células por pocillo y se usó placas de 96 pocillos. Las células fueron acondicionadas durante 24 h. Al siguiente día las células fueron estimuladas con la fracción Ds a diferentes concentraciones [5,10,15,20,50 µM] el rango de concentraciones administrado se determinó a partir de la actividad hemolítica medida, como control positivo se utilizó 10% DMSO y como control negativo tampón PBS 1x. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Las células estimuladas fueron incubadas durante 24 horas a 20°C, transcurrido el tiempo se adicionó 10 µl del reactivo WST1 y se incubó durante 4 horas a 20°C, finalizado el tiempo de incubación se midió la absorbancia a 450 nm, utilizando un lector de microplacas. Los resultados obtenidos de las mediciones de absorbancias se les fue restado el blanco, el cual correspondía a el medio de cultivo en ausencia de células.

3.2.6 Ensayo de citotoxicidad en la línea Celular RTGutGC

Para medir la citotoxicidad de la fracción Ds en la línea celular RTgutGC se utilizó la técnica tinción de cristal violeta 0.5%. Para este ensayo se sembraron 2x10⁴ células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células fueron aclimatadas por 24 horas a 20°C, para promover la adhesión. Al siguiente día las células fueron estimuladas con la fracción Ds a diferentes concentraciones [5,10,15,20,50 µM] el rango de concentraciones administrado se determinó a partir de la actividad hemolítica medida. Como control positivo se utilizó 10% DMSO y como control negativo se utilizó solución tampón PBS. Cada tratamiento se hizo por triplicado, incluyendo los controles.

Las células estimuladas fueron incubadas durante 24 horas a 20°C. Terminado el tiempo de incubación fue retirado el medio y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído y una vez agregado a la placa esta se mantuvo en agitación durante 10 minutos. Finalizado el tiempo de incubación la placa fue lavada con agua potable y secada. Se agregó la solución de cristal violeta al 0,5%, manteniendo la placa en agitación durante 20 min. Luego la placa fue lavada con agua potable y secada. Pasado 24 horas se adicionó metanol, se mantuvo en agitación durante 20 min y finalmente, se midió la absorbancia a 570 utilizando un lector de microplacas.

Efecto de la fracción deacilsaponina sobre la traspaso e internalización de Hep20 en líneas celulares

3.2.7 Ensayo de traspaso de Hep20 en presencia de DS por la monocapa RTGutGC

Para el desarrollo del ensayo de traspaso es necesaria la formación de un modelo de barrera intestinal de dos compartimentos. Para ello se utilizaron placas de 6 pocillos con insertos (transwell), con un tamaño de poro de 0,4 μm en donde fueron sembradas células RTGutGC a una concentración de 1×10^5 células/ml en su lado apical, y el compartimiento basolateral se llenó con 1 ml de L-15 con SFB al 10%. Las células RTGutGC se mantuvieron en cultivo durante dos semanas a 20 °C, según Wang et al. (2019). Durante este periodo, se realizaron cambios de medio una vez por semana tanto en los compartimientos apicales como basolaterales. Una vez formada el monocapa celular en la cámara apical, las células fueron expuestas a una concentración determinada de hepcidina 20 acoplada a fluoresceína (Hep20-FITC, 100 μM) y a la coadministración de deacilsaponina con Hep20 (Ds/Hep 20) a una concentración 20 μM de Ds y 100 μM de hep20-FITC. La concentración de Ds se definió en función de los resultados del ensayo de citotoxicidad, mientras que la concentración de Hep20 se seleccionó deliberadamente alta con el objetivo de favorecer su detección y cuantificación durante el ensayo de translocación. Para ello, se estableció previamente una curva estándar de fluorescencia con concentraciones de Hep20-FITC entre 0 y 100 μM . Las soluciones correspondientes se añadieron al compartimiento apical de los pocillos que contenían las monocapa de RTGutGC. Posteriormente, se recolectaron 100 μL de medio de cultivo desde la cámara basolateral en los intervalos de 1, 3, 6 y 24 horas. De cada punto de muestreo se tomaron 25 μL para la medición de fluorescencia, la cual se realizó en un termociclador AriaMX (Agilent Technologies). Transcurridas las 24 horas de exposición, se retiró la malla sobre la cual se encontraba formada el monocapa celular. Para el marcaje de membrana, las células se incubaron con cloruro de octadecil rodamina B (1:3000) durante 30

minutos. Posteriormente, se realizó el marcaje nuclear utilizando un medio de montaje conteniendo DAPI.

3.2.8. Detección mediante inmunofluorescencia hep20 tras coadministración Ds/hep20 en las líneas celulares RTS11 y RTgutGC.

Las células RST11 y RTGutGC se sembraron a una concentración de 1×10^6 células/ml y 2×10^5 células/ml en placa de 24 pocillos que contenían cubre objeto respectivamente. Las células fueron acondicionadas durante 24 horas y posteriormente estimuladas con Hep20 [10 μ M] según Álvarez *et al.*, (2022) y la combinación Hep20/Ds [10 μ M /20 μ M] a diferentes tiempos de incubación (3, 6 y 24 horas). Una vez finalizado el tiempo se extrajo el medio y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 10 min. La solución de fijación fue extraída y se agregó la solución de permeabilización y bloqueo durante 30 min. Para la detección de Hep20 se utilizó el anticuerpo primario anti-hepcidina generado en ratón (1:100) y se mantuvo en incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (1:750) conjugado Alexa flúor 488 durante 1 hora a temperatura ambiente. El marcaje de membrana se realizó con Cloruro de octadecil rodamina B (1:3000) durante 30 min, para el marcaje nuclear se utilizó el medio montaje con DAPI. Finalmente, las imágenes fueron obtenidas utilizando una cámara LEICA DFC 450C microscopio de EPI fluorescencia.

Efecto inmunomodulador de la coadministración deacilsaponina y hepcidina 20 en la línea celular RTS11

3.2.9. Estimulación de la línea RTS11 con la combinación Hep20/Ds

La línea celular RTS11 se mantenían de acuerdo con el apartado 3.1.1.3. Se cultivaron hasta alcanzar una alta densidad celular. Para el análisis transcripcional las células fueron sembradas en placas de 12 pocillo en una concentración de 1×10^6 células/ml para cada pocillo. Las células fueron acondicionadas durante 24 h y posteriormente estimuladas con Hep20 [10 μ M], la fracción Ds [20 μ M] y la combinación Hep20/Ds [10 μ M/ 20 μ M] a diferentes tiempos de incubación 6, 12 y 24 horas, también se incluyeron pocillos de control no tratados, cada condición tenía 4 réplicas experimentales. Los tiempos evaluados se establecieron siguiendo la metodología propuesta por Álvarez *et al.* (2022).

3.2.9.1. Extracción ARN

Terminado los distintos tiempos de incubación se realizó extracción de ARN mediante la utilización del kit E.Z.N.A.® Total RNA Kit I. Se tomo el medio de cada pocillo tratado y fue depositado en un tubo eppendorff, luego las células fueron centrifugadas a 180 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionó 700 µl del buffer de lisis TRK. Posteriormente se agregó 700 µl Etanol al 70% y las muestras fueron agitadas durante 10 segundos. La solución se pasó a las columnas y se centrifugó a 10000 g durante 1 minuto. Seguidamente se realizaron lavados utilizando las soluciones de lavado 1 y 2 pertenecientes al kit. Finalmente, la elución del RNA se realizó mediante la adición de agua grado biología molecular a las columnas de agua grado biología molecular. Añadida el agua, se incubó durante 10 min y luego se centrifugo a 12000 g durante 2 minutos. La concentración de ARN fue determinada a través del uso de Nanodrop (Thermo Fisher). La integridad de la muestra se verificó mediante un gel de agarosa (Cleaner Scientific) al 1% en buffer TAE.

3.2.9.2. Síntesis de cadena complementaria de ADN (ADNc)

Posterior a la extracción de ARN se realizó la reacción de retrotranscripción para la síntesis de ADNc mediante el kit RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit, utilizando 200 ng de ARN total y oligo(dT). El perfil térmico utilizado fue el siguiente: 5 minutos a 65°Celsius, 60 minutos a 42°Celsius y 5 minutos a 70°Celsius.

3.2.9.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Para determinar la expresión relativa de genes asociados a la inmunomodulación se evaluaron tres citoquinas, *tnfa*, *il1β* (proinflamatoria) y *il10* (antiinflamatoria). Por lo tanto, se utilizaron los partidores diseñados en el laboratorio de marcadores inmunológicos en organismo acuáticos ver en la tabla 3.1 La reacción para el desarrollo del PCR en tiempo real, fueron realizada ocupando los siguientes componentes: Takyon 5 µl, oligonucleótidos (100 nM) 0.2 µl, 1µl de ADNc y agua libre de nucleasas, hasta completar un volumen final de 10 µl. La mezcla se homogenizó y se llevó a un termociclador en tiempo real ARIAmx. El perfil térmico utilizado fue el siguiente: 1 etapa de desaturación (95°Celsius, 10 minutos), seguido de 40 ciclos compuestos por: 15 segundos de denaturación a 95°Celsius, 15 segundos de hibridación a 60°Celsius y 15 segundos de extensión a 72°Celsius. Adicionalmente, se realizó una curva de disociación con un perfil térmico de: 10 segundos a 95°Celsius, 10 segundos a 25°Celsius, 1 segundo a 70°Celsius y 1 segundo a 95°Celsius. Para el cálculo de la expresión relativa (R) se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, el cual ex-

presa la proporción obtenida de la relación entre los valores del ciclo umbral (Ct) de la muestra y los valores Ct del gen de referencia. Se utilizó como gen de referencia el factor de elongación 1 α (*ELF1* α). El cálculo descrito anteriormente se resume en la siguiente ecuación: $R=2^{-[\Delta Ct \text{ gen diana} - \Delta Ct \text{ gen referencia}]}$ y la expresión relativa de los genes fue calculada mediante la estimación del $\Delta\Delta Ct$ respecto al gen de referencia *ELF1* α y normalizando con el grupo control.

Tabla 3.1. Partidores utilizados para evaluar citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias

Gen	Secuencia	Eficiencia	
<i>TNFα</i>	CTGTGTGGCGTTCTCTTAATAGCAGCTT	1,9	Álvarez <i>et al.</i> , 2022
	CATTCCGTCCTGCATCGTTGC		
<i>IL10</i>	GCTATGGACAGCATCCTGAAGT	1,9	Álvarez <i>et al.</i> , 2022
	CGATGGAGTCGATGGGAGATTTA		
<i>IL1β</i>	GTCACATTGCCAACCTCATCATCG	1,98	Álvarez <i>et al.</i> , 2022
	GTTGAGCAGGTCCTTGTCTTGAA		
<i>ELF-1α</i>	GTCTACAAAATCGGCGGTAT	1,99	Álvarez <i>et al.</i> , 2022
	CTTGACGGACACGTTCTTGA		

3.2.10. Coadministración de Ds/hep20 vía inyección intraperitoneal en trucha arcoíris

Los peces fueron mantenidos y sacrificados de acuerdo con protocolos de manejo animal aprobados por el comité de bioética de la PUCV. Las truchas arcoíris tenían un peso entre 40 a 50 g y tras 7 días de aclimatación se separaron de forma aleatoria 4 individuos por estanque. Los tratamientos fueron administrados vía inyección intraperitoneal y consistieron en 4 grupos: control (PBS), Hep20 [20 μ g] Álvarez *et al.*, (2016), Ds [40 μ g] modificada de Vinay *et al.*, (2014) y Ds/hep20 [20 μ g/ 40 μ g]. Después de 24 hora post-inyección, los individuos fueron sacrificados a través de una sobredosis de benzocaína. Posteriormente cada individuo fue diseccionado en una campana de flujo laminar, se extrajo el riñón anterior y bazo. Ambos órganos fueron guardados en RNA $later$ y congelados a -80 °C.

3.2.10.1. Homogenización y extracción de RNA desde muestras de órganos de trucha arcoíris (Método Trizol)

Se tomaron los órganos contenidos en RNA later , se cortó una porción de tejido de 3x5 mm y se depositó inmediatamente en un tubo de 2ml tapa rosca, el cual contenía 3 cuentas de acero inoxidable y 700 μl del reactivo trizol. Estos fueron llevados al homogeneizador de tejido, con un programa de 3 ciclos de 35 segundos a una potencia de 5,5 m/s con pausas de 5 minutos entre cada ciclo. Los homogenizados fueron centrifugados a 10000 g por 15 minutos a 4°C, para la eliminación de debris celular. El sobrenadante de trizol fue recolectado en un nuevo tubo ependorff libre de nucleasas, se agregó 150 μl de cloroformo se agitó fuertemente por 15 seg y se dejó reposar por otros 5 minutos. Luego se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C. se tomó el sobrenadante al cual se le agrego 700 μl de isopropanol, para la precipitación del ARN, la solución se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 10 minutos. Luego fue centrifugada a 12000 g por 15 minutos descartando el sobrenadante. El pellet fue lavado con etanol al 75% y centrifugado a 7500 g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante. El pellet se dejó secar bajo campana. Para la eliminación de DNA las muestras fueron tratadas con mix de DNasa I (21,5 μl agua biomolecular, 2,5 μl de buffer DNasa I y 1 μl de DNasa I) e incubadas a 37°C por 30 minutos. Para detener la acción de la DNasa I se agregó 25 μl acetato de sodio en una dilución 1:5 a esta misma solución fue agregado 100 μl isopropanol e incubados durante 10 minutos, posteriormente la solución fue centrifugada a 12000 g por 15 minutos se descartó el sobrenadante, finalmente el pellet resultante se lavó con 500 μl de etanol al 75% y luego fue centrifugado en las condiciones mencionadas anteriormente. Una vez descartado el sobrenadante, el pellet fue secado bajo campana, resuspendido en 50 μl de agua biomolecular y congeladas a -80°C. Al día siguiente, se cuantificó por nanodrop y se visualizaron 5 muestras al azar en gel de agarosa, cargando 1 μg por muestra para verificar pureza e integridad. Para el siguiente procedimiento de síntesis de cDNA y análisis de transcripcional se realizó de igual manera que el apartado 3.2.9.2. y 3.2.9.3.

3.2.11. Efecto en modulación trucha arcoiris alimentado con dieta suplementada con la coadministración Ds/hep20

3.2.11.1. Formulación de las Dietas Experimentales

Se formularon un total de cuatro dietas experimentales a partir de un *pellet* comercial base de 2 mm de diámetro (las concentraciones utilizadas para cada tratamiento se especifican en la Tabla 3.2). El proceso de formulación, se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, consistió la encapsulación y en la incorporación de cada tratamiento al *pellet* mediante la técnica de aceitado (*coating*).

Para este proceso, se preparó la suspensión activa mezclando lentamente cada tratamiento con el aceite portador en un vaso de precipitado de 500 mL. La mezcla se agitó durante 5 minutos

utilizando un mezclador mecánico (Dragon Lab, modelo OS20-S), manteniendo la suspensión en agitación constante con un agitador magnético (Thermolyne Nuova II) para asegurar su homogeneidad.

Finalmente, la suspensión activa fue incorporada al *pellet* utilizando una bomba de vacío (Precisión, S35) conectada a un recipiente plástico de 2 litros de capacidad. En este recipiente, se mezclaron 500 g de *pellet* con la suspensión de cada tratamiento de manera independiente (según el esquema detallado en la Tabla de Dietas), aprovechando el vacío para garantizar la correcta absorción del aceite y el compuesto activo por la matriz del *pellet*. Las concentraciones de hep20 fue establecida según la metodología utilizada por Mercado et al., (2017). Proyecto FIE-2015-V014 y para DS según Francis et al., (2002)

Tabla 3.2 Resumen de la formulación de dietas, las concentraciones de la dieta utilizadas se b

Dietas	Tratamientos	Cantidades (mg)	Concentración	Total
Dieta 1	Control	-----	-----	500 g
Dieta 2	Hep20	0,15	150µg/ kg pez	500 g
Dieta 3	Ds	0,204	240µg/kg pez	500 g
Dieta 4	Hep20/Ds	0,15 + 0,204	150µg/kg pez+ 240µg/kg pez	500 g

3.2.11.2. Administración oral de las dietas experimentales

Los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Organismo de Bienestar Animal y el Comité de Ética de la Investigación de la UMH, así como por la autoridad competente de la Consejería de Presidencia y de Agricultura, Pesca, Alimentación y Agua. El cuidado de los animales y todas las actividades que implican manipulación y experimentación con animales se realizaron de acuerdo con las normativas y recomendaciones españolas [Real Decreto 1201/2005] y de la UE [Directiva UE EC86/609 y Apéndice A del Convenio ETS123, 2007/526/CE] para la experimentación animal.

Para la realización de este ensayo se utilizaron 52 peces truchas arcoíris juveniles de 10 a 15 gramos aproximadamente, los cuales fueron aclimatados unas semanas antes de la experimentación y fueron alimentados con dieta control. Finalizado el tiempo de aclimatación, los peces fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos con un total de 13 peces por estanque, cada es-

tanque estaba bajo condiciones controlada a temperatura de 14 Celsius, con un sistema de recirculación de agua decolorada y microfiltrada en un fotoperiodo 12 horas día/12 horas noche.

Los peces fueron alimentados una vez al día a una tasa equivalente al 1 % de su peso corporal, recibiendo su respectivo tratamiento durante un periodo de 21 días. Se realizaron muestreos a los 7, 14 y 21 días, extrayendo tres ejemplares por estanque en cada punto temporal. Los peces seleccionados fueron sacrificados mediante sobreexposición a metanosulfonato de tricaína (MS-222; Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 0,2 g/L y posteriormente disecados según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.7.

Durante el experimento se registró mortalidad el día 7 en los tratamientos Control, DS y Hep20; sin embargo, esta no mostró un patrón consistente asociado al tratamiento experimental. Por este motivo, el análisis y muestreo final se consideraron hasta el día 14.

3.2.11.3. Homogenización y extracción de ARN desde muestras de órganos de trucha arcoíris (método kit E.Z.N.A)

Se tomaron los órganos contenidos en RNA^{later}, cortando una porción de tejido de 3x5 mm la que se depositó inmediatamente en un tubo de 2ml tapa rosca, que contenía 3 cuentas de acero inoxidable con 700 µl de buffer TRK y fueron llevados al homogeneizador de tejido, con un programa de 3 ciclos de 35 segundos a una potencia de 5,5 m/s con pausas de 5 minutos en entre cada ciclo. Los homogenizados fueron centrifugados a 10000 g por 15 minutos a 4°C, para la eliminación de debris celular. Se tomó el sobrenadante y se continuó de acuerdo al apartado 3.2.9.1., 3.2.9.2. y 3.2.9.3.

3.2.12. Análisis estadístico

El análisis de datos y la construcción de gráficos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.0 para Windows). La normalidad de los datos fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y la presencia de valores atípicos se verificó mediante la prueba de Grubb's. En los ensayos realizados con líneas celulares, los resultados se analizaron inicialmente mediante una prueba t de Student (dos colas) y ano ANOVA de una vía (Dunnett) para comparar tratamientos individuales, siempre que los datos cumplieran los supuestos de normalidad. Cuando no se cumplían dichos supuestos, se aplicó un ANOVA de una vía no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis) para comparar múltiples grupos experimentales. Los resultados se expresan como promedio $\pm$ desviación estándar y se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,001$ (***) $p < 0,01$ (**) $p < 0,05$ (*).

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1- Caracterización de la fracción deacilsaponina desde hojas de quillay

Obtención de Saponinas desde hojas de quillay

El proceso de obtención de saponinas a partir de hojas de Quillaja saponaria se realizó mediante extracción acuosa y purificación en fase sólida, seguida de hidrólisis alcalina para obtener la fracción deacilsaponina (Ds). A partir de 100,63 g de hojas frescas se obtuvieron 45 g de material seco (44,7 % del peso inicial). Posteriormente, se logró un rendimiento del 27,1 % tras la extracción, un 30,3 % luego de la purificación, y finalmente un 81,1 % tras la hidrólisis (Tabla 4.1). En conjunto, el rendimiento global del proceso desde el material fresco hasta la fracción hidrolizada fue de aproximadamente 3,0 %

Tabla 4.1 Rendimiento de obtención de la fracción deacilsaponina desde hojas de *Quillaja saponaria*

Etapa	Gramos	% Rendimiento
Peso húmedo	100,63 g	
Peso seco	45,0	44,7
Extracción	12,2	27,1
Purificación	3,7	30,3
Hidrolisis	3,0	81,1

Para determinar el contenido de saponinas del extracto obtenido tras la purificación en gradiente de 0 a 100% de MEOH. Se analizaron de acuerdo a los perfiles cromatográficos de cada fracción. En primera instancia se comparó los perfiles de las fracciones obtenidas con las saponinas comercial fue comparada con saponinas de corteza de quillay comerciales grado practico estas poseen un 25 a 35% de saponinas, el resto de componentes son otros polifenoles, benzoatos. los resultados mostraron (figura 4 A) que la fracción 80% y 100% MEOH estaba libre de los compuestos mencionados, por lo cual fue comparada con el estándar QuilA. Se observo que los perfiles de la fracción 80 % correspondía el perfil cromatográfico el tiempo de retención expuesto por el estándar QuilA, Por esta razón se utilizó la fracción 80% para ser hidrolizada, en paralelo también se hidrolizo el estándar. Los resultados mostraron que al someter a hidrolisis el tiempo de retención disminuye. Este fenómeno se en la figura 4C donde se observa que la fracción 80 y estándar que se sometió a hidrolisis, presentan el mismo perfil cromatográfico.

La determinación del contenido y pureza del extracto de saponina obtenido desde hojas de quillay se llevó a cabo mediante el análisis de perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas tras una purificación en gradiente de MEOH (0 a100%). En una instancia preliminar los perfiles de estas fracciones se compararon con saponinas comerciales obtenida desde corteza de quillay (grado Industrial/Practico) la cual posee un $\leq 35\%$ de saponinas, estas saponinas contienen una alta mezcla de compuestos como polifenoles, azucares y benzoatos. En la figura 4 A se muestra la eficacia del proceso de purificación, al comparar las fracciones obtenidas con las saponinas comercial se observa que las fracciones con mayor concentración de MEOH, específicamente 80% y 100%, lograron la eliminación exitosa de las impurezas presente en la región inicial de los cromatogramas. Una vez purificada las saponinas de hoja fueron comparadas con un estándar de alta pureza QuilA, La fracción 80%, presento un perfil cromatográfico que coincidió notablemente con el estándar utilizado, mostrando un pico principal a un tiempo de retención idéntico (aproximadamente 15,5 minutos). Esta coincidencia es una fuerte indicación de identidad. Es importante mencionar que QuilA posee entre un 85 a 99% y además contiene la mezcla de sa-

poninas triterpénicas QS-7, QS-17, QS-18 y QS-21. Por lo que podemos concluir que se obtuvo una fracción de alta pureza y rica en saponinas.

La saponina de alta pureza fue sometida al proceso de hidrólisis, para la confirmación de esta se hizo el mismo procedimiento con el estándar QuilA. En la figura 4C se observa que tras la hidrólisis se produjo un desplazamiento cromatográfico significativo en ambos casos, este fenómeno se debe a la escisión del grupo acilo, resultando en una deacilsaponina, la cual es menos polar por ende eluye en un tiempo de retención menor (alrededor de los 14 min). La saponina de hoja hidrolizada coincidió exactamente con el estándar QuilA sometido a hidrólisis, lo cual confirma de manera robusta y concluyente que la saponina aislada de la fracción 80% del extracto de hoja es QuilA.

Finalmente, en el análisis del perfil de la fracción deacilsaponina (saponina hidrolizada de hoja) muestra que la remoción del grupo acilo resulta en una alteración en el tiempo de retención, lo que subraya la importancia de la acilación en las propiedades fisicoquímicas.

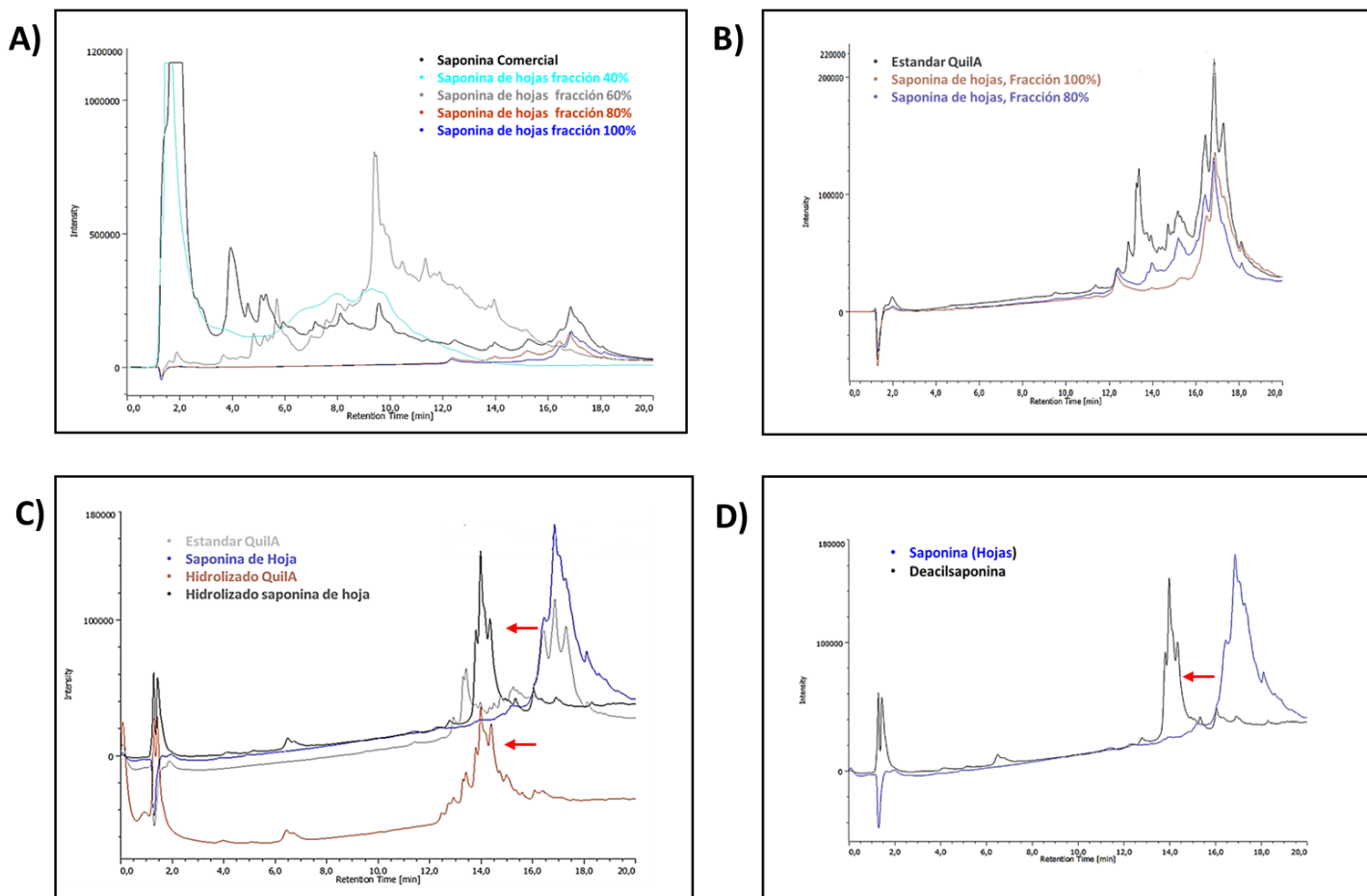


Figura 4.1. Análisis cromatográfico de la purificación y caracterización de deacilsaponina de hojas,

El panel de imágenes ilustra las etapas de aislamiento y confirmación de cambio en la estructura posterior al proceso de hidrólisis a través de perfiles cromatográficos. **A:** Purificación de saponinas de hojas: Perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas en gradientes de MEOH en comparación con saponinas comerciales. **B:** Identificación; comparación de los Perfiles cromatográfico de las fracciones purificada 80 y 100% con el estándar de alta pureza Quil A. **C:** Confirmación estructural: Perfiles cromatográfico de las saponinas hojas y estándar QuilA antes y después de ser sometidos a hidrólisis, demostrando la liberación del grupo acilo. **D:** Perfil cromatográfico saponina de hojas y deacilsaponina. **D:** Perfil cromatográfico de la saponina de hoja purificada y su forma deacilsaponina.

4.2. Síntesis en fase sólida y caracterización por HPLC/MS del péptido Hepcidina 20 de trucha arcoíris

El péptido de interés, Hepcidina 20 de trucha arcoíris, fue exitosamente obtenido mediante síntesis química en fase sólida y posteriormente purificado. El péptido crudo, en su forma reducida (con grupos sulfhídricos libres), presenta una masa molecular teórica, 2229.8 Da. Este péptido se caracteriza por contener 8 residuos de cisteína en su secuencia, que son capaces de generar cuatro puentes disulfuros (intramolecular). Para obtener la conformación activa y estable, se utilizó un protocolo de oxidación controlada. Este proceso promueve la formación de los cuatro puentes disulfuros a partir de los grupos sulfhidrido de las cisteínas, utilizando un buffer que contenía DMSO) como agente oxidante.

La pureza del péptido sintetizado y la posterior oxidación se determinó mediante análisis RP-HPLC. La figura 4.2, muestra los perfiles cromatográficos de la forma reducida y la forma oxidada del péptido demostró un cambio conformacional y de pureza tras la oxidación. El péptido reducido exhibió un pico principal alto y estrecho a un tiempo de retención de 6.0 minutos. En contraste, la forma oxidada presentó un pico dominante a 5,7 minutos, un desplazamiento a menor tiempo de retención consistente con la formación de puentes disulfuros que reduce la hidrofobicidad molecular. Además, el pico oxidado se mostró visiblemente ensanchado, sugiriendo la generación de formación de isómeros conformacionales, lo cual distribuye la masa del péptido en un área cromatográfica más amplia. La identidad de hep20 se confirmó tras el análisis espectral del

péptido, se confirmó los iones teóricos correspondientes al peso molecular del péptido hepcidina reducida 2329.8 Da, Los resultados muestran en la figura 4.3. A la presencia de 3 iones teóricos, los principales peak protonados que se observan son $[M+2H]^{2+}$ (1165.9 Da), $[M+3H]^{3+}$ (777.6 Da) y $[M+4H]^{4+}$ (583.4 Da).

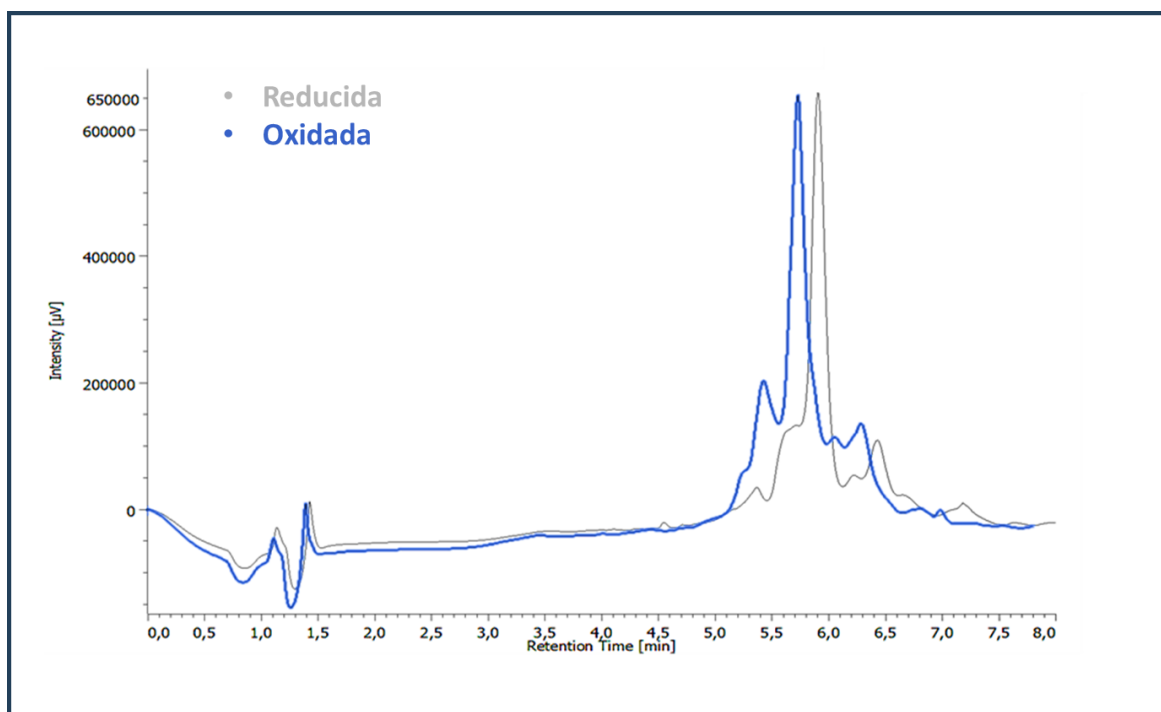


Figura 4.2. Cromatogramas RP-HPLC comparativos del péptido Hepcidina-20 de trucha arcoíris en su forma reducida y oxidada. El cromatograma muestra la superposición de la forma reducida (gris) y la forma oxidada (azul) del péptido. La elución del péptido reducido se observa a un tiempo de retención de 6.0 minutos y la forma oxidada eluye a un tiempo menor de 5.7 minutos.

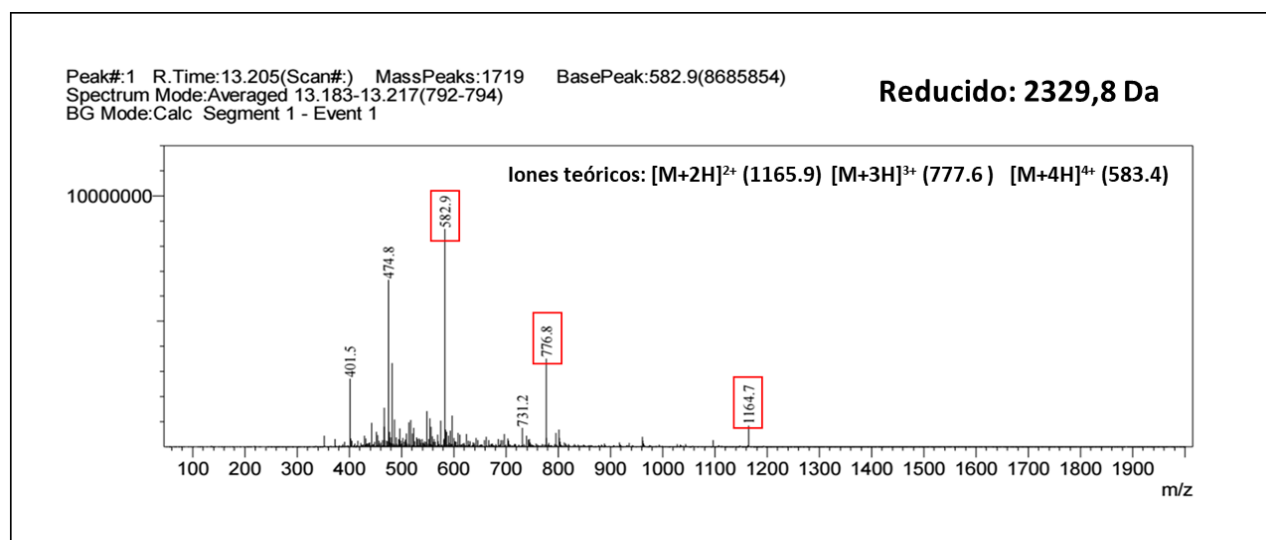


Figura 4.3. Espectros de Masas (MS) del Péptido Hecpidina 20. Análisis de masas del péptido Hep20 tras su síntesis y modificación. A: Corresponde al espectro de forma Reducida con un peso de 2329.8 Da. B: Corresponde al espectro de forma oxidada con un peso de 2321.8 Da. En cuadrados rojos se destacan los iones teóricos

4.3. Optimización de la dosis de deacilsaponina mediante ensayos de hemólisis y citotoxicidad

4.3.1 Actividad Hemolítica

Tras la obtención de moléculas claves hepcidina 20 y deacilsaponina, fue fundamental establecer la concentración optima y segura para los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Esta precaución se justifica por la actividad hemolítica característica de las saponinas, la cual sirve como un indicador directo de su potencial toxicidad biológica. Para mitigar el riesgo, se midió la actividad hemolítica de varias fracciones clave en eritrocito de trucha arcoíris, evaluando un rango de concentración amplio (5 a 450 μ M) Las fracciones evaluadas incluyeron el estándar QuilA, Saponinas obtenidas desde hojas de quillay y deacilsaponina.

Los resultados, presentados en la figura 4,4 se observa el porcentaje de hemólisis producidas por las distintas concentraciones de las fracciones evaluadas. Se aprecia que las saponinas de hojas y el estándar QuilA exhiben una alta actividad hemolítica en eritrocito de trucha, alcanzando el 50% de hemólisis (HD 50) en una concentración menor 5 μ M. En contraste, la fracción deacilsaponina presenta una toxicidad significativamente menor, requiriendo concentraciones superiores a 100 μ M, para alcanzar el mismo umbral de hemólisis del 50%.

Este hallazgo no solo confirma el éxito de la purificación, si no que corrobora que el proceso de hidrólisis al que fue sometido las saponinas de hojas, fue efectivo para disminuir drásticamente su actividad hemolítica. La reducción de la toxicidad de la deacilsaponina la convierte en una candidata biológicamente más segura para ser utilizada a concentraciones elevadas en modelos

de trucha
arcoí-
ris, asegu-
rando
la viabilidad
del pez
y la validez
de los
ensayos de
inmu-
nomodula-
ción.

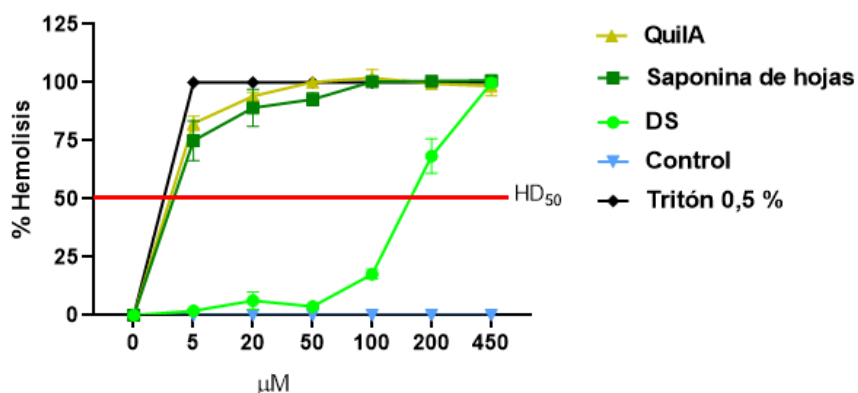


Figura 4.4. Actividad hemolítica y determinación del HD 50. Grafico de dosis respuesta de hemolisis de eritrocito de trucha arcoíris inducido por fracciones evaluadas en un rango de 0 a 450 μ M. Estándar QuilA ($\blacktriangle$), Saponinas de hojas ($\blacksquare$), Deacilsaponina ($\bullet$), Control negativo (Tritón 0,5%) ($\blacktriangledown$) Control positivo (PBS) ($\blacklozenge$). La línea roja indica el 50 % de hemolisis (--- HD_{50}). Se realizaron 3 replica técnicas por tratamiento

4.3.2. Ensayo citotóxico

La determinación de la concentración adecuada de deacilsaponina requirió evaluar la citotóxica en las líneas celulares de trucha arcoíris que serían ocupadas para el desarrollo de los posteriores ensayos *in vitro*. Los componentes evaluados fueron deacilsaponina y deacilsaponina coadministrada con hepcidina 20, fue un paso metodológico crítico, no obstante resultados de la actividad hemolítica nos ayudaron discriminar un rango específico (5 a 50 μ M)

Para evaluar la citotoxicidad en líneas celulares con crecimiento diferente, fué necesario establecer ensayos diferentes para cada línea celular que sería utilizada en los ensayos *in vitro*. Para la línea celular RTS11 que crecen parte su población en suspensión, se usó el ensayo WST-1, en contraste de la línea celular RTGutGC que crece adherida a la superficie de cultivo, se utilizó el ensayo cristal violeta vitro, el uso de este compuesto colorado permitió tener una medida de la biomasa total y la integridad del monocapa celular remanente tras el tratamiento.

Los resultados mostraron una sensibilidad diferencial entre líneas celulares: En la figura 4.5. A se muestra línea celular RTGut disminuye su supervivencia en un 35% con respecto al control al ser expuesta a una concentración de 50 μ M de deacilsaponina, resultado que también se puede observar en la figura 4.5.B que con una menor superficie de células formando la monocapa, al igual se muestra en el control positivo con DMSO 10%.

En contraste, la línea celular monocito /macrófagos RTS11 mostró, figura 4.5 C, ser resistente, manteniendo una alta viabilidad celular en todo el rango de concentración evaluado (5 a 50 μ M) sin toxicidad significativa.

Basándose en estos hallazgos, se validó que el rango 5 a 20 μ M de Deacilsaponina como seguro para los ensayos funcionales. Además, se confirmó, figura 4.5. D la seguridad de la administración conjunta de ambas moléculas, demostrando que la coadministración de Deacilsaponina a 20 μ M con hepcidina (hasta una dosis máxima de 25 μ M) no afectó la viabilidad celular. En conjunto estos ensayos de citotoxicidad garantizan que la dosis seleccionada no induce efectos tó-

xicos, asegurando que cualquier cambio observado en la modulación inmunitaria sea atribuible directamente a la acción biológica de la deacilsaponina y hepcidina 20

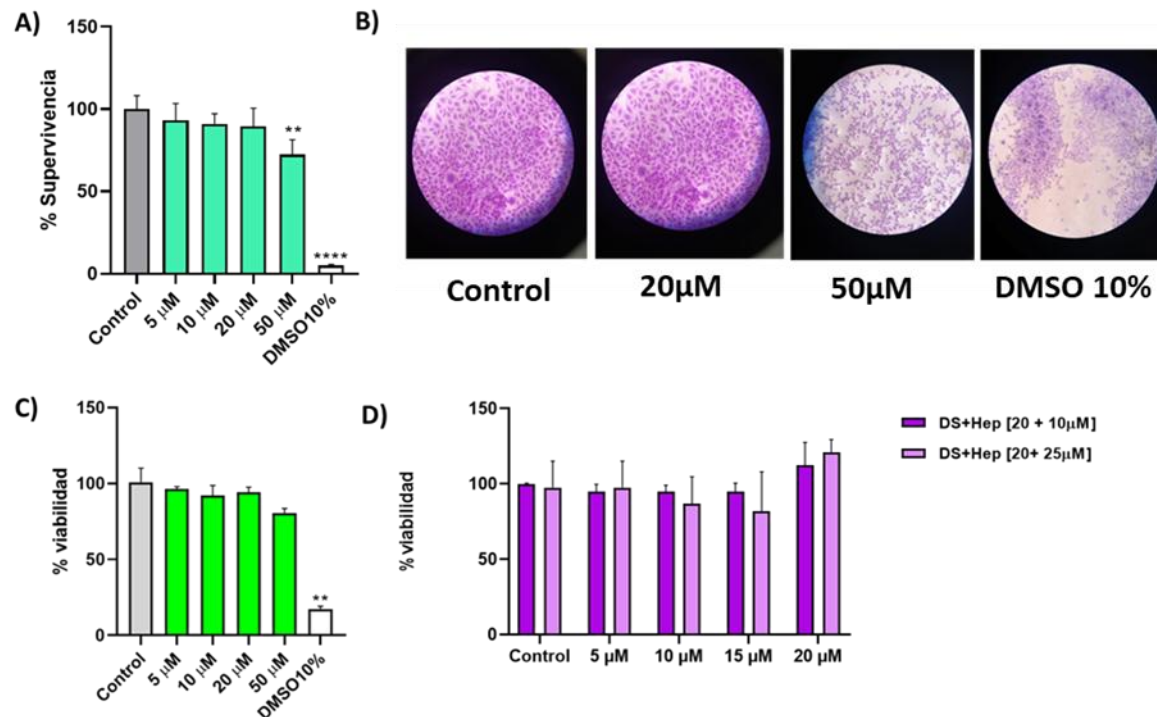


Figura 4.5. Evaluación de la citotoxicidad de deacilsaponina y la coadministración de deacilsaponina más hepcidina 20 en líneas celulares de trucha arcoíris. El rango utilizado para medir la citotoxicidad de deacilsaponina fue de 5 a 50 μ M **A:** Grafico de supervivencia de la línea epitelial RTGutGC. **B:** Imágenes que muestran la monocapa de RTGutGC tras ser tratadas con deacilsaponina. **C:** Grafico de viabilidad de monocitos/ macrófagos RTS11. **D:** Grafico de supervivencia de la coadministración de deacilsaponina con hepcidina 20 en dos concentraciones 10 y 25 μ M. contaban con un control positivo: células sin tratar y un control negativo: DMSO 10%. Se realizó un test T para comparar los tratamientos. Las diferencias significativas ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) entre los grupos en cada momento se indican mediante (*) o (**) respectivamente ($n = 6$)

4.4. Diponinibilidad *in vitro* de la hep20 mediada por deacilsaponina:

4.4. 1. Ensayo de traspaso de hep20 en la línea celular RTGutGC

Se llevó a cabo una evaluación cuantitativa del flujo transepitelial para determinar la tasa de traspaso del péptido hep20 utilizando el modelo celular epitelial intestinal RTGutGC. El sistema se basó en el cultivo de la línea celular en placas Transwell para establecer una monocapa polarizada, la cual delimita funcionalmente los compartimentos apical y basolateral. Esta configura-

ción *in vitro* es crucial para simular la barrera epitelial biológica, permitiendo una caracterización rigurosa de la cinética de translocación de la molécula de interés.

La figura 4.6 A y B presenta la cinética del flujo transepitelial del péptido hepcidina 20 a través de la monocapa celular RTGutGC, evaluando la medición mediante la fluorescencia de hepcidina-20-fluoresceína (Hep20-FITC) en el compartimiento basolateral a lo largo de 24 horas. Tras la conversión de intensidad de fluorescencia a valores de concentración μM utilizando una curva estándar preestablecida, se observa un marcado efecto potenciador de la deacilsaponina sobre el traspaso de hepcidina. La condición de coadministración exhibió consistentemente el mayor flujo transepitelial en todos los tiempos evaluados, a las 24 horas la concentración final de hepcidina en el compartimiento basolateral alcanzó un valor máximo aproximado de 80 μM .

Para la condición donde se administró hepcidina 20, también se mostró un traspaso sostenido, pero con una eficacia notablemente menor. La concentración final alcanzada a las 24 horas fue aproximadamente de 60 μM .

La comparación de ambos tratamientos muestra que la coadministración con deacilsaponina resultó en un incremento del traspaso de aproximadamente un 33% respecto a hepcidina 20, lo que resalta la acción de la deacilsaponina como un potenciador de la absorción *in vitro*.

Por último el traspaso de hepcidina 20 en toda la condición fue dependiente del tiempo, mostrando un aumento sostenido desde la hora 1 hasta las 24 horas, un patrón característico de un proceso continuo de transporte o difusión a través de una barrera.

Tras el término de las 24 horas del ensayo, se extrajo la membrana de las placas transwell para realizar una verificación por microscopía con el propósito validar la formación de la monocapa celular y si aún contenía resto de hepcidina 20 que no fueron traspasada al compartimiento basolateral.

En la figura 4.6 b podemos apreciar que en todo el tratamiento realizado se formó la monocapa, también se observa la presencia de hepcidina en las condiciones de coadministrada y de forma independiente. Se aprecia levemente una menor presencia de hepcidina 20 en la coadministración lo cual sería evidente tras los datos anteriormente mostrado en la gráfica.

También se muestra que en tratamiento con la coadministración la monocapa se ve íntegra, lo que sugiere que deacilsaponina actúa facilitando el transporte efectivo de hepcidina a través de la monocapa sin causar una desorganización celular visible. El mecanismo más probable de apertura de las uniones estrechas (vía paracelular) o el aumento de fluides/ permeabilidad de la membrana (vía transcelular) ambos compatibles con la acción conocida de algunas saponinas.

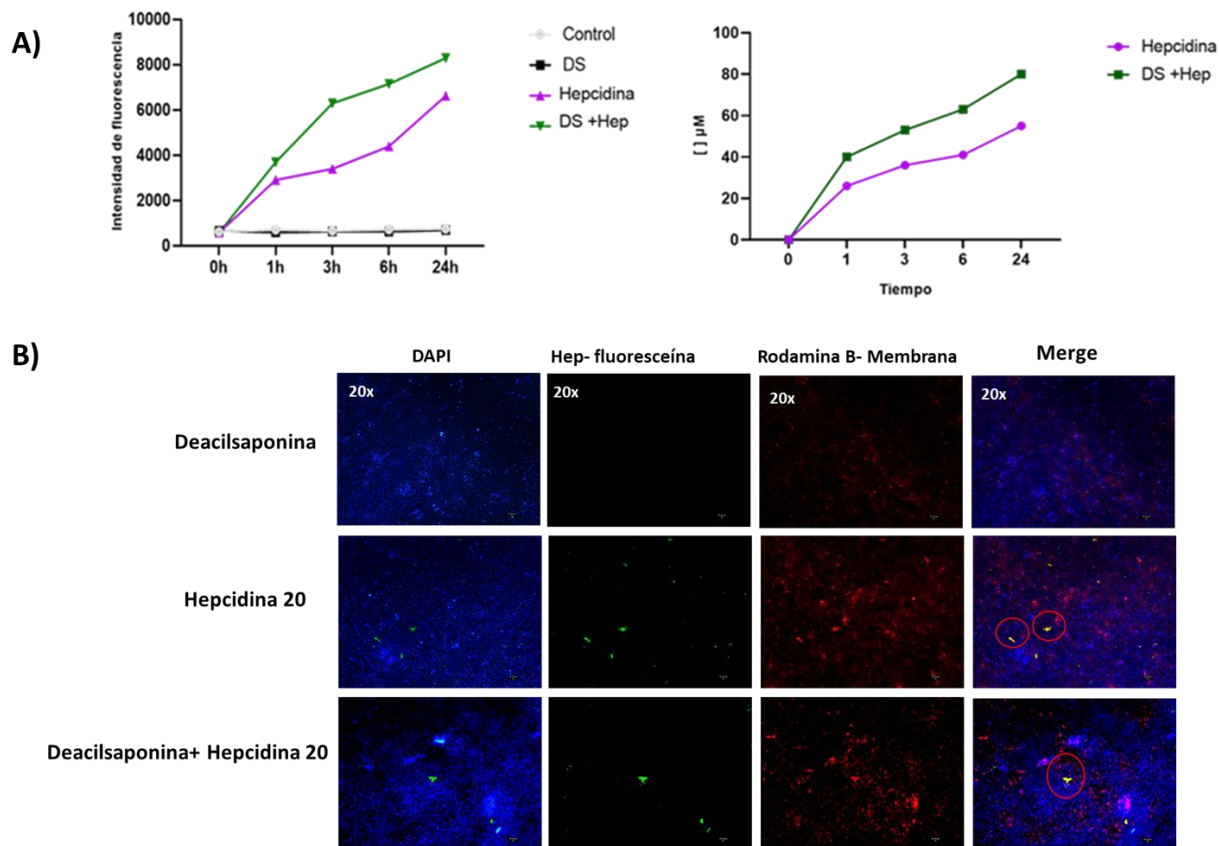


Figura 4.6. Evaluación del flujo Transepitelial de Hepcidina 20 potenciado por deacilsaponina en monocapa celulares RTgutGC y validación microscópica de la formación y estado de la monocapa tras las 24 horas. **A:** Grafica (izquierda) muestra la intensidad de fluorescencia hepcidina 20-Fluoresceína en el compartimiento basolateral durante 24 horas. Grafica (derecha) Muestra la conversión de intensidad de fluorescencia en la concentración acumulada de Hepcidina 20 en el tiempo. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: Deacilsaponina (■), Hepcidina 20- Fluoresceína (▲), Deacilsaponina + Hepcidina Fluoresceína (▼) y control PBS (●). **B)** Imágenes de fluorescencia (20X) que muestran la distribución celular. Para la tinción de núcleos se utilizó DAPI (azul), Hepcidina-Fluoresceína (verde) y membrana se utilizó tinción Rodamina-B (Rojo).

4.5. Cinética de internalización de hep20 en células RTGutGC y RTS11 en presencia de deacilsaponina

Para elucidar el mecanismo subyacente a esta mejora en el flujo de Hepcidina 20, se evaluó la captación y distribución intracelular de RTGutGC y RTS11 del Hep20 mediante inmunofluorescencia a diferentes tiempos.

La Figura 4.7 proporciona una clara evidencia del impacto de la deacilsaponina en la cinética de internalización de la hepcidina 20. Inicialmente, a las 3 horas, se observa una mayor presencia de hepcidina 20 en las células que recibieron el tratamiento de coadministración con deacilsaponina. Este hallazgo sugiere que la deacilsaponina ejerce un efecto facilitador crucial, promoviendo tanto la entrada como la acumulación intracelular del péptido. Por el contrario, el tratamiento donde se administró únicamente hepcidina 20 mostró un proceso de internalización celular notablemente lento.

Avanzando en el tiempo, a las 6 horas, el comportamiento entre ambos tratamientos se torna similar; sin embargo, la formulación con deacilsaponina es superior. Se detecta hepcidina no solo en el citoplasma, sino también a nivel de membrana, revelando una notoria y continua acumulación del péptido. Este patrón de distribución y acumulación es totalmente congruente con el traspaso continuo del péptido que se demostró previamente en el ensayo de translocación de hepcidina 20.

Finalmente, a las 24 horas, la diferencia es drástica: mientras que el tratamiento sin deacilsaponina no exhibe presencia residual del péptido, la coadministración sí muestra hepcidina 20, aunque en una cantidad disminuida respecto a los tiempos de 3 y 6 horas. En conclusión, estos resultados destacan de manera contundente que la coadministración con deacilsaponina permite y facilita eficazmente la localización intracelular del péptido, asegurando su presencia dentro de la célula por un período de tiempo extendido.

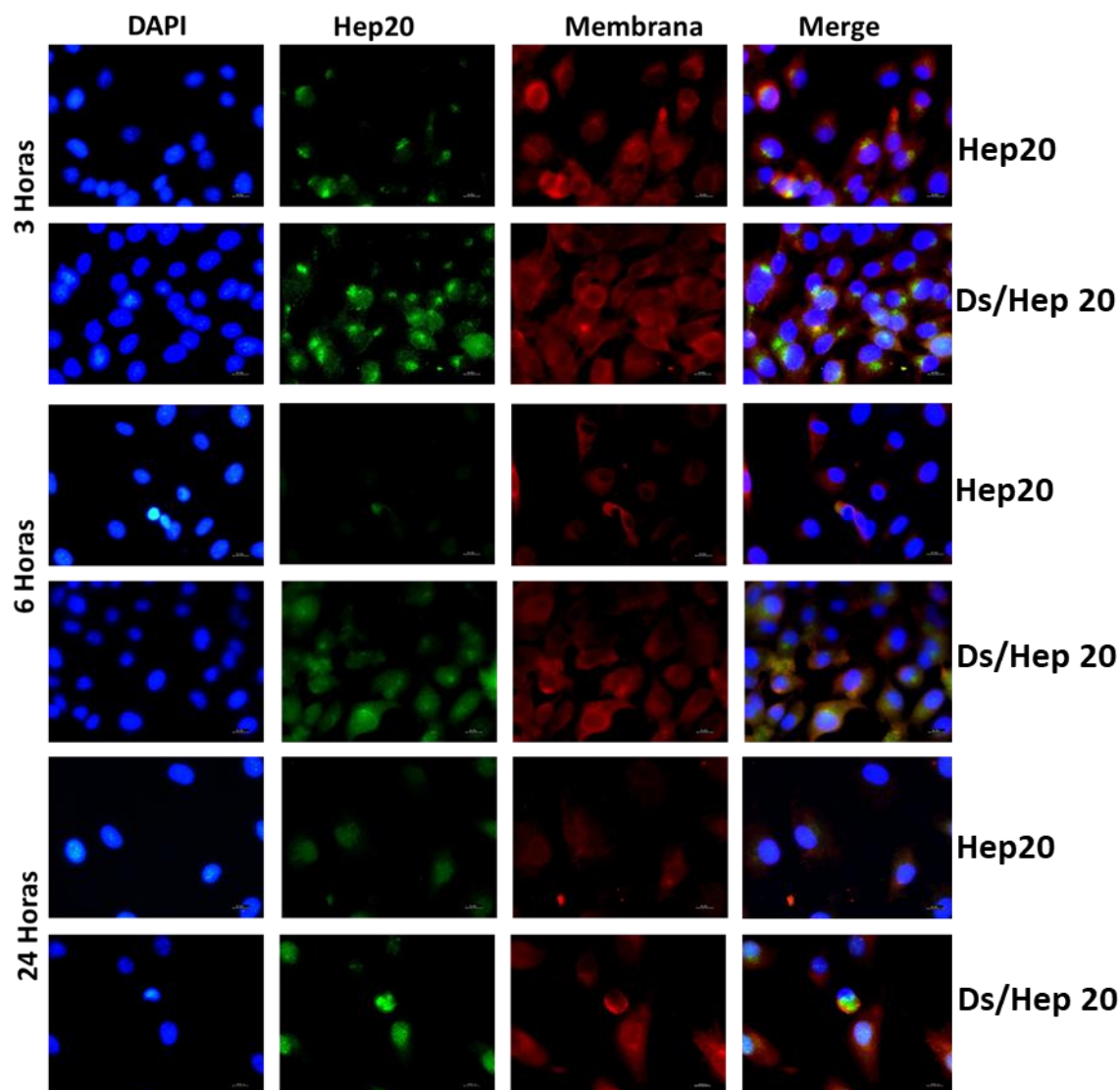


Figura 4.7. Evaluación por inmunofluorescencia de la localización celular del péptido Hep 20 en presencia y ausencia de deacilsaponina a lo largo del tiempo. Las imágenes de microscopia de EPI fluorescencia corresponde a células RTGutGC las cuales fueron tratadas con Hep20 [10 μ M] y la coadministración de deacilsaponina [20 μ M] y Hep 20 [10 μ M] diferente tiempo (3,6 y 24 horas). Hep20 fue detectada a través del uso del antisuero específico de ratón y el anticuerpo conjugado con Alexa-488 de IgG anti-ratón (verde). Se usó cloruro de octadecil rodamina B (R18) para la tinción de la membrana (rojo). Además, se utilizó DAPI como tinción de núcleos (azul).

El ensayo de inmunofluorescencia, visible en la Figura 4.8, demostró que la DS es un factor determinante en la dinámica de internalización y retención del péptido Hep en las células tipo macrófago RTS11 a lo largo del tiempo. A las 3 horas, ambos tratamientos exhiben presencia del péptido; sin embargo, en el tratamiento con Hep20 solo, la señal es moderada y se localiza predominantemente en la periferia celular, sugiriendo una unión superficial. En contraste, la coadministración Hep20/DS resulta en una presencia intensa y difusa que se extiende claramente hacia el citoplasma, indicando una rápida y masiva internalización del péptido promovida por la DS. La diferencia se acentúa a las 6 horas. Mientras que el tratamiento con Hep 20 solo muestra una clara y drástica ausencia del péptido (señal mínima o indetectable), sugiriendo una rápida degradación o eliminación; el tratamiento DS mantiene una presencia robusta y concentrada en la región perinuclear. Esta tendencia a la ausencia del Hep20 administrado solo se confirma a las 24 horas, donde la señal residual es casi nula. Por otro lado, la coadministración con DS asegura una presencia significativa y bien definida del péptido en el citoplasma, demostrando que la DS es esencial para la retención a largo plazo del Hep20. En conclusión, la DS revierte la baja internalización del péptido Hep20. Es notable que, a pesar de utilizar la misma concentración inicial de Hep20 en ambos tratamientos, la presencia de la DS marcó una diferencia crítica: no solo facilitó una internalización rápida, sino que también garantizó la presencia sostenida del péptido en el sitio de acción intracelular hasta por 24 horas

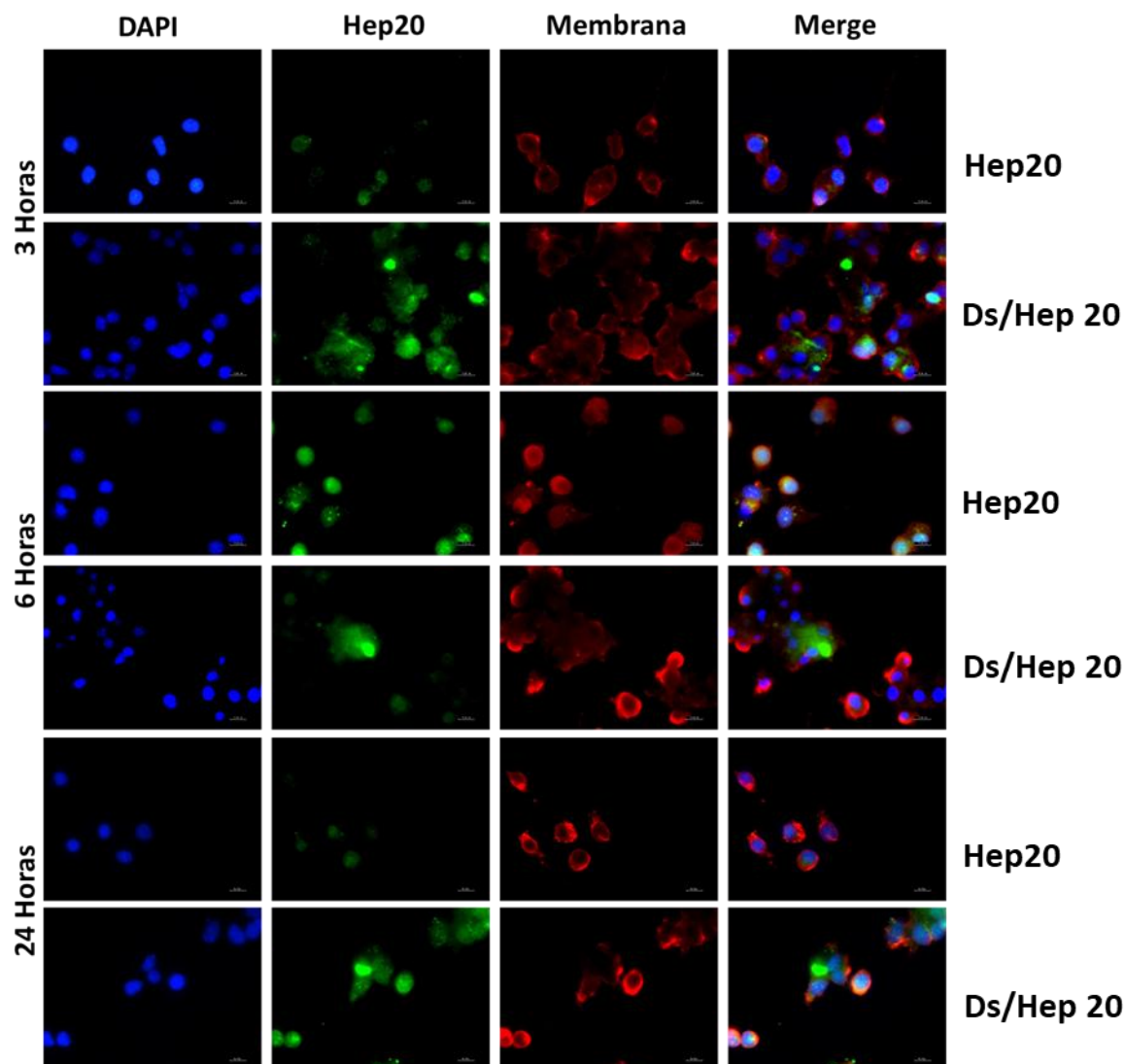


Figura 4.8. Evaluación por Inmunofluorescencia de la localización Celular del Péptido Hep 20 en Presencia y Ausencia de Deacilsaponina a lo Largo del Tiempo. Las imágenes de microscopia de EPI fluorescencia corresponde a células RtS11 las cuales fueron tratadas con hepcidina 20 [10 μ] y la coadministración de deacilsaponina [20 μ] y Hep 20 [10 μ] diferente tiempo (3,6y 24 horas). Hep20 fue detectada a través del uso del antisuero específico de ratón y el anticuerpo conjugado con Alexa-488 de IgG anti-ratón (verde). Se usó cloruro de octadecil rodamina B (R18) para la tinción de la membrana (rojo). Además, se utilizó DAPI como tinción de núcleos (azul).

4.6. Efecto inmunomodulador de la hepcidina 20 en presencia de deacilsaponina en la línea celular RTS11: Análisis de la expresión de citoquinas.

Para dilucidar el efecto inmunomodulador de Hep20, se evaluó la expresión de las citoquinas *il-1 β* , *tnfa* e *il-10* en células monocito/macrófago RTS11 tratadas con Hep20, Ds y la coadministración de Hep20/Ds a las 6, 12 y 24 horas, con el fin de caracterizar tanto las fases tempranas como tardías de la respuesta inmune. A las 6 horas (Figura 4.9 A) se evidenció una activación inicial marcada particularmente en el tratamiento con Ds, donde *il-1 β* aumentó aproximadamente 10 veces y *tnfa* cerca de 120 veces respecto a Hep20, acompañado de un incremento significativo en *il-10*. Este patrón indica que Ds es capaz de inducir simultáneamente una señal proinflamatoria intensa y una respuesta reguladora, sugiriendo que la fracción posee componentes capaces de activar vías típicas de macrófagos (posiblemente asociadas a receptores de reconocimiento de patrones y a la activación de *NF- κ B*), mientras promueve en paralelo la expresión de mecanismos antiinflamatorios tempranos como *il-10*. La coadministración Hep20/Ds también indujo un aumento significativo en estas citoquinas, aunque de menor magnitud que Ds sola, lo que revela que la combinación modula la intensidad de la activación temprana manteniéndola, pero sin generar un estímulo tan abrupto como el producido por Ds por separado. A las 12 horas (Figura 4.9 B), el efecto de Ds disminuyó notablemente, sin diferencias significativas frente a Hep20, lo que sugiere que la activación inicial inducida por la fracción es transitoria. En contraste, la combinación Hep20/Ds mantuvo una activación moderada de *tnfa* y aumentó significativamente la expresión de *il-10*, indicando que, aun cuando el estímulo proinflamatorio inicial se atenúa, la combinación continúa promoviendo una respuesta más equilibrada, caracterizada por una activación controlada y una regulación antiinflamatoria más evidente. En la fase tardía, a las 24 horas (figura 4.9 C), la coadministración mostró el efecto más robusto, con un aumento pronunciado de *tnfa* cercano a 250 veces respecto a Hep20 y un incremento paralelo de *il-10*, lo cual refleja una modulación sostenida tanto de la activación proinflamatoria como de los mecanismos reguladores. En este mismo tiempo, se observó que Ds sola redujo significativamente la expresión de *il-1 β* en comparación con Hep20, lo que confirma que su efecto proinflamatorio es potente pero limitado a las fases tempranas. En conjunto, estos resultados muestran que la fracción Ds induce una activación rápida pero fugaz del sistema inmune, mientras que la combinación Hep20/Ds promueve una modulación inmunitaria más progresiva, sostenida y equilibrada, caracterizada por la conducción coordinada de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias a lo largo del tiempo. Este patrón sugiere que Hep20 podría influir en la duración y estabilidad de la respuesta, potenciando o extendiendo la señalización inicial inducida por Ds y contribuyendo a una

modulación dinámica que combina activación y regulación en las distintas fases temporales evaluadas.

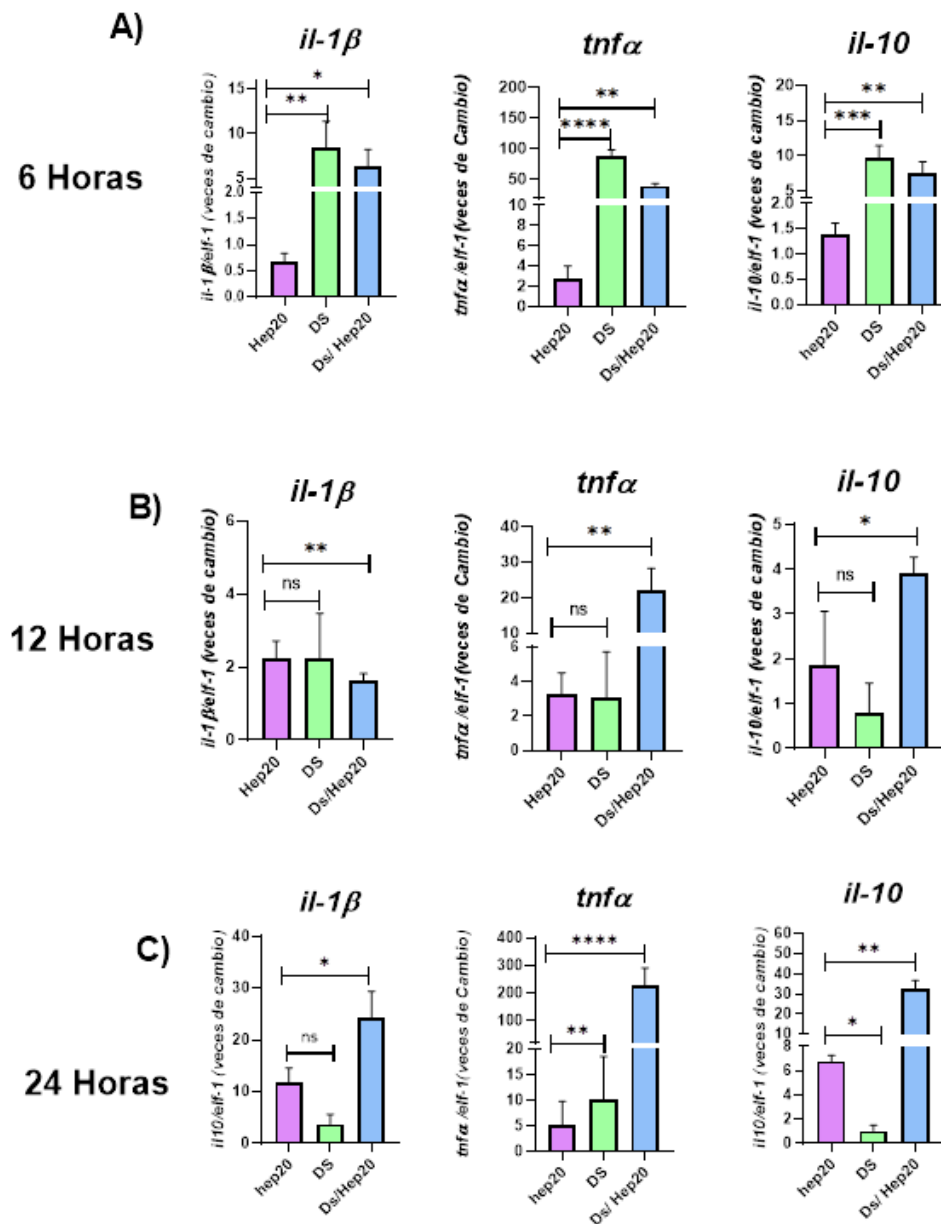


Figura 4.9. Modulación de la expresión génica de citoquinas por hep20, Ds y coadministración de hep20 con Ds en células monocito/macrófago RTS11. Expresión de citoquinas en tejidos linfoides de trucha arcoíris inyectadas con Hep20 en presencia de Ds. La expresión relativa de las citoquinas proinflamatorias *il-1β* y *tnf-α*, junto con la citoquina antiinflamatoria *il-10*, fue cuantificada mediante qPCR. Las células fueron tratadas con Hep20 [10 μM] (violeta), Ds [20 μM] (verde) y la coadministración Hep20/Ds [10 μM / 20 μM] (celeste) durante A) 3 h, B) 6 h y C) 24 h. Los gráficos muestran el cambio relativo de expresión (fold change) para cada gen, normalizado respecto al

gen de referencia ELF-1 α . Las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett, utilizando Hep20 como grupo de referencia. Las diferencias significativas se indican como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ ($n = 3$).

4.6. Evaluación del perfil de expresión de citoquinas en trucha arcoíris bazo y riñón cefálico inyectada intraperitoneal con Hep 20 en ausencia y presencia de deacilsaponina

Se evaluó la modulación de citoquinas inmunitarias en trucha arcoíris as la administración intraperitoneal de la combinación Hep20/Ds. A las 24 horas post-inyección, se recolectaron muestras de riñón anterior y bazo, con el objetivo de analizar los niveles de expresión génica de citoquinas clave involucradas en la respuesta inmune proinflamatoria y antiinflamatoria.

En riñón cefálico (Figura 4.10) el tratamiento con Hep20, se observó una expresión basal o moderada de las tres citoquinas evaluadas, lo que sugiere que la administración del péptido por sí sola induce una activación leve del sistema inmunitario. Por el contrario, los peces tratados con Ds mostraron un aumento significativo en la expresión de *tnfa*, alcanzando valores notoriamente superiores en comparación con Hep20, mientras que *il-1 β* no presentó un cambio en su expresión. Este patrón indica que Ds promueve una activación proinflamatoria selectiva, principalmente mediada por *tnf- α* .

En el grupo tratado con la coadministración Ds/hep20, se observó un incremento marcado en la expresión de *tnfa* y, de forma paralela, un aumento significativo en *il-10* con respecto a Hep20. Esta tendencia sugiere una modulación equilibrada entre las respuestas proinflamatoria y antiinflamatoria, lo que podría reflejar una respuesta inmunitaria más regulada y sostenida frente a la combinación de ambos compuestos.

En conjunto, estos resultados evidencian que, a las 24 horas postratamiento, la coadministración de Hep20 y Ds induce una fuerte modulación de la respuesta inmune en el riñón anterior de trucha arcoíris. Este tratamiento promueve una activación significativa de las citoquinas proinflamatorias, acompañada de un incremento en la expresión de IL-10, lo que refleja una respuesta más intensa, equilibrada y sostenida en comparación con los tratamientos individuales con Hep20 o Ds.

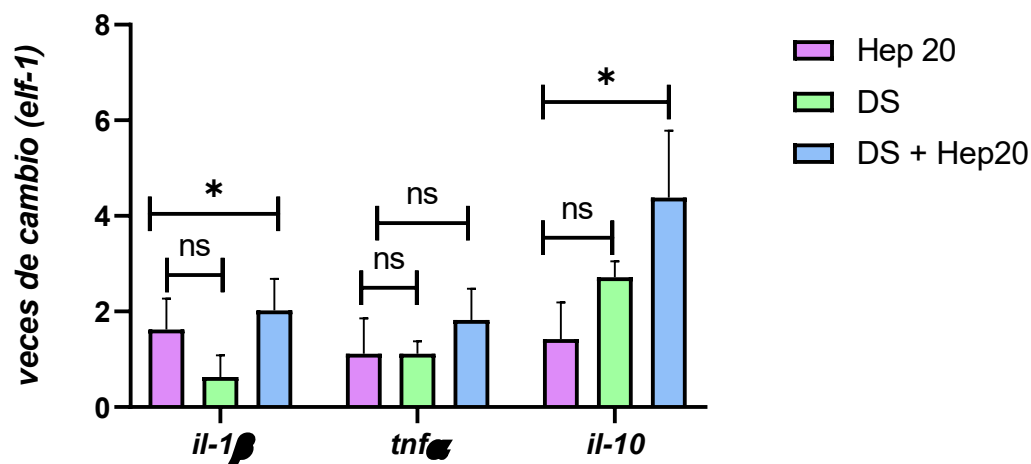


Figura 4.10. Expresión génica de citoquinas en riñón cefálico de trucha arcoíris juvenil tras inyección intraperitoneal de hep 20 (violeta), Ds (verde), coadministración Ds/hep20 (celeste). Tras 24 horas post inyección se evaluó la expresión relativa de las citoquinas *IL-1 β* y *TNF- α* y *IL-10*, fue cuantificada mediante qPCR. Los gráficos fueron expresados en veces de cambio normalizados con respecto al gen de referencia *elf-1* y al grupo control (peces inyectados con PBS). Se utilizó un 4 pez por estanque (n=4). Se realizó un test T comparando los tratamientos con respecto a hep20 y las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos en cada momento se indican mediante (*) y ns (diferencias no significativas).

En general, las respuestas de las citoquinas (figura 4.11) en el bazo presentaron una tendencia distinta a la observada en el riñón anterior. Los tratamientos individuales con Hep20 o Ds no provocaron cambios marcados en la expresión de las citoquinas analizadas. Sin embargo, la coadministración de Ds/he20 desencadenó una activación inmunitaria más evidente, reflejada en un aumento pronunciado de *il1 β* y una elevación significativa de *IL-10*.

El incremento simultáneo de estas dos citoquinas sugiere que la combinación de Hep20 y Ds estimula una respuesta mixta, en la cual coexisten mecanismos proinflamatorios y reguladores, posiblemente orientados a potenciar la vigilancia inmunitaria sistémica sin inducir una inflamación exacerbada. Por lo tanto, a las 24 horas postinyección, el bazo evidencia una respuesta inmunológica modulada principalmente por la coadministración Hep20/Ds, mientras que los tratamientos individuales muestran una escasa capacidad de activación génica. Este comportamiento indica que la interacción entre ambos compuestos potencia de forma coordinada la respuesta inmune adaptativa y la regulación homeostática en tejidos linfoides secundarios.

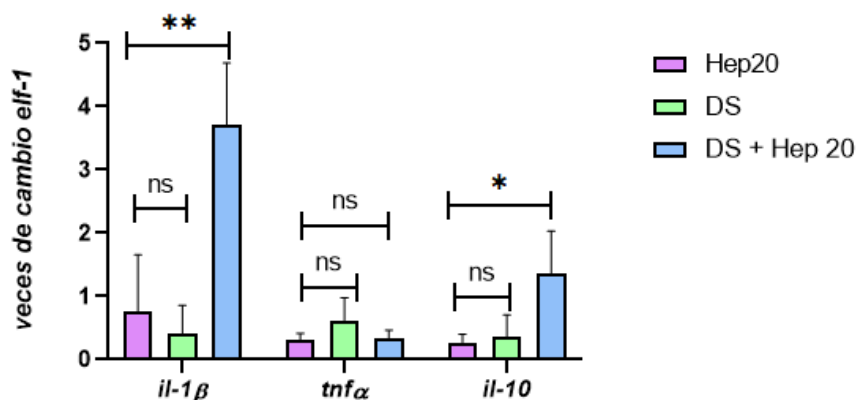


Figura 4.10. Expresión génica de citoquinas en bazo de trucha arcoíris juvenil tras inyección intra-peritoneal de hep 20 (violeta), Ds(verde), coadministración Hep20/Ds (celeste). Tras 24 horas post inyección se evaluó la expresión relativa de las citoquinas *IL-1β* y *TNF-α* y *IL-10*, fue cuantificada mediante qPCR Los gráficos fueron expresados en veces de cambio normalizados con respecto al gen de referencia *ELF-1* y al grupo control (peces inyectados con PBS). Se utilizó un 4 pez por estanque (n=4) Se realizó un test T comparando los tratamientos con respecto a hep20 y las diferencias significativas (*p < 0,05; **p<0,001) entre los grupos en cada momento se indican mediante (*) y ns (diferencias no significativas)

4.8. Evaluación del perfil de expresión de citoquinas en trucha arcoíris bazo y riñón cefálico alimentada con dieta suplementada con Hep20 en ausencia y presencia de deacilsaponina.

Después de evaluar el efecto modulador de la combinación Ds/Hep20 mediante inyecciones, se procedió a estudiar el efecto inmunomodulador de hepcidina en presencia de deacilsaponina a través de su administración oral. Con este propósito, se formularon cuatro dietas experimentales: una dieta control sin aditivos y tres dietas suplementadas con las moléculas individuales Hep20, Ds, y de manera conjunta Ds/hep20. Las dietas fueron administradas durante un período de 21 días. Sin embargo, la toma de muestras de riñón anterior y bazo se realizó a los 7 y 14 días postratamiento, debido a la aparición de mortalidades en el grupo control durante la primera semana. Esta modificación en el diseño experimental permitió obtener datos en condiciones donde fue posible apreciar los efectos inmunomoduladores de las dietas en las etapas iniciales del tratamiento.

En el riñón anterior, (figura 4.12), expresión génica de citoquinas mostró una clara modulación dependiente del tratamiento y del tiempo de exposición.

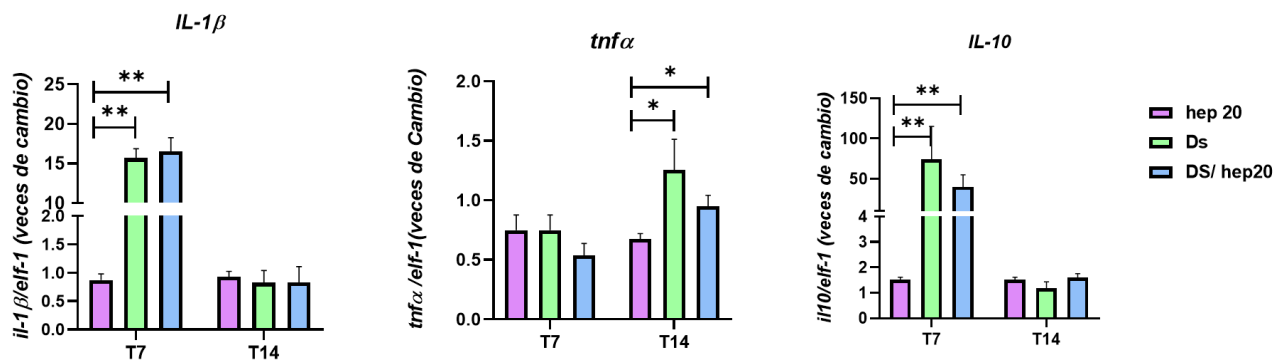


Figura 4.12. Expresión génica de citoquinas en riñón cefálico de trucha arcoíris juvenil tras administración oral de hep 20 (violeta), Ds(verde), coadministración Hep20/Ds (celeste). Tras 24 horas post inyección se evaluó la expresión relativa de las citoquinas *il-1 β* y *tnf- α* y *il-10*, fue cuantificada mediante qPCR. Los gráficos fueron expresados en veces de cambio normalizados con respecto al gen de referencia *elf-1* y al grupo control (peces inyectados con PBS). Se utilizó un 3 pez por estanque (n=3). Se realizó un test T comparando los tratamientos con respecto a hep20 y las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos en cada momento se indican mediante (*) y ns (diferencias no significativas).

A los 7 días, se observó que expresión de *il1 β* se incrementó especialmente en los peces alimentados con las dietas que contenían deacilsaponina (Ds) y la combinación Ds/Hep20 con respecto a la dieta control indicando una respuesta inflamatoria controlada, posiblemente vinculada a la estimulación inicial del sistema inmune innato por parte de los tratamientos administrados. Al mismo tiempo vemos un aumento exacerbado en la expresión de *il10*, lo que sugiere una activación temprana de mecanismos antiinflamatorios en este tejido. En contraste, a los 14 días postratamiento, los niveles de ambas citoquinas tendieron a disminuir, lo que podría reflejar una resolución del estado inflamatorio o una regulación homeostática tras la exposición continua a los inmunoestimulantes. En conjunto, estos resultados sugieren que la administración oral de deacilsaponina sola o combinada con Hep20 promueve una respuesta inmunomoduladora equilibrada en el riñón anterior de trucha arcoíris, a través de una inducción marcadores proinflamatorios y antiinflamatorios.

En el bazo (Figura 4.13), la expresión relativa de las citoquinas *il1 β* , *tnfa* e *il10* no presentó diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. No obstante, se observaron tendencias biológicamente relevantes en los niveles de transcripción, dependientes del tratamiento y del tiempo de exposición.

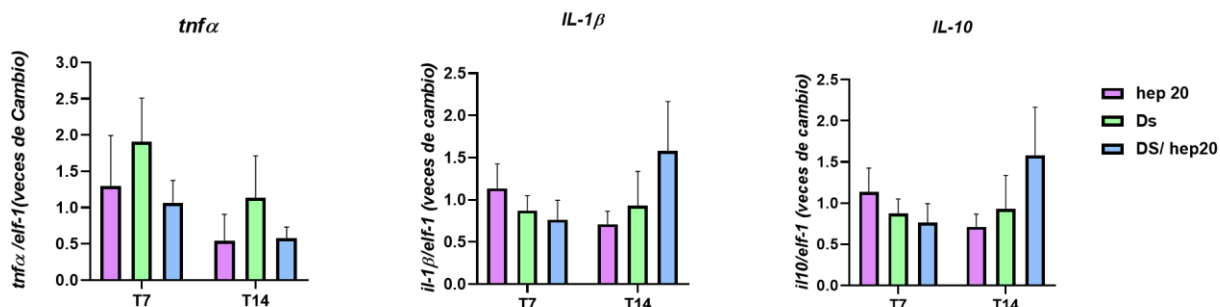


Figura 4.13. Expresión génica de citoquinas en Bazo de trucha arcoíris juvenil administración oral hep 20 (violeta), Ds(verde), coadministración Hep20/Ds (celeste). Tras 24 horas post inyección se evaluó la expresión relativa de las citoquinas *il-1 β* y *tnf- α* y *il-10*, fue cuantificada mediante qPCR Los gráficos fueron expresados en veces de cambio normalizados con respecto al gen de referencia *elf-1* y al grupo control (peces inyectados con PBS). Se utilizó un 3 pez por estanque (n=3) Se realizó un test T comparando los tratamientos con respecto a hep20 y las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos en cada momento se indican mediante (*) y ns (diferencias no significativas)

A los 7 días postratamiento, las citoquinas *il1 β* y *tnfa* mostraron una leve tendencia al aumento en los grupos alimentados con Hep20 y con la combinación Ds/Hep20, mientras que en el grupo tratado con Ds los niveles se mantuvieron similares al control. Estos resultados sugieren una activación moderada y transitoria de la respuesta proinflamatoria esplénica. En cambio, la expresión de *il10* presentó una tendencia al alza en los grupos tratados, especialmente en la combinación Ds/hep20, tanto a los 7 como a los 14 días, lo que podría reflejar una regulación antiinflamatoria compensatoria frente a la estimulación inicial del sistema inmune.

Aunque las variaciones no fueron estadísticamente significativas, las tendencias observadas en el bazo indican que la administración oral de Hep20 y deacilsaponina, individualmente o en conjunto, podría modular de forma equilibrada la respuesta inmune sistémica, promoviendo un balance entre señales proinflamatorias y antiinflamatorias en etapas tempranas del tratamiento.

4.9. Supervivencia de peces alimentada con dieta suplementada con Hepcidina20 en ausencia y presencia de deacilsaponina.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la modulación basal de la expresión de citoquinas en trucha arcoíris como respuesta a la suplementación dietaria con los compuestos inmunomoduladores propuestos. En el diseño experimental original no se consideró la medición de la supervivencia, ni se planificó un ensayo de desafío con patógenos, dado que el enfoque se centraba en analizar la respuesta inmune a nivel molecular.

Sin embargo, la supervivencia se transformó en un hallazgo relevante e inesperado, ya que a partir del séptimo día de alimentación se registró una mortalidad no prevista en los peces experimentales. La causa subyacente de dichas pérdidas no pudo determinarse con certeza, debido a la ausencia de análisis microbiológicos o patológicos específicos durante el ensayo.

Aunque la piscicultura de origen no reportó la presencia de agentes infecciosos, en el centro experimental se había detectado previamente *Saprolegnia* en un lote anterior de peces provenientes del mismo establecimiento, lo que sugiere la posibilidad de una exposición previa o persistente al patógeno. No obstante, los ejemplares utilizados en el presente estudio no mostraron signos clínicos evidentes al momento de su llegada, y como medida preventiva se realizaron baños de sal antes del inicio del experimento, con el objetivo de minimizar riesgos sanitarios y estabilizar las condiciones de los peces durante la fase inicial del ensayo.

La supervivencia acumulada (Figura 4.11) de truchas arcoíris alimentadas con las dietas experimentales durante el periodo de ensayo. El grupo control, que no recibió ningún tipo de suplemento inmunomodulador, presentó la mayor tasa de mortalidad, con una supervivencia final cercana al 60%. Este resultado establece un punto de referencia para estimar el impacto de factores de estrés o condiciones ambientales no controladas que podrían haber contribuido a las pérdidas observadas, confirmando además la vulnerabilidad basal de los peces en ausencia de estimulación inmunológica. Por el contrario, los grupos alimentados con dietas suplementadas con hep20 o con Ds mostraron una mejor supervivencia en comparación con el control, lo que sugiere un efecto protector asociado al uso de estos compuestos bioactivos. En particular, la dieta con Hep20 sola otorgó una protección parcial, evidenciada por un aumento intermedio de la supervivencia, posiblemente vinculado a la activación de mecanismos innatos mediados por este péptido antimicrobiano.

El efecto más destacado se observó en los peces alimentados con dieta suplementada con Ds/hep20, donde se alcanzó la supervivencia más alta al final del experimento. Este resultado sugiere una interacción sinérgica entre ambos compuestos, en la que la hepcidina podría poten-

ciar la respuesta inmune, mientras que la deacilsaponina actuaría como adyuvante, favoreciendo la presentación antigénica y la activación de células efectoras del sistema inmune.

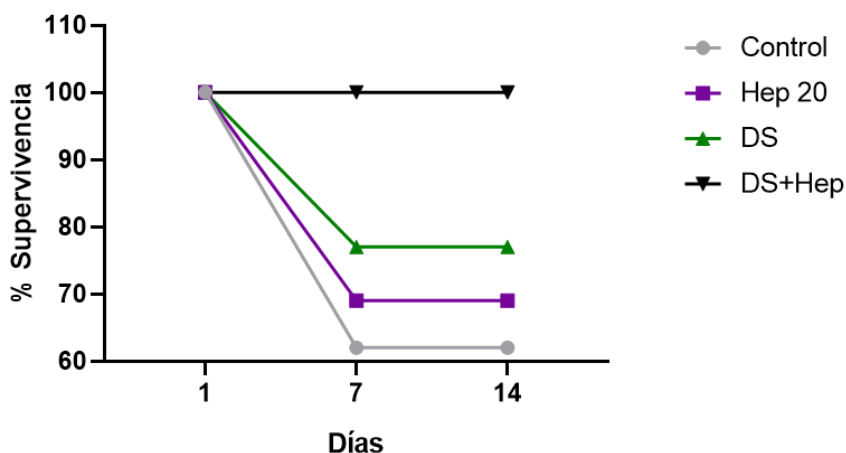


Figura 4.11. Análisis de la Supervivencia de la Trucha Arcoíris sometida a dietas suplementadas.

Curva de supervivencia de peces alimentados durante 21 días con las diferentes dietas experimentales y monitoreados tras la aparición espontánea de mortalidad. La mortalidad inesperada se atribuye a una posible exposición a agentes oportunistas o a factores de estrés ambiental desconocidos, ya que no se realizó un desafío patogénico planificado. Se compararon tres tratamientos: (1) Dieta Control (Ausencia de suplementos, línea gris), (2) Dieta suplementada con Solo Hep20 (línea morada), y (3) Dieta con la Combinación de Hepcidina-20 y Deacilsaponina (línea verde). el grafico representa el tiempo (días de monitoreo) vs porcentaje de supervivencia.

Aunque la etiología exacta de las mortalidades no fue determinada y no se asocia con un desafío patogénico específico, la mejor supervivencia observada en los tratamientos suplementados con Ds/hep20 podría conferir una protección inespecífica efectiva, fortaleciendo las defensas fisiológicas frente a factores ambientales o infecciosos no identificados. Estos resultados respaldan la potencial aplicación de Ds/hep20 como aditivos funcionales en dietas para trucha arcoíris, capaces de mejorar la resistencia general y la respuesta inmunitaria, especialmente cuando se administran de manera combinada. La evidencia obtenida sugiere que esta formulación podría integrarse en estrategias de nutrición inmunoprotectora orientadas a reducir pérdidas productivas bajo condiciones de estrés o exposición a agentes oportunistas.

CAPITULO 5

5. Discusión

5.1. Producción sustentable de la fracción deacilsaponina desde hojas de Quillay

La demanda global de saponinas de quillay ha aumentado de manera sostenida durante las últimas décadas debido a su amplio uso en las industrias alimentaria, farmacéutica, cosmética y otras. Se estima que entre 2009 y 2012 las cosechas de biomasa aumentaron desde aproximadamente 5700 hasta 11 600 toneladas, lo que corresponde a una tasa de crecimiento anual cercana al 19,4 % (Schlotterbeck *et al.*, 2015). Si esta tasa de crecimiento se extendiera teóricamente hasta 2024, la demanda potencial podría situarse entre 80 000 y 100 000 toneladas, es decir, tres a cuatro veces por sobre el umbral sostenible (27 000 toneladas anuales). Aunque estas cifras corresponden a una proyección hipotética, ilustran claramente la magnitud de la presión que la industria ejerce sobre los bosques nativos y justifican la necesidad urgente de fuentes alternativas y renovables de biomasa.

En este contexto, la relevancia económica del quillay ha aumentado considerablemente. En un análisis reciente del comercio exterior, el extracto de quillay lideró por primera vez el ranking anual de Productos Forestales No Madereros (PFNM), con exportaciones por US\$ 20,8 millones, equivalentes al 26,2 % del total del rubro. Esta cifra representa un aumento del 92,5 % respecto a 2019, lo que evidencia una fuerte expansión de la demanda internacional. Asimismo, los principales compradores Suecia (US\$ 8,9 millones) y Estados Unidos (US\$ 6,4 millones)— concentraron el 74 % del total exportado, consolidando al quillay como un producto altamente competitivo en mercados de alto valor (INFOR, 2021). En conjunto, estos antecedentes refuerzan la urgencia de avanzar hacia modelos de producción sustentable que reduzcan la presión sobre la corteza y diversifiquen las fuentes de biomasa.

Históricamente, las hojas han sido subutilizadas debido a que en árboles adultos representan solo entre 4 % y 6 % del peso total y porque los procesos industriales tradicionales no consideran la eliminación de compuestos como clorofilas y polifenoles (Pulido, 2000; Sfeir, 1990). Sin embargo, estudios recientes demuestran que en plantaciones jóvenes las hojas pueden alcanzar un 27,8 % del peso del árbol, convirtiéndose en una fracción considerablemente más abundante. Además, contienen cerca de 2,58 % de saponinas en peso seco, similar a la madera, y pueden aportar hasta un tercio del total de saponinas del árbol (Schlotterbeck *et al.*, 2015). Estas eviden-

cias señalan que las hojas constituyen una materia prima renovable, económicamente valiosa y estratégicamente relevante para un modelo de producción sostenible.

Sobre esta base, en este estudio se desarrolló un protocolo eficiente, reproducible y ambientalmente responsable para la obtención de saponinas y su fracción deacilada (Ds) a partir de hojas de quillay. La extracción acuosa inicial permitió recuperar 12,2 g de extracto crudo (rendimiento 12 %), seguido de una purificación en fase sólida (C18) que generó 3,7 g de saponinas puras. Esto demuestra que, bajo condiciones controladas de laboratorio, las hojas pueden transformarse en una fuente de saponinas de alta calidad, contribuyendo además a la valorización de una biomasa históricamente tratada como residuo (Pulido, 2000).

Metodológicamente, la combinación de extracción acuosa seguida de purificación mediante SPE permitió eliminar de manera eficiente clorofilas, polifenoles y otros metabolitos polares característicos de matrices foliares, generando fracciones con perfiles cromatográficos definidos y libres de interferencias. Este nivel de selectividad contrasta con los procesos industriales tradicionales, que suelen emplear técnicas intensificadas como extracción ultrasónica, sistemas continuos o precipitación con sales orientadas a maximizar el rendimiento, pero que sacrifican la separación fina de impurezas y, por ende, limitan la aplicabilidad de los extractos en estudios bioactivos específicos (Cheok *et al.*, 2014).

Si bien la etapa de purificación requirió el uso de altas concentraciones de metanol como solvente orgánico, su impacto ambiental es considerablemente menor que el de otros solventes históricamente utilizados en la extracción de saponinas, como n-butanol, acetato de etilo o solventes clorados (p. ej., cloroformo o diclorometano) (Azmir *et al.*, 2013). Dentro del marco de la química verde, el metanol es clasificado como un solvente de menor impacto debido a su biodegradabilidad, su alta recuperabilidad mediante destilación, su baja persistencia ambiental y la posibilidad de obtenerlo a partir de fuentes renovables, como biomasa lignocelulósica (Chemat *et al.*, 2019). Asimismo, el uso de gradientes controlados en SPE reduce notablemente el volumen total de solvente requerido en comparación con técnicas convencionales de extracción líquido-líquido o procesos industriales intensivos en solventes.

No obstante, el protocolo presenta algunas limitaciones que deben considerarse antes de su escalamiento. La hidrólisis alcalina, aunque efectiva para eliminar grupos acilo, puede generar mezclas heterogéneas si no se controla finamente el pH, la temperatura y el tiempo, pudiendo resultar en fracciones parcial o excesivamente hidrolizadas. La presente metodología no incluye una verificación estructural completa mediante técnicas de alto poder resolutivo como LC-MS/MS o RMN, por lo que la composición final de la fracción Ds podría variar entre lotes. Ade-

más, aunque SPE es altamente selectiva a nivel de laboratorio, su escalamiento industrial requiere sistemas de cartuchos de gran capacidad, aumento significativo de solvente, cambios en la dinámica de flujo y costos operacionales mayores. A esto se suma que la extracción acuosa a gran escala enfrenta desafíos como la estabilidad microbiológica del extracto, la variabilidad química entre lotes de hojas y la logística de acopio durante la temporada.

En conjunto, estos resultados demuestran que las hojas de quillay constituyen una fuente eficaz, renovable y ambientalmente responsable para la producción de saponinas y Ds equivalentes a QuilA. El protocolo desarrollado, sustentable, selectivo y de alta pureza, provee una base sólida para futuras etapas de escalamiento, aunque será necesario integrar técnicas analíticas estructurales, optimizar las condiciones de hidrólisis y evaluar sistemas industriales de purificación para garantizar consistencia y eficiencia en condiciones reales de producción. Estos avances permitirán consolidar esta aproximación como una alternativa sostenible para el desarrollo de formulaciones orales inmunomoduladora en acuicultura moderna.

5.1. Interacción del grupo acilo con la membrana y toxicidad de saponinas aciladas versus deaciladas

La notable diferencia en los perfiles de toxicidad entre las saponinas aciladas y deaciladas obtenidas desde Quillay puede explicarse desde una perspectiva estructural y, donde el grupo acilo emerge como un determinante esencial en la magnitud de la interacción con la bicapa lipídica (Sun *et al.*, 2009). Las saponinas aciladas, como QuilA o QS-21, presentan un núcleo triterpenoide unido a un oligosacárido y a una cadena acilada de longitud variable (Roner *et al.*, 2014). Esta configuración confiere a la molécula una geometría altamente anfipática que favorece su inserción profunda en la membrana, alterando de manera significativa la organización de los lípidos (Fleck *et al.*, 2019). En este estudio, tanto el estándar QuilA como las saponinas crudas obtenidas desde hojas mostraron una hemólisis elevada, con valores de HD_{50} inferiores a 5 μM , lo cual coincide con los rangos reportados para fracciones aciladas evaluadas en eritrocitos de mamíferos (Zhu *et al.*, 2015). Estos resultados confirman la alta afinidad de estas moléculas por dominios de membrana enriquecidos en colesterol, cuya interacción favorece la formación de poros y explica su marcada actividad hemolítica. En contraste, la fracción deacilsaponina (DS) presentó una hemólisis drásticamente menor ($HD_{50} > 100 \mu M$), lo que indica que la ausencia del grupo acilo modifica el modo de interacción de la molécula con la bicapa, reduciendo su capacidad de inducir perturbaciones permanentes.

Desde la perspectiva del mecanismo de acción, la interacción del grupo acilo con la membrana puede desglosarse en cuatro procesos fundamentales: inserción hidrofóbica profunda, reducción de la energía de curvatura, desestabilización de dominios lipídicos enriquecidos en colesterol, y nucleación cooperativa de poros (Agustín *et al.*, 2011). La cadena acilada incrementa la hidrofobicidad total de la saponina, disminuyendo la barrera energética requerida para atravesar la región polar superficial de la bicapa y accediendo a la zona hidrofóbica interna. Esta inserción profunda genera un desplazamiento lateral de fosfolípidos, aumentando la fluidez local y modificando el ordenamiento de los dominios lipídicos (So Lin y Wang, 2010; Agustín *et al.*, 2011). Estudios de dinámica molecular han demostrado que la presencia del grupo acilo incrementa el tiempo de residencia de la molécula en la membrana respecto a las formas deaciladas, prolongando su capacidad de perturbar la bicapa, esta permanencia extendida favorece la formación de agregados saponina colesterol altamente estables, que constituyen la base estructural de la toxicidad asociada a las saponinas aciladas (Pedebos *et al.*, 2014). Un segundo efecto crítico del grupo acilo es su capacidad para reducir la energía de curvatura de la membrana. La geometría molecular de las saponinas aciladas con una cabeza polar amplia y una cola hidrófoba larga favorece la formación de estructuras con curvatura positiva, como invaginaciones o defectos lipídicos transitorios. Esta alteración facilita la transición de la membrana desde un estado lamelar hacia configuraciones más desorganizadas, en este escenario, la membrana adquiere una mayor susceptibilidad a la formación de poros toroidales o mixtos lípido-saponina (Agustín *et al.*, 2011). El grupo acilo reduce la barrera energética para esta transición, permitiendo que la saponina no solo perturbe la bicapa, sino que mantenga la estructura porosa el tiempo suficiente para inducir la lisis célula (So Lin y Wang, 2010). Además, el grupo acilo participa activamente en la estabilización de dominios lipídicos ordenados (rafts). Estos dominios son microestructuras ricas en colesterol y esfingolípidos que regulan procesos como señalización, endocitosis y organización estructural de la membrana (Anselmo *et al.*, 2025). La interacción triterpeno colesterol facilita la inserción de la saponina en estos dominios, mientras que la cadena acilada incrementa la compatibilidad hidrofóbica con los acilos saturados presentes en los rafts (Cruz *et al.*, 2023). La consecuencia es la formación de complejos que desestabilizan la integridad del dominio, reducen su rigidez y promueven la segregación de lípidos. Esta perturbación induce una pérdida de coherencia estructural que puede propagarse a regiones adyacentes de la membrana, amplificando el daño y acelerando la hemólisis. Este fenómeno es particularmente relevante en eritrocitos, donde la alta concentración de colesterol en la membrana (Niesor *et al.*, 2022) los convierte en un blanco particularmente sensible a las saponinas aciladas. Este mecanismo explica la hemólisis abrupta observada en eritrocitos de peces y mamíferos.

Por el contrario, la fracción Ds al carecer del grupo acilo presenta una inserción superficial y menos persistente. Las interacciones que establece con la bicapa son dominadas por fuerzas electrostáticas y contactos hidrofóbicos restringidos al núcleo triterpenoide, sin la contribución anclante de la cadena acilada. Esta interacción superficial no alcanza la profundidad necesaria para reducir de manera significativa el orden lipídico, ni para desestabilizar dominios raft de forma permanente. Como resultado, los defectos transitorios que se generan son rápidamente resellados por la dinámica natural de la membrana, evitando la nucleación de poros estables. Esta diferencia estructural explica la drástica disminución de hemólisis observada para DS y su comportamiento característico de molécula anfipática de baja agresividad. Desde el punto de vista funcional, DS mantiene la capacidad de asociarse a la superficie de la membrana un atributo esencial para facilitar la permeación de compuestos bioactivos, pero sin comprometer la integridad estructural de la célula.

Los ensayos de viabilidad en líneas celulares RTgutGC y RTS11 complementan este análisis, evidenciando que las interacciones superficiales establecidas por DS no inducen citotoxicidad apreciable ni en epitelio intestinal ni en células inmunitarias. Esta compatibilidad celular es particularmente relevante en el contexto de administración oral, donde la integridad de la barrera epitelial es crucial para la salud del pez y para evitar respuestas inflamatorias no deseadas. La capacidad de DS para mantener alta viabilidad celular indica que su acción como permeador es regulada y reversible, lo que la posiciona como una alternativa atractiva a los surfactantes sintéticos o a las saponinas aciladas tradicionales, cuyos efectos tóxicos limitan su aplicación en sistemas biológicos sensibles.

Finalmente, la combinación de baja toxicidad, afinidad superficial por membranas, estabilidad funcional y origen renovable convierte a DS en un candidato altamente promisorio para su integración en estrategias de administración oral de péptidos inmunoestimulantes, como Hep20. Su obtención desde hojas una fracción renovable y subutilizada contribuye además a la sustentabilidad del proceso, evitando la extracción de corteza y reduciendo el impacto sobre los bosques nativos. Estos resultados no solo validan la fracción DS como un agente de permeación seguro, sino que también abren nuevas perspectivas para su uso como adyuvante de baja toxicidad en acuicultura y otras aplicaciones biotecnológicas.

5.3. Aumento de la disponibilidad y captación celular de Hep20 mediado por la fracción Ds

La administración oral de péptidos bioactivos en peces continúa siendo uno de los principales desafíos en inmunonutrición y biotecnología acuícola debido a la degradación proteolítica en el tracto gastrointestinal, la baja permeabilidad intestinal y la limitada estabilidad estructural de muchas moléculas peptídicas (Embregts *et al.*, 2019; del Hierro *et al.*, 2018). En este contexto, la Hep20 destaca por su potente acción inmunomoduladora; sin embargo, su efectividad depende de alcanzar concentraciones suficientes en el epitelio intestinal y posteriormente en células del sistema inmune. Optimizar su biodisponibilidad mediante estrategias que mejoren su absorción oral resulta entonces esencial para aprovechar su potencial biológico. En peces, se ha demostrado que las saponinas, particularmente aquellas derivadas de Quillay, pueden modular la barrera intestinal y facilitar la captación de macromoléculas administradas por vía oral, aumentando la absorción de antígenos proteicos en salmónidos y ciprínidos e incluso favoreciendo su transporte hacia tejidos inmunes (Refstie *et al.*, 2010; Embregts & Forlenza, 2016; Diógenes *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2022).

En este estudio se comprobó que la coadministración de Hep20 con la fracción Ds, obtenida sustentablemente desde hojas de Quillay, incrementó de manera significativa el traspaso del péptido a través de una monocapa intestinal de RTgutGC y aumentó su acumulación intracelular tanto en células epiteliales como inmunitarias RTS11. Estos resultados constituyen una evidencia clara de que Ds actúa como un promotor de permeabilidad capaz de modular de forma transitoria la organización de la membrana plasmática y facilitar el paso de compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular como Hep20, aumentando su captación sin inducir citotoxicidad y evidenciando un efecto seguro. El comportamiento observado puede explicarse por la naturaleza anfipática de Ds, que le permite interactuar superficialmente con la bicapa lipídica, reducir el empaquetamiento de los fosfolípidos y modular la fluidez local de la membrana. A diferencia de las saponinas aciladas, cuyo grupo acilo promueve una inserción profunda y altamente tóxica, la fracción deacilada conserva la capacidad de alterar el orden lipídico sin comprometer la integridad estructural de la célula. Esta interacción reversible podría favorecer rutas transcelulares de internalización mediante reorganización de microdominios lipídicos, como rafts enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, coherente con lo observado para saponinas deaciladas como DS-1, las cuales han demostrado incrementar la permeabilidad de líneas epiteliales humanas principalmente a través de mecanismos transcelulares con una participación menor de la vía paracelular (Chao *et al.*, 1998; Vinarov *et al.*, 2018). En peces, se ha reportado que extractos de Quillaja modulan la expresión de proteínas asociadas a uniones estrechas (claudinas, ocludina, ZO-1), generando au-

mentos reversibles en la permeabilidad intestinal (Refstie *et al.*, 2010; Vallejos-Vidal *et al.*, 2022), lo que refuerza la hipótesis de que Ds puede actuar de manera similar facilitando el paso de Hep20 a través del epitelio. A partir de los modelos utilizados en este estudio es posible aproximarse de manera consistente a los procesos iniciales que determinan la absorción intestinal de un péptido administrado por vía oral. El aumento del traspaso transepitelial entre los compartimentos apical y basolateral de la monocapa de RTgutGC constituye una evidencia funcional de que Ds incrementa el flujo neto de Hep20 a través del epitelio, un requisito indispensable para su absorción en condiciones *in vivo*. Paralelamente, la clara internalización del péptido tanto en enterocitos como en células inmunitarias demostró que una vez que Hep20 logra atravesar la capa epitelial puede ser reconocido y captado por células residentes del sistema inmune intestinal, lo cual es esencial para generar una respuesta biológica. Si bien el modelo *in vitro* no reproduce la complejidad del tracto digestivo como la presencia de moco, la acción enzimática luminal, la dinámica peristáltica o la influencia de la microbiota sí permite identificar los dos procesos críticos que condicionan la absorción oral: la entrada efectiva del péptido a las células epiteliales y su transporte transepitelial hacia el compartimento interno. En este sentido, los resultados obtenidos son suficientes para proponer un modelo plausible donde Ds potencia la absorción de Hep20 mediante una combinación de facilitación de la internalización y aumento del transporte transcelular, mejorando la probabilidad de que el péptido alcance su sitio de acción en el intestino.

El aumento de la absorción de Hep20 en presencia de Ds posee implicancias biológicas relevantes para la acuicultura. La posibilidad de modular de manera segura la permeabilidad del epitelio intestinal representa un avance importante en el diseño de formulaciones orales para peces, particularmente para moléculas peptídicas que presentan baja estabilidad luminal. En un contexto productivo, donde la hepcidina administrada oralmente puede enfrentar degradación enzimática y condiciones ambientales variables, la acción facilitadora de Ds incrementa la probabilidad de que el péptido alcance concentraciones funcionales en células epiteliales o inmunitarias encargadas de activar mecanismos de defensa. La literatura disponible demuestra que las saponinas pueden mejorar la estabilidad y entrega de antígenos hacia el intestino medio y posterior, favoreciendo su reconocimiento por células presentadoras de antígeno y potenciando la respuesta inmune (Diógenes *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2022), lo que refuerza la interpretación de que el aumento de captación e internalización observado *in vitro* podría traducirse en una mayor eficacia inmunomoduladora *in vivo*.

Sin embargo, para validar este potencial de manera robusta, es necesario avanzar hacia estudios *in vivo* que permitan integrar los hallazgos obtenidos en modelos celulares con la complejidad del tracto digestivo de los peces. En particular, resulta fundamental evaluar no solo la estabilidad del complejo Ds/Hep20 durante el tránsito gastrointestinal, sino también cuantificar su absorción real mediante técnicas sensibles como LC–MS/MS. Asimismo, profundizar en el mecanismo de entrada del complejo permitirá esclarecer si la mejora en la biodisponibilidad se debe principalmente al aumento de rutas transcelulares, a la modulación de paso paracelular o a una combinación sinérgica de ambas, lo que contribuirá a optimizar su formulación futura.

En conjunto, los resultados de este estudio demuestran que la fracción Ds obtenida desde hojas de quillay potencia de manera significativa la biodisponibilidad y la acción inmunomoduladora de Hep20, consolidándose como una herramienta prometedora para la administración oral de péptidos bioactivos en peces. Esta aproximación representa una estrategia innovadora y sustentable, coherente con las necesidades actuales de la acuicultura moderna, y ofrece una alternativa viable para fortalecer la salud intestinal, mejorar la respuesta inmune y reducir la dependencia de antibióticos en sistemas productivos intensivos.

5.4. Acción sinérgica de la fracción Ds sobre la respuesta inmunomoduladora inducida por Hep20 en la línea monocítica (RTS11)

La evaluación temprana de la respuesta inmune (6 h) demostró que la fracción deacilsaponina (Ds) actúa como un potente inductor de inflamación en la línea celular RTS11 (monocitos/macrófagos), evidenciado por el aumento significativo en la expresión de *il1 β* , *tnfa* e *il10* con respecto a hep 20. Este patrón sugiere una activación simultánea de vías proinflamatorias y reguladoras, reflejando una respuesta inmunitaria bifásica en células inmunes de trucha arcoíris. Un perfil similar, caracterizado por la inducción de citocinas proinflamatorias seguida de una respuesta reguladora mediada por *il-10*, ha sido descrito para saponinas vegetales en macrófagos de mamíferos, donde estos compuestos son capaces de estimular *tnfa*, *il-1 β* e *il-6* y, de forma concomitante o posterior, promover la producción de *il-10* y la activación de rutas antiinflamatorias asociadas a la polarización macrófagos (Xiong *et al.*, 2025). Este estudio aporta, por primera vez en células inmunes de peces, evidencia sobre la naturaleza bifásica de la respuesta inducida por saponinas, incluso en ausencia de un estímulo patógeno. En esta fase aguda, la presencia de Hep20 no produjo un efecto atenuador sobre la fuerte inducción mediada por Ds, lo que sugiere que su acción como inmunomodulador no se manifiesta durante las etapas iniciales del proceso inflamatorio. Esto coincide con lo reportado por Álvarez *et al.* (2022), quienes describen que Hep20 ejerce una modulación retardada en la línea celular RTS11, con efectos a las 24 horas.

En contraste, la coadministración Ds/Hep20 promovió un aumento robusto en la expresión de *il1 β* , *tnfa* e *il10*. Este resultado fue inesperado, ya que la pérdida del grupo acilo característica de la fracción Ds teóricamente debería reducir su capacidad inmunomoduladora (Pillon *et al.*, 1996; Araújo *et al.*, 2017). El grupo acilo confiere a las saponinas mayor hidrofobicidad y capacidad de inserción en membranas, propiedades que facilitan su interacción con receptores celulares y la activación de rutas inflamatorias; este comportamiento se ha descrito para QS-21 y otras fracciones de saponina de Quillaja, donde se ha demostrado la activación del inflamasoma NLRP3, la activación de caspasa-1 y la secreción de *il1 β* e *il18* por células presentadoras de antígeno primadas con agonistas de TLR (Marty-Roix *et al.*, 2016). Sin embargo, es posible que la hidrólisis alcalina no haya eliminado completamente todas las saponinas aciladas, dejando una fracción residual parcialmente acilada capaz de conservar su capacidad de estimulación inmune. Esta interpretación coincide con la naturaleza compleja de los extractos de Quillaja y con trabajos recientes donde extractos purificados de saponinas de esta especie han mostrado una potente activación de macrófagos de salmón atlántico, incluyendo aumento de fagosoma–lisosoma y expresión de mediadores inmunes tanto proinflamatorios como reguladores (Cortés *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos respaldan los mecanismos inmunológicos descritos para las saponinas, pero aportan evidencia nueva sobre su dinámica temporal y la magnitud de la respuesta en células inmunes de peces, incluso en ausencia de un patógeno.

Un aspecto clave para comprender la respuesta observada es que las saponinas pueden comportarse como DAMPs (Patrones asociado a daño) debido a su capacidad de alterar la integridad y el orden lipídico de la membrana plasmática. Estas perturbaciones generan señales de daño como entrada de Ca^{2+} , liberación de ATP u otras moléculas de peligro que son reconocidas por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y activan rutas proinflamatorias aun en ausencia de patógenos (Lee *et al.*, 2021; Tizard, 2020). Este mecanismo explica por qué Ds induce activación temprana de citocinas en RTS11 y por qué la coadministración con Hep20 puede potenciar la señal, ya que la reorganización de microdominios lipídicos facilita rutas transcelulares y endocíticas dependientes de rafts. En este escenario, la fracción Ds no actuaría únicamente como un estímulo proinflamatorio, sino como un modulador dinámico capaz de desencadenar una fase efectora inicial y una fase reguladora posterior. Esta interpretación concuerda con el modelo propuesto, pero además sugiere que en peces las saponinas podrían adaptar su señalización en función del tipo celular, tiempo de exposición y contexto específico, ajustando la intensidad de la respuesta para mantener la homeostasis inmunológica. El hecho de que en RTS11 se observe una inducción temprana de *il-10* es especialmente relevante, ya que estudios con esta misma línea celular han mostrado que la producción de *il-10* aumenta tras infecciones intra-

celulares como las causadas por *P. salmonis*, donde su expresión se asocia a mecanismos de contención de la inflamación y de protección del hospedero frente a daño excesivo (Álvarez et al., 2016).

Por otra parte, la ausencia de modulación por parte de Hep20 durante las primeras horas sugiere que su efecto inmunorregulador podría depender de su internalización o de la activación de vías intracelulares más lentas, posiblemente relacionadas con el metabolismo del hierro o con la activación de *stat3* en fases posteriores, como se ha descrito para la hepcidina en otros modelos donde regula tanto el tráfico de hierro como la intensidad de la inflamación (Shen et al., 2023). En este sentido, es probable que Ds actúe inicialmente sobre receptores de membrana, mientras que Hep20 ejerza un efecto complementario al modular la transcripción de genes vinculados a la resolución de la inflamación. A las 6, 12 y 24 horas, la combinación Hep20/Ds produjo un aumento sostenido de $\text{tnf}\alpha$, indicativo de una fase inflamatoria activa. A las 12 horas, esta respuesta se mantuvo en un nivel moderado, mientras que a las 24 horas se evidenció un incremento exacerbado en todas las citocinas evaluadas, lo que refleja la transición hacia una fase regulada y posteriormente compensatoria de la respuesta inmune. Este equilibrio entre activación y regulación es fundamental para evitar daño tisular, manteniendo la eficacia inmunológica sin comprometer la homeostasis celular, y coincide con lo descrito para otros extractos saponínicos que presentan una fase efectora temprana seguida de una fase reguladora más tardía (Xiong et al., 2025).

Un aspecto clave es que Hep20, por sí solo, mostró a las 24 horas una respuesta moderada en comparación con la deacilsaponina. Sin embargo, cuando ambos compuestos son coadministrados, la magnitud de la respuesta sugiere un efecto sinérgico. Esto puede explicarse porque la saponina induce inicialmente señales de daño celular (DAMPs) debido a su capacidad de alterar el orden lipídico de la membrana. Estas señales activan Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) y desencadenan una inflamación temprana, frente a la cual Hep20 puede amplificar o modular la respuesta. En este contexto, la hepcidina actuaría respondiendo a un microambiente inflamatorio inducido por Ds, potenciando la activación de vías dependientes de *NF- κ B* y contribuyendo así a la respuesta inmunitaria conjunta observada.

Estos resultados tienen una implicancia biotecnológica directa para la acuicultura, ya que demuestran que las saponinas de quillay, incluso en su forma deacilada, pueden modular eficazmente la respuesta inmune de peces de manera controlada. En conjunto, la fracción Ds se perfila como un modulador inmunológico dual, capaz de inducir una inflamación transitoria y activar mecanismos de regulación posteriores, mientras que su sinergia potencial con Hep20 podría potenciar la inmunidad protectora sin generar efectos adversos. Este comportamiento coincide

con la tendencia observada en el desarrollo de adyuvantes basados en saponinas para uso veterinario y humano, donde se busca maximizar la respuesta protectora minimizando la toxicidad (Cao *et al.*, 2025). En este sentido, Ds representa una base prometedora para el desarrollo de inmunoestimulantes orales sostenibles, orientados a fortalecer la resistencia de los peces frente a patógenos y reducir la dependencia de antibióticos en la producción acuícola.

5.5. Efecto potenciador de Ds sobre la actividad inmunomodulador de Hep20 en administraciones oral e inyectable

La evaluación de la respuesta inmune tras la administración intraperitoneal de Hep20 en presencia de Ds evidenció que la magnitud y el tipo de modulación inmunitaria dependen estrechamente del órgano analizado. A las 24 horas postinyección, el riñón anterior y el bazo mostraron perfiles de expresión génica claramente diferenciados, lo que refleja la especialización funcional de estos tejidos dentro del sistema inmune de los teleósteos (Secombes *et al.*, 2012). En el riñón anterior, la administración de Hep20 generó una respuesta basal o moderada en las citoquinas evaluadas, confirmando que el péptido, por sí solo, induce una activación inmune de baja intensidad. En contraste, los peces con Ds/hep20 mostraron un aumento pronunciado de *il-1 β* e *il-10*. Esta sensibilidad es especialmente relevante en el riñón anterior, dado que este órgano constituye el principal centro hematopoyético e inmunológico de los peces, donde residen abundantes poblaciones de macrófagos, monocitos y granulocitos altamente reactivos a estímulos inflamatorios (Secombes *et al.*, 2012). La coadministración Ds/Hep20 produjo el patrón más robusto, un incremento marcado en *il-1 β* , acompañado de una elevación significativa de *il-10*, indicando una respuesta inmunitaria bifásica. La activación inicial mediada por Ds podría favorecer la internalización y acción posterior de Hep20, permitiendo que el péptido module rutas más lentas asociadas a la regulación inflamatoria. Esta combinación de señales proinflamatorias y antiinflamatorias sugiere un mecanismo de cooperación donde Ds actúa como un iniciador de la inflamación, mientras que Hep20 contribuye a activar circuitos reguladores, generando una respuesta más equilibrada y sostenida que cualquiera de los compuestos por separado. Estos resultados confirman que, a las 24 horas postinyección, la combinación Ds/Hep20 induce una activación inmune intensa y regulada en el riñón anterior, lo que se alinea con su papel central como órgano integrador de señales sistémicas y generador de citoquinas pro- y antiinflamatorias.

A diferencia del riñón anterior, el bazo presentó una respuesta más moderada y orientada a la regulación homeostática. Los tratamientos individuales con Hep20 o Ds no generaron cambios marcados en la expresión de las citoquinas evaluadas. Sin embargo, Ds/Hep20 desencadenó un

aumento evidente de *il-1 β* y *il-10*, sugiriendo una activación mixta, típicamente asociada a tejidos linfoides secundarios donde predominan linfocitos y células presentadoras de antígeno dedicadas a la vigilancia sanguínea (Zapata *et al.*, 2006). Esta respuesta más contenida puede reflejar que, a nivel esplénico, los estímulos evaluados promueven vigilancia y regulación más que inflamación activa, evitando una activación excesiva que pudiera comprometer la homeostasis sistémica.

Los resultados obtenidos durante el ensayo de alimentación evidencian que la administración oral de deacilsaponina (Ds), sola o en combinación con Hep20, es capaz de modular la expresión de citoquinas en trucha arcoíris, especialmente en el riñón anterior. A los 7 días de tratamiento, tanto Ds como la combinación Ds/Hep20 indujeron un aumento de *il1 β* y *il10*, patrón que indica una activación temprana del sistema inmune innato acompañada de una respuesta regulatoria compensatoria. Este comportamiento sugiere que Ds actúa como un estímulo inicial capaz de desencadenar inflamación moderada y simultáneamente promover mecanismos de control homeostático, coherente con la naturaleza anfipática de las saponinas, que pueden activar rutas dependientes de PRRs mediante cambios en la integridad y orden de la membrana celular.

La marcada similitud entre la dieta con Ds sola y la dieta con Ds/Hep20 indica que, en estas primeras etapas del tratamiento oral, la fracción deacilsaponina constituye el principal determinante de la modulación inmune, mientras que Hep20 no muestra un efecto adicional evidente. Este fenómeno puede explicarse por dos razones: (i) la biodisponibilidad reducida de péptidos administrados por vía oral, y (ii) el hecho de que la señalización inducida por Ds es suficientemente fuerte como para dominar la respuesta inicial. A los 14 días postratamiento, la disminución de *il1 β* e *il10* sugiere un proceso de resolución y adaptación inmunológica, posiblemente asociado a tolerancia intestinal frente a compuestos bioactivos de la dieta.

Los resultados obtenidos coinciden con lo descrito previamente para la vía intraperitoneal en estudios con Hep20. Álvarez *et al.* (2022) reportaron una activación inmunitaria marcada en riñón y una respuesta más moderada en bazo durante el primer día posterior a la inyección. De manera similar, en el presente trabajo la administración oral reprodujo este patrón organoespecífico: una activación intensa en el riñón anterior y una respuesta más contenida en el bazo, aun cuando el estímulo inmunitario se originó a nivel intestinal. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la organización funcional de los tejidos inmunes determina la magnitud y el tipo de modulación, independiente de la vía de administración utilizada.

El patrón observado también se alinea con estudios de saponinas de quillay administradas por vía oral. Recientemente, se demostró que extractos de quillay suplementados en la dieta de salmón Atlántico modulan genes inmunes clave y reducen la mortalidad durante desafíos por *P. salmonis* (Cortés *et al.*, 2023), apoyando su función como inmunoestimulantes dietarios no farmacológicos. Del mismo modo, otras especies de peces presentan una activación sistémica tras ingesta de saponinas vegetales, lo que indica que el intestino es capaz de traducir señales bioactivas hacia órganos como el riñón anterior, aun cuando las moléculas presenten baja absorción. En este contexto, el comportamiento del bazo durante el ensayo de dieta sin cambios significativos, pero con incrementos suaves y persistentes de *il.10* es consistente con su rol como órgano linfoide secundario orientado a la vigilancia sistémica. El bazo evita respuestas inflamatorias excesivas frente a estímulos dietarios y favorece señales reguladoras que mantengan la homeostasis, lo cual explica la ausencia de aumentos marcados en *il1 β* o *tnfa* pese a las variaciones biológicamente relevantes observadas en *il10* (Morales *et al.*, 2021).

Los resultados del ensayo de dieta muestran que la deacilsaponina es el componente más determinante en la modulación inmune temprana tras administración oral, mientras que Hep20 podría requerir mayor estabilidad o absorción para ejercer plenamente su efecto. La combinación Ds/Hep20 no potencia la respuesta más allá de Ds sola en los primeros 14 días, pero sí genera un perfil regulado y fisiológicamente seguro, lo que resulta relevante para diseñar inmunoestimulantes orales que actúen sin inducir inflamación crónica ni daño tisular. Estos hallazgos, sumados a la evidencia previa en peces, refuerzan el potencial de Ds como modulador inmunitario sostenible para uso en acuicultura intensiva.

5.6. Efecto protector de la combinación Hep20/Ds en ensayos *in vivo*

Durante el ensayo de administración oral se registraron mortalidades en los grupos control, Hep20 y Ds entre los 7 y 14 días posteriores al inicio de la alimentación experimental. Es relevante señalar que existían antecedentes de brotes de saprolegniosis en otros lotes provenientes de la misma piscifactoría. Debido a ello, los peces de este estudio recibieron un tratamiento preventivo previo a su traslado al centro experimental. No obstante, estos antecedentes sugieren que los peces podrían haber estado expuestos previamente al agente infeccioso, lo que habría comprometido parcial o subclínicamente su estado inmunológico al inicio del ensayo.

La saprolegniosis, causada por *Saprolegnia parasitica*, es una de las principales patologías que afectan a salmones en agua dulce. Se caracteriza por lesiones algodonosas en piel y branquias, y puede desencadenar altas tasas de mortalidad (Elameen *et al.*, 2021). En este estudio, algunos peces manifestaron signos clínicos compatibles con esta enfermedad. Sin embargo, no se realizaron análisis microbiológicos ni moleculares que permitieran confirmar la presencia del patógeno, por lo que no es posible atribuir de manera concluyente la mortalidad observada a *Saprolegnia*. Esta limitación metodológica obliga a interpretar los resultados con cautela, aunque las evidencias clínicas sugieren una posible afectación de este tipo.

Un aspecto destacable fue que los peces alimentados con la dieta que contenía la combinación Ds/Hep20 no presentaron mortalidades. Este resultado podría interpretarse como un posible efecto protector frente a infecciones oportunistas o condiciones de estrés inmunológico. Las saponinas se han descrito con actividad antifúngica y antimicrobiana, siendo capaces de inhibir el crecimiento de diversos hongos ambientales y fitopatógenos, como *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium ultimum* (Dixit *et al.*, 2010; Chapagain *et al.*, 2007). Si bien no existen reportes específicos contra *Saprolegnia*, esta evidencia sugiere que las fracciones deaciladas, como Ds, podrían ejercer un efecto antifúngico indirecto o contribuir al fortalecimiento de la inmunidad innata, reduciendo la susceptibilidad frente a infecciones subclínicas. Adicionalmente, las saponinas poseen la capacidad de activar macrófagos y estimular la producción de citocinas proinflamatorias, fortaleciendo las defensas iniciales del hospedero frente a patógenos ambientales (Francios *et al.*, 2000; Lin & Wang, 2010). En ensayos *in vivo*, se ha reportado que dietas suplementadas con extractos de saponinas reducen significativamente la mortalidad en salmónidos expuestos a agentes infecciosos (Cortés *et al.*, 2023). Bajo esta perspectiva, Ds/hep20 podría haber potenciado la respuesta inmune basal, aumentando la resistencia de los peces frente a infecciones oportunistas no detectadas durante el experimento. Sin embargo, la imposibilidad de determinar con certeza la causa de la mortalidad observada obliga a interpretar estos resultados como preliminares. Para confirmar con mayor precisión el potencial protector de esta combinación, será necesario realizar un ensayo específicamente diseñado para evaluar su efectividad frente a un desafío experimental controlado. Este tipo de estudio permitiría establecer si la reducción de mortalidad observada se debe efectivamente a un efecto inmunoestimulante o antifúngico de DS/hep20, fortaleciendo la evidencia para su aplicación en condiciones de cultivo. Este hallazgo refuerza el valor de las deacilsaponina como componentes funcionales capaces de mejorar la salud y supervivencia de los peces en sistemas de cultivo, ofreciendo una alternativa natural y sostenible a tratamientos convencionales.

CAPITULO 6

6. CONCLUSIONES

- **Obtención sustentable:** La fracción deacilsaponina puede obtenerse eficientemente desde hojas de Quillaja saponaria mediante un procedimiento sencillo y reproducible, lo que representa una alternativa sostenible frente al uso tradicional de la corteza. Este enfoque contribuye al aprovechamiento de recursos renovables y a la conservación de los bosques nativos.
- **Seguridad mejorada:** La fracción deacilsaponina obtenida desde hojas presentó una actividad hemolítica y citotoxicidad significativamente reducidas en comparación con las saponinas comerciales derivadas de corteza, demostrando ser una fuente más segura y biocompatible para su uso en sistemas biológicos.
- **Aumento de biodisponibilidad de Hepcidina 20:** La combinación de deacilsaponina con Hepcidina 20 (DS/Hep20) incrementó disponibilidad del péptido en las líneas celulares RTGutGC y RTS11, evidenciando su capacidad como potenciador de permeabilidad intestinal y facilitador de la internalización celular.
- **Potenciación de la respuesta inmunomoduladora:** La combinación DS/Hep20 indujo una respuesta inmunológica más robusta y equilibrada en peces, tanto en ensayos de administración oral como inyectable, destacando un perfil caracterizado por la activación inicial de citocinas proinflamatorias (*il-1 β* , *tnfa*) seguida por una regulación compensatoria mediada por *il10*.
- **Potencial biotecnológico y como adyuvante:** La fracción deacilsaponina demostró poseer actividad inmunomoduladora intrínseca y baja toxicidad, posicionándola como un candidato promisorio para su uso como adyuvante natural en formulaciones vacunales y en estrategias de inmunoestimulación oral en peces, aportando una herramienta sostenible y eficaz para fortalecer la salud en sistemas acuícolas.

Nomenclatura

%= Porcentaje

µg= Microgramos

µL= Microlitros

µm= Micrometros

RTS11= Línea celular derivada de bazo de trucha arcoíris

RTGutGC= Línea celular intestinal de trucha arcoíris

FITC= Fluoresceína

il-10= Interleuquina 10

il-1β= Interleuquina 1 beta

tnfα= Factor de necrosis tumoral

C-terminal= Extremo carboxilo terminal

N-terminal= Extremo amino terminal

SPPS= Síntesis de péptidos en fase sólida

PCR= Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR= PCR en tiempo real cuantitativo

IFAT= Inmunofluorescencia

HPLC= Cromatografía líquida de alta eficacia

RT-PCR= Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa

inversa

PBS= Buffer fosfato salino

ARN= Ácido ribonucleico

ARNm= ARN mensajero

ADNc= ADN complementario

ELF-1 α = Factor de elongación 1 alfa

Hep25= Péptido maduro de hepcidina de trucha

Hep20= Variante de péptido maduro de hepcidina de trucha

Hep20-FITC= Variante de péptido maduro de hepcidina de trucha
acoplado a fluoresceína

ATCUN= Amino-terminal copper and nickel binding

DMSO= Dimetilsulfoxido

DS= Deacilsaponina

DAMPs= Patrones asociado a daño

REFERENCIAS

- Agrillo, B., Porritiello, A., Gratino, L., Balestrieri, M., Proroga, Y. T., Mancusi, A., ... & Palmieri, G. (2023). Antimicrobial activity, membrane interaction and structural features of short arginine-rich antimicrobial peptides. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- Álvarez, C. A., Acosta, F., Montero, D., Guzmán, F., Torres, E., Vega, B., & Mercado, L. (2016). Synthetic hepcidin from fish: uptake and protection against *Vibrio anguillarum* in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology*, 55, 662-670.
- Álvarez, C. A., Gomez, F. A., Mercado, L., Ramírez, R., & Marshall, S. H. (2016). *Piscirickettsia salmonis* imbalances the innate immune response to succeed in a productive infection in a salmonid cell line model. *PloS one*, 11(10), e0163943.
- Álvarez, C. A., Santana, P. A., Salinas-Parra, N., Beltrán, D., Guzmán, F., Vega, B., ... & Mercado, L. (2022). Immune Modulation Ability of Hepcidin from Teleost Fish. *Animals*, 12(12), 1586.
- Anselmo, S., Bonaccorso, E., Gangemi, C., Sancataldo, G., Conti Nibali, V., & D'Angelo, G. (2025). Lipid rafts in signalling, diseases, and infections: what can be learned from fluorescence techniques?. *Membranes*, 15(1), 6.
- Aristizábal, B., & González, Á. (2013). Innate immune system. In *Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]*. El Rosario University Press.
- Asensio-Calavia, P., González-Acosta, S., Otazo-Pérez, A., López, M. R., Morales-de la Nuez, A., & Pérez de la Lastra, J. M. (2023). Teleost Piscidins—In Silico Perspective of Natural Peptide Antibiotics from Marine Sources. *Antibiotics*, 12(5), 855.
- Ashfaq, H., Soliman, H., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2019). CD4: a vital player in the teleost fish immune system. *Veterinary research*, 50(1), 1-11.
- Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B., & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72(6), 435-457.
- Bachmann-Vargas, P., van Koppen, C. K., & Lamers, M. (2021). Re-framing salmon aquaculture in the aftermath of the ISA crisis in Chile. *Marine Policy*, 124, 104358.
- Baral, K. C., & Choi, K. Y. (2025). Barriers and strategies for oral peptide and protein therapeutics delivery: update on clinical advances. *Pharmaceutics*, 17(4), 397.
- Barbosa, F. C., Tadine, R. M., Rezende, J. D. P., Lopes, G. C. D., & Neto, E. A. (2023). Current challenges for the use of phytotherapy: a narrative. *Contribuciones a las Ciencias Sociales*, 16(5), 2066-2078..

-
- Barhate, G., Gautam, M., Gairola, S., Jadhav, S., & Pokharkar, V. (2013). Quillaja saponaria extract as mucosal adjuvant with chitosan functionalized gold nanoparticles for mucosal vaccine delivery: stability and immunoefficiency studies. *International journal of pharmaceutics*, 441(1-2), 636-642.
 - Barroso, C., Carvalho, P., Nunes, M., Gonçalves, J. F., Rodrigues, P. N., & Neves, J. V. (2021). The era of antimicrobial peptides: use of hepcidins to prevent or treat bacterial infections and iron disorders. *Frontiers in Immunology*, 12, 754437.
 - Bhat, R. A. H., Khangembam, V. C., Thakuria, D., Pant, V., Tandel, R. S., Tripathi, G., & Sarma, D. (2022). Antimicrobial activity of an artificially designed peptide against fish pathogens. *Microbiological Research*, 260, 127039.
 - Brinchmann, Monica Fengsrud. "Immune relevant molecules identified in the skin mucus of fish using-omics technologies." *Molecular BioSystems* 12.7 (2016): 2056-2063.
 - Cabello, F.C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H. (2013). Uso de antimicrobianos en la acuicultura reexaminado: su relevancia para la resistencia a los antimicrobianos y para la salud animal y humana. *Microbiología ambiental*, 15(7), 1917-1942.
 - Caccia, E., Agnello, M., Ceci, M., Strickler Dinglasan, P., Vasta, G. R., & Romano, N. (2017). Antimicrobial peptides are expressed during early development of zebrafish (*Danio rerio*) and are inducible by immune challenge. *Fishes*, 2(4), 20.
 - Campostrini, N., Traglia, M., Martinelli, N., Corbella, M., Cocca, M., Manna, D., ... & Girelli, D. (2012). Serum levels of the hepcidin-20 isoform in a large general population: The Val Borbera study. *Journal of proteomics*, 76, 28-35.
 - Cao, L., Dong, P., Liu, J., Zhang, J., Xie, H., Yu, S., & Zhang, J. (2025). Advancements in saponin-based vaccine adjuvants. *Medicinal Chemistry Research*, 1-16.
 - Complementar porque es necesario el uso de potenciadores de asociación
 - Cortés, H. D., Gómez, F. A., & Marshall, S. H. (2021). The phagosome–lysosome fusion is the target of a purified quillaja saponin extract (Pqse) in reducing infection of fish macrophages by the bacterial pathogen *piscirickettsia salmonis*. *Antibiotics*, 10(7), 847.
 - Cortés, H., Castillo-Ruiz, M., Cañón-Jones, H., Schlotterbeck, T., San Martín, R., & Padilla, L. (2023). In vivo efficacy of purified quillaja saponin extracts in protecting against *piscirickettsia salmonis* infections in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Animals*, 13(18), 2845.
 - Cronin, S. J. F., Woolf, C. J., Weiss, G., & Penninger, J. M. (2019). *The role of iron regulation in immunometabolism and immunity*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, 116. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00116>
 - Cruz, MDFSJ, y Pereira, GM (2023). Relación estructura-actividad de las saponinas triterpenoides: propiedades biológicas y aplicaciones comerciales. *Revista Fitos*, 17 (2), 295-316.

-
- Chao, A. C., Nguyen, J. V., Broughall, M., Recchia, J., Kensil, C. R., Daddona, P. E., & Fix, J. A. (1998). Enhancement of intestinal model compound transport by DS-1, a modified Quillaja saponin. *Journal of pharmaceutical sciences*, 87(11), 1395-1399.
 - Chapagain, B. P., Wiesman, Z., & Tsrer, L. (2007). In vitro study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 26(2), 109-115.
 - Chaturvedi P, RaH B, Pande A. Péptidos antimicrobianos de pescado: alternativas inocuas a los antibióticos. *Reverendo Aquacult* (2020) 12:85–106. doi: 10.1111/raq.12306
 - Chen, Caixia, Xiulan Su, and Zhiwei Hu. "Immune promotive effect of bioactive peptides may be mediated by regulating the expression of SOCS1/miR-155." *Experimental and therapeutic medicine* 18.3 (2019): 1850-1862.
 - Chen, F., Li, X., Wu, Y., Huang, D., Guo, Y., Zhang, Y., ... y Mai, K. (2020). Influencia del péptido antimicrobiano dietético APSH-07 en el crecimiento, la respuesta inmunitaria y la resistencia a la vibriosis del abulón (*Haliotis discus hannai* Ino). *Aquaculture Nutrition*, 26 (5), 1736-1747.
 - Chen, Jiemin, et al. "Antibiotics and food safety in aquaculture." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68.43 (2020): 11908-11919.
 - Chen, R. C., & Lan, C. Y. (2020). Human antimicrobial peptide hepcidin 25-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Microorganisms*, 8(4), 585.
 - Chettri, J. K., Mehrdana, F., Hansen, E. B., Ebbensgaard, A., Overgaard, M. T., Lauritsen, A. H., ... & Buchmann, K. (2017). Antimicrobial peptide CAP18 and its effect on *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): comparing administration by injection and oral routes. *Journal of fish diseases*, 40(1), 97-104.
 - de Groot, C., & Müller-Goymann, C. C. (2016). Saponin interactions with model membrane systems—Langmuir monolayer studies, hemolysis and formation of ISCOMs. *Planta medica*, 82(18), 1496-1512.
 - de Koning, C., Beekhuijzen, M., Tobor-Kaplon, M., de Vries-Buitenweg, S., Schoutsen, D., Leeijen, N., ... & Emmen, H. (2015). Visualizing compound distribution during zebrafish embryo development: the effects of lipophilicity and DMSO. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 104(6), 253-272.
 - del Hierro, J. N., Herrera, T., Fornari, T., Reglero, G., & Martín, D. (2018). The gastrointestinal behavior of saponins and its significance for their bioavailability and bioactivities. *Journal of Functional Foods*, 40, 484-497.
 - Dixit, V., Tewari, J., & Obendorf, S. K. (2010). Fungal growth inhibition of regenerated cellulose nanofibrous membranes containing Quillaja saponin. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 59, 417-423.
 - Dong, ZR, Mu, QJ, Kong, WG, Qin, DC, Zhou, Y., Wang, XY, ... y Xu, Z. (2022). Respuestas inmunitarias de la mucosa intestinal y eficacia protectora de la vacuna oral contra el herpesvirus cipro-

nido de levadura tipo 2 (CyHV-2) en *Carassius auratus gibelio*. *Frontiers in Immunology*, 13, 932722.

- Donoso, S., Peña, K., Pacheco, C., Luna, G., & Aguirre, A. (2011). Respuesta fisiológica y de crecimiento en plantas de Quillaja saponaria y *Cryptocarya alba* sometidas a restricción hídrica. *Bosque (Valdivia)*, 32(2), 187-195.
- Dourmashkin, R. R., Dougherty, R. M., & Harris, R. J. C. (1962). Electron microscopic observations on Rous sarcoma virus and cell membranes. *Nature*, 194(4834), 1116-1119.
- Drayton, M., Deisinger, J. P., Ludwig, K. C., Raheem, N., Müller, A., Schneider, T., & Straus, S. K. (2021). Host Defense Peptides: Dual Antimicrobial and Immunomodulatory Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11172.
- Elameen, A., Stueland, S., Kristensen, R., Fristad, R. F., Vrålstad, T., & Skaar, I. (2021). Genetic analyses of saprolegnia strains isolated from salmonid fish of different geographic origin document the connection between pathogenicity and molecular diversity. *Journal of Fungi*, 7(9), 713.
- Embregts, C. W., Rigau, D., Tacchi, L., Pijlman, G. P., Kampers, L., Veselý, T., ... & Forlenza, M. (2019). Vaccination of carp against SVCV with an oral DNA vaccine or an insect cells-based subunit vaccine. *Fish & Shellfish Immunology*, 85, 66-77.
- Faraj, S. A., & Al-Abedy, N. M. (2022). Hepcidin. In *Iron Metabolism-A Double-Edged Sword*. IntechOpen.
- Figueroa, C., Veloso, P., Espin, L., Dixon, B., Torrealba, D., Elalfy, I. S., ... & Gallardo, J. A. (2020). Host genetic variation explains reduced protection of commercial vaccines against *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon. *Scientific Reports*, 10(1), 18252.
- Fleck, J. D., Betti, A. H., Da Silva, F. P., Troian, E. A., Olivaro, C., Ferreira, F., & Verza, S. G. (2019). Saponins from *Quillaja saponaria* and *Quillaja brasiliensis*: particular chemical characteristics and biological activities. *Molecules*, 24(1), 171.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: A review. *British Journal of Nutrition*, 88(6), 587-605. doi:10.1079/BJN2002725
- Francis, G., Levavi-Sivan, B., Avitan, A. y Becker, K. (2002). Efectos de la alimentación a largo plazo con saponinas de Quillaja sobre la proporción de sexos, el colesterol muscular y sérico y los niveles de LH en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus* (L.)). *Bioquímica y Fisiología Comparadas, Parte C: Toxicología y Farmacología*, 133 (4), 593-603.
- GANASSIN, R. C., & BOLS, N. C. (1998). Development of a monocyte/macrophage-like cell line, RTS11, from rainbow trout spleen. *Fish & Shellfish Immunology*, 8(6), 457-476.
- Ganz, T. (2003). Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 102(3), 783-788.
- Gatlin III, Delbert M., and Fernando Y. Yamamoto. "Nutritional supplements and fish health." *Fish Nutrition*. Academic Press, 2022. 745-773.

-
- Gemperle, C., Schmid, M., Herova, M., Marti-Jaun, J., Wuest, S. J., Loretz, C., & Hersberger, M. (2012). Regulation of the formyl peptide receptor 1 (FPR1) gene in primary human macrophages. *PloS one*, 7(11), e50195.
 - Gemperle, C., Schmid, M., Herova, M., Marti-Jaun, J., Wuest, S. J., Loretz, C., & Hersberger, M. (2012). Regulation of the formyl peptide receptor 1 (FPR1) gene in primary human macrophages. *PloS one*, 7(11), e50195.
 - Ghodsi, Z., Kalbassi, M. R., Farzaneh, P., Mobarez, A. M., Beemelmans, C., & Moghaddam, J. A. (2020). Immunomodulatory function of antimicrobial peptide EC-Hepcidin1 modulates the induction of inflammatory gene expression in primary cells of Caspian Trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). *Fish & shellfish immunology*, 104, 55-61.
 - Guerra, F. y Sepúlveda, S. (2020). Producción de saponina en especies del género Quillaja. Una perspectiva sobre sus aplicaciones y biología. *Scientia Agrícola*, 78 (5), e20190305.
 - Guo, S., & Kenne, L. (2000). Structural studies of triterpenoid saponins with new acyl components from Quillaja saponaria Molina. *Phytochemistry*, 55(5), 419-428.
 - Hancock, R. E., Alford, M. A., & Haney, E. F. (2021). Antibiofilm activity of host defence peptides: Complexity provides opportunities. *Nature Reviews Microbiology*, 19(12), 786-797.
 - Haney, E. F., Straus, S. K., & Hancock, R. E. (2019). Reassessing the host defense peptide landscape. *Frontiers in chemistry*, 7, 43.
 - Harrer, T., Plettenberg, A., Arastéh, K., Van Lunzen, J., Fätkenheuer, G., Jaeger, H., ... & Voss, G. (2014). Safety and immunogenicity of an adjuvanted protein therapeutic HIV-1 vaccine in subjects with HIV-1 infection: a randomised placebo-controlled study. *Vaccine*, 32(22), 2657-2665.
 - Hassan, S. M., Byrd, J. A., Cartwright, A. L., & Bailey, C. A. (2010). Hemolytic and antimicrobial activities differ among saponin-rich extracts from guar, quillaja, yucca, and soybean. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 1008-1017.
 - Hsieh, J. C., Pan, C. Y., & Chen, J. Y. (2010). Tilapia hepcidin (TH) 2-3 as a transgene in transgenic fish enhances resistance to *Vibrio vulnificus* infection and causes variations in immune-related genes after infection by different bacterial species. *Fish & shellfish immunology*, 29(3), 430-439.
 - Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., Yi, H., 2020. Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
 - Ibieta, P., Tapia, V., Venegas, C., Hausdorf, M., & Takle, H. (2011). Chilean salmon farming on the horizon of sustainability: review of the development of a highly intensive production, the ISA crisis and implemented actions to reconstruct a more sustainable aquaculture industry. *Aquaculture and the environment—A shared destiny*, 215-246.

-
- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 175-181.
 - Jiang, X., Cao, Y., von Gersdorff Jørgensen, L., Strobel, B. W., Hansen, H. C. B., & Cedergreen, N. (2018). Where does the toxicity come from in saponin extract?. *Chemosphere*, 204, 243-250.
 - Jin, Z., Shen, M., Wang, L., Wang, C., Gao, M., Yu, G., ... & Zhang, X. (2023). Antibacterial and immunoregulatory activity of an antimicrobial peptide hepcidin in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124833.
 - Katzenback, Barbara A. "Antimicrobial peptides as mediators of innate immunity in teleosts." *Biology* 4.4 (2015): 607-639.
 - Koo, H. B., & Seo, J. (2019). Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Peptide Science*, 111(5), e24122.
 - Kumar, S. D., & Shin, S. Y. (2020). Antimicrobial and anti-inflammatory activities of short decapeptides derived from duck cathelicidin: Plausible mechanism of bactericidal action and endotoxin neutralization. *European journal of medicinal chemistry*, 204, 112580.
 - Lacaille-Dubois, M. A. (2016). Newest Strategies in the Search for Bioactive Saponins from the Tropical Plant Biodiversity. *Current Drug Delivery*, 13(3), 389-399.
 - Lafferty KD, Harvell CD, Conrad JM, Friedman CS, Kent ML, Kuris AM, et al. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annu Rev Marine Sci* (2015) 7:471–96. doi: 10.1146/annurev-marine-010814-015646
 - Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*, 30(3), 131-141.
 - Lauth, X., Babon, J. J., Stannard, J. A., Singh, S., Nizet, V., Carlberg, J. M., ... & Westerman, M. E. (2005). Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9272-9282.
 - Lee, P. T., Yamamoto, F. Y., Low, C. F., Loh, J. Y., & Chong, C. M. (2021). Gut immune system and the implications of oral-administered immunoprophylaxis in finfish aquaculture. *Frontiers in Immunology*, 12, 773193.
 - Leon, R., Ruiz, M., Valero, Y., Cardenas, C., Guzman, F., Vila, M., & Cuesta, A. (2020). Exploring small cationic peptides of different origin as potential antimicrobial agents in aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, 98, 720-727.
 - Liao, Y., Li, Z., Zhou, Q., Sheng, M., Qu, Q., Shi, Y., ... & Shi, X. (2021). Saponin surfactants used in drug delivery systems: A new application for natural medicine components. *International Journal of Pharmaceutics*, 603, 120709

-
- Lieke, T., Meinelt, T., Hoseinifar, S. H., Pan, B., Straus, D. L., & Steinberg, C. E. (2020). Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 943-965.
 - Lin, W. C., Chen, Y. R., Chuang, C. M., & Chen, J. Y. (2022). A cationic amphipathic Tilapia piscidin 4 peptide-based antimicrobial formulation promotes eradication of bacterial vaginosis-associated bacterial biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 13, 806654.
 - Liu, E., Huang, T., Gu, W., Wang, G., Dong, F., Ma, H., ... & Xu, G. (2022). Molecular characterization and antibacterial immunity functional analysis of the antimicrobial peptide hepcidin from *Coregonus ussuriensis* berg. *Fish & Shellfish Immunology*, 122, 78-86.
 - Liu, G., Anderson, C., Scaltreto, H., Barbon, J. y Kensil, CR (2002). Estudios de estructura/función de QS-21: efecto de la acilación sobre la actividad adyuvante. *Vaccine*, 20 (21-22), 2808-2815.
 - Liu, G., Anderson, C., Scaltreto, H., Barbon, J., & Kensil, C. R. (2002). QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine*, 20(21-22), 2808-2815.
 - Lorena, R., Karina, Y., Ekaterina, P., Cecilia, B., Sebastián, Z., Miguel, B. J., ... & Javiera, C. (2022). Impacts of COVID-19 on the Chilean salmon: A first approach to the effects of the pandemic in the industry. *Marine Policy*, 105185.
 - Luna, O. F., Gomez, J., Cárdenas, C., Albericio, F., Marshall, S. H., & Guzmán, F. (2016). Deprotection reagents in Fmoc solid phase peptide synthesis: moving away from piperidine?. *Molecules*, 21(11), 1542.
 - Lloyd-Williams, P., Albericio, F., & Giralt, E. (2020). *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. CRC Press.
 - Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A. L., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A., ... & Tegos, G. P. (2020). The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(9), e216-e230.
 - Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 194.
 - Mahrous, K. F., Aboelenin, M. M., Abd El-Kader, H. A., Mabrouk, D. M., Gaafar, A. Y., Younes, A. M., ... & Hassanane, M. S. (2020). Piscidin 4: Genetic expression and comparative immunolocalization in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge using different local bacterial strains. *Developmental & Comparative Immunology*, 112, 103777.
 - Malerba, M. (2018). The immunomodulatory role of epidermal hepcidin in infectious condition (Doctoral dissertation, Sorbonne Paris Cité).
 - Marciani, D. J. (2018). Elucidating the mechanisms of action of saponin-derived adjuvants. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(6), 573-585.
 - Marciani, Dante J., et al. "Altered immunomodulating and toxicological properties of degraded Quilajia saponaria Molina saponins." *International immunopharmacology* 1.4 (2001): 813-818

-
- Mardones, F. O., Martinez-Lopez, B., Valdes-Donoso, P., Carpenter, T. E., & Perez, A. M. (2014). The role of fish movements and the spread of infectious salmon anemia virus (ISAV) in Chile, 2007–2009. *Preventive veterinary medicine*, 114(1), 37-46.
 - Marques, ME, de Carvalho, AC, Yendo, AC, Magedans, YV, Zachert, E. y Fett-Neto, AG (2023). Fitotoxicidad de las saponinas foliares de Quillaja lancifolia y su potencial bioherbicida. *Plantas*, 12 (3), 663.
 - Marty-Roix, R., Vladimer, G. I., Pouliot, K., Weng, D., Buglione-Corbett, R., West, K., ... & Lien, E. (2016). Identification of QS-21 as an inflammasome-activating molecular component of saponin adjuvants. *Journal of Biological Chemistry*, 291(3), 1123-1136.
 - Masso-Silva, J. A., & Diamond, G. (2014). Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals*, 7(3), 265-310.
 - Mastrogiovanni, M. (2012). Extracción, purificación y caracterización primaria de saponinas de Quillaja brasiliensis.
 - Merrifield, R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149-2154.
 - Minghetti, M., Drieschner, C., Bramaz, N., Schug, H., & Schirmer, K. (2017). A fish intestinal epithelial barrier model established from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cell line, RTgutGC. *Cell biology and toxicology*, 33(6), 539-555.
 - Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P. y Davidson, D. J. (2020). Péptidos antimicrobianos de defensa del huésped: funciones y potencial clínico. *Nature revisa el descubrimiento de fármacos*, 19(5), 311-332.
 - Morais, V., Suarez, N., Cibulski, S., & Silveira, F. (2025). Leaf Saponins of Quillaja brasiliensis as Powerful Vaccine Adjuvants. *Pharmaceutics*, 17(8), 966.
 - Morales-Lange, B., Agboola, JO, Hansen, J. Ø., Lagos, L., Øyås, O., Mercado, L., ... & Øverland, M. (2021). El bazo como diana para caracterizar los efectos inmunomoduladores de las levaduras *Cyberlindnera jadinii* procesadas en salmón del Atlántico expuesto a una dieta con harina de soja. *Frontiers in Immunology*, 12, 708-747.
 - Morgan, M. J., & Liu, Z.-g. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Research*, 21, 103-115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178> [Nature](#)
 - Mutoloki, S., Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2015). Oral vaccination of fish—antigen preparations, uptake, and immune induction. *Frontiers in immunology*, 6, 519.
 - Nairz, M., Theurl, I., Swirski, F. K., & Weiss, G. (2017). “Pumping iron”—how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 469, 397-418. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1944-8>
 - Nemeth, E., & Ganz, T. (2021). Heparin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6493.

-
- Niesor, E. J., Nader, E., Perez, A., Lamour, F., Benghozi, R., Remaley, A., ... & Connes, P. (2022). Red blood cell membrane cholesterol may be a key regulator of sickle cell disease microvascular complications. *Membranes*, 12(11), 1134.
 - Oliveira-Freitas, E., Casas, C. P., Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Nico, D., Souza, L. O. P., ... & Palatnik-de-Sousa, C. B. (2006). Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 24(18), 3909-3920.
 - Ouyang, J., Zhu, Y., Hao, W., Wang, X., Yang, H., Deng, X., ... & Wang, Y. (2022). Three naturally occurring host defense peptides protect largemouth bass (*Micropterus salmoides*) against bacterial infections. *Aquaculture*, 546, 737383.
 - Pan, C. Y., Peng, K. C., Lin, C. H., & Chen, J. Y. (2011). Transgenic expression of tilapia hepcidin 1-5 and shrimp chelonianin in zebrafish and their resistance to bacterial pathogens. *Fish & shellfish immunology*, 31(2), 275-285.
 - Pan, CY, Lee, SC, Rajanbabu, V., Lin, CH y Chen, JY (2012). Perspectivas sobre las funciones antibacterianas e inmunomoduladoras de la hepcidina (TH) 2-3 de tilapia contra la infección por *Vibrio vulnificus* en ratones. *Inmunología del Desarrollo y Comparada*, 36 (1), 166-173.
 - Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., and Malmsten, M. (2012). Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32, 143–171. doi: 10.3109/07388551.2011.594423
 - Pedebos, C., Pol-Fachin, L., Pons, R., Teixeira, CV y Verli, H. (2014). Modelo atómico y dinámica micelar de la saponina QS-21. *Moléculas*, 19 (3), 3744-3760.
 - Peng, K. C., Lee, S. H., Hour, A. L., Pan, C. Y., Lee, L. H., & Chen, J. Y. (2012). Five different piscidins from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: analysis of their expressions and biological functions. *PloS one*, 7(11), e50263.
 - Peng, S., Li, Z., Zou, L., Liu, W., Liu, C., & McClements, D. J. (2018). Improving curcumin solubility and bioavailability by encapsulation in saponin-coated curcumin nanoparticles prepared using a simple pH-driven loading method. *Food & function*, 9(3), 1829-1839.
 - Pirtskhalava, M., Vishnepolsky, B., Grigolava, M., & Managadze, G. (2021). Physicochemical Features and Peculiarities of Interaction of AMP with the Membrane. *Pharmaceuticals*, 14(5), 471.
 - Pontigo, J. P., Espinoza, C., Hernandez, M., Nourdin, G., Oliver, C., Avendaño-Herrera, R., ... & Yáñez, A. J. (2021). Protein-based vaccine protect against *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Immunology*, 12, 602689.
 - Porter, D., Naseer, S., Peggs, D., McGurk, C. y Martin, SAM (2023). Descifrando los efectos inmunostimuladores del β -glucano en una línea celular de macrófagos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (RTS11) mediante análisis del transcriptoma completo. *Genes*,

-
- Rajanbabu, V., & Chen, J. Y. (2011). Antiviral function of tilapia hepcidin 1–5 and its modulation of immune-related gene expressions against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Chinook salmon embryo (CHSE)-214 cells. *Fish & shellfish immunology*, 30(1), 39-44.
 - Rajput, Z. I., Hu, S. H., Xiao, C. W., & Arijo, A. G. (2007). Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(3), 153-161.
 - Rauf, A., Shariati, M. A., Khalil, A. A., Bawazeer, S., Heydari, M., Plygun, S., ... & Aljohani, A. S. (2020). Hepcidin, an overview of biochemical and clinical properties. *Steroids*, 160, 108661.
 - Rauta, P. R., Nayak, B., & Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunology letters*, 148(1), 23-33.
 - Rhea, E. M., Salameh, T. S., & Banks, W. A. (2019). Routes for the delivery of insulin to the central nervous system: A comparative review. *Experimental neurology*, 313, 10-15.
 - Ríos, J. L. (2010). Effects of triterpenes on the immune system. *Journal of ethnopharmacology*, 128(1), 1-14.
 - Roner, M. R., Sprayberry, J., Spinks, M., & Dhanji, S. (2007). Antiviral activity obtained from aqueous extracts of the Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria* Molina). *Journal of General Virology*, 88(1), 275-285.
 - Roopashree, K., & Naik, D. H. A. N. A. N. J. A. Y. (2019). Saponins: properties, applications and as insecticides: a review. *Biosci. Trends*, 8, 1-14.
 - Schar, D., Klein, E. Y., Laxminarayan, R., Gilbert, M., & Van Boeckel, T. P. (2020). Tendencias mundiales en el uso de antimicrobianos en la acuicultura. *Informes científicos*, 10(1), 1-9.
 - Schlotterbeck, T., Castillo–Ruiz, M., Cañon–Jones, H., & Martín, R. S. (2015). The use of leaves from young trees of *Quillaja saponaria* (Molina) plantations as a new source of saponins. *Economic Botany*, 69(3), 262-272.
 - Secombes, C. J., & Wang, T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish. In *Infectious disease in aquaculture* (pp. 3-68). Woodhead Publishing.
 - SERNAPESCA (2024). Informe Sanitario con información productiva y sanitaria de acuicultura (Año 2023).
 - SERNAPESCA 2024. Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional. Subsecretaría de Pesca, Gobierno de Chile.
 - Shen, L., Luo, H., Fan, L., Tian, X., Tang, A., Wu, X., ... & Su, Z. (2023). Potential immunoregulatory mechanism of plant saponins: a review. *Molecules*, 29(1), 113..
 - Shirdel, I., Kalbassi, M. R., Hosseinkhani, S., Paknejad, H., & Wink, M. (2019). Cloning, characterization and tissue-specific expression of the antimicrobial peptide hepcidin from caspian trout (*Salmo caspius*) and the antibacterial activity of the synthetic peptide. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 288-296.

-
- Su, H., Yakovlev, I. A., Van Eerde, A., Su, J., & Clarke, J. L. (2021). Plant-produced vaccines: future applications in aquaculture. *Frontiers in Plant Science*, 12, 718775.
 - Subha Palaneeswari, M., Ganesh, M., Karthikeyan, T., Manjula Devi, A. J., & Mythili, S. V. (2013). Hepcidin—Minireview. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 7(8).
 - Szulc-Dabrowska, L., Bossowska-Nowicka, M., Struzik, J., & Toka, F. N. (2020). Cathepsins in Bacteria-Macrophage Interaction: Defenders or Victims of Circumstance? *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10.
 - Szulc-Dabrowska, L., Bossowska-Nowicka, M., Struzik, J., & Toka, F. N. (2020). *Cathepsins in Bacteria-Macrophage Interaction: Defenders or Victims of Circumstance? Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10.
 - Thorarinsson, R., Wolf, J. C., Inami, M., Phillips, L., Jones, G., Macdonald, A. M., ... & Evensen, Ø. (2021). Effect of a novel DNA vaccine against pancreas disease caused by salmonid alphavirus subtype 3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology*, 108, 116-126..
 - Tseng, C. C., Chu, T. W., Danata, R. H., Risjani, Y., Shih, H. T., & Hu, S. Y. (2020). Hepcidin-Expressing Fish Eggs as A Novel Food Supplement to Modulate Immunity against Pathogenic Infection in Zebrafish (*Danio rerio*). *Sustainability*, 12(10), 4057.
 - Valero, Y., Saraiva-Fraga, M., Costas, B., Guardiola, F.A., 2018. Antimicrobial peptides from fish: beyond the fight against pathogens. *Rev Aquacult.* <https://doi.org/10.1111/raq.12314>
 - VINAROV, Z., et al. Solubilisation of hydrophobic drugs by saponins. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, vol. 80, no 4, p. 709-718
 - Vinay, TN, Park, CS, Kim, HY y Jung, SJ (2014). Toxicidad y determinación de dosis de saponina de quillaja, hidróxido de aluminio y escualeno en el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*). *Inmunología e Inmunopatología Veterinaria* , 158 (1-2), 73-85.
 - Wallace, F., Bennadji, Z., Olivaro, C., & Ferreira, F. (2006). Aislamiento y Purificación de saponinas de Quillaja brasiliensis. *Chromatogr*, 1112, 78-91.
 - Wang, G., 2023. The antimicrobial peptide database is 20 years old: Recent developments and future directions. *Protein Science* 32, e4778. <https://doi.org/10.1002/pro.4778>
 - Wang, J., Dou, X., Song, J., Lyu, Y., Zhu, X., Xu, L., ... & Shan, A. (2019). Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. *Medicinal research reviews*, 39(3), 831-859.
 - Wang, J., Lei, P., Gamil, A. A. A., Lagos, L., Yue, Y., Schirmer, K., ... & Kortner, T. M. (2019). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal epithelial cells as a model for studying gut immune function and effects of functional feed ingredients. *Frontiers in immunology*, 10, 152.
 - Wang, J., Wilson, A.E., Su, B., Dunham, R.A., 2023. Functionality of dietary antimicrobial peptides in aquatic animal health: Multiple meta-analyses. *Animal Nutrition* 12, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.10.001>
 - Wang, P. (2021). Natural and synthetic saponins as vaccine adjuvants. *Vaccines*, 9(3), 222.

-
- Wang, P., Ding, X., Kim, H., Michalek, SM y Zhang, P. (2020). Efecto estructural sobre la adyuvancia de las saponinas. *Revista de química medicinal* , 63 (6), 3290-3297.
 - Wang, P., Ding, X., Kim, H., Michalek, SM y Zhang, P. (2020). Efecto estructural sobre la adyuvancia de las saponinas. *Revista de química medicinal* , 63 (6), 3290-3297.
 - Welsby, I., Detienne, S., N’Kuli, F., Thomas, S., Wouters, S., Bechtold, V., ... & Goriely, S. (2017). Lysosome-dependent activation of human dendritic cells by the vaccine adjuvant QS-21. *Frontiers in immunology*, 7, 663.
 - Xiong, B., Wang, H., Song, YX, Lan, WY, Li, J. y Wang, F. (2025). Saponinas naturales y polarización de macrófagos: perspectivas mecanísticas y terapéuticas en el manejo de enfermedades. *Frontiers in Pharmacology* , 16 , 1584035.
 - Xu, HD, You, CG, Zhang, RL, Gao, P. y Wang, ZR (2007). Efectos de los polisacáridos y astragalósidos de astrágalo en la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* por macrófagos. *Revista de investigación médica internacional*, 35 (1), 84-90.
 - Xu, HD, You, CG, Zhang, RL, Gao, P. y Wang, ZR (2007). Efectos de los polisacáridos y astragalósidos de astrágalo en la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* por macrófagos. *Revista de investigación médica internacional* , 35 (1), 84-90.
 - Yang, M., Chen, B., Cai, J. J., Peng, H., Yuan, J. J., & Wang, K. J. (2011). Molecular characterization of hepcidin AS-hepc2 and AS-hepc6 in black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*): expression pattern responded to bacterial challenge and in vitro antimicrobial activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 158(2), 155-163.
 - Yang, Y., Leser, M. E., Sher, A. A., & McClements, D. J. (2013). Formación y estabilidad de emulsiones utilizando un surfactante natural de molécula pequeña: saponina Quillaja (Q-Naturale®). *Hidrocoloides alimentarios*, 30(2), 589-596.
 - Yilmaz, S., Yilmaz, E., Dawood, M. A., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Abdel-Latif, H. M. (2022). Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: A review. *Aquaculture*, 547, 737514.
 - Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C., & Cortés, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 126-136.
 - Zheng, X., & Gallot, G. (2020). Dynamics of cell membrane permeabilization by saponins using terahertz attenuated total reflection. *Biophysical Journal*, 119(4), 749-755.
 - Zhou, J. G., Wei, J. G., Xu, D., Cui, H. C., Yan, Y., Ou-Yang, Z. L., ... & Qin, Q. W. (2011). Molecular cloning and characterization of two novel hepcidins from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(2), 559-568.
 - Zhou, Jing-Geng, et al. "Molecular cloning and characterization of two novel hepcidins from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*." *Fish & Shellfish Immunology* 30.2 (2011): 559-568.
 - Zhu, D., & Tuo, W. (2016). QS-21: a potent vaccine adjuvant. *Natural products chemistry & research*, 3(4).

-
- Zou, Q., Wu, X., Wang, J., Xia, D., Deng, M., Ding, Y., ... & Chen, T. (2022). Therapeutic effect of Panax notoginseng saponins combined with cyclophosphamide in mice bearing hepatocellular carcinoma H 22 cell xenograft. *Nan Fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*, 42(4), 538-545.
 - Zúñiga, G. E., Junqueira-Gonçalves, M. P., Pizarro, M., Contreras, R., Tapia, A., & Silva, S. (2012). Efecto de la energía ionizante sobre extractos de Quillaja saponaria para ser utilizado como agente antimicrobiano sobre recubrimiento comestible irradiado para fresas frescas. *Física y Química de la Radiación*, 81(1), 64-69.