



UNIVERSIDAD TÉCNICA
FEDERICO SANTA MARÍA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

“Péptidos sintéticos con actividad quelante de hierro y antioxidante como aditivos en la dieta para robustecer el sistema inmune de *Salmo salar* frente a la piscirickettsiosis”

Doctorando:

Yannick Pombett López

Profesores Patrocinantes:

Dr. Luis Mercado Vianco

Dra. Fanny Guzmán Quimbayo

Marzo, 2026

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: Péptidos sintéticos con actividad quelante de hierro y antioxidante como aditivos en la dieta para robustecer el sistema inmune de *Salmo salar* frente a la piscirickettsiosis

Nombre del candidato(a): Yannick Mike Pombett López

Carrera / Grado: Ingeniero en alimentos

Campus: Valparaíso **Departamento:** No aplica

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Luis Mercado, 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)

X 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: 01/09/2025

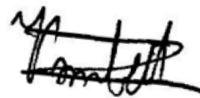
Firma:



Estudiante o Candidato(a):

Fecha 25/08/2025

Firma:



Dedicado a:

Mi amada esposa, que en cada paso que di, fuese certero, en falso, o hacia el vacío, siempre
caminó a mi lado sin vacilar.

“If I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants.”

Isaac Newton (25 de diciembre 1642 – 20 de marzo 1727)

RESUMEN

La acuicultura chilena pierde más de 500 millones USD cada año debido al síndrome rickettsial de salmónidos (SRS), provocado por la infección de la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, siendo responsable de más del 12% de las mortalidades de truchas arcoíris y salmones del Atlántico en el año 2022. En este trabajo, aplicamos péptidos sintéticos quelantes de hierro y antioxidantes como aditivos alimentarios para salmónidos, con la finalidad de evaluar su efecto en la resiliencia del sistema inmune innato frente a *P. salmonis*. El objetivo general de este trabajo consiste en determinar que la ingesta de péptidos sintéticos con actividad quelante de hierro y antioxidante produce efectos inmunomoduladores en *Salmo salar* y la mejora de su resistencia frente a *P. salmonis*. En adición, los objetivos específicos corresponden a (i) seleccionar péptidos con potencial inmunomodulador mediante su capacidad quelante de hierro, antioxidante y su efecto sobre marcadores de la inmunidad innata in vitro, (ii) establecer la inocuidad y biodisponibilidad de los péptidos seleccionados como aditivos alimentarios en *S. salar*, (iii) evaluar el efecto en la inmunidad innata producido por los péptidos sintéticos seleccionados como aditivos alimentarios en *S. salar*, y (iv) evaluar el potencial protector de los péptidos seleccionados como aditivos alimentarios en *S. salar* contra *Piscirickettsia salmonis*. Para cumplir con el objetivo anterior, a partir de investigaciones académicas de otros autores, 17 secuencias de péptidos quelantes de hierro y/o antioxidantes fueron preseleccionadas y químicamente sintetizadas. Del total de los 17 péptidos sintéticos, dos péptidos fueron seleccionados en base a la mayor actividad quelante de hierro presentada en pruebas de determinación de hierro libre por ferrocina y pozo de hierro lábil, ensayos antioxidantes como la capacidad de barrido de radical DPPH·, capacidad de absorbancia de radical de oxígeno, actividad antioxidante celular, y la capacidad de modular marcadores del sistema inmune innato a nivel de transcritos. Los péptidos seleccionados 4426 (antioxidante) y 4429 (quelante de hierro) fueron microencapsulados y añadidos a una dieta similar a la comercial, produciendo tres dietas experimentales: dieta antioxidante (AD), dieta quelante de hierro (ID), y una dieta contenedora de una mezcla de los dos péptidos seleccionados en concentraciones iguales (AID). Las dietas experimentales fueron utilizadas para alimentar a salmones del Atlántico en un desafío de alimentación piloto durante 28 días. El peso corporal, FCR, y SGR fueron mejorados por ID y AID en relación a la dieta control (CD), mientras que solo en el grupo ID aumentó significativamente el número de eritrocitos. Además, se extrajo el bazo y el hígado de los salmones al final del desafío piloto de alimentación para evaluar el efecto de las dietas experimentales en la modulación de genes involucrados en la respuesta inmune innata y la homeostasis redox, lo que nos llevó a descubrir una regulación a la baja de *sod1* y *gshpx* en el hígado de los salmones alimentados con ID y AID, respectivamente. Por otra parte, los peces alimentados con AID presentaron una expresión reducida de *tnfa* en bazo. Finalmente, a partir de los salmones al final del desafío se estableció un cultivo primario de leucocitos de riñón anterior, el cual fue estimulado con *P. salmonis* LF-89, EM-90, o una mezcla de ambos genogrupos, todas inactivadas previamente por calor. Los análisis de expresión relativa a través de RT-qPCR revelaron una regulación al alza de *arg1* en el grupo AD, y un aumento en la expresión de *il8* en los grupos ID y AID, mientras que en el grupo AID la expresión de *sod1* fue disminuida. Aún más, la respuesta inmune de los HKLs provenientes de salmones alimentados con las dietas experimentales fue aumentada significativamente frente a estimulaciones con genogrupos específicos de *P. salmonis* y la mezcla de ambos genogrupos, lo cual no ocurrió en los HKLs del grupo CD. Por los motivos anteriores, se ha establecido que los péptidos sintéticos quelantes de hierro y antioxidantes como aditivos alimentarios son capaces de mejorar la respuesta inmune innata frente a *P. salmonis* inactivada e incrementar los parámetros de crecimiento, presentándose con potencial para seguir siendo desarrollados como tecnología para disminuir las altas tasas de mortalidades provocadas por el SRS.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a todas las personas que me apoyaron durante este magnífico proceso, el cual marcó un antes y un después en mi vida. En primer lugar, agradecer a mi esposa Fernanda Miranda por todo el apoyo durante los momentos más difíciles, y por la dedicación a escuchar mis ideas, resultados, teorías, y cada uno de mis ensayos de presentaciones y charlas. A mi querido perro Lalo, el cual más de una vez brindó el apoyo suficiente para seguir adelante. A mis guías en la vida de la ciencia, al Dr. Luis Mercado por darme la oportunidad de poder realizar este trabajo, por su apoyo incondicional, por depositar su confianza en mí, y por todas las enseñanzas que me ha entregado, y a la Dra. Fanny Guzmán, también por todo su apoyo y dedicación al proyecto, por sus enseñanzas de vida, y principalmente por su infinita paciencia durante estos años de trabajo.

Además, agradecer a mis amigos y a mis padres, que a pesar de en ocasiones no entender lo que estuve haciendo estos 5 años, siempre me brindaron todo su apoyo, atención, y comprensión.

También, agradecer al Grupo de Marcadores Inmunológicos en Organismos Acuáticos del Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular de la PUCV, al Laboratorio de Síntesis de Péptidos del Núcleo de Biotecnología Curauma, y al grupo Foods of Norway de la Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, por facilitarme el espacio, los equipos, la paciencia, y todas esas conversaciones que me permitieron pulir este trabajo y mi persona como investigador.

Por otra parte, agradecer al Doctorado en Biotecnología conjunto PUCV-UTFSM y a ANID, por su financiamiento durante este proyecto, y a Codelco Andina por la disposición de peces para algunos experimentos de este proyecto a través de la Piscicultura Río Blanco.

Finalmente, agradecer al Dr. Patricio Carvajal, que fue la primera persona en mostrarme el camino de la ciencia que yo quise recorrer.

ÍNDICES

Índice General

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Homeostasis del hierro en peces.....	4
El hierro y su adquisición.....	4
2.2 Sistema antioxidante en peces.....	8
El sistema antioxidante y radicales libres.....	8
Mecanismos de defensa antioxidante.....	10
Sistema antioxidante no enzimático.....	12
Regulación del sistema antioxidante.....	12
2.3 Macrófagos, inmunidad nutricional y estado redox en la defensa contra infecciones bacterianas en teleósteos.....	14
Macrófagos en el sistema inmune innato en teleósteos.....	14
Macrófagos y su rol en la inmunidad innata.....	15
Polarización de macrófagos.....	16
Inmunidad nutricional.....	18
Estado redox e inmunidad innata.....	19
2.4 Péptidos bioactivos y su aplicación en la acuicultura.....	21
Péptidos antioxidantes.....	21
Péptidos quelantes de hierro.....	22
CAPÍTULO III: Materiales y métodos.....	25
3.1 Selección, síntesis, y caracterización de péptidos.....	5
3.2 Determinación de actividad quelante de hierro y antioxidante de los péptidos sintéticos.....	29
Ensayo de ferrocina.....	29
Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC).....	30
Animales y cultivo primario de leucocitos de riñón anterior (HKL).....	31
Pozo de hierro lábil (LIP).....	31
Actividad antioxidante celular (CAA).....	32

3.3 Expresión de marcadores del sistema inmune innato en línea celular.....	33
Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	33
Análisis de expresión relativa de genes por medio de RT-qPCR.....	34
3.4 Efecto de los péptidos sintéticos como aditivos alimentarios.....	38
Microencapsulación de péptidos.....	38
Dietas experimentales.....	38
Desafío de alimentación piloto y diseño experimenta.....	39
Conteo de eritrocitos y parámetros de crecimiento.....	39
Extracción de ARN y expresión de marcadores del sistema inmune innato en hígado y bazo de salmones del Atlántico.....	40
Estimulación de HKL con P. salmonis inactivada.....	41
Expresión de marcadores del sistema inmune innato en cultivo primario de HKL.....	41
3.5 Análisis de datos.....	43
CAPÍTULO IV: Resultados.....	44
4.1 Síntesis y caracterización de péptidos.....	44
4.2 Actividad quelante de hierro y antioxidante de los péptidos sintéticos.....	44
4.3 Modulación de marcadores del sistema inmune innato en la línea celular RTS-11 por los péptidos sintéticos preseleccionados.....	47
4.4 Parámetros de crecimiento y número de glóbulos rojos.....	55
4.5 Expresión de marcadores del sistema inmune innato en hígado y bazo de salmones del Atlántico alimentados con las dietas experimentales.....	58
4.6 Expresión de marcadores del sistema inmune innato en cultivo primario de HKL estimulado con P. salmonis inactivada.....	61
CAPÍTULO V: Discusiones.....	67
CAPÍTULO VI: Conclusión.....	82
CAPÍTULO VII: Nomenclatura.....	83
CAPÍTULO VIII: Referencias.....	86
CAPÍTULO IX: Apéndices.....	111
10.1 Índice de apéndices.....	111
Índice de Tablas	

Tabla 3.1. Código, secuencia, actividad reportada, y peso molecular de los péptidos quelantes de hierro y antioxidantes seleccionados.....	27-28
Tabla 3.2. Organismo objetivo, secuencias de primers forward y reverse, temperatura de anillado, y número de acceso de los genes utilizados en RT-qPCR.....	35-37
Tabla 3.3. Organismo objetivo, secuencias de primers forward y reverse, temperatura de anillado, y número de acceso de los genes utilizados en RT-qPCR.....	42-43
Tabla 4.1. Resumen de descubrimientos del primer objetivo.....	55
Tabla 4.2. Parámetros relacionados al crecimiento de salmones del Atlántico al final del desafío piloto de alimentación.....	57
Tabla 4.3. Resumen de descubrimientos del segundo objetivo.....	58
Tabla 4.4. Resumen de descubrimientos del tercer objetivo.....	61
Tabla 4.5. Resumen de descubrimientos del cuarto objetivo.....	66

Índice de Figuras

Figura 2.1. Homeostasis del hierro inorgánico dietario en peces.....	8
Figura 2.2. Producción de ROS celular y sistema de defensa antioxidante.....	14
Figura 2.3. Mecanismo de regulación de la expresión del sistema antioxidante.....	14
Figura 4.1. Actividad quelante de hierro y antioxidante de los péptidos sintéticos.....	46
Figura 4.2. Modulación de marcadores del sistema inmune innato a nivel de transcritos en la línea celular RTS-11 estimulada con los péptidos preseleccionados.....	49-50
Figura 4.3. Mapa de calor y análisis de correlación de la capacidad de modulación del péptido sintético quelante de hierro 4429.....	50-51
Figura 4.4. Mapa de calor y análisis de correlación de la capacidad de modulación del péptido sintético quelante de hierro 4448.....	51-52
Figura 4.5. Mapa de calor y análisis de correlación de la capacidad de modulación del péptido sintético antioxidante 4426.....	52-53
Figura 4.6. Mapa de calor y análisis de correlación de la capacidad de modulación del péptido sintético antioxidante 4430.....	53-54
Figura 4.7. Mapa de calor y análisis de correlación de la capacidad de modulación del péptido sintético antioxidante 4444.....	54-55
Figura 4.8. Peso, talla y número de eritrocitos en salmones del Atlántico al final del ensayo piloto de alimentación.....	56-57
Figura 4.9. Efecto de las dietas experimentales en la expresión relativa de marcadores del sistema inmune innato y de estrés oxidativo en hígado salmones del Atlántico luego de 28 días de desafío de alimentación piloto.....	59

Figura 4.10. Efecto de las dietas experimentales en la expresión relativa de marcadores del sistema inmune innato y de estrés oxidativo en bazo de salmones del Atlántico luego de 28 días de desafío de alimentación piloto.....**60**

Figura 4.11. Efecto de las dietas experimentales en la expresión relativa de marcadores del sistema inmune innato de cultivo primario de HKL de salmones del Atlántico luego de 28 días del desafío piloto de alimentación.....**63-64**

Figura 4.12. Efecto de las dietas experimentales en la expresión relativa de marcadores del sistema inmune innato de cultivo primario de HKL de salmones del Atlántico luego de 28 días del desafío piloto de alimentación.....**64-65**

Figura 4.13. Mapa de calor y análisis de correlación del efecto de las dietas experimentales en los marcadores del sistema inmune innato en cultivo primario de HKL obtenido de salmones del Atlántico luego de 28 días del desafío piloto de alimentación.....**65-66**

HIPÓTESIS

La ingesta de péptidos sintéticos con actividad quelante de hierro y antioxidante como aditivo alimentario produce efectos inmunomoduladores en *Salmo salar*, favoreciendo la respuesta inmune frente a *Piscirickettsia salmonis*.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar que la ingesta de péptidos sintéticos con actividad quelante de hierro y antioxidante produce efectos inmunomoduladores en *Salmo salar*, mejorando su resistencia a *P. salmonis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar péptidos con potencial inmunomodulador mediante su capacidad quelante de hierro, antioxidante y su efecto sobre marcadores de la inmunidad innata in vitro.
2. Establecer la inocuidad y biodisponibilidad de los péptidos seleccionados como aditivos alimentarios en *S. salar*.
3. Evaluar el efecto en la inmunidad innata producido por los péptidos sintéticos seleccionados como aditivos alimentarios en *S. salar*.
4. Evaluar el potencial protector de los péptidos seleccionados como aditivos alimentarios en *S. salar* contra *Piscirickettsia salmonis*.

CAPÍTULO I: Introducción

La acuicultura en Chile ha sido un mercado prominente desde el año 1995, con una producción superior a 1,440 mil toneladas solo en el año 2021, representando el 1,15% de la producción global, posicionando a Chile como el cuarto y el segundo mayor productor de trucha arcoíris y salmón del Atlántico del mundo, respectivamente [FAO, 2024]. Sin embargo, las mortalidades causadas por infecciones superaron el 12% de la producción total de ambas especies en el año 2022 [SERNAPESCA, 2022]. Además, del total de las mortalidades causadas por enfermedades infecciosas, el 49,4% y el 52,8% correspondieron a infecciones causadas por la bacteria *Piscirickettsia salmonis* en trucha arcoíris y salmón del Atlántico, respectivamente, lo cual se traduce a pérdidas anuales por sobre los USD 500 millones [FAO, 2024, SERNAPESCA, 2022].

La bacteria *P. salmonis* pertenece al grupo de las bacterias Gram-negativas intracelulares, siendo activa principalmente en agua de mar y el agente etiológico de la septicemia rickettsial de salmónidos (SRS) [Fryer *et al.*, 1992, Rozas y Enríquez, 2014]. Los salmónidos afectados por SRS presentan síntomas como la pérdida del apetito, estrés, disminución del crecimiento, anemia severa, hinchazón abdominal, úlceras, ascitis serosanguinolenta, y deficiencia de la respuesta del sistema inmune, lo que aumenta la susceptibilidad a otras infecciones [Álvarez *et al.*, 2016, Rozas y Enríquez, 2014, Mardones *et al.*, 2018]. Las principales estrategias utilizadas en la acuicultura de Chile para prevenir y controlar el SRS son el tratamiento con antimicrobianos y la vacunación. Sin embargo, aunque el 93,8% de los antimicrobianos utilizados en agua de mar en la primera mitad del año 2023 [SERNAPESCA, 2023] fueron aplicados para el control de *P. salmonis*, y más del 48,57% de los productos biológicos inmunológicos están registrados para potenciar las defensas contra el SRS [SAG, 2024], las infecciones de *P. salmonis* siguen causando grandes pérdidas a la industria de la acuicultura chilena. Además, el amplio uso de antimicrobianos ha levantado alertas sanitarias, poniendo en riesgo la sostenibilidad de salmonicultura nacional [Farias *et al.*, 2025]. Por lo tanto, se deben desarrollar nuevas estrategias para disminuir las altas tasas de mortalidad en salmónidos y las pérdidas económicas que el SRS está causando. La estrategia propuesta en este trabajo consiste en la aplicación de péptidos sintéticos quelantes de hierro y antioxidantes como aditivos alimentarios para combatir el SRS.

Los péptidos bioactivos son cadenas cortas de 2 a 50 aminoácidos unidas entre sí por un enlace peptídico, los cuales ejercen efectos benéficos en la salud de un organismo. Farmacológicamente, los péptidos presentan ventajas tanto de las proteínas como de las moléculas pequeñas, tales como seguridad, eficiencia, alta selectividad, metabolismo conocido, y una alta potencia [Korhonen y Pihlanto, 2006]. Los péptidos ejercen un amplio rango de actividades biológicas, tales como actividad antihipertensiva, antidiabética, antimicrobiana, antiviral, anticongelante, quelante de hierro, antioxidante, e inmunomoduladora, entre otras. De todas aquellas actividades, la actividad quelante de hierro y antioxidante se presentan como posibles candidatos para potenciar el sistema inmune en salmónidos contra el SRS.

Las bacterias patógenas intracelulares, como *P. salmonis*, requieren el hierro del hospedero para ser capaces de llevar a cabo sus procesos biológicos como la replicación de ADN, metabolismo, y virulencia, por lo que el controlar el hierro celular ha sido demostrado como una forma efectiva de reducir las infecciones provocadas por *P. salmonis* [Pulgar *et al.*, 2015, Valenzuela-Muñoz *et al.*, 2020, Caruffo *et al.*, 2020]. Considerando lo anterior, la inmunidad nutricional se alza como una posible estrategia para el control del SRS. Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el balance redox poseen una estricta relación con la ejecución y efectividad del estallido respiratorio en macrófagos, y con otros componentes del sistema inmune innato. Además, la capacidad antioxidante es descrita como un biomarcador de importancia asociado a un mejor estado de salud y resiliencia frente a infecciones [McCann *et al.*, 2022, Pisoschi *et al.*, 2024]. Diversos estudios en salmónidos han destacado el efecto positivo sobre la adición de compuestos bioactivos en su dieta, obteniendo efectos benéficos como la modulación del sistema inmune o una mayor respuesta frente a patógenos [Hooft *et al.*, 2024, Rocha *et al.*, 2023, Korhonen y Pihlanto, 2006, Pulgar *et al.*, 2015, Caruffo *et al.*, 2020, Romero *et al.*, 2021]. Por tal razón, la aplicación de péptidos sintéticos con propiedades quelantes de hierro y antioxidantes como compuestos bioactivos en alimentos de salmónidos podría generar beneficios en la respuesta inmune frente a *P. salmonis*.

Por lo tanto, en este trabajo preseleccionamos 17 secuencias peptídicas de estudios publicados, los cuales fueron sintetizados químicamente, para luego seleccionar los dos péptidos con la mayor actividad respectiva *in vitro* y añadirlos como aditivos alimentarios para salmónidos. Con los péptidos seleccionados, se produjeron tres dietas experimentales (una dieta quelante de

hierro (ID), una dieta antioxidante (AD), y una dieta con ambas propiedades (AID)) para investigar sus capacidades para estimular la eficiencia de crecimiento y mejorar la resiliencia de salmónidos frente a *P. salmonis*.

CAPÍTULO II: Revisión Bibliográfica

2.1 Homeostasis del hierro en peces

El hierro y su adquisición

El hierro es el elemento químico más abundante en el planeta Tierra, perteneciente al grupo de los metales, y de vital importancia para la mayoría de los organismos vivos, estando éste involucrado en procesos tales como la replicación y reparación del ADN, respiración celular, expresión de genes, metabolismo de lípidos, defensa contra patógenos, transporte de oxígeno, producción de hormonas, colágeno y vitaminas, reacciones redox, contracción muscular, mineralización ósea, entre otros [Farida *et al.*, 2023, Morgan y Anders, 1980, Teh *et al.*, 2024]. Por tal motivo, la deficiencia de hierro puede causar diversos efectos negativos en la salud y el funcionamiento de los organismos. No obstante, el exceso de hierro a nivel celular puede generar efectos adversos tales como la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando daño a nivel de lípidos, proteínas, y material genético, o incluso gatillar la muerte celular a través de la ferroptosis, por lo que es necesaria su regulación a nivel sistémico [Sousa *et al.*, 2020].

En seres humanos y animales, la adquisición de hierro es a través de la ingesta alimentaria. Principalmente, el hierro es absorbido en su forma inorgánica o hierro no hemo, proveniente de fuentes vegetales y mariscos, y en su forma orgánica o hierro hemo, accesible de fuentes animales como la carne. La ingesta de ambos tipos de hierro se da a nivel intestinal, en donde luego es transportado por medio del torrente sanguíneo a los tejidos del cuerpo [Sousa *et al.*, 2020]. Además, los peces teleósteos son capaces de adquirir el hierro disuelto en el agua a través de las branquias y del intestino al tragar agua [Bury y Grosell, 2003 a, Cooper y Bury, 2007]. El hierro presente con mayor biodisponibilidad en este tipo de ambiente es el ion ferroso, aunque en ambientes óxicos se encuentra principalmente el ion férrico con una menor biodisponibilidad. Aún más, a diferencia de en agua dulce, en mar abierto el hierro es un nutriente limitante que se encuentra principalmente como óxido de hierro hídrico coloidal con una muy baja biodisponibilidad, dificultando aún más su adquisición no dietaria [Bury y Grosell, 2003 b]. En adición, otros metales divalentes presentes en los alimentos han demostrado ser sustratos que compiten por su ingreso en intestino anterior, presentando una reducción significativa en la

velocidad de ingesta de ion ferroso en presencia de zinc, cobre, níquel, plomo y cadmio [Kwong y Niyogi, 2009, Kwong *et al.*, 2010, Kwong *et al.*, 2011].

El requerimiento dietario de hierro en peces varía según especie, estado de desarrollo, y crecimiento. Sin embargo, en teleósteos se ha reportado que en algunas especies el requerimiento diario puede oscilar entre los 30 y los 202 mg de hierro por kg de dieta. Por otra parte, la biodisponibilidad y los mecanismos de ingesta de los diferentes tipos de hierro añadido a las dietas no ha sido del todo dilucidada, y también varían de especie a especie [Lall y Kaushik, 2021].

Regulación del hierro a nivel molecular

El hierro no orgánico adquirido a través de la dieta es en forma de ion ferroso, el cual ingresa a los enterocitos duodenales a través de una proteína simportadora de hierro/protones, también conocida como el transportador de metales divalentes-1 (DMT1) (Figura 2.1), permitiendo el movimiento de este a través de la membrana celular. DMT1 es considerado como el transportador de ion ferroso más caracterizado y el más importante, además se ha descrito una alta similitud en secuencias de cDNA de DMT1 entre mamíferos y especies de teleósteos [Scudiero *et al.*, 2009]. Aunque al parecer la función principal de DMT1 es el ingreso el hierro a los enterocitos, la afinidad de DMT1 por metales divalentes y no específicamente por ion ferroso provoca que la absorción de este se vea afectada negativamente en presencia de otros iones, generando un efecto de promiscuidad metálica [Bury y Grosell, 2003 b].

No obstante, la mayoría del hierro no orgánico se encuentra en su forma trivalente, ion férrico, lo cual dificulta su ingreso a las células. Para remediar esto, en mamíferos se han reportado reductasas férricas unidas a las membranas de los enterocitos, tales como el citocromo duodenal B (DCYTB), las cuales se encargan de reducir el ion férrico a ion ferroso, lo que posibilita su paso por DMT1 [Sousa *et al.*, 2020, Waldvogel-Abramowski *et al.*, 2014]. No obstante, a pesar de que los peces son capaces de asimilar el ion férrico derivado de alimentos, se estima que esto ocurre por la acción de reductasas férricas aún no descritas en enterocitos duodenales [Bury y Grosell, 2003 a, Kwong *et al.*, 2010]. Sin embargo, si se han observado relaciones entre la actividad de

reductasas férricas y el contenido de hierro en hígado y bazo en especies como *Anabas testudineus*, y en branquia de *Danio reiro* [Bury y Grosell, 2003 a, Rejitha y Peter, 2013].

El hierro intracelular presente en los enterocitos puede ser almacenado, utilizado para los propios procesos celulares, o liberado al torrente sanguíneo. La proteína encargada de su almacenamiento celular es llamada ferritina, y es una proteína citosólica presente en diversos tejidos que en mamíferos está compuesta por dos subunidades, la subunidad H (FtH) y la subunidad L (FtL) mientras que en peces habitualmente se encuentra una tercera subunidad denominada como subunidad M (FtM) [Giorgi *et al.*, 2008, Scudiero *et al.*, 2009, Xia *et al.*, 2021, Xu *et al.*, 2023].

En situaciones donde existe una baja concentración de hierro y este es requerido por el organismo, un grupo de proteínas conocidas como proteínas reguladoras de hierro (IRP) se unen a elementos de respuesta al hierro (IRE) presentes en el ARNm que codifica para ferritina, lo que previene su traducción, evitando así el almacenamiento del hierro promoviendo su circulación y uso [Bury y Grosell, 2003 b, Sousa *et al.*, 2020, Xu *et al.*, 2023]. Se estima que en mamíferos cada ferritina puede almacenar alrededor de 4500 átomos de hierro en su núcleo mineral, y presenta propiedades enzimáticas siendo capaz de convertir el ion férrico a ion ferroso [Waldvogel-Abramowski *et al.*, 2014].

El hierro intracelular no almacenado en ferritina presente en los enterocitos duodenales es enviado a otros tejidos a través de la circulación sanguínea. Lo anterior ocurre en la cara basolateral de los enterocitos, en donde la proteína transmembrana ferroportina 1 (FPN1) (también conocida como transportador regulado por hierro 1) es la encargada de su transporte a través de la membrana plasmática hacia el torrente sanguíneo, la cual en teleósteos posee una alta similitud con su contraparte mamífera [Bury y Grosell, 2003 b, Shi y Camus, 2006]. La expresión de FPN1 se da en diversos tejidos, entre los que se pueden encontrar riñón, bazo, músculo, hígado, intestino, entre otros, y en algunas especies de teleósteos se han reportado dos ferroportinas funcionales con patrones de expresión diferenciales [Kaminska-Gibas *et al.*, 2023, Xu *et al.*, 2023].

Para mantener la homeostasis del hierro y evitar los efectos dañinos de su excesiva acumulación, en conjunto con las IRP los organismos como peces y mamíferos utilizan el péptido llamado hepcidina. La hepcidina es un péptido antimicrobiano e inmunomodulador perteneciente a los péptidos de defensa del huésped, los cuales son expresados como una de las primeras respuestas del sistema inmune innato frente a patógenos, y además de presentar actividad antimicrobiana, es el regulador clave en la homeostasis del hierro [Silva *et al.*, 2018, Santana *et al.*, 2016, Álvarez *et al.*, 2022]. Cuando los niveles de hierro se encuentran elevados, los hepatocitos expresan el péptido de preprohepcidina de 84 aminoácidos, el cual posee un péptido señal que es clivado al ser exportado al citoplasma en la forma de prehepcidina con 64 aminoácidos, para luego ser clivada nuevamente por enzimas, lo que puede finalizar en el péptido bioactivamente funcional de hepcidina con 25, 22 o 20 aminoácidos [Franchini *et al.*, 2010]. El péptido funcional de hepcidina se une a FPN1, produciendo la internalización y degradación de estos, lo que disminuye la circulación y disponibilidad de hierro en el organismo [Waldvogel-Abramowski *et al.*, 2014].

Luego de la exportación del hierro al medio extracelular por la FPN1 en la cara basolateral de los enterocitos, la ferroxidasa hephaestina cataliza la conversión de ion ferroso a su forma de ion férrico, lo cual permite su transporte por el plasma a través de la transferrina (Tf) [Bury y Grosell, 2003 b]. La Tf es una proteína presente en vertebrados encargada del transporte de ion férrico a través del torrente sanguíneo, la cual es sobreexpresada en situaciones de abundancia de hierro, o subexpresada cuando existe privación del mismo [Neves *et al.*, 2011, Sousa *et al.*, 2020]. La internalización de Tf unida a hierro a la célula ocurre a través de su interacción con la proteína de membrana llamada receptor de transferrina 1 (TfR1), la cual forma un complejo solo con Tf saturada con hierro a pH fisiológico. El complejo Tf-TfR1 ingresa por endocitosis al medio intracelular, en donde por una reducción en el pH del endosoma la afinidad de TfR1 por Tf cambia, siendo ahora solo capaz de unirse a Tf no saturada de hierro, lo que provoca la liberación del ion férrico al endosoma y mantiene el complejo TfR1-Tf. Posteriormente, el ion férrico es reducido por metalorreductasas a su forma divalente, y transportado al citosol por DMT1 [Kawabata, 2019]. Algunos tipos celulares, como los precursores de eritrocitos, solo son capaces de ingresar el hierro por medio de Tf y TfR1, mientras que los hepatocitos pueden utilizar el hierro no unido a Tf y el unido a Tf [Waldvogel-Abramowski *et al.*, 2014]. De forma similar a la regulación de

transferrina, las IRP se unen a las IRE del ARNm de TfR1 en condiciones de escasez de hierro celular, lo que mejora su estabilidad y expresión, mientras que la transcripción de TfR1 también está condicionada por la hipoxia y los factores inducibles de hipoxia (HIF1 α y HIF2 α), funcionando estos como promotores en la expresión de TfR1 [Kawabata, 2019].

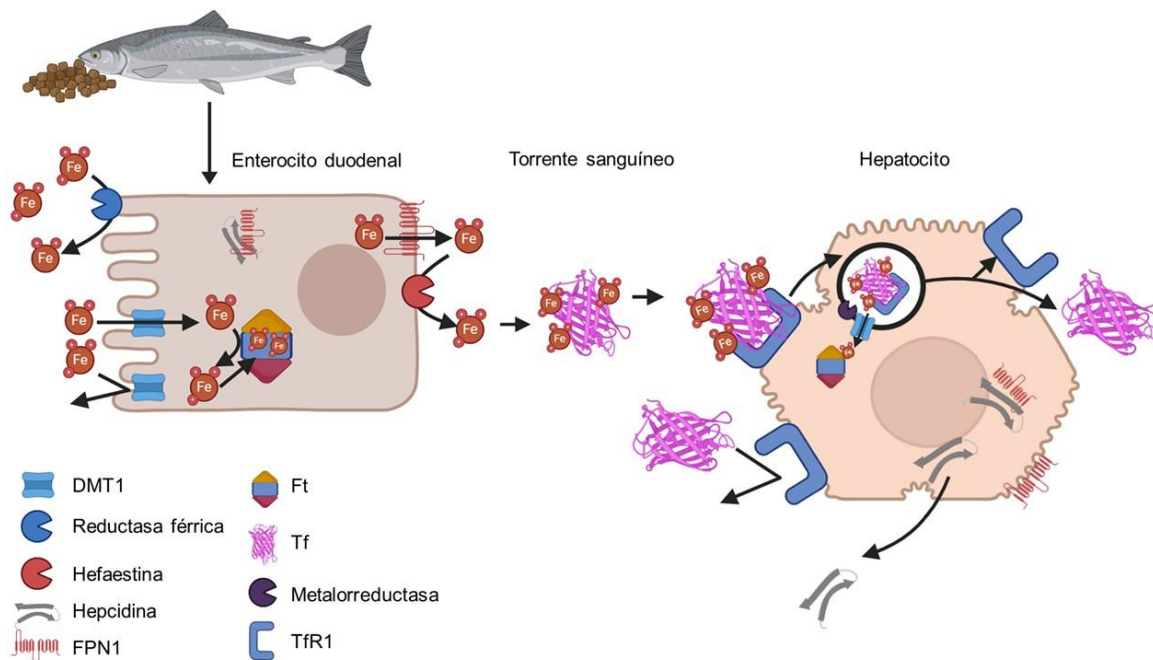


Figura 2.1. Homeostasis del hierro inorgánico dietario en peces.

2.2 Sistema antioxidante en peces

El sistema antioxidante y radicales libres

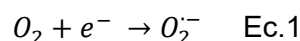
El sistema antioxidante comprende los componentes enzimáticos, dietarios, y no metabólicos enfocados a la regulación de los radicales libres, tales como especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), y especies reactivas de azufre (RSS) producidas en los organismos tanto por factores endógenos como exógenos [Aslani y Ghobadi, 2016]. La modulación del estado redox, en el cual existe una homeostasis entre la generación de especies reactivas y la eliminación de estas, es un proceso de vital importancia para los organismos aerobios [Abrescia *et al.*, 2020]. No obstante, cuando existe un desbalance en la producción de ROS y el sistema antioxidante no logra cumplir con esta demanda, se genera un estado de estrés

oxidativo el cual puede generar daño celular en múltiples niveles [Compa *et al.*, 2024, Kumar *et al.*, 2024].

Los radicales libres son moléculas que poseen uno o más electrones no apareados en su órbita externa lo que las hace altamente reactivas. En peces, los ROS son producidos de forma natural en el proceso de respiración celular, o también por factores ambientales tales como exposición a metales pesados, microplásticos, altas de temperatura, pesticidas, biocidas, posición en la jerarquía social, niveles de testosterona y cortisol, radiación ionizante, entre otros [Compa *et al.*, 2024, Kumar *et al.*, 2024, Aslani y Ghobadi, 2016, Bahn *et al.*, 2016, Culbert *et al.*, 2024, Lu *et al.*, 2024, Rossi *et al.*, 2020, Yang *et al.*, 2020].

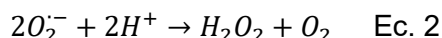
Las ROS, RNS y RSS que no son reducidas por el sistema antioxidante pueden ser muy dañinas para las células, ya que son especies altamente reactivas que pueden provocar la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana celular y mitocondrial, desnaturalización, inactivación y entrecruzamiento de proteínas contenedoras de metionina, cisteína, fenilalanina, triptófano y tirosina, alteración conformacional de carbohidratos que genera alteración en funciones de receptores, hormonales o neurotransmisoras, y clivaje y entrecruzamiento del ADN, y la apoptosis [Kumar *et al.*, 2024, Aslani y Ghobadi, 2016], mientras que a nivel de organismo el estrés oxidativo puede generar estados patofisiológicos como daño por isquemia-reperfusión, hiperoxia, hipoxia, sobrecarga de hierro o intoxicación [Abele y Puntarulo, 2004]. Sin embargo, las ROS y RNS también pueden activar respuestas fisiológicas, funcionando como moléculas señalizadoras para la comunicación neuronal y la inflamación [Aslani y Ghobadi, 2016, Abrescia *et al.*, 2020].

A partir del proceso de respiración celular, la mitocondria consume más del 90% del oxígeno en células no estresadas, y es también el proceso donde se genera la mayor cantidad de ROS [Abele y Puntarulo, 2004]. El anión superóxido es un ROS producido por la reducción de un electrón singlete en la cadena transportadora de electrones a través de la siguiente ecuación:

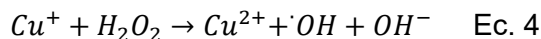
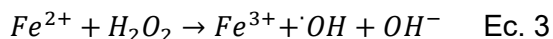


Una de las principales características del anión superóxido es su incapacidad para atravesar membranas lipídicas, por lo que es normalmente encontrado en la mitocondria. No obstante, el anión superóxido también puede ser producido por la actividad de enzimas como la xantina oxidasa (XO), lipoxigenasa, NADPH oxidasa (NOX), y peroxidasas [Aslani y Ghobadi, 2016, Jie *et al*, 2022].

Por otra parte, el peróxido de hidrógeno es una ROS que no es considerada una especie radical y es muy estable, el cual es generado principalmente a través de la dismutación del anión superóxido catalizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD):



El peróxido de hidrógeno es capaz de atravesar membranas celulares libremente, lo cual genera un canal de transferencia de ROS, ya que este puede luego transformarse en radical hidroxilo, la especie más reactiva y destructiva, a través de la transición de metales por la reacción de Fenton:



La vida del radical hidroxilo es muy limitada, ya que reacciona con moléculas instantáneamente luego de su generación, provocando daño en moléculas como ADN, lípidos y proteínas [Abele, y Puntarulo, 2004, Aslani y Ghobadi, 2016].

Mecanismos de defensa antioxidante

Las células poseen un sistema antioxidante encargado de la protección frente a los radicales libres y así evitar los posibles daños provocados por estos, los cuales se pueden separar en mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Sistema antioxidante enzimático

En la primera línea de defensa frente a las ROS se encuentra la enzima SOD, la cual es una metaloenzima que genera la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno. Al igual que en mamíferos, los peces presentan tres grupos de isoformas de SODs, entre las que se

encuentra la super óxido dismutasa de cobre/zinc (CuZn-SOD o SOD1) presente en el citosol, la superóxido dismutasa manganeso mitocondrial (MN-SOD o SOD2), y la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD o SOD3) (Figura 2.2).

Presente en todos los tejidos y también considerada parte de la primera línea de defensa frente al estrés oxidativo, la enzima catalasa (CAT) contiene un anillo de porfirina y está ubicada principalmente en los peroxisomas, en donde cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno molecular.

El glutatión (GSH), es un tripéptido abundante en las células necesario para la actividad de las enzimas glutatión peroxidasas (GPx), las cuales se dividen en GPx dependiente de selenio y GPx independiente de selenio (glutatión S-transferasa, GST), las que reducen el peróxido de hidrógeno a agua transformando el GSH en glutatión disulfuro (GSSG). Existen 4 isoformas de GPx en vertebrados: GPx citosólica o mitocondrial (xGPx o GPx1), GPx citosólica (GPx-x1 o GPx2), GPx extracelular (GPx-P o GPx3), y la fosfolípido hidroperóxido GPx (GPx4). A pesar de que las GPx se encuentran distribuidas en todos los tejidos, el hígado es el órgano que posee la mayor cantidad de esta enzima.

Las tioredoxinas (Trx) poseen el rol de reducir proteínas oxidadas a través de un intercambio entre el grupo tiol de cisteína y los puentes disulfuros de otras proteínas. Estas enzimas no participan directamente en la eliminación de ROS y RNS, pero permiten el funcionamiento de otras enzimas antioxidantes.

Otra familia de enzimas contenedoras de selenocisteína son las tioredoxina reductasas (TrxR), que reducen las Trx oxidadas al consumir NADPH, lo cual permite el correcto funcionamiento de las enzimas dependiente de este y evitar el estrés oxidativo de forma indirecta.

Finalmente, las enzimas tioredoxinas peroxidasas (PRx) en mamíferos y peces se encargan de la eliminación de radicales tiilo y catalizan la reducción directa de peróxidos como el peróxido de

hidrógeno y peroxinitritos a través del uso de tiorredoxinas. Esta familia de enzimas posee un residuo de cisteína como sitio activo, y necesitan de la acción de las sulfirredoxinas (Srxn) para ser nuevamente reactivadas [Kumar *et al.*, 2004, Aslani y Ghobadi, 2016, Abele y Puntarulo, 2004, Esteban *et al.*, 2013, Ferrão *et al.*, 2024, Malandrakis *et al.*, 2024, Thibaut *et al.*, 2021, Xu *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2024, Zhang *et al.*, 2013].

Sistema antioxidante no enzimático

El principal y predominante antioxidante no enzimático en la mayoría de los organismos es el péptido GSH, el cual en vertebrados es sintetizado exclusivamente en el citosol, pero también puede ser encontrado en menor concentración en la mitocondria y peroxisomas, entre otros. Además, el GSH puede ser encontrado en la mayoría de los tipos celulares, pero es principalmente producido y exportado en el hígado. El GSH por sí mismo actúa como un eliminador de ROS de forma directa, pero también participa de indirectamente en reacciones enzimáticas, en donde el GSH es oxidado a GSSG, y luego es nuevamente reducido a GSH por la enzima GR dependiente de NADPH, siendo la razón GSH:GSSG utilizada como un biomarcador del estado redox [Aslani y Ghobadi, 2016, Ferreira *et al.*, 2023, Giustarini *et al.*, 2017].

Las metalotioneínas presentes en peces son una familia de proteínas ricas en residuos de cisteína encargadas de mantener la homeostasis de metales esenciales, los cuales pueden a su vez provocar la generación de ROS, y también poseen la capacidad directa de eliminar radicales hidroxilos [Gopi *et al.*, 2019, Miura *et al.*, 1997].

Otros componentes no enzimáticos con actividad antioxidante y/o efecto protector en vertebrados son la melatonina, la coenzima Q10, vitaminas A, C, y E, metales como el selenio, azufre y cobre, entre otros [Abele y Puntarulo, 2004, Aslani y Ghobadi, 2016, Huang *et al.*, 2023, López-Olmeda *et al.*, 2006, Takahashi y Ogiwara, 2021, Wang *et al.*, 2022, Wang *et al.*, 2024].

Regulación del sistema antioxidante

Más de 200 genes involucrados en el sistema antioxidante son regulados por el factor nuclear similar al factor 2 (Nrf2), el cual reside en el citoplasma, y en situaciones de estrés oxidativo, es translocado al núcleo donde se une a la secuencia promotora llamada elemento de respuesta antioxidante (ARE), lo que promueve la transcripción de enzimas antioxidantes, glutatión, y otros componentes de la desintoxicación electrofílica [Vomhof-DeKrey y Picklo Sr, 2012, Zhang *et al.*, 2013].

Sin embargo, en el citoplasma Nrf2 se encuentra normalmente capturado por la proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch (Keap1), formando el complejo Nrf2-Keap1 que funciona como un regulador negativo de la vía Nrf2/ARE, ya que evita su traslocación al núcleo. Keap1 se compone de 3 dominios funcionales, formando un homodímero donde cada uno de ellos se une a una molécula de Nrf2, además de estar unido a un complejo ubiquitina ligasa E3 por medio de la proteína adaptadora cullin-3, lo que provoca la ubiquitinación de Nrf2 y su posterior degradación proteasomal [Zhang *et al.*, 2013].

La disociación del complejo Nrf2-Keap1 puede ocurrir a través de la interacción con compuestos oxidativos, como las ROS y RNS, ya que Keap1 posee residuos de cisteína altamente reactivos los que al oxidarse generan un cambio conformacional en Keap1 y ,por ende, la liberación de Nrf2. Por tal motivo, se ha propuesto que Keap1 actúa como un sensor del estrés oxidativo celular (Figura 2.3) [Abrescia *et al.*, 2020, Zhang *et al.*, 2013].

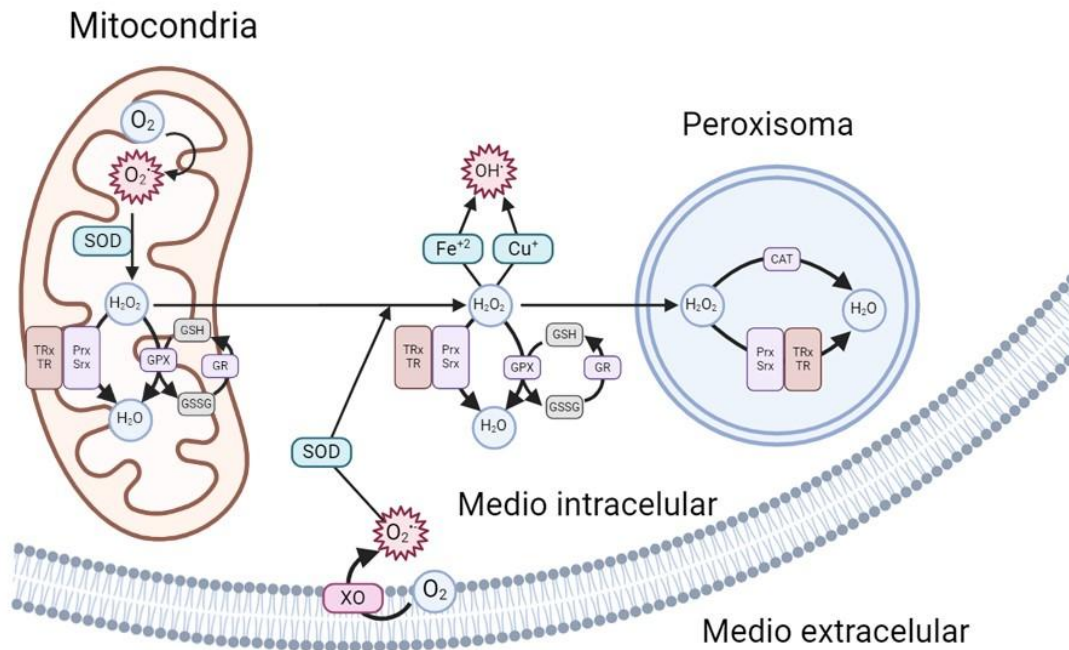


Figura 2.2. Producción de ROS celular y sistema de defensa antioxidante.

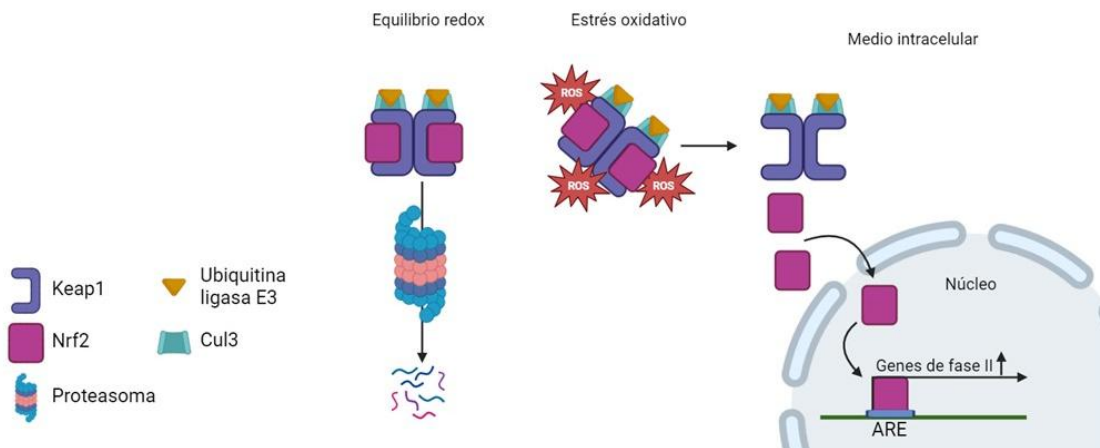


Figura 2.3. Mecanismo de regulación de la expresión del sistema antioxidante.

2.3 Macrófagos, inmunidad nutricional y estado redox en la defensa contra infecciones bacterianas en teleósteos

Macrófagos en el sistema inmune innato en teleósteos

Macrófagos y su rol en la inmunidad innata

Los vertebrados poseen un sistema inmune innato y adaptativo con el cual combaten a los patógenos invasores. El sistema inmune innato funciona como la primera línea de defensa frente a los patógenos, el cual consiste de elementos físicos, humorales, y celulares que actúan rápidamente frente a estímulos. Por otra parte, la respuesta inmune adaptativa es altamente específica y de una mayor duración, siendo los mecanismos de esta solo humorales y celulares [Wu *et al.*, 2024]. Los peces teleósteos se encuentran en habitualmente en un ambiente hostil, en donde el contacto con patógenos es más elevado y desde una etapa de desarrollo más temprana que en el caso de los vertebrados superiores como los mamíferos, lo cual los ha generado una dependencia mayor del sistema inmune innato para mantener la homeostasis al actuar rápidamente frente a los recurrentes estímulos [Speirs *et al.*, 2024].

Entre los componentes celulares del sistema inmune innato se encuentran los macrófagos, siendo estas células pertenecientes a los leucocitos que actúan como la primera línea de defensa contra patógenos en vertebrados y una parte importante del sistema inmune innato. Entre las variadas funciones de los macrófagos en los organismos, como parte del sistema inmune innato estos patrullan tejidos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) intracelulares y extracelulares, entre los que destacan los receptores de tipo Toll (TLRs), las lectinas de tipo C, los receptores tipo NOD (NLRs), y los receptores similares a RIG-1 (RLRs). Estos PRR son capaces de detectar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), que corresponden a pequeños motivos de moléculas conservadas en microorganismos como flagelina o lipopolisacáridos, y a moléculas involucradas señales como estrés oxidativo o muerte celular, respectivamente. Además, los macrófagos presentan actividad fagocítica de patógenos, eliminación de células apoptóticas, eliminación de patógenos, regeneración de tejidos, y promoción de la angiogénesis. En adición, los macrófagos funcionan como células presentadoras de antígeno profesionales a los linfocitos T, generando un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, y son considerados fábricas robustas productoras de citoquinas, las que son capaces de tanto estimular, disminuir, e incluso inhibir la respuesta inmunitaria [Doyle *et al.*, 2024, Grayfer *et al.*, 2018, Speirs *et al.*, 2024, Wu *et al.*, 2024].

Los macrófagos presentan algunas diferencias entre especies de vertebrados, en donde las características conservadas entre ellas son la heterogeneidad funcional y fenotípica, y la procedencia a partir de progenitores hematopoyéticos y monocitos en circulación. Al igual que los vertebrados superiores, los peces poseen órganos linfoides primarios y secundarios con presencia de macrófagos [Doyle *et al.*, 2024, Forlenza *et al.*, 2011].

Polarización de macrófagos

Una de las principales características de los macrófagos es su plasticidad, siendo estos capaces de modificar su fenotipo en base a las señales de su microambiente para ejercer un efecto determinado en base a estas tanto en condiciones de homeostasis como de enfermedad, proceso el cual ha sido denominado polarización.

La polarización es un componente conservado en peces, contando estos con monocitos en circulación capaces de detectar señales y polarizarse a un fenotipo con un estado de activación determinado [Speirs *et al.*, 2024]. Es en base a los dos fenotipos existentes donde se genera una dicotomía entre las funciones de los macrófagos, siendo los macrófagos polarizados al fenotipo M1 poseedores de la función proinflamatoria, mientras que los macrófagos polarizados al fenotipo M2 tienen actividad antiinflamatoria o inmunosupresora. En base a esta diferenciación, los macrófagos se dirigen a los linfocitos T generando así una respuesta en células T helper 1 (T_H1) o T helper 2 (T_H2) para el fenotipo M1 y para el fenotipo M2, respectivamente, lo que finaliza en la potenciación de la actividad de los macrófagos [Wiegertjes *et al.*, 2016].

Una de las principales diferencias entre los macrófagos fenotipo M1 y los fenotipo M2 es el cómo catabolizan la L-arginina, ya que ambos fenotipos expresan diferentes enzimas que utilizan el mismo sustrato. Los macrófagos fenotipo M1 expresan la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS o NOS-2), la cual cataboliza al sustrato L-arginina a L-citrulina y óxido nítrico (NO) como respuesta proinflamatoria, el cual junto con los RNS derivados del mismo y ROS generados por la enzima NADPH oxidasa (NOX) presentan propiedades microbicidas, pueden regular la resolución de la inflamación, y son capaces de mediar la actividad antioxidante [Canton *et al.*, 2021, Soliman y Barreda, 2023]. A diferencia de los mamíferos, los peces poseen dos copias del

gen NOS-2, denominadas como NOS-2A y NOS-2B, siendo NOS-2B la molécula en teleósteos que presenta mayor similitud en expresión y función al NOS-2 de vertebrados superiores [Wiegertjes *et al.*, 2016]. Por otra parte, en los macrófagos fenotipo M2 se expresa la metaloenzima arginasa, la cual provoca la hidrólisis de la L-arginina a L-ornitina y úrea, limitando el sustrato a iNOS, lo que genera la resolución de la inflamación. Además, L-ornitina es utilizada para la producción de L-prolina y poliaminas, los cuales son componentes necesarios durante la regeneración de la matriz extracelular. La enzima arginasa se encuentra tanto en mamíferos como en peces vertebrados en dos isoformas. No obstante, ambas arginasas en peces teleósteos presentan secuencias de direccionamiento solo a la mitocondria, mientras que en mamíferos arginasa-1 posee secuencia de direccionamiento al citoplasma y arginasa-2 a la mitocondria [Forlenza *et al.*, 2011, Wiegertjes *et al.*, 2016].

En vertebrados se han descrito diferentes subtipos de macrófagos en base a las señales del microambiente que provocan su cambio fenotípico y a la respuesta que estos producen. Como parte de los macrófagos polarizados a M1, se han categorizado y caracterizado los macrófagos activados de forma innata, la cual requiere solamente un estímulo microbiano, generando una respuesta proinflamatoria con la expresión de la enzima iNOS, y los macrófagos activados de forma clásica los cuales requieren de un estímulo microbiano y de la presencia de interferón γ ($\text{IFN}\gamma$), factor necrosis tumoral α ($\text{TNF}\alpha$), y/o el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), los que presentan una respuesta proinflamatoria más potente en comparación con los macrófagos activados de forma innata. No obstante, en algunos peces también se han estudiado dos subtipos de macrófagos clásicamente activados, siendo el anteriormente mencionado un macrófago polarizado al subtipo M1a, mientras que los macrófagos polarizados por señales de $\text{IFN}\gamma$ -relacionado (un isómero de $\text{IFN}\gamma$ encontrado en algunas especies de peces, pero no en mamíferos) y $\text{TNF}\alpha$ son categorizados como el subtipo M1b [Forlenza *et al.*, 2011, Grayfer *et al.*, 2018, Wu *et al.*, 2024].

Por otra parte, los macrófagos polarizados a M2 también presentan subtipos. Los macrófagos M2a corresponden a los más estudiados y caracterizados, y son producidos por las citoquinas interleuquina-4 (IL-4) e interleuquina-13 (IL-13), en donde un aumento en la actividad arginasa y la producción de proteínas de matriz extracelular y poliaminas caracterizan a este estado de activación- Por otra parte, los macrófagos fenotipo M2b son aquellos que son estimulador por un

ligando de TLR en conjunto con una señal de complejos inmunes o células apoptóticas, y son conocidos por la alta producción de interleuquina-10 (IL-10), lo que conlleva a una regulación a la baja de citoquinas proinflamatorias. Finalmente, los macrófagos polarizados al subtipo M2c son considerados los macrófagos inmunosupresores, desarrollados en respuesta a IL-10, factor de crecimiento transformante β (TGF- β), o glucocorticoides, los que de forma similar a los macrófagos polarizados M2b, producen altos niveles de IL-10, y son conocidos por la reducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias, RNS, y ROS. No obstante, a pesar de que se han demostrado marcadores específicos de estados de activación en macrófagos de teleósteos, producción y caracterización de citoquinas en base a estímulos, y respuestas similares a las de macrófagos de los vertebrados superiores, aún falta por estudiar y caracterizar los diferentes tipos y subtipos de polarización de macrófagos, lo cual a su vez ha sido dificultado por los eventos de duplicidad de genes (por ejemplo, iNOS1 e iNOS2, IL-4a/13a e IL-4b/13b, e incluso parálogos como IL-13R α 1 e IL-13R α 2), y las diferencias entre las respuestas a diversos estímulos a lo largo de las especies de los peces teleósteos [Forlenza *et al.*, 2011, Grayfer *et al.*, 2018, Wiegertjes *et al.*, 2016].

Inmunidad nutricional

La inmunidad nutricional es la restricción de metales esenciales por parte de organismos hospederos a patógenos intracelulares, con la finalidad de prevenir o reducir su infección, y es considerada como parte de la inmunidad innata [Hood y Skaar, 2012]. Los microorganismos dependientes de hierro para su crecimiento se denominan como ferrofílicos, aunque este es virtualmente requerido por todos los patógenos bacterianos para procesos como la replicación de DNA, transcripción de RNA, y metabolismo central [Hood y Skaar, 2012, Kim *et al.*, 2006]. Por tal motivo, los vertebrados han desarrollado estrategias para la reducción del hierro libre (por ejemplo: Tf, hepcidina, Ft, y hemoglobina), mientras que algunas bacterias patógenas poseen sistemas de captura del hierro, entre los que se pueden encontrar sideróforos, receptores de hemoproteínas, receptores de transferrina, entre otros [Grayfer *et al.*, 2014, Hood y Skaar, 2012].

Se han realizado diversos estudios en peces teleósteos en donde se vinculan la disponibilidad del hierro y la modulación de los componentes celulares de regulación del hierro con la resistencia a infecciones bacterianas y/o con una respuesta inmune mejorada. Por ejemplo, pez dorado

(*Carassius auratus*) Tf se expresa de forma constitutiva, pero en macrófagos su expresión aumenta rápidamente luego de su polarización, los cuales al ser tratados con aún más Tf mejoran su capacidad de producción de NO [Stafford y Belosevic, 2003]. Además, el tratamiento con ferritina M recombinante en lenguado chino (*Cynoglossus semilaevis*) inhibe completamente el crecimiento de seis bacterias patógenas de peces, vinculándose así a una posible participación en la inmunidad innata/ nutricional [Wang *et al.*, 2011]. De forma similar, en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se ha demostrado la efectividad del uso de quelantes de hierro para el tratamiento de la septicemia rickettsial salmonídea (SRS), provocada por la bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis* [Caruffo *et al.*, 2020]. Aún más, se ha evidenciado que al provocar una sobrecarga de hierro en salmones del Atlántico (*Salmo salar*), estos presentan una susceptibilidad mayor a la infección de *P. salmonis*, mientras que salmones y células SHK-1 tratados con quelantes de hierro exhiben una alta tolerancia a la infección [Díaz *et al.*, 2021, Valenzuela-Muñoz *et al.*, 2020].

Estado redox e inmunidad innata

Entre las diversas respuestas posibles del sistema inmune innato a estímulos provenientes de patógenos, la rápida y espontánea producción de ROS y RNS en neutrófilos y macrófagos es utilizada para combatir agentes infecciosos, esto gracias a las propiedades oxidativas de ambos compuestos, generando un efecto microbicida [Cardoso *et al.*, 2023]. No obstante, ambas especies también son capaces de mediar la actividad antioxidante, y aunque están vinculadas a un perfil proinflamatorio, pueden mediar la respuesta antiinflamatoria, y tanto las ROS como las RNS pueden actuar de forma independiente la una de la otra para modular las vías de señalización de migración celular, potencial mitogénico, y la defensa del huésped [Soliman y Barrera, 2023, Wink *et al.*, 2011].

La mitocondria es conocida como el organelo encargado de la respiración celular y, por lo tanto, encargada la generación de ROS a partir de oxígeno. En mamíferos, se ha demostrado que la actividad de la mitocondria es capaz de influenciar la actividad microbicida de las células del sistema inmune innato, ya que en presencia de PAMPs aumenta la producción de ROS mitocondriales, lo que se ha relacionado con una mayor actividad bactericida. Además, la inhibición farmacológica de ROS mitocondriales ha provoca la reducción en la expresión de

citoquinas proinflamatorias en presencia de PAMPs, lo que fortalece la idea entre del vínculo entre el estado redox celular y el sistema inmune innato. De forma similar, en leucocitos de teleósteos se ha demostrado que las mitocondrias se agrupan alrededor de bacterias intracelulares, lo que en conjunto con una mayor producción de ROS mitocondriales y un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-8, provoca el aumento de la capacidad bactericida [Hall *et al.*, 2014, Hissen *et al.*, 2023].

Las células del sistema inmune innato contienen altos niveles de ácidos grasos polinsaturados, lo que las hace susceptibles a oxidación por ROS, lo cual a su vez puede deteriorar la actividad fagocítica. Aún más, las mismas ROS producidas por leucocitos pueden ser destructivas para ellos sin una defensa antioxidante suficiente, denotando una sensibilidad de la inmunidad celular hacia el estado redox. Por tales motivos, las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, entre otras) y los nutrientes que promueven la actividad antioxidante son necesarios para apoyar la función inmune [Aslani y Ghobadi, 2016]. Uno de los micronutrientes más estudiados en la relación sistema antioxidante-sistema inmune innato en teleósteos es el selenio, el cual actúa como un cofactor para las enzimas antioxidantes dependientes de selenio. Se ha demostrado el impacto del selenio en la actividad antioxidante y expresión de citoquinas en teleósteos, esto a través de la suplementación de selenio, lo que ha generado un aumento en la expresión a nivel de transcritos de *cat*, *il1b*, y *lisozima* en sargo sobaito (*Sparidentex hasta*), el aumento de la concentración de CAT, GPx, y GST, el número de monocitos, y también en la actividad del estallido respiratorio en pacú (*Piaractus mesopotamicus*), una mayor expresión de GPx2, actividad CAT, GST, y GPx, y la expresión de *il1b*, *ifny*, y *tnfa* en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) [Biller-Takahashi *et al.*, 2015, Abdollahi-Mousavi *et al.*, 2024, Rathore *et al.*, 2021, Chen *et al.*, 2020]. Otro mineral vinculado a la actividad antioxidante es el zinc, el cual es necesario para la actividad de la enzima CuZnSOD. La suplementación alimentaria de zinc ha producido el aumento en la expresión de *hepcidina*, *leap2*, *tgfb1*, *tgfb2*, *il4/13a*, e *il10*, y la disminución de *tnfa*, *ifny*, *il1b*, *il6*, e *il8* en carpa china (*Ctenopharyngodon idella*) desafiadas con *Aeromonas hydrophila* [Zeng *et al.*, 2024]. Finalmente, la suplementación vitamina de vitamina C y E mejoran la capacidad fagocítica, y el estallido respiratorio, mientras que la deficiencia de la vitamina C produce la supresión del sistema inmune, aumentando la susceptibilidad a infecciones [Kiron., 2012].

De forma independiente a la suplementación de micronutrientes, las enzimas antioxidantes se han visto sobreexpresadas frente a estímulos de PAMPs y desafíos con patógenos [Sandamalika *et al.*, 2021]. Aún más, en carpa china se ha demostrado que infecciones bacterianas pueden modular la expresión de Keap1, uno de los principales reguladores de la defensa antioxidante, en conjunto con un aumento en la expresión de SOD1, CAT, y GSS (glutación sintetasa), sugiriendo que Keap1 participa en la respuesta inmune frente a bacterias [Li *et al.*, 2023].

2.4 Péptidos bioactivos y su aplicación en la acuicultura

Los péptidos bioactivos son definidos como moléculas compuestas por 2 o más aminoácidos que poseen un efecto biológico benéfico en un organismo, influenciando de esta forma su salud [Korhonen y Pihlanto 2006]. Desde el punto de vista farmacológico, los péptidos bioactivos para uso terapéutico se encuentran entre la categoría de las pequeñas moléculas y las proteínas, obteniendo las características positivas de ambos tipos en lo que respecta a su seguridad, eficacia, facilidad para producción, selectividad, metabolismo predecible, y una alta potencia [Fosgerau 2015]. Los péptidos bioactivos pueden ser producidos a través de proteólisis enzimática, síntesis enzimática, de forma recombinante a través de la utilización de microorganismos, y la síntesis química [Xavier *et al.*, 2024]. La actividad que pueden ejercer los péptidos bioactivos comprende una amplia gama, siendo algunas de estas la actividad anti-diabética, anti-cancerígena, anti-hipertensiva, antimicrobiana, anti-apoptótica, hipolipidémica, antioxidante, quelante, e inmunomoduladora, entre otras [Esfandi *et al.*, 2019, Fan *et al.*, 2024, Xavier *et al.*, 2024, Zhao *et al.*, 2024, Zhu *et al.*, 2024].

Péptidos antioxidantes

Dentro del grupo de los péptidos bioactivos, los péptidos antioxidantes se encuentran entre los mayores ingredientes funcionales utilizados en alimentos que promueven la salud y el bienestar. Los péptidos con propiedades antioxidantes reducen el daño por estrés oxidativo asociado a ROS por medio de dos mecanismos; el primero consiste en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), mientras que el segundo mecanismo en la transferencia de un solo electrón (SET) [Tadesse y Emire, 2020, Esfandi *et al.*, 2019]. El mecanismo HAT involucra la capacidad de un antioxidante para secuestrar ROS a través de la donación de un protón y un electrón en un mismo paso cinético, lo que provoca la pérdida de un átomo de hidrógeno por parte del antioxidante, el

cual se transforma en un radical. Por otra parte, en el mecanismo SET se transfiere un solo electrón a partir de un nucleófilo hacia un sustrato, formando un radical catiónico. Ambos mecanismos pueden actuar tanto de forma independiente como simultánea dependiendo de la estructura de la molécula antioxidante y su solubilidad [Rana *et al*, 2024].

En el caso de los péptidos con propiedades antioxidantes, su actividad dependerá de su composición, secuencia, hidrofobicidad, y tamaño molecular. Los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la actividad antioxidante dependen directamente de la cadena lateral del aminoácido. Las cadenas laterales de los aminoácidos Leu, Val, Ala, Pro y Phe promueven la interacción con los radicales libres en lípidos y de esta forma evitan la lipoperoxidación, mientras que los aminoácidos Tyr y Trp actúan como donantes de hidrógeno por sus respectivos grupos hidroxilo fenólico e indol. De forma similar, His posee la capacidad de donar átomos de hidrógeno, atrapar radicales de lipoperoxidación y capturar iones metálicos con actividad oxidante gracias a su anillo imidazol, mientras que los residuos sulfurados de Cys mejoran la actividad antioxidante ya que el grupo sulfhidrilo puede directamente barrer radicales libres, y el azufre de Met funciona como un donante de electrones. Además, los residuos Glu y Lys gracias a sus grupos carbonilos y aminos son capaces de capturar iones que promueven la oxidación [Mada *et al.*, 2019, Wen *et al.*, 2020, Sila y Bougatef, 2016].

Péptidos quelantes de hierro

Los péptidos quelantes de hierro en los últimos años han sido estudiados y desarrollados comercialmente por su capacidad de formar complejos con iones de hierro, con un enfoque como aditivos alimentarios para aumentar la biodisponibilidad del hierro para el organismo y como parte importante de la inmunidad nutricional innata frente a bacterias patógenas intracelulares [Hood y Skaar, 2013, Haschka 2020, Walters *et al.*, 2018, Wu *et al.*, 2020, Guo *et al.*, 2014].

Como característica común de los péptidos bioactivos, la actividad quelante de hierro del péptido depende también de su composición aminoacídica, secuencia, la posición de los aminoácidos, y peso molecular. Se ha reportado una relación estructura-actividad para los péptidos quelantes de hierro, entre los que destacan la presencia de los aminoácidos Cys, His, Asp, Glu, Met, Gln, Lys,

Arg, Ser, Thr, y Tyr en péptidos con esta actividad, siendo también los responsables de esta. La posesión de Cys en el péptido aumenta la solubilidad del ion férrico en estado soluble e insoluble, mientras que Asp, Glu y Lys son los residuos mayormente asociados a la unión del hierro gracias a los grupos carboxilos de Asp y Glu, y los grupos nitrogenados de His. A su vez, Met, Gln, Glu, Lys y Arg contribuyen a la actividad quelante de ion ferroso [Walters *et al.*, 2018, Wu *et al.*, 2020, Guo *et al.*, 2014].

Aplicación de péptidos en la acuicultura

La acuicultura es la crianza de organismos acuáticos, tales como peces, bivalvos, crustáceos, y algas, siendo un mercado de producción de alimentos mundial en constante expansión [Weitzman, 2019]. No obstante, esta misma expansión y la alta demanda de sus productos derivados presentan constantes desafíos para esta industria, entre los que se encuentra el tratamiento de desechos, seguridad alimentaria, disminución de los niveles de oxígeno disuelto, enfermedades infecciosas, aparición de patógenos multirresistentes a antimicrobianos, etc [Bhat *et al.*, 2022, Kunjiraman *et al.*, 2024, Zhan *et al.*, 2023]. Para combatir tales problemáticas, uno de los enfoques utilizados es la adición de compuestos bioactivos a la dieta de los peces, obteniendo modulaciones benéficas en el sistema inmune, aumentando la supervivencia frente a patógenos, incrementando el crecimiento y la razón de conversión de alimento a biomasa, y mejorando las defensas antioxidantes, entre otros efectos positivos [Caballero-Solares *et al.*, 2017, Li and Gatlin III, 2006, Reyes-Cerpa *et al.*, 2018, Askarian *et al.*, 2012, Romero *et al.*, 2021, Xia y Yao, 2024, Rashidian *et al.*, 2021].

Los compuestos bioactivos utilizados en la acuicultura son variados, encontrándose prebióticos, probióticos, productos vegetales, derivados de algas, insectos, y péptidos [Hooft *et al.*, 2025, Eide *et al.*, 2025, Serradell *et al.*, 2023, Tran *et al.*, 2024, Nakagawa, 2004, Wang *et al.*, 2021]. Los péptidos han sido ampliamente estudiados como herramienta biotecnológica para la acuicultura por sus propiedades, siendo estos mayoritariamente seguros para los peces dada su ocurrencia natural en los organismos, estabilidad a temperatura ambiente y a bajas temperaturas, menor probabilidad de provocar interacciones no deseadas, alta capacidad de penetración de tejidos, acumulación reducida tanto en el organismo objetivo como en el medio ambiente gracias a su alta biodegradabilidad, diversidad estructural, y diversos mecanismos de acción. No obstante,

una de las mayores barreras que presentan los péptidos para su aplicación es el paso de los modelos in vitro a los modelos in vivo, por lo que uno de los grandes desafíos es la estrategia aplicada para que los péptidos alcancen las moléculas objetivo y puedan cumplir su acción [Bhat *et al.*, 2022, Schep *et al.*, 1999, Zermeño-Cervantes *et al* 2019].

Los estudios de péptidos bioactivos utilizando modelos de peces han demostrado efectos positivos en el control de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio ordalli*, *Streptococcus iniae*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida*, y *Aeromonas hydrophila* [Leon *et al.*, 2020, Debbarma *et al.*, 2024, Jofré *et al.*, 2011, Rashidian *et al.*, 2021, Wang *et al.*, 2021], el control de enfermedades provocadas por infecciones virales tales como el virus de necrosis nerviosa (NNV), la septicemia hemorrágica viral (VSHV), y el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) [Leon *et al.*, 2020, Jofré *et al.*, 2011], el aumento de las defensas antioxidantes como el incremento de la expresión de SOD y CAT [Yuan *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2021], la mejora de parámetros relacionados al crecimiento y a la razón de conversión de alimento a biomasa [Muñoz-Flores *et al.*, 2023, Wang *et al.*, 2021], y la modulación de la expresión de marcadores del sistema inmune [Debbarma *et al.*, 2024, Rashidian *et al.*, 2021, Ko *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2021]. Por lo tanto, incluso con el desafío para traspasar la barrera de los modelos in vitro a los organismos, los péptidos se presentan como potentes candidatos a ser utilizados como herramientas biotecnológicas para solucionar las grandes problemáticas en la acuicultura.

CAPÍTULO III: Materiales y métodos

3.1 Selección, síntesis, y caracterización de péptidos

A partir de publicaciones de investigación académica, se seleccionaron 17 secuencias de péptidos con la mayor actividad quelante de hierro y/o antioxidante reportada (Tabla 3.1). Las secuencias fueron sintetizadas a través de síntesis química en fase sólida utilizando la estrategia Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo) y el protocolo de síntesis simultánea tea-bag [Guzmán *et al.*, 2021]. Se utilizaron 40 mg de resina rink-amida y 2-clorotritil como soporte sólido, las cuales se adicionaron dentro de mallas de polipropileno. La resina rink-amida fue utilizada para generar péptidos amidados en su extremo C-terminal [Ferrer-Gago *et al.*, 2019], mientras que la resina 2-clorotritil permitió la síntesis de péptidos con ácido carboxílico en su extremo C-terminal [Kassem *et al.*, 2009]. La sustitución de la resina rink-amida fue de 0,74 mmol/g. Por otra parte, la carga del primer aminoácido en las resinas 2-clorotritil y su sustitución fueron realizadas según el protocolo de Román *et al.* [Román *et al.*, 2023]. La sustitución de la resina 2-CTC fue de 0,4 mmol/g, la cual se determinó a través de la remoción del grupo protector Fmoc con 1 mL de piperidina al 20% en DMF, durante 5 minutos. El solvente fue recuperado y aforado hasta 50 mL en un matraz de aforo, para luego ser diluida en una razón de 1:500, y medir su absorbancia a 290 nm en un espectrofotómetro utilizando cubetas de cuarzo y DMF como blanco. La ecuación para el cálculo de la sustitución de resina fue:

$$\text{Sustitución} = (\text{Abs} * \text{DF}) / (\epsilon * 1 * g)$$

Dónde:

Abs: Absorbancia medida a 290 nm

DF: Factor de dilución

ϵ : Coeficiente de extinción

g: Gramos de resina utilizada

Como reactor se utilizaron botellas de polietileno rotuladas para cada aminoácido, con la finalidad de realizar acoples de forma simultánea e independiente. La desprotección del grupo Fmoc en la resina rink-amida y en el extremo N-terminal de los aminoácidos se llevó a cabo utilizando piperidina al 20% en DMF. La solución de acople consistió en el aminoácido deseado, un activador HBTU o TBTU (para el acople sencillo y doble, respectivamente), DIEA como estabilizador de pH, y Oxima-Pure® para evitar reacciones indeseadas. Se prepararon soluciones

stock para los acoples previo al primer acople, con la finalidad de automatizar el proceso de síntesis, con excepción de los aminoácidos de cisteína, histidina, metionina y triptófano, los cuales son susceptibles a la oxidación durante el almacenamiento [Guzmán *et al.*, 2021]. De forma previa a cada acople, las resinas fueron hinchadas con DCM en agitación durante 1 minuto, con la finalidad de aumentar la eficiencia de las reacciones. Para determinar la eficacia de cada acople, luego de cada doble acople se utilizó el método colorimétrico azul de bromofenol como indicador cualitativo no destructivo, considerando la coloración azul como la unión del azul de bromofenol al extremo N-terminal libre de la resina-peptidil, y por lo tanto, como un acople exitoso [Guzmán *et al.*, 2021] Luego de cada fase de desprotección, acople y pruebas colorimétricas, las resinas fueron lavadas con DMF por 1 minuto en agitación.

Una vez obtenida la secuencia deseada de cada péptido, se llevó a cabo el clivaje de la resina-peptidil utilizando una solución de ácido trifluoroacético (2,5% v/v), TIS (triisopropilsilano) (2,5% v/v), y agua (95% v/v). Para los casos de péptidos con presencia de aminoácidos con una cadena lateral que pudiese oxidarse, la solución de clivaje consistió de ácido trifluoroacético (2,5% v/v), TIS (2,5% v/v), DOT (2,2-(etilendioxi)dietanotiol)) (2,5% v/v), y agua (92,5% v/v). Se añadieron las bolsas de cada péptido a su respectivo tubo falcón de 15 mL, y 1,5 mL de solución de clivaje a cada tubo, manteniendo la reacción en agitación durante 3 horas. Luego, los péptidos fueron precipitados en éter a -20°C, y luego lavados 4 veces más con éter y agitación, centrifugando cada vez a 3500 rpm por 3 minutos, descartando el sobrenadante. Finalmente, los péptidos fueron disueltos en agua y liofilizados para su almacenamiento y posterior caracterización.

Los péptidos sintetizados fueron caracterizados utilizando un sistema de espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), del cual se compararon los pesos moleculares de los iones teóricos con los iones prácticos para así determinar si el péptido sintetizado correspondió al seleccionado de la literatura científica. Además, se determinó la pureza de los péptidos a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) utilizando un gradiente de agua-acetonitrilo 0-70%. Se calcularon los porcentajes de pureza de cada péptido integrando los cromatogramas normalizados con agua de grado HPLC como blanco. La purificación de los péptidos sintetizados se realizó con cromatografía de fase sólida en columnas Sep-Pak C-18 a través de un gradiente de acetonitrilo-agua.

Tabla 3.1. Código, secuencia, actividad reportada, y peso molecular de los péptidos quelantes de hierro y antioxidantes seleccionados.

Código	Secuencia	Actividad	Peso molecular (g/mol)	Referencia
4416	FMPLH-Amida	Antioxidante	642,82	He <i>et al.</i> (2019) grupo amida añadido
4417	FMPLH	Antioxidante	643,81	He <i>et al.</i> (2019)
4418	SGSTGH	Quelante de hierro	543,54	Guo <i>et al.</i> (2015)
4426	VIAPW-Amida	Antioxidante	583,73	He <i>et al.</i> (2019) grupo amida añadido
4427	VIAPW	Antioxidante	584,72	He <i>et al.</i> (2019)
4428	FWKVV-Amida	Quelante de hierro	676,86	He <i>et al.</i> (2019) grupo amida añadido
4429	FWKVV	Quelante de hierro	677,84	He <i>et al.</i> (2019)

Continuación de Tabla 3.1.

Código	Secuencia	Actividad	Peso molecular (g/mol)	Referencia
4430	PMDYMT	Antioxidante	855,05	Hsu (2010)
4438	NCS-Amida	Quelante de hierro	321,36	Guo <i>et al.</i> (2013) grupo amida añadido
4439	NCS	Quelante de hierro	322,34	Guo <i>et al.</i> (2013)
4444	LPTSEAAKY	Antioxidante	978,1	Hsu (2010)
4445	TSSSLNMAVRGGLTR	Antioxidante	1548,77	Agrawal <i>et al.</i> (2019)
4446	AGPHGPPGKDGR	Quelante de hierro	1144,24	Wu <i>et al.</i> (2017)
4447	GPAGPHGPPG	Quelante de hierro	841,91	Guo <i>et al.</i> (2015)
4448	NLGEQYFKG	Quelante de hierro	1054,16	Modificado de Lee y Song (20019)
4449	KVP	Antioxidante	341,45	Modificado de Neves <i>et al.</i> (2017)
4453	KGF	Antioxidante	349,43	Modificado de Neves <i>et al.</i> (2017)

3.2 Determinación de actividad quelante de hierro y antioxidante de los péptidos sintéticos

Ensayo de ferrocina

Se determinó la actividad quelante de hierro de los péptidos sintéticos a través del método descrito por Abeynayake *et al.* [Abeynayake *et al.*, 2022] con algunas modificaciones. En resumen, en una microplaca de 96 pocillos se añadieron 25 µL de FeCl₂ (250 µM) y 50 µL de cada uno de los péptidos sintéticos quelantes de hierro (50 µM). Para iniciar la reacción, se agregaron 25 µL de ferrocina (5 mM) en cada pocillo. La reacción se mantuvo durante 15 minutos en agitación suave. Luego, en un espectrofotómetro de microplacas se midió la absorbancia a 562 nm. Para el control negativo y el control positivo, se utilizó agua Milli-Q y EDTA (50 µg/mL) en vez de péptidos sintéticos, respectivamente. Todas las muestras se realizaron por triplicado. Se calculó la capacidad quelante de ion ferroso con la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad quelante de ion ferroso (\%)} = \left(1 - \frac{M}{N}\right) * 100$$

Donde:

M: Absorbancia a 562 nm de la muestra

N: Absorbancia a 562 nm del control negativo

Ensayo de capacidad secuestradora de radical DPPH·

El ensayo de capacidad secuestradora de radical DPPH· se llevó a cabo según lo descrito por Agrawal *et al.* [Agrawal *et al.*, 2016] con algunas modificaciones. En resumen, en un cuarto oscuro se agregaron a una microplaca de 96 pocillos 100 µL de cada uno de los péptidos sintéticos antioxidantes en solución de agua ultrapura (250 µM) y 50 µL de solución de DPPH· (0,75 mM) en etanol 70%. El tiempo de reacción fue de 30 minutos y la placa se mantuvo en agitación suave y oscuridad. Una vez finalizado el tiempo de reacción, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de microplacas a 517 nm. Para el control negativo y el control positivo se utilizó agua Milli-Q y ácido gálico (10 µg/mL) en vez de péptidos sintéticos, respectivamente. Además, se usó un blanco con 100 µL de agua ultrapura y 50 µL de etanol 70%. Todas las muestras, controles y blancos se evaluaron por triplicado. La capacidad secuestradora de radical DPPH· se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad secuestradora de DPPH} = \frac{(CN - B) - (M - B)}{CN - B} * 100$$

Donde:

CN: Absorbancia a 517 nm del control negativo

M: Absorbancia a 517 nm de la muestra

B: Absorbancia a 517 nm del blanco

Capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno (ORAC)

La capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno fue determinada a través del método descrito por Dávalos *et al.* [Dávalos *et al.*, 2004] con algunas modificaciones. Para lo anterior, se disolvieron los péptidos sintéticos antioxidantes en buffer fosfato (75 mM y pH 7,4) hasta lograr una concentración de 8 µM. Luego, en condiciones de oscuridad se añadieron 120 µL de fluoresceína (74 nM concentración final) y 20 µL de cada uno de los péptidos sintéticos antioxidantes a una microplaca de 96 pocillos. Se incubó la microplaca durante 15 minutos a 36,9 °C. Una vez finalizada la incubación, se añadieron 80 µL de AAPH en buffer fosfato (12 mM concentración final) a cada pocillo. Se midió la fluorescencia de la placa en un lector de fluorescencia de microplacas Muse® Cell Analyzer (EMD Millipore Corporation) cada 1 minuto durante 80 minutos. Bajo estas mismas condiciones, se utilizó un control de fluorescencia solo con fluoresceína y buffer, un blanco solo con fluoresceína y AAPH, y un control positivo con fluoresceína, AAPH y Trolox a concentraciones de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 µM. El volumen final de todas las reacciones fue de 200 µL en cada pocillo.

El valor ORAC se calculó a través de la normalización de las curvas de fluorescencia en base al blanco. De estas curvas normalizadas se calculó el área bajo la curva y en base a regresión lineal de estos valores y los de control positivo se expresó la actividad antioxidante como Equivalentes a Trolox (µmol Trolox/ µmol péptido).

Animales y cultivo primario de leucocitos de riñón anterior (HKL)

Para esta investigación se siguieron estrictamente las guías del US National Research Council guidelines for the care and use of laboratory animals. Se compraron alevines de truchas arcoíris saludables de la Piscicultura Río Blanco (Los Andes, Chile). Los peces se mantuvieron en estanques de 70 L (8 ± 1 mg/L de oxígeno disuelto, temperatura del agua de 10 ± 1 °C, y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas) con aireación y sistemas de filtración en el Laboratorio de Inmunología y Genética Molecular, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. Las truchas fueron alimentadas con pellet comercial una vez al día en base al 1% de su peso corporal. Luego de una fase de aclimatación de 2 semanas, los peces fueron sacrificados por inmersión de benzocaína (0,04% v/v) por 5 minutos, sumergidos en agua con cloruro de sodio (40 g/L) para eliminar la posible presencia de hongos, y disecados para extraer su riñón anterior bajo condiciones estériles.

Para establecer el cultivo primario de riñón anterior, estos fueron individualmente homogenizados con 4 ml de medio de cultivo L-15 (10% de SFB, penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml), y anfotericina B (0,25 µg/ml)) en un filtro celular de 70 µm sobre un tubo de centrifuga cónico de 50 ml. Para remover los eritrocitos de las muestras, se realizó un shock osmótico añadiendo 36 ml de agua ultra pura estéril. Luego de 20 segundos, se agregaron 4 ml de PBS 10x a cada tubo y estos fueron incubados en hielo durante 10 minutos. Luego, se separaron los restos celulares usando un filtro de 70 µm sobre un tubo de centrifuga de 50 ml, para luego centrifugar a 600g durante 5 minutos a 12 °C. Posteriormente, el sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en PBS (2% SFB y antibióticos), para luego centrifugar nuevamente y repetir el lavado. Las células fueron contadas utilizando azul de tripán y una cámara de Neubauer. Finalmente, un total de 6×10^5 células/pocillo fueron sembradas en microplacas de 96 pocillos e incubadas durante 48 horas a 18°C para asegurar su adhesión a la placa.

Pozo de hierro lábil (LIP)

La actividad quelante de hierro de los péptidos sintéticos quelantes de hierro se determinó a través del uso de una sobrecarga de hierro previa a la inducción con los péptidos quelantes de hierro, y por medio de la sonda fluorescente calceína acetoximetilo (ca-AM) de forma similar a lo descrito por Imoto *et al.* [Imoto *et al.*, 2022] y siguiendo las instrucciones del proveedor.

Brevemente, se removió el medio de cultivo de las células de riñón anterior de trucha arcoíris y se agregaron 200 µl de medio de cultivo L-15 10% suero fetal bovino con antibióticos y citrato de amonio férrico (0,2 mM). Las células fueron incubadas a 18 °C por 18 horas para permitir el ingreso de hierro a los leucocitos. Luego de la incubación, se eliminó nuevamente el medio de cultivo, se añadieron 90 µl de PBS y 10 µl de cada uno de los péptidos quelantes de hierro sintéticos (30 µM, concentración final). Las células se incubaron durante 1 hora a 18 °C. Posteriormente, se removió el medio y se añadieron 100 µl de ca-AM (100 nM) en PBS bajo condiciones de oscuridad. Las células fueron incubadas 18 °C por 45 minutos en una habitación oscura. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se removió el medio de los pocillos, se añadieron 100 µl de PBS, y se midió la fluorescencia a una longitud de 485/515 ex/em en un lector multi-modal de microplacas Synergy™ LX (BioTek). Además, se midió en cada ensayo un blanco y un control negativo, los cuales estuvieron compuestos PBS en vez de ca-AM, y PBS en vez de péptidos sintéticos, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron considerando triplicados técnicos y triplicados biológicos. La actividad quelante de hierro de los péptidos sintéticos fue calculada según la ecuación:

$$\text{Actividad quelante de hierro (\%)} = \frac{M - B}{CN - B} * 100$$

Donde:

M: Fluorescencia de la muestra a una longitud de onda de 485/515 ex/em

B: Fluorescencia del blanco a una longitud de onda de 484/515 ex/em

CN: Fluorescencia del control negativo a una longitud de onda de 484/515 ex/em

Actividad antioxidante celular (CAA)

Se evaluó la actividad antioxidante de los péptidos sintéticos antioxidantes a nivel celular siguiendo el protocolo reportado por López-Barrios *et al.* [López-Barrios *et al.*, 2016], con algunas modificaciones. En resumen, se removió el medio de cultivo de las células de riñón anterior de trucha arcoíris y se agregaron 90 µl de DCFH-DA (33,33 µM) y 10 µl de cada uno de los péptidos antioxidantes sintéticos (30 µM concentración final). Las células fueron incubadas a 18 °C por una hora. Luego, se removió el medio y se añadieron 100 µl de AAPH (0,5 mM) en PBS. Posteriormente, se midió la fluorescencia en un lector multi-modal de microplacas Synergy™ LX (BioTek) a una longitud de onda de 485/515 ex/em durante 60 minutos, cada 1 minuto. Además,

en cada ensayo se utilizó un blanco y un control negativo, los cuales contenían PBS en vez de AAPH y péptidos, y PBS en vez de péptidos, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron considerando triplicados técnicos y triplicados biológicos. La actividad antioxidante celular se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Actividad antioxidante celular (\%)} = \left(\frac{AUC_{CN} - AUC_{muestra}}{AUC_{CN}} \right) * 100$$

Donde:

AUC_{CN} : Área bajo la curva de la fluorescencia versus tiempo del control negativo a una longitud de onda de 485/515 ex/em.

$AUC_{muestra}$: Área bajo la curva de la fluorescencia versus tiempo de los péptidos sintéticos a una longitud de onda de 485/515 ex/em.

3.3 Expresión de marcadores del sistema inmune innato en línea celular

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Los péptidos seleccionados con la mayor actividad antioxidante (4426, 4430, y 4444) y quelante de hierro (4429 y 4448) en los ensayos previos fueron inducidos en la línea celular Rainbow Trout Spleen 11 (RTS-11) para determinar sus efectos en marcadores del sistema inmune innato. Por tal motivo, en microplacas de 12 pocillos se sembraron 600.000 células RTS-11 en medio L-15 con 30% suero fetal bovino. Luego de 4 días, se realizó la inducción con los péptidos sintéticos seleccionados a concentraciones de 10, 20, y 60 μ M. Las células se mantuvieron en incubación durante 24 horas a 18 °C. Luego, se aisló el RNA a través de extracción por TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific). Para esto, se recolectó el medio de cultivo de cada pocillo en tubos cónicos de 2 ml, los cuales fueron centrifugados a 180g durante 5 minutos a 4°C, y con la finalidad de recuperar la fracción celular en suspensión, se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 500 μ L de reactivo TRIzol® a cada pocillo. Luego, se tomó la solución de TRIzol® y células de cada pocillo y se depositaron en cada tubo correspondiente, recuperando así las células adheridas a la placa. Se añadieron 150 μ L de cloroformo a cada tubo, los cuales fueron homogenizados enérgicamente e incubados a temperatura ambiente por 7 minutos. Finalizando el tiempo de incubación, los tubos fueron centrifugados a 12.000g durante 15 minutos a 4°C para producir la separación de la fase acuosa y orgánica. Se recuperó la fase acuosa, a la cual se le añadieron 400 μ L de isopropanol y se dejaron incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Luego del tiempo de incubación, los tubos fueron centrifugados a 10.000g por 10 minutos a 4°C, y se descartó el sobrenadante. Se lavaron los tubos con 750 µL de etanol 75%, se descartó el sobrenadante y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 30 µL de agua libre de RNAsas a cada tubo. La concentración de ARN fue cuantificada utilizando un NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Para la síntesis de cDNA, se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific), según las indicaciones del proveedor.

Análisis de expresión relativa de genes por medio de RT-qPCR

Se cuantificó la expresión a nivel de transcritos de los marcadores inmunológicos del sistema inmune innato (Tabla 3.2) a través del uso del kit KAPA SYBR® FAST (Kapa Biosystems) según las indicaciones del proveedor. Para cada reacción de RT-qPCR se utilizaron 5 µl de KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix, 3,8 µl de agua ultra pura estéril, 0,1 µl de los partidores correspondientes, y 1 µl del cDNA sintetizado previamente en base al RNA extraído del cultivo de HKL. El ensayo fue llevado a cabo en cuadruplicados en un AriaMX Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Los pares de primers fueron previamente estandarizados para su uso en trucha arcoíris. La medición se realizó con un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 5 segundos, anillado a 60°C por 15 segundos, y extensión a 72°C por 15 segundos. Posteriormente, la curva de disociación fue llevada a cabo iniciado a 95 °C por 30 segundos, luego 65 °C por 30 segundos, y finalmente 95 °C por 30 segundos. La expresión relativa fue calculada según el método $-2^{\Delta\Delta C_t}$ descrito por Pfaffl [2001], y se utilizó el gen *ef1a* para normalizar los valores de Ct medidos de los genes objetivos.

$$Razón = \frac{(E_{objetivo})^{\Delta CP_{objetivo}(control-muestra)}}{(E_{referencia})^{\Delta CP_{referencia}(control-muestra)}}$$

Dónde:

$E_{objetivo}$: Eficiencia del partidor del gen objetivo

$E_{referencia}$: Eficiencia del partidor del gen de referencia

$\Delta CP_{objetivo}$: Desviación CP del control menos la muestra para el gen objetivo

$\Delta CP_{referencia}$: Desviación CP del control menos la muestra para el gen de referencia

Tabla 3.2. Organismo objetivo, secuencias de primers forward y reverse, temperatura de anillado, y número de acceso de los genes utilizados en RT-qPCR, número de acceso obtenido de National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Gen	Organismo objetivo	Secuencia de forward	Secuencia de reverse	Temperatura de disociación (°C)	Número de acceso
<i>ef1a</i>	<i>O. mykiss</i>	GTCTACA AAATCG GCGGTA T	CTTGACGG ACACGTTC TTGA	60	NM_001124339.1
<i>ifny</i>	<i>O. mykiss</i>	AGGACC AGCTGTT CAACGG AAA	CTCCTGAA CCTTCCCC TTGACC	60	NM_001160503.1
<i>il1b</i>	<i>O. mykiss</i>	GTCACAT TGCCAA CCTCATC ATCG	GTTGAGCA GGTCCTTG TCCTTGAA	60	NM_001124347.2
<i>inos</i>	<i>O. mykiss</i>	CCAGCA TAAGTG GTTCCAA GACCT	GCGTTTGG GGAAGGAA CTTTAGGA	60	XM_021581479.2
<i>nlrc3</i>	<i>O. mykiss</i>	AGATCTG CACAGA CGTGAG T	AAGTCCAG AGGACAAC GGAA	60	KX449137.1
<i>nlrc5</i>	<i>O. mykiss</i>	TGCCAAT GCGTCT GGAATCT	ATTCGTGG GCGTTTTG CACA	60	KX449138.1

Continuación de Tabla 3.2.

Gen	Organismo objetivo	Secuencia de forward	Secuencia de reverse	Temperatura de disociación (°C)	Número de acceso
<i>tlr5</i>	<i>O. mykiss</i>	GCACTG CCTCCAT ACATTAC CCAT	TAGAGCAC TGCCAAGT TTGCCA	60	NM_001124208.1
<i>tlr9</i>	<i>O. mykiss</i>	CAAGTTC CGTTGG CTGGAG G	GACTGAGT AGAGAAGG ATGG	60	NM_001129991.2
<i>ef1a</i>	<i>S. salar</i>	GTCTACA AAATCG GCGGTA T	CTTGACGG ACACGTTC TTGA	60	NM_001141909.1
<i>arg1</i>	<i>S. salar</i>	TGCGTAT CAGCCA AAGACAT AG	CCACCTCA GTCATGGA GTAAAC	61	NM_001141316.2
<i>hep</i>	<i>S. salar</i>	GAAGGC CTTTAGT GTTGCA GTGGT	GTTGATGTT CCCCAACT GGACTGT	60	AF542965.1
<i>il1b</i>	<i>S. salar</i>	GTCACAT TGCCAA CCTCATC ATCG	GTTGAGCA GGTCCTTG TCCTTGAA	60	NM_001123582.1

Continuación de Tabla 3.2.

Gen	Organismo objetivo	Secuencia de forward	Secuencia de reverse	Temperatura de disociación (°C)	Número de acceso
<i>tgfb1</i>	<i>S. salar</i>	AGTTGCC TTGTGATT GTGGGA	CTCTTCAGT GGTTTGTCTG	60	XM_01412926 1.2
<i>sod1</i>	<i>S. salar</i>	CCACGTC CATGCCTT TGG	TCAGCTGCT GCAGTCACG TT	60	NM_00112358 7.1
<i>lfny</i>	<i>S. salar</i>	ATGCTGC TCAGTTCA CATCA	ACGTCCAGA ACCACACTC AT	60	NM_00112355 8.1
<i>il4/13 a</i>	<i>S. salar</i>	TTGGCCT CCGTGAA AAATGC	AAGTCTCCT CAGCTCCAC CT	60	NM_00120489 5.1
<i>il10</i>	<i>S. salar</i>	ATGAGGC TAATGAC GAGCTGG AGA	GGTGTAGAA TGCCTTCGT CCAACA	60	XM_04570580 2.1
<i>tnfa</i>	<i>S. salar</i>	GCAGCCA TCCATTTA GAGGGTG AA	CTAAACGAA GCCTGGCTG TAAACG	60	NM_00112358 9.1
<i>gpx3</i>	<i>S. salar</i>	GATTCGTT CCAAACTT CCTGCTA	GCTCCCAGA ACAGCCTGT TG	60	XM_01421333 9.2

3.4 Efecto de los péptidos sintéticos como aditivos alimentarios

Microencapsulación de péptidos

Los péptidos seleccionados 4426 y 4429 fueron sometidos a un proceso de microencapsulación por gelación iónica, logrando la formación de perlas. Para esto, se utilizó como material encapsulante una solución de alginato de sodio 1% a partir de alginato (Buchi®), en donde para cada péptido se utilizaron 50 g de alginato al 1%. La mezcla péptido-alginato fue encapsulada a través del equipo Encapsulador B-390 (Buchi®), utilizando una boquilla de 200 µm, frecuencia de 1000 Hz, presión de 1 bar, amplitud de 2 y una carga de 300 Volts. Se utilizó una solución de 200 ml de cloruro de calcio (100 mM) para cada péptido, la cual se mantuvo 2 horas en agitación. Posteriormente, las perlas fueron lavadas con agua ultra pura para eliminar los restos de cloruro de calcio. Finalmente, las perlas fueron secadas y sometidas a un proceso de molienda, para luego ser pesadas utilizando una balanza analítica (Precisa®).

Dietas experimentales

Las dietas experimentales producidas fueron la dieta con péptido sintético antioxidante (AD), dieta con péptido sintético quelante de hierro (ID), y la dieta con una mezcla de péptidos sintéticos antioxidante y quelante de hierro en proporciones iguales (AID). Todas las dietas experimentales poseían una composición base similar a la comercial, con la única diferencia entre ellas siendo la adición de los péptidos 4426 y/o 4429 a un nivel de inclusión de 150 µg/kg de alimento. Además, se produjo una dieta control sin adición de péptidos sintéticos. Para cada dieta se produjeron 3 kg de alimento en base al peso inicial de los peces y la proyección de crecimiento durante el tiempo del ensayo. Los ingredientes de la dieta y los péptidos microencapsulados fueron añadidos en la etapa de mezcla, la cual se mantuvo durante 30 minutos hasta alcanzar la homogeneidad. Luego, se produjo el pellet a partir de la mezcla homogénea a través de extrusión en frío utilizando un troquel con diseño circular de 2,5 mm de diámetro en un extrusor de pasta P35A (Italgi, Italy). Posteriormente, los pellets fueron secados por inducción de aire caliente hasta una humedad de 8-10% y evitando superar una temperatura de 50° C. Finalmente, las dietas experimentales fueron almacenadas a 4°C hasta el ensayo piloto de alimentación.

Desafío de alimentación piloto y diseño experimental

El desafío piloto de alimentación fue llevado a cabo en el Centro de Acuicultura Sostenible en la Universidad Noruega de las Ciencias de la Vida (NMBU), Oslo, Noruega. Todos los experimentos fueron desarrollados según las guías noruegas para el cuidado y uso de animales (The Norwegian Animal Welfare Act y Norwegian Regulation and Animal Experimentation). Un total de 200 salmones del Atlántico pre-smolt fueron distribuidos de forma aleatoria en 4 estanques de 200 litros cada uno, finalizando con 50 peces en cada estanque, con una biomasa promedio de tanque e individual de 1892 g y 37,84 g, respectivamente. Los peces se mantuvieron con un fotoperíodo de 24 horas durante todo el experimento, en agua dulce recirculada con un flujo de $8,48 \pm 0,43$ L/min, una temperatura promedio de 14,7 °C, y niveles de oxígeno disuelto de $8,98 \pm 6,00$ mg/L a la salida del sistema de recirculación. De forma previa al inicio de la alimentación con las dietas experimentales, se llevó a cabo un período de aclimatación de 10 días, en la que los peces fueron alimentados solo con la dieta control. Una vez finalizada la etapa de aclimatación, a cada estanque se le asignó una dieta experimental (CD, AD, ID, y AID). Los peces fueron alimentados *ad libitum* a través de alimentadores de cinturón eléctricos, programados para funcionar una vez al día durante 6 horas. Una vez finalizado el período de aclimatación, los peces fueron alimentados con la dieta experimental correspondiente durante 28 días. Durante la etapa de alimentación, se llevaron a cabo muestreos al azar de 4 peces por estanque en los días 0, 14, 21 y 28 del desafío. Los peces fueron sacrificados con un fuerte golpe en la cabeza, para luego registrar su peso y talla. Luego, se extrajo la sangre con una jeringa heparinizada desde la vena dorsal. Posteriormente, cada pez fue diseccionado con un escalpelo esterilizado, con el cual se removieron cuidadosamente el riñón anterior, branquias, bazo, intestino medio, intestino distal, y ciegos pilóricos. Finalmente, a partir de riñón anterior se establecieron cultivos primarios de leucocitos, para los cuales se sembraron 3 pocillos con 2.000.000 células/pocillo por condición en placas de 24 pocillos, finalizando en triplicados técnicos y cuádruplicados biológicos para cada dieta experimental y condición, mientras que los demás órganos fueron almacenados para análisis de expresión relativa a nivel de transcritos.

Conteo de eritrocitos y parámetros de crecimiento

El conteo de eritrocitos se llevó a cabo utilizando un contador automático TC20TM Automated Cell Counter (Bio-Rad). Los parámetros de crecimiento fueron calculados de la forma descrita por Weththasinghe *et al* [2021]. En resumen, el peso inicial de los peces fue calculado como un peso

medio de 4 peces muestreados aleatoriamente de cada estanque al final de la fase de aclimatación (Día 0). La ingesta de alimento como materia seca fue corregida considerando los 8 peces muestreados en los días 14 y 21 del desafío piloto. La velocidad de crecimiento específica (SGR), ingesta de alimento (FI), ganancia de peso (BWG), y razón de conversión de alimento (FCR) fueron calculados en base a las siguientes ecuaciones:

$$SGR (\% \text{ peso corporal} * \text{día}^{-1}) = \frac{\ln(F_{bw}) - \ln(I_{bw})}{t} * 100$$

$$FI (g \text{ de materia seca} * \text{pez}^{-1}) = \frac{T_{FI}}{N}$$

$$BWG(g) = F_{bw} - I_{bw}$$

$$FCR (g * g^{-1}) = \frac{FI}{BWG}$$

Dónde:

SGR: Velocidad de crecimiento específica

F_{bw}: Peso de los peces al final del desafío de alimentación (Día 28) (g)

I_{bw}: Peso de los peces al inicio del desafío de alimentación (Día 0) (g)

t: Número de días de alimentación con dietas experimentales

BWG: Peso corporal ganado

T_{FI}: Ingesta de alimento total en materia seca por estanque

FI: Ingesta de alimento en materia seca por pez

N: Número de peces por estanque

FCR: Razón de conversión de alimento

Extracción de ARN y expresión de marcadores del sistema inmune innato en hígado y bazo de salmones del Atlántico

A partir de las muestras de tejido de hígado y bazo obtenidos de los salmones del Atlántico al final del desafío piloto de alimentación, se extrajo el ARN total y se llevó a cabo la síntesis de cDNA bajo la misma metodología explicada en el numeral 3.3. La expresión de genes objetivo

(Tabla 3.1) fueron medidos y analizados a través de RT-qPCR utilizando los mismos parámetros que en el numeral 3.3.

Estimulación de HKL con *P. salmonis* inactivada

Se incubaron las células HKL durante una noche a una temperatura de 20 °C para asegurar su adhesión a la placa. Al día siguiente, las células fueron estimuladas con proteínas totales de *Piscirickettsia salmonis* LF-89, EM-90 y una mezcla de ambas a la misma concentración y en la razón 1:1. Las bacterias fueron inactivadas por medio de baño María a 90°C durante 10 minutos. Luego, se determinó el contenido de proteínas totales por medio de una curva de calibrado a través del kit Pierce™ BCA Protein Assay Kits (ThermoFisher Scientific), según las instrucciones del proveedor. Posteriormente, se realizaron diluciones en medio L-15 (10% SFB y antibióticos) para cada lisado inactivado de bacteria hasta llegar a una concentración de 2 µg/µL. Al momento de la estimulación, se hizo un recambio de medio de cultivo y se añadieron 50 µL de cada solución con *P. salmonis* inactivada. Se utilizaron 50 µL de medio de cultivo L-15 (10% SFB y antibióticos) reemplazando las soluciones de proteínas totales de *P. salmonis* como controles negativos de cada estanque. Los tiempos de estimulación fueron de 6 y 24 horas, y todos los tratamientos se realizaron en triplicados para cada condición en cada uno de los peces.

Expresión de marcadores del sistema inmune innato en cultivo primario de HKL

La extracción de ARN total de cada muestra se llevó a cabo utilizando QIAzol® Lysis Reagent (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ARN aislado fue disuelto en 20 µl de agua ultra pura estéril y cuantificada en un NanoDrop Eight Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Todas las muestras de ARN aislado fueron normalizadas a 260 ng, y la síntesis de cDNA fue llevada a cabo utilizando el kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del proveedor. Todas las muestras de cDNA fueron diluidas para alcanzar una concentración de 4 ng/µl. Las diferencias en la expresión de marcadores del sistema inmune innato fueron medidas a través de RT-qPCR con el kit LightCycler® 480 SYBR® Green I Master (Roche Diagnostics) siguiendo las indicaciones del proveedor en un termociclador de tiempo real CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Los genes analizados fueron *il1b*, *inos*, *il8*, *sod1*, *arg1*, *cath2*, *hep*, y *tgfb1* (Tabla 3.3). Los datos fueron calculados como fold change utilizando el método $-2^{\Delta\Delta Ct}$ descrito por Pfaffl

[2001]. Finalmente, el gen constitutivo *ef1a* fue seleccionado como único normalizador para los valores de Ct de los genes objetivos debido a su estabilidad reportada en células de salmón del Atlántico y en base a diseños experimentales similares [Olsvik *et al.*, 2005, Peña *et al.*, 2010, Nuic *et al.*, 2025, Vera *et al.*, 2017, Brown *et al.*, 2016].

Tabla 3.3. Organismo objetivo, secuencias de primers forward y reverse, temperatura de anillado, y número de acceso de los genes utilizados en RT-qPCR. Número de acceso obtenido de National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Gen	Organismo objetivo	Secuencia de forward	Secuencia de reverse	Temperatura de disociación (°C)	Número de acceso
<i>ef1a</i>	<i>S. salar</i>	GCAGTG GCAGTG TGATTTC G	GTAGATCA GATGGCCG GTGG	62	NM_001123629.1
<i>il1b</i>	<i>S. salar</i>	AGGACA AGGACC TGCTCAA CT	CCGACTCC AACTCCAA CACTA	64	XM_014170479.2
<i>inos</i>	<i>S. salar</i>	AGGTGC TGAATGT GTTGCA C	GTATTCTCC TGCCTGGG TGA	64	XM_014214976.2
<i>cath2</i>	<i>S. salar</i>	TCGGAC AAGAAG AGGCAA GC	CTTCCGCT AGCTCCAG CAAT	64	AY542961.1

Continuación de Tabla 3.3.

Gen	Organismo objetivo	Secuencia de forward	Secuencia de reverse	Temperatura de disociación (°C)	Número de acceso
<i>hep</i>	<i>S. salar</i>	GAAGGC CTTTAGT GTTGCA GTGGT	GTTGATGTT CCCCAACT GGACTGT	67	XM_014170044.2
<i>sod1</i>	<i>S. salar</i>	CCACGT CCATGC CTTTGG	TCAGCTGC TGCAGTCA CGTT	64	XM_014198383.2
<i>tgfb1</i>	<i>S. salar</i>	AGTTGC CTTGTGA TTGTGG GA	CTCTTCAGT AGTGGTTT GTCG	61	XM_014129261.2
<i>il8</i>	<i>S. salar</i>	ATTGAGA CGGAAA GCAGAC G	CGCTGACA TCCAGACA AATCT	63	NM_001140710.3

3.5 Análisis de datos

Los valores de media, desviación estándar, error estándar de la media, normalidad, pruebas de valores atípicos, pruebas de significancia, y representaciones gráficas de los resultados fueron realizadas a través del software GraphPad Prism 10.1.1. Además, se utilizó el paquete Corplot en R para evaluar correlaciones entre los grupos de datos [Wei y Simko, 2011]. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$.

CAPÍTULO IV: Resultados

4.1 Síntesis y caracterización de péptidos

Se seleccionaron 12 secuencias peptídicas con las mayores actividades quelante de hierro y/o antioxidante reportadas en trabajos de investigación académica, las cuales fueron sintetizadas a través de síntesis química en fase sólida. Además, durante el proceso de síntesis se llevaron a cabo algunas modificaciones tales como el reemplazo de la terminación carboxilo por una amida amida en los péptidos 4417, 4427, 4429, y 4439 en su extremo C-terminal, generando los péptidos 4416, 4426, 4428 y 4438, o adiciones de aminoácidos como en el caso de los péptidos 4448, 4449, y 4453 (Tabla 3.1), finalizando con 17 péptidos sintéticos de los cuales 8 correspondieron a péptidos quelantes de hierro y 9 a péptidos antioxidantes. La pureza de los péptidos fue calculada posterior a su purificación en columnas Sep-Pak C18, encontrándose estos con una pureza de al menos 70% en la etapa de selección en base a actividades, y al menos un 90% de pureza para los péptidos que fueron utilizados como aditivos alimentarios. Los cromatogramas de cada uno de los péptidos se pueden observar en el Anexo 1. Por otra parte, a partir de un reporte de ESI-MS, los iones prácticos y los iones teóricos de cada péptido fueron contrastados para determinar si la secuencia sintetizada era equivalente a la secuencia seleccionada de investigaciones académicas, para lo cual el 100% de los péptidos sintetizados correspondieron a las secuencias seleccionadas (Anexo 2).

4.2 Actividad quelante de hierro y antioxidante de los péptidos sintéticos

Con la finalidad de preseleccionar 2 péptidos quelantes de hierro y 3 péptidos antioxidantes de los 17 péptidos sintetizados (Tabla 3.1), se llevaron a cabo ensayos químicos y celulares in vitro para determinar dichas actividades y preseleccionar a los péptidos sintéticos con la mayor actividad correspondiente.

Se evaluó la actividad quelante de hierro a través de un ensayo de ferrocina, para determinar la actividad quelante de ion ferroso (%) (Fig. 4.1 A). Los péptidos que presentaron mayor actividad fueron el péptido 4429 ($14,37 \pm 1,45$) y el péptido 4448 ($12,83 \pm 0,70$), seguidos en orden decreciente por los péptidos 4428 ($12,71 \pm 1,82$), 4446 ($10,81 \pm 3,64$), 4418 ($7,37 \pm 2,25$), 4438 ($7,08 \pm 3,42$), 4439 ($1,52 \pm 1,22$) y 4447 ($0,57 \pm 0,14$). De los dos péptidos con mayor actividad, se observaron diferencias significativas del péptido 4429 con los péptidos 4418, 4438, 4439 y

4447, y del péptido 4448 con los péptidos 4439 y 4447. Por otra parte, no se evidenciaron diferencias significativas entre los pares de péptidos con modificaciones C-terminales.

La actividad quelante de hierro obtenida en el ensayo LIP en cultivo primario de HKL fueron, en orden decreciente, los péptidos 4439 ($2,62 \pm 0,32$), 4418 ($2,47 \pm 0,43$), 4428 ($2,22 \pm 0,39$), 4446 ($2,17 \pm 0,21$), 4429 ($2,09 \pm 0,27$), 4448 ($2,05 \pm 0,24$), 4447 ($1,74 \pm 0,17$), y 4438 ($0,43 \pm 0,08$) (Fig. 4.1 B). No se evidenciaron diferencias significativas entre los péptidos evaluados.

En consideración de los resultados de actividad quelante de hierro, los péptidos sintéticos 4428 y 4448 fueron preseleccionados, debido a que presentaron el mayor valor de actividad en el ensayo de ferrocina, y diferencias significativas con otros péptidos. Debido a que los resultados el ensayo LIP no fueron significativos, no se consideraron para la preselección.

Para determinar la actividad antioxidante, se evaluó la capacidad de barrido de radicales libres de DPPH (Fig 4.1 C), la actividad de los péptidos fue, en orden decreciente, el péptido 4430 ($17,77 \pm 4,82$), 4427 ($13,13 \pm 2,39$), 4445 ($9,24 \pm 4,02$), 4426 ($8,25 \pm 2,89$), 4417 ($3,49 \pm 3,55$), 4416 ($2,48 \pm 1,86$), y los péptidos 4444, 4449 y 4453, presentando no actividad antioxidante (0 ± 0). En base a estos resultados, el péptido sintético 4430 fue preseleccionado, presentando el mayor valor de actividad y diferencias significativas con los péptidos 4416, 4417, 4426, 4444, 4445, 4449 y 4453.

En el ensayo ORAC (Fig. 4.1 D), la actividad antioxidante, jerarquizada de mayor a menor actividad, fue de los péptidos sintéticos 4444 ($1,15 \pm 0,20$), 4426 ($0,79 \pm 0,08$), 4445 ($0,78 \pm 0,01$), 4427 ($0,76 \pm 0,01$), 4453 ($0,76 \pm 0,05$), 4430 ($0,75 \pm 0,03$), 4449 ($0,72 \pm 0,01$), 4417 ($0,71 \pm 0,04$), 4416 ($0,69 \pm 0,02$). El péptido sintético 4444 presentó diferencias significativas con todos los otros péptidos evaluados y la mayor actividad, por lo que fue preseleccionado.

En base a la actividad antioxidante obtenida en el ensayo CAA en cultivo primario de HKL, los péptidos sintéticos, ordenados de mayor a menor actividad, fueron 4426 ($38,35 \pm 5,44$), 4430 ($32,92 \pm 2,27$), 4427 ($26,02 \pm 4,58$), 4445 ($25,99 \pm 4,43$), 4444 ($25,86 \pm 3,20$), 4417 ($24,66 \pm 3,23$), 4416 ($21,57 \pm 3,08$), 4453 ($20,96 \pm 3,82$), 4449 ($17,30 \pm 4,04$). El péptido sintético 4426 presentó diferencias significativas con los péptidos 4449 y 4453, mientras que no se observaron diferencias entre los demás péptidos. Por tal motivo, el péptido sintético 4426 fue preseleccionado.

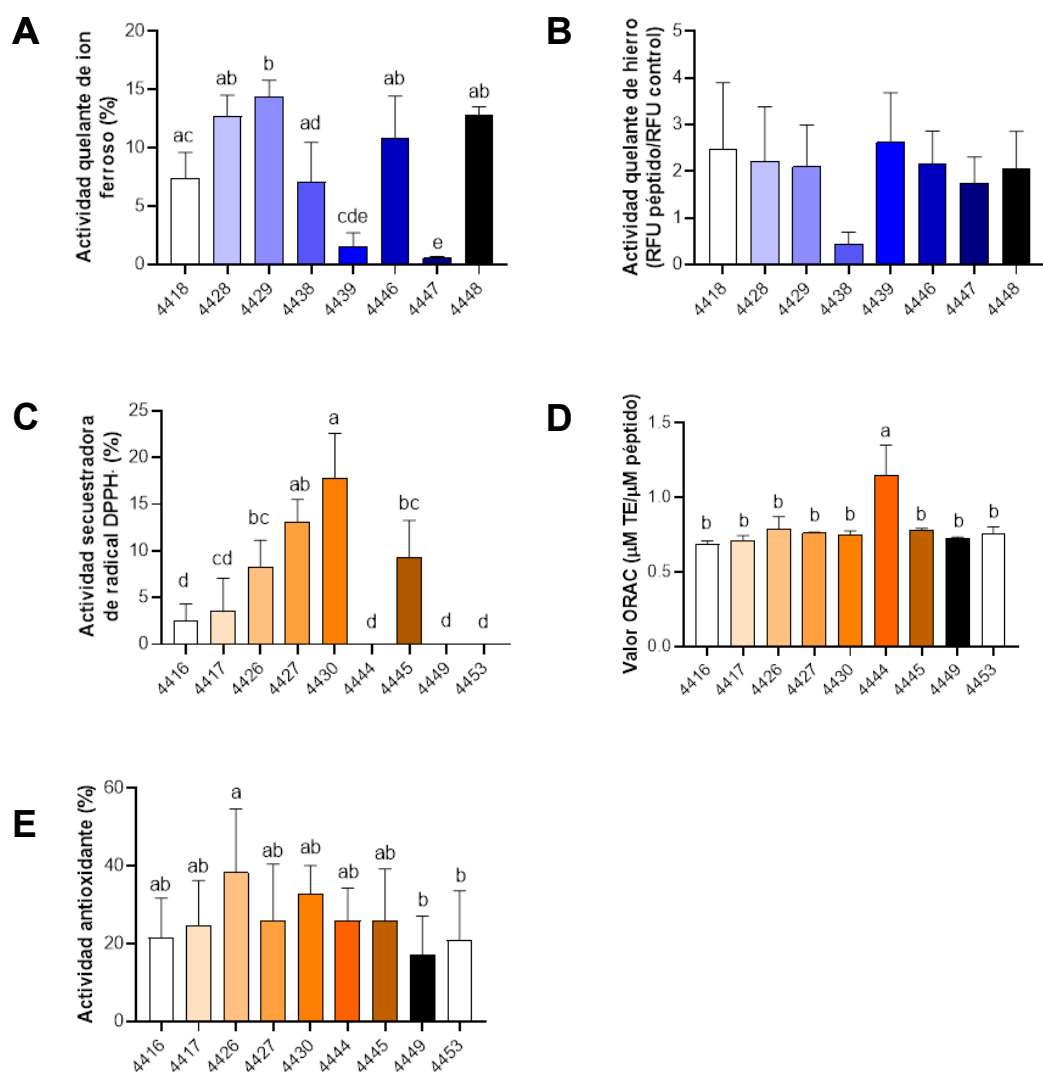


Figura 4.1. Actividad quelante de hierro y antioxidante de los péptidos sintéticos. Ensayos de actividad de los péptidos sintéticos de A) actividad quelante de ion ferroso de ferrocina, B) actividad quelante de hierro celular de pozo de hierro lábil (LIP) luego de sobrecarga de hierro e inducción con los péptidos sintéticos quelantes de hierro a un cultivo primario de HKL de trucha arcoíris, C) capacidad secuestradora de radical DPPH·, D) capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC), y E) actividad antioxidante celular (CAA) en un cultivo primario de HKL de trucha arcoíris. Los valores están representados como la media $\pm$ SD (A, C, y D, $n=3$) y la media $\pm$ SEM (B y E, $n=3$). Las diferencias estadísticas entre los tratamientos y controles están expresadas con letras minúsculas ($P < 0,05$), las cuales fueron determinadas a través de la prueba One-way ANOVA, donde las muestras presentan diferencias estadísticamente significativas cuando dos grupos presentan letras diferentes entre ellos.

4.3 Modulación de marcadores del sistema inmune innato en la línea celular RTS-11 por los péptidos sintéticos preseleccionados

Para realizar la selección final de los péptidos sintéticos que serán utilizados como aditivos alimentarios, la capacidad inmunomoduladora de los péptidos 4426, 4429, 4430, 4444, y 4448 fue determinada en la línea celular RTS-11 a nivel de transcritos. El péptido 4429 fue seleccionado entre los péptidos sintéticos quelantes de hierro, ya que provocó un efecto de regulación a la baja de *inos* (Fig. 4.2 A) e *il1b* (Fig. 4.2 C) cuando las células fueron inducidas con una concentración de 60 μ M, mientras que a concentraciones de 20 μ M y 10 μ M se obtuvo un efecto de regulación al alza de *ifny* (Fig. 4.2 B). Además, los mayores valores de fold change se observaron en *ifny* y *nlrc3* a 10 μ M y 20 μ M, mientras que los menores fueron de *inos*, *il1b*, y *nlrc5* a 60 μ M (Fig. 4.3 A). Aún más, se observaron correlaciones positivas significativas al aplicar el péptido 4429 entre *nlrc5* y *tlr5*, y *nlrc3* y *tlr9* a 10 μ M, *tlr9* con *tlr5* y *nlrc3*, y *tlr5* con *nlrc3* a 20 y 60 μ M (Fig. 4.3 B, C, y D).

Por otra parte, el péptido quelante de hierro 4448 presentó efectos de regulación al alza en *ifny* (Fig. 4.2 B) a 20 μ M y 10 μ M, y en *nlrc3* (Fig. 4.2 D) a 10 μ M, los cuales fueron los mayores valores de fold change alcanzados en las células tratadas con el péptido 4448 (Fig. 4.4 A). No obstante, no se encontraron correlaciones significativas entre la modulación de genes objetivos a 10 μ M (Fig. 4.4 A). En cambio, se observaron correlaciones negativas significativas en *inos* con *ifny* y *tlr5* (Fig. 4.4 C), y una correlación positiva entre *tlr5* e *ifny* a 20 μ M (Fig. 4.4 C). Por otra parte, a 60 μ M *tlr5* presentó una correlación positiva significativa con *il1b*, mientras que en *tlr9* con *nlrc5* se observó una fuerte correlación negativa (Fig. 4.4 D).

Con respecto a los péptidos sintéticos antioxidantes, el péptido 4426 fue seleccionado para ser incorporado como aditivo alimentario, ya que presentó efectos de regulación al alza en *ifny* (Fig. 4.2 B), *nlrc3* (Fig. 4.2 D), *tlr5* (Fig. 4.2 F), y *tlr9* (Fig. 4.2 H), con las mayores diferencias observadas a concentraciones de 20 μ M y 10 μ M (Fig. 4.5 A). Además, en el perfil de respuesta de los HKL frente al péptido 4426 se observaron correlaciones positivas significativas entre *il1b* y *nlrc3*, y *tlr5* e *inos* a 10 μ M (Fig. 4.5 B), y entre *inos* y *nlrc5* a 60 μ M (Fig. 4.5 D). No obstante, a 20 μ M no se encontraron correlaciones en la expresión de genes evaluados (Fig. 4.5 C).

En los HKL inducidos con el péptido 4430 se observó el aumento en la expresión de *ifny* (Fig. 4.2 B), y la disminución de la expresión en *il1b* y *nlrc3* (Fig. 4.2 C y D). El mayor efecto de regulación al alza fue en *ifny* para todas las concentraciones del péptido 4430, mientras que la expresión de mRNA disminuyó en *il1b* a todas las concentraciones, en *inos* a 10 μ M, y en *nlrc3* y *tlr9* a 60 μ M (Fig. 4.6 A). Aún más, no se encontraron correlaciones en la respuesta de los HKL al péptido 4430 a 10 μ M y 20 μ M (Fig. 4.6 B y C), pero sí se observó la correlación positiva entre *il1b* y *nlrc3*, y correlaciones negativas entre *ifny* e *inos*, y *nlrc5* e *inos* a 60 μ M (Fig. 4.6 D).

Finalmente, el péptido antioxidante 4444 provocó regulaciones al alza en *ifny* y *nlrc3* a concentraciones de 10 μ M y 20 μ M (Fig. 4.2 B y D), y la regulación a la baja de *il1b* a 60 μ M (Fig. 4.2 C). No obstante, los mayores valores medios de mRNA se alcanzaron en *tlr5* a 10 μ M y 60 μ M, mientras que los menores valores fueron en *il1b* a todas las concentraciones y en *inos* a 10 μ M (Fig. 4.7 A). Finalmente, se establecieron correlaciones positivas entre *nlrc5* e *ifny*, y *tlr5* con *tlr9*, y la correlación negativa de *il1b* y *nlrc3* a 10 μ M (Fig. 4.7 B), la correlación negativa entre *il1b* y *tlr5* a 20 μ M (Fig. 4.7 C), y a 60 μ M la correlación positiva de *il1b* con *tlr9*, en conjunto las correlaciones negativas de *inos* con *il1b* y *tlr9* (Fig. 4.7 D).

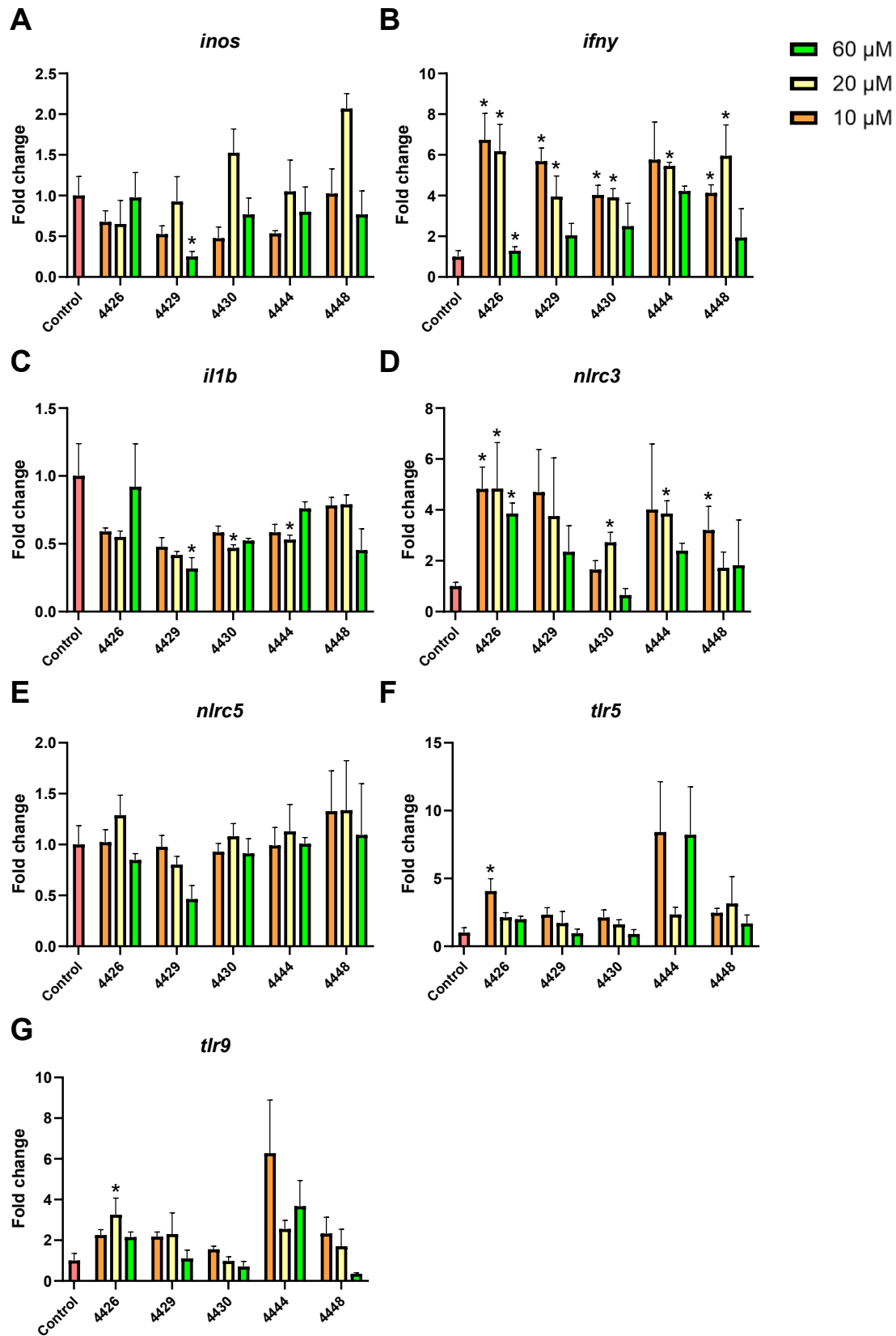


Figura 4.2. Modulación de marcadores del sistema inmune innato a nivel de transcritos en la línea celular RTS-11 estimulada con los péptidos preseleccionados. Los marcadores analizados fueron A) *inos*, B) *ifny*, c) *il1b*, D) *nlrc3*, E) *nlrc5*, F) *tlr5*, y G) *tlr9*. Los valores están representados como media $\pm$ SEM (n=4). Las diferencias estadísticas entre el control y los tratamientos están expresadas con una marca de asterisco (*) ($P < 0,05$) y fueron calculados por t-test.

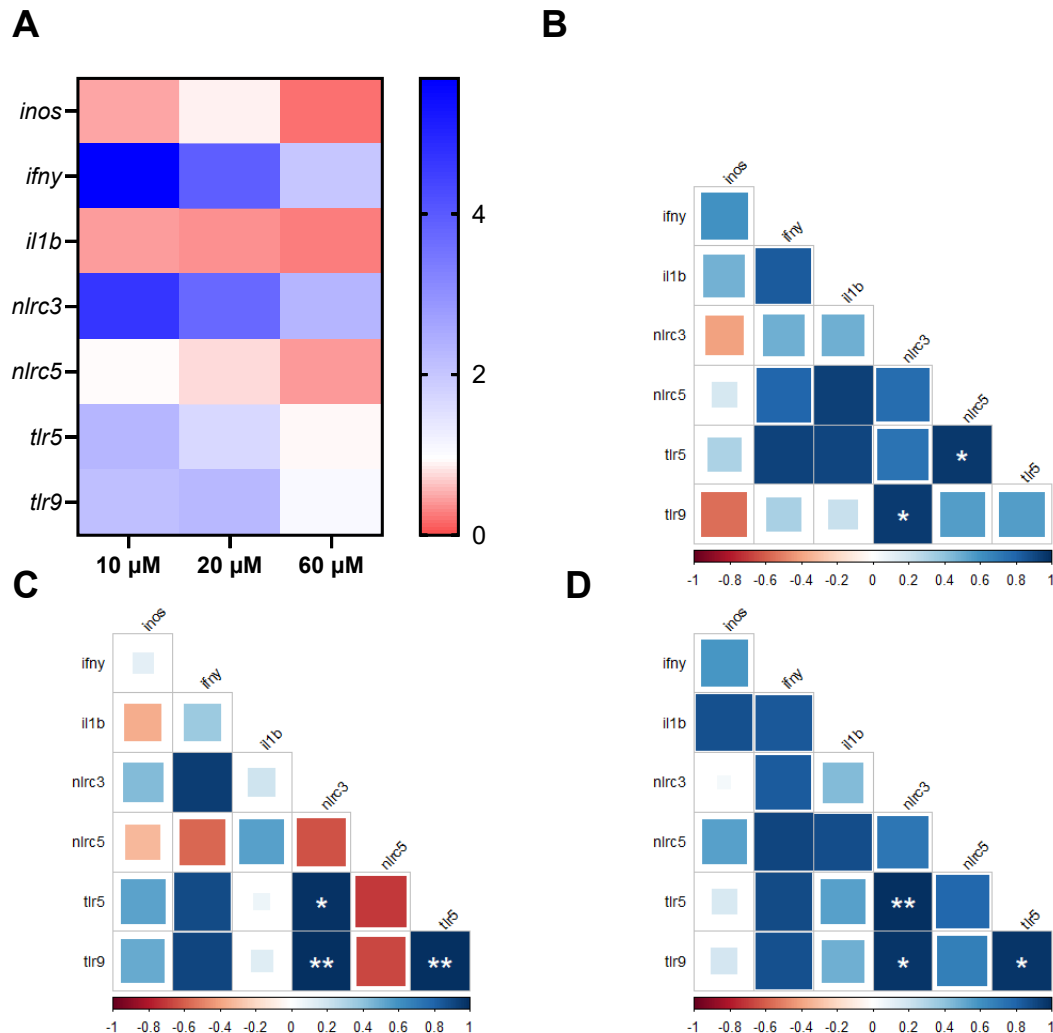


Figura 4.3. Mapa de calor y análisis de correlación de la capacidad de modulación del péptido sintético quelante de hierro 4429. A) Mapa de calor del efecto del péptido 4429 en marcadores del sistema inmune innato. La escala de color a la derecha representa el fold change en relación a al grupo control, en donde el color azul implica un mayor aumento de expresión, el color blanco denota que no existió una variación del gen con respecto al grupo control, y el color rojo

representa una disminución en el fold change con respecto al grupo control. Análisis de correlación del efecto del péptido 4429 en marcadores del sistema inmune innato a concentraciones de B) 10 μ M, C) 20 μ M, y D) 60 μ M. Todos los parámetros significativamente correlacionados están denotados por una marca (*) cuando $P < 0,05$, dos marcas (**) cuando $P < 0,01$, y tres marcas cuando $P < 0,001$. Grados de libertad = 6. En azul: correlaciones positivas, y en rojo: correlaciones negativas.

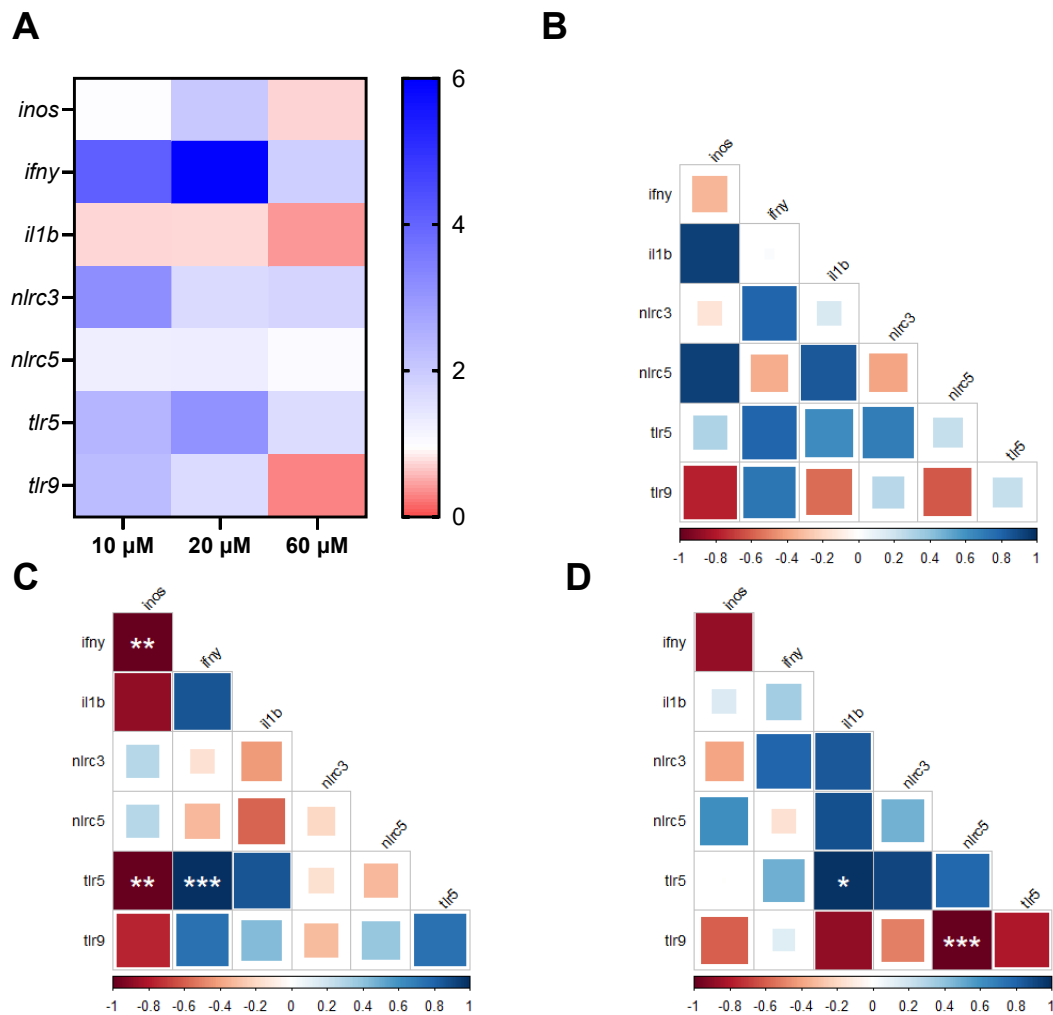


Figura 4.4. Mapa de calor y análisis de correlación de la capacidad de modulación del péptido sintético quelante de hierro 4448. A) Mapa de calor del efecto del péptido 4448 en marcadores del sistema inmune innato. La escala de color a la derecha representa el fold change en relación a al grupo control, en donde el color azul implica un mayor aumento de expresión, el color blanco denota que no existió una variación del gen con respecto al grupo control, y el color rojo

representa una disminución en el fold change con respecto al grupo control. Análisis de correlación del efecto del péptido 4448 en marcadores del sistema inmune innato a concentraciones de B) 10 μ M, C) 20 μ M, y D) 60 μ M. Todos los parámetros significativamente correlacionados están denotados por una marca (*) cuando $P < 0,05$, dos marcas (**) cuando $P < 0,01$, y tres marcas (***) cuando $P < 0,001$. Grados de libertad = 6. En azul: correlaciones positivas, y en rojo: correlaciones negativas.

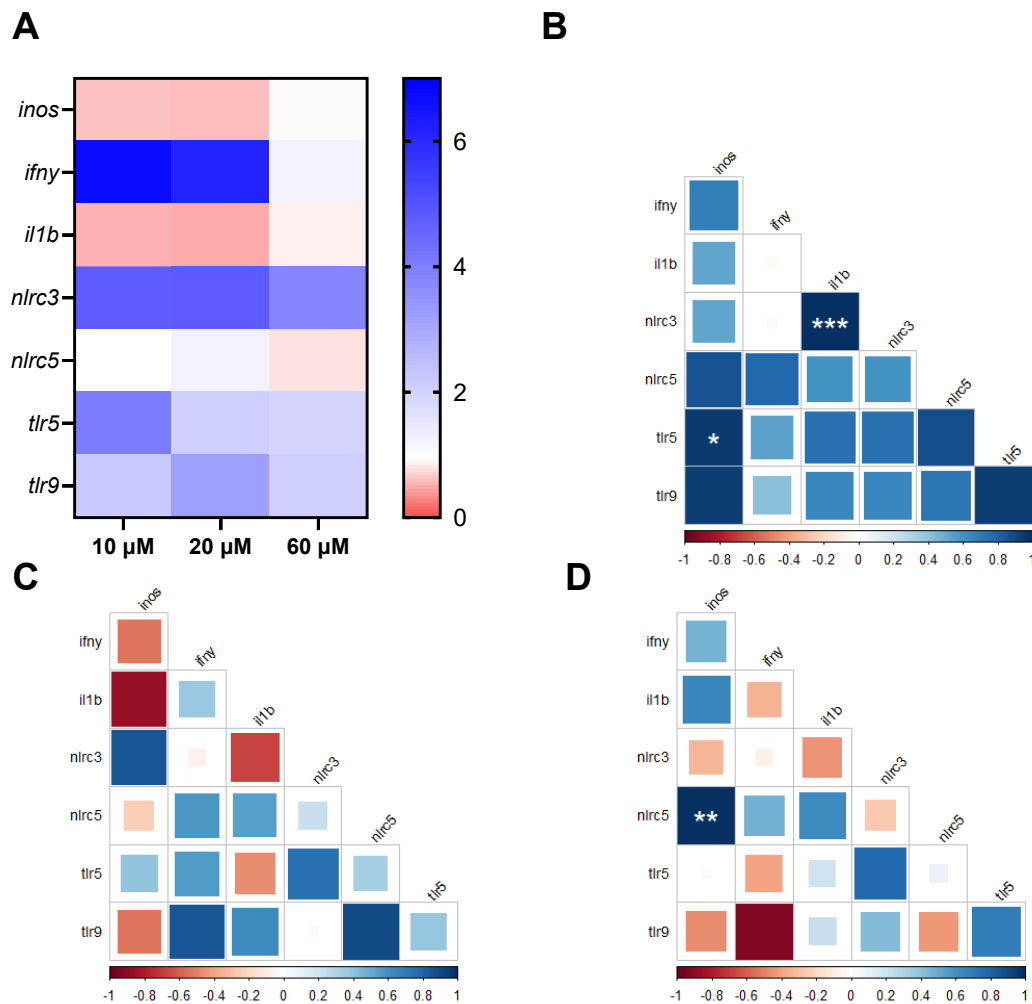


Figura 4.5. Mapa de calor y análisis de correlación de la capacidad de modulación del péptido sintético antioxidante 4426. A) Mapa de calor del efecto del péptido 4426 en marcadores del sistema inmune innato. La escala de color a la derecha representa el fold change en relación a al grupo control, en donde el color azul implica un mayor aumento de expresión, el color blanco denota que no existió una variación del gen con respecto al grupo control, y el color rojo

representa una disminución en el fold change con respecto al grupo control. Análisis de correlación del efecto del péptido 4426 en marcadores del sistema inmune innato a concentraciones de B) 10 μ M, C) 20 μ M, y D) 60 μ M. Todos los parámetros significativamente correlacionados están denotados por una marca (*) cuando $P < 0,05$, dos marcas (**) cuando $P < 0,01$, y tres marcas cuando $P < 0,001$. Grados de libertad = 6. En azul: correlaciones positivas, y en rojo: correlaciones negativas.

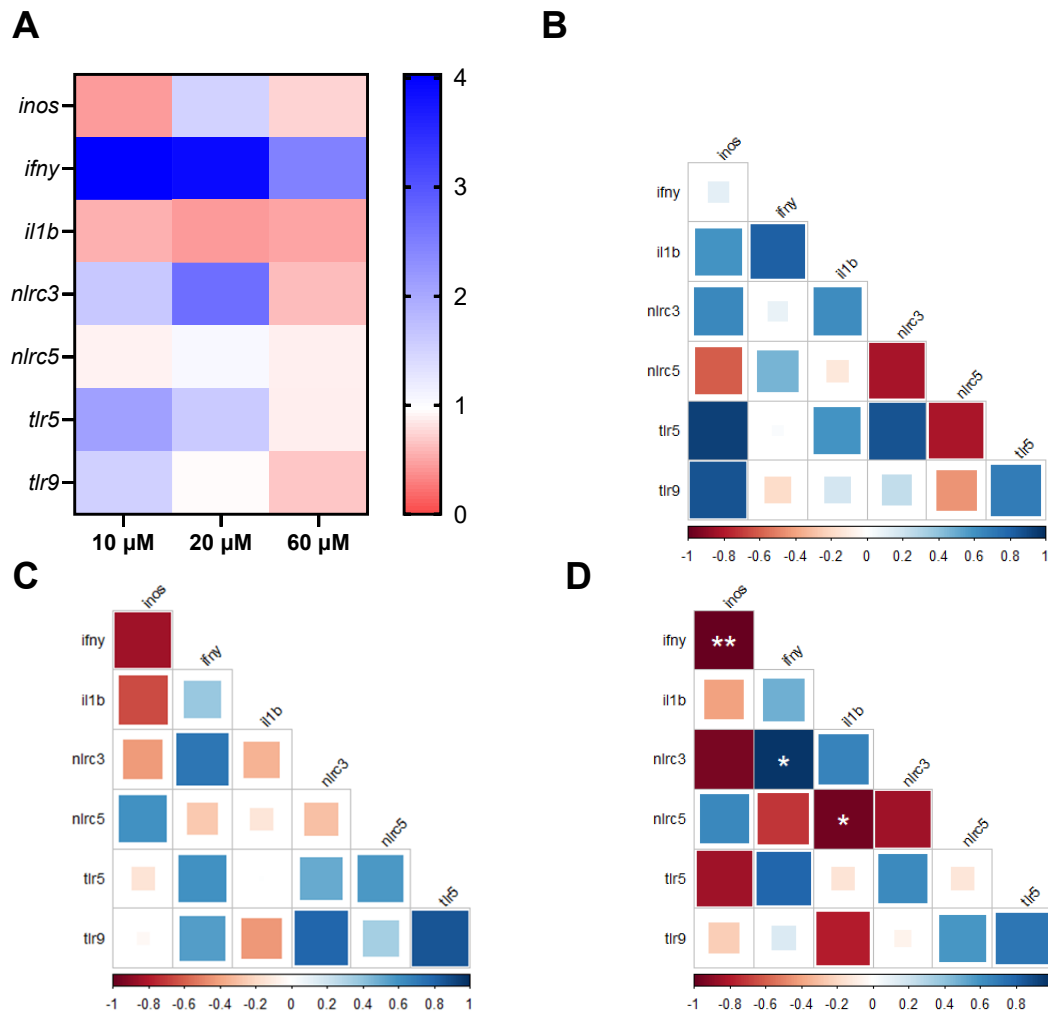


Figura 4.6. Mapa de calor y análisis de correlación de la capacidad de modulación del péptido sintético antioxidante 4430. A) Mapa de calor del efecto del péptido 4430 en marcadores del sistema inmune innato. La escala de color a la derecha representa el fold change en relación a al grupo control, en donde el color azul implica un mayor aumento de expresión, el color blanco denota que no existió una variación del gen con respecto al grupo control, y el color rojo

representa una disminución en el fold change con respecto al grupo control. Análisis de correlación del efecto del péptido 4430 en marcadores del sistema inmune innato a concentraciones de B) 10 μ M, C) 20 μ M, y D) 60 μ M. Todos los parámetros significativamente correlacionados están denotados por una marca (*) cuando $P < 0,05$, dos marcas (**) cuando $P < 0,01$, y tres marcas cuando $P < 0,001$. Grados de libertad = 6. En azul: correlaciones positivas, y en rojo: correlaciones negativas.

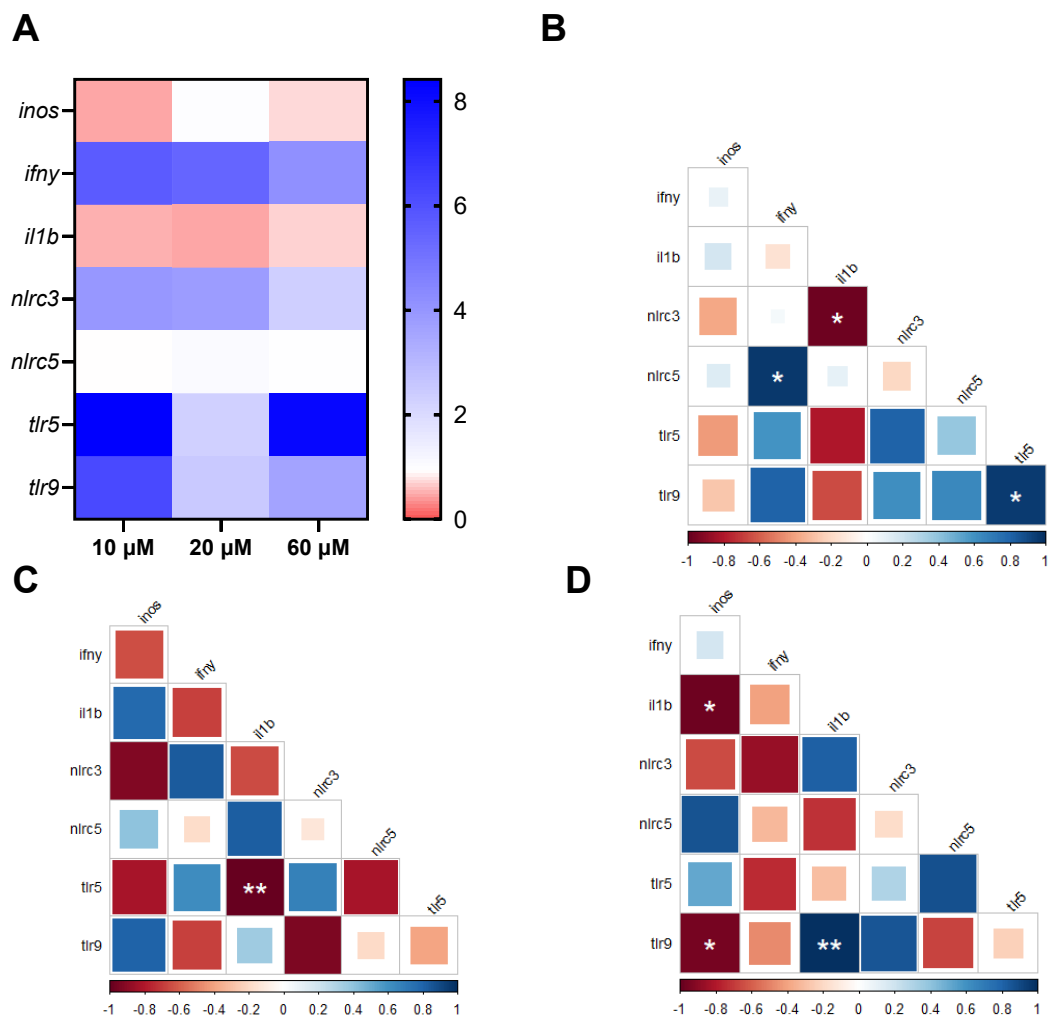


Figura 4.7. Mapa de calor y análisis de correlación de la capacidad de modulación del péptido sintético antioxidante 4444. A) Mapa de calor del efecto del péptido 4444 en marcadores del sistema inmune innato. La escala de color a la derecha representa el fold change en relación a al

grupo control, en donde el color azul implica un mayor aumento de expresión, el color blanco denota que no existió una variación del gen con respecto al grupo control, y el color rojo representa una disminución en el fold change con respecto al grupo control. Análisis de correlación del efecto del péptido 4444 en marcadores del sistema inmune innato a concentraciones de B) 10 μ M, C) 20 μ M, y D) 60 μ M. Todos los parámetros significativamente correlacionados están denotados por una marca (*) cuando $P < 0,05$, dos marcas (**) cuando $P < 0,01$, y tres marcas cuando $P < 0,001$. Grados de libertad = 6. En azul: correlaciones positivas, y en rojo: correlaciones negativas.

Tabla 4.1. Resumen de descubrimientos del primer objetivo.

Actividad quelante de hierro y antioxidante	➤ 17 péptidos fueron sintetizados y caracterizados con una pureza superior al 70%. ➤ Los péptidos 4429 y 4448 presentaron la mayor actividad quelante de hierro. ➤ Los péptidos 4426, 4430, y 4444 fueron los que demostraron la mayor actividad antioxidante. ➤ No se encontraron diferencias significativas entre péptidos con terminación amida o carboxilo.
Actividad inmunomoduladora	➤ Los péptidos sintéticos quelantes de hierro preseleccionados pudieron modular los marcadores <i>inos</i>, <i>ifny</i>, <i>il1b</i>, y <i>nlrc3</i>. ➤ Los péptidos sintéticos antioxidantes preseleccionados modularon los marcadores <i>infy</i>, <i>il1b</i>, <i>nlrc3</i>, <i>tlr5</i>, y <i>tlr9</i>.
Selección de péptidos sintéticos	➤ El péptido quelante de hierro 4429 y el péptido antioxidante 4426 fueron seleccionados en base a sus respectivas actividades y a su capacidad de modular el mayor número de marcadores del sistema inmune innato de interés.

4.4 Parámetros de crecimiento y número de glóbulos rojos

El peso inicial de los peces al inicio del desafío de alimentación piloto (Día 0) fue de 42,47 g, y el total de peces en cada estanque fue de 46. Luego de los 28 días de la duración del desafío, los peces que fueron alimentados con la dieta contenedora de péptidos sintéticos quelantes de hierro

(ID) y la dieta con la mezcla péptidos sintéticos quelantes de hierro y antioxidantes (AID) presentaron diferencias significativas en el aumento de peso (Fig. 4.8 A) y talla (Fig. 4.8 B) en comparación a los peces alimentados con la dieta control (CD), mientras que en los peces alimentados con la dieta contenedora de péptidos sintéticos antioxidantes (AD) no se observaron cambios significativos en comparación al grupo control (n=38). Por otra parte, en los peces alimentados con ID se encontró un mayor número de eritrocitos (Fig. 4.8 C) en comparación a los peces alimentados con CD, y sin diferencia entre AD y AID y el grupo control (n=10).

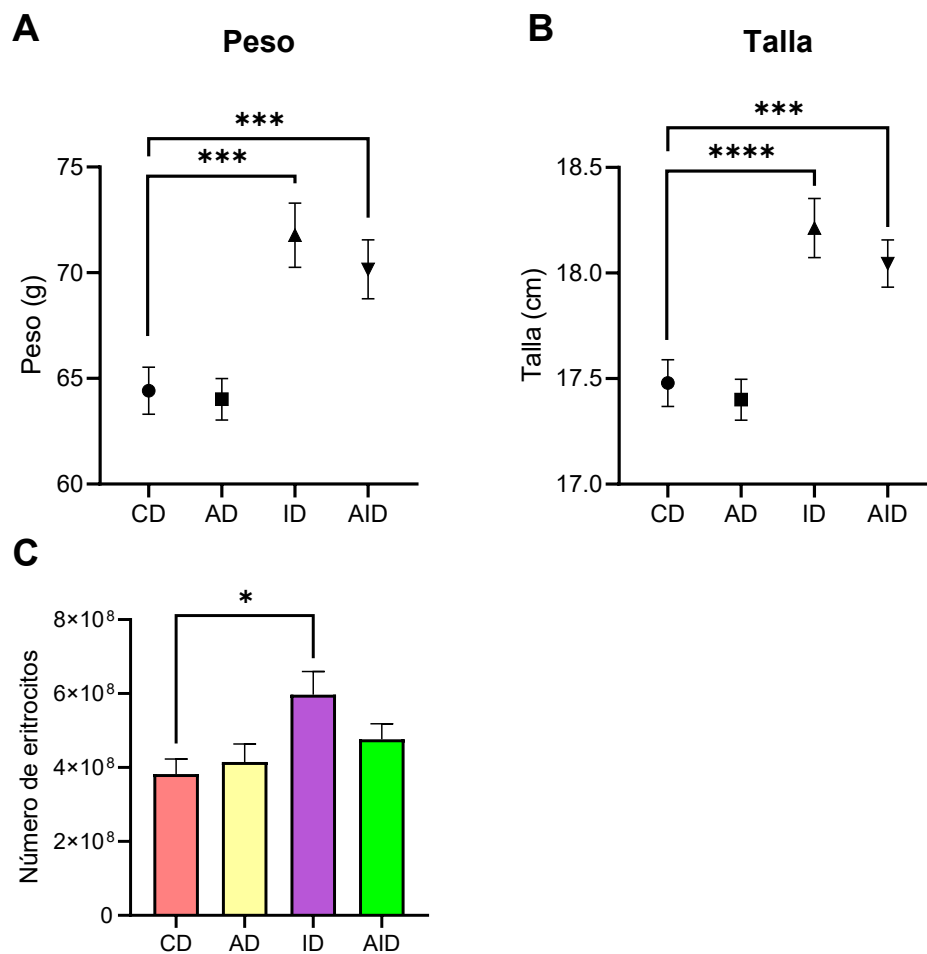


Figura 4.8. Peso, talla y número de eritrocitos en salmones del Atlántico al final del ensayo piloto de alimentación. Efecto de los péptidos sintéticos quelantes de hierro y antioxidantes seleccionados como aditivos alimentarios en salmones del Atlántico en el A) peso, B) talla, y C) número de eritrocitos luego de 28 días de alimentación con las dietas experimentales. Los valores

están representados como media $\pm$ SEM (A y B, n=38, C, n=10). Las diferencias estadísticas entre los tratamientos están expresadas con una marca de asterisco (*) ($P < 0,05$), tres marcas de asterisco (***) ($P < 0,001$), o cuatro marcas de asterisco (****) ($P < 0,0001$), las cuales fueron calculadas utilizando t-test.

Con respecto a la razón de conversión de alimento (FCR), velocidad de crecimiento (SGR), y el aumento de masa corporal (BWG) (Tabla 4.2), los peces del grupo AD (0,8 g/g, 1,47 %BWG/día, y 21,54 g, respectivamente) presentaron valores similares en comparación a los del grupo CD (0,8 g/g, 1,47 %BWG/día, y 21,54 g). Adicionalmente, los peces del grupo ID presentaron un FCR (0,79 g/g) cercano al grupo CD, el mayor SGR de todos los tratamientos (1,87 %BWG/día), y el mayor valor BWG (29,31 g), mientras que el grupo AID obtuvo el menor valor de FCR (0,73 g/g), un valor de SGR superior a CD y AD, pero inferior a ID (1,79 BWG/día), y el segundo mayor valor de BWG (27,69 g) (n=38) (Tabla R3).

Tabla 4.2. Parámetros relacionados al crecimiento de salmones del Atlántico al final del desafío piloto de alimentación.

Parámetro	CD	AD	ID	AID
Número inicial de peces	46	46	46	46
FI (g materia seca/pez) *	18,09	17,32	23,18	20,21
Peso inicial (g/pez)	42,47	42,47	42,47	42,7
Peso final (g/pez)	64,42	64,02	71,78	70,16
FCR (g/g)	0,82	0,8	0,79	0,73
SGR (%BWG/ día)	1,49	1,47	1,87	1,79
BWG (g)	21,94	21,54	29,31	27,69

Tabla 4.3. Resumen de descubrimientos del segundo objetivo.

Crecimiento de salmones del Atlántico	➤ Los peces alimentados con las dietas experimentales ID y AID presentaron un aumento de peso y talla significativos. ➤ Los peces alimentados con la dieta ID produjeron un mayor número de eritrocitos en comparación al grupo control. ➤ Los efectos en peso y talla de las dietas experimentales permitieron inferir que los péptidos sintéticos fueron asimilados por los peces y, por lo tanto, presentan biodisponibilidad. ➤ El aumento de eritrocitos, peso, talla, y la ausencia de mortalidad implican una seguridad en el uso de los péptidos sintéticos 4426 y 4429 como aditivos alimentarios a una concentración de 150 µg/kg.
Parámetros y eficiencia de crecimiento	➤ Los peces pertenecientes al grupo ID y AID obtuvieron los mejores valores de SGR y BWG, mientras que solo los peces alimentados con la dieta AID presentaron un valor de FCR distante al del grupo CD. ➤ La dieta AD no generó diferencias notables en ningún parámetro de eficiencia de crecimiento analizado.

4.5 Expresión de marcadores del sistema inmune innato en hígado y bazo de salmones del Atlántico alimentados con las dietas experimentales

Con la finalidad de evaluar los efectos de inmunomodulación de las dietas experimentales en salmones del Atlántico, se realizaron análisis de RT-qPCR al final del desafío piloto de alimentación en tejido de hígado y bazo. En hígado, los peces alimentados con la dieta ID presentaron una regulación a la baja de *sod1* en comparación con los peces del grupo CD (Fig. 4.9 A). Por otra parte, solo la dieta AID redujo la expresión a nivel de transcritos de *gpx* en comparación a la dieta control (Fig. 4.9 B). Aún más, no se observaron efectos significativos *hep* o *il1b* en hígado para todas las dietas experimentales (Fig. 4.9 C y D). Con respecto a la modulación de genes en bazo de los peces alimentados con las dietas experimentales, no se encontraron efectos en *ifny*, *il4/13a*, *cath*, *il10*, *il1b*, *tgfb*, *hep* y *arg* (Fig. 4.10 A-H). No obstante, los peces del grupo AID presentaron una disminución en la expresión de *tnfa* (Fig 4.9 I).

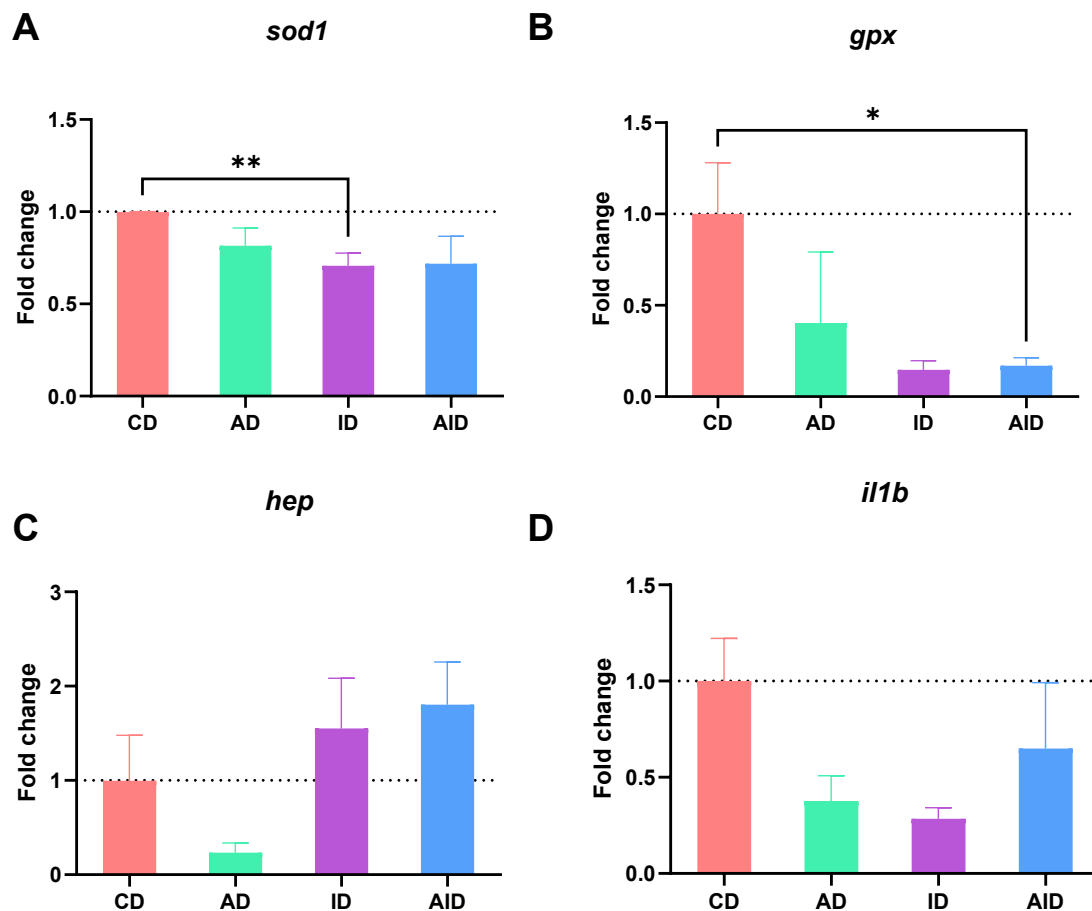


Figura 4.9. Efecto de las dietas experimentales en la expresión relativa de marcadores del sistema inmune innato y de estrés oxidativo en hígado salmones del Atlántico luego de 28 días de desafío de alimentación piloto. Los genes analizados correspondieron a A) *sod1*, B) *gpx*, C) *hep*, e D) *il1b*. Los transcritos de mRNA fueron normalizados a través de la media aritmética de la expresión del gen constitutivo *ef1a*. Los valores están representados como media $\pm$ SEM en unidades de fold change. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos (AD, ID, y AID) y el control (CD) fueron analizadas a través de t-test o Mann-Whitney U-Test, y estas se encuentran denotadas con una marca (*) cuando $P < 0,05$ y con dos marcas (**) cuando $P < 0,01$.

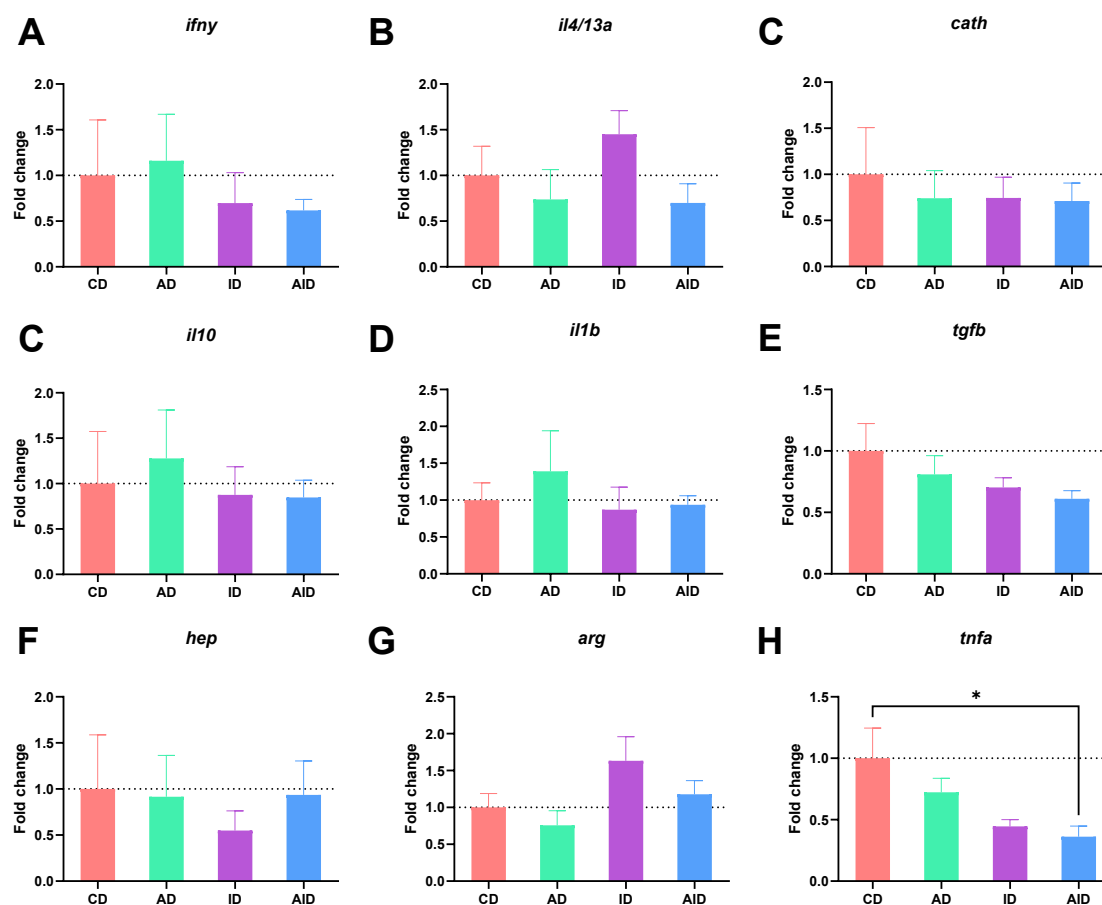


Figura 4.10. Efecto de las dietas experimentales en la expresión relativa de marcadores del sistema inmune innato y de estrés oxidativo en bazo de salmones del Atlántico luego de 28 días de desafío de alimentación piloto. Los genes analizados correspondieron a A) *ifny*, B) *il4/13a*, C) *cath*, D) *il10*, E) *il1b*, F) *tgfb*, G) *hep*, H) *arg*, y I) *tnfa*. Los transcritos de mRNA fueron normalizados a través de la media aritmética de la expresión del gen constitutivo *ef1a*. Los valores están representados como media $\pm$ SEM en unidades de fold change. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos (AD, ID, y AID) y el control (CD) fueron analizadas a través de t-test o Mann-Whitney U-Test, y estas se encuentran denotadas con una marca (*) cuando $P < 0,05$ y con dos marcas (**) cuando $P < 0,01$.

Tabla 4.4. Resumen de descubrimientos del tercer objetivo.

Expresión relativa en hígado	➤ La dieta experimental ID produjo una regulación a la baja de <i>sod1</i>, lo cual puede representar una disminución en el estrés oxidativo en el hígado. ➤ Los peces del grupo AID presentaron una subexpresión de <i>gpx</i>, lo que puede indicar una reducción del estrés oxidativo en el hígado. ➤ Ninguna dieta experimental generó un efecto significativo en la expresión de <i>hep</i> e <i>il1b</i>. ➤ La dieta AD no provocó diferencias en la expresión de los marcadores analizados en hígado.
Expresión relativa en bazo	➤ Los peces alimentados con AID presentaron una disminución significativa en la expresión de <i>tnfa</i> en bazo. ➤ Ninguna de las dietas experimentales moduló la expresión de <i>infy</i>, <i>il4/13a</i>, <i>cath</i>, <i>il10</i>, <i>il1b</i>, <i>tgfb</i>, <i>hep</i>, y <i>arg</i>. ➤ Las dietas AD e ID no provocaron diferencias en la expresión de los marcadores evaluados en bazo.

4.6 Expresión de marcadores del sistema inmune innato en cultivo primario de HKL estimulado con *P. salmonis* inactivada

Para determinar la capacidad de las dietas experimentales de modular marcadores del sistema inmune innato en respuesta a *P. salmonis*, a partir de los salmones del Atlántico muestreados al final del desafío piloto de alimentación se estableció un cultivo primario de HKL, el cual fue estimulado durante 6 horas y 24 horas con *P. salmonis* LF-89, EM-90, o ambas (Mix) inactivada, y la expresión relativa a nivel de transcritos fue evaluada (Fig. 4.11 y Fig 4.12).

Prevía a la estimulación con *P. salmonis* inactivada, no se encontraron diferencias significativas en AD, ID, y AID en comparación a CD en todos los genes evaluados (Fig. 4.11 y Fig. 4.12). Por otra parte, todas las estimulaciones con *P. salmonis* inactivada produjeron un aumento en los niveles de ARNm en *il1b*, *il8*, y *cath2* en el grupo AD (Fig. 4.11 A y C, Fig. 4.12 C) en comparación al grupo AD sin estimulación, mientras que a las 24 hpe con el genogrupo EM-90 se observó un incremento en la expresión de *inos* (Fig. 4.11 B). Adicionalmente, los niveles de mRNA de *arg1* en el grupo AD fueron mayores que en el grupo CD a 6 hpe con el genogrupo LF-89, efecto el

cual no estuvo presente a las 24 hpe (Fig. 4.12 A). Aún más, se demostró una diferencia en la expresión *il8* en el grupo AD a las 24 hpe con el Mix en contraste con la estimulación con el genogrupo LF-89 (Fig. 4.11 C), siendo los HKL del grupo estimulados con el Mix los que presentaron una mayor respuesta.

Al comparar al grupo ID antes de la estimulación y posterior a esta, se observaron regulaciones al alza con el genogrupo LF-89 en *il1b*, *hep*, *cath2*, y *tgfb1* (Fig. 4.11 A y Fig. 4.12 B, C, y D), el genogrupo EM-90 en *il1b* y *cath2* (Fig. 4.11 A y Fig. 4.12 C), y con el Mix en *inos* y *cath2* (Fig. 4.11 B y Fig. 4.12 C). Aún más, en el grupo ID se descubrió un incremento en *il8* a las 24 hpe en la estimulación con *P. salmonis* LF-89 inactivada en comparación con el grupo CD bajo las mismas condiciones (Fig. 4.11 C). Adicionalmente, se encontró una diferencia entre las estimulaciones con el genogrupo LF-89 y el Mix en los niveles de *sod1* 24 hpe en el grupo ID (Fig. 4.11 D).

Con respecto al grupo final, los HKL pertenecientes al grupo AID presentaron un incremento de *il1b* luego del estímulo con los genogrupos LF-89 y EM-90 (Fig. 4.11 A), y *cath2* luego de la estimulación con el Mix (Fig. 4.12 C), ambas en comparación al grupo AID previo a la estimulación. Adicionalmente, se observó un efecto de regulación al alza en *il8* a las 24 hpe luego de la estimulación con el genogrupo LF-89 (Fig. 4.11 C), y una regulación a la baja en *sod1* a las 24 hpe con el genogrupo EM-90 (Fig. 4.11 D), ambos efectos en comparación a CD bajo las mismas estimulaciones respectivas.

Como una vista general del impacto de las dietas experimentales en la expresión de los marcadores del sistema inmune innato, *il1b* y *arg1* fueron los genes mayormente sobreexpresados a las 6 hpe y 24 hpe, con los niveles de *arg1* siendo mayores a las 6 hpe (Fig. 4.13 A y B). Por otra parte, *sod1*, *hep*, *tgfb1*, *il8* y *cath2* fueron subexpresados en los grupos ID y AID antes del estímulo con *P. salmonis* inactivada. A la vez, *il1b* e *inos* también demostraron una expresión reducida en el grupo ID (Fig. 4.13 A y B). Aún más, el incremento de los niveles de mRNA de *il1b* son observados solo posterior a la estimulación con *P. salmonis* inactivada. Además, en el grupo CD se observó una correlación positiva entre *il1b* y *sod1*, *il1b* e *il8*, y *sod1* e *il8*, y una fuerte correlación negativa entre *il1b* e *inos* (Fig. 4.13 B). Por el contrario, los análisis

en los grupos AD, ID, y AID presentaron correlaciones positivas significativas entre *cath2* y *sod1*, *cath2* e *il1b*, *inos* y *tgfb1*, y *hep* y *tgfb1* (Fig. 4.13 C, D, y E), correlaciones que no fueron establecidas en CD (Fig. 4.13 B). Finalmente, se descubrió una correlación negativa entre *il1b* e *inos* en el grupo CD (Fig. 4.13 B), la cual no estuvo presente en ninguno de los otros grupos.

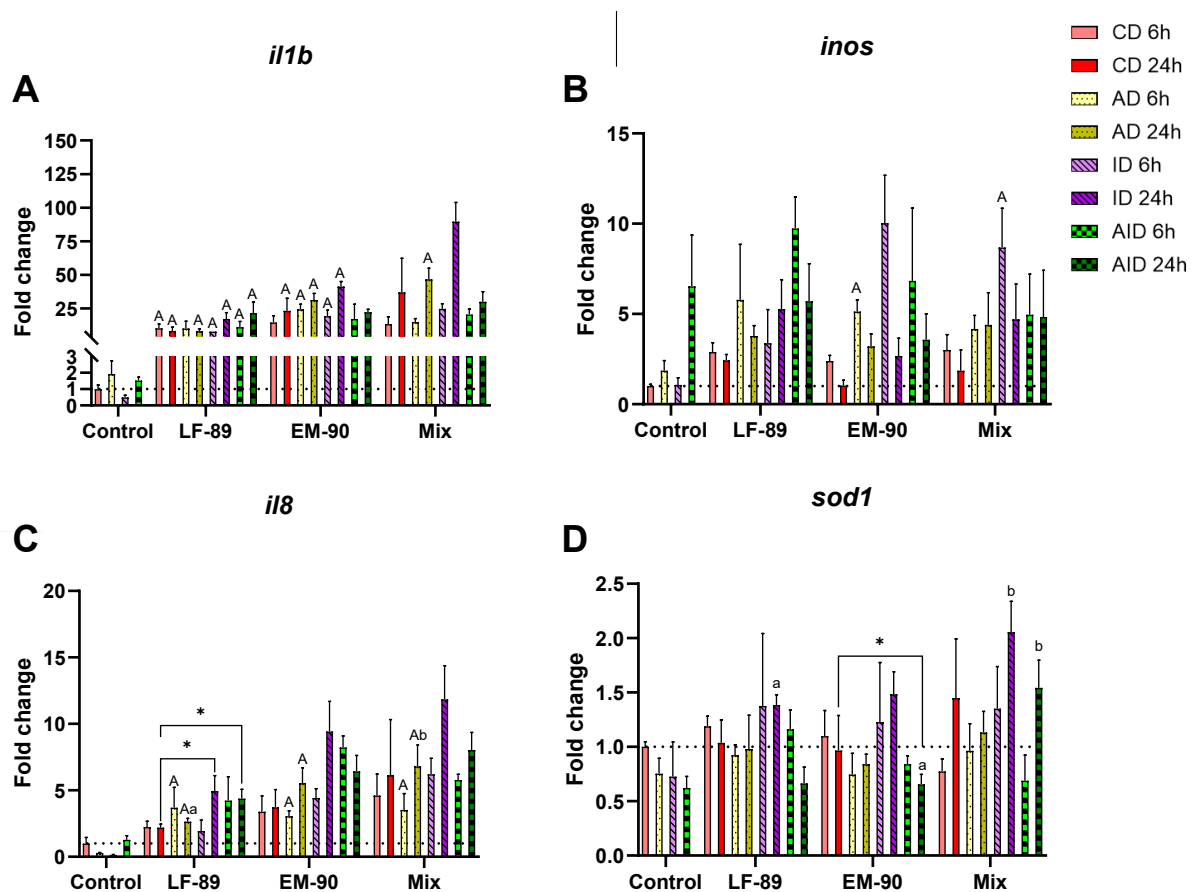


Figura 4.11. Efecto de las dietas experimentales en la expresión relativa de marcadores del sistema inmune innato de cultivo primario de HKL de salmones del Atlántico luego de 28 días del desafío piloto de alimentación. Los cultivos primarios fueron estimulados con *P. salmonis* de genogrupos inactivados LF-89, EM-90, o ambas (Mix) durante 6 y 24 horas. Los marcadores del sistema inmune innato analizados fueron A) *il1b*, B) *inos*, C) *il8*, y D) *sod1*. Los valores de expresión fueron normalizados por la media aritmética de la expresión del gen constitutivo *ef1a* y están descritos como media $\pm$ SEM en unidades de fold change. Las diferencias estadísticas fueron analizadas a través de t-test o Mann-Whitney U-test, las que están representadas con una diferencia en letras minúsculas para denotar diferencias entre estímulos de genogrupos en un

mismo tratamiento con dietas experimentales, letras mayúsculas para diferencias entre los tratamientos (CD, AD, ID, y AID estimulados) y su grupo control respectivo (CD, AD, ID, y AID sin estimular), y una marca (*) para diferencias entre tratamientos ($P < 0,05$).

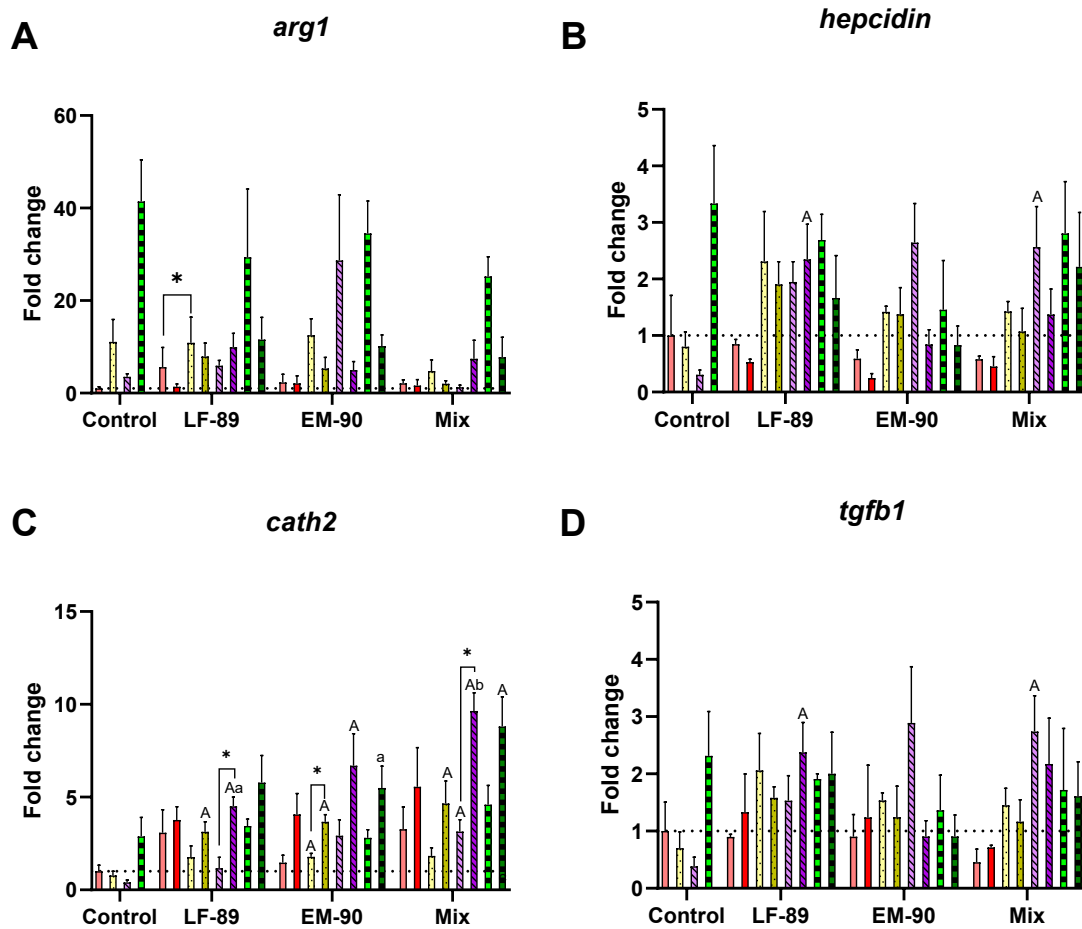


Figura 4.12. Efecto de las dietas experimentales en la expresión relativa de marcadores del sistema inmune innato de cultivo primario de HKL de salmones del Atlántico luego de 28 días del desafío piloto de alimentación. Los cultivos primarios fueron estimulados con *P. salmonis* de genogrupos inactivados LF-89, EM-90, o ambas (Mix) durante 6 y 24 horas. Los marcadores del sistema inmune innato analizados fueron A) *arg1*, B) *hepcidin*, C) *cath2*, y D) *tgfb1*. Los valores de expresión fueron normalizados por la media aritmética de la expresión del gen constitutivo *ef1a* y están descritos como media $\pm$ SEM en unidades de fold change. Las diferencias estadísticas fueron analizadas a través de t-test o Mann-Whitney U-test, las que están

representadas con una diferencia en letras minúsculas para denotar diferencias entre estímulos de genogrupos en un mismo tratamiento con dietas experimentales, letras mayúsculas para diferencias entre los tratamientos (CD, AD, ID, y AID estimulados) y su grupo control respectivo (CD, AD, ID, y AID sin estimular), y una marca (*) para diferencias entre tratamientos ($P < 0,05$).

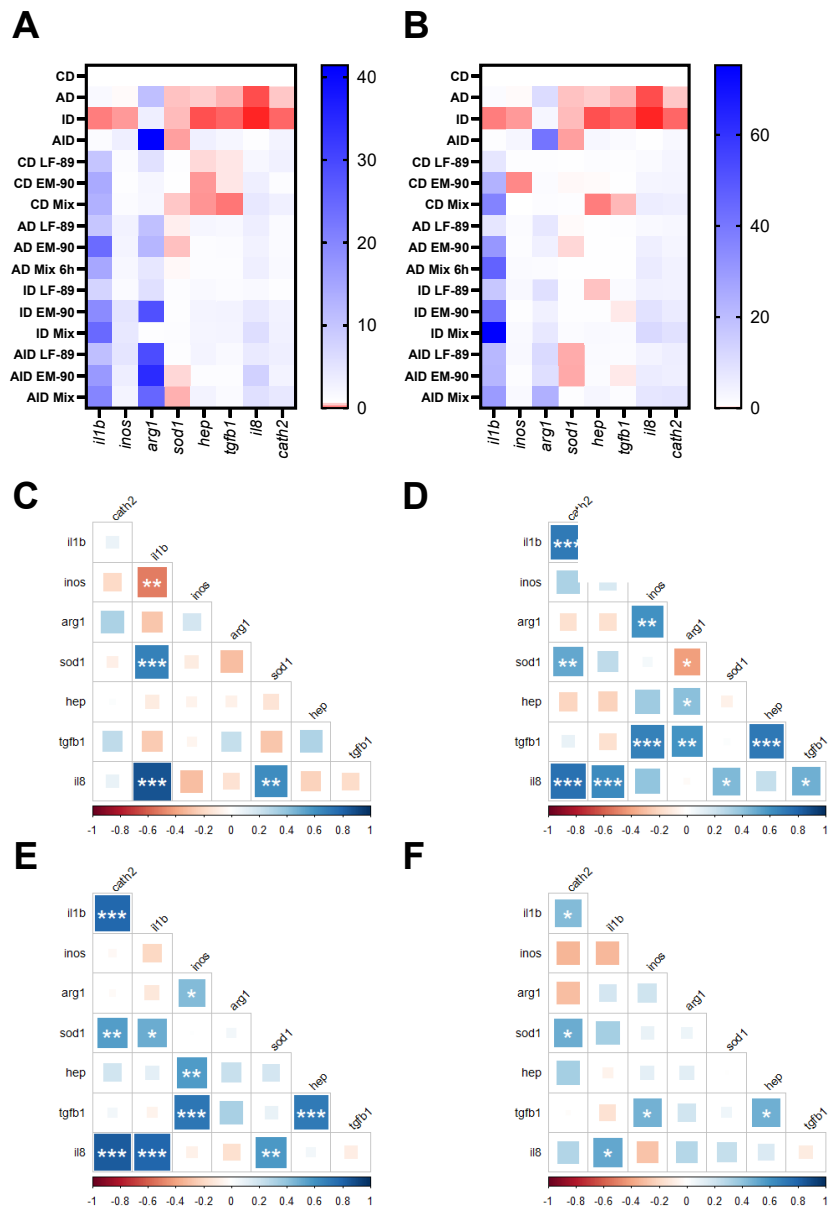


Figura 4.13. Mapa de calor y análisis de correlación del efecto de las dietas experimentales en los marcadores del sistema inmune innato en cultivo primario de HKL obtenido de salmones del Atlántico luego de 28 días del desafío piloto de alimentación. Mapa de calor del impacto de las

experimentales en la expresión de marcadores del sistema inmune innato (*arg1*, *sod1*, *cath2*, *il1b*, *il8*, *inos*, *hep*, y *tgfb1*) a las A) 6 horas y B) 24 horas. La escala de color a la derecha representa el fold change en relación a las muestras del grupo CD, en donde el color azul implica un aumento de la expresión, el color blanco significa que no hay diferencia, y el color rojo denota que una disminución en la expresión en relación al grupo CD sin estimular. Los análisis de correlación de los grupos C) CD, D) AD, E) ID, y F) AID de la expresión de marcadores del sistema inmune innato están significativamente correlacionados cuando poseen una marca (*) ($P < 0,05$), dos marcas (**) ($P < 0,01$), y tres marcas (***) ($P < 0,001$). Grados de libertad = 6. En azul: correlaciones positivas, y en rojo: correlaciones negativas.

Tabla 4.5. Resumen de descubrimientos del cuarto objetivo.

Modulación de la expresión relativa en HKL	➤ Los HKL del grupo ID y AID presentaron una sobrerregulación de <i>il8</i> luego de la estimulación con <i>P. salmonis</i> LF-89 en contraste con el grupo CD. ➤ Se observó una regulación a la baja de <i>sod1</i> en los HKL del grupo AID 24 hpe con <i>P. salmonis</i> EM-90 con respecto al grupo control. ➤ Luego de la estimulación con <i>P. salmonis</i> LF-89, los HKL del grupo AD presentaron un aumento en la expresión de <i>arg1</i> en comparación con el grupo CD. ➤ Los HKL pertenecientes a los grupos AD, ID, y AID respondieron de forma diferente entre las estimulaciones con <i>P. salmonis</i> LF-89, EM-90 y el Mix.
Relaciones entre la inmunomodulación de las dietas experimentales	➤ El mayor aumento de expresión se obtuvo en el gen <i>il1b</i> luego de la estimulación bacteriana. ➤ Los HKL de los grupos AD e ID presentaron un mayor número de correlaciones en la expresión relativa que los grupos CD y AID. ➤ Los HKL de los grupos AD e ID presentaron un mayor número de correlaciones en la expresión relativa que los grupos CD y AID.

CAPÍTULO V: Discusiones

La importancia de los niveles de hierro y la inmunidad nutricional frente a la infección de *P. salmonis* ha sido demostrada en un amplio número de estudios [Detleff *et al.*, 2015, Pulgar *et al.*, 2015, Caruffo *et al.*, 2020, Valenzuela-Miranda 2016, Valenzuela-Muñoz y Gallardo-Escárate, 2020]. Por otra parte, la actividad antioxidante está estrechamente relacionada con el estallido respiratorio en macrófagos, ya que la célula debe protegerse a sí misma del estrés oxidativo resultante del mismo, lo que limita la producción de especies reactivas según la capacidad antioxidante, por lo que un incremento en la actividad antioxidante también aumenta la potencia del estallido respiratorio [McCann *et al.*, 2022, Pisoschi *et al.*, 2024]. En consideración de lo anterior, esta investigación tiene por objetivo establecer el potencial de los péptidos sintéticos quelantes de hierro y antioxidantes para mejorar la resiliencia y el fortalecimiento de la respuesta del sistema inmune innato de salmónidos frente al SRS cuando son usados de forma individual o combinada como aditivos alimentarios.

Por tal motivo, 8 péptidos quelantes de hierro y 9 péptidos antioxidantes fueron sintetizados basados en publicaciones científicas de péptidos con secuencia y actividad reportada. Estos péptidos sintéticos fueron puestos a prueba en según su respectiva actividad y su habilidad para modular marcadores del sistema inmune innato, con la finalidad de seleccionar uno de cada categoría para ser aplicados como aditivos alimentarios.

Para preseleccionar dos péptidos sintéticos quelantes de hierro con la mayor actividad, se llevaron a cabo dos ensayos. La actividad quelante de hierro fue determinada químicamente a través de una prueba de ferrocina, en la que los péptidos 4429 y 4448 presentaron la mayor actividad. Luego, para evaluar la actividad quelante de hierro a nivel biológico, se llevó a cabo una prueba de LIP utilizando cultivos primarios de HKL de trucha arcoíris, en la cual a pesar de que los péptidos presentaron actividad quelante de hierro en comparación al control negativo, no se encontraron diferencias significativas entre ellos, por lo que ninguno pudo ser preseleccionado. Por tal motivo, se consideraron los péptidos 4429 y 4448 del ensayo químico como preseleccionados. Se ha demostrado que los grupos nitrogenados mejoran la interacción y la selectividad por Fe^{+2} [Li *et al.*, 2017]. No obstante, en este trabajo los péptidos sintéticos con la mayor cantidad de nitrógeno en sus secuencias no presentaron la mayor actividad quelante de

hierro, lo cual puede ser causal de la posición de los aminoácidos en la secuencia, el tamaño del péptido, u otros factores estructurales [Wu *et al.*, 2020]. Por otra parte, aunque no se observaron diferencias significativas entre los péptidos sintéticos en el ensayo LIP, los péptidos 4418, 4428, 4429, 4439, 4446 y 4448 presentaron actividad quelante de hierro con actividad celular significativamente diferente al control negativo ($p < 0,05$). En consecuencia, aunque el ensayo LIP no permitió evaluar la selección entre péptidos quelantes de hierro, si permitió validar su actividad como quelantes de hierro en un ambiente biológico.

Debido a que la actividad antioxidante puede ocurrir a través de diversas vías tales como transferencia de átomos de hidrógeno, transferencia de electrón único, inducción de vías de señalización de enzimas antioxidantes, o una combinación de los factores anteriores [Lang *et al.*, 2024, Siddeeg *et al.*, 2021], no existe una prueba antioxidante que pueda ser considerada concluyente o patrón de referencia por si sola [Naparło *et al.*, 2020]. Por el motivo anterior, para seleccionar los péptidos sintéticos antioxidantes con la mayor actividad se llevaron a cabo tres ensayos, esto con la finalidad de medir la actividad antioxidante a través del mecanismo SET por medio de la actividad secuestradora de radical DPPH·, la combinación de los mecanismos HAT y SET a través del método ORAC, y la actividad antioxidante en un ambiente biológico utilizando la metodología CAA. De forma interesante, en los tres ensayos antioxidantes no se observó un consenso entre los péptidos con la mayor actividad, siendo los péptidos 4426, 4430, y 4444 los que presentaron la mayor actividad biológica en los mecanismos, SET, SET y HAT, y celular, respectivamente y, por lo tanto, fueron preseleccionados.

Los péptidos 4416, 4426, 4428, y 4438 fueron sintetizados con las mismas secuencias que los péptidos 4417, 4427, 4429, y 4439, respectivamente, pero utilizando la resina Rink Amide® en lugar de la resina cloruro de 2-clorotritil, generando una amidación C-terminal al momento de realizar el paso de clivaje al final de la síntesis en fase sólida. Lo anterior se llevó a cabo para determinar si péptidos cortos con las mismas secuencias, pero con amidaciones C-terminales, podrían provocar diferencias en la actividad quelante de hierro y/o antioxidante. La modificación del grupo C-terminal de los péptidos sintéticos puede impactar directamente la conformación del péptido y, por ende, su actividad biológica, esto debido a la neutralización de la carga negativa del grupo carboxilo, aumento de hidrofobicidad, cambios en las propiedades de unión a receptores, patrones de interacción de puentes de hidrógeno, e incluso su capacidad de ingresar

a células o interactuar con las membranas de estas [Arbour *et al.*, 2020]. No obstante, en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante para las parejas de péptidos con modificaciones C-terminales. Por otra parte, el péptido quelante de hierro 4438 presentó una actividad quelante de hierro inferior al del control negativo (datos no mostrados) en el ensayo celular LIP y con una diferencia significativa en comparación al péptido 4439, lo cual no se observó en la actividad del ensayo químico de ferrocina, donde no se encontraron diferencias entre las parejas de péptidos con modificaciones C-terminales, implicando que la modificación C-terminal influyó negativamente solo en la actividad quelante de hierro biológica del péptido 4438.

Con la finalidad de seleccionar el péptido sintético quelante de hierro y el péptido sintético antioxidante final a partir de los 5 péptidos preseleccionados, se determinó su capacidad de modular la expresión de marcadores del sistema inmune innato en la línea celular RTS-11. El primer grupo de marcadores evaluados fue el de respuesta proinflamatoria, en el que se encuentran la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y las citoquinas interleuquina-1 β (IL-1 β) e interferón- γ (IFN- γ), las que forman parte del sistema inmune innato y son expresadas en respuesta a PAMPS, DAMPS, citoquinas proinflamatorias, e infecciones de patógenos [Carreiro 2018, Seppola *et al.*, 2008, Soliman y Barreda 2023, Yang *et al.*, 2017]. La enzima iNOS genera NO en respuesta a estímulos proinflamatorios, el cual a su vez puede promover la producción de ROS y RNS provocando la muerte de patógenos, mediar la resolución de la inflamación, y modular el sistema antioxidante celular [Soliman y Barreda 2023, Li *et al.*, 2021]. La estimulación con el péptido quelante de hierro 4429 a 60 μ M fue la único en la que provocó un efecto significativo en iNOS, siendo este una regulación a la baja. De forma similar, Fang *et al.* [Fang *et al.*, 2024], observó un aumento en la expresión de iNOS por una sobrecarga de hierro en células RAW264,7, efecto que no fue evidenciado en presencia de quelantes de hierro luego del mismo tratamiento con hierro, lo que puede implicar que el aumento o la disminución en la expresión de *inos* está vinculada al hierro libre intracelular.

La citoquina IL-1 β en teleósteos es secretada por diferentes tipos celulares, funcionando como promotora de las funciones antimicrobianas en la inflamación aguda temprana en macrófagos clásicamente activados a través de la señalización por la vía de NF- κ B, regulando al alza otras citoquinas proinflamatorias [Soliman y Barrera, 2023]. Además, la citoquina IL-1 β gatilla la

respuesta inmune proinflamatoria, entre la cual se encuentra la producción de iNOS en diversos tipos celulares [Kim *et al.*, 2008, Beauregard *et al.*, 2003, Adams *et al.*, 2002]. De tal manera, en todas las inducciones con los péptidos preseleccionados se observó una tendencia a la disminución de los niveles de mRNA de *il1b*, o se mantuvieron cercanos al del control, mientras que los péptidos 4429, 4430, y 4444 provocaron una reducción significativa en la expresión. No obstante, a pesar de que se observó una correlación negativa entre la expresión de *inos* e *il1b* en los HKL estimulados con el péptido 4444 a 60 μ M, ambos marcadores se mantuvieron por debajo de la expresión del grupo control.

Por otra parte, IFN- γ es una de las citoquinas encargadas de orquestar la respuesta inmune proinflamatoria a través de la activación de macrófagos, inducción de quimiocinas, inhibición de la proliferación celular, y la inhibición de la autofagia [Pereiro *et al.*, 2019]. Los 5 péptidos preseleccionados provocaron un aumento significativo en la expresión de *ifny*, lo que permitiría inferir que al menos a nivel de transcritos estarían gatillando una respuesta proinflamatoria. Además, *ifny* fue el marcador más sobreexpresado en las células estimuladas con los péptidos 4426, 4429, 4430, y 4448. Otros autores han demostrado el efecto de tratamientos IFN- γ recombinante en la regulación al alza de *il1b*, *ifny*, *tnfa*, e *inos*, y en el aumento de la producción de NO [Jung *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2017]. No obstante, en este trabajo se observó una correlación negativa entre *ifny* e *inos* en los HKL inducidos con los péptidos 4448 y 4430, y ninguna correlación positiva entre *ifny* con *il1b* o *inos* en todas las respuestas de HKL inducidos con los péptidos sintéticos preseleccionados. Considerando que otros autores observaron que los tiempos de respuesta en el aumento de expresión de *inos* e *il1b* en otros modelos fue de entre 6 horas y 24 horas [Jung *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2017], al igual que el tratamiento en este trabajo, y la disminución de la expresión de *il1b* en todos los leucocitos de riñón anterior estimulados con los péptidos preseleccionados, puede ser que *ifny* se esté expresando solo a nivel de mRNA y no como proteína. En sistemas biológicos complejos, incluyendo la respuesta inmune de teleósteos, la correlación entre los niveles de transcripción y la abundancia de la proteína funcional no siempre es directa, estando sujeta a mecanismos de regulación post-transcripcional, tasas de recambio proteico y estabilidad del ARN mensajero. Por lo tanto, los resultados serán validados a través de técnicas a nivel de proteínas en una etapa posterior.

Considerando que los péptidos sintéticos seleccionados serían utilizados en salmónidos como aditivos alimentarios, evitar la activación de los componentes proinflamatorios sin la presencia de un patógeno es un comportamiento ideal, ya que podría generar otras complicaciones biológicas. Por tal motivo, el péptido 4429 fue seleccionado como aditivo alimentario por su capacidad de disminuir la expresión de los marcadores proinflamatorios *inos* e *il1b*, lo cual no se observó en los HKL inducidos con el péptido quelante de hierro 4448.

El segundo grupo de genes evaluados corresponden a receptores involucrados en la inmunidad innata pertenecientes a los receptores de reconocimientos de patrones (PRRs), en los que se encuentran el receptor tipo dominio tipo oligomerización por unión de nucleótidos (NOD) con dominio de reclutamiento y activación de caspasas (CARD) 3 (NLRC3), y el receptor tipo NOD con dominio de reclutamiento y activación de caspasas 5 (NLRC5). En estudios realizados en NLRC3 de peces, se ha observado la sobreexpresión de NLRC3 frente a LPS, TNF- α , IL-1 β , y desafíos bacterianos [Álvarez *et al.*, 2017, Gao *et al.*, 2018], y su efecto en la represión de las vías de señalización proinflamatorias de NF- κ B y en la expresión de IL-1 β , facilitando el crecimiento bacteriano y su diseminación [Fang *et al.*, 2020]. Por otra parte, en mamíferos la expresión de NLRC3 se ha vinculado directamente con una disminución de la respuesta inflamatoria [Gültekin y Eren, 2023, Schneider *et al.*, 2012], y se estima que es el encargado de evitar la inflamación en condiciones basales. En este trabajo, los péptidos antioxidantes 4426, 4430, y 4444, y el péptido quelante de hierro 4448 provocaron un aumento en la expresión de *nlr3*, lo cual basado en el concepto de represión de la inflamación de NLRC3, los HKLs podrían estar gatillando una respuesta proinflamatoria, la cual sería inhibida por *nlr3*. Como soporte de la teoría anterior, se observaron correlaciones entre *nlr3* e *il1b* en los péptidos 4426 y 4444, y una correlación negativa entre *nlr3* e *ifn γ* en el péptido 4430, implicando que los perfiles de respuesta están vinculados entre sí. Por otra parte, NLRC5 es considerado como un transactivador específico de los genes MHC de clase I en mamíferos, siendo sobreexpresado en presencia de IFN γ , IFN β , PAMPs, e infecciones virales [Kobayashi y Elsen, 2012]. De forma similar, NLRC5 ha sido caracterizado en peces, en donde se ha destacado su rol en la respuesta viral dependiente de IFN, y siendo sobreexpresado en presencia de infecciones virales y bacterianas [Álvarez *et al.*, 2017, Pontigo *et al.*, 2016, Wu *et al.*, 2017]. La inducción con los péptidos preseleccionados en HKLs no indujo cambios significativos en la expresión de *nlr5* a ninguna de las concentraciones evaluadas. En consideración de lo presentado, la capacidad de regular al alza *nlr3* a nivel de mRNA es una característica positiva para su uso como aditivo

alimentario, ya que es un indicativo de que los péptidos 4426, 4430, y 4448 están provocando una respuesta proinflamatoria que es inhibida por NLRC3 al no haber un mayor estímulo presente, lo cual podría no ser el caso frente a una infección bacteriana, en donde el posible efecto proinflamatorio de los péptidos podría dar lugar a una mayor supervivencia. No obstante, la hipótesis anterior debe ser validada con futuros ensayos de expresión de NLRC3 a nivel de transcritos y de proteína en un desafío bacteriano. Además, a pesar de que un aumento en *nlrc5* hubiese indicado un posible efecto protector de los péptidos preseleccionados frente a infecciones virales y eso hubiese ampliado el espectro de uso de los péptidos como aditivos alimentarios, al estar enfocados al aumento de resiliencia a *P. salmonis* el no modular la expresión de *nlrc5* no genera una desventaja.

Finalmente, el último grupo de marcadores del sistema inmune innato analizados fueron el receptor de tipo Toll 5 (TLR5), y el receptor de tipo Toll 9 (TLR9), también pertenecientes al grupo de los PRRs [Medzhitov y Janeway, 2000]. Los receptores de tipo Toll son considerados los principales sensores de PAMPs y son expresados en variados tipos de células, siendo TLR5 capaz de sensor flagelos de bacterias tanto a nivel intracelular como extracelular [Guo *et al.*, 2014, Carrizo *et al.*, 2021, Tsujita *et al.*, 2004], mientras que TLR9 detecta ácidos nucleicos de bacterias y virus [Blasius *et al.*, 2010, Valenzuela *et al.*, 2017]. Por tales motivos, un aumento en la expresión de TLR5 y TLR9 podría mejorar la capacidad de respuesta de los salmónidos frente a *P. salmonis*, siendo este un efecto deseado para el presente estudio. Por consiguiente, el aumento en la expresión de *tlr5* y *tlr9* provocado por la inducción del péptido antioxidante 4426, en conjunto con su capacidad de modular de *il1b*, *nlrc3*, *ifny* e *inos*, fueron los factores decisivos para ser seleccionado para su aplicación como aditivo alimentario.

En consideración de los resultados obtenidos en la estimulación de la línea celular RTS-11 y el objetivo de mejorar la resistencia al SRS en salmón del Atlántico, es necesario destacar que, aunque trucha arcoíris (organismo originario de la línea celular RTS-11) y salmón del Atlántico son modelos de estudio consolidados en teleósteos, estos son géneros diferentes dentro del grupo de los salmónidos. No obstante, se ha demostrado que la inmunidad innata en teleósteos se encuentra altamente conservada, incluyendo la función y estructura de los PRRs. Particularmente en el linaje de los salmónidos, existe una relación de ortología y cercanía filogenética mayor en moléculas clave de reconocimiento celular (TLR5, TLR9, entre otras) que

en las observadas entre otras familias de teleósteos, en conjunto con capacidad fagocítica similares en presencia de patógenos [Palti, 2011, Salazar *et al.*, 2016, Jiang *et al.*, 2015b, Yañez *et al.*, 2024]. Esta conservación estructural y funcional se sustenta en la historia evolutiva y los eventos de duplicación genómica compartidos por ambas especies [Palti, 2011]. Por lo tanto, incluso frente a las divergencias interespecíficas posibles en ciertas respuestas inmunes, el enfoque exclusivo de esta investigación en la modulación de la inmunidad innata permite establecer una base biológica extrapolable entre ambos modelos de salmónidos.

En los últimos años, diferentes estudios han establecido una conexión entre la suplementación de hierro y su biodisponibilidad con un incremento en parámetros de crecimiento en peces [Afshari *et al.*, 2021, Evliyaoğlu *et al.*, 2022, He *et al.*, 2023, Mao *et al.*, 2024, Thangapandiyar *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2023, Zafar y Khan, 2020]. Previamente al desarrollo del desafío piloto de alimentación, no existían datos en publicaciones académicas que comparasen las diferencias de los efectos de péptidos quelantes de hierro, antioxidante, y una mezcla de ambos como aditivos alimentarios para salmónidos en parámetros de crecimiento y en la modulación de marcadores del sistema inmune innato. Sin embargo, no se utilizaron replicas tanto para los estanques de las dietas experimentales como para el control, lo que dificulta la inferencia estadística de los efectos de las dietas experimentales en parámetros de crecimiento como el SGR y el FCR. No obstante, los valores presentados están basados en el peso de todos los peces de cada estanque, contando con 38 mediciones por cada condición. Con respecto a los parámetros de crecimiento, no se encontraron diferencias en los salmones alimentados con AD en comparación al grupo control, ya que ambos presentaron valores similares de peso, talla, número de eritrocitos, FCR, SGR, y ganancia de peso corporal. Por otra parte, los peces de los grupos ID y AID presentaron un valor de SGR mayor que el de los grupos de CD y AD, y muy similar entre ellos, ya que sus pesos iniciales y finales también son cercanos. Aún más, el valor de FCR en el grupo AID es más distante del grupo CD que el de ID. Adicionalmente, tanto en ID como en AID el peso y la talla aumentaron de forma significativa en comparación al grupo control, al incrementar la biodisponibilidad del hierro por efecto de los péptidos quelantes de hierro, y no por un efecto antioxidante, permite un mayor aumento de peso y talla en salmones del Atlántico. Finalmente, aunque se han observado diferencias significativas entre los grupos alimentados con las dietas experimentales y el grupo control, permitiendo inferir que los péptidos son biodisponibles en base a los efectos diferenciales, se realizará como parte de un próximo estudio ensayos de liberación de péptido *in vitro* que busquen simular las condiciones gástricas en salmón del Atlántico.

Los parámetros hematológicos son considerados como un indicativo de la salud general en peces [Lee., 2023, Pastorino *et al.*, 2020]. Luego del desafío piloto de alimentación, los salmones del Atlántico alimentados con ID presentaron el mayor número de eritrocitos, incluso cuando AID demostró la mayor eficiencia de crecimiento. Estos resultados se alinean con otros estudios, donde el hierro suplementado también mejoró parámetros hematológicos en otros modelos [Huang *et al.*, 2023, Thangapandiyan *et al.*, 2020] sugiriendo que la concentración del péptido 4429 es demasiado baja en AID en comparación con ID para ejercer un incremento en el número de eritrocitos, y que la actividad antioxidante no presenta actividad significativa en el aumento de eritrocitos.

Con la finalidad de determinar el efecto de los péptidos sintéticos en marcadores del sistema antioxidante, la homeostasis del hierro, y el sistema inmune innato, se evaluó la diferencia en la expresión de estos en hígado y bazo. El hígado es un órgano que cumple diversas funciones, entre las cuales se destaca la capacidad de detectar los niveles de hierro en tejidos y plasma, metabolismo de carbohidratos y lípidos, alta actividad antioxidante, y actividad inmunitaria [Enes *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2024, Li *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2019]. Por otra parte, el sistema antioxidante enzimático en peces es el encargado de evitar el daño celular generado por ROS, para lo cual utiliza enzimas tales como Cu/Zn Superóxido dismutasa (SOD1) y glutatión peroxidasa (GPX), las que se encargan de la dismutación al anión superóxido a peróxido de hidrógeno y de la conversión de peróxido de hidrógeno a agua, respectivamente [Martínez-Álvarez *et al.*, 2015]. En este trabajo, los salmones del grupo ID presentaron una disminución significativa en la expresión de *sod1*, mientras que en los peces del grupo AID se observó una expresión significativamente reducida de *gpx*, ambas en comparación al grupo CD. A pesar de que SOD1 es considerado un marcador del estrés oxidativo [Yoo *et al.*, 1999], el grupo AD que fue alimentado con la mayor cantidad péptidos antioxidantes no generó una reducción significativa en la expresión de *sod1* o de *gpx*. La expresión de enzimas antioxidantes como SOD1 y GPX está dirigida por Nrf2, el cual es considerado el interruptor maestro en la señalización antioxidante celular y en la expresión de dichos genes [Jiang *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2024]. En una investigación utilizando macrófagos de bagre amarillo, He *et al.* [He *et al.*, 2024] demostró el efecto de la adición de hierro en el aumento en la producción de ROS y en la expresión de SOD1 y Nrf2. Además, la expresión de enzimas antioxidantes puede aumentar en presencia de iones metálicos que pueden provocar el aumento de los niveles de ROS, tales como el hierro, por la existencia de elementos de respuesta a metales [Zelko, 2002]. Por tal motivo, estos resultados

sugieren que la reducción en la expresión de *sod1* se debe a la disminución de hierro libre intracelular por el efecto quelante de hierro de la dieta ID. Por otra parte, la disminución de los niveles de mRNA de *gpx* puede ser por un efecto sinérgico entre los péptidos antioxidantes y quelantes de hierro, o por un efecto de la disminución en la concentración el péptido quelante de hierro en comparación a ID. No obstante, se requiere más investigación para demostrar la inferencia anterior

La hepcidina es un péptido antimicrobiano que a su vez funciona como un péptido-hormona a cargo de mantener la homeostasis del hierro a nivel sistémico al limitar la capacidad de transporte de hierro al medio extracelular, por lo que su expresión puede ser regulada tanto por un aumento en los niveles de hierro como por infección de patógenos, siendo esta expresada principalmente en el hígado [Nemeth y Ganz, 2006, Pan *et al.*, 2023, Wang *et al.*, 2019]. Interesantemente, no se observaron cambios significativos en la expresión de *hep*. Sin embargo, si se observó una tendencia a un aumento en la expresión de *hep* en el hígado de los peces alimentados con ID y AID, lo que indicaría que el hígado podría estar respondiendo a un aumento de hierro a través de la limitación de su transporte hacia el plasma.

De forma similar a lo observado en las pruebas realizadas en RTS-11 con los péptidos seleccionados, y a pesar de que no se evidenció un efecto significativo, los niveles de mRNA de *il1b* fueron inferiores a los del grupo CD en todas las muestras de hígado de los salmones alimentados con AD, ID, y AID, indicando una posible tendencia. Tal como se ha comentado anteriormente, la disminución de la expresión de este marcador de inflamación es un resultado buscado para un aditivo alimentario, ya que evitar la inflamación en ausencia de una infección de patógenos (inflamación estéril) es importante para la salud y el bienestar en los peces.

Por otra parte, el bazo en peces es un órgano linfoide periférico mayor, el cual contiene colecciones de linfocitos, macrófagos, y células dendríticas [Zapata, 2024]. A pesar de que se evaluaron marcadores del sistema inmune innato pertenecientes a diferentes grupos tales como la respuesta proinflamatoria (*ifny*, *il1b*, y *tnfa*), la respuesta antiinflamatoria (*il4/13a*, *il10*, *arg*, y *tgfb*), y péptidos de defensa del huésped (*cath* y *hep*), solo se identificó un efecto significativo en la disminución de la expresión de *tnfa* en el grupo AID. Por lo tanto, estos resultados sugieren

que al menos fuera del marco de una infección, los péptidos sintéticos 4426 y 4429 como aditivos alimentarios no alteran significativamente la homeostasis inmune en bazo de salmones del Atlántico, lo cual es de importancia en un aditivo alimentario, ya que la modificación de la homeostasis inmune puede generar patologías en diferentes tejidos [Bentley y Little, 2021, Emanuel *et al.*, 2024, Liu *et al.*, 2023, Xie *et al.*, 2024].

Para evaluar la capacidad de las dietas experimentales de modular la respuesta inmune innata a nivel de transcritos frente a *P. salmonis*, se estableció un cultivo primario de HKL a partir de salmones del Atlántico al final del desafío piloto de alimentación, el cual fue estimulado con *P. salmonis* inactivada. Además, para identificar la existencia de diferencias entre la respuesta inmune innata, las estimulaciones se llevaron a cabo con los genogrupos LF-89, EM-90, y una mezcla de ambas a la misma concentración, todos estandarizados por proteínas totales.

Interleuquina -1β e iNOS son marcadores de respuesta inflamatoria del sistema inmune innato los cuales son expresados en respuesta a infecciones de patógenos [Soliman y Barreda, 2023, Grayfer *et al.*, 2018]. De forma similar, IL-8 (también llamada CXCL8) es una citoquina quimioatrayente y un mediador de la respuesta proinflamatoria que es expresada en peces durante infecciones bacterianas [Sigh *et al.*, 2004, Montero *et al.*, 2008]. Previa a la estimulación con *P. salmonis* inactivada, no se encontraron efectos significativos en los HKL provenientes de peces alimentados con dietas experimentales en comparación al grupo control. Considerando lo anterior, ya que *il1b*, *inos*, e *il8* no fueron sobreexpresados, los péptidos sintéticos no están causando un efecto proinflamatorio por la vía IL- 1β en ausencia de un estímulo bacteriano, lo cual es una característica importante en los aditivos alimentarios, ya que la inflamación fuera de la infección de patógenos o la inflamación crónica pueden afectar negativamente la salud de los peces [Rossi *et al.*, 2020, van Doan *et al.*, 2023]. A pesar de que no se observaron diferencias significativas en *il1b* e *inos* entre las dietas experimentales y el grupo CD luego de la estimulación con *P. salmonis*, si se evidenció un aumento significativo en la expresión de estos marcadores en relación con su control sin estimular, lo cual no ocurrió en el grupo CD, implicando una posible sensibilización del sistema inmune o priming. Adicionalmente, la sobreexpresión de *il8* luego de la estimulación con *P. salmonis* LF-89 inactivada observada en los grupos ID y AID en comparación con CD fue probablemente a causa del incremento en la biodisponibilidad del hierro, ya que se ha demostrado una relación similar entre la expresión relativa de *il8* y el hierro dietario

en carpa herbívora infectada con *Flavobacterium columnare* [Guo *et al.*, 2018]. Por otra parte, se establecieron correlaciones positivas entre *il1b* e *il8* en todos los grupos luego de la estimulación con *P. salmonis* inactivada, lo que implicaría que los HKL están respondiendo a los PAMPs con un perfil proinflamatorio de forma independiente de los péptidos como aditivos alimentarios, pero la potencia de esa respuesta incrementa luego de la ingesta de las dietas experimentales.

Las superóxido dismutasas (SODs) son una familia de enzimas antioxidantes altamente presentes en un amplio rango de tejidos en peces teleósteos que disminuyen el daño provocado por ROS a través de la dismutación de radicales superóxido [Sirisena *et al.*, 2023]. Otros estudios en modelos diferentes al salmón del Atlántico han demostrado que *sod1* puede ser sobreexpresada con estimulación de LPS y bacteriana [Yoo *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2016]. Sin embargo, en este trabajo los niveles de *sod1* del grupo CD luego de la estimulación con *P. salmonis* inactivada permanecieron sin cambios significativos. Por otra parte, considerando que en el grupo AID se observaron niveles de mRNA de *sod1* reducidos luego de la estimulación con *P. salmonis* EM-90, esto podría deberse a la disminución del estrés oxidativo provocado por el péptido antioxidante, ya que SOD1 es considerado un indicador de estrés oxidativo [Li 2019, Yoo *et al.*, 1999]. Sin embargo, considerando que en el grupo AD no se observó el mismo efecto en *sod1*, no es posible inferir si es un efecto debido a una baja concentración del péptido 4426 en AID o una sinergia entre los péptidos antioxidantes y quelantes de hierro en el mismo grupo.

Las catelicidinas son un grupo de péptidos de defensa del huésped catiónicos cortos que actúan como la primera defensa del sistema inmune innato en respuesta a PAMPs e infecciones bacterianas con un amplio rango de actividad antimicrobiana e inmunomoduladora [Leite *et al.*, 2023, Santana *et al.*, 2016]. Considerando que las tres dietas experimentales incrementaron significativamente los niveles de mRNA de *cath2* luego del estímulo, y los HKL del grupo CD no presentaron un aumento significativo, es posible establecer que los péptidos sintéticos están incrementando la potencia de la respuesta del sistema inmune innato frente a los PAMPs de *P. salmonis*. Además, se observó una fuerte correlación de *cath2* con *il8* y *sod1* en los grupos AD e ID, e *il1b* en todos los grupos pertenecientes a las dietas experimentales, sugiriendo que esta puede estar ejerciendo un efecto inmunomodulador, ya que otros estudios han determinado su capacidad de regular al alza IL-1 β , TNF- α , e IL-8 [Li *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2019].

Otro péptido de defensa del huésped evaluado en este estudio fue hepcidina, el cual funciona como un péptido-hormona a cargo de mantener la homeostasis del hierro a nivel sistémico, por lo que su expresión puede ser regulada tanto por un aumento en los niveles de hierro como por infección de patógenos [Shi y Camus, 2006, Nemeth y Ganz, 2006, Pan *et al.*, 2023]. Los niveles de *hep* aumentaron significativamente en HKL pertenecientes al grupo ID en la estimulación con el genogrupo LF-89 y el Mix en comparación, lo cual es atribuible a la capacidad de mejorar la biodisponibilidad del hierro de los compuestos quelantes de hierro [Cheng *et al.*, 2023]. Además, Evliyaoğlu *et al.* [Evliyaoğlu *et al.*, 2022] reportó un efecto similar en trucha arcoíris luego de suplementar su alimento con hierro, lo que produjo un aumento en la expresión de hepcidina. No obstante, incluso cuando en otros estudios se ha reportado la regulación al alza de *hep* luego de desafíos bacterianos o estimulaciones con PAMP en otros modelos [Liu *et al.*, 2023, Yin *et al.*, 2022], en este trabajo no se observó un incremento significativo en los niveles de mRNA de *hep* en los HKL del grupo CD tanto antes como después de la estimulación en todos los grupos de *P. salmonis* inactivada. Adicionalmente, considerando que en el grupo AID no se presentó un efecto de modulación de *hep* con respecto al grupo AID sin estimular, pero si entre los grupos ID estimulados y no estimulados, nuevamente la diferencia de concentración de péptidos quelantes de hierro entre ID y AID podría estar afectando su respuesta.

Como parte de la respuesta inflamatoria, arginasa y TGF- β son marcadores del sistema inmune innato involucrados en la inmunosupresión y en el detrimento del rol de las citoquinas proinflamatorias, las cuales son inducidas frente a infección de patógenos [Schneider y Dy, 1985, Wei *et al.*, 2015]. De forma interesante, solo en el grupo AD se observó un efecto de regulación al alza en *arg1* en comparación a CD luego de la estimulación con *P. salmonis* LF-89 inactivada, mientras que únicamente en ID el marcador *tgfb1* fue sobreexpresado en la estimulación con el el genogrupo LF-89 y el Mix, permitiendo inferir que el grupo AID no presentó diferencias en la expresión de ambos genes nuevamente debido a la diferencia de concentración de péptidos quelantes de hierro en ambos grupos. Aún más, se ha demostrado que en branquia de carpa herbívora infectada con *F. columnare* el aumento del hierro dietario aumenta la expresión de *tgfb1* [Guo *et al.*, 2018], la cual podría ser una respuesta similar a la observada en el grupo ID luego de la estimulación. Incluso cuando no se encontraron diferencias significativas, los valores de las medias de *arg1* y *tgfb1* del grupo AID fueron notoriamente elevados previa a la estimulación en

comparación a las otras dietas experimentales y al control, descendiendo luego de la estimulación. Por otra parte, no existieron correlaciones negativas entre *il1b* y otro ningún gen analizado en esta investigación. A su vez, *inos* se correlacionó positivamente con *tgfb1* y *cath2* en los grupos AD, ID, y AID, y también se encontró una correlación positiva con *arg1* en AD e ID, implicando que los péptidos sintéticos quelantes de hierro y antioxidantes están favoreciendo una respuesta combinada proinflamatoria y antiinflamatoria a diferencia del grupo CD, donde se observa un patrón proinflamatorio único.

Se observaron diferencias en los marcadores del sistema inmune innato de los HKLs entre genogrupos o el Mix de *P. salmonis* inactivada. De forma interesante, estas diferencias en la respuesta a genogrupos específicos se presentaron solo en los peces alimentados con las dietas experimentales, implicando que aquellos péptidos están mejorando respuestas inmunes frente a PAMPs específicos de genogrupos de *P. salmonis*, lo cual se alinea con otras investigaciones donde comparan las respuestas diferenciales del sistema inmune entre a cada uno de esos genogrupos y la co-infección [Rozas-Serri *et al.*, 2023, Saavedra *et al.*, 2017]. Aún más, considerando que la distribución espacio-temporal de las infecciones de ambos genogrupos de *P. salmonis* ha demostrado variación en la acuicultura [Rozas-Serri *et al.*, 2023, Saavedra *et al.*, 2017, McCarthy *et al.*, 2008], si las diferencias en las respuestas de los HKLs causadas por las dietas experimentales pudiesen ser emuladas en un desafío *in vivo*, las combinaciones de péptidos sintéticos quelantes de hierro y antioxidantes como aditivos alimentarios podrían ser utilizados como un tratamiento para genogrupos específicos o para co-infección, según sea el caso en donde estos sean más efectivos. Por otra parte, es necesario señalar que, aunque las concentraciones de ambos genogrupos de *P. salmonis* inactivada fueron estandarizadas por proteínas totales, esta aproximación metodológica incluye una fuente de variabilidad potencial, ya que la normalización por biomasa no asegura la equivalencia estequiométrica en concentración de PAMPs entre los genogrupos de *P. salmonis*, lo que podría afectar los resultados obtenidos al comparar el efecto entre genogrupos y su extrapolación a condiciones con *P. salmonis* nativa. Sin embargo, dado que las diferencias significativas se concentraron específicamente al comparar el tratamiento combinado (Mix) frente a cada genogrupo individual, y no entre genogrupos individuales, representa el efecto de la sustitución estequiométrica de la mitad de la biomasa por el genogrupo homólogo, lo que permite inferir un comportamiento de reconocimiento inmune combinado o sinergia antigénica.

Adicionalmente, existe una diferencia entre las pruebas con *P. salmonis* inactiva y nativa debido a la capacidad de *P. salmonis* de evadir las respuestas del sistema inmune durante la infección del huésped, lo que podría dificultar la extrapolación del modelo *in vitro* a *in vivo* [Rozas-Serri *et al.*, 2023]. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que la activación de tanto la respuesta inmune como la inmunidad nutricional pueden ser evaluadas tanto en *P. salmonis* inactivada como nativa, ya que en ambos sistemas la respuesta fue similar [Martínez *et al.*, 2023], lo que apoya los descubrimientos de este trabajo y su futura aplicación. Los resultados obtenidos en la etapa de desafío de alimentación en agua dulce y la estimulación *in vitro* con PAMPs de *P. salmonis* fueron realizados utilizando una sola concentración de péptidos sintéticos como aditivos alimentarios de 150 µg/kg, en conjunto con 75 µg/kg de cada péptido en el grupo AID. Este enfoque fue planteado como base para un primer acercamiento, fundamentado por investigaciones previas con péptidos como aditivos alimentarios (Datos no publicados). Sin embargo, en consideración de la dependencia de la respuesta inmunitaria a las dosis de péptidos sintéticos [Rashidian *et al.*, 2021, Cai *et al.*, 2022, Chiou *et al.*, 2006], se realizará una evaluación posterior utilizando al menos tres niveles de inclusión por cada dieta.

Con el propósito de robustecer el alcance de estos hallazgos y abordar las limitaciones inherentes al diseño principal respecto a la falta de análisis *in vivo* con *P. salmonis* nativa, se condujeron ensayos complementarios. Estos resultados, presentados en detalle en el Anexo 10.4, permiten validar el efecto inmunomodulador de la dieta experimental ID en condiciones de infección por cohabitación, lo cual se observa a través del aumento significativo de la expresión de *il1b* e *il10* en riñón anterior y bazo en relación con el grupo CD. Esta combinación de modulación de la expresión fue solo observada en el grupo ID, indicando una respuesta coordinada más potente en presencia de *P. salmonis* LF-89. El objetivo principal de la respuesta proinflamatoria es eliminar patógenos en el sitio de infección, lo que involucra la liberación de citoquinas proinflamatorias [Soliman y Barreda, 2023]. Sin embargo, un estado de inflamación no controlado puede provocar daño en tejido, inflamación estéril, enfermedades crónicas, e incluso la muerte [Campos-Sánchez y Esteban, 2020]. Por lo tanto, la regulación al alza de *il10* en conjunto con *il1b* implicaría una respuesta más potente contra el patógeno, pero a la vez menos dañina para el huésped. Aún más, la evaluación de la prevalencia de infección por *P. salmonis* LF-89 refuerza los resultados transcripcionales, no encontrándose prevalencia del patógeno en riñón anterior de salmones del Atlántico en el grupo ID en comparación al grupo CD, la cual no fue significativa en bazo e hígado. Esta diferencia en la prevalencia entre los diferentes tejidos del grupo ID podría

estar relacionada con la función de cada órgano, siendo el riñón anterior el encargado de las respuestas tempranas y rápida producción de leucocitos [Tacchi *et al.*, 2011, Soliman y Barreda, 2023, Iliev *et al.*, 2013].

CAPÍTULO VI: Conclusión

Los péptidos sintéticos como aditivos alimentarios, específicamente los grupos alimentados con péptidos quelantes de hierro y la mezcla de péptidos antioxidantes y quelantes de hierro, mejoraron significativamente el peso y talla de salmones del Atlántico luego de 28 días de alimentación en agua dulce, en conjunto una mejora en la media de parámetros de rendimiento de crecimiento. Adicionalmente, solo en el grupo alimentado con péptidos quelantes de hierro se observó un aumento significativo del número de eritrocitos.

Al analizar marcadores del sistema inmune innato y antioxidantes en salmones del Atlántico al final del desafío de alimentación, se evidenció que las dietas experimentales contenedoras de péptidos quelantes de hierro y mezcla entre péptidos antioxidantes y quelantes de hierro disminuyeron la expresión de *sod1* y *gpx* en el hígado de salmones del Atlántico, respectivamente, implicando una reducción del estrés oxidativo celular incluso en ausencia o con una menor concentración de péptidos antioxidantes en comparación al grupo suplementado con péptidos antioxidantes, que no presentó diferencias significativas.

Por otra parte, en bazo del grupo de la mezcla entre péptidos quelantes de hierro y antioxidantes se observó una regulación a la baja de *tnfa*, siendo esta la única diferencia significativa directamente relacionada a la inmunidad en las dietas experimentales. Luego de la estimulación con *P. salmonis* inactivada, las dietas experimentales provocaron un efecto de inmunomodulación de marcadores del sistema inmune en innato en HKLs, tales como *arg1*, *sod1*, e *il8*, y mejorando la respuesta a genogrupos específicos de *P. salmonis* inactivada o a la mezcla de ambas.

Finalmente, la expresión transcripcional de *il10* e *il1b* aumentó en riñón anterior y bazo en el grupo suplementado con el péptido quelante de hierro durante el desafío de infección por cohabitación, en adición a la disminución de prevalencia de *P. salmonis* LF-89.

Colectivamente, estos resultados demuestran el potencial de los péptidos sintéticos antioxidantes y/o quelantes de hierro como aditivos alimentarios para mejorar la respuesta inmune de salmón del Atlántico frente a *P. salmonis* en conjunto con un aumento de peso, talla, y parámetros de eficiencia productiva. Sin embargo, para validar esta potencial actividad se deberá realizar posteriormente un desafío de supervivencia *in vivo* de salmones del Atlántico contra *P. salmonis*, lo que permitirá demostrar si esta modulación transcripcional también se expresa a nivel fenotípico y que genera un aumento en la supervivencia contra *P. salmonis*.

CAPÍTULO VII: Nomenclatura

AD: Dieta contenedora del péptido sintético antioxidante 4426

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AID: Dieta contenedora de los péptidos sintéticos quelante de hierro 4429 y antioxidante 4426

ANOVA: Análisis de la varianza

Arg1: Arginasa 1

ARN: Ácido ribonucleico

BWG: Aumento de masa corporal

CARD: Dominio de reclutamiento y activación de caspasas

CAT: Catalasa

CD: Dieta control

CN: Control negativo

CSF-1: Factor estimulante de colonias 1

DAMP: Patrón molecular asociado al peligro

DMT1: Transportador de metales divalentes-1

DOT: 2,2-(etilendioxi)dietanotiol

FCR: Razón de conversión de alimento

FI: Ingesta de alimento

FPN1: Ferroportina 1

FtH: Subunidad H de ferritina

FtL: Subunidad L de ferritina

FtM: Subunidad M de ferritina

GPx: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación

GSSG: Glutación disulfuro

GSS: Glutación transferasa

GST: Glutación S-transferasa

HAT: Transferencia de átomo de hidrógeno

Hep: Hepcidina

HKL: Leucocito de riñón anterior

hpe: Horas post-estimulación

ID: Dieta contenedora del péptido sintético quelante de hierro 4429

IFN- γ : Interferon γ

IL-1 β : Interleuquina-1 β

IL-4: Interleuquina-4

IL-8: Interleuquina-8

IL-10: Interleuquina-10

IL-13: Interleuquina-13

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IRE: Elemento de respuesta al hierro

IRP: Proteína reguladora de hierro

Keap1: Proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch

MRE: Elemento de respuesta a metales

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NLRC3: Receptor de tipo NOD con dominio CARD 3

NLRC5: Receptor de tipo NOD con dominio CARD 5

NNV: Virus de necrosis nerviosa

NO: Óxido Nítrico

NOD: Dominio tipo oligomerización por unión de nucleótidos

NOX: NADPH oxidasa

Nrf2: Factor nuclear eritroide similar al factor 2

PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones

PRx: Peroxidasa tiorredoxina

RFU: Unidades fluorescentes relativas

RIG-1: Gen inducible por ácido retinoico 1

RLR: Receptores similares a RIG-1

ROS: Especie reactiva de oxígeno

RTS-11: Rainbow trout spleen 11
SEM: Error estándar de la media
SET: Transferencia de electrón único
Srxn: Sulfirredoxina
SGR: Velocidad de crecimiento específico
SOD: Superóxido dismutasa
SOD1: Superóxido dismutasa 1
SRS: Síndrome rickettsial de salmónidos
TE: Equivalente Trolox
Tf: Transferrina
TfR: Receptor de transferrina
TGF- β : Factor de crecimiento transformante β
TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante β 1
T_H1: Células T helper 1
T_H2: Células T helper 2
TIS: Triisopropilsilano
TLR5: Receptor de tipo Toll 5
TLR9: Receptor de tipo Toll 9
Trx: Tiorredoxina
TrxR: Tiorredoxina reductasa
VPNI: Virus de la necrosis pancreática infecciosa
VSHV: Septicemia hemorrágica viral
XO: Xantina oxidasa

CAPÍTULO VIII: Referencias

Abdollahi-Mousavi, S. E., S. Keyvanshokoo, M. T. Mozanzadeh y A. Ghasemi. 2024. Efficacy of nutritional selenium nanoparticles on growth performance, immune response, antioxidant capacity, expression of growth and immune-related genes, and post-stress recovery in juvenile Sobaity seabream (*Sparidentex hasta*). *Fish Shellfish Immunol.* (147): 109452.

Abele, D. y S. Puntarulo. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol.* (138): 405-415.

Abeynayake, R., S. Zhang, W. Yang y L. Chen. 2022. Development of antioxidant peptides from brewers' spent grain proteins. *LWT* (158).

Abrescia, P., L. Treppiccione, M. Rossi y P. Bergamo. 2020. Modulatory role of dietary polyunsaturated fatty acids in Nrf2-mediated redox homeostasis. *Prog. Lipid Res.* (80): 101066.

Adams, V., B. Nehrhoff, U. Späte, A. Linke, P. C. Schulze, A. Baur, S. Gielen, R. Hambrecht y G. Schuler. Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1 β and NF- κ B activation: an in vitro and in vivo study *Cardiovasc. Res.* (1): 95-104.

Afshari, A., I. Sourinejad, A. Ghareaei, S. A. Johari y Z. Ghasemi. 2021. The effects of diet supplementation with inorganic and nanoparticulate iron and copper on growth performance, blood biochemical parameters, antioxidant response and immune function of snow trout *Schizothorax zarudnyi* (Nikolskii, 1897). *Aquaculture* (539): 736638.

Agrawal H., R. Joshi y M. Gupta. 2016. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate. *Food Chem.* (204): 365–372.

Agrawal H., R. Joshi y M. Gupta. 2019. Purification, identification and characterization of two novel antioxidant peptides from finger millet (*Eleusine coracana*) protein hydrolysate. *Food Res. Int.* (120): 697–707.

Álvarez, C.A., F. A. Gomez, L. Mercado, R. Ramírez y S. H. Marshall. 2016. Piscirickettsia salmonis Imbalances the Innate Immune Response to Succeed in a Productive Infection in a Salmonid Cell Line Model. *Plos One* (10): e0163943.

Álvarez, C. A., F. Ramírez-Cepeda, P. Santana, E. Torres, J. Cortés, F. Guzmán, P. Schmitt y L. Mercado. 2017. Insights into the diversity of NOD-like receptors: Identification and expression analysis of NLRC3, NLRC5 and NLRX1 in rainbow trout. *Molecular Immunology* (87): 102-113.

Álvarez, C.A., P. A. Santana, N. Salinas-Parra, D. Beltrán, F. Guzmán, B. Vega, F. Acosta y L. Mercado. 2022. Immune Modulation Ability of Hecpidin from Telost Fish. *Animals* (12): 1586.

Arbour, A. C., L. G. Mendoza y J. L. Stockdill. 2020. Recent Advances in the Synthesis of C-Terminally Modified Peptides. *Org. Biomol. Chem.* (37).

Askarian, F., Z. Zhou, R. E. Olsen, S. Sperstad y E. Ringø. 2012. Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture*: 326-329.

Aslani, B. A. y S. Ghobadi. 2016. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci.* (146): 163-173.

Bahn, S., L. Wiens, E. Sotiri, J. R. Treberg. 2016. Mitochondrial reactive oxygen species production by fish muscle mitochondria: Potential role in acute heat-induced oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* (191): 99-107.

Beauregard, C., P. C. Brandt y G. C. Y. Chiou. 2003. Induction of nitric oxide synthase and over-production of nitric oxide by interleukin-1 β in cultured lacrimal gland acinar cells. *Exp. Eye Res.* (77): 109-144.

Bentley, E. R. y S. R. Little. 2021. Local delivery strategies to restore immune homeostasis in the context of inflammation. *Adv. Drug Delivery Rev.* (178): 113971.

Bhat, R. A. H., D. Thakuria, R. S. Tandel, V. C. Khangembam, P. Dash, G. Tripathi y D. Sarma. 2022. Tools and techniques for rational designing of antimicrobial peptides for aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* (127): 1033-1050.

Biller-Takahashi, J. D., L. S. Takahashi, F. E. Mingatto y E. C. Urbinati. 2015. The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piraractus mesopotamicus*. *Fish Shellfish Immunol.* (47): 360-367.

Blasius, A. L. y Bruce Beutler. 2010. Intracellular Toll-like Receptors Immunity (32):305-315.

Brown, T.D., T.S. Hori, X. Xue, C.L. Ye, D.M. Anderson y M.L. Rise. 2016. Functional Genomic Analysis of the Impact of Camelina (*Camelina sativa*) Meal on Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Distal Intestine Gene Expression and Physiology. *Mar. Biotechnol.* (18): 418-435. <https://doi.org/10.1007/s10126-016-9704-x>

Bury, N. R. y M. Grosell. 2003 a. Waterborne iron acquisition by a freshwater teleost fish, zebrafish, *Danio rerio*. *The journal of experimental biology.* (206): 3529-3535.

Bury, N. y M. Grosell. 2003 b. Iron acquisition by teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* (135): 97-105.

Caballero-Solares, A., J. R. Hall, X. Xue, K. Eslamloo, R. G. Taylor, C. C. Parrish y M. L. Rise. 2017. The dietary replacement of marine ingredients by terrestrial animal and plant alternatives modulates the antiviral immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.* (64): 24-38.

Cai, B., H. Chen, P. Wan, L. Luo, Z. Ye, J. Huang, D. Chen y J. Pan. (2022). Isolation and identification of immunomodulatory peptides from the protein hydrolysate of tuna trimmings (*Thunnus albacares*). *LWT* (164): 113614. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113614>.

Campos-Sánchez, J.C. y M.Á. Esteban. 2020. Review of inflammation in fish and value of the zebrafish model. *J. Fish Dis.* (44): 123-139. <https://doi.org/10.1111/jfd.13310>.

Canton, M., R. Sánchez-Rodríguez, I. Spera, F- C- Venegas, M. Favia, A. Viola y A. Castegna. 2021. Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Front. Immunol.* (12): 734229.

Cardoso M. A., H. M. R. Gonçalves y F. Davis. 2023. Reactive oxygen species in biological media are they friend or foe? Major In vivo and In vitro sensing challenges. *Talanta* (206): 124648.

Carrizo, V., C. A. Valenzuela, C. Aros, P. Dettleff, V. Valenzuela-Muñoz, C. Gallardo-Escarate, C. Altamirano, A. Molina, J. A. Valdés. 2021. Transcriptomic analysis reveals a *Piscirickettsia salmonis*-induced early inflammatory response in rainbow trout skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* (39): 100859.

Caruffo, M., D. Mandakovic, M. Mejías, I. Chávez-Báez, P. Salgado, D. Ortiz, L. Montt, J. Pérez-Valenzuela, F. Vera-Tamargo, J. M. Yáñez, J. Wacyk, R. Pulgar. 2020. Pharmacological iron-chelation as an assisted nutritional immunity strategy against *Piscirickettsia salmonis* infection. *Vet Res* (51).

Chen, C., A. Wang, F. Zhang, M. Zhang, H. Yang, J. Li, P. Su, Y. Chen, H. Yu y Y. Wang. The protective effect of fish-derived cathelicidins on bacterial infections in zebrafish, *Danio rerio*. *Fish Shellfish Immunol.* (92): 519-527.

Chen, H., J. Li, L. Yan, J. Cao, D. Li, G. Huang, W. Shi, W. Dong, J. Zha, G. Ying, H. Zhong, Z. Wang, Y. Huang, Y. Luo y L. Xie. 2020. Subchronic effects of dietary selenium yeast and selenite on growth performance and the immune and antioxidant systems in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* (97): 283-293.

Chen, N., M. Hu, T. Jiang, P. Xiao y J. Duan. 2024. Insights into the molecular mechanisms, structure-activity relationships and application prospects of polysaccharides by regulating Nrf2-mediated antioxidant response. *Carbohydr. Polym.* (333): 122003.

Cheng, X., Y. Chen, C. Cao, J. Ma, C. Zhang, Z. Zhao, Q. Wu, Y. Li, M. N. Muskat y G. Wu. 2023. Eijiao peptide-iron chelates regulate the metabolism of iron deficiency anemia mice and improve the bioavailability of iron. *Food Biosci.* (54): 102835.

Compra, M., X. Capó, C. Alomar, S. Deudero y A. Sureda. 2024. A meta-analysis of potential biomarkers associated with microplastic ingestion in marine fish. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (107): 104414.

Cooper, C. A. y N. R. Bury. 2007. The gills as an important uptake route for the essential nutrient iron in freshwater rainbow trout *Oncorhynchus Mykiss*. *J. Fish Biol.* (71): 115-128.

Culbert, B. M., S. E. Border, R. J. Fialkowski e I. Bolitho. 2023. Social status influences relationships between hormones and oxidative stress in cichlid fish. *Horm. Behav.* (152): 105365.

Dávalos, A., C. Gómez-Cordovés y B. Bartolomé. 2004. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *J. Agric. Food Chem.* (52): 48–54.

Debbarma, S., S. A. Narsale, A. Acharya, S. K. Singh, B. P. Mocherla, R. Debbarma e Y. Yirang. 2024. Drawing immune-capacity of fish-derived antimicrobial peptides for aquaculture industry: A comprehensive review. *Comparative Immunology Reports* (6): 200150.

Dettleff, P., C. Bravo, A. Patel y V. Martinez. 2015. Patterns of *Piscirickettsia salmonis* load in susceptible and resistant families of *Salmo salar*. *Fish Shellfish Immunol.* (45): 67-71.

Díaz R., J. Troncoso, E. Jakob y S. Skugor. 2021. Limiting access to iron decreases infection of Atlantic salmon SHK-1 cells with bacterium *Piscirickettsia salmonis*. *BMC Vet. Res.* (17).

Doan, H. V., P. Prakash, S. H. Hosseinifar, E. Ringø, E. El-Haroun, C. Faggio, R. E. Olsen, H. Q. Tran, V. Stejskal, H. M. R. Abdel-Latif y M. A. O. Dawood. 2022. Marine-derived products as functional feed additives in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports* (31): 101679.

Doyle, E. H., H. J. Vaughan y S. A. Mariani. 2024. From drosophila to humans: a journey through macrophage development. *Exp. Hematol. Today* (136): 104272.

Eide, L. H., B. Morales-Lange, R. V. Kuiper, O. B. Dale, S. D. C. Rocha, B. Djordjevic y M. Øverland. 2025. Fermented sunflower meal in diets for Atlantic salmon under commercial-like farming conditions promotes gut lactic acid bacteria and controls inflammation in the distal intestine. *Aquaculture* (595): 741517.

Emanuel, E., M. Arifuzzaman y D. Artis. 2024. Epithelial-neuronal-immune cell interactions: Implications for immunity, inflammation, and tissue homeostasis at mucosal sites. *J. Allergy Clin. Immunol.* (153): 1169-1180.

Enes, P., S. Panserat y S. Kaushik. 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol. Biochem.* (35): 519-539.

Esfandi, R., W. G. Willmore y A. Tsopmo. 2019. Antioxidant and Anti-Apoptotic Properties of Oat Bran Protein Hydrolyzates in Stressed Hepatic Cells. *Foods* (8): 160.

Esteban, M. A., E. Chaves-Pozo, M. Arizcun, J. Meseguer y A. Cuesta. 2013. Regulation of natural killer enhancing factor (NKEF) genes in teleost fish, gilthead seabream and European sea bass. *Molecular Immunology* (55): 275-282.

Evliyaoğlu, E., S. Kilercioğlu, H. A. Yilmaz, G. M. Turchini, M. Paolucci, T. D. Clark, I. Demirkale y O. T. Eroldoğan. 2022. Iron supplementation in plant-based aquafeed: Effects on growth performance, tissue composition, iron-related serum parameters and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* (15): 737884.

Fan, S., Q. Liu, Q. Du., X. Zeng., Z. Wu., D. Pan y M. Tu. 2024. Multiple roles of food-derived bioactive peptides in the management of T2DM and commercial solutions: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* (279): 134993.

Fang, H., X. M. Wu, Y. W. Hu., Y. J. Song, J. Zhang y M. X. Chang. 2020. NLRC3-like 1 inhibits NOD1-RIPK2 pathway via targeting RIPK2. *Dev. Comp. Immunol.* (112): 103769.

Fang, Z., C. Wang, J. Zhu y Y. Gou. 2024. Iron overload promotes hemochromatosis-associated osteoarthritis via the mTORC1-p70S6K/4E-BP1 pathway. *Int. Immunopharmacol.* (131): 111848.

Farias, D. R., R. Ibarra, F. Tucca, A. Jaramillo-Torres, J. Cornejo, P. Ibieta, O. Mardones y R. Avendaño-Herrera. 2025. Insights and Lessons from Chilean Salmon Aquaculture on Antimicrobial Use. *Antibiotics* (14): 1177.

Farida, B., K. G. Ibrahim, B. Abubakar, I. Malami, M. B. Abubakar, A. Y. Abbas, y M. U. Imam. 2023. Iron deficiency and its epigenetic effects on iron homeostasis. *J. Trace Elem. Med. Biol.* (78): 127203.

Ferrão, L., M. Blanes.García, L. Pérezm J. F. Asturiano y M. Morini. 2024. Superoxidase dismutases (SODs) in the European eel: Gene characterization, expression response to temperature combined with hormonal maturation and possible migratory implications. *Comp. Biochem. Physiol.* (290): 111590.

Ferreira J., T. A. Rodrigues, A. G. Pedrosa, A. R. Silva, B. G. Vilarinho, T. Francisco y J. E. Azevedo. 2023. Glutathione and peroxisome redox homeostasis. *Redox Biol.* (67): 102917.

Ferrer-Gago F. J., Koh L. Q. y Lane D. P. 2019. Functionalized Resins for the Synthesis of Peptide Alcohols. *Chem. Eur. J.* (26): 379-383.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. En: FishStatJ - Software for Fishery and Aquaculture Statistical Time Series. 24 de marzo del 2024 16:24 hrs. Disponible en: <https://www.fao.org/fishery/en/statistics/software/fishstatj>.

Forlenza, M., I. R. Fink, G. Raes y G. F. Wiegertjes. 2011. Heterogeneity of macrophage activation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* (35): 1246-1255.

Fosgerau K. y T. Hoffmann. 2015. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today* (20): 122-128.

Franchini, M., M. Montagnana y G. Lippi. 2010. Hepcidin and iron metabolism: From laboratory to clinical implications. *Clin. Chim. Acta* (411): 1565-1569.

Fryer, J. L., C. N. Lannan, S. J. Giovannoni y N. D. Wood. 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov. the Causative Agent of an Epizootic Disease in Salmonid Fishes?. *Int J Syst Bacteriol*: 120–126.

Gao, F., J. Pang, M. Lu, X. Yang, H. Zhu, X. Ke., Z. Liu, J. Cao y M. Wang. 2048. Molecular characterization, expression and functional analysis of NOD1, NOD2 and NLRC3 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* (73): 207-219.

Giorgi, A., G. Mignogna, G. Bellapadrona, M. Gattoni, R. Chiaraluce, V. Consalvi, E. Chiancone y S. Stefanini. 2008. The unusual co-assembly of H- and M-chains in the ferritin molecule from the Antarctic teleosts *Trematomus bernacchii* and *Trematomus newnesi*. *Arch. Biochem. Biophys.* (478): 69-74.

Giustarini D., G. Colombo, M. L. Garavaglia, E. Astori, N. M. Portirano, F. Reggiani, S. Badalamenti, A. M. Aliosi, A. Santucci, R. Rossi, A. Mizlani e I. Dalle-Donne. 2017. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free Radicals Biol. Med.* (112): 360-375.

Gopi, N., S. Vijayakumar, R. Thaya, M. Govindarajan, N. S. Alharbi, S. Kadaikunnan, J. M. Khaled, M. N. Al-Anbr y B. Vaseeharan. 2019. *J. Trace Elem. Med. Biol.* (55): 170-179.

Grayfer, L., B. Kerimoglu, A. Yaparla, J. W. Hodgkinson, J. Xie y M. Belosevic. 2018. Mechanism of Fish Macrophage Antimicrobial Immunity. *Front. Immunol.* (9): 1105.

Grayfer, L., J. W. Hodgkinson y M. Belosevic. 2014. Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* (43): 223-242.

Guo, L., H. Hou, B. Li, Z. Zhang, S. Wang y X. Zhao. 2013. Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin. *Process Biochemistry* (48): 988–993.

Guo, L., P. A. Harnedy, B. Li, H. Hou, Z. Zhang, X. Zhao y R. J. FitzGerald. 2014. Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends Food Sci. Technol.* (37): 92-105.

Guo, L., P. A. Harnedy, M. B. O'Keeffe, L. Zhang, B. Li, H. Hou y R. J. Fitzgerald. 2015. Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides. *Food Chem.* (173): 536–542.

Guo, Y., P. Wu, W. Jiang, Y. Lio, S. Kuang, J. Jiang, L. Tang, W. Tang, Y. Zhang, X. Zhou y L. Feng. 2018. The impaired immune function and structural integrity by dietary iron deficiency or excess in gill of fish after infection with *Flavobacterium columnare*: Regulation of NF- κ B, TOR, JNK, p38MAPK, Nrf2 and MLCK signalling. *Fish and Shellfish Immunol.* (74): 593-608.

Gütelkin, Y., E. Eren y N. Özören. 2013. Overexpressed NLRC3 Acts as an Anti-Inflammatory Cytosolic Protein. *J. Innate Immun.* (7): 25.36.

Guzmán, F., A. Gauna, T. Román, O. Luna, C. Álvarez, C. Pareja.Barrueto, L. Mercado, F. Albericio y C. Cárdenas. 2021. Tea Bags for Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: An Example of Circular Economy. *Molecules* (16): 5035.

Hall, J. H., L. E. Sanderson. K. E. Crosier y P. S. Crosier. 2014. Mitochondrial metabolism, reactive oxygen species, and macrophage function-fishing for insights. *J. Mol. Med.* (92): 1119-1128.

Haschka, D., A. Hoffmann y G. Weiss. 2021. Iron in immune cell function and host defense. *Semin. Cell Dev. Biol.* (115): 27-36.

He, H., X. Long, H. Jiang y C. Qin. 2024. The differential impact of iron on ferroptosis, oxidative stress, and inflammatory reaction in head-kidney macrophages of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) with and without ammonia stress. *Dev. Comp. Immunol.* (157): 105184.

He, K., R. Huang, L. Cheng, Q. Liu, Y. Zhang, H. Yan, Y. Hu, L. Zhao y S. Yang. 2023. Effects of dietary nano-iron on growth, hematological parameters, immune antioxidant response, and hypoxic tolerance in juvenile Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture reports* (33): 101759.

He, Y., X. Pan, C. F. Chi, K. L. Sun y B. Wang. 2019. Ten new pentapeptides from protein hydrolysate of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*) muscle: Preparation, identification, and antioxidant activity evaluation. *LWT.* (105): 1–8.

Hissen, K. L., W. He, G. Wu y M. F. Criscitello. 2023. Immunonutrition: facilitating mucosal immune response in teleost intestine with amino acids through oxidant-antioxidant balance. *Front. Immunol.* (14): 1241615.

Hood, M. I y E. P. Skaar. 2012. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat. Rev. Microbiol.* (10): 525-537.

Hooft, J. M., H. Q. Tran, R. Montero, B. Morales-Lange, V. Stejskal, L. Torunn Mydland, y M. Øverland. 2025. Environmental impacts of the filamentous fungi *Paecilomyces variotii* (PEKILO®) as a novel protein source in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* (596): 741779.

Hooft, J. M., R. Montero, B. Morales-Lange, V. F. Blihovde, K. Purushothaman, C. M. Press, D. D. Mensah, J. O. Agboola, S. Javed, L. T. Mydland y M. Øverland. 2024. *Paecilomyces variotii* (PEKILO®) in novel feeds for Atlantic salmon: Effects on pellet quality, growth performance, gut health, and nutrient digestibility and utilization. *Aquaculture*: 740905.

Hsu, K. C. 2010. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chem.* (122): 42–48.

Huang, Y., R. Ge, G. Lou, N. Jiang, X. Zhu, Y. Guo, H. Liu, X. Liu y X. Chen. 2023. The influence of dietary Coenzyme Q10 on growth performance, antioxidant capacity and resistance against *Aeromonas hydrophila* of juvenile European eel (*Anguilla anguilla*). *Fish Shellfish Immunol.* (138): 108834.

Iliev, D.B., H. Thim, L. Lagos, R. Olsen y J.B. Jørgensen. 2013. Homing of Antigen-Presenting Cells in Head Kidney and Spleen – Salmon Head Kidney Hosts Diverse APC Types. *Front. Immunol.* (4). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00137>.

Imoto, S., T. Sawamura, Y. Shibuya, M. Kono, A. Ohbuchi, T. Suzuki, Y. Mizokoshi y K. Saigo. 2022. Labile iron, ROS, and cell death are prominently induced by haemin, but not by non-transferrin-bound iron. *Transfusion and Apheresis Science* (61).

Jiang, W. Y. Liu, K. Hu, J. Jiang, S. Li, L. Feng y X. Zhou. 2024. Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: Protective effects of myo-inositol. *Aquat. Toxicol.* (155): 301-313.

Jiang, Y., M. Husain, Z. Qi, S. Bird, T. y Wang. (2015b). Identification and expression analysis of two interleukin-23 α (p19) isoforms, in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and Atlantic salmon *Salmo salar*. *Mol. Immunol.* (66): 216-228. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.014>.

Jie, Z., J. Liu, M. Shu, Y. Ying y H. Yang. 2022. Detection strategies for superoxide anion: A review. *Talanta* (236): 122892.

Jofré, C., F. Guzmán, C. Cárdenas, F. Albericio y S. H. Marshall. 2011. A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides* (32): 852-858.

Jung, C. Y., J. Hikima, M. Ohtani, H. B. Jang, C. S. del Castillo, S. W. Nho, I. S. Cha, S. B. Park, T. Aoki y T. S. Jung. 2012. Recombinant interferon- γ activates immune responses against *Edwardsiella tarda* infection in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol.* (22): 197-203.

Kamińska-Gibas, T., J. Szczygiel, A. Blasweiler, Ł. Gajda, E. Yilmaz, P. Jurecka, L. Kolek, M. Ples, e I. Irnazarow. 2023. New reports on iron related proteins: Molecular characterization of two ferroportin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and its expression pattern. *Fish Shellfish Immunol.* (142): 109087.

Kassem T., Sabatino D. y Jia X. 2009. To Rink or not to Rink Amide Link, that is the Question to Address for More Economical and Environmentally Sound Solid-Phase Peptide Synthesis. *Int. J. Pept. Res. Ther.* (15): 211-218.

Kawabata, H. 2019. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radical Biol. Med.* (133): 46-54.

Kim, C. R. Park, M. Choi, H. Sun y S. Shin. 2006. Ferrophilic Characteristics of *Vibrio vulnificus* and Potential Usefulness of Iron Chelation Therapy. *The Journal of Infectious Diseases* (195): 90-97.

Kim, H. S., P. A. Loughran y T. R. Billiar. 2008. Carbon monoxide decreases the level of iNOS protein and active dimer in IL-1 β -stimulated hepatocytes. *Nitric Oxide* (18): 256-265.

Kiron V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Anim. Feed Sci. Technol.* (173): 111-133.

Ko, J., E. Kim, J. Lee, M. Kang, J. Lee, J. Kim, W. Jung y Y. Jeon. 2014. Protective effect of aquacultured flounder fish-derived peptide against oxidative stress in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol.* (36): 320-232.

Kobayashi, K. S y P. J. van den Elsen. 2012. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* (12): 813-820.

Korhonen, H. y A. Pihlanto. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality, *Int Dairy J* (16): 945–960.

Kumar, M., S. Singh, A. Jain., S. Yadav, A. Dubey y S. P. Trivedi. 2024. A review on heavy metal-induced toxicity in fishes: Bioaccumulation, antioxidant defense system, histopathological manifestations, and transcriptional profiling of genes. *J. Trace Elem. Med. Biol.* (83): 127377.

Kunjiraman, S., I. S. B. Singh, M. Sarasan y J. Puthumana. 2024. Immobilized microbial consortia: An eco-friendly and sustainable solution for aquaculture waste management. *The Microbe* (4): 100100.

Kwong, R. W. M y S. Niyogi. 2009. The interactions of iron with other divalent metals in the intestinal tract of freshwater teleost, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* (150): 442-449.

Kwong, R. W. M., Andrés, J. A. y Niyogi, S. 2010. Molecular evidence and physiological characterization of iron absorption in isolated enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Implications for dietary cadmium and lead absorption. *Aquat. Toxicol.* (99): 343-350.

Kwong, R. W. M., Andrés, J. A. y Niyogi, S. 2011. Effects of dietary cadmium exposure on tissue-specific cadmium accumulation, iron status and expression of iron-handling and stress-inducible genes in rainbow trout: Influence of elevated dietary iron. *Aquat. Toxicol.* (102): 1-9.

Lall, S. P. y Kaushik, S. J. 2021. Nutrition and Metabolism of Minerals in Fish. *Animals.* (11): 2711.

Lang, Y., N. Gao, Z. Zang, X. Meng, Y. Lin, S. Yang, Y. Yang, Z. Jin y B. Li. 2024. Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review. *J. Future Foods* (4): 193-204.

Lee, J., J. Kang y J. Kim. 2023. Toxic effects of microplastic (Polyethylene) on fish: Accumulation, hematological parameters and antioxidant responses in Korean Bullhead, *Pseudobagrus fulvidraco*. *Sci. Total Environ.* (877): 162874.

Lee, S. H., K. B. Song. 2009. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochemistry* (44): 378–381.

Leite, M. L., H. M. Duque, G. R. Rodrigues, N. B. da Cunha y O. L. Franco. 2023. The LL-37 domain: A clue to cathelicidin immunomodulatory response? *Peptides* (165): 171011.

León, R., M. Ruiz, Y. Valero, C. Cárdenas, F. Guzmán, M. Vila y A. Cuesta. 2020. Exploring small cationic peptides of different origin as potential antimicrobial agents in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol* (98): 720-727.

Li, C., L. Qin. R. Qu, P. Sun y Z. Wang. 2016. Responses of antioxidant defense system to polyfluorinated dibenzo-p-dioxins (PFDDs) exposure in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (126): 170-176.

Li, C., X. Lu., M. Li y J. Chen. 2015. Cathelicidin modulates the function of monocytes/macrophages via the P2X7 receptor in a teleost, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Shellfish Immunol.* (47): 878-885.

Li, P., D. M. Gatlin III. 2006. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. *Aquaculture* (251): 141-152.

Li, S., T. Zhang, Y. Feng y J. Sun. 2021. Extracellular ATP-mediated purinergic immune signaling in teleost fish: A review. *Aquaculture* (537): 736511.

Li, X., X. Yue y J. Xie. 2024. The goldfish primary kidney macrophage system. *Dev. Comp. Immunol.* (151): 105100.

Li, Y., H. Jiang y G. Huang. 2017. Protein Hydrolysates as Promotes of Non-Haem Iron Absorption. *Nutrients* (9): 609.

Li, Y., Z. Chen., Y. Xiao, F. Gao, F. Zhan, Z. Lu, Z. Huang, X. Wei, F. Su, F. Shi, L. Lin y Z. Qing. 2023. The Keap1-Nrf2 signaling pathway regulates antioxidant defenses of *Ctenopharyngodon idella* induced by bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* (137): 108686.

Liu, S., Z. Deng, J. Zhu, Z. Ma, B. Tuo, T. Li y X. Liu. 2023. Gastric immune homeostasis imbalance: An important factor in the development of gastric mucosal diseases. *Biomed. Pharmacother.* (161): 114338.

Liu, Y., Z. Wang, A. Kelimu, S. A. Korma, Il Cacciotti, H. Xiang y C. Cui. 2023. Novel iron-chelating peptide from egg yolk: Preparation, characterization, and iron transportation. *Food Chem.*:X (18): 100692.

López-Barrios, L., M. Antunes-Ricardo y J. A. Gutiérrez-Urbe. 2016. Changes in antioxidant and antiinflammatory activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates due to germination and enzymatic digestion. *Food Chem.* (203): 417–424.

López-Olmeda, J. F., M. J. Bayarri, M. A. Rol de Lama, J. A. Madrir y F. J. Sánchez.Vázquez. 2006. Effects of melatonin administration on oxidative stress and daily locomotor activity patterns in goldfish. *J- Physiol. Biochem.* (62): 17-26.

Lu, Z., W. Shi, D. Ma, J. Zhang, X. Long, S. Li, F. Gao, Q. Zhang y G. Ying. 2024. The azole biocide climbazole induces oxidative stress, inflammation, and apoptosis in fish gut. *Sci. Total Environ.* (923): 171475.

Mada, S. B., C. P. Ugwu y M. M. Abarshi. 2019. Health Promoting Effects of Food-Derived Bioactive Peptides: A Review. *Int. J. Pept. Res. Ther.* (26): 831-848.

Malandrakis, E. E., A. Exadactylos, O. Dadali, E. Golomazou, S. Klaoudatos y P. Panagiotaki. 2014. Molecular cloning of four glutathione peroxidase (GPx) homologs and expression analysis during stress exposure of the marine teleost *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol.* (168): 53-61.

Mao, X., W. Chen, X. Long, X. Pan, G. Liu, W. Hu, D. Gu y Q. Tan. 2024. Effect of dietary (Fe) level on growth performance and health status of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture* (581): 740446.

Mardones, F. O., F. Paredes, M. Medina, A. Tello, V. Valdivia, R. Ibarra, J. Correa y S. Gelcich. 2018. Identification of research gaps for highly infectious diseases in aquaculture: The case of the endemic *Piscirickettsia salmonis* in the Chilean salmon farming industry: *Aquaculture* 482.

Martínez, D., R. Oyarzún-Salazar, A. M. Quilapi, J. Coronado, R. Enriquez, C. Vargas-Lagos, C. Oliver, N. Santibañez, M. Godoy, J. L. Muñoz, L. Vargas-Chacoff y A. Romero. 2023. Live and inactivated *Piscirickettsia salmonis* activated nutritional immunity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Front. Immunol.* (14).

Martínez-Álvarez, R. M., A. E. Morales y A. Sanz. 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev.:Methods Technol. Fish Biol. Fish.* (15): 75-88.

McCann, K. J., S. M. Christensen, D. H. Colby, P. J. McGuire, I. A. Myles, C. S. Zerbe, C. L. Dalgard, G. Sukumar, W. J. Leonard, B. A. McCormick y S. M. Holland. 2022. IFN γ regulates NAD $^{+}$ metabolism to promote the respiratory burst in human monocytes. *Blood Adv* (6): 3821–3834.

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

Medzhitov R. y C. Janeway. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* (Frederiksberg, Den.) (173): 89-97.

Miura T., S. Muraoka y T. Ogiso. 1997. ANTIOXIDANT ACTIVITY OF METALLOTHIONEIN COMPARED WITH REDUCED GLUTATHIONE. *FARMACOLOGY LETTERS* (60): 301-309.

Montero, J., J. Coll, N. Sevilla, A. Cuesta, N. C. Bols y C. Tafalla. 2008. Interleukin 8 and CK-6 chemokines specifically attract rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS11 monocyte–macrophage cells and have variable effects on their immune functions. *Dev. Comp. Immunol.* (32): 1374-1384.

Morgan, J. W. y E. Anders. 1980. Chemical composition of Earth, Venus, and Mercury. *Proc. Nati. Acad. Sci.* (77): 6973-6977.

Muñoz-Flores, C., F. J. Roa, P. Saavedra, P. Fuentealba, M. F. Starck, L. Ortega, R. Montesino, A. Valenzuela, A. Astuya, N. Parra, I. González-Chavarría, O. Sánchez, J. R. Toledo y J. Acosta. 2023. Immunomodulatory role of vasoactive intestinal peptide and ghrelin in *Oncorhynchus mykiss*. *Heliyon* (9): e23215.

Nakagawa, H. 2004. USEFULNESS OF WASTE ALGAE AS A FEED ADDITIVE FOR FISH CULTURE. *More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products*: 243-252.

Naparlo, K., M. Soszynski, G. Bartosz e I. Sadowska-Bartosz. 2020. Comparison of Antioxidants: The Limited Correlation between Various Assays of Antioxidant Activity. *Molecules* (25): 3244

Nemeth, E. y T. Ganz. 2006. Regulation of Iron Metabolism by Hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.* (26): 42.

Neves, A. C., P. A. Harnedy, M. B. O'Keeffe, R. J. FitzGerald. 2017. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. *Food Chem* (218): 396–405.

Neves, J. V., C. Caldas, J. M. Wilson y P. N. S. Rodrigues. 2011. Molecular mechanisms of hepcidin regulation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.* (31): 1154.1161.

Nuic, B., C. English, A. Bowden, N.M. Wade, L. Koster, M. Kawasaki, A. Williams, O. Mendoza-Porras, A.C. Carnes, C.E. Franklin, R. Smullen y R.L. Cramp. 2025. Physiological and immunological biomarkers of chronic thermal stress in post-smolt Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* (609): 742850. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2025.742850>.

Olsvik, P.A., K.K. Lie, A.O. Jordal, T.O. Nielsen e I. Hordvik. 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol. Biol.* (6). <https://doi.org/10.1186/1471-2199-6-21>.

Palti, Y. (2011). Toll-like receptors in bony fish: From genomics to function. *Dev. Comp. Immunol.* (35): 1263-1272. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.006>.

Pan, K., H. Xu, C. Yan, J. Chen, X. Jian, Y. Son, X. Qi, J. Long y H. Liu. 2023. Hepcidin from *Onychostoma macrolepis*: Response to *Aeromonas hydrophila* infection by down-regulating expression of inflammatory factor genes and regulating iron homeostasis potentially. *Gish Shellfish Immunol.* (143): 109187.

Pastorino, P., S. Bergagna, D. Dezzutto, R. Barbero, M. Righetti, G. Pagliasso, L. Gasco, M. S. Gennero, E. Pizzul, A. Dondo y M. Prearo. 2020. Long-Term Assessment of Baseline Blood Biochemistry Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Maintained under Controlled Conditions. *Animals* (10): 1466.

Peña, A.A., N.C. Bols y S.H. Marshall. 2010. An evaluation of potential reference genes for stability of expression in two salmonid cell lines after infection with either *Piscirickettsia salmonis* or IPNV. BMC Res. Notes (3): 101. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-101>.

Pereiro, P., A. Figueras y B. Novoa. 2019. Insights into teleost interferon-gamma biology: An update. Fish Shellfish Immunol. (90): 150-164.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. (9): e45.

Pisoschi, A. M., F. Iordache, L. Stanca, C. Cimpeanu, F. Furnaris, O. I. Geicu, L. Bilteanu y A. I. Serban. 2024. Comprehensive and critical view on the anti-inflammatory and immunomodulatory role of natural phenolic antioxidants. Eur J Med Chem (265).

Pontigo, J. P., M. J. Agüero, P. Sánchez, R. Oyarzún, C. Vargas-Lagos, J. Mancilla, H. Kossmann, F. J. Morera, A. J. Yáñez y L. Vargas-Chacoff. 2016. Identification and expression analysis of NLRC5 inflammasome gene in smolting Atlantic salmon (*Salmo salar*) Fish Shellfish Immunol (58): 259-265.

Pulgar, R., C. Hödar, D. Travisany, A. Zuñiga, C. Domínguez, A. Maass, M. González y V. Cambiazo. 2015. Transcriptional response of Atlantic salmon families to *Piscirickettsia salmonis* infection highlights the relevance of the iron-deprivation defence system. BMC Genomics (16).

Rana S., N. M. A. Rayhan, S. H. Emon, T. Islam, K. Rathry, M. Hasan, M. I. Mansur, B. C. Srijon, S. Islam, A. Ray, A. Rakinb, A. Islam, M. Kudrat-E-Zahan, F. Hossen y A. Asraf. 2024. Antioxidant activity of Schiff base ligands using the DPPH scavenging assay: an updated review. RSC Adv. (14):33094.

Rashidian, G., M. M. Moghaddam, R. Mirnejad y Z. M. Azad. 2021. Supplementation of zebrafish (*Danio rerio*) diet using a short antimicrobial peptide: Evaluation of growth performance, immunomodulatory function, antioxidant activity, and disease resistance. Fish Shellfish Immunol. (119): 42-50.

Rathore, S. S., H. S. Murthy, S.K. Girisha, M. S. Nithin, S. Nasren, M. A. A. Mamun, T. G. Puneeth, K. Rakesh, B. T. N. Kumar y M. Pai. 2021. Supplementation of nano-selenium in fish diet: Impact on selenium assimilation and immune-regulated selenoproteome expression in monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Comp. Biochem. Physiol., Part C:Toxicol. Pharmacol. (240): 108907.

Rejitha V. y M. C. S. Peter. 2013. Adrenaline and triiodothyronine modify the iron handling in the freshwater air-breathing fish *Anabas testudineus* Bloch: Role of ferric reductase in iron acquisition. *Gen. Comp. Endocrinol.* (181): 130-138.

Ren J., X. Ma, H. Hu, D. Wang, H. Sun, J. Liu, X. Wang y H. Zhou. 2024. *Edwardsiella piscicida* causes iron storage disorders by an autophagy pathway in fish monocytes/ macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* (146): 109417.

Reyes-Cerpa, S., E. Vallejo-Vidal, M. J. Gonzales-Bown, J. Morales-Reyes, D. Pérez-Stuardo, D. Vargas, M. Imarai, V. Cifuentes, E. Spencer, A. M. Sandino, F. E. Reyes-López. 2018. Effect of yeast (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) and plant (Saint John's wort, lemon balm, and rosemary) extract based functional diets on antioxidant and immune status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) subjected to crowding stress. *Fish Shellfish Immunol.* (74): 250-259.

Rocha, S. D. C, B. Morales-Lange, R. Montero, D. Teklay Okbayohanese, P. Kathiresan, C. McLean Press, L. Torunn Mydland y M. Øverland. 2023. Norway spruce extracts (NSEs) as bioactive compounds in novel feeds: Effect on intestinal immune-related biomarkers, morphometry and microbiota in Atlantic salmon pre-smolts. *J Funct Foods* (111).

Román, T., G. Acosta, C. Cárdenas, B. G. de la Torre, F. Guzmán y F. Albericio. 2023. Protocol for Facile Synthesis of Fmoc-N-Me-AA-OH Using 2-CTC Resin as Temporary and Reusable Protecting Group. *Methods Protoc.* (6): 110.

Romero, A., T. Pérez, N. Santibáñez, M. Vega, P. Miranda. 2021. Phytogenic feed additive (PFA) standardized in labdane diterpens have a protective effect in *Salmo salar* against *Piscirickettsia salmonis*. *Aquaculture* (533).

Rossi, A. S., N. Fantón, M. P. Michlig, M. R. Repetti y J. Cazenave. 2020. Fish inhabiting rice fields: Bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxic effects after pesticides application. *Ecol. Indic.* (113): 106186.

Rozas, M. y R. Enríquez. 2014. *Piscirickettsiosis* and *Piscirickettsia salmonis* in fish: A review. *J Fish Dis* 37: 163–188.

Rozas-Serri, M., A. Peña, I. Gardner, E. Peñaloza, L. Maldonado, A. Muñoz, F. O. Mardones, C. Rodríguez, R. Ildfonso, C. Senn, y Felipe Aranís. 2023. Co-Infection by LF-89-Like and EM-90-Like Genogroups of *Piscirickettsia Salmonis* in Farmed Atlantic Salmon in Chile: Implications for Surveillance and Control of *Piscirickettsiosis*. *Pathogens* (12): 45.

Saavedra, J., N. Hernandez, A. Osses, A. Castillo, A. Cancino, H. Grothusen, E. Navas, P. Henriquez, H. Bohle, F. Bustamante, P. Bustos y M. Mancilla. 2017. Prevalence, geographic distribution and phenotypic differences of *Piscirickettsia salmonis* EM-90-like isolates. *J. Fish Dis.* (40): 1055-1036.

Salazar, S., C. Oliver, A.J. Yáñez y R. Avendaño-Herrera. (2016). Comparative analysis of innate immune responses to *Streptococcus phocae* strains in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* (51): 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.005>.

Sandamalika, W. M. G., H. Kwon, C. Lim, H. Yang y J. Lee. 2021. The possible role of catalase in innate immunity and diminution of cellular oxidative stress: Insights into its molecular characteristics, antioxidant activity, DNA protection, and transcriptional regulation in response to immune stimuli in yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*). *Fish Shellfish Immunol.* (113): 106-117.

Santana, P. A., F. Guzmán, J. C. Forero, O. F. Luna y L. Mercado. 2016. Hepcidin, Cathelicidin-1 and IL-8 as immunological markers of responsiveness in early developmental stages of rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* (62): 48-57.

Schep, L. L., I. G. Tucker, G. Young, R. Ledger y A. G. Butt. 1999. Controlled release opportunities for oral peptide delivery in aquaculture. *J. Controlled Release* (59): 1-14.

Schneider, E. y M. Dy. 1985. The role of arginase in the immune response. *Immunol. Today* (6): 136-140.

Schneider, M., A. G. Zimmermann, R. A. Roberts, L. Zhang, K. V. Swanson, H. Wen, B. K. Davis, I. C. Allen, E. K. Holl, Z. Ye, A. H. Rahman, B. J. Conti, T. K. Eitas, B. H. Koller y J. P. Ting. 2012. The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF- κ B. *Nat. Immunol.* (13): 823-832.

Scudiero, R., F. Trinchella y E. Parisi. 2009. Iron metabolism genes in Antarctic notothenioids: A review. *Mar. Genomics.* (1): 79-85.

Seppola, M., A. N. Larsen, K. Steiro, B. Robertsen e I. Jensen. 2008. Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 β , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Mol. Immunol.* (45): 887-897.

Serradell, A., S. Torrecillas, F. Soares, T. Silva y D. Montero. 2023. Modelling the effect of prebiotics, probiotics and other functional additives on the growth, feed intake and feed conversion of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture Reports* (35): 101759.

Servicio Agrícola y Ganadero. En: Productos Biológicos Inmunológicos con registro Provisional de Uso en Salmónidos. 24 de marzo del 2024: 19:42 hrs. Disponible en: <https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/registro-provisional-deproductos-inmunologicos-de-uso-en-salmonidos/registros>.

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. 2022. INFORME SANITARIO CON INFORMACIÓN SANITARIA DE AGUA DULCE Y MAR AÑO 2022.

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. 2023. INFORME SOBRE USO DE ANTIMICROBIANOS EN LA SALMONICULTURA NACIONAL Primer Semestre-Año 2023.

Shi, J, A. y C. Camus. 2006. Hecpidins in amphibians and fishes: Antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones?. *Dev. Comp. Immunol.* (30): 745-755.

Siddeeg, A., N. M. AlKehayez, H. A. Abu-Hiamed, E. A. Al-Sanea y A. M. Al-Farga. 2021. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi J. Biol. Sci.* (28): 1633-1644.

Sigh, J., T. Lindenstrøm y K. Buchmann. 2004. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol* (17): 75-86.

Sila, A. y A. Bougatef. 2016. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *J. Funct. Foods* (21): 10-26.

Silva, O. N., W. F. Porto, S. M. Ribeiro, I. Batista y O. L. Franco. 2018. Host-defense peptides and their potential use as biomarkers in human diseases. *Dug Discovery Today* (23): 9.

Soliman, A. M. y D. R. Barreda. 2023. The acute inflammatory response of teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* (146): 104731.

Sousa, L., M. M. Oliveira, M. Túlio, C. Pessôa y L. A. Barbosa. 2020. Iron overload: Effect on cellular biochemistry. *Clin. Chim. Acta.* (504): 180-189.

Speirs Z., C. A. Loynes, H. Mathiessen, P. M. Elks, S. A. Renshaw y L. G. Jørgensen. 2024. Fish Shellfish Immunol. (148): 109490.

Stafford, J. L. y M. Belosevic. 2003. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. Dev. Comp. Immunol. (27): 539-554.

Tacchi, L., J.E. Bron, J.B. Taggart, C.J Secombes, R. Bickerdike, M.A. Adler, H. Takle y S.A.M. Martin. 2011. Multiple tissue transcriptomic responses to *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Physiol. Genomics (43): 1241-1254. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00086.2011>.

Tadesse, S. A. y S. A. Emire. 2020. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. Heliyon (6): e04765.

Takahashi, T. y K. Ogiwara. 2021. Roles of melatonin in the teleost ovary: A review of the current status. Comp. Biochem. Physiol. (254): 110907.

Teh, M. R., A. E. Armitage y H. Drakesmith. 2024. Why cells need iron: a compendium of iron utilization. Trends Endocrinol. Metab. (xx): x.

Thangapandiyan, S., A. S. A. Alisha y K. Anidha. 2020. Growth performance, hematological and biochemical effects of iron oxide nanoparticles in *Labeo rohita*. Biocatal. Agric. Biotechnol. (25): 101582.

Thibaut, L., L. Catherine, B. Eva, P. Julie, V. Frédéric y F. Emilie. 2021. Intraspecific variation in freshwater tolerance has consequences for telomere dynamics in the euryhaline teleost *Dicentrarchus labrax*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. (545): 151611.

Tran, H. Q., E. W. von Sienebthal, J. Luce, T. T. Nguyen, A. Tomcala, V. Stejskal y T. Janssens. 2024. Complementarity of insect meal and poultry by-product meal as replacement for fishmeal can sustain the production performance of European perch (*Perca fluviatilis*), reduce economic fish-in fish-out ratio and food-feed competition, and influence the environmental indices. Aquaculture (578): 740166.

Tsujita, T., H. Tsukada, M. Nakao, H. Oshiumi, M. Matsumoto y T. Seya. 2004. Sensing Bacterial Flagellin by Membrane and Soluble Orthologs of Toll-like Receptor 5 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mikiss*)*. *The Journal of Biological Chemistry* (279): 48588-48597.

Valenzuela, C. A., R. Zuloaga, M. Poblete-Morales, T. Vera-Tobar, L. Mercado, R. Avendaño-Herrera, J. A. Valdés y A. Molina. 2017. Fish skeletal muscle tissue is an important focus of immune reactions during pathogen infection. *Dev. Comp. Immunol.* (73): 1-9.

Valenzuela-Miranda D. y C. Gallardo-Escárate. 2016. Novel insights into the response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to *Piscirickettsia salmonis*: Interplay of coding genes and lncRNAs during bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol* (59): 427-438.

Valenzuela-Muñoz, V., D. Valenzuela-Miranda, A. T. Gonçalves, B. Novoa, A. Figueras y C. Gallardo-Escárate. 2020. Induced-iron overdose modulate the immune response in Atlantic salmon increasing the susceptibility to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Aquaculture* (521): 735058.

Vera, L.M., C. Metochis, J.F. Taylor, M. Clarkson, K.H. Skjærven, H. Migaud y D.R. Tocher. 2017. Early nutritional programming affects liver transcriptome in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*. *BMC Genomics* (18): 886. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4264-7>.

Vomhof-DeKrey, E. E. y M. J. Picklo Sr. 2012. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J. Nutr. Biochem.* (23): 1201-1206.

Waldvogel-Abramowski, S., G. Waeber, C. Gassner, A. Buser, B. M. Frey, B. Favrat y J. Tissot. 2014. Physiology of Iron Metabolism. *Transfus Med Hemother.* (41): 213-221.

Walters, M. E., R. Esfandi y A. Tsopmo. 2018. Potencial of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption. *Foods* (7): 172.

Wang, C. y J. L. Babitt. 2019. Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood* (133): 18-29.

Wang, L., G. Sagada. R. Wang, P. Li, B. Xu, C. Zhang, J. Qiao y Y. Yan. 2022. Different forms of selenium supplementation in fish feed: The bioavailability, nutritional functions, and potential toxicity. *Aquaculture* (549): 737819.

Wang, L., H. Wang, C. Gao, C. Wang, Y. Yan y F. Zhou. 2024. Dietary copper for fish: Homeostasis, nutritional functions, toxicity, and affecting factors. *Aquaculture* (587): 740875.

Wang, S., S. Xie, A. Zhou, C. Zhang, L. Wen, G. Xu y J. Zou. 2021. Effects of mixed antimicrobial peptide on the growth performance, antioxidant and immune responses and disease resistance of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze). *Fish Shellfish Immunol* (114): 112-118.

Wang, W., M. Zhang, y L. Sun. 2011. Ferritin M of *Cynoglossus semilaevis*: An iron-binding protein and a broad-spectrum antimicrobial that depends on the integrity of the ferroxidase center and nucleation center for biological activity. *Fish Shellfish Immunol*. (31): 269-274.

Wang, X., L. Wang, Q. Ren, S. Yin, F. Liang y Y. Jia. 2016. Two superoxide dismutases (SODs) respond to bacterial challenge identified in the marbled eel *Anguilla marmorata*. *Aquaculture* (451): 316-325.

Wang, Z., X. Li, K. Lu, L. Wang, X. Ma, K. Song y C. Zhang. 2023. Effects of dietary iron levels on growth performance, iron metabolism and antioxidant status in spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) reared at two temperatures. *Aquaculture* (56): 738717.

Wei, H., L. Yin, S. Feng, X. Wang, K. Yang, A. Zhang y H. Zhou. 2015. Dual-parallel inhibition of IL-10 and TGF- β 1 controls LPS-induced inflammatory response via NF- κ B signaling in grass carp monocytes/macrophages. *Fish Shellfish Immunol*. (44): 445-452.

Wei, T., y V. Simko. 2024. R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix. (Version 0.95), <https://github.com/taiyun/corrplot>.

Weitzman J. 2019. Applying the ecosystem services concept to aquaculture: A review of approaches, definitions, and uses. *Ecosystem Services* (35): 194-206.

Wen, C., J. Zhang., H. Zhang., Y. Duan y H. Ma. 2020. Plant protein-derived peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends Food Sci. Technol.* (105): 308-322.

Weththasinghe, P., J. Ø. Hansen, D. Nøklund, L. Lagos, M Rawski, y M. Øverland. 2021. Full-fat black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) meal and paste in extruded diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effect on physical pellet quality, nutrient digestibility, nutrient utilization and growth performances. *Aquaculture* (530): 735785.

Wiegertjes, G. F., A. S. Wentzel, H., P. Spaink, P. M. Elks e I. R. Fink. 2016. Polarization of immune responses in fish: The 'macrophages first' point of view. *Mol. Immunol.* (69): 146-156.

Wink, D. A., H. B. Hines, R. Y. S. Cheng, C. H. Switzer, W. Flores-Santana, M. P. Vitek, L. A. Ridnour y C. A. Colton. 2011. Nitric oxide and redox mechanism in the immune response. *J. Leukocyte Biol.* (89): 873-891.

Wu, L., L. Li, A. Gao, J. Ye y J. Li. 2024. Antimicrobial roles of phagocytosis in teleost fish: Phagocytic B cells vs professional phagocytes. *Aquaculture and Fisheries* (9): 105-114.

Wu, W., B. Li, H. Hou, H. Zhang y X. Zhao. 2017. Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode. *J Funct Foods* (35): 418–427.

Wu, W., Y. Wang, N. Sun, Z. Bao y S. Lin. 2020. Food protein-derived iron-chelating peptides: The binding mode and promotive effects of iron bioavailability. *Food Res. Int.* (131): 108976.

Xavier, J. R., B. S. Sanjay, D. Gupta, S. Mehta y O. P. Chauhan. 2024. Bioactive compounds of foods: Phytochemicals and peptides. *Food and Humanity* (3): 1003

Xia, J., C. Ge y H. Yao. 2024. Antimicrobial peptides: An alternative to antibiotic for mitigating the risks of antibiotic resistance in aquaculture. *Environ. Res.* (251): 118619.

Xia, X., Z. Cheng, B. He, H. Liu, M. Liu, J. Hu, L. Lei, L. Wang y Y. Bai. 2021. Ferroptosis in aquaculture research. *Aquaculture.* (541): 736760.

Xie, G., C. Huang, S. Jiang, H. Li, Y. Gao, T. Zhang, Q. Zhang, V. Pavel, M. Rahmati y Y. Li. 2024. Smoking and osteoimmunology: Understanding the interplay between bone metabolism and immune homeostasis. *Journal of Orthopaedic Translation* (46): 33-45.

Xu, P., C. Song, X. Tan, T. Zhao, C. Zhong, J. Xu, Y. Song y Z. Luo. 2023. Characterization of fifteen key genes involved in iron metabolism and their responses to dietary iron sources in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *J. Trace Elem. Med. Biol.* (80): 127301.

Xu, X., D. Zhang, T. Zhao, Y. Xu, Z. Luo. 2020. Characterization and expression analysis of seven selenoprotein genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* to dietary selenium levels. *J. Trace Elem. Med. Biol.* (62): 126600.

Yang, C., W. Lim y G. Song. 2020. Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* (234): 108758.

Yang, K., S. Zhang, D. Chen, A. Zhang, X. Wang y H. Zhou. 2013. IFN- γ -activated lymphocytes boost nitric oxide production in grass carp monocytes/macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* (35): 1635-1641.

Yang, S., Q. Li, Y. Mu, J. Ao y X. Chen. 2017. Functional activities of interferon gamma in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Fish Shellfish Immunol.* (70): 545-552.

Yañez, A.J., C.A. Barrientos, A. Isla, M. Aguilar, S.N. Flores-Martin, Y. Yuivar, A. Ojeda, P. Ibieta, M. Hernández, J. Figueroa, R. Avendaño-Herrera y M. Mancilla. (2024). Discovery and Characterization of the *ddx41* Gene in Atlantic Salmon: Evolutionary Implications, Structural Functions, and Innate Immune Responses to *Piscirickettsia salmonis* and *Renibacterium salmoninarum* Infections. *Int. J. Sci.* (25): 6346. <https://doi.org/10.3390/ijms25126346>.

Yin, X., N. Chen, L. Mu, H. Bi, H. Wu, W. Qi, Y. Huang, J. Jian, A. Wang y J. Ye. 2022. Identification and characterization of hepcidin from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to bacterial infection and iron overload. *Aquaculture* (546): 737317.

Yoo, H. Y., M. S. Chang y H. M. Rho. 1999. The Activation of the Rat Copper/Zinc Superoxide Dismutase Gene by Hydrogen Peroxide through the Hydrogen Peroxide-responsive Element and by Paraquat and Heat Shock through the Same Heat Shock Element. *The Journal of Biological Chemistry* (274): 23887-23892.

Yuan, X., W. Liu, C. Wang, Y. Huan, Y. Dai, H. Cheng y G. Jiang. 2020. Evaluation of antioxidant capacity and immunomodulatory effects of cottonseed meal protein hydrolysate and its derivative peptides for hepatocytes of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish Shellfish Immunol* (98): 10-18.

Zafar, N. y M. A. Khan. 2020. Effects of dietary iron on growth, haematology, oxidative stress and hepatic ascorbic acid concentration of stinging catfish *Heteropneustes fossilis*. *Aquaculture* (516): 734642.

Zapata, A. G. 2024. The fish spleen. *Fish Shellfish Immunol.* (144): 109280.

Zelko, I. N., T. J. Mariani y R. J. Folz. 2002. SUPEROXIDE DISMUTASE MULTIGENE FAMILY: A COMPARISON OF THE CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), AND EC-SOD (SOD3) GENE STRUCTURES, EVOLUTION, AND EXPRESSION. *Free Radical Biol. Med.* (33): 337-349.

Zeng, X., Z. Song, X. Zhou, W. Jiang, P. Wu, Y. Liu, L. Tang, S. Li, J. Yang y L. Feng. 2024. The emerging role of zinc on alleviating inflammatory responses and enhancing immunity in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture* (584): 740645.

Zermeño-Cervantes, L. A., B. González-Acosta, S. F. Martínez-Díaz y C. S. Cardona-Félix. 2020. Antibacterial proteins and peptides as potential treatment in aquaculture: current status and perspectives on delivery. *Reviews in Aquaculture* (12): 1135-1156.

Zhan, Y., B. Ning, J. Sun y Y. Chang. 2023. Living in a hypoxic world: A review of the impacts of hypoxia on aquaculture. *Mar. Pollut. Bull.* (194): 115207.

Zhang, M., C. An., Y. Gao, R. K. Leak, J. Chen y F. Zhang. 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* (N. Y.) (100): 34-47.

Zhao, Q., W. Liang., Z. Xiong, C. Li, L. Zhang, J. Rong, S. Xiong, R. Liu, J. You, T. Yin e Y. Hu. 2024. Digestion and absorption characteristics of iron-chelating silver carp scale collagen peptide and insights into their chelation mechanism. *Food Res. Int.* (190): 114612.

Zhu, M., F. Li, Y. Zhang., J. Yu, Y. Wei y X. Gao. 2024. Preparation, bioactivities, and food industry applications of tuber and tuberous roots peptides: A review. *Food Chem.* (456): 140027.

CAPÍTULO IX: Apéndices

10.1 Índice de apéndices

10.2 Cromatogramas de los péptidos sintéticos preseleccionados.....	113
Figura 10.2.1. Cromatogramas de los péptidos sintéticos antioxidantes 4416, 4417, 4426, 4427, 4430, y 4444.....	113
Figura 10.2.2. Cromatogramas de los péptidos sintéticos antioxidantes 4445, 4449, y 4453.....	114
Figura 10.2.3. Cromatogramas de los péptidos sintéticos quelantes de hierro 4418, 4428, 4429, 4438, 4439, 446, 4447, y 4448.....	115
10.3 Espectrometría de masas de los péptidos sintéticos preseleccionados.....	116
Figura 10.3.1 Reportes de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos antioxidantes 4416, 4417, y 4426.....	116
Figura 10.3.2 Reportes de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos antioxidantes 4427, 4430, y 4444.....	117
Figura 10.3.3 Reportes de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos antioxidantes 4445, 4449, y 4453.....	118
Figura 10.3.4 Reportes de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos quelantes de hierro 4418, 4428, y 4429.....	119
Figura 10.3.5 Reportes de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos quelantes de hierro 4438, 4439, y 4446.....	120
Figura 10.3.6 Reporte de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos quelantes de hierro 4447 y 4448.....	121
10.4 Continuidad investigativa y validaciones complementarias	122
Figura 10.4.1. Esquema representativo del diseño experimental de desafío de alimentación y desafío de infección por cohabitación en salmones del Atlántico contra <i>P. salmonis</i> LF-89.....	122

Tabla 10.4.1. Partidores de RT-qPCR, secuencias de partidores directos e inversos, temperatura de fusión (T _m ; °C), y número de acceso obtenido del National Center of Biotechnology Information (NCBI).....	123
Figura 10.4.2. Expresión relativa de genes del sistema inmune innato en riñón anterior de salmónes del Atlántico desafiados con <i>P. salmonis</i> LF-89 por cohabitación durante 40 días.....	124
Figura 10.4.3. Expresión relativa de genes del sistema inmune innato en bazo de salmónes del Atlántico desafiados con <i>P. salmonis</i> LF-89 por cohabitación durante 40 días.....	125
Figura 10.4.4. Expresión relativa de genes del sistema inmune innato en hígado de salmónes del Atlántico desafiados con <i>P. salmonis</i> LF-89 por cohabitación durante 40 días.....	126
Figura 10.4.5. Gráfico de contingencia.....	126

10.2. Cromatogramas de los péptidos sintéticos preseleccionados

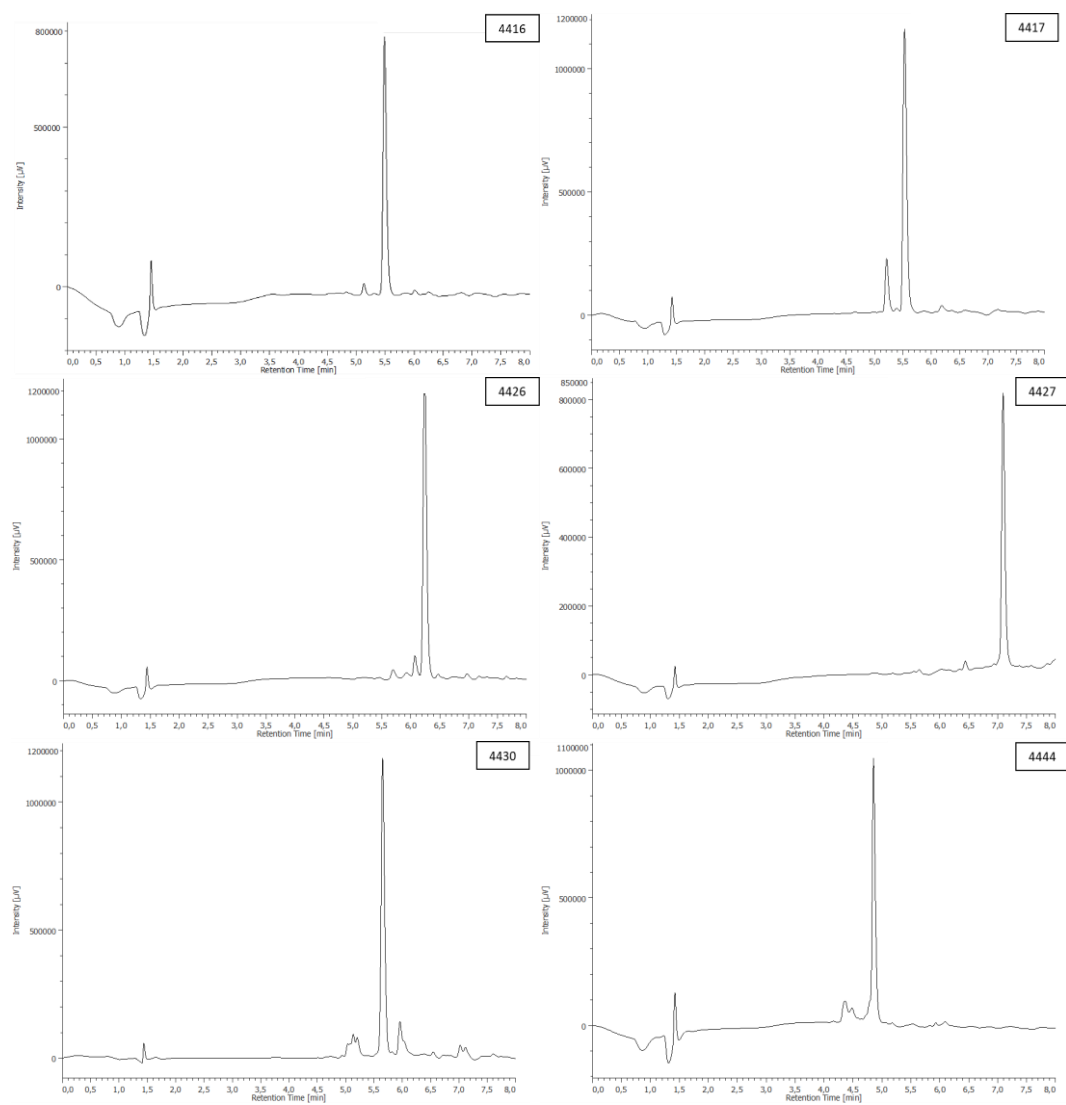


Figura 10.2.1. Cromatogramas de los péptidos sintéticos antioxidantes 4416, 4417, 4426, 4427, 4430, y 4444.

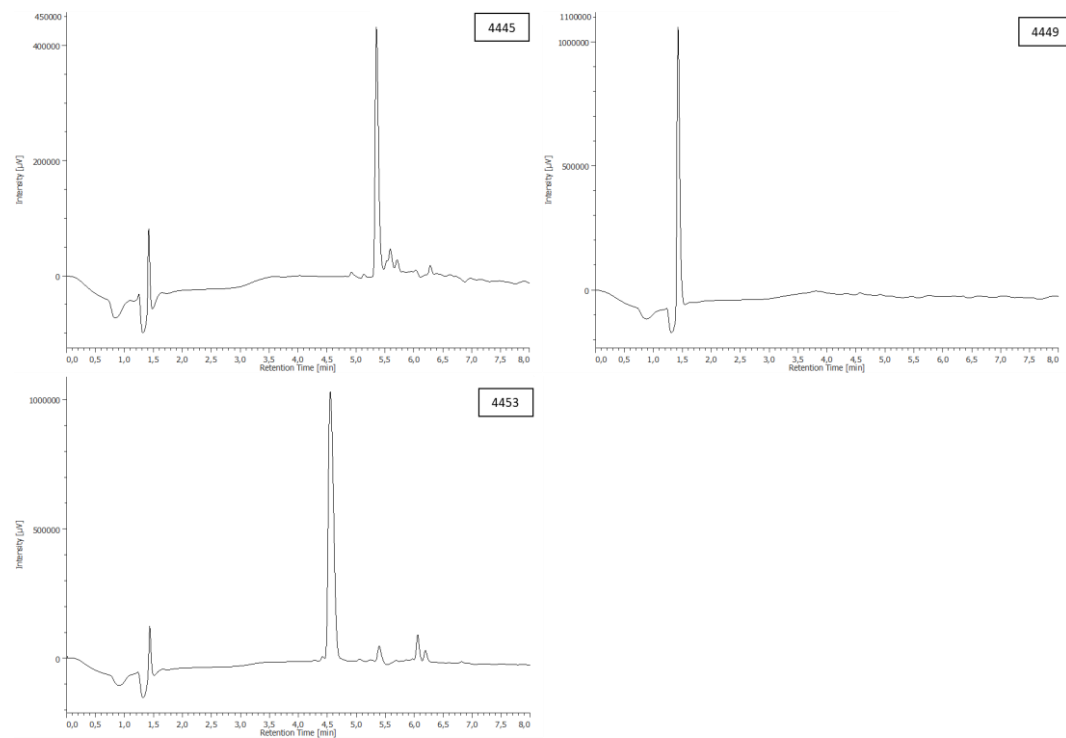


Figura 10.2.2. Cromatogramas de los péptidos sintéticos antioxidantes 4445, 4449, y 4453.

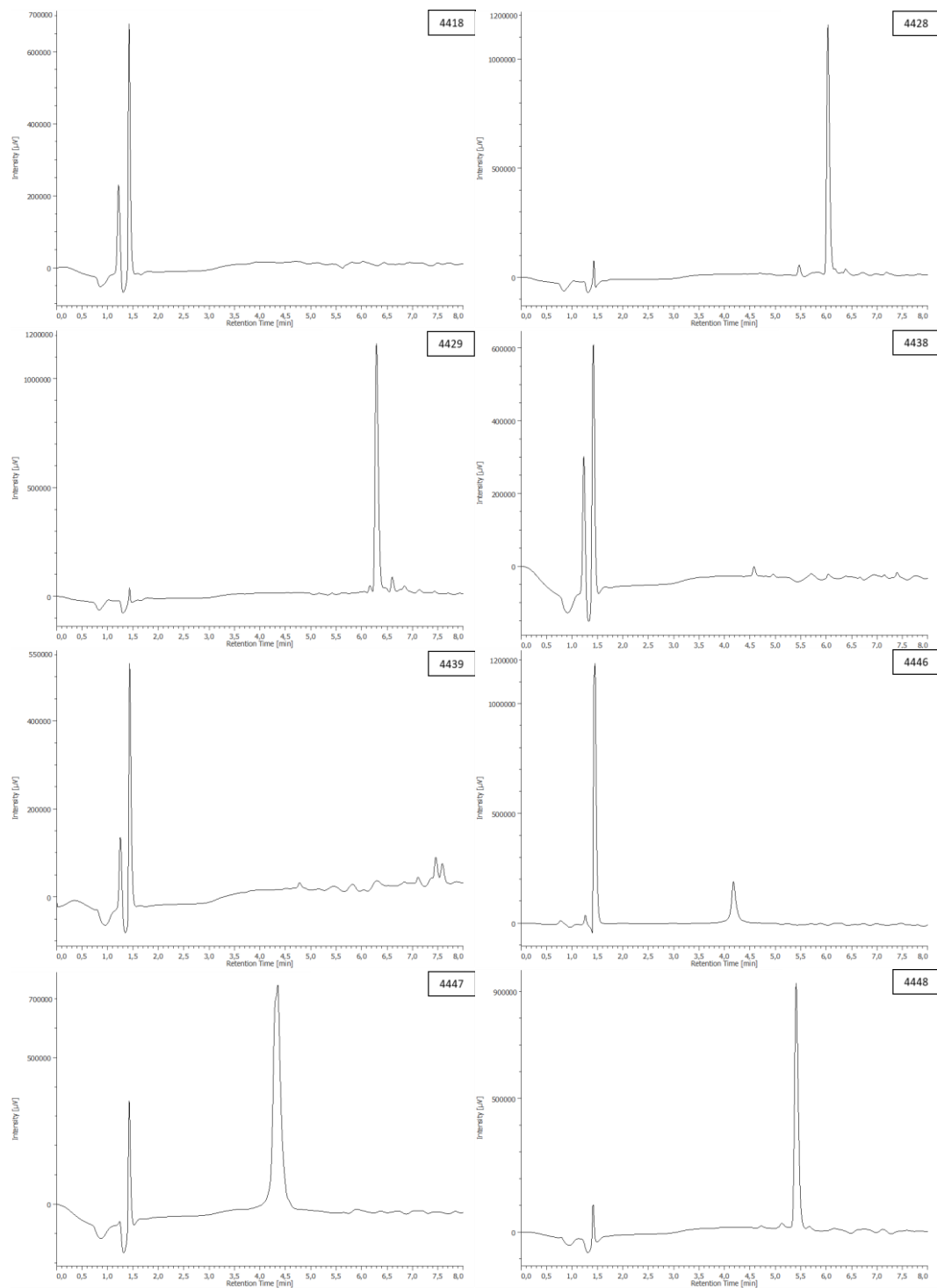


Figura 10.2.3. Cromatogramas de los péptidos sintéticos quelantes de hierro 4418, 4428, 4429, 4438, 4439, 446, 4447, y 4448.

10.3 Espectrometría de masas de los péptidos sintéticos preseleccionados

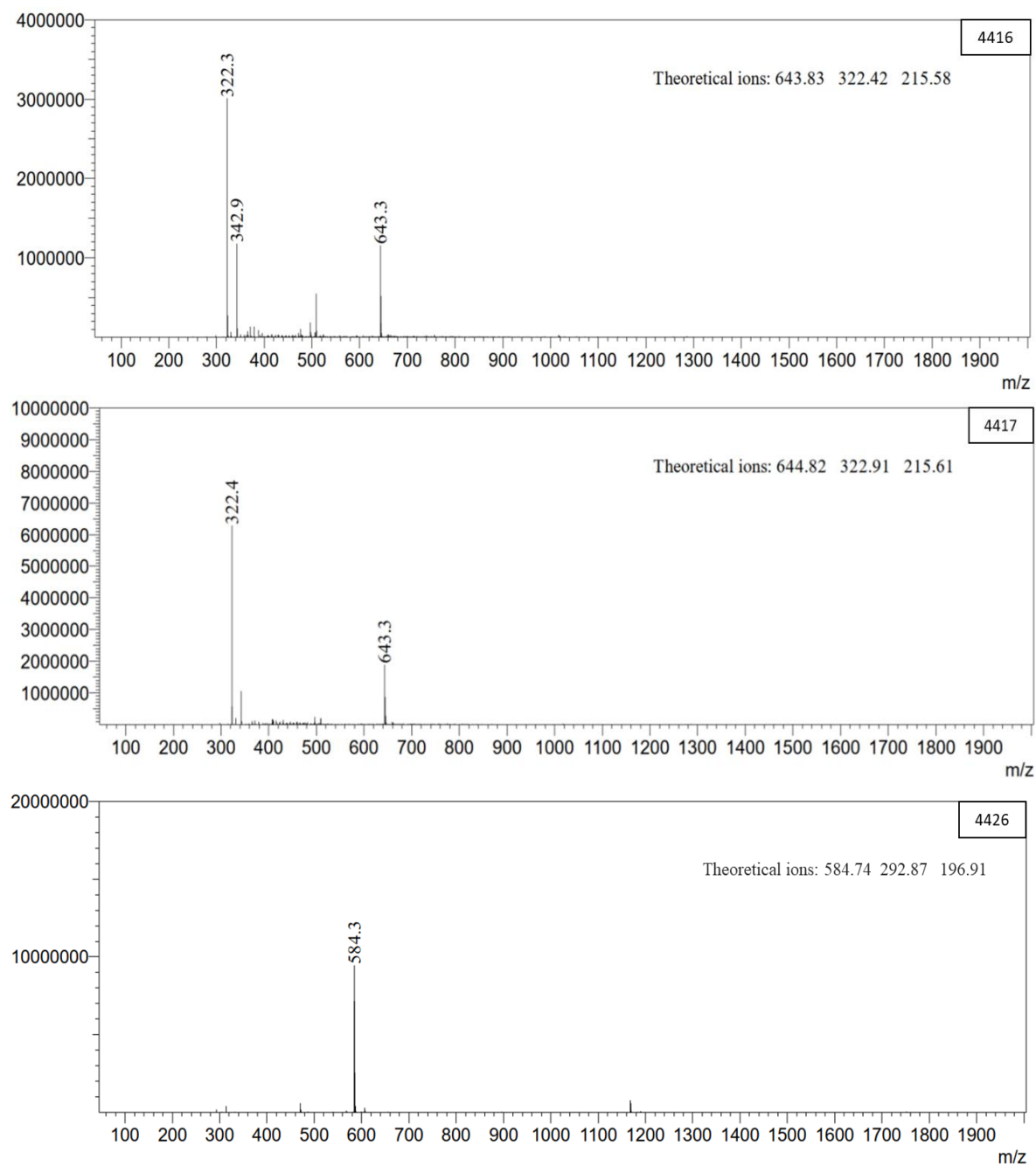


Figura 10.3.1 Reportes de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos antioxidantes 4416, 4417, y 4426.

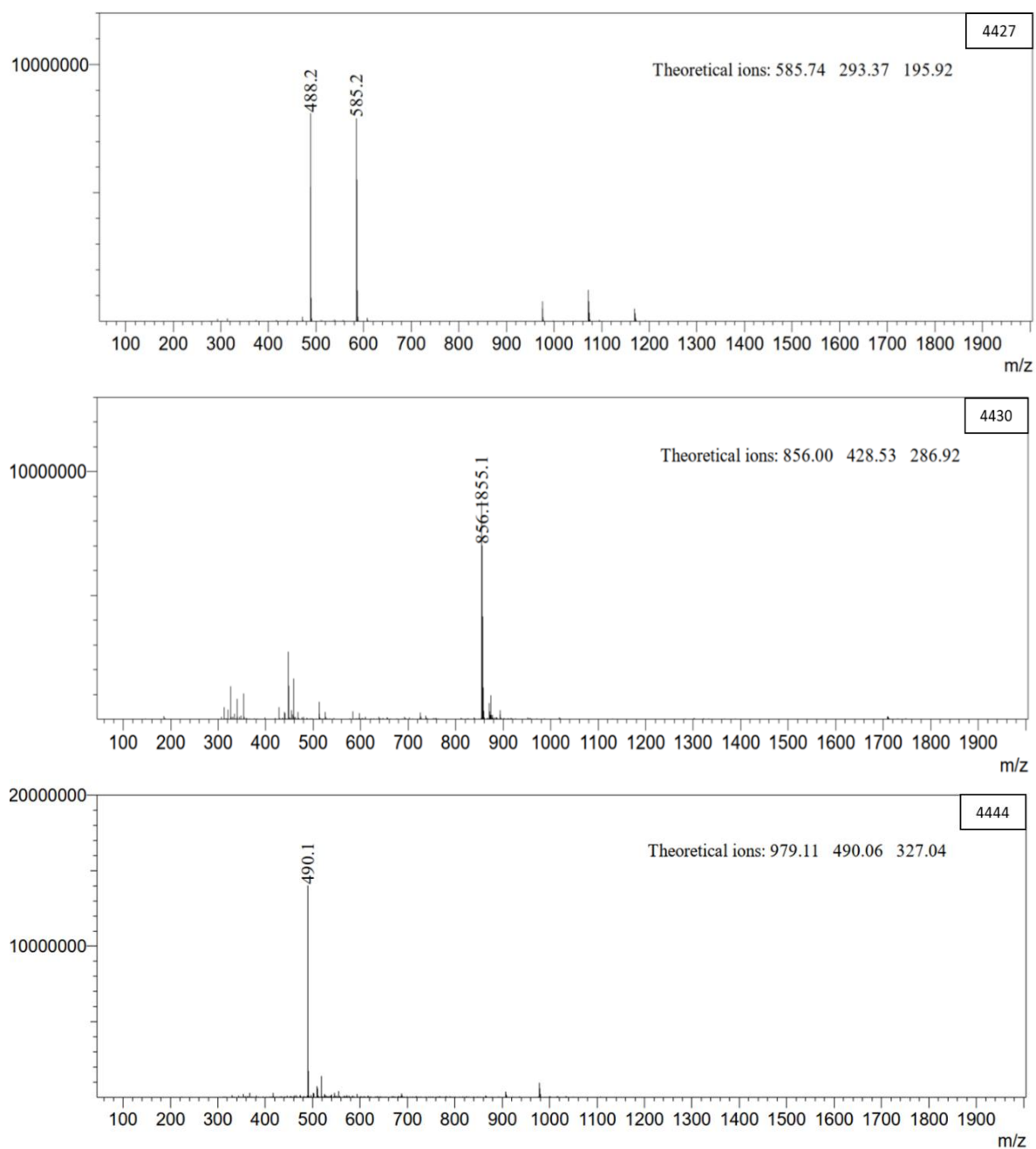


Figura 10.3.2 Reportes de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos antioxidantes 4427, 4430, y 4444.

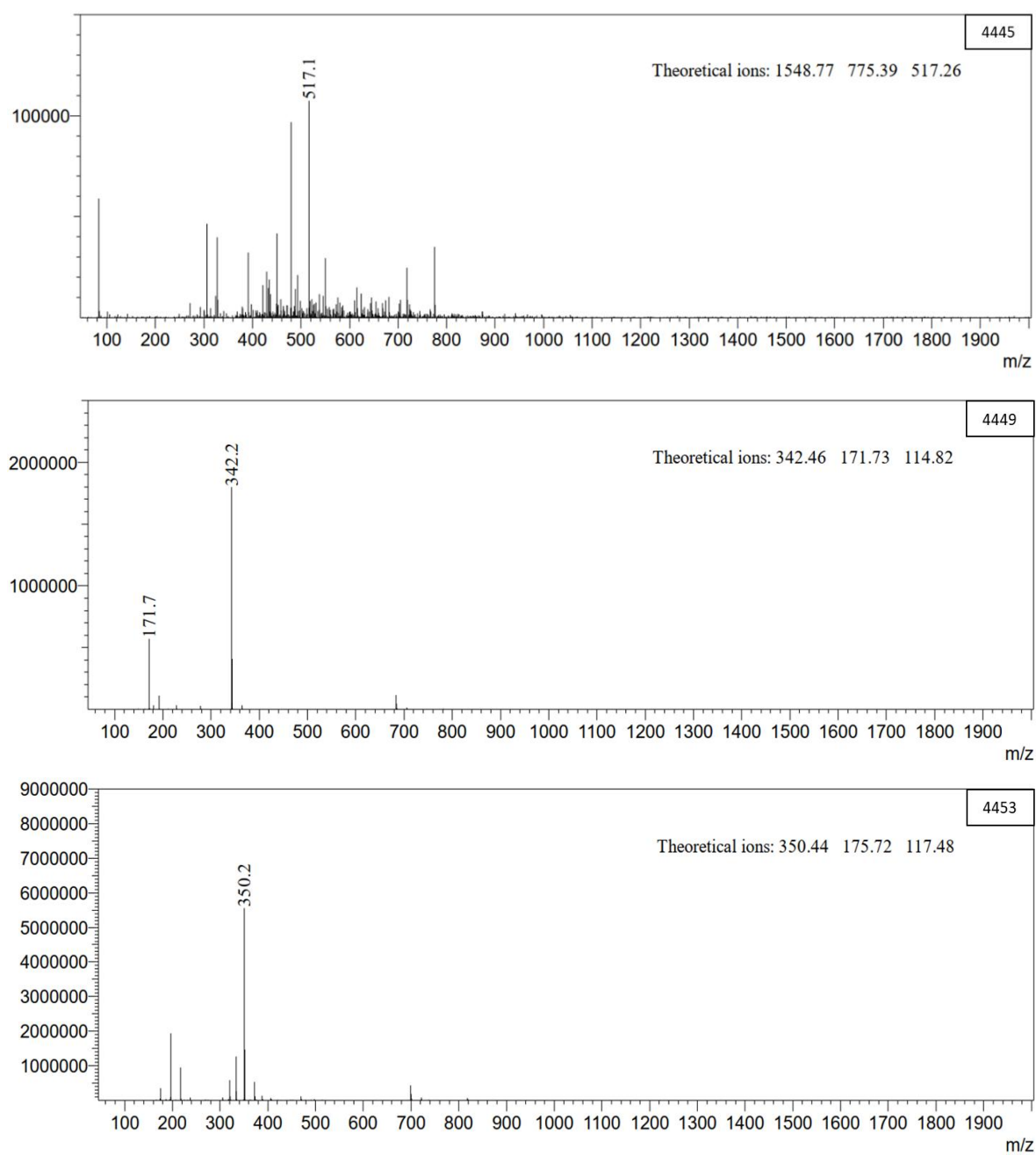


Figura 10.3.3 Reportes de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos antioxidantes 4445, 4449, y 4453.

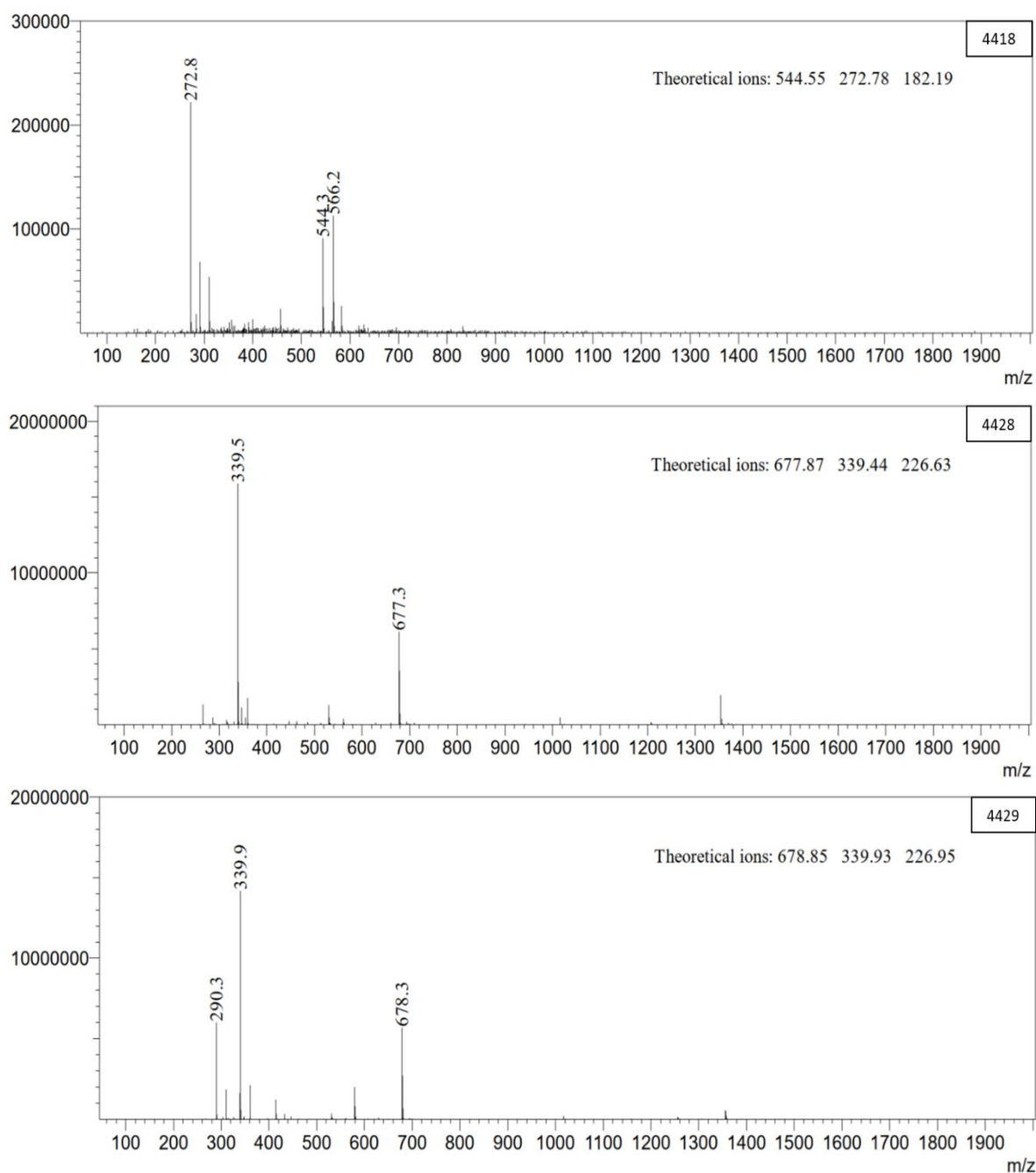


Figura 10.3.4 Reportes de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos quelantes de hierro 4418, 4428, y 4429.

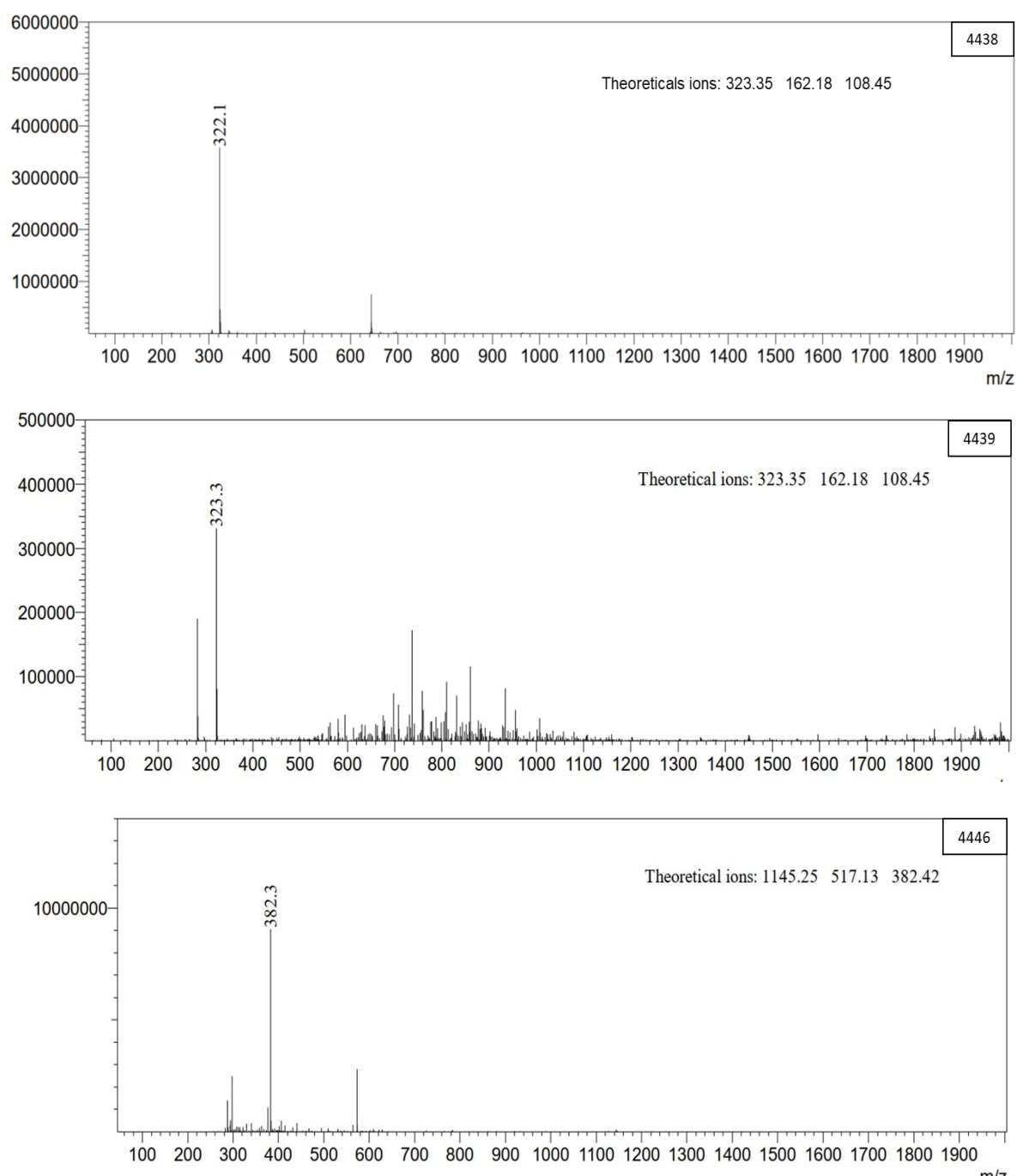


Figura 10.3.5 Reportes de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos quelantes de hierro 4438, 4439, y 4446.

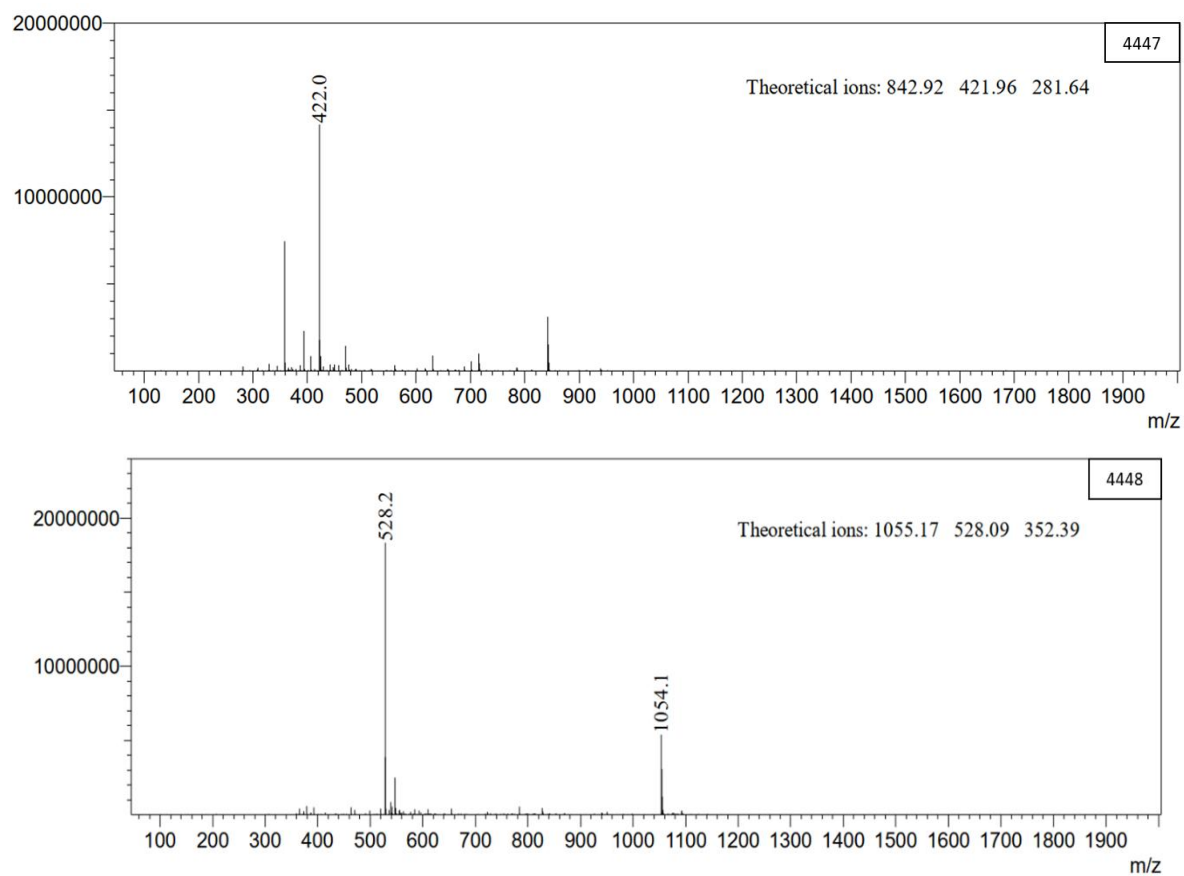


Figura 10.3.6 Reporte de espectrometría de masas de los péptidos sintéticos quelantes de hierro 4447 y 4448.

10.4 Continuidad investigativa y validaciones complementarias

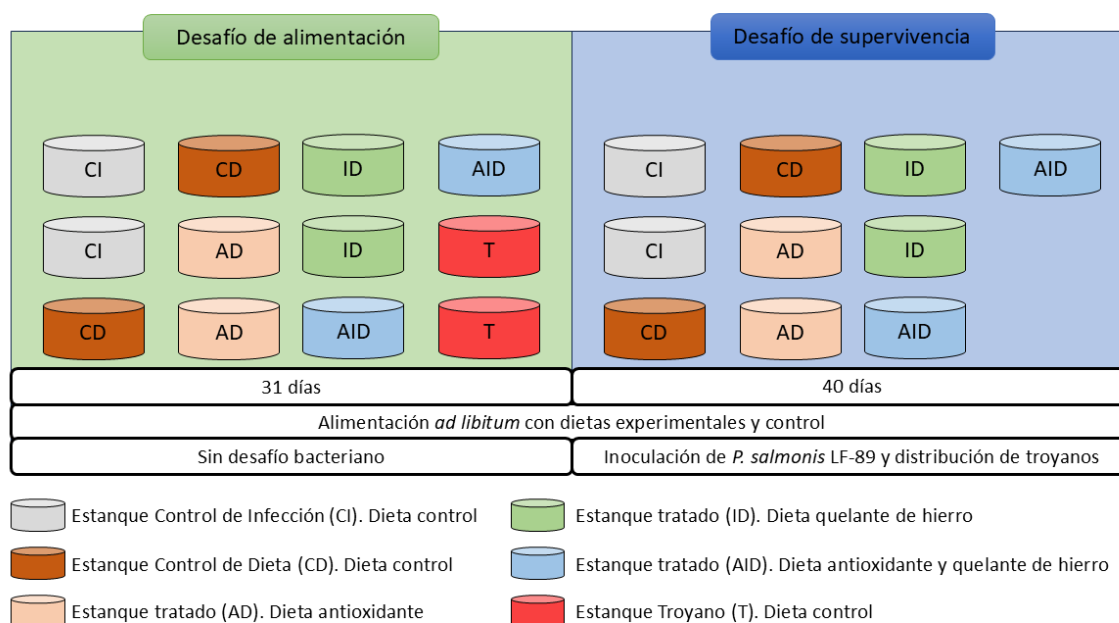


Figura 10.4.1. Esquema representativo del diseño experimental de desafío de alimentación y desafío de infección por cohabitación en salmones del Atlántico contra *P. salmonis* LF-89. Luego de 14 días de período de aclimatación, 250 salmones del Atlántico fueron anestesiados, medidos, pesados y equitativa y aleatoriamente distribuidos entre 10 estanques con agua de mar. Durante 31 días (Desafío de alimentación), los peces fueron alimentados *ad libitum* con dietas experimentales con péptido sintético adicionado (AD, ID y AID) o dieta control. Al final del período de desafío de alimentación, aleatoriamente se seleccionaron 80 peces del estanque Troyano, los cuales fueron inoculados con *P. salmonis* LF-89 (10^5 CFU/ml), y 20 peces que fueron inoculados con medio SBS lactosa, ambos por inyección intraperitoneal. Posteriormente, los peces inoculados con *P. salmonis* LF-89 fueron equitativamente distribuidos entre los estanques AD, ID, AID y CD, mientras que los peces inoculados con medio SBS lactosa fueron equitativamente distribuidos entre los estanques Control de Infección, dando inicio al desafío de infección por cohabitación que tuvo una duración de 40 días, manteniendo el esquema de alimentación del desafío de alimentación. Todos los estanques fueron evaluados por duplicado.

Tabla 10.4.1. Partidores de RT-qPCR, secuencias de partidores directos e inversos, temperatura de fusión (Tm; °C), y número de acceso obtenido del National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Gen	Secuencia de forward	Secuencia de reverse	Tm	Número de acceso
<i>ef1a</i>	GTCTACAAAATCGGCG GTAT	CTTGACGGACACGTTCT TGA	60	NM_001141909 .1
<i>18S</i>	GGGTCCGAAGCGTTTA CTTTG	CCTAGCTGCGGTATTCA GGC	60	XR_006763448 .1
<i>gadph</i>	CCTGCAGAAGGGAATC AAAGTCGT	TCTCATGGGGCTTCATA CACT	60	XM_045718648 .1
<i>il1b</i>	GTCACATTGCCAACCT CATCATCG	GTTGAGCAGGTCCTTG TCCTTGAA	60	NM_001123582 .1
<i>il8</i>	TGTCGCTGCATTGAGA CGGAAA	AGCGCTGACATCCAGA CAATTC	60	NM_001140710 .3
<i>tgfb</i>	AGTTGCCTTGTGATTG TGGGA	CTCTTCAGTGGTTTGTC G	60	XM_014129261 .2
<i>cath</i>	AAGCCAGAAAATGCTC CAGA	CTCAGGCGACCAATTAA GGA	60	NM_001123586 .1
<i>il10</i>	ATGAGGCTAATGACGA GCTGGAGA	GGTGTAGAATGCCTTC GTCCAACA	60	XM_045705802
<i>sod1</i>	CCACGTCCATGCCTTT GG	TCAGCTGCTGCAGTCA CGTT	60	NM_001123587 .1
<i>hep</i>	GAAGGCCTTTAGTGTT GCAGTGGT	GTTGATGTTCCCCAACT GGA CTGT	60	AF542965.1
<i>glyA</i>	CCAGTGGTTTGCGTTT AGGC	GCTGCCTGCTTGGTCTT TTC	64	QGP40124.1

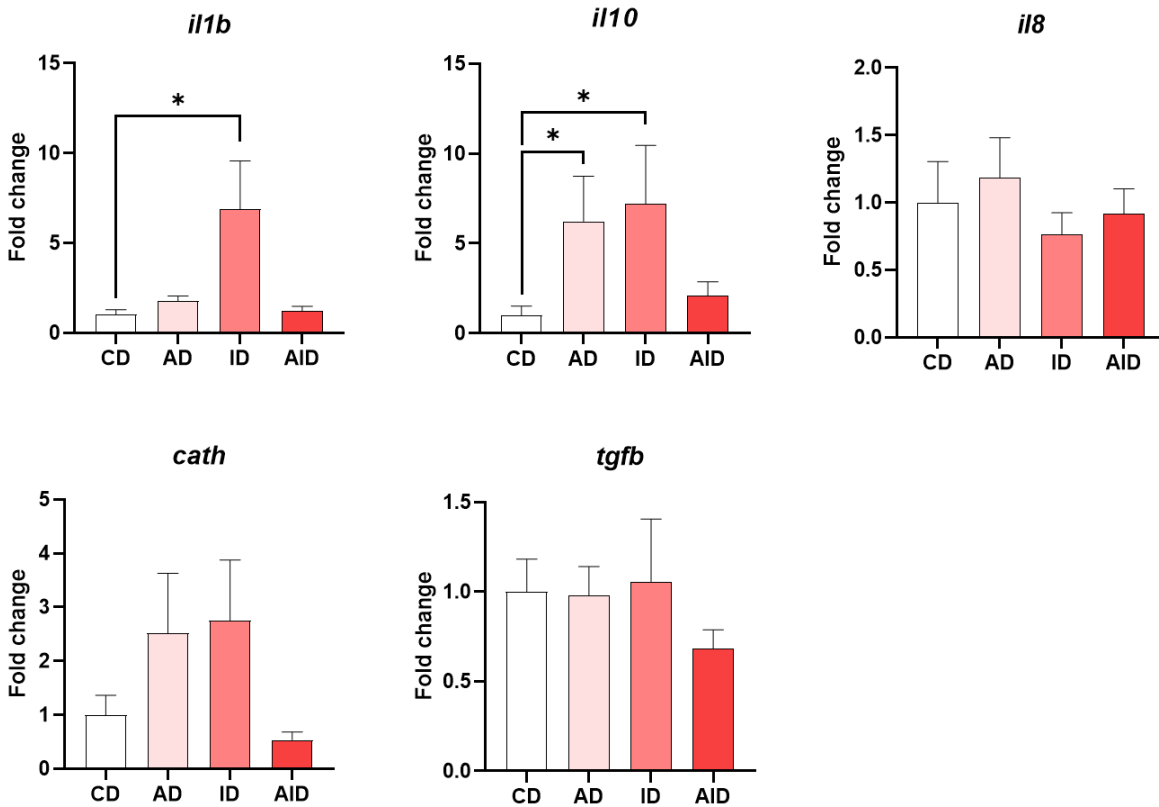


Figura 10.4.2. Expresión relativa de genes del sistema inmune innato en riñón anterior de salmones del Atlántico desafiados con *P. salmonis* LF-89 por cohabitación durante 40 días. Cada barra representa la media $\pm$ error estándar de la media ($n = 8$). Las diferencias significativas están denotadas por una marca (*) cuando $p < 0,05$, y fueron obtenidas a través de t-test o Mann-Whistney U Test, luego del análisis de normalidad por Shapiro-Wilk normality test.

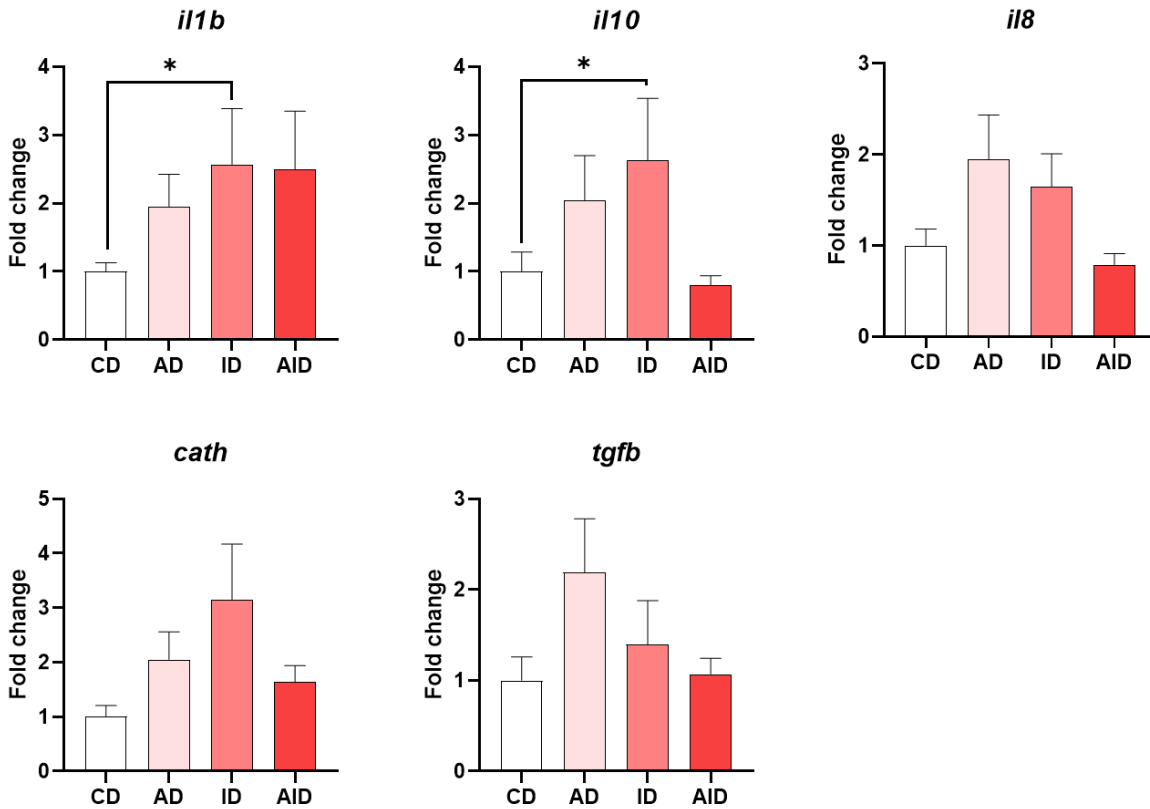


Figura 10.4.3. Expresión relativa de genes del sistema inmune innato en bazo de salmónes del Atlántico desafiados con *P. salmonis* LF-89 por cohabitación durante 40 días. Cada barra representa la media $\pm$ error estándar de la media ($n = 8$). Las diferencias significativas están denotadas por una marca (*) cuando $p < 0,05$, y fueron obtenidas a través de t-test o Mann-Whistney U Test, luego del análisis de normalidad por Shapiro-Wilk normality test.

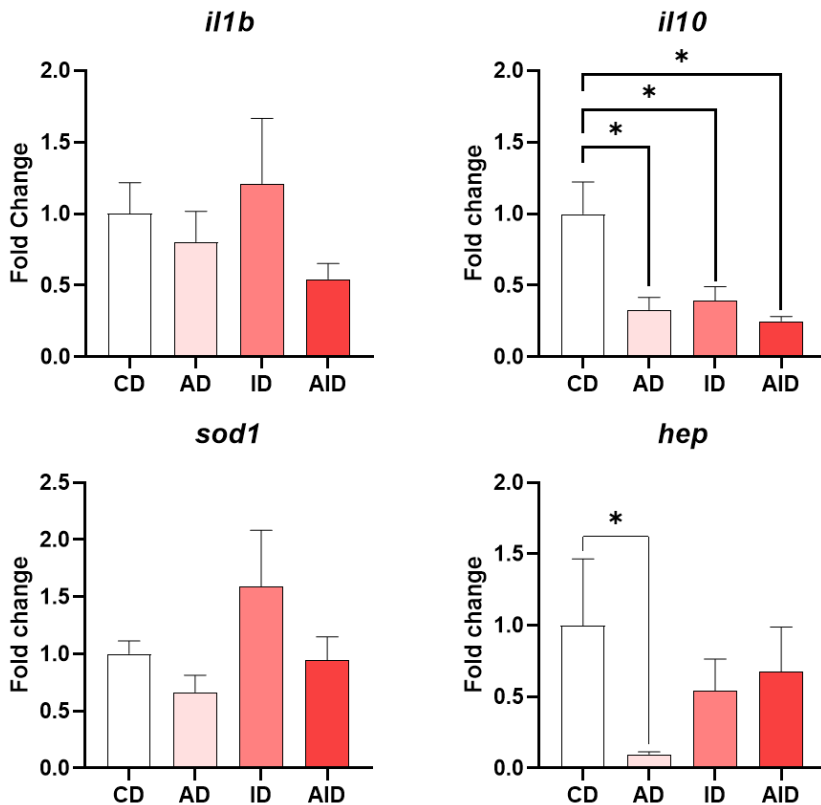


Figura 10.4.4. Expresión relativa de genes del sistema inmune innato en hígado de salmones del Atlántico desafiados con *P. salmonis* LF-89 por cohabitación durante 40 días. Cada barra representa la media $\pm$ error estándar de la media ($n = 8$). Las diferencias significativas están denotadas por una marca (*) cuando $p < 0,05$, y fueron obtenidas a través de t-test o Mann-Whistney U Test, luego del análisis de normalidad por Shapiro-Wilk normality test.

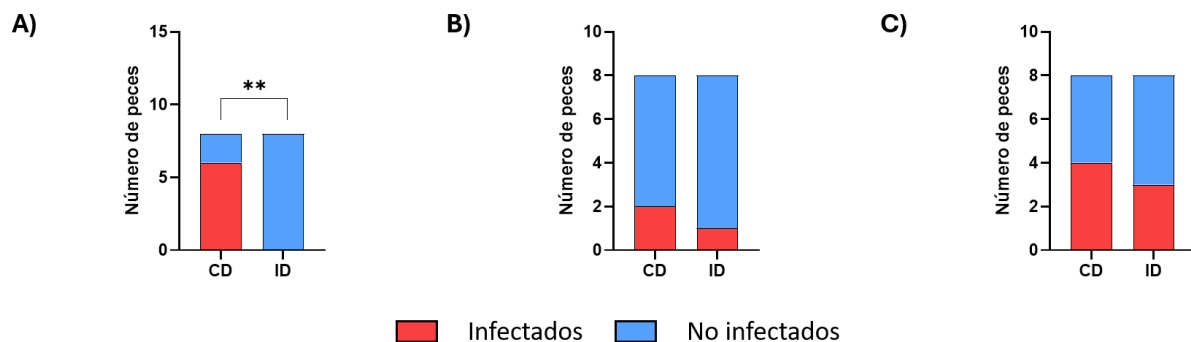


Figura 10.4.5. Gráfico de contingencia donde se agrupan los peces en las categorías de “Infectados” o “No infectados” en base a muestras de A) riñón anterior, B) bazo, e C) hígado

obtenidas de salmón del Atlántico al final del desafío de infección contra *P. salmonis* LF-89 y alimentados con la dieta experimental con aditivo de péptido quelante de hierro (ID) (n=8). Las proporciones de Infectados/No Infectados fueron determinadas a través de RT-qPCR, considerando Infectados a los peces desafiados que presentaron un valor de Cq inferior al valor de Cq obtenido de las muestras de peces del estanque CI, y No Infectados a los peces desafiados que presentaron un valor de Cq superior al valor de Cq obtenido de las muestras de peces del estanque CI. Las diferencias significativas están denotadas por dos marcas (**) cuando $p < 0,01$, siendo obtenidas a través de Fisher's exact test.