

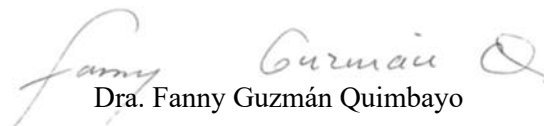
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
Programa Conjunto de Doctorado en Biotecnología

“Diseño y síntesis de péptidos inhibidores de acetilcolinesterasa para el control del parásito *Caligus rogercresseyi*”

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
Doctor en Biotecnología

Tanya Román Banchemo

Profesoras Guías:



Dra. Fanny Guzmán Quimbayo

Dra. Constanza Cárdenas Carvajal

Valparaíso, 2025



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

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

Título del trabajo: "Diseño y síntesis de péptidos inhibidores de acetilcolinesterasa para el control del parásito *Caligus rogercresseyi*"

Nombre del candidato(a): Tanya Román Banchemo

Carrera / Grado: Bioquímica/Doctor en Biotecnología

Campus: Casa Central Valparaíso ; **Departamento:** Núcleo de Biotecnología de Curauma

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Dra. Fanny Guzmán Quimbayo, 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

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:

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: 30.08.2025

Firma:

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: 30.08.2025

Firma:

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

Agradecimientos

En estas breves palabras, quiero expresar mi profunda gratitud a todas las personas que han sido parte de este camino y que, de una u otra manera, hicieron posible la culminación de este proyecto.

A la Dra. Fanny Guzmán, por su guía y compañía a lo largo de todos estos años de trabajo conjunto. Su constante apoyo ha sido fundamental para mi crecimiento, no solo en lo profesional, sino también en lo personal. Sus sabios consejos y su generosidad infinita, siempre dispuesta a compartir su conocimiento y experiencia, serán ejemplo que llevaré conmigo siempre.

A la Dra. Constanza Cárdenas, quien ha sido un pilar de apoyo incansable, brindándome ideas y acompañándome en cada momento de este proceso. Su disposición y compromiso para ayudar han sido una fuente de inspiración. Su presencia ha sido fundamental en mi crecimiento, y por ello le estaré siempre agradecida.

Mi agradecimiento también se extiende a todo el equipo de Síntesis de Péptidos, tanto a quienes están presentes, Mónica y Dina, como a quienes ya no lo están, Adriana, Paula y Claudio. Cada desayuno de cumpleaños y nuestras caminatas de mediodía fueron momentos preciosos. Las risas compartidas, el trabajo en equipo, sin olvidar las ricas arepas y el chocolate caliente se convirtieron en pequeños rituales que fortalecieron nuestros lazos.

No puedo dejar de mencionar la colaboración de CRC Innovación, especialmente a Juan Pablo, cuya hospitalidad durante mis largas visitas fueron siempre acogedoras. A mis queridos amigos Fernanda, Jose y Stefanny, quienes me brindaron su constante apoyo y disposición en todo momento. También agradezco al IQAC, en particular al Profesor Fernando y Gerardo, quienes me recibieron con los brazos abiertos durante la pasantía en Barcelona.

Finalmente, quiero expresar mi eterna gratitud a mi núcleo, quienes han sido incondicionales en cada etapa. A mis amigos, padres, hermano, Kote y mor, no tengo palabras suficientes para agradecerles su apoyo y su paciencia infinita. Gracias por creer en mí.

Abstract

The salmon farming industry in Chile faces significant challenges due to infestations by the ectoparasite *Caligus rogercresseyi*, which causes substantial economic losses. Current treatments, mostly based on organophosphates that inhibit the enzyme acetylcholinesterase (AChE), are hindered by the parasite's growing resistance. This necessitates the use of higher drug doses, increasing both costs and environmental risks. In this context, the search for new therapeutic alternatives focuses on the development of bioactive peptides due to their low risk of resistance and reduced environmental impact, with fish mucus being considered a promising matrix for their discovery, given its role as the first line of defense.

This research focused on the identification and evaluation of peptides to identify potential AChE inhibitors; a key therapeutic target due to its role in nerve impulse transmission in parasites. Using an *in silico* modeling approach and *in vitro* assays, a QSAR model (quantitative structure-activity relationship) was employed to predict the AChE inhibitory activity of 959 peptides derived from the mucus of *Salmo salar*. Of these, 21 peptides were selected for their inhibitory potential. These peptides were synthesized and tested in antiparasitic assays, demonstrating that four of them induced 100% mortality in *C. rogercresseyi* at a concentration of 100 μ M, with hemolysis rates in salmon cells below 5% and a survival rate greater than 80% in RTgill cell lines.

The analysis of AChE inhibitory properties revealed that peptides AS4528, AS4531, and AS4532 inhibited the enzyme, with AS4532 showing the highest activity. Additionally, molecular docking analysis suggested that peptide AS4532 formed stronger interactions with the key residues of AChE's active site, highlighting its potential as a selective inhibitor. Furthermore, activity was enhanced by synthesizing a modified peptide, AS5372, derived from AS4532, which demonstrated a significant improvement in AChE inhibition and lower cytotoxicity in RTgill cells compared to the original peptide. This suggests that AS5372 could be a promising candidate for future studies. However, further research on the safety and bioavailability of these peptides in fish is required to assess their viability as a therapeutic treatment.

In summary, peptides derived from the mucus of *Salmo salar* show great potential as selective AChE inhibitors, opening new possibilities for treating caligidosis and offering a more sustainable and less resistance-prone alternative for the salmon farming industry.

Resumen

La industria de la salmonicultura en Chile enfrenta serios desafíos debido a la infestación por el ectoparásito *Caligus rogercresseyi*, que causa importantes pérdidas económicas. Los tratamientos actuales, en su mayoría basados en compuestos organofosforados que inhiben la enzima acetilcolinesterasa (AChE), se ven afectados por la resistencia creciente del parásito, lo que obliga a utilizar dosis mayores de estos fármacos y aumenta tanto los costos como los riesgos ambientales. En este contexto, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas se enfoca en el desarrollo de péptidos bioactivos por su bajo riesgo de generar resistencia y su reducido impacto ambiental, teniendo en consideración el mucus de peces como una matriz prometedora para la búsqueda, debido a su función como primera barrera de defensa.

La presente investigación se centró en la identificación y evaluación de péptidos, con el objetivo de encontrar posibles inhibidores de la AChE, un objetivo terapéutico clave debido a su rol en la transmisión del impulso nervioso en los parásitos. Mediante un enfoque de modelado *in silico* y ensayos *in vitro*, se utilizó un modelo QSAR (relación cuantitativa estructura-actividad) para predecir la actividad inhibidora de AChE de 959 péptidos derivados del mucus de *Salmo salar*. De estos, 21 péptidos fueron seleccionados por su potencial inhibidor. Estos péptidos fueron sintetizados y probados en ensayos antiparasitarios, demostrando que cuatro de ellos inducían una mortalidad del 100% en *C. rogercresseyi* a una concentración de 100 μM , con tasas de hemólisis en células de salmón inferiores al 5% y una sobrevivencia mayor al 80% en línea celular RTgill. El análisis de las propiedades de inhibición de la AChE mostró que los péptidos AS4528, AS4531 y AS4532 inhibieron la enzima, sin embargo el péptido AS4532 fue quien presentó mayor actividad. Además un análisis de docking molecular sugirió que el péptido AS4532 formó interacciones más fuertes con los residuos clave del sitio activo de AChE, lo que resalta su potencial como inhibidor selectivo. Por otro lado, se logró potenciar la actividad, al sintetizar un péptido modificado AS5372, obtenido a partir de AS4532, quien mostró una mejora significativa en la inhibición de AChE, con una menor citotoxicidad en células de RTgill que el péptido original, lo que sugiere que puede ser un buen candidato para estudios futuros. No obstante, es necesario realizar más investigaciones sobre la seguridad y biodisponibilidad de estos péptidos en peces, para evaluar su viabilidad como tratamiento terapéutico.

En resumen, los péptidos derivados del mucus de *Salmo salar* presentan un gran potencial como inhibidores selectivos de AChE, abriendo nuevas posibilidades para el tratamiento de la caligidosis. En este contexto, el uso de QSAR como herramienta permite predecir la afinidad de estos péptidos, lo que facilita su evaluación y optimización, acelerando el desarrollo de compuestos terapéuticos eficaces..

Índice General

ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ABREVIATURAS.....	10
1 INTRODUCCIÓN.....	11
2 MARCO TEÓRICO	12
2.1 SALMONICULTURA EN CHILE Y PROBLEMAS ASOCIADOS AL PARÁSITO <i>CALIGUS ROGERCRESSEYI</i>	12
2.2 CICLO BIOLÓGICO DE <i>CALIGUS ROGERCRESSEYI</i>	12
2.3 IMPACTO DE LAS INFESTACIONES POR <i>CALIGUS ROGERCRESSEYI</i>	13
2.4 NORMATIVAS PARA EL CONTROL DE <i>CALIGUS ROGERCRESSEYI</i> EN CHILE	14
2.5 TRATAMIENTOS PARA EL CONTROL DE <i>CALIGUS ROGERCRESSEYI</i> EN CHILE.....	15
2.6 CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA AChE.....	17
2.7 PÉPTIDOS, MOLÉCULAS CON POTENCIAL BIOACTIVIDAD	19
2.8 PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS POR SÍNTESIS QUÍMICA	20
2.9 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA.....	21
2.10 MODELO PREDICTIVO QSAR.....	23
3 HIPÓTESIS	25
4 OBJETIVOS	25
4.1 OBJETIVO GENERAL	25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1 SECUENCIAS PEPTÍDICAS PRESENTES EN MUCUS DE <i>SALMO SALAR</i>	27
5.2 IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS POTENCIALES INHIBIDORES DE AChE	27
5.3 SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS SELECCIONADOS	28
5.4 ENSAYOS ANTIPARASITARIOS CONTRA <i>C. ROGERCRESSEYI</i>	31
5.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LOS PÉPTIDOS SELECCIONADOS.....	33
5.6 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS RTGILL MEDIANTE WST-1.....	34
5.7 CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA	35
5.8 ANÁLISIS DE DOCKING DE LOS PÉPTIDOS SELECCIONADOS CON AChE.....	35
5.9 OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO ENZIMÁTICO DE AChE DE <i>C. ROGERCRESSEYI</i>	36
5.10 INMUNODETECCIÓN DE AChE EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE <i>C. ROGERCRESSEYI</i>	36
5.11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE AChE EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE <i>C. ROGERCRESSEYI</i>	37
5.12 EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE LOS PÉPTIDOS EN AChE 37	
5.13 CÁLCULO DE LAS VELOCIDADES INICIALES (V_0).....	38
5.14 GRÁFICOS DE LINEWEAVER-BURK.....	38
5.15 GRÁFICO SECUNDARIO KAP V/S [I]	38
5.16 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FUNCIONAL DE LOS PÉPTIDOS MODIFICADOS	39
5.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39

6	RESULTADOS.....	40
6.1	SELECCIÓN DE POTENCIALES PÉPTIDOS INHIBIDORES DE AChE MEDIANTE MODELO QSAR	40
6.2	SÍNTESIS QUÍMICA Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS SELECCIONADOS.....	42
6.3	ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS CONTRA <i>C. ROGERCRESSEYI</i>	42
6.4	ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE LOS CUATRO PÉPTIDOS SELECCIONADOS CONTRA <i>C. ROGERCRESSEYI</i>	43
6.5	DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA.....	45
6.6	CARACTERIZACIÓN DE LA AChE DE <i>C. ROGERCRESSEYI</i>	47
6.7	INMUNODETECCIÓN DE LA ENZIMA AChE EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO	51
6.8	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA AChE DE <i>C. ROGERCRESSEYI</i>	52
6.9	MECANISMO DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA DE AChE DE <i>C. ROGERCRESSEYI</i> POR LOS PÉPTIDOS SELECCIONADOS	53
6.10	ESTUDIO DE DOCKING MOLECULAR	55
6.11	MODIFICACIONES DEL PÉPTIDO SELECCIONADO	61
6.12	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FUNCIONAL DE LOS PÉPTIDOS MODIFICADOS	61
6.13	ESTUDIO DE DOCKING MOLECULAR DE AS5372	65
7	DISCUSIÓN.....	68
7.1	EFICACIA DE PÉPTIDOS SELECCIONADOS MEDIANTE MODELO QSAR	68
7.2	CONSERVACIÓN DE SECUENCIA Y ESTRUCTURA EN AChE DE DIFERENTES ESPECIES.....	70
7.3	MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PÉPTIDOS SELECCIONADOS	71
7.4	POTENCIAL TRATAMIENTO PARA COMBATIR <i>C. ROGERCRESSEYI</i>	73
7.5	AUMENTO DE EFECTIVIDAD DE PÉPTIDOS MODIFICADOS	74
8	CONCLUSIÓN.....	76
9	PROYECCIONES.....	77
10	PRODUCTOS.....	78
11	REFERENCIAS	82
12	MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	91

Índice de Tablas

Tabla 1: Clasificación de los productos quimioterapéuticos utilizados hoy en día en Chile para el control de <i>C. rogercresseyi</i>	15
Tabla 2: Péptidos seleccionados según el modelo QSAR con IC_{50} predictivo de AChE.	41
Tabla 3: Porcentaje de supervivencia de <i>C. rogercresseyi</i> a lo largo del tiempo después de ser expuestos a los péptidos.	43
Tabla 4: Valores de EC_{50} calculado a partir de los gráficos dosis dependiente.	45
Tabla 5: Propiedades fisicoquímicas calculadas con el paquete Peptides (Osorio et al., 2015).....	47
Tabla 6: Números de acceso para las secuencias y modelos estructurales de la AChE de diferentes organismos.	48
Tabla 7: Valores de V_{max} , K_{ap} y K_i de la actividad de AChE de <i>C. rogercresseyi</i> utilizando los cuatro péptidos seleccionados.55	55
Tabla 8: Resultados del análisis post-docking con PRODIGY para la AChE de <i>C. rogercresseyi</i> con los péptidos seleccionados.	60
Tabla 9: Péptidos modificados a partir de la secuencia AS4532.	61
Tabla 10: Valores de EC_{50} calculado a partir de los gráficos dosis dependiente.	63
Tabla 11: Tabla comparativa de los valores de V_{max} y K_{ap} de la actividad de AChE de <i>C. rogercresseyi</i> utilizando los péptidos modificados respecto al original.	65
Tabla 12: Resultados del análisis post-docking con PRODIGY para la AChE de <i>C. rogercresseyi</i> con el péptido AS5372.....	67

Índice de Figuras

Figura 1: El ciclo de vida de <i>C. rogercresseyi</i> abarca tres fases del desarrollo.....	13
Figura 2: Representación esquemática adaptada de sinapsis normal (verde y amarillo), y en la presencia de un OP (rojo) (George et al., 2014).	17
Figura 3: Disposición en el sitio activo de la enzima AChE de <i>Electrophorus electricus</i>	18
Figura 4: Esquema general de la síntesis de péptidos en fase sólida.	22
Figura 5: Esquema resumido del flujo de trabajo para cada objetivo desarrollado.	26
Figura 6: Esquema de síntesis en fase sólida Fmoc por la metodología “Tea bag”.	29
Figura 7: Esquema del procedimiento para el screening de actividad antiparasitaria de los péptidos contra <i>C. rogercresseyi in vitro</i>	32
Figura 8: Esquema del procedimiento de la actividad hemolítica de los péptidos seleccionados en eritrocitos de <i>Salmo salar in vitro</i>	34
Figura 9: Correlación entre IC50 predicho y experimental.	40
Figura 10: Evaluación de la supervivencia <i>C. rogercresseyi</i> en estadio nauplius..	42
Figura 11: Evaluación de letalidad de los péptidos seleccionados sobre <i>C. rogercresseyi</i>	44
Figura 12: Actividad hemolítica de los péptidos seleccionados.	45
Figura 13: Viabilidad celular de RTgill con los péptidos seleccionados.....	46
Figura 14: Comparación de secuencias de AChE.....	49
Figura 15: Comparación estructural de AChE.....	50
Figura 16: Modelo estructural de la AChE 1A de <i>C. rogercresseyi</i>	51
Figura 17: Identificación de la enzima AChE en el extracto enzimático.....	52
Figura 18: Graficos para la determinación de la actividad enzimática de AChE de <i>C. rogercresseyi</i>	53
Figura 19: Estudios cinéticos sobre el mecanismo de inhibición de los péptidos seleccionados.	54
Figura 20: Análisis de docking múltiple de péptidos.....	56
Figura 21: Interacción de los péptidos con la variante 1A de AChE de <i>C. rogercresseyi</i>	57
Figura 22: Interacción de los péptidos con la variante mutante 1A de AChE de <i>C. rogercresseyi</i>	58
Figura 23: Interacción de los péptidos con la variante 1B de AChE de <i>C. rogercresseyi</i>	59
Figura 24: Evaluación de letalidad de los péptidos modificados sobre <i>C. rogercresseyi</i>	62
Figura 25: Viabilidad celular de RTgill con los péptidos modificados.	63
Figura 26: Estudios cinéticos sobre el mecanismo de inhibición de los péptidos modificados.....	64
Figura 27: Interacción del péptido AS5372 con la variante 1A de AChE de <i>C. rogercresseyi</i>	66

Abreviaturas

AChE: Acetilcolinesterasa

OMS: organización mundial de la salud

QSAR: relación cuantitativa estructura-actividad

SPPS: síntesis de péptidos en fase sólida (por sus siglas en inglés)

Fmoc: 9-fluorometoxicarbonil

tBu: terbutilo

Pbf: 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurano-5-sulfonilo

Trt: tritilo

Boc: ter-butiloxicarbonilo

TFA: ácido trifluoroacético

CD: Espectroscopía de dicroísmo circular (por sus siglas en inglés)

DMF: N,N-dimetilformamida

IPA: Isopropanol

DCM: Diclorometano

HBTU: 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato

TBTU: 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato

HCTU: O-(1H-6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato

DIPEA: N,N-diisopropiletilamina

TFA: ácido trifluoroacético

TIS: Triisopropil silano

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

ESI-MS: espectroscopía de masas por ionización en electrospray

TFE: 2,2,2-Trifluoroetanol

PBS: Tampón fosfato

Random coil: conformación desordenada

1 Introducción

La acuicultura ha experimentado un crecimiento sostenido en las últimas décadas, convirtiéndose en una de las principales actividades productivas del sector alimentario a nivel mundial. En este contexto, la salmicultura ha adquirido una relevancia estratégica, destacándose por su capacidad de generar alimentos de alto valor nutricional, empleo local e importantes ingresos por exportaciones (SalmonChile, 2024). Chile, gracias a sus extensas costas, abundantes recursos hídricos y condiciones ambientales favorables, se ha posicionado como el segundo mayor exportador de salmón después de Noruega, alcanzando en 2023 más de un millón de toneladas exportadas y generando ingresos por 6.463 millones de dólares (SalmonChile, 2024).

Este notable desarrollo, sin embargo, ha traído consigo importantes desafíos sanitarios, especialmente en sistemas de cultivo intensivo. La alta densidad de peces cultivados por unidad de superficie genera condiciones que favorecen la proliferación de enfermedades infecciosas, tanto bacterianas como parasitarias (González & Carvajal, 2003a; Guo & Woo, 2009). En este escenario, uno de los problemas más significativos para la industria salmonera chilena es la infestación por *Caligus rogercresseyi*, un ectoparásito marino de la familia Caligidae, comúnmente conocido como piojo de mar. Este parásito afecta a los salmónidos cultivados, alimentándose de la piel, sangre y mucosidad de los peces, lo que provoca estrés, lesiones, pérdida de peso y un aumento en la susceptibilidad a infecciones secundarias (Boxshall & Bravo, 2000; Fast, 2014).

La relevancia de *C. rogercresseyi* no se limita al impacto sanitario, sino que representa también una amenaza económica de gran magnitud. El costo de los tratamientos y la disminución en la productividad pueden afectar significativamente la rentabilidad de los centros de cultivo. De hecho, se ha estimado que el impacto económico de la caligidosis puede alcanzar hasta US\$1,4 por kilo de salmón producido, sumando pérdidas asociadas a mortalidad, reducción del crecimiento y gastos en control químico (Costello, 2009; Dresdner et al., 2019).

Ante esta problemática, el enfoque tradicional de control basado en el uso de antiparasitarios químicos ha comenzado a mostrar limitaciones. A lo largo de los años, se ha observado una creciente resistencia del parásito a los principales principios activos utilizados, como las avermectinas, piretroides y organofosforados (Bravo et al., 2008; Helgesen et al., 2014; Marín et al., 2015). Esta resistencia ha sido atribuida, entre otros factores, a mutaciones en la enzima blanco de algunos fármacos, como la acetilcolinesterasa (AChE), la cual es responsable de la degradación del neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis del sistema nervioso del parásito (Agusti-Ridaura et al., 2018b).

En este contexto, se hace urgente la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que no solo sean efectivas, sino que también reduzcan el riesgo de resistencia y tengan un menor impacto ambiental.

2 Marco Teórico

2.1 Salmonicultura en Chile y problemas asociados al parásito *Caligus rogercresseyi*

Dentro de las exportaciones del salmón a nivel mundial, Chile cumple un rol de gran importancia, ubicándose tras Noruega, como el segundo país con mayores exportaciones. En 2023, las exportaciones chilenas de salmón alcanzaron más de 1 millón de toneladas, generando ingresos por 6.463 millones de dólares. Los principales mercados de exportación incluyen Estados Unidos, Japón y Brasil, con una preferencia significativa por salmón del Atlántico y salmón coho dependiendo del destino (SalmonChile, 2023). Esto se debe al fuerte aumento de la producción acuícola chilena en los últimos 30 años gracias a las ventajas en las condiciones ambientales y los abundantes recursos naturales. Con la finalidad de cubrir la demanda mundial, el incremento de cultivos ha generado también un aumento de carga o densidad de peces por unidad de superficie, lo que a su vez se manifiesta en situaciones de estrés, trayendo como consecuencia enfermedades infecciosas bacterianas y otros tipos de patógenos, entre los que se destaca el parásito *Caligus rogercresseyi* (*C. rogercresseyi*), también conocido como piojo de mar (González & Carvajal, 2003b; Guo & Woo, 2009).

En los inicios de la salmonicultura en Chile, el problema de los piojos de mar no era tan preocupante como en la actualidad, debido a que la densidad de biomasa cultivada en las granjas no era tan elevada (Pino-Marambio et al., 2007). Sin embargo, el escenario actual de la salmonicultura registra a *C. rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000), como la enfermedad infecciosa que produce las mayores pérdidas económicas en la industria del salmón y trucha en el sur de Chile (González & Carvajal, 2003b). Este parásito genera efectos negativos en la sobrevivencia, crecimiento y aumento en la susceptibilidad a otras infecciones, resultando en un serio problema económico para la acuicultura por los elevados costos asociados a tratamiento y prevención (Bravo et al., 2008).

2.2 Ciclo biológico de *Caligus rogercresseyi*

El ciclo de vida de *C. rogercresseyi* facilita su transmisión entre huéspedes, especialmente en peces criados en condiciones de alta densidad (González & Carvajal, 2003b). Este ciclo biológico (Figura 1) comienza tras la eclosión de los huevos, y posteriormente el parásito atraviesa tres etapas larvales planctónicas de vida libre: nauplius I, nauplius II y copepodito. Los nauplius y copepoditos viven

solo de sus reservas de energía y no se alimentan. Durante la etapa de nauplius se dispersan en la columna de agua y flotan a la deriva según la corriente, mientras que los copepoditos deben tratar de encontrar y adherirse a un huésped usando sus piezas bucales y segunda antena. Los copepoditos exitosos, logran mudar y pasan por cuatro estadios más de chalimus (chalimus I-IV). Durante estas etapas, el parásito permanece unido a su huésped a través de un filamento frontal hasta completar la última muda donde pasan al estado adulto en proporciones similares de machos y las hembras (González & Carvajal, 2003b).

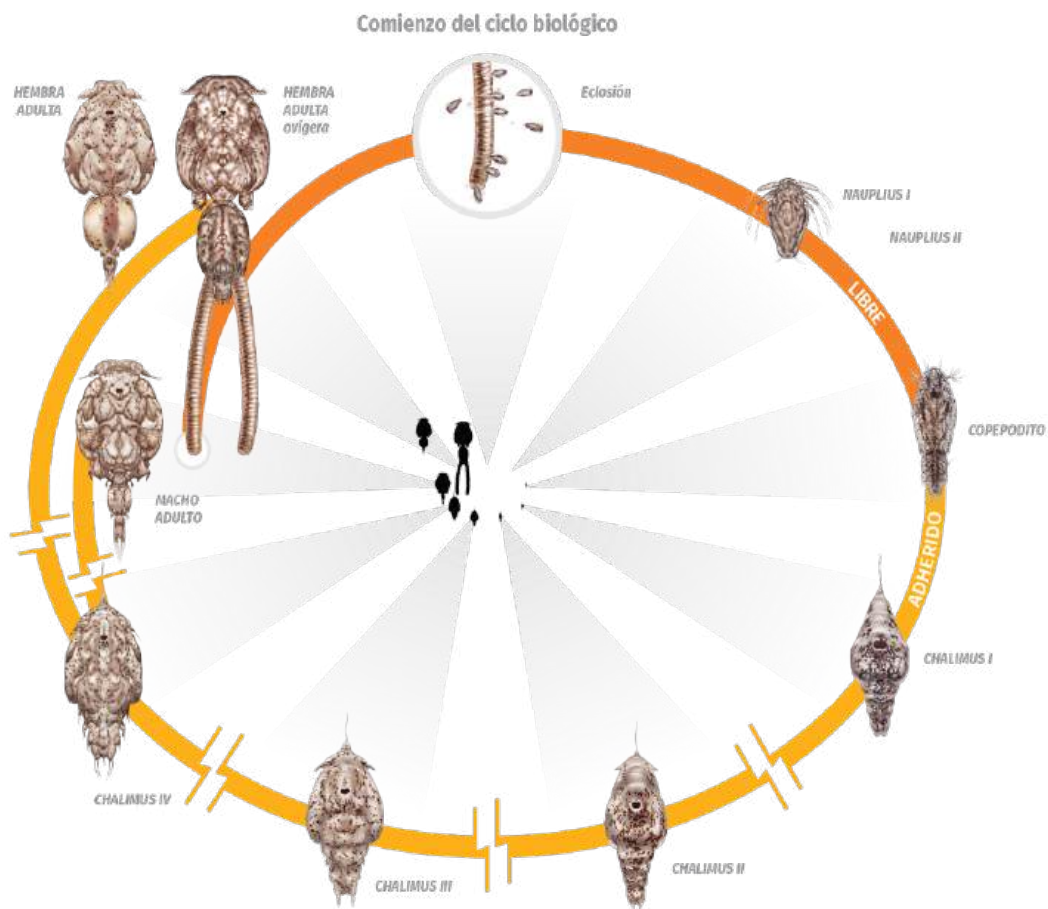


Figura 1: El ciclo de vida de *C. rogercresseyi* abarca tres fases del desarrollo: Infecciosa (nauplius I, nauplius II y copepodito), de adhesión (chalimus I-IV) y adulta (macho y hembra) (Subpesca, 2018).

2.3 Impacto de las infestaciones por *Caligus rogercresseyi*

El piojo de mar *C. rogercresseyi* es un ectoparásito copépodo marino de la familia Caligidae que se alimenta de la piel, sangre y mucosidad de peces marinos. Es el principal parásito que afecta a los

salmónidos cultivados en Chile, impactando aproximadamente el 27% de la producción global (Fast, 2014; Lhorente et al., 2014).

El comportamiento alimenticio de los piojos puede provocar daños severos, como lesiones que rompen la epidermis, lo que puede llevar a pérdida de peso, fallas osmorregulatorias, además de hacerlos más susceptibles a infecciones como la Piscirickettsiosis (Lhorente et al., 2014). Incluso se ha observado una disminución de los efectos protectores de las vacunas contra patógenos bacterianos (Dresdner et al., 2019). Estas lesiones suelen desarrollarse en áreas específicas del cuerpo, como alrededor de la aleta anal, dorsal y, en casos severos, en la superficie dorsal de la cabeza (Boxshall & Bravo, 2000).

El estrés causado por las infestaciones tiene un impacto significativo en la salud y el crecimiento de los peces. Este estrés aumenta los niveles de cortisol y glucosa, disminuyendo la respuesta inmune de los peces, lo que resulta en un crecimiento reducido y una mayor vulnerabilidad a otras enfermedades (Fast, 2014). Además del impacto sobre la salud de los peces, la interacción entre los salmónidos cultivados y los piojos de mar genera importantes pérdidas económicas. Estas pérdidas no solo se deben al daño físico infligido a los peces, sino también al costo elevado de los tratamientos contra el parásito, que deben ser asumidos por los productores. Un estudio de Costello (Costello, 2009) estimó que el costo del piojo de mar para la industria ascendía a un promedio de US\$ 0,151 por kilo en 2006. Además, en Chile, la intensificación en la frecuencia de desparasitaciones ha incrementado el costo de producción, alcanzando un promedio de US\$1,4 por kilo (Dresdner et al., 2019).

2.4 Normativas para el control de *Caligus rogercresseyi* en Chile

En la actualidad, lo más cercano al control de caligidosis se basa en la evaluación periódica de la cantidad y de las etapas de desarrollo de los piojos de mar encontrados en peces cultivados. La caligidosis fue incorporada en el año 2007 por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura como una enfermedad de alto riesgo por considerarse una enfermedad de importancia presente en el país y que debe ser objeto de programas sanitarios. En el 2012 se implementa una nueva estrategia en la vigilancia y el control de esta enfermedad regulada a través del “Programa Sanitario Específico de Caligidosis”. En este sentido, SERNAPESCA exige realizar muestreos semanales sobre las cargas parasitarias, estableciendo el criterio de centros CAD (Centros de Alta Diseminación) y cuando el número de hembras ovígeras es igual o superior a tres por pez, es considerado como nivel crítico para iniciar un tratamiento (Sernapesca, 2018). A pesar de las normativas aplicadas, y que posiblemente

pueden atenuar la caligidosis, sería óptimo poder encontrar una solución que apunte directamente al parásito, ya que lo importante es atacar de raíz el problema que afecta la salmicultura.

2.5 Tratamientos para el control de *Caligus rogercresseyi* en Chile

Con el objetivo de poder controlar la carga parasitaria de *C. rogercresseyi* en granjas de peces chilenas, hoy en día se utilizan diversos productos quimioterapéuticos que contienen ingredientes farmacéuticos activos con diferente mecanismo de acción (Tabla 1) (Aaen et al., 2015; Agustí-Ridaura et al., 2018).

Tabla 1: Clasificación de los productos quimioterapéuticos utilizados hoy en día en Chile para el control de *C. rogercresseyi*.

Clasificación	Nombre del producto	Objetivo	Mecanismo de Acción	Resistencia	Dosificación
Avermectinas	Benzoato de emamectina 0.2%	Sistema nervioso; canales de cloruro	Se une a los canales de cloruro activados por glutamato y por GABA en los nervios de los invertebrados (Yen & Lin, 2004)	2006 (Bravo et al., 2008)	Durante siete días consecutivos, en una dosis recomendada de 50 µg/kg de pez x día
	Calbiofarm				
	Slice				
	Quinafish				
Piretroides	Betamax®	Sistema nervioso; canales de sodio electro controlados	Bloqueo sinapsis de los canales de sodio (Burka et al., 2012)	2013 (Helgesen et al., 2014)	Una dosis recomendada de 3 µg/L durante 30 a 60 minutos (Siwicki et al., 2010)
	Deltamertina 1%				
	AMX				
Compuestos Organofosforados	Byelice®	Sistema nervioso; AChE	Bloqueo / inhibición de AChE en la sinapsis	2015 (Marín et al., 2015)	Una dosis de 0.2 mg /L durante 30-60 minutos (Burridge et al., 2010)
	Azasure®				
	Calfree®.				
	Purisan				

Entre 2000 y 2007, el único producto químico autorizado en Chile fue el benzoato de emamectina, clasificado como Avermectinas (Bravo et al., 2008). El mecanismo de acción antiparasitaria de este

fármaco se basa en estimular la liberación del neurotransmisor GABA (Bravo et al., 2008) provocando una apertura persistente de los canales de cloro, lo que permite la entrada de iones Cl^- en la célula. Sin embargo, la reducción en la eficacia del tratamiento se detectó por primera vez en 2006–2007 (Bravo et al., 2013).

Para hacer frente al problema de resistencia de *C. rogercresseyi* hacia el benzoato de emamectina, posteriormente se introdujeron piretroides, deltametrina en el año 2007 y cipermetrina en 2010 (Leboulanger et al., 2009). Los compuestos de esta clase tienen como objetivo los canales de sodio electro controlados en el sistema nervioso de los piojos, interfiriendo la conducción iónica a través de las membranas neuronales causando su parálisis y muerte (Burka et al., 2012; Tippe, 1987). Éstos, se convirtieron en los principales agentes químicos hasta el año 2013, cuando se informaron los primeros indicios de parásitos resistentes a este compuesto (Helgesen et al., 2014).

Posteriormente, durante el año 2013 se incorporó azametifos como tratamiento (Agusti et al., 2016). Éste se clasifica dentro de los compuestos organofosforados (OPs), que son un grupo de insecticidas o agentes nerviosos que actúan sobre la enzima acetilcolinesterasa (AChE), y que en consecuencia interfieren con la transmisión de los impulsos nerviosos (Figura 2) dando como resultado una sobreestimulación de los nervios y músculos, lo que lleva a la parálisis y la muerte del parásito.

Desde entonces, el azametifos es el agente químico antipiojos más utilizado en la cría de salmónidos chilenos, sin embargo, la sensibilidad reducida de *C. rogercresseyi* hacia este compuesto se ha informado recientemente en algunas áreas de producción de salmónidos en Chile (Marín et al., 2015). Según el último estudio realizado por Agusti (Agusti-Ridaura et al., 2018), la resistencia se puede deber a la mutación de la enzima AChE en donde se genera un cambio de un único aminoácido de fenilalanina por valina en la posición 318 (AChE1a F/V318), desencadenando la resistencia al impedir la unión de OPs (Agusti-Ridaura et al., 2018).

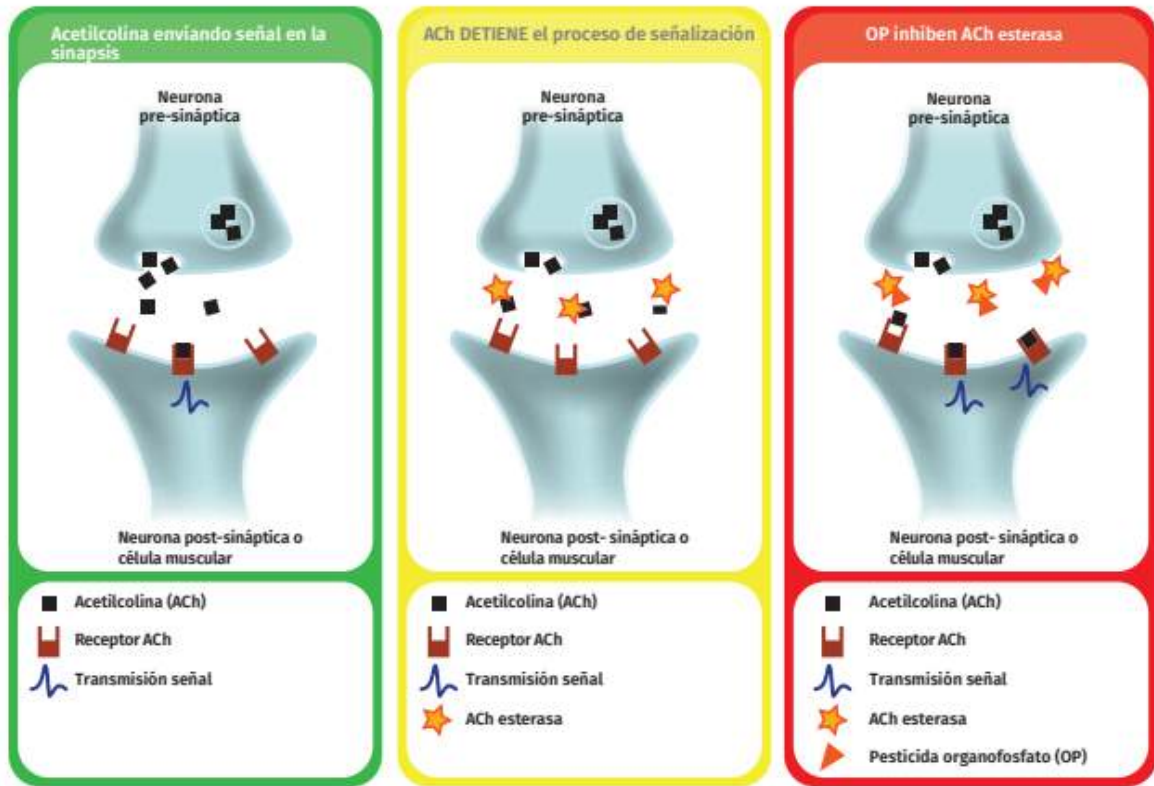


Figura 2: Representación esquemática adaptada de sinapsis la sinapsis colinérgica y mecanismo de acción de compuestos organofosforados. Durante el proceso de sinapsis, ACh es liberada y activa los receptores presentes en la célula post-sináptica (verde). La enzima AChE hidroliza ACh y detiene el proceso de señalización (amarillo). OPs inhiben AChE de manera que no puede hidrolizar ACh, con un proceso de señalización permanente (marco rojo). Extraído de (George et al., 2014; Sernapesca, 2018).

2.6 Caracterización de la enzima AChE

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima del grupo de las hidrolasas, EC. 3.1.1.7 según la clasificación numérica EC (Enzyme Commission numbers), se encuentra presente en la mayoría de los seres vivos, principalmente en los vertebrados, pero también en invertebrados como los insectos y parásitos. Está localizada en el sistema nervioso, y es la responsable de la regulación de la concentración de la acetilcolina (ACh), un neurotransmisor involucrado en la sinapsis colinérgica en el sistema nervioso, permitiendo la transmisión de la señal nerviosa en el sistema nervioso central y periférico (Wiesner et al., 2007). La estructura de la AChE ha sido estudiada desde la década de 1990 (Sussman et al., 1991). Estudios estructurales de la enzima en diferentes organismos han permitido establecer que tanto el sitio activo de la AChE, como en general toda la estructura de la enzima, están evolutivamente conservados y contienen regiones comunes y similares a otras enzimas tipo serina-

hidrolasas (Pohanka, 2011). La AChE obtenida de la anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*) ha sido caracterizada y utilizada como referencia para la enumeración de secuencia aminoacídica, ya que presenta varias zonas que participan en la hidrólisis de la acetilcolina. El más importante es el “sitio activo”, también conocido como sitio esterático, que está constituido por tres residuos: Ser 200, His 440 y Glu 327 (en amarillo Figura 3). La orientación que adquiere el neurotransmisor en el proceso de hidrólisis se debe al subsitio aniónico, dado por los residuos de Trp 84, Tyr 130 y Phe 330 (en magenta Figura 3). Esta orientación facilita la hidrólisis de la ACh en colina y acetato, paso importante en la sinapsis. Adicionalmente, esta enzima posee otros subsitios en la cavidad aromática que son importantes en la interacción del neurotransmisor con el sitio activo de la enzima; el bolsillo acilo, el agujero oxianiónico y el subsitio periférico aniónico (PAS) (en gris, cyan y verde respectivamente Figura 3). La cavidad aromática abarca una gran cantidad de residuos aromáticos encargados de las interacciones π -catión de la parte del amonio cuaternario de la ACh y estos residuos aromáticos del sitio activo. El subsitio periférico aniónico aísla la cavidad aromática de la superficie externa de la enzima, además participa en funciones no catalíticas de la misma, como la adhesión a membranas, la diferenciación de células, ente otras (Bajda et al., 2013; Pohanka, 2012).

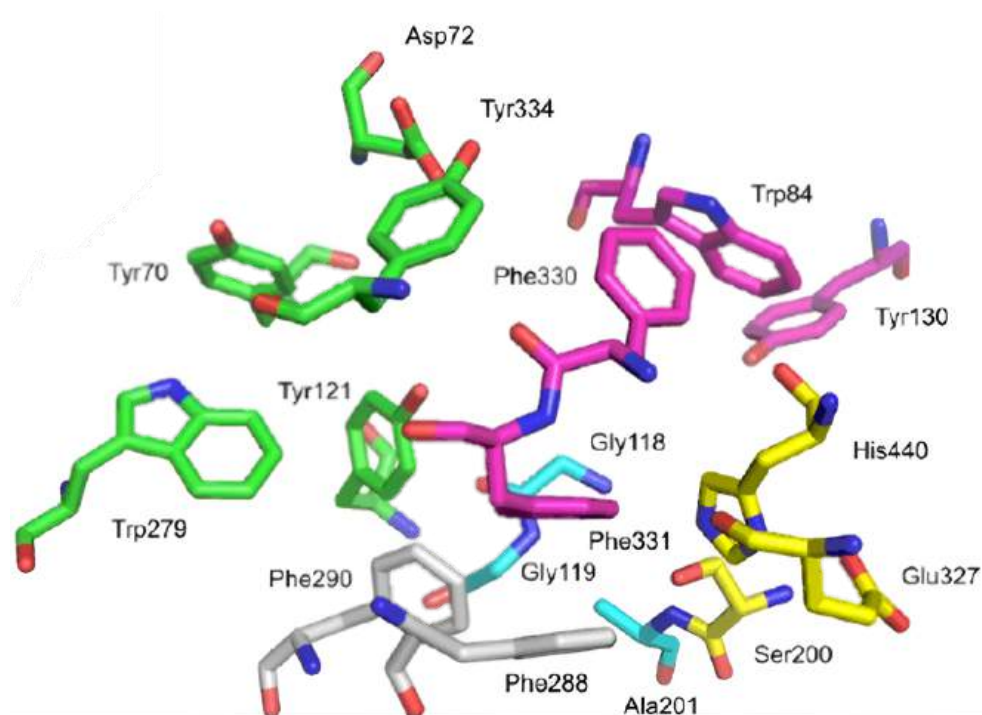


Figura 3: Disposición del sitio activo de la enzima AChE de *Electrophorus electricus*. Se observan las interacciones con los aminoácidos pertenecientes al sitio activo (Ser 200, Glu 327 e His 440) en amarillo, al sitio aniónico en magenta, el bolsillo acilo en gris, el agujero oxianionico cyan y el subsitio periférico aniónico (PAS) en verde (Bajda et al., 2013).

2.7 Péptidos, moléculas con potencial bioactividad

Como se mencionó anteriormente, los compuestos quimioterapéuticos utilizados hasta la fecha frente al parásito *C. rogercresseyi*, han generado resistencia en distintos grados. Sin embargo, este fenómeno no es exclusivo de este parásito, sino que se comparte por la mayoría de agentes patógenos. Es por esto que surge la necesidad de búsqueda de nuevas moléculas que tengan potencial actividad y que disminuyan la generación de resistencia.

En este contexto, los péptidos antimicrobianos, que corresponden a pequeñas moléculas naturales que forman parte de la inmunidad innata y actúan destruyendo las membranas de bacterias, virus y otros patógenos; surgen como una alternativa que podría cambiar el enfoque para el manejo de la caligidosis en la acuicultura del salmón. Gracias a sus propiedades únicas, los péptidos han demostrado un gran potencial para combatir patógenos (Cárdenas et al., 2020; Chaturvedi et al., 2020; León et al., 2020; Valero et al., 2020), con una menor probabilidad de generar resistencia en comparación con los tratamientos convencionales (Chaturvedi et al., 2020). Existen informes sobre péptidos dirigidos contra parásitos, pero la mayoría se centra en *Apicomplexa* y *Trypanosomatida* (El-Dirany et al., 2021; Ribeiro et al., 2023; Rivera-Fernández et al., 2022). Por ejemplo, en la base de datos de péptidos antiparasitarios, describen que de las 863 de estas moléculas (Mehta et al., 2014), el 67% corresponden a péptidos dirigidos a parásitos del género *Apicomplexa*, siendo *Plasmodium* el más representado. El 30% está dirigido a *Leishmania* y *Trypanosoma*, y las entradas restantes apuntan a otros géneros, incluyendo *Schistosoma*, un parásito helminto capaz de expresar actividad de AChE.

Los péptidos también han sido estudiados como inhibidores enzimáticos. En el caso de la AChE, debido a su relación con enfermedades neurodegenerativas, existen numerosos estudios sobre péptidos diseñados para inhibir esta enzima con resultados prometedores (Asen & Aluko, 2022; Prasasty et al., 2018; Sanchis et al., 2020; Siano et al., 2017).

Recientemente, se ha publicado un trabajo que describe la capacidad del péptido hepcidina en afectar hasta en un 50% a *C. rogercresseyi* en estadio nauplius II (Santana et al., 2024). Mientras que Álvarez y colaboradores describen la actividad de cuatro péptidos contra el estadio copepodito de *C. rogercresseyi* (Álvarez et al., 2024). Esto confirma que la utilización de péptidos, podría ser una estrategia prometedora para combatir la caligidosis.

En este contexto, los péptidos seleccionados para la presente investigación fueron obtenidos a partir del mucus de *Salmo salar*, ya que representa una fuente rica en moléculas bioactivas con funciones inmunológicas. La elección de esta matriz biológica se basó en antecedentes previos documentados por Fæste et al. (2020a), quienes caracterizaron péptidos y proteínas derivados del mucus con potencial actividad antiparasitaria. Esta selección se justifica además en el hecho de que, en peces, la piel y las branquias constituyen las principales barreras epiteliales expuestas al entorno, actuando como la primera línea de defensa frente a agentes patógenos. Diversos estudios han demostrado que el mucus que recubre estas superficies contiene proteínas, péptidos antimicrobianos, enzimas y otros componentes con propiedades inmunoprotectoras, lo que lo convierte en una fuente relevante para la identificación de nuevas moléculas terapéuticas (Ángeles Esteban, 2012; Ellis, n.d.; Subramanian et al., 2007).

2.8 Producción de péptidos antimicrobianos por síntesis química

Los péptidos pueden ser obtenidos de fuentes naturales pero requieren procesos sofisticados de extracción y purificación. Además, presentan numerosos problemas en el producto final, como baja producción, falta de estabilidad, poca tolerancia a concentraciones de sal y alta toxicidad debido a la naturaleza de sus secuencias. Estos factores dificultan su uso a gran escala, lo que hace que la síntesis química sea relevante como herramienta para la producción de péptidos bioactivos (Erdem Büyükkiraz & Kesmen, 2022). Se han desarrollado muchos métodos para la producción, pero la síntesis química en fase sólida (SPSS, por sus siglas en inglés) se ha convertido en la más utilizada desde su desarrollo por Merrifield en 1963 (Merrifield, 1963). Esta estrategia permite realizar modificaciones o crear nuevas secuencias con un mayor potencial bioactivo. La ventaja de este proceso es que las impurezas causadas por reacciones incompletas o secundarias en el proceso de síntesis, son fácilmente identificadas y eliminadas mediante un proceso de purificación (Petrou & Sarigiannis, 2018; Wang et al., 2022).

Una vez obtenidos los péptidos activos, es posible realizar diversas modificaciones en la secuencia para potenciar su efecto, aumentar la estabilidad o reducir los costos de producción a gran escala. Entre las principales modificaciones se encuentran: la reducción en el tamaño de una secuencia; modificaciones en la cadena lateral de aminoácidos para mejorar la actividad biológica de los péptidos; péptidos miméticos; y la ciclación de péptidos (Chen & Jiang, 2023; Magana et al., 2020). Por ejemplo, para mejorar la estabilidad proteolítica del péptido, la estrategia más utilizada es la sustitución de L-aminoácidos por D-aminoácidos, especialmente en sitios proteolítico, lo cual permite aumentar la vida media del péptido (Huang et al., 2014). Estas y otras modificaciones, son una

realidad gracias a los avances que se han desarrollado en el campo de la síntesis de péptido en fase sólida, donde la metodología Fmoc/tBu, destaca como la más utilizada en la actualidad.

2.9 Síntesis de péptidos en fase sólida

En los inicios, la síntesis química de péptidos se realizaba en solución, sin embargo, con la introducción SPPS, esta tecnología comenzó a ganar relevancia y ha avanzado significativamente, volviéndose cada vez más versátil (Guzmán et al., 2007). Actualmente, la síntesis química es la técnica más apropiada para la síntesis de péptidos pequeños o medianos, entre 5 y 80 residuos (Guzmán et al., 2007, 2021a, 2023). La SPPS consiste en la elongación de una cadena peptídica anclada a un soporte sólido mediante la adición sucesiva de aminoácidos, que se unen a través de enlaces amida (enlaces peptídicos).

En esta técnica, el primer aminoácido de la secuencia, desde el extremo carboxi-terminal, se une covalentemente a una resina sólida por su grupo carboxilo, mientras que su extremo amino se protege de forma reversible. Esta protección se retira mediante la reacción de desprotección, para que el grupo amino esté disponible para reaccionar con el extremo carboxilo previamente activado del siguiente aminoácido de la secuencia “reacción de acople”. Así, la cadena peptídica se sintetiza progresivamente, un aminoácido a la vez, mediante reacciones sucesivas de desprotección y acople. Las cadenas laterales de los aminoácidos están previamente protegidas con grupos adecuados para evitar reacciones indeseables durante la formación del enlace peptídico. Una vez acoplados todos los aminoácidos de la secuencia deseada, se desprotegen las cadenas laterales y el péptido se libera de la resina bajo condiciones ácidas fuertes, obteniéndose así en su forma libre soluble (Albericio, 2004). Aunque hay una gran variedad de excelentes grupos protectores de las funciones amino, en la síntesis de péptidos se utilizan casi exclusivamente los grupos ter-butiloxycarbonilo (t-Boc) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), como metodología de síntesis en fase sólida (Albericio, 2000).

Cuando se emplea el grupo t-Boc, se utilizan protectores tipo bencilo (Bzl) para las funciones de las cadenas laterales, dando lugar a la metodología conocida como t-Boc/Bzl (Tam et al., 1983). Por otro lado, cuando se emplea el grupo Fmoc como protección de la función amino, se utilizan protectores basados en el grupo ter-butilo para las cadenas laterales, dando lugar a la estrategia Fmoc/tBu, que es la más usada en la actualidad (Wellings & Atherton, 1997) como se ilustra en la Figura 4.

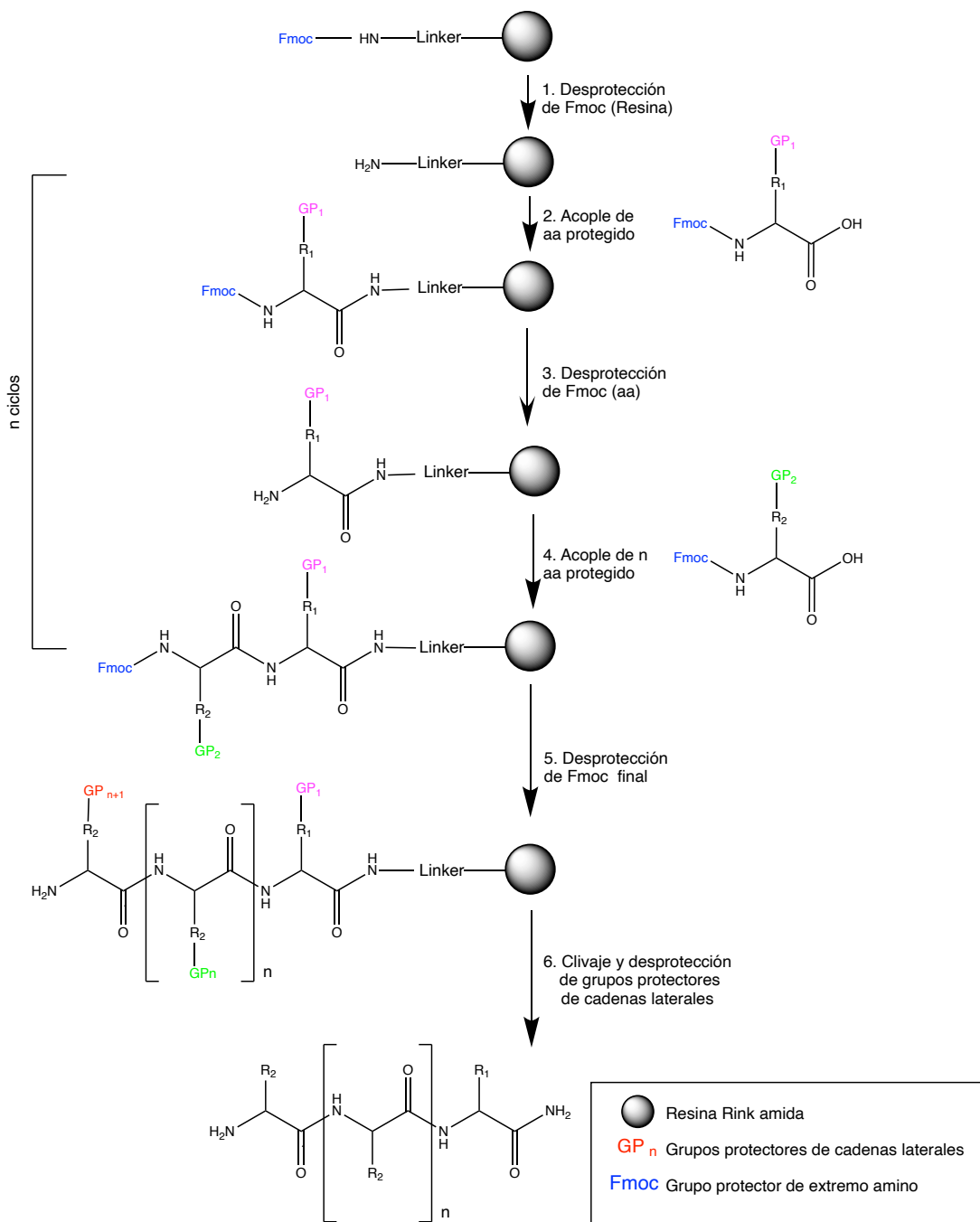


Figura 4: Esquema general de la síntesis de péptidos en fase sólida. El primer paso consiste en la desprotección del grupo Fmoc del liker de la resina (Paso 1). Luego el aminoácido protegido en N- α se acopla desde el grupo carboxilo a la resina (Paso 2). El péptido deseado se ensambla de manera lineal desde el C-terminal hasta el N-terminal mediante ciclos repetitivos de desprotección del grupo Fmoc en el N- α (Paso 3). Después de completar la síntesis (Paso 4), los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos (GP) son eliminados durante la clivaje del péptido obteniendo el péptido deseado (Paso 6).

2.10 Modelo predictivo QSAR

Actualmente, los bioensayos son el único método disponible para medir la sensibilidad de *C. rogercresseyi* en Chile (Agusti et al., 2016; Kazemi et al., 2012; Marín et al., 2015), en donde los parásitos vivos están expuestos a un rango de concentraciones de productos químicos, durante un tiempo determinado, y luego de la exposición, se registra el número de parásitos muertos o inmovilizados (Helgesen et al., 2014). Sin embargo, los bioensayos son laboriosos y al considerar un gran número de desafíos, resulta casi imposible de abordar (Kaur et al., 2015a; Robertson et al., 1995).

Frente a esta limitante, es que los métodos basados en bioinformática han adquirido gran énfasis para el diseño y la predicción de nuevas moléculas con bioactividad, siendo una de las áreas más desafiantes en las ciencias, ya que favorece considerablemente el hecho de acotar las pruebas biológicas y bioensayos en laboratorios al tener un método de selección previa.

Bajo esta mirada, el diseño y la predicción de bioactividad, potencialmente favorecería la selectividad al escoger un número menor de moléculas teóricas bioactivas, en este caso péptidos, que se deban someter a bioensayos, reduciendo el número de test *in vitro* o *in vivo* para encontrar el que presentaría una mejor bioactividad (Abbasitabar & Zare-Shahabadi, 2012).

Este gran desafío lo ha protagonizado la bioinformática, ya que se han vuelto cada vez más populares en el diseño de péptidos, particularmente el estudio cuantitativo de la relación estructura-actividad (QSAR). Los modelos QSAR corresponden a una herramienta estadística ampliamente cotizada que utiliza una función matemática para resumir la relación entre las actividades biológicas de un conjunto de compuestos y sus características estructurales en función de descriptores moleculares (Abbasitabar & Zare-Shahabadi, 2012, 2017; Zare-Zardini et al., 2013). En los modelos QSAR se utilizan descriptores químicos basados en propiedades de las moléculas que pueden provenir de múltiples aproximaciones, desde índice topológicos (Leszczynski, 2017; Shirakol et al., 2019) hasta propiedades electrónicas (Oluwaseye et al., 2020), los cuales son representativos de las características moleculares relacionadas con la actividad relevante. Recientemente, se han introducido nuevos enfoques QSAR que mejoran aún más el estudio de las actividades. Sin embargo, los modelos QSAR construidos deben ser probados y validados por su eficiencia y uso práctico. Cada modelo QSAR es específico, por lo tanto no puede ser aplicado de manera universal, sin embargo, su alta precisión y eficacia le otorga un futuro prometedor en el diseño de fármacos.

Hoy en día los modelos QSAR se han establecido con éxito para péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Deng et al., 2017), péptidos antioxidantes (Chen et al., 2018), péptidos antimicrobianos (Vishnepolsky et al., 2018), péptidos antitumorales (Radman et al., 2011), entre otros. En base a lo ya mencionado, un modelo QSAR desarrollado para péptidos antiparasitarios capaces de inhibir la enzima AChE sería de gran utilidad en esta área.

La industria de la salmonicultura chilena enfrenta pérdidas económicas significativas debido al parásito *C. rogercresseyi*. A pesar del uso de diversos fármacos, la resistencia de este parásito ha generado tanto costos elevados como daños ambientales debido a los residuos en el mar. Por lo tanto, es crucial desarrollar nuevas estrategias de control, como el diseño de péptidos con mecanismos de acción de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa como objetivo terapéutico, complementado con un modelo QSAR para optimizar la selección de péptidos con actividad antiparasitaria.

3 Hipótesis

Péptidos con actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa seleccionados por un modelo QSAR y mejorados a través de modificaciones químicas, incrementan su efecto de letalidad en el parásito *Caligus rogercresseyi*.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar y mejorar químicamente la letalidad de péptidos inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa de *Caligus rogercresseyi* seleccionados mediante un modelo QSAR.

4.2 Objetivos específicos

1. Seleccionar péptidos inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa de *Caligus rogercresseyi* mediante un modelo QSAR.
2. Evaluar la letalidad *in vitro* de péptidos seleccionados contra el parásito *Caligus rogercresseyi*.
3. Evaluar la actividad inhibitoria de los péptidos seleccionados contra la enzima acetilcolinesterasa de *Caligus rogercresseyi*.
4. Aumentar la efectividad de los péptidos seleccionados contra el parásito *Caligus rogercresseyi* mediante modificaciones químicas en la secuencia peptídica.

5 Materiales y Métodos

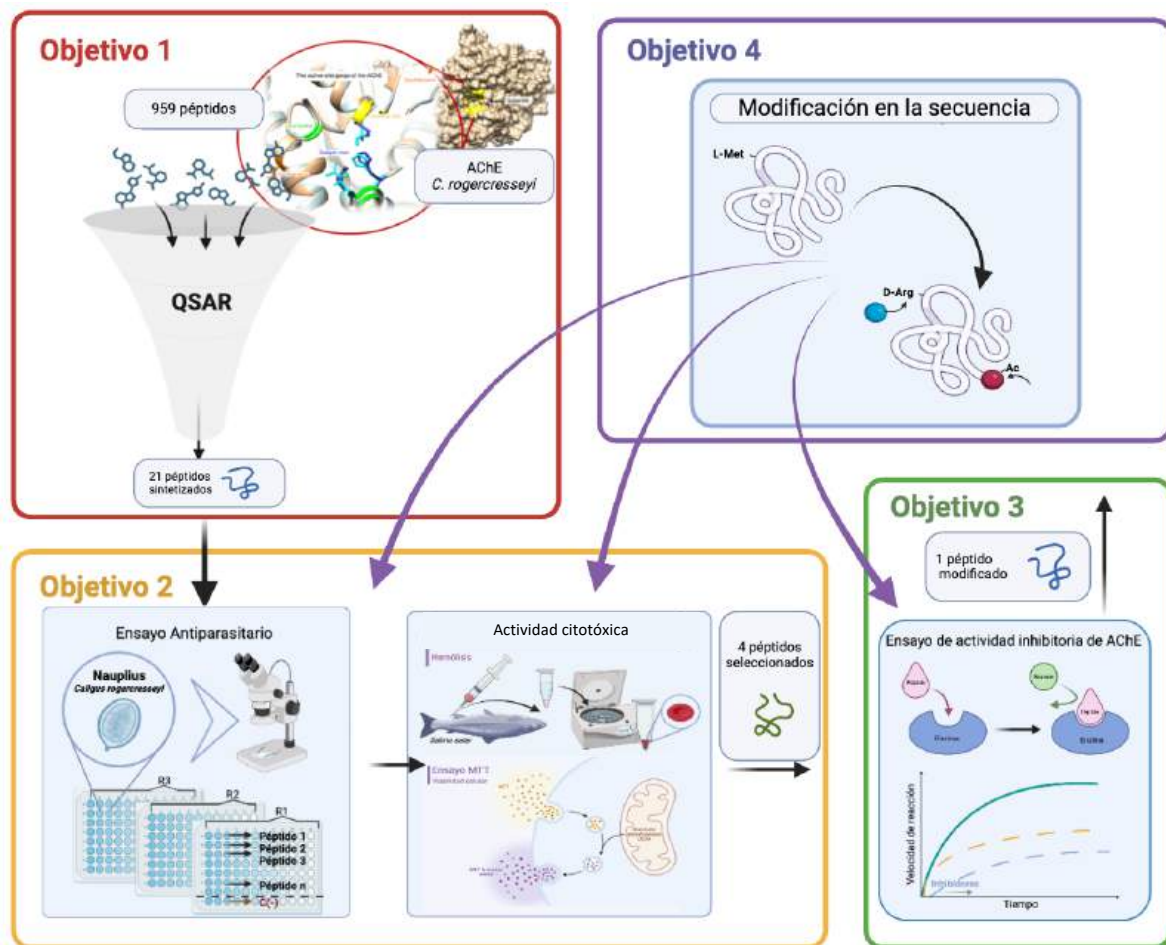


Figura 5: Esquema resumido del flujo de trabajo para cada objetivo desarrollado. Selección de péptidos potenciales inhibidores de la enzima AChE a partir de modelo QSAR (Objetivo 1), síntesis, caracterización y evaluación de actividad antiparasitaria, actividad citotóxica (Objetivo 2) y actividad inhibitoria de la enzima AChE de *C. rogercresseyi* (Objetivo 3). Modificaciones en la secuencia aminoacídica para potenciar la efectividad del peptido seleccionado (Objetivo 4).

5.1 Secuencias peptídicas presentes en mucus de *Salmo salar*

Se generó una base de datos interna de un total de 959 péptidos únicos para ser analizados como potenciales agentes antiparasitarios inhibitorios de la enzima AChE (Tabla S2 y S3). Estos péptidos fueron obtenidos del mucus de *Salmo salar*, previamente documentadas en la literatura por Fæste y col (Fæste et al., 2020a), ya que se consideró que la primera línea de defensa de los peces en respuestas ante enfermedades producidas por parásitos, corresponde a la piel y las branquias (Alvarez-Pellitero, 2008; Huttenhuis et al., 2006). Así, se incluyeron secuencias obtenidas mediante hidrólisis *in silico* que fue realizada con las enzimas quimotripsina, tripsina y pepsina en el servidor Biopep (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>). Esto nos permitió predecir todos los posibles péptidos hidrolizados a partir de las secuencias obtenidas de Uniprot (<https://www.uniprot.org/>).

Para ser usadas estas secuencias en el modelo QSAR, la notación de aminoácidos de una letra fue transformada al Sistema Molecular de Introducción Lineal Simplificada (SMILES), mediante la herramienta PepSMI en el servidor <https://www.novoprolabs.com/tools/convert-peptide-to-smiles-string>, de tal manera de obtener la notación lineal para codificar cualquier estructura molecular.

5.2 Identificación de péptidos potenciales inhibidores de AChE

Por otro lado, se utilizó el software gratuito CORAL (<http://www.insilico.eu/coral>) que nos permitió generar el modelo QSAR para predecir péptidos potenciales inhibitorios de la enzima AChE utilizando la representación SMILES de cada compuesto como entrada. Para construir el modelo, se recopilaron 69 compuestos con actividad reportada como inhibidores de AChE (Tabla S4) obtenidos a partir de la base de datos (<https://www.bindingdb.org/rwd/bind/index.jsp>). Estos 69 compuestos se dividieron aleatoriamente en un conjunto de entrenamiento (aproximadamente 40%), un conjunto de entrenamiento invisible (aproximadamente 40%), un conjunto de calibración (aproximadamente 10%) y un conjunto de validación externa (aproximadamente 10%).

El descriptor SMILES óptimo para la generación del modelo se calculó utilizando la ecuación 1:

$$DCW(T, N) = a \sum CW(S_k) + \beta \sum CW(SS_k) + \gamma \sum CW(SSS_k) + z \cdot CW(BOND) \quad (1)$$

Para los parámetros T (número de la corrida del modelo) y N (umbral mínimo de aparición de fragmentos), se utilizaron los valores predeterminados del programa. S_k corresponde a un símbolo de átomo en el SMILES, SS_k y SSS_k corresponden a dos o tres símbolos de átomos, respectivamente. El

índice BOND corresponde a la presencia o ausencia de enlaces químicos en tres categorías: dobles, triples y estereoespecíficos (Benfenati et al., 2011; Toropov, Barnes, et al., 2023; Toropov, Toropova, et al., 2023). Tras este análisis, se evaluaron las 959 secuencias peptídicas y mediante este modelo QSAR se seleccionaron los 21 péptidos (< 2 %) con mayor actividad inhibitora de AChE para su posterior análisis.

5.3 Síntesis, purificación y caracterización de péptidos seleccionados

5.3.1. Buenas prácticas de manufactura

La síntesis de péptidos, fue realizada bajo las buenas prácticas de manufactura, siguiendo Procedimientos Operativos Estándares (POE). Todo el proceso fue supervisado por un ejecutor y un supervisor, garantizando el cumplimiento de las normativas. El manejo de reactivos químicos se realiza con las medidas de seguridad necesarias, incluyendo el uso de cabinas de extracción para solventes, guantes de nitrilo, lentes de seguridad y bata de laboratorio. Todos los solventes se depositan en contenedores adecuados y son gestionados por una compañía especializada. Los desechos de los solventes se eliminan por separado, esto es DMF de los compuestos halogenados como el DCM, así como del éter y TFA.

5.3.2. Protocolo de síntesis de péptidos

Una vez seleccionadas las secuencias de los péptidos, se procedió a la síntesis química mediante la estrategia Fmoc, empleando el método conocido como “Tea-bag” (Guzmán et al., 2021). En 1985, Houghten describió esta metodología que ha facilitado la síntesis simultánea de un gran número de péptidos. Utilizando esta metodología (Figura 6), los 21 péptidos se sintetizaron individualmente en pequeñas bolsas de polipropileno numeradas que contenían 40 mg de resina Rink Amida de sustitución 0,59 meq/g (Guzmán et al., 2021). Los pasos comunes, como la desprotección y los lavados sucesivos, se realizaron en el mismo contenedor, mientras que los ciclos de acoplamiento se llevaron a cabo por separado con el correspondiente aminoácido activado. El proceso de síntesis continuó a través de ciclos de lavado, desprotección y acoplamiento hasta que la síntesis se completó (Houghten, 1985). Esta metodología ha demostrado ser de gran utilidad en la síntesis múltiple simultánea, permitiendo la producción de muchos péptidos a la vez, especialmente péptidos análogos, reduciendo considerablemente el uso de reactivos al emplear soluciones comunes en múltiples pasos.

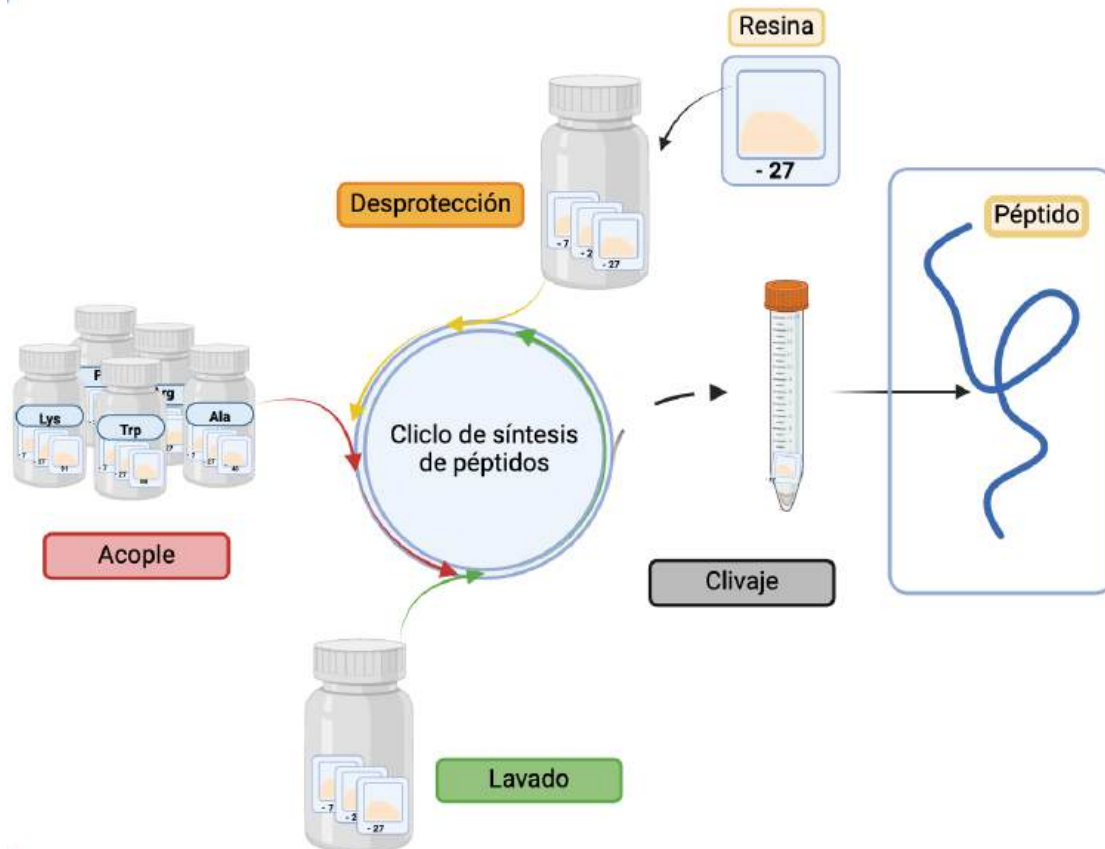


Figura 6: Esquema de síntesis en fase sólida Fmoc por la metodología "Tea bag".

5.3.3. Purificación de los péptidos sintetizados

Los péptidos crudos se purificaron usando columnas de extracción preparativa Clean-Up® CEC18153 (UCT, Bristol, PA, USA). Estas columnas C18 permiten separar moléculas de diferente hidrofobicidad, eluyendo con porcentajes ascendentes de acetonitrilo (ACN) en agua. Las moléculas hidrofílicas, eluyen con agua y mientras se va aumentando el porcentaje de ACN, comienzan a eluir las moléculas de acuerdo a su hidrofobicidad. La fase estacionaria C18 fue activada con metanol grado HPLC antes de ser cargada con una solución de péptido crudo, el cual fue eluído en fracciones sucesivas de agua y soluciones de ACN al 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 25%, 30%, 60% y 100%. Para una elución final y lavado de la columna se utilizó metanol al 100%. El ACN de las fracciones puras se evaporó utilizando un concentrador SpeedVac, dejando el péptido disuelto en agua. Estas fracciones fueron congeladas a -80°C y posteriormente liofilizadas.

5.3.4. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC)

El grado de pureza de los péptidos sintetizados se determinó mediante HPLC en fase reversa, utilizando un cromatógrafo con detector UV-2075 Plus, bomba cuaternaria PU-2089 Plus y autosampler AS-2055 Plus (Jasco Corp., Tokyo, Japan), con una columna XBridge™ BEH C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 μm) (Water Corp., Milford, MA, USA) utilizando un gradiente de 0 – 70% de solvente B (acetonitrilo con 0,05% TFA) versus solvente A (agua con 0,05% TFA), con un flujo de 1 mL/min en 8 min y detección a 220 nm. Los cromatogramas fueron obtenidos utilizando el programa ChromNAV Chromatography Data System Build 4 (Version 2.02.05, JASCO Corp., Tokyo, Japan) (Guzmán et al., 2021a).

5.3.5. Caracterización por espectrometría de masas

La espectrometría de masas fue usada para confirmar el peso molecular de cada péptido obtenido, utilizando ionización por electrospray (ESI-MS) con un cromatógrafo líquido LCMS-2020 ESI-MS (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón), mediante un gradiente 10-100% acetonitrilo en 12 minutos. En esta metodología, el péptido se inyectó disuelto en agua, en una cantidad de 5 μg. Luego de pasar por el equipo ULFC, donde se obtiene un cromatograma, entran a la interfase ESI donde son volatilizados, ionizados y fragmentados. Estos viajan por un sistema octapolo hasta el detector de masas. Debido a la interfase que se usa, el espectro de masa muestra los peaks correspondientes a los distintos valores de m/z del péptido de acuerdo a su capacidad de protonación. La adquisición y análisis de las muestras se realizó usando el programa Lab Solutions v5.42 SP3 (Shimadzu Corp., Kyoto Japón) (Guzmán et al., 2021b).

5.3.6. Determinación de la estructura secundaria por Dicroísmo Circular

La determinación de la estructura secundaria de los péptidos sintetizados se realizó por espectroscopia de dicroísmo circular (CD), se utilizó un equipo Jasco J-815 Spectrometer acoplado con un Peltier Jasco CDF426S/15 para control de temperaturas (Jasco Corp., Japón) en el rango ultravioleta (190-250 nm), utilizando cubetas de cuarzo de 0.1 cm de longitud de trayectoria y 1 nm de ancho de banda a 0,5 nm de resolución. La preparación de la muestra se realizó disolviendo el péptido en agua Milli-Q a una concentración de 2mg/mL. En una cubeta de cuarzo se agregaron 35 μL de péptido y 215 μL de 2,2,2-trifluoroetanol al 30% con agua (TFE30%) (Merck). Cada espectro se registró como un promedio de tres repeticiones de exploración continua con una velocidad de exploración de 50

nm/min y un tiempo de respuesta de 1 s. El blanco de la contribución del disolvente se restó de cada espectro de la muestra. Los datos obtenidos que proporcionó el equipo se encontraban en grados de CD y se transformaron a elipticidad molar de acuerdo a la concentración del péptido utilizado, finalmente se obtuvieron las gráficas de elipticidad molar (Θ) v/s longitud de onda (nm).

5.4 Ensayos antiparasitarios contra *C. rogercresseyi*

5.4.1. Cultivo de la etapa de naupliu de *C. rogercresseyi*

Se recolectaron hembras ovígeras de *C. rogercresseyi* de *Salmo salar* infectados con el patógeno. La selección de hembras se basó en su desarrollo, prefiriendo aquellas que presentaban pigmentación oscura (que varía de marrón a negro), indicando un estadio avanzado de desarrollo y proximidad a la eclosión. Las cadenas de huevos se criaron en un tanque cónico con movimiento continuo de agua de mar asistido por aireación en el fondo. Tras la eclosión, las larvas se separaron de las cadenas no eclosionadas y se cultivaron hasta su uso en bioensayos. Los nauplius utilizados fueron utilizados en etapa de naupliu II confirmada mediante un microscopio óptico (Carl Zeiss NT Stab).

5.4.2. Evaluación inicial *in vitro* de letalidad de los péptidos contra *C. rogercresseyi*

La determinación *in vitro* de la actividad antiparasitaria contra *C. rogercresseyi* consistió en realizar bioensayos de letalidad, utilizando una malla de 120 μm con un volumen reducido de agua de mar, para concentrar y obtener el stock de parásitos que posteriormente se distribuyó en placas 96 pocillos de fondo plano utilizando una mini-malla con la ayuda de una micropipeta, tal como lo muestra el esquema del procedimiento en la Figura 7.

La metodología del bioensayo de letalidad con larvas de parásito tenía como objetivo determinar el porcentaje de individuos vivos con cada péptido para determinar los posibles péptidos bioactivos. El efecto antiparasitario de 21 péptidos se evaluó en una primera instancia a una única concentración de 100 μM en agua de mar filtrada, inoculando 100 μL de la solución en cada uno de los 96 pocillos que contenían 1 parásitos en cada uno. Se utilizó agua de mar filtrada como control negativo y azametifos a 0,1 ppm como control positivo. Los bioensayos y el mantenimiento de las placas se realizaron a 12°C, y los efectos se evaluaron en 12 muestras para cada péptido mediante tres réplicas del experimento.

Se realizaron lecturas cada 24 horas utilizando un microscopio estereoscópico (modelo Euromex NexiusZoom NZ.1903P) y un microscopio óptico (Carl Zeiss NT Stab), y el efecto sobre el parásito se evaluó categorizándolos como vivos o muertos. "Vivo" se refería a naupliu nadando activamente en la columna de agua (Santana et al., 2024b) , “muerto” indicaba la ausencia de nado, movimiento de apéndices, órganos o sistema digestivo.

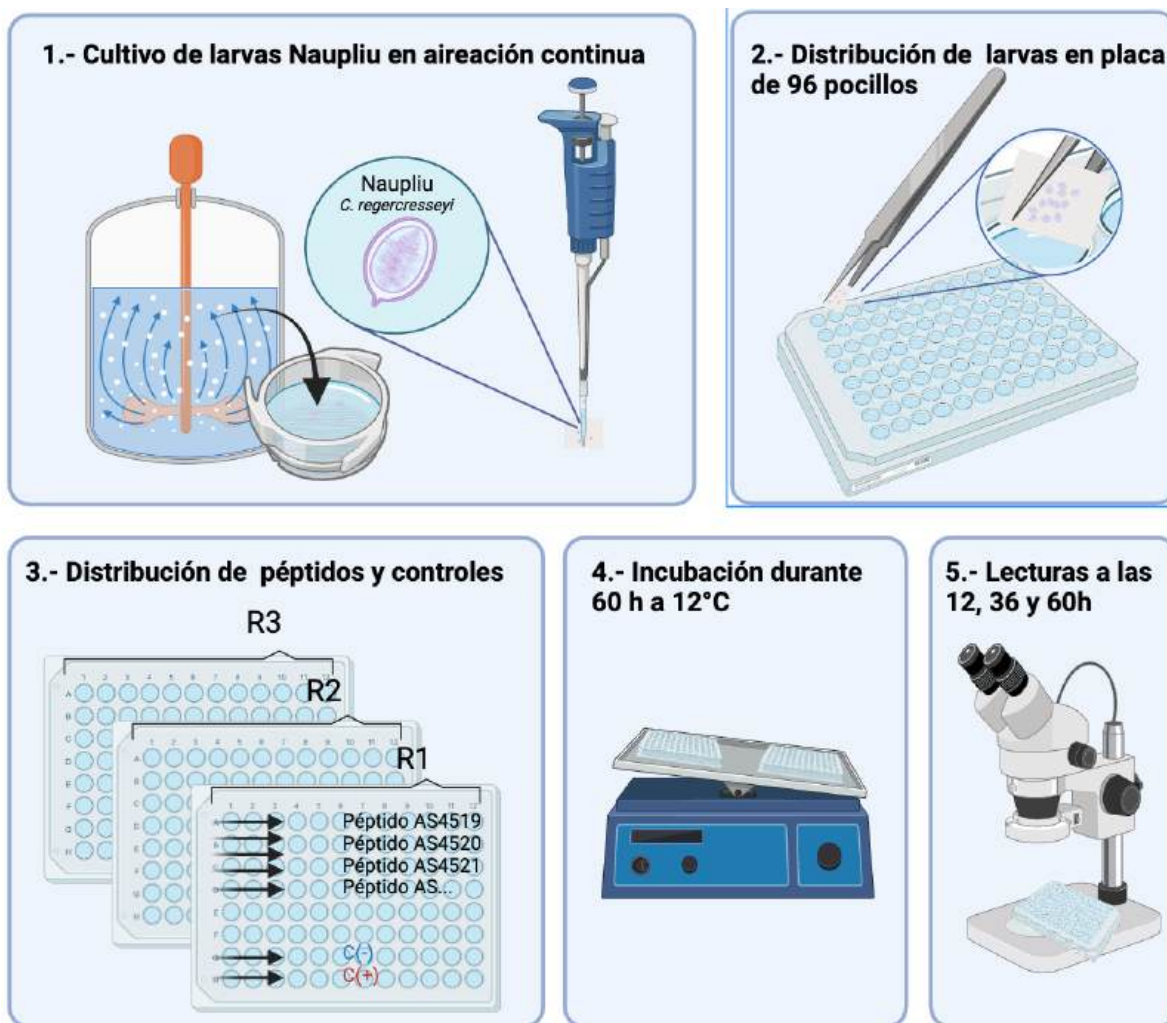


Figura 7: Esquema del procedimiento para el *screening* de actividad antiparasitaria de los péptidos contra *C. rogercresseyi* *in vitro*.

5.4.3. Evaluación *in vitro* de dosis respuesta de los péptidos seleccionados contra *C. rogercresseyi*

Al tener una primera aproximación de la actividad antiparasitaria con la evaluación inicial, se procedió con la determinación *in vitro* de dosis respuesta de los cuatro péptidos seleccionados. El efecto antiparasitario se evaluó como % de letalidad en placas de 96 pocillos a las concentraciones

de 200, 150, 100 y 50 μM para cada péptido. Se realizaron 12 replicas para cada condición, con 1 parásitos por pocillo y se utilizó agua de mar filtrada como control negativo y azametifos como control positivo a 0,1 ppm. Las lecturas fueron realizadas tras las 6, 24, 48, 72 y 96 h de exposición, teniendo las mismas consideraciones mencionadas en la sección 5.4.2.

5.5 Evaluación de la actividad hemolítica de los péptidos seleccionados

La actividad hemolítica se evaluó empleando glóbulos rojos obtenidos de sangre fresca de salmón, siguiendo el protocolo descrito por Santana et al. (Santana et al., 2021). La solución de eritrocitos se combinó en una proporción 1:1 con soluciones de los péptidos AS4525, AS4528, AS4531 y AS4532, a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 μM . La muestra de sangre con anticoagulante se mezcló por inversión y se adicionó a un tubo falcon de 15mL, luego se centrifugó a 2000g por 10 min a 4°C tal como lo muestra el procedimiento en la Figura 8. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en un volumen equivalente de tampón salino fosfato (PBS) 1X (pH 7,4), se repitió este ciclo de lavado 3 veces y el pellet final se resuspendió a una concentración de $\sim 6 \times 10^8$ células/mL. Después en un tubo eppendorf se agregaron 65 μL de la suspensión de hematocritos y 65 μL de péptido y se dejó incubar por 1hr a 18°C en agitación suave (100 rpm). Los controles utilizados fueron: Control 0% hemólisis: 65 μL de suspensión de eritrocitos y 65 μL de PBS 1X. Control 100% hemólisis: 65 μL de suspensión de eritrocitos y 65 μL de 0,5% v/v Tritón X-100. Pasado el período de incubación, la mezcla del péptido con los eritrocitos se centrifugó a 3000g por 5 min, se recuperaron 80 μL de sobrenadante y se agregaron a una placa de 96 pocillos con 80 μL de agua Milli-Q para medir su absorbancia a 540 nm. Finalmente, la actividad hemolítica se determinó por medio de la siguiente ecuación:

$$\%Hemolisis = \frac{Abs\ péptido - Abs\ 0\%}{Abs\ 100\% - Abs\ 0\%} \times 100 \quad (2)$$

Donde, Abs péptido = Absorbancia de péptidos, Abs 0% = Absorbancia Control 0% hemólisis y Abs 100% = Absorbancia Control 100% hemólisis.

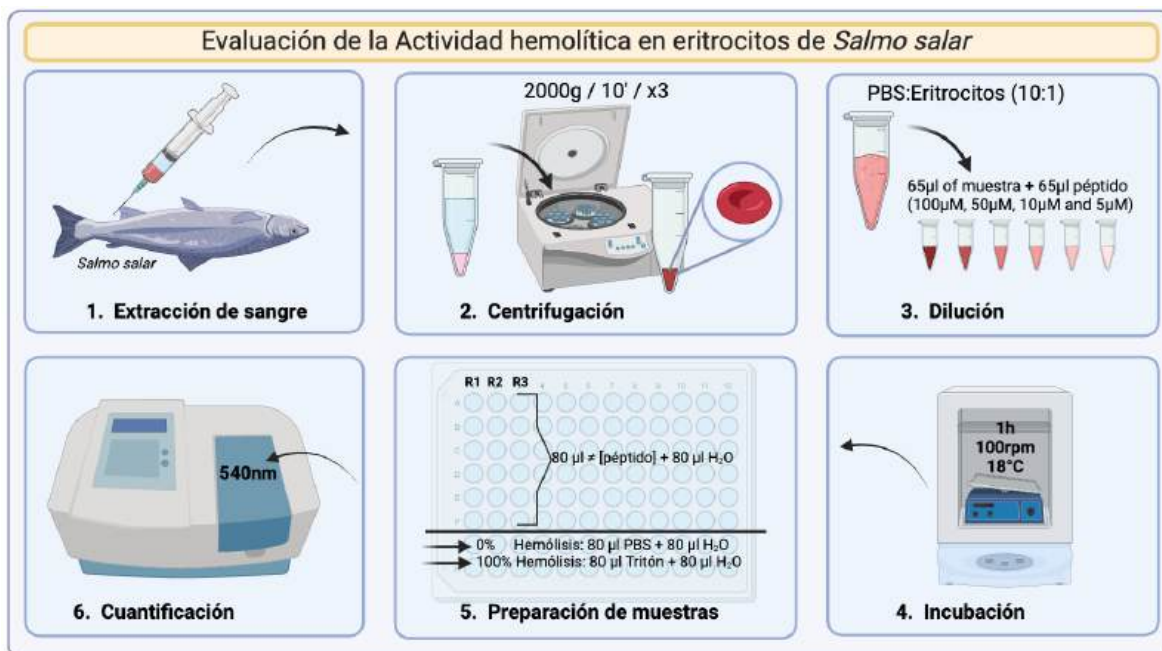


Figura 8: Esquema del procedimiento de la actividad hemolítica de los péptidos seleccionados en eritrocitos de *Salmo salar in vitro*.

5.6 Ensayo de Citotoxicidad en células RTgill mediante WST-1

La citotoxicidad inducida por péptidos sintetizados se evaluó en células RTgill-W1, una línea celular epitelial derivada de branquias de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), ampliamente utilizada como modelo *in vitro* en toxicología acuática, ya que las branquias son un órgano de contacto directo con el medio ambiente acuático.

Las células se cultivaron en medio Leibovitz's L-15, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Para analizar la viabilidad celular tras la exposición a los péptidos, se utilizó el kit WST-1 Cell Proliferation Assay (Jimeno-Romero et al., 2021) (Roche, Sigma-Aldrich), una herramienta analítica colorimétrica basada en la reducción enzimática del reactivo tetrazolio por células metabólicamente activas, lo que genera un compuesto formazán soluble cuya absorbancia es proporcional al número de células viables.

Una vez alcanzada la confluencia necesaria, se realizó la tripsinización para desprender las células adheridas, seguida del conteo celular en una cámara de Neubauer utilizando *Trian Blue* para evaluar la viabilidad. Las células viables se ajustaron a una concentración de $7,0 \times 10^4$ células/mL con medio de cultivo y se sembraron 100 µL por pozo en placas de 96 pocillos. Se establecieron tres condiciones

experimentales: control negativo (células sin tratar + 100 μ L de medio), control positivo (células + 100 μ L de DMSO al 10% en medio) y tratamiento con péptido (células + péptido disuelto en medio). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Las células se dejaron adherir durante 24 horas a 19 °C, tras lo cual se añadieron 10 μ L del péptido a las concentraciones de 100, 200 y 400 μ M, y se incubaron durante 24 y 48 horas. Luego, se agregó 10 μ L del reactivo WST-1 y se incubó nuevamente por 4 horas a 19 °C. Finalmente, la absorbancia se midió a 450 nm utilizando un lector de microplacas, y los resultados se analizaron y graficaron mediante el software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc.).

5.7 Caracterización de la enzima Acetilcolinesterasa

De acuerdo al enfoque de nuestro estudio, asociado a la inhibición de AChE, resulta indispensable la caracterización de esta enzima. Para lograrlo, se recopilaron secuencias y modelos estructurales de AChE de diversas especies, entre ellas *C. rogercresseyi*, *Lepeophtheirus salmonis*, *Salmo salar*, *Onchorhynchus mykiss*, *Onchorhynchus kisutch*, *Salmo trutta*, *Cyprinus carpio*, *Amphiprion ocellaris*, *Electrophorus electricus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Tetronarce californica* y *Plutella xylostella* de la base de datos Uniprot, como se detalla en la Tabla S1. Además, se incorporó la secuencia de una variante de la enzima para *C. rogercresseyi* según lo reportado en la literatura (Agusti-Ridaura et al., 2018).

5.8 Análisis de docking de los péptidos seleccionados con AChE

Para esclarecer el mecanismo de acción de los péptidos, se realizó un análisis de docking ciego a través del servidor HPEPDOCK (Zhou et al., 2018) (<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock/>). Para ello, se utilizaron las estructuras de las variantes de AChE de *C. rogercresseyi* generadas con AlphaFold como receptor y las secuencias de los péptidos seleccionados como ligandos. El análisis post-docking se realizó con Chimera UCSF (Pettersen et al., 2021), para seleccionar los complejos en que los péptidos se dirigían al sitio activo de la enzima. Los complejos seleccionados fueron analizados a través del servidor PRODIGY (Xue et al., 2016). Como control comparativo, se trabajó también con azametifos, obteniendo su estructura de Pubchem CID 71482, y utilizando el servidor ReverseDock (Krause et al., 2023), ya que permite usar un ligando con varios receptores, y de esta manera se evaluaron las variantes de AChE *C. rogercresseyi*.

5.9 Obtención de un extracto enzimático de AChE de *C. rogercresseyi*

El extracto enzimático de AChE se realizó según Herrera et al. (Herrera et al., 2015). Los parásitos en etapa adulta de *C. rogercresseyi*, previamente lavados con agua de mar filtrada y secados, se homogenizaron utilizando un mortero manual en PBS 0.1 M (pH 7,4) a una concentración de 0.1 g/mL de extracto de parásito en buffer. El material homogeneizado se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y se recolectó el sobrenadante. Este extracto enzimático se almacenó en condiciones de congelación a -20°C hasta su utilización.

5.10 Inmunodetección de AChE en el extracto enzimático de *C. rogercresseyi*

Para confirmar la presencia de AChE en la muestra de extracto enzimático de *C. rogercresseyi*, se cargaron 15 µg de proteínas totales en un gel SDS-PAGE al 8%. La AChE comercial de *Electrophorus electricus* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) se utilizó como control positivo, cargando 1 y 1,5 µg. Por otro lado, se realizó un *dot blot* en una membrana de nitrocelulosa, donde se cargaron 4 µg del extracto enzimático. Como control positivo se utilizó la enzima comercial *E. electricus*, y albúmina sérica bovina (BSA) como control negativo. Posteriormente, las membranas se bloquearon con 3% de BSA en PBS durante 1h a 37°C; se lavaron tres veces con PBS-0,05% Tween, y se incubaron con una dilución 1:1000 de anticuerpo primario anti-AChE producido en conejo (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 1,5 horas a 37°C. Después de tres lavados con PBS-0,05% Tween, se añadió anticuerpo secundario anti-IgG de cabra (H+L), conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante) (Thermo) en dilución 1:5000 e incubado a 37°C durante 60 minutos. Finalmente, la membrana se reveló con el kit de quimioluminiscencia ECL Pierce™ (ThermoFisher). Para complementar los resultados, se utilizó un ensayo de transferencia *Western blot* para confirmar la detección de la enzima AChE. Para esto se electrotransfirieron a la membrana 10 µg de la enzima comercial *E. electricus* y 30 µg de extracto enzimático y se bloquearon usando BSA al 3% en PBS durante 1 h a 37°C. Posteriormente se siguieron los mismos pasos utilizados para el *dot blot*, es decir, bloqueo de membrana, anticuerpo primario anti-AChE, anticuerpo secundario anti-IgG de cabra (H+L), y finalmente, revelado con el kit de quimioluminiscencia.

5.11 Determinación de la actividad enzimática de AChE en el extracto enzimático de *C. rogercresseyi*

Para determinar la actividad de AChE en el extracto enzimático, se construyó una curva estándar utilizando una preparación comercial de AChE de *E. electricus* conocida, expresada en unidades de actividad (U/mL). La actividad enzimática se evaluó utilizando el método de Ellman (Ellman et al., 1961), en microplacas de 96 pocillos. Este método permite evaluar la actividad enzimática mediante la formación de un producto amarillo, resultado de la interacción entre el tiol liberado durante la reacción catalizada por la enzima y el reactivo DTNB (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), detectable a 415 nm. Se utilizó acetiltiocolina yodada (ATCI) a concentraciones 0,7; 0,35; 0,175; 0,116 y 0,0875 mM como sustrato, y ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) a 1,5 mM como reactivo colorimétrico. Los reactivos y los péptidos se disolvieron en PBS 0.1 M (pH 7,4).

Para construir la curva, se prepararon diluciones seriadas de la enzima comercial en un rango de 0,02 U/mL a 0,5 U/mL. Cada punto de la curva correspondió a la pendiente de la formación de producto frente al tiempo (V_o). Los valores obtenidos se graficaron como V_o (pendiente) frente a la actividad enzimática (U/mL), generando una recta calibrada cuya ecuación permitió relacionar directamente las unidades de actividad con la velocidad inicial. Posteriormente, se midió la actividad enzimática del extracto enzimático bajo las mismas condiciones y los valores de V_o obtenidos para el extracto se interpolaron en la ecuación de la recta de la curva estándar, lo que permitió determinar las unidades de actividad en el extracto en términos de U/mL. Este valor se utilizó como referencia para ajustar el volumen de extracto enzimático en los ensayos de inhibición, garantizando que las reacciones se desarrollaran en el rango lineal del método.

5.12 Evaluación del mecanismo de inhibición enzimática de los péptidos en AChE

Para determinar las constantes de inhibición (K_i) de los cuatro péptidos en la enzima AChE, se realizaron ensayos cinéticos. En una placa de 96 pocillos, se incubaron 50 μ L de concentraciones crecientes de cada péptido con 50 μ L del extracto enzimático y 50 μ L de DTNB durante 30 minutos a 25°C. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de la solución de sustrato, obteniendo concentraciones finales de 25, 50, 100 y 200 μ M para cada péptido. Se realizaron lecturas desde el momento de adición del sustrato a 415 nm durante 40 min utilizando un lector de microplacas. La concentración del producto final, tiocolina, se determinó utilizando una curva estándar basada en la absorbancia medida.

5.13 Cálculo de las velocidades iniciales (V_o)

Las curvas de formación de producto ([P]) v/s tiempo (t) obtenidas para cada concentración de sustrato ([S]) e inhibidor ([I]) se ajustaron a una línea recta en el intervalo inicial donde la reacción era lineal. La pendiente de cada recta se utilizó como la velocidad inicial (V_o). Se aplicó una corrección de fondo utilizando los valores de absorbancia de los blancos correspondientes.

5.14 Gráficos de Lineweaver-Burk

Con los valores de V_o y las concentraciones de sustrato ([S]), se generaron gráficos de doble recíproco ($1/V_o$ v/s $1/[S]$) para cada concentración de inhibidor. Para los datos obtenidos, se observó que las rectas de Lineweaver-Burk convergían en el eje y ($1/V_o$), lo que confirmó que el tipo de inhibición correspondía a inhibición competitiva. Este comportamiento indica que el inhibidor compite directamente con el sustrato por el sitio activo de la enzima, incrementando el valor aparente de K_{ap} sin alterar V_{max} . A partir de los gráficos de Lineweaver-Burk, se determinaron los valores aparentes de la constante de Michaelis-Menten para cada concentración de inhibidor calculados a partir de la pendiente de las rectas ajustadas, considerando la ecuación 3:

$$Pendiente = \frac{K_{ap}}{V_{max}} \quad (3)$$

5.15 Gráfico Secundario K_{ap} v/s [I]

Los valores de K_{ap} se graficaron frente a las concentraciones de inhibidor ([I]). En el caso de la inhibición competitiva, la relación entre K_{ap} y [I] sigue la ecuación 4:

$$K_{ap} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{[K_i]} \right) \quad (4)$$

Este gráfico generó una línea recta cuya pendiente está directamente relacionada con la constante de inhibición K_i . Los datos se ajustaron mediante análisis de regresión lineal permitieron obtener el valor de K_i para cada péptido.

5.16 Caracterización química y funcional de los péptidos modificados

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó aquel péptido que presentó valor más bajo de K_i . A este péptido se le realizaron varias modificaciones para ser evaluado: se modificó la longitud de la secuencia, se realizó un reemplazo con D-aminoácidos y se acetiló el extremo amino. Todas las modificaciones fueron realizadas en el proceso de síntesis química del péptido, y fue corroborado mediante la caracterización química, tal como se describió en la sección 5.3. La caracterización funcional se realizó por el ensayo de actividad antiparasitaria, sección 5.4, se determinó la actividad citotóxica, sección 5.6 y finalmente la actividad inhibitoria de la enzima AChE, sección 5.12.

5.17 Análisis estadístico

Para comparar los efectos antiparasitarios de los péptidos y las dosis evaluadas, se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), seguido de una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey. En el caso de los análisis de citotoxicidad y hemólisis, se empleó un ANOVA de una vía, seguido de una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron con un valor de $p < 0,05$. Todos los datos fueron analizados y representados gráficamente utilizando el software estadístico GraphPad Prism 9.0 (Graphpad software, Inc.).

6 Resultados

6.1 Selección de potenciales péptidos inhibidores de AChE mediante modelo QSAR

Se generó un modelo QSAR tal como lo representa la Ecuación 5, utilizando la selección de los 69 compuestos inhibidores de AChE reportados (Tabla Suplementaria S1).

$$IC_{50} = 12,07(\pm 0,197) + 0,28 (\pm 0,006) * DCW \quad (5)$$

DCW corresponde a los descriptores calculados según lo indicado en la Sección 5.2. El comportamiento del modelo con los conjuntos utilizados para su construcción se muestra en la Figura 9. Como se puede observar, los valores de R^2 para los conjuntos de entrenamiento son superiores a 0,8, indicando una correlación entre los valores experimentales y los valores predichos de IC_{50} .

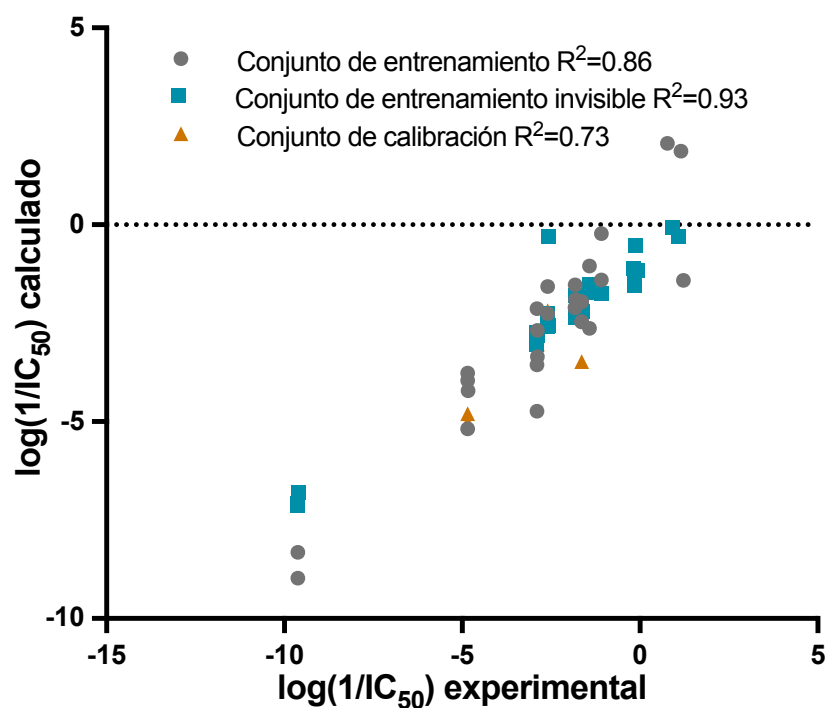


Figura 9: Correlación entre $\log(1/IC_{50})$ predicho y experimental. Resultados obtenidos con los diferentes conjuntos de datos utilizados para generar el modelo QSAR con CORAL. El valor de R^2 se indica para cada conjunto de datos.

Se incluyeron en el análisis, un total de 959 péptidos provenientes del mucus de la piel del salmón. Entre ellos, 20 eran péptidos previamente descritos en el mucus de la piel del salmón (Fæste et al., 2020b), mientras que los demás, fueron generados a través de hidrólisis *in silico* de proteínas del mucus de *Salmo salar* utilizando las enzimas quimotripsina, tripsina y pepsina. Estos péptidos, con longitudes que varían entre 9 y 20 residuos (Tablas Suplementarias S2 y S3), se utilizaron como datos de entrada para el modelo QSAR con el fin de identificar péptidos con potenciales actividades antiparasitarias basadas en la inhibición de la actividad de AChE, resultando en un IC₅₀ predictivo. Tras este análisis, se seleccionaron 21 péptidos con los valores de IC₅₀ más bajos, para su síntesis química y posterior prueba en ensayos experimentales. Estos péptidos se enumeraron de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2: Péptidos seleccionados según el modelo QSAR con IC₅₀ predictivo de AChE.

Péptidos	Secuencia	IC₅₀ (µM) predictivo
AS4519	EDIKDRRTL	0,23
AS4520	MGPYTITYF	0,33
AS4521	CSDSTSDLEK	0,40
AS4522	GGQTGTGSTR	0,40
AS4523	ETKETKKEDL	0,42
AS4524	KPDPKPDGL	0,74
AS4525	MKGDYYRYL	0,77
AS4526	ERIASEASKL	0,78
AS4527	QEYDEAGPSIVHR	5,06
AS4528	DEPGHFVLPAAEEK	2,41
AS4529	AEERTGAPKIAKDY	0,95
AS4530	MSSGNAKIGQPAPQF	0,97
AS4531	SIQFVDWCPTGFK	4,90
AS4532	VHWYVGEGMEEGEF	7,62
AS4533	RVEDGDKVAVDPSSY	2,26
AS4534	MEYDESGPAIVHR	0,52
AS4535	MANYHKPDEKTL	3,86
AS4536	MANSIDAVKRRKIKVL	1,96
AS4537	QEIPKGTKYQDF	0,01
AS4538	DVGVHWWILGHSER	78,30
AS4539	RQAIAERIKPVL	19,30

6.2 Síntesis química y caracterización de los péptidos seleccionados.

Se sintetizaron los 21 péptidos con potenciales actividades antiparasitarias basadas en la inhibición de la actividad de AChE. La síntesis se realizó por el método “Tea bag” síntesis simultánea, y los péptidos fueron caracterizados por HPLC y espectroscopía de masa UFLC-ESI-Masa obteniendo una pureza mayor al 95% y su masa teórica corresponde a la masa reportada, como se puede corroborar en la aparición de señales con relación masa/carga (m/z) coincidentes con las especies iónicas M+1, M+2, M+3, de cada secuencia (Tabla S4).

6.3 Actividad antiparasitaria de péptidos sintéticos contra *C. rogercresseyi*

Se realizó un *screening* inicial de la actividad antiparasitaria evaluando la supervivencia de los parásitos en el estadio nauplius II de *C. rogercresseyi*. El efecto sobre los parásitos se observó entre 12 y 60 h después del tratamiento, utilizando una única concentración de péptido de 100 μM (Figura 10). Tras las 60 horas de exposición, no sobrevivieron parásitos tratados con los péptidos AS4525, AS4528, AS4531 y AS4532. Además, los péptidos AS4531 y AS4532 mostraron una reducción de supervivencia a 44% y 8% respectivamente, después de 36 horas post-tratamiento (Tabla 3).

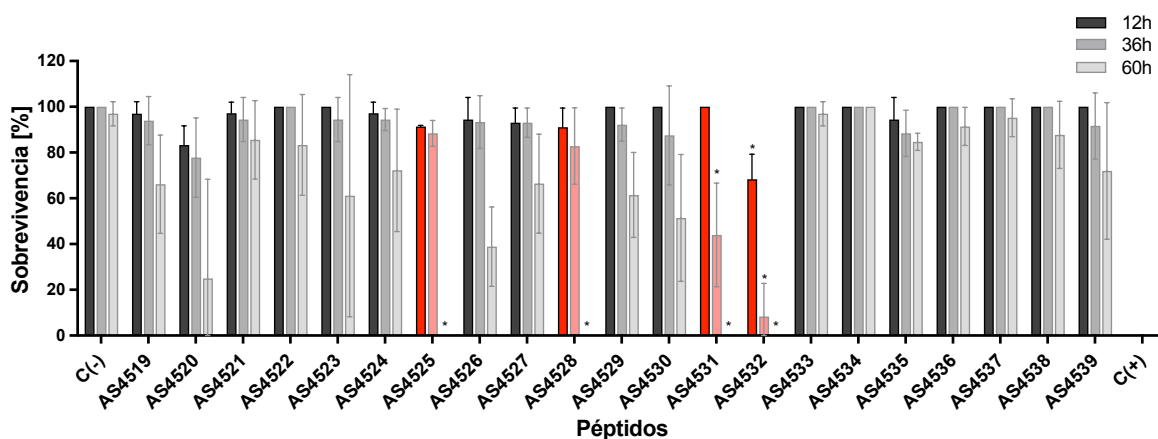


Figura 10: Evaluación de la supervivencia *C. rogercresseyi* en estadio nauplius. La figura muestra el porcentaje de supervivencia de los parásitos tratados con péptidos a una única concentración de 100 μM . Se utilizó agua de mar filtrada como control negativo y azametifos como control positivo a 0,1 ppm. La supervivencia en naupliu fue evaluada después de 12, 36 y 60 h. Los datos se presentan como media \pm SD de experimentos realizados por triplicado. Los péptidos que demostraron diferencias significativas en comparación con el control están resaltados en rojo (* indica significancia con $p < 0,05$).

Tabla 3: Porcentaje de supervivencia de *C. rogercresseyi* a lo largo del tiempo después de ser expuestos a los péptidos.

Porcentaje de supervivencia de <i>C. rogercresseyi</i>			
Tiempo	12h	36h	60h
C(-)	100%	100%	97%
AS4519	97%	94%	66%
AS4520	83%	78%	25%
AS4521	97%	94%	86%
AS4522	100%	100%	83%
AS4523	100%	94%	61%
AS4524	97%	94%	72%
AS4525	91%	94%	0%*
AS4526	94%	93%	39%
AS4527	93%	93%	66%
AS4528	91%	83%	0%*
AS4529	100%	92%	61%
AS4530	100%	88%	51%
AS4531	100%	44%*	0%*
AS4532	68%*	8%*	0%*
AS4533	100%	100%	97%
AS4534	100%	100%	100%
AS4535	94%	88%	85%
AS4536	100%	100%	91%
AS4537	100%	100%	95%
AS4538	100%	100%	88%
AS4539	100%	92%	72%
C(+)	0%	0%	0%

**Los péptidos muestran diferencias significativas en comparación con el control negativo*

6.4 Actividad antiparasitaria de los cuatro péptidos seleccionados contra *C. rogercresseyi*

La actividad antiparasitaria evaluada como letalidad (%) de los cuatro péptidos seleccionados contra el estadio nauplius II de *C. rogercresseyi* se observó entre 1 a 96 horas después del tratamiento,

utilizando concentraciones de 200, 150, 100 y 50 μM (Figura 11). Tras las 96 horas de exposición, todos los péptidos generaron un porcentaje de letalidad superior al 97%. Sin embargo, el péptido AS4532 fue quien presentó mayor efectividad, ya que a tiempos más cortos se observó un efecto de letalidad en el parásito a las concentraciones más bajas (Figura 11C). Estos resultados se complementan con los valores de EC_{50} calculados a partir de los gráficos dosis respuesta (Figura S3), en donde se evidencia que el péptido AS4532 tiene el menor valor de EC_{50} de 3 μM a las 48 h de exposición (Tabla 4).

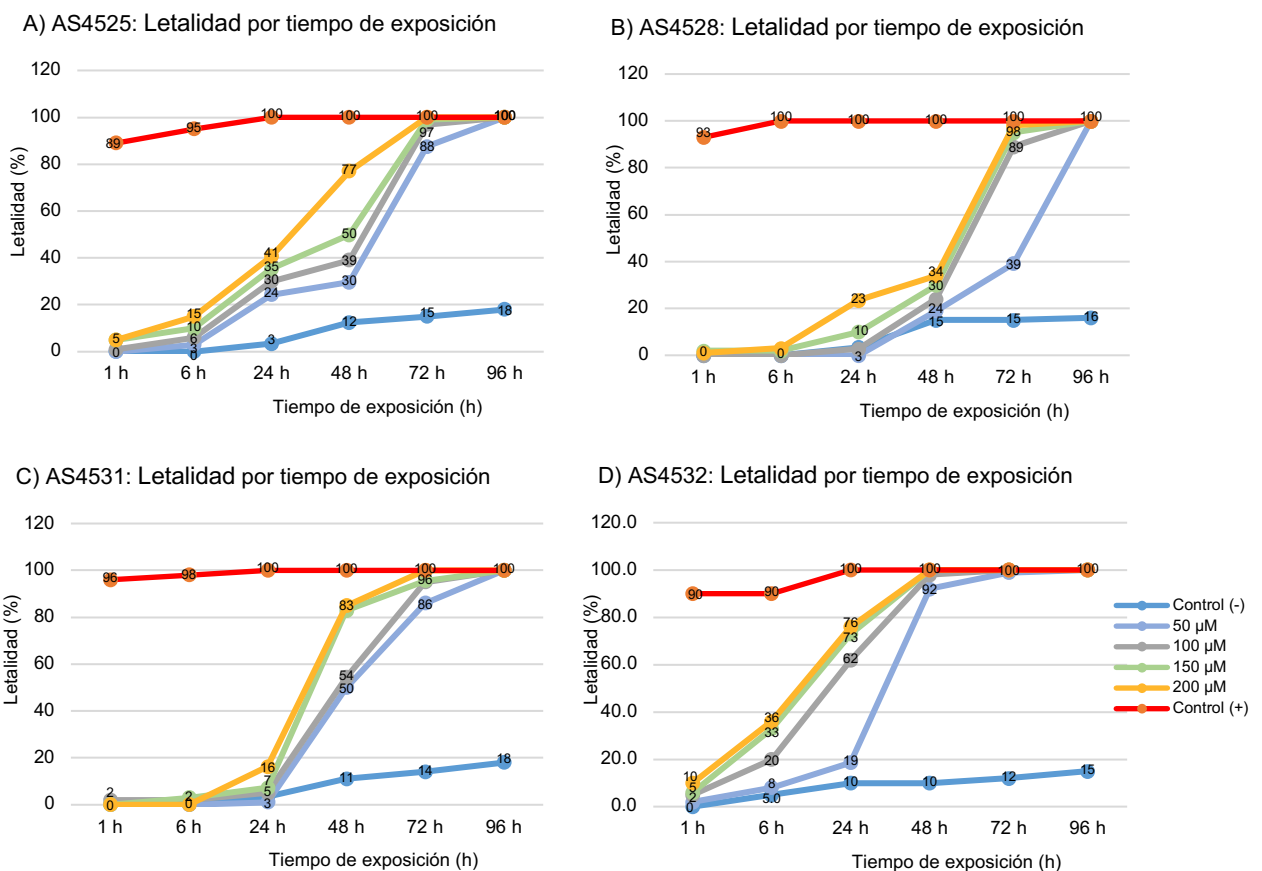


Figura 11: Evaluación de letalidad de los péptidos seleccionados sobre *C. rogercresseyi*. Gráficas de letalidad (%) en función del tiempo. Cada péptido fue evaluado a 200 (amarillo), 150 (verde), 100 (gris), 50 μM (lila) al ser expuesto a 1, 6, 24, 48, 72 y 96 h. Se realizaron 12 replicas para cada condición, con 3 parásitos por pocillo y se utilizó agua de mar como control negativo 0 μM (celeste) y azametifos como control positivo a 0,1 ppm (rojo).

Tabla 4: Valores de EC₅₀ calculado a partir de los gráficos dosis dependiente. Cada valor representa la concentración de péptido que produce una letalidad del 50% de *C. rogercresseyi* a un tiempo determinado.

	EC ₅₀ (μM)					
	1 h	6 h	24 h	48 h	72 h	96 h
AS4525	3905	1273	252	117	5	0,0002
AS4528	14841	8201	1045	338	31	0,0002
AS4531	37200	11308	1421	51	7	0,0002
AS4532	1982	358	81	3	0,4	0,0002

6.5 Determinación de la toxicidad de los péptidos con potencial actividad antiparasitaria

Luego de evaluar la letalidad *C. rogercresseyi* frente a los cuatro péptidos seleccionados, se procedió a evaluar su toxicidad, en células de salmónidos. Por este motivo, se evaluaron concentraciones definidas para fines terapéuticos utilizando en primera instancia, eritrocitos de *Salmo salar* para la determinación de la actividad hemolítica. Los resultados muestran que los péptidos no tienen una actividad hemolítica significativa en las distintas concentraciones evaluadas (Figura 12), con un porcentaje de hemólisis ≤5% en todos los casos.

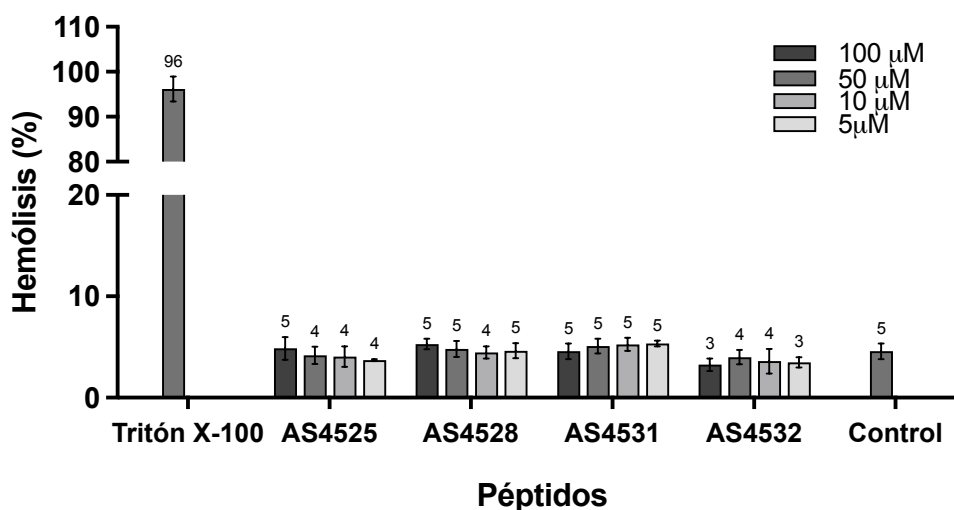


Figura 12: Actividad hemolítica de los péptidos seleccionados. Determinación de la actividad hemolítica en glóbulos rojos de salmón a diferentes concentraciones de los péptidos AS4525, AS4528, AS4531 y AS4532. (100, 50, 10 y 5 μM). Como control hemolítico negativo se utilizó PBS1X, mientras que como control hemolítico positivo se utilizó Tritón X-100. Todos los péptidos mostraron diferencias significativas con $p < 0,05$ en comparación con el control positivo.

Posteriormente, se evaluó el efecto de estos péptidos en la viabilidad de la línea celular de branquias de salmónidos RTgill. Luego de 36 h de exposición, solo el péptido AS4532 a 400 μM (58%), redujo significativamente la sobrevivencia de las células RTgill (Figura 13A). Mientras que, luego de 60 h de exposición, los péptidos AS4531 a 400 μM y AS4532 a una concentración de 400 y 200 μM reducen el porcentaje de sobrevivencia hasta un 75, 54 y 73%, respectivamente (Figura 13B).

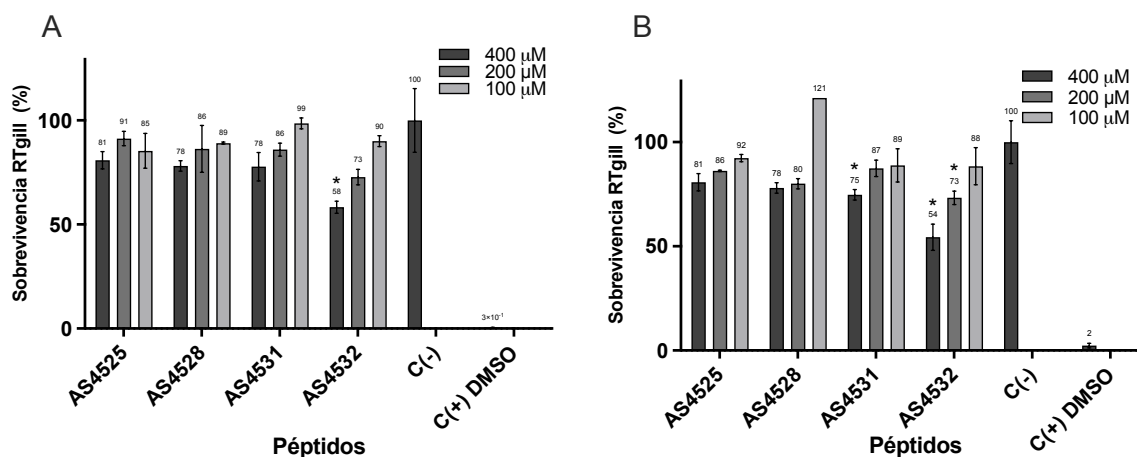


Figura 13: Viabilidad celular de RTgill con los péptidos seleccionados. Determinación del porcentaje de sobrevivencia en células RTgill al interactuar a las diferentes concentraciones de los péptidos AS4525, AS4528, AS4531 y AS4532. (100, 200 y 400 μM). Como control negativo se utilizó PBS1X, mientras que como control positivo se utilizó DMSO al 10%. (A) Evaluación con 36h de exposición. (B) Evaluación con 60 h de exposición. Los péptidos que mostraron diferencias significativas en comparación con el control negativo están resaltados con * indicando significancia con $p < 0,05$.

Asimismo, se calcularon algunas propiedades fisicoquímicas de los péptidos activos utilizando el paquete Peptides (Krause et al., 2023) en Rstudio 2023.06.2, y la predicción de la penetración en la barrera hematoencefálica se llevó a cabo mediante el servidor B3Pred. Estos resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Propiedades fisicoquímicas calculadas con el paquete Peptides (Osorio et al., 2015). PI: Punto isoeléctrico, AI: Índice alifático. Boman: Índice de Boman. Charge: carga a pH 7. Hphob: Índice GRAVY con la escala de Kidera. % Aromático: Porcentaje de residuos aromáticos. El puntaje B3Pred corresponde a la predicción de la penetración de la barrera hematoencefálica.

Peptide	PI	AI	Boman	Charge	Hphob	%Aromatic	B3Pred score
AS4525	9,05	43,33	2,38	1	0,08	33,33	0,12
AS4528	4,15	55,71	1,67	-2,97	0,03	14,29	0,01
AS4531	6,16	52,31	0,49	-0,06	-0,22	23,08	0,03
AS4532	3,82	41,43	0,96	-3,9	-0,04	28,57	0,14

6.6 Caracterización de la AChE de *C. rogercresseyi*

Para comparar y verificar la similitud de AChE de las diferentes especies descritas, se obtuvieron las secuencias de la base de datos Uniprot (Tabla 6). La variante 1A de *C. rogercresseyi* se obtuvo como el marco de lectura abierto (ORF) de la secuencia de nucleótidos reportada por Agusti-Ridaura et al. (Agusti-Ridaura et al., 2018b). Además, se generó el mutante 1A con una sustitución F por V en la posición 318. La AChE tiene diferentes sitios importantes y la mayoría de los reportes incluyen la *T. californica* como enzima comparativa, es por esto que mediante un alineamiento múltiple se utilizó a *T. californica* como referencia para la enumeración. La comparación se realizó a nivel de estructura primaria y terciaria, donde se observó un alto grado de conservación de esta proteína entre las diferentes especies, tanto a nivel de secuencia como estructural. Las mayores diferencias se encontraron en las regiones terminales (regiones enmarcadas en azul en la Figura 14), hacia el extremo N-terminal, donde se ubicaba el péptido señal, y en la región C-terminal. El resto de la secuencia proteica está bastante conservado, y todas las secuencias de salmónidos presentan una región de inserción de aproximadamente 26 residuos hacia la región C terminal (Figura 14).

Tabla 6: Números de acceso para las secuencias y modelos estructurales de la AChE de diferentes organismos.

Fuente	Etiqueta	Uniprot ID	Estructura 3D*
<i>Caligus rogercresseyi</i>	Calro1A	GAZX01027370 [‡]	Modelo Alphafold
	Calro1A_V	ND	Modelo Alphafold
	Calro1B	A0A345DGH5	AF-A0A345DGH5-F1
<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	Lepsm1A	A0A0A7E9D3	AF-A0A0A7E9D3-F1
	Lepsm1B	A0A0A7E972	AF-A0A0A7E972-F1
<i>Salmo salar</i>	Salsa	A0A1S3N9K7	AF-A0A1S3N9K7-F1
<i>Onchorhynchus mykiss</i>	Onemy	A0A8C7LXG5	Modelo Alphafold
<i>Onchorhynchus kisutch</i>	Oncki	A0A8C7CIG2	Modelo Alphafold
<i>Salmo trutta</i>	Saltr	A0A673YS56	AF-A0A673YS56-F1
<i>Cyprinus carpio</i>	Cypca	B7X755	AF-B7X755-F1
<i>Amphiprion ocellaris</i>	Ampoc	A0A3Q1B4K1	AF-A0A3Q1B4K1-F1
<i>Electrophorus electricus</i>	Eleel	O42275	AF-O42275-F1
<i>Mus musculus</i>	Mouse	P21836	1Q83
<i>Homo sapiens</i>	Human	P22303	4BDT
<i>Tetronarce californica</i>	TetCF	P04058	1EA5
<i>Plutella xylostella</i>	Pluxy	A0A854E7J2	Modelo Alphafold

[‡] Este número de acceso corresponde a la secuencia de nucleótidos, y la proteína se deriva del marco de lectura abierta +1 de esta variante (Agusti-Ridaura et al., 2018b).

*Solo se han reportado estructuras experimentales en ratones y humanos; las otras estructuras corresponden a modelos de Alphafold obtenidos de Uniprot o construidos a través de Alphafold colab en Google (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>).

fue la AChE humana (ID PDB 6U37), que incluye las posiciones 37-574, utilizando el software Chimera (Pettersen et al., 2021).

El alineamiento de todas las secuencias demostró la conservación de residuos clave (Figura 14), incluidos los de la tríada catalítica y otros residuos reportados como importantes tanto para la localización del sustrato como para su especificidad, como el bolsillo de colina, el agujero de oxianión, y el bolsillo acilo. Asimismo, los 14 aminoácidos aromáticos presentes en la mayoría de las AChE descritas están conservados en *C. rogercresseyi* 1A, con dos excepciones: Tyr91, que cambia a una Val en ambas variantes de *C. rogercresseyi* (Ile en el caso de la variante 1B), y Tyr463, que cambia a Asp en ambos parásitos (*C. rogercresseyi* y *L. salmonis*) y en el insecto *Plutella xylostella* (la numeración se refiere a *Tetronarce californica*). La mutación reportada en *Calro* 1A corresponde al residuo aromático Phe311 (sustituido por Val), que es parte del bolsillo acilo. Además, la variante *Calro* 1B tiene cinco cambios en los residuos aromáticos: Tyr91[Ile60], Phe360[Ile281], Phe351[Pro321], Phe352[Asp322] y Tyr463 [Glu344] (la numeración se refiere a *T. californica*, el número correspondiente a *C. rogercresseyi* 1B está en paréntesis cuadrados). Los RMSD (desviación cuadrática media de la raíz) de las estructuras comparadas se presentan en la Figura Suplementaria S2.

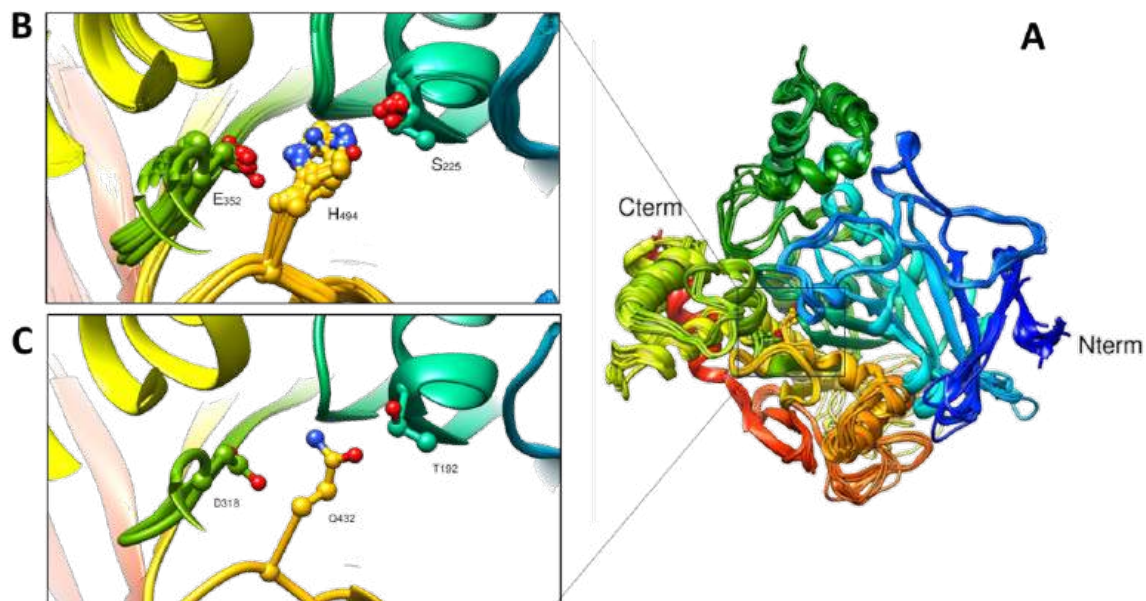


Figura 15: Comparación estructural de AChE. (A) Superposición de los 16 modelos estructurales de la Tabla 6. (B) Detalle de la tríada catalítica, los números de residuos se refieren a la secuencia de AChE de *C. rogercresseyi* 1A. (C) Residuos para la tríada catalítica en *C. rogercresseyi* 1B.

Además, todos los residuos de aminoácidos representados en el alineamiento de la Figura 14 para *C. rogercresseyi* 1A se ilustran en la Figura 16, proporcionando una vista detallada de la hendidura de entrada al sitio activo.

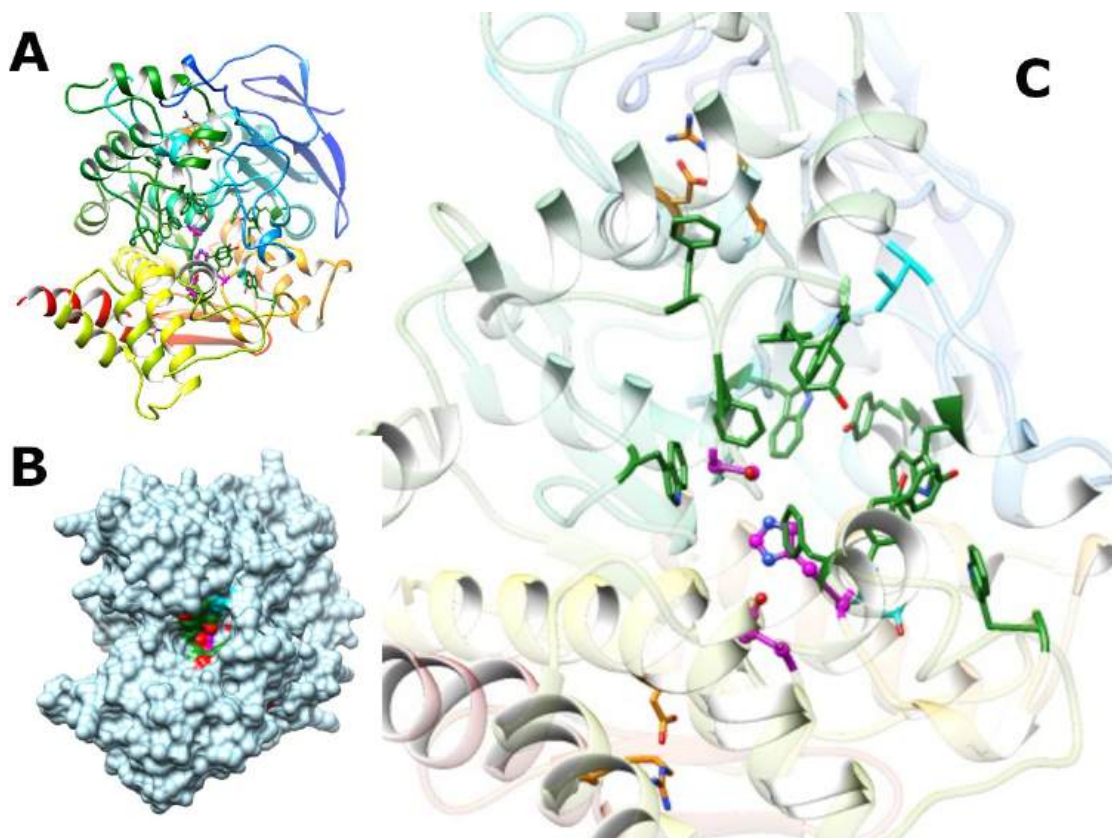


Figura 16: Modelo estructural de la AChE 1A de *C. rogercresseyi*. (A) y (B) Estructura completa de la AChE representada en cintas y en superficie, respectivamente. En (C) se muestra una vista detallada de la hendidura de entrada al sitio activo, con los residuos de la tríada catalítica representados en modelo de esferas y varillas resaltados en magenta, los 12 residuos aromáticos conservados están en varillas de color verde oscuro, y los dos residuos no conservados en varillas de color cian. Los cuatro residuos cargados que forman puentes salinos están representados en varillas de color naranja.

6.7 Inmunodetección de la enzima AChE en el extracto enzimático

La detección de la AChE en el extracto enzimático de *C. rogercresseyi* se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE seguido de *Western Blot*, utilizando anticuerpo comercial anti-AChE producido en conejo. Se utilizó como control, la enzima comercial de *E. electricus* (Figura 17B y C). La AChE de *C. rogercresseyi*, se detectó en su forma monomérica de 70 kDa.

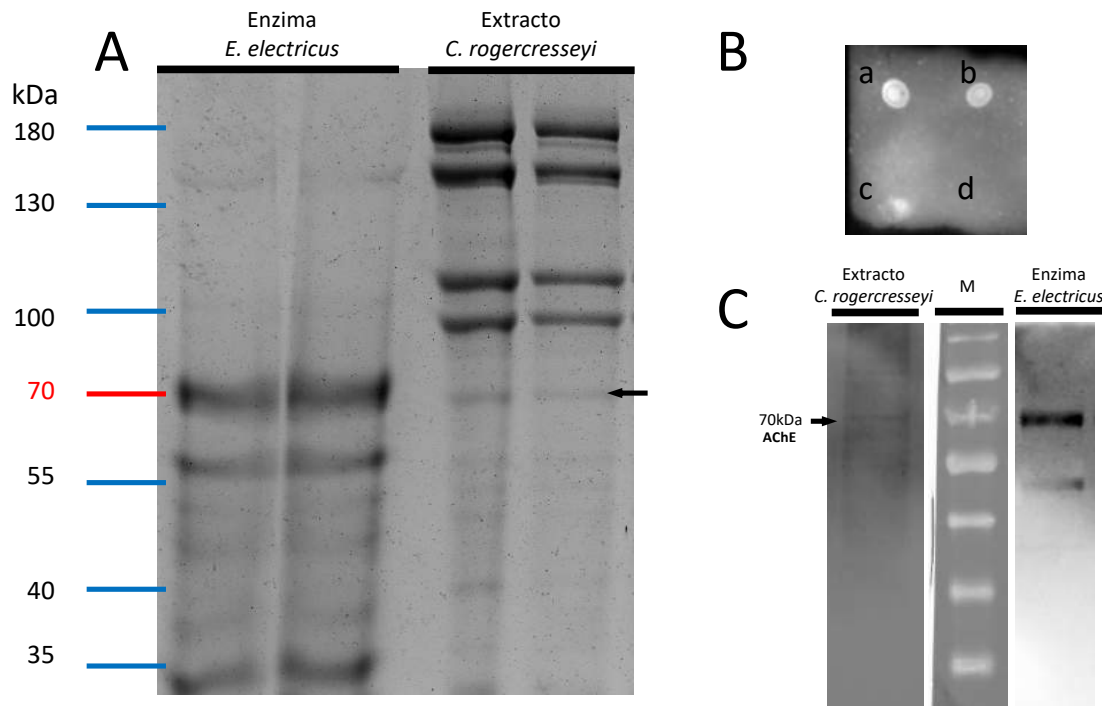


Figura 17: Identificación de la enzima AChE en el extracto enzimático. (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Los carriles 1 y 2 comparan la enzima comercial de *Electrophorus electricus*, y los carriles 3 y 4 el extracto enzimático de *C. rogercresseyi*, donde se identifica el monómero de AChE a 70 kDa (flecha negra). (B) Identificación mediante anticuerpo anti-AChE vía *dot blot*, donde a) y b) muestran el extracto enzimático de *C. rogercresseyi*; c) enzima comercial de *E. electricus*; d) control con BSA. (C) *Western blot* donde para la detección de AChE en el extracto enzimático de *C. rogercresseyi* y enzima comercial de *E. electricus* y, en ambos casos se identifica la banda a 70 kDa. M: marcador de peso molecular.

6.8 Determinación de la actividad enzimática AChE de *C. rogercresseyi*

Luego de asegurar que AChE estaba presente en los extractos enzimáticos de *C. rogercresseyi*, se procedió a analizar su actividad enzimática. Se generó una curva estándar con la enzima comercial de AChE de *E. electricus* (Figura 18A), interpolando el valor de V_0 con el extracto de *C. rogercresseyi*, para determinar una actividad de 0,21 U/mL. Una vez determinado este valor se utilizó como referencia para ajustar el volumen de extracto enzimático en los ensayos de inhibición, garantizando que las reacciones se desarrollaran en el rango lineal del método.

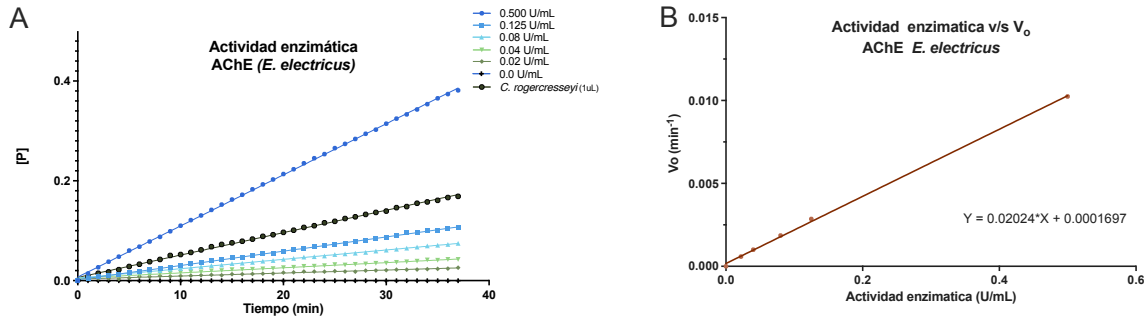


Figura 18: Gráficos para la determinación de la actividad enzimática de AChE de *C. rogercresseyi*. (A) Curva de progreso de la reacción catalizada por AChE de *E. electricus*. (B) Curva de V_o utilizada para interpolar el valor del extracto enzimático, que se calcula a partir de la pendiente de la porción inicial de la curva, donde la reacción es lineal y no está limitada por factores como la concentración de sustrato o la acumulación de producto.

6.9 Mecanismo de inhibición enzimática de AChE de *C. rogercresseyi* por los péptidos seleccionados

Para evaluar el mecanismo inhibitor de AChE de los péptidos seleccionados, se realizaron experimentos cinéticos. Para este propósito, se evaluó la cinética de inhibición enzimática, utilizando diferentes concentraciones de sustrato en ausencia y presencia de los péptidos seleccionados a diferentes concentraciones (Figura 19). El análisis gráfico de los diagramas recíprocos de Lineweaver-Burk se utilizó para determinar los parámetros cinéticos en la ecuación de Michaelis-Menten (K_m y V_{max}).

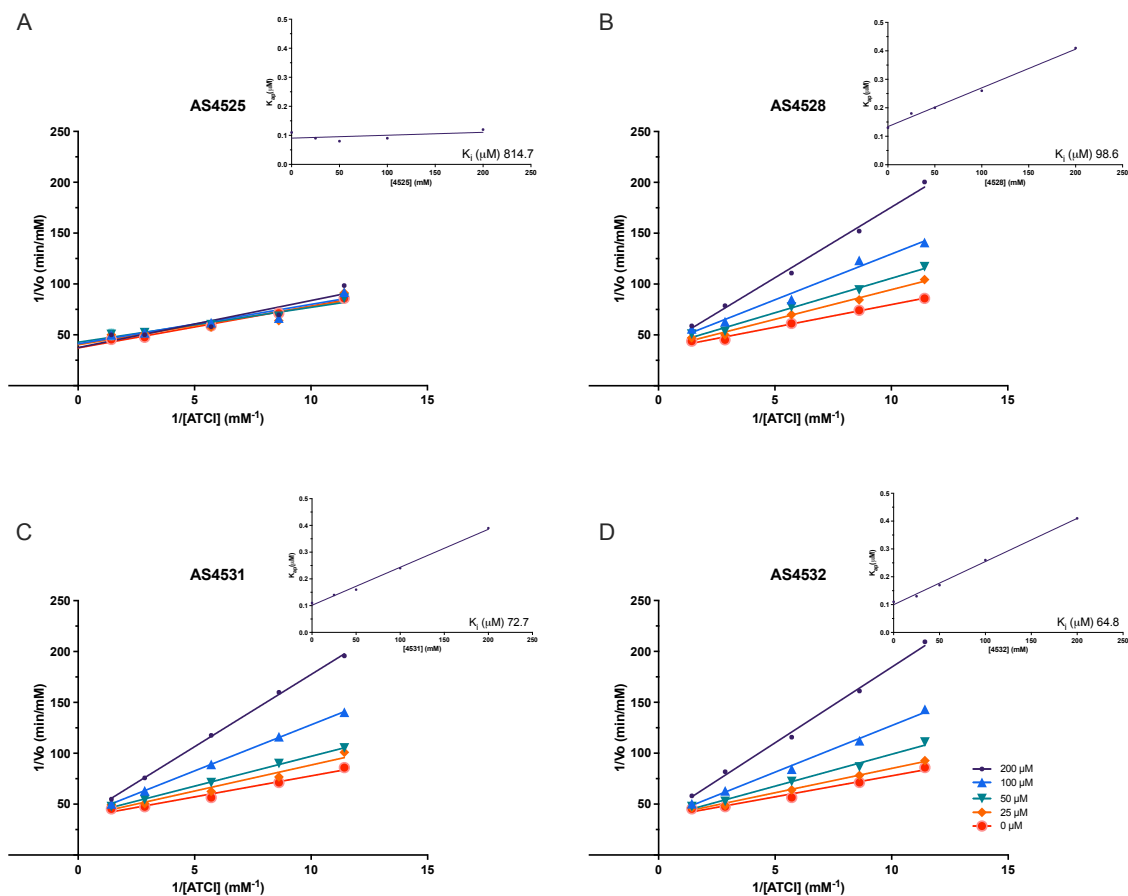


Figura 19: Estudios cinéticos sobre el mecanismo de inhibición de AChE de *C. rogercresseyi* para los péptidos seleccionados. El efecto de los inhibidores sobre la enzima AChE se determinó a partir de la gráfica recíproca doble de $1/v_0$ frente a $1/\text{concentración de sustrato}$ en presencia de concentraciones variables de los inhibidores. Valores de K_i fueron calculados mediante la intersección de las curvas obtenidas al representar gráficamente K_{ap} frente a la concentración de inhibidor para cada concentración de sustrato (gráficos insertados en la parte superior derecha). A) Péptido AS4525. (B) Péptido AS4528. (C) Péptido AS4531. (D) Péptido AS4532. Todos fueron probados a concentraciones de 200 μM (negro), 100 μM (azul), 50 μM (verde), 25 μM (naranja) y 0 μM (sin inhibidor en rojo).

El ensayo de inhibición enzimático mostró que tres péptidos fueron capaces de inhibir la enzima AChE de *C. rogercresseyi*. Para AS4528, AS4531 y AS4532 se obtuvo que las K_{ap} aumentaron respecto a la K_m (control sin péptido), mientras que V_{max} permaneció sin cambios al ir incrementando las concentraciones de péptido (Tabla 7). Los gráficos de Lineweaver-Burk obtenidos para estos compuestos mostraron una serie de líneas convergentes en el mismo punto del eje y ($1/[V_0]$), lo que perfila un mecanismo de inhibición competitivo (Figura 19). A partir de los gráficos obtenidos de K_{ap} frente a la concentración de péptido (Figura 19, esquinas superiores derechas), se calcularon las afinidades de unión de inhibición de AChE, determinadas como constantes de inhibición (K_i). El

péptido AS4532 fue el que obtuvo un valor más bajo de K_i correspondiente a 64.8 μM (Figura 19D, esquina superior derecha). Por el contrario, el péptido AS4525 no mostró actividad inhibitoria de la enzima AChE en ninguna de las concentraciones probadas ya que ambos valores de V_{max} y K_{ap} no cambiaron respecto al control sin péptido (Tabla 7).

Tabla 7: Valores de V_{max} , K_{ap} y K_i de la actividad de AChE de *C. rogercresseyi* tratados con los cuatro péptidos seleccionados. Los péptidos que mostraron diferencias significativas en comparación con el control sin péptido, están resaltados con * y en negrilla, indicando significancia con $p < 0,05$.

Péptidos		i = 200 (μM)	i = 100 (μM)	i = 50 (μM)	i = 25 (μM)	i = 0 (μM)		
AS4525	V_{max}	0,027	0,024	0,023	0,025	V_{max} 0,027		
	K_i 814,7	K_{ap}	0,124	0,094	0,080		0,094	
AS4528	V_{max}	0,027	0,027	0,026	0,027		K_m 0,111	
	K_i 98,6	K_{ap}	0,376*	0,228*	0,179*			0,161*
AS4531	V_{max}	0,027	0,027	0,027	0,027			K_m 0,111
	K_i 72,7	K_{ap}	0,386*	0,241*	0,157*			
AS4532	V_{max}	0,028	0,028	0,028	0,027	K_m 0,111		
	K_i 64,8	K_{ap}	0,412*	0,256*	0,173*			

6.10 Estudio de docking molecular

Para complementar los análisis cinéticos, se realizaron pruebas de docking que apoyen el mecanismo de acción de los péptidos seleccionados, así como determinar la afinidad de estos en la inhibición de AChE. El análisis de los complejos acoplados realizado con Chimera mostró que todos los péptidos son capaces de interactuar con las tres variantes de AChE de *C. rogercresseyi* (Figura 20).

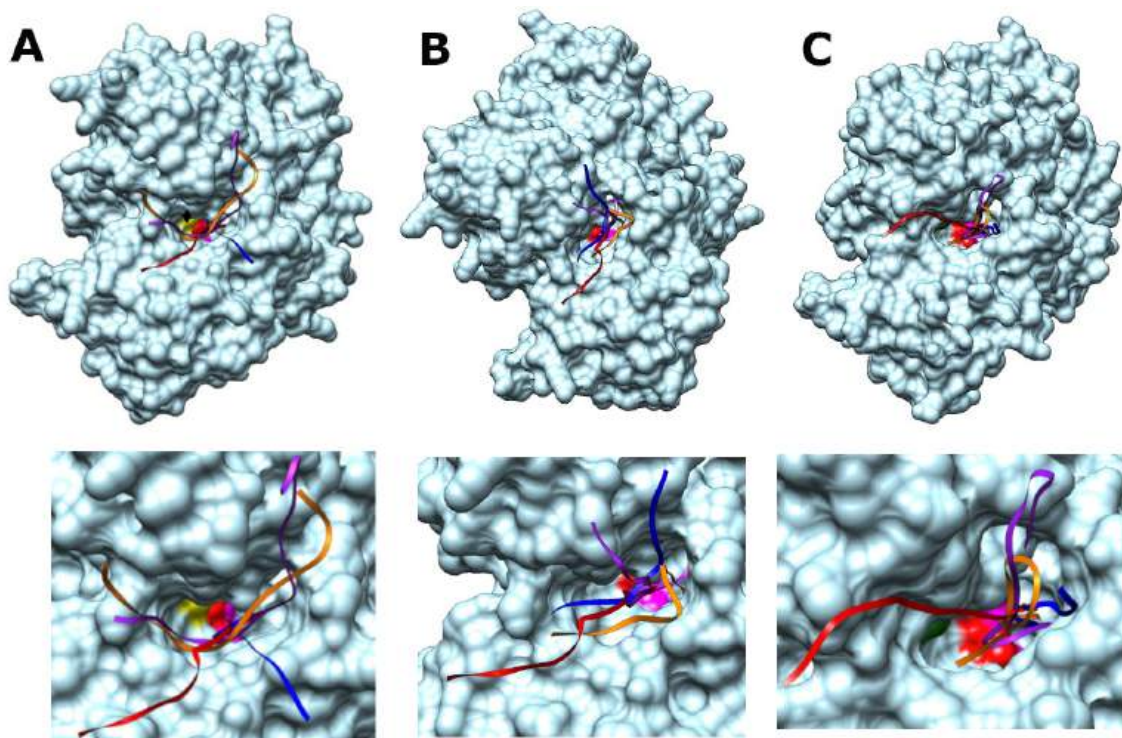


Figura 20: Análisis de docking múltiple de péptidos. La AChE de *C. rogercresseyi* acoplada con los péptidos AS4525 (cinta azul), AS4528 (cinta púrpura), AS4531 (cinta naranja) y AS4532 (cinta roja). (A) Calro1A (B) Calro1A_V₃₁₈ (C) Calro1B.

Los análisis realizados con la variante Calro1A, revelaron que los péptidos AS4528 y AS4531 no penetran en el sitio activo de la enzima, sino que se posicionaron cubriendo la entrada de la hendidura (cinta púrpura y naranja, respectivamente, en la Figura 20A, y Figura 21). Para la variante Calro1A_V₃₁₈, el péptido AS4525 permaneció posicionado para cubrir la entrada del desfiladero (cinta azul en la Figura 20B, y Figura 22), mientras que los péptidos, AS4528 y AS4531 entraron en el sitio activo. De manera similar, en la variante Calro1B, todos los péptidos se situaron dentro de la hendidura (Figura 20C y Figura 23).

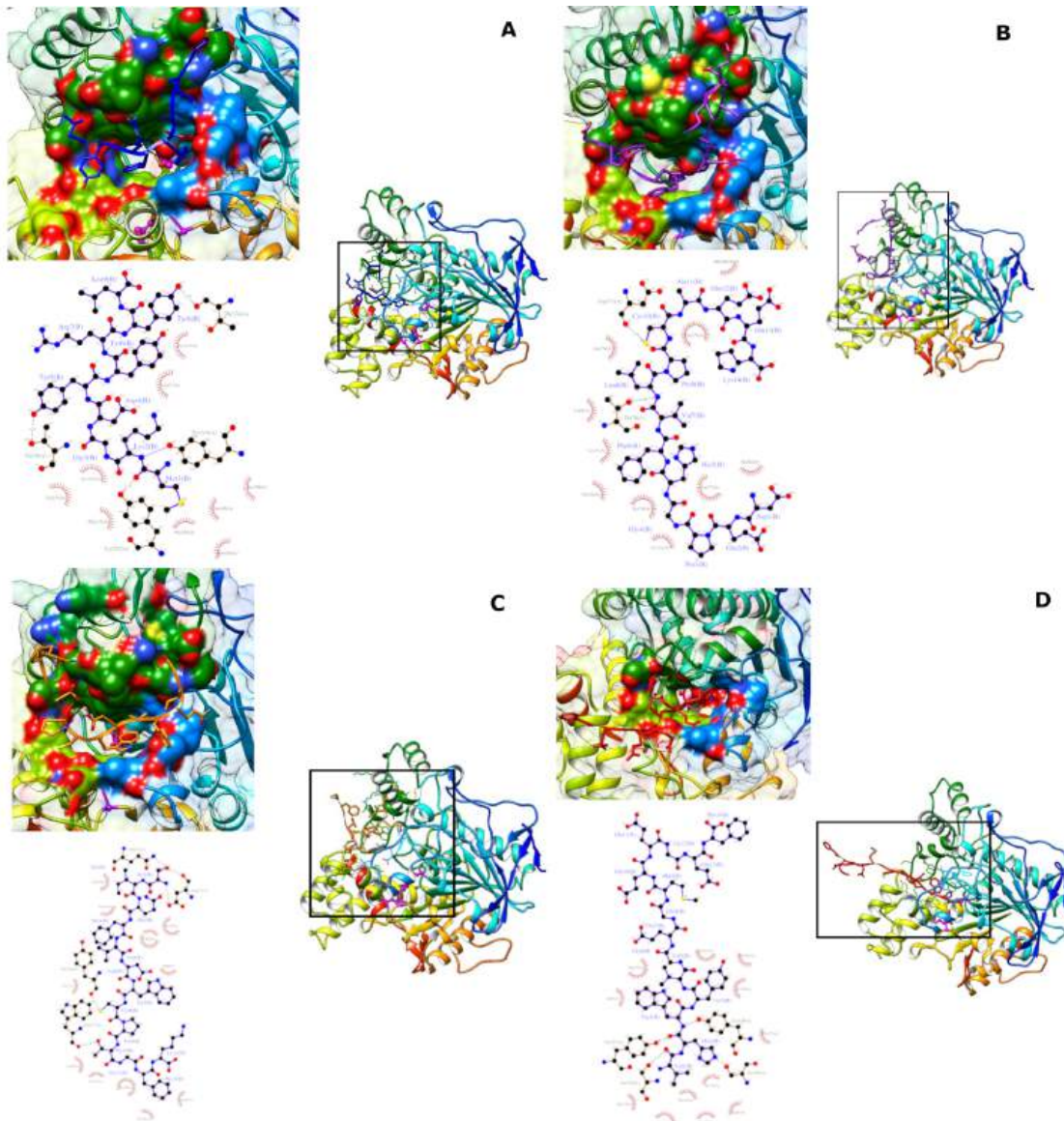


Figura 21: Interacción de los péptidos con la variante 1A de AChE de *C. rogersesseyi*. (A) Péptido AS4528 cinta azul. (B) Péptido AS4528 cinta púrpura. (C) Péptido AS4531 cinta naranja. (D) Péptido AS4532 cinta roja. Los residuos de la tríada catalítica están en magenta, y los residuos de interacción para cada péptido están mostrados en varillas. El panel derecho de cada figura muestra la estructura completa acoplada a cada péptido, un primer plano del sitio de interacción en la superficie se muestra en el lado izquierdo, y un diagrama 2D de la interacción se muestra en la parte inferior.

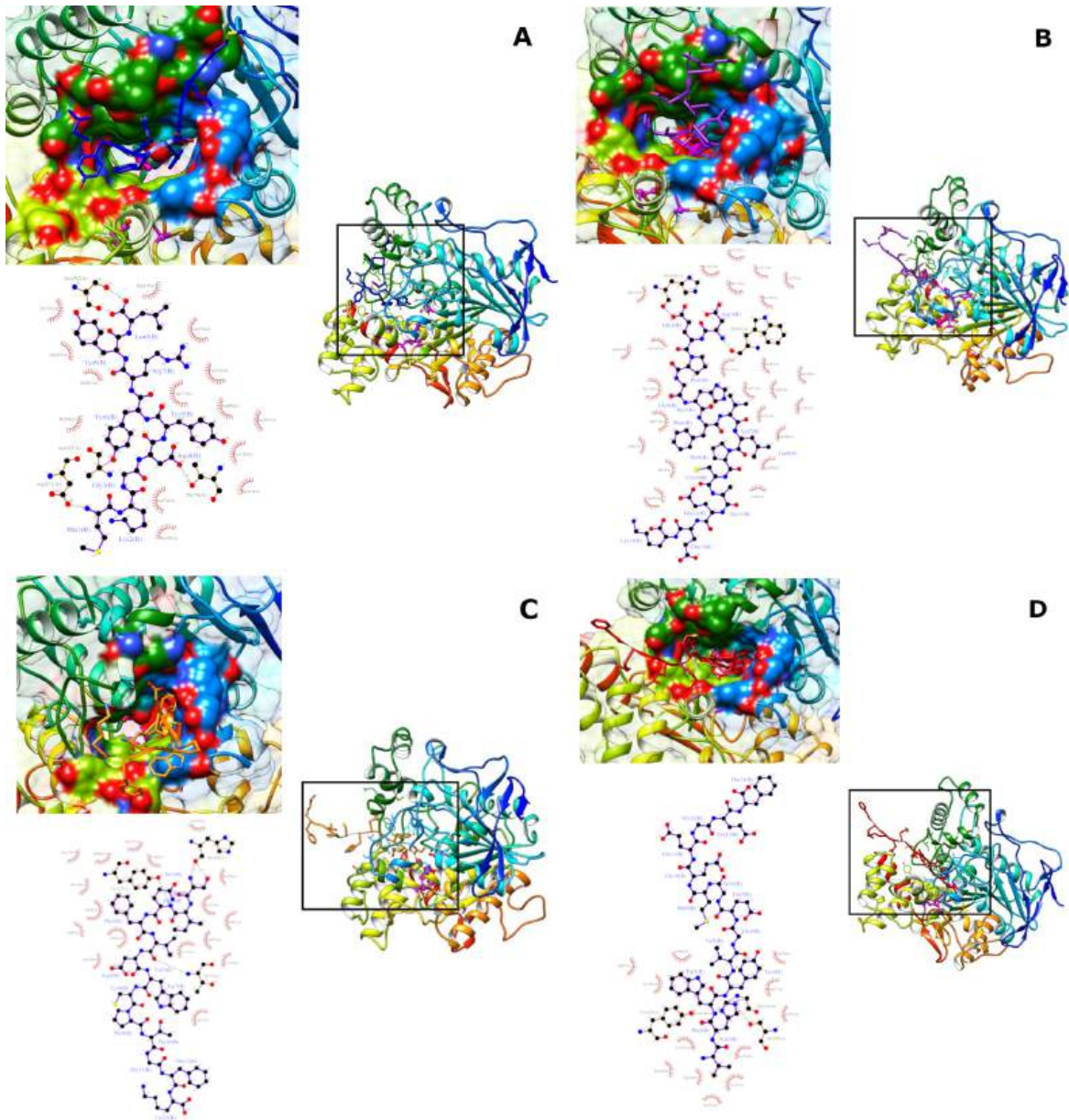


Figura 22: Interacción de los péptidos con la variante mutante 1A de AChE de *C. rogersesseyi*. (A) Péptido AS4528 cinta azul. (B) Péptido AS4528 cinta púrpura. (C) Péptido AS4531 cinta naranja. (D) Péptido AS4532 cinta roja. Los residuos de la tríada catalítica están en magenta, y los residuos de interacción para cada péptido están mostrados en varillas. El panel derecho de cada figura muestra la estructura completa acoplada a cada péptido, un primer plano del sitio de interacción en la superficie se muestra en el lado izquierdo, y un diagrama 2D de la interacción se muestra en la parte inferior.

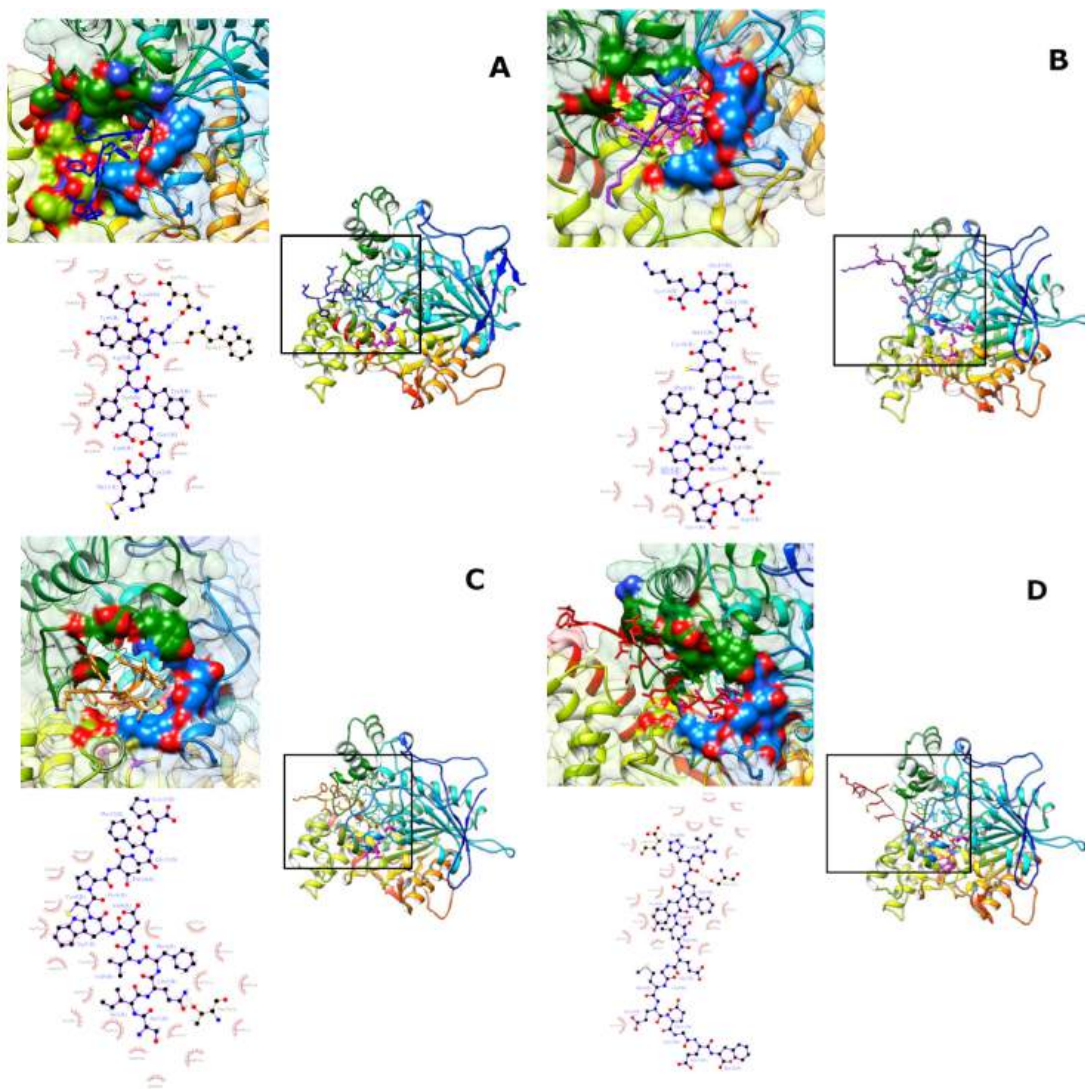


Figura 23: Interacción de los péptidos con la variante 1B de AChE de *C. rogercresseyi*. (A) Péptido AS4528 cinta azul. (B) Péptido AS4528 cinta púrpura. (C) Péptido AS4531 cinta naranja. (D) Péptido AS4532 cinta roja. Los residuos de la tríada catalítica están en magenta, y los residuos de interacción para cada péptido están mostrados en varillas. El panel derecho de cada figura muestra la estructura completa acoplada a cada péptido, un primer plano del sitio de interacción en la superficie se muestra en el lado izquierdo, y un diagrama 2D de la interacción se muestra en la parte inferior.

El análisis post-docking a través del servidor PRODIGY (Xue et al., 2016) mostró un mecanismo de acción similar de las tres variantes con los cuatro péptidos seleccionados (Tabla 8). En todos los casos, la predominancia fue la interacción entre residuos cargados-apolares y apolares-apolares. La energía de unión (ΔG) fue de aproximadamente -8 kcal mol^{-1} en casi todos los casos, con valores más bajos

para Calro1A y Calro1A_V₃₁₈ con el péptido AS4528 y para Calro1A_V₃₁₈ y Calro1B con el péptido AS4531; en estos casos, el Kd también fue más bajo, y el número total de interacciones fue alto. El diagrama 2D de las interacciones se creó utilizando Ligplot++ (Osorio et al., 2015), y un inventario de interacciones con los residuos clave se resume en la Tabla Suplementaria S5. Como se puede ver, todos los péptidos interactuaron con residuos clave de AChE en las tres variantes de *C. rogercresseyi*. Además, el análisis de acoplamiento para las 16 AChEs listadas en la Tabla 6 exhibió un comportamiento similar en cuanto a energía y constante de disociación con algunos péptidos, resaltadas en negrita en la Tabla Suplementaria S6.

Tabla 8: Resultados del análisis post-docking con PRODIGY para la AChE de *C. rogercresseyi* con los péptidos seleccionados. ΔG es la afinidad de unión predicha, Kd es la constante de disociación a 25°C (los valores más bajos están en negrita), ICs corresponden a contactos intermoleculares definidos a 5,5 Å de distancia y NIS se refiere al porcentaje de superficie no interactiva.

Péptido	AChE	ΔG (kcal mol ⁻¹)	Kd (μ M) at 25°C	ICs charged- charged	ICs charge d-polar	ICs charge d- apolar	ICs polar - polar	ICs polar - apola r	ICs apolar- apolar	NIS charge d	NIS apola r	Total ICs
AS4525	Calro1A	-8,3	0,83	2	2	20	0	5	25	31,76	35,29	54
	Calro1A_V ₃₁₈	-8,9	0,3	2	4	12	0	11	36	31,5	35,26	65
	Calro1B	-7,6	2,8	3	5	13	0	7	30	30,09	39,54	58
AS4528	Calro1A	-10,1	0,037	2	4	17	0	15	22	31,53	36,08	60
	Calro1A_V ₃₁₈	-10,1	0,04	4	10	36	0	5	31	32,05	35,01	86
	Calro1B	-8,2	0,93	6	6	27	0	3	21	30	40,29	63
AS4531	Calro1A	-8,1	1,1	1	1	5	7	17	24	30,59	35,69	55
	Calro1A_V ₃₁₈	-10,3	0,027	0	8	7	2	22	24	31,29	35,38	63
	Calro1B	-11,3	0,005	0	3	14	5	28	28	29,31	39,66	78
AS4532	Calro1A	-7,9	1,5	3	2	16	0	5	30	32,06	35,29	56
	Calro1A_V ₃₁₈	-8,2	0,91	1	1	19	0	6	32	31,87	35,67	59
	Calro1B	-8,0	1,4	5	7	16	0	7	24	29,8	40,11	59

Además, se realizó un análisis de acoplamiento del antiparasitario comercial azametifos, como referencia de inhibición de AChE. Para esto se utilizó el servidor ReverseDock (Krause et al., 2023), y los resultados se resumen en la Tabla S7 y la Figura Suplementaria S4. Como se muestra, los valores de energía libre son ligeramente más altos que los de los complejos formados con los péptidos. El complejo establecido por el azametifos con la variante Calro1A_V₃₁₈ parece penetrar más profundamente en la cavidad del sitio activo e interactúa con uno de los residuos de la tríada catalítica, H438 (Figura Suplementaria S4B). En el complejo formado con la variante 1B, que tiene la energía libre más baja, -7,52 kcal/mol, se observa que azametifos se encuentra aún más profundo en el sitio

activo, interactuando con los residuos que reemplazan a los de la tríada catalítica, T192 y Q432 (Figura Suplementaria S4C).

6.11 Modificaciones del péptido seleccionado

De acuerdo con los resultados obtenidos del estudio de docking molecular, el único péptido que ingresó en el sitio activo de todas las variantes de AChE fue AS4532. Además, al evaluar la actividad inhibitoria con la enzima de extraída de *C. rogercresseyi*, fue este mismo péptido el que presentó menor valor de K_i . No obstante, presentó el mayor efecto citotóxico en línea celular RTgill. Otro detalle a considerar, es que este péptido presentó una baja solubilidad en agua al ser evaluado a nivel experimental. Por todos estos motivos, fue seleccionado para poder potenciar su actividad. Una de las modificaciones fue asociada a la secuencia, ya que al visualizar el péptido en el modelo de interacción con AChE, se observa que el extremo carboxilo queda fuera de la cavidad del sitio activo, por tanto, se decidió quitar los últimos 3 aminoácidos (destacados en negrita en Tabla 9), además de reemplazar el aminoácido Met por D-Arg (r) para incrementar la solubilidad y mejorar su estabilidad, quedando el péptido AS5372. Sumado a esto, se trabajó también con la acetilación del extremo amino, para aumentar la solubilidad, quedando el péptido AS5373 (Tabla 9).

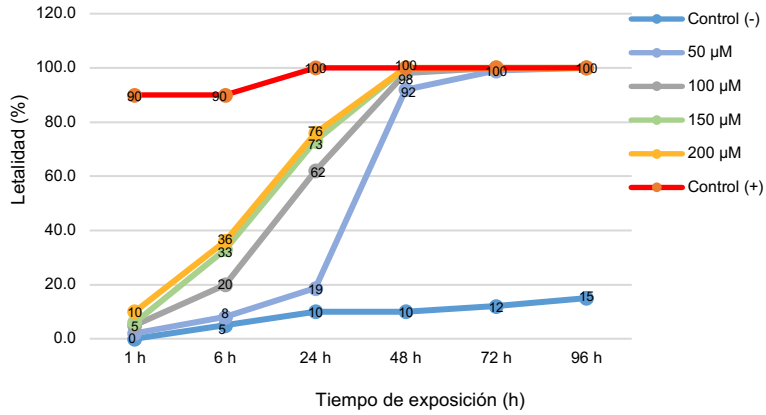
Tabla 9: Péptidos modificados a partir de la secuencia AS4532. El péptido AS5372 presenta delección de los tres últimos aminoácidos respecto al péptido original (destacadas en negrita), además del reemplazo del M9r y el péptido AS5373 incluye a las modificaciones anteriores, la acetilación del extremo amino (Ac-).

Nº	Secuencia	PM (Da)
AS4532	VHWYVGEG MEEGEF	1669,01
AS5372	VHWYVGEGr EE	1359,44
AS5373	Ac-VHWYVGEGr EE	1401,44

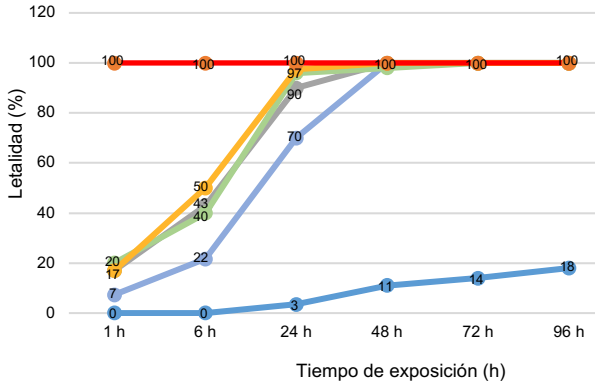
6.12 Caracterización química y funcional de los péptidos modificados

La caracterización química por espectroscopía de masas mostró la identidad de ambos péptidos y mediante HPLC se observó un porcentaje de pureza mayor al 95 % (Tabla S4). La evaluación de la funcionalidad se realizó por el ensayo de actividad antiparasitaria, mostrando que el péptido AS5372 presentó una mayor efectividad en el tratamiento, ya que, tras 1 h de exposición, el péptido AS4532 presenta un 10 % de letalidad a 200 μ M, y al utilizar AS5372, el porcentaje de letalidad aumentó a 17 % (Figura 24B). Sin embargo, para el péptido modificado AS5373, no se observó un aumento significativo (Figura 24C).

A) Letalidad de Nauplius por tiempo de exposición con AS4532



B) Letalidad de Nauplius por tiempo de exposición con AS5372



C) Letalidad de Nauplius por tiempo de exposición con AS5373

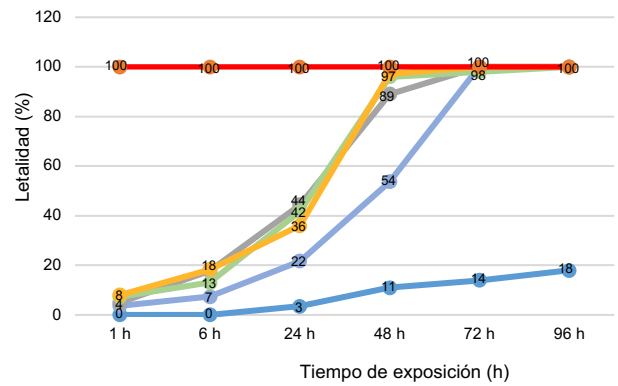


Figura 24: Evaluación de letalidad de los péptidos modificados sobre *C. rogerresseyi*. Gráficas de letalidad (%) en función del tiempo. Los péptidos fueron evaluados a 200 (amarillo), 150 (verde), 100 (gris), 50 µM (lila) al ser expuesto a 1, 6, 24, 48, 72 y 96 h. Se realizaron 12 réplicas para cada condición, con 3 parásitos por pocillo, y se utilizó agua de mar como control negativo 0 µM (celeste) y azametifos como control positivo a 0,1 ppm (rojo).

Estos resultados se complementan con los valores de EC₅₀ calculados a partir de los gráficos dosis respuesta (Figura S3), en donde se evidencia que, a las 48h de exposición el péptido modificado AS5372 presenta un valor 10 veces menor (EC₅₀ 0,2 µM) que el original AS4532 (EC₅₀ 3 µM). Mientras que, para el péptido AS5373, ocurrió el efecto contrario, aumentando el valor de EC₅₀ a 23 µM (Tabla 10).

Tabla 10: Valores de EC₅₀ de análogos sintéticos calculado a partir de los gráficos dosis respuesta. Cada valor representa la concentración de péptido modificado que produce una letalidad del 50% de *C. rogercresseyi* a un tiempo determinado.

	EC ₅₀ (μM)					
	1 h	6 h	24 h	48 h	72 h	96 h
AS4532	1982	358	81	3	0,4	0,0002
AS5372	705	183	16	0,2	0,0002	0,0002
AS5373	1365	793	211	23	0,2	0,0002

Al evaluar la actividad citotóxica en línea celular RTgill, se logró evidenciar una disminución en la toxicidad, ya que con ambas modificaciones se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia sin diferencia significativa respecto al control negativo, tras las 36 y 60 h de exposición (Figura 25).

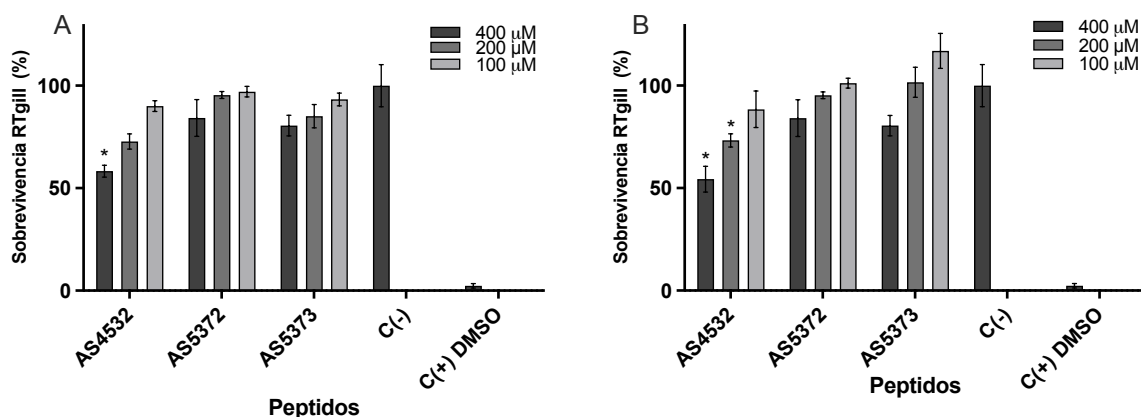


Figura 25: Viabilidad celular de RTgill con los péptidos modificados. Determinación del porcentaje de sobrevivencia en células RTgill al interactuar a las diferentes concentraciones de los péptidos AS4532, AS5372 y AS5373 (100, 200 y 400 μM). Como control negativo se utilizó PBS1X, mientras que como control positivo se utilizó DMSO al 10%. (A) Evaluación con 36h de exposición. (B) Evaluación con 60h de exposición.

El mismo comportamiento de los ensayos antiparasitarios se vio reflejado al evaluar la actividad inhibitoria de los péptidos AS5372 y AS5373 sobre la enzima AChE de *C. rogercresseyi* (Tabla 11) observando una disminución en el valor de K_i del AS5372 respecto al péptido original AS4532, pasando de 64,8 μM a 39,9 μM y para el péptido AS5373, aumentó a 100,8 μM (Figura 26).

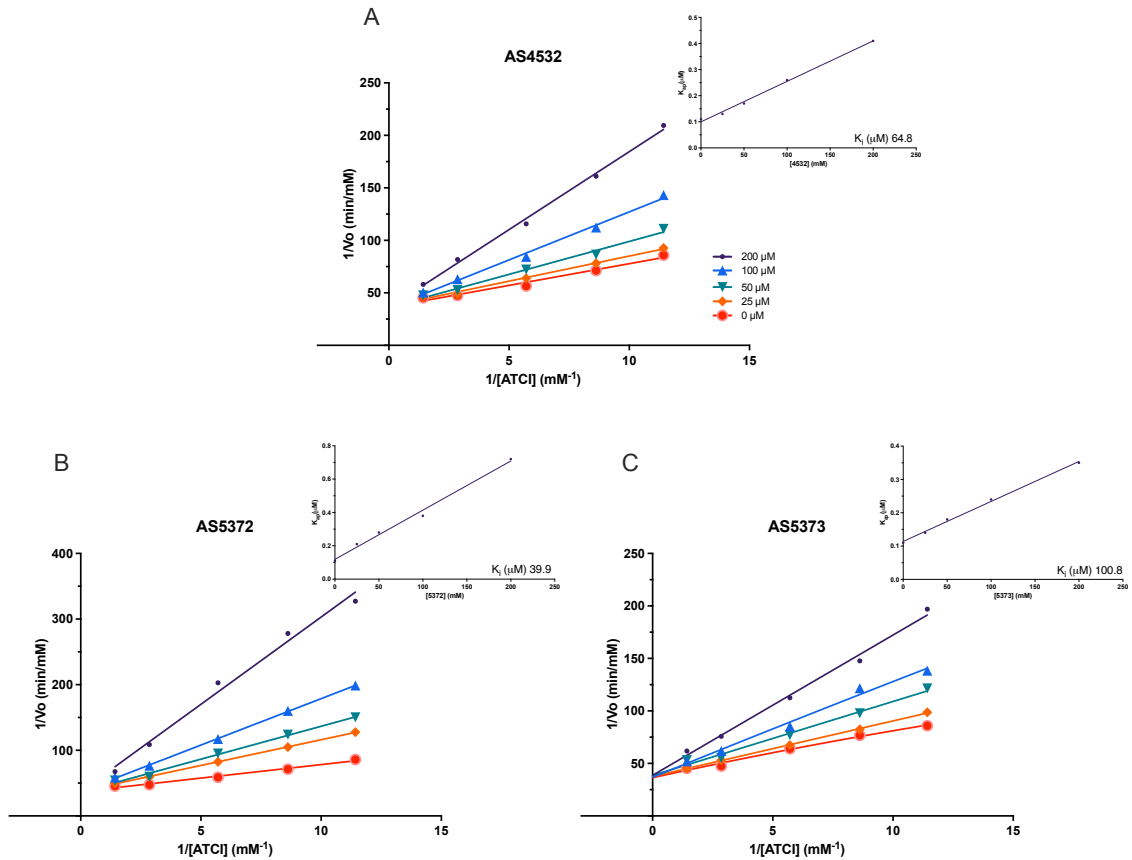


Figura 26: Estudios cinéticos sobre el mecanismo de inhibición de los péptidos modificados. El efecto de los inhibidores sobre la enzima AChE se determinó a partir de la gráfica recíproca doble de $1/\text{velocidad}$ frente a $1/\text{concentración de sustrato}$ en presencia de concentraciones variables de los inhibidores. Valores de K_i fueron calculados mediante la intersección de las curvas obtenidas al representar gráficamente K_{ap} frente a la concentración de inhibidor para cada concentración de sustrato (gráficos insertados en la parte superior derecha). A) Péptido original AS4531. (B) Péptido modificado AS5372. (C) Péptido modificado AS5373. Todos fueron probados a concentraciones de 200 μM (negro), 100 μM (azul), 50 μM (verde), 25 μM (naranja) y 0 μM (sin inhibidor en rojo).

Tabla 11: Tabla comparativa de los valores de V_{max} y K_{ap} de la actividad de AChE de *C. rogercresseyi* utilizando los péptidos modificados respecto al original. Los péptidos que mostraron diferencias significativas en comparación con el control están resaltados con * y en negrilla indicando significancia con $p < 0,05$.

Péptidos		i = 200 (μ M)	i = 100 (μ M)	i = 50 (μ M)	i = 25 (μ M)	i = 0 (μ M)
AS4532	V_{max}	0,028	0,028	0,028	0,027	
K_i 64,8	K_{ap}	0,412*	0,256*	0,173*	0,128	V_{max} 0,027
AS5372	V_{max}	0,027	0,027	0,027	0,026	
K_i 39,9	K_{ap}	0,717*	0,380*	0,275*	0,208*	
AS5373	V_{max}	0,026	0,027	0,026	0,027	K_m 0,111
K_i 100,8	K_{ap}	0,345*	0,242*	0,182*	0,141*	

6.13 Estudio de docking molecular de AS5372

En paralelo a la caracterización y ensayos de actividad antiparasitaria, se realizaron pruebas de docking para complementar el mecanismo de acción y determinar la afinidad del péptido modificado AS5372 con la AChE. El análisis del complejo acoplado realizado con Chimera mostró que, aunque el péptido AS5372 presenta un menor grado de penetración en el sitio activo comparado con el original AS4532, parece establecer mejores interacciones con los aminoácidos aromáticos que están en la entrada de la hendidura la variante 1A AChE de *C. rogercresseyi* (Figura 27). Por otro lado, el análisis post-docking a través del servidor PRODIGY (Xue et al., 2016) mostró que AS5372 presenta valores de energía y de constante de disociación más bajas respecto de su análogo AS4532, lo que indicaría una mejor interacción (Tabla 12).

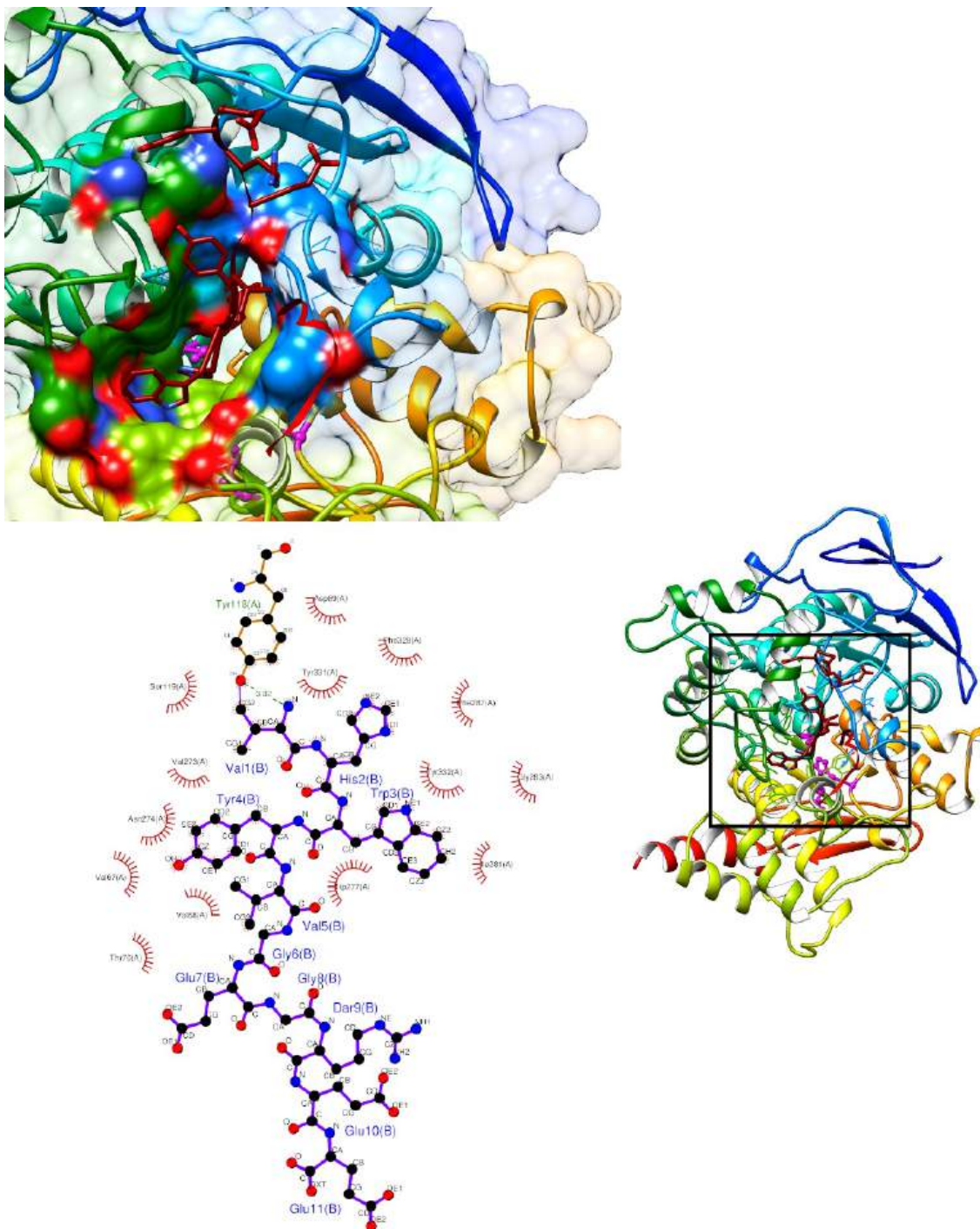


Figura 27: Interacción del péptido AS5372 con la variante 1A de AChE de *C. rogerscresseyi*. Los residuos de la tríada catalítica están en magenta, y los residuos de interacción para cada péptido están mostrados en varillas. El panel derecho de cada figura muestra la estructura completa acoplada al péptido, un primer plano del sitio de interacción en la superficie se muestra en el lado izquierdo, y un diagrama 2D de la interacción se muestra en la parte inferior.

Tabla 12: **Resultados del análisis post-docking con PRODIGY para la AChE de *C. rogercresseyi* con el péptido AS5372.** ΔG es la afinidad de unión predicha, K_d es la constante de disociación a 25°, ICs corresponden a contactos intermoleculares definidos a 5,5 Å de distancia y NIS se refiere al porcentaje de superficie no interactiva.

Péptido	ΔG (kcal mol- 1)	K_d (μM) at 25°C	ICs charge d- charge d	ICs charge d-polar	ICs charged- apolar	ICs polar - polar	ICs polar- apolar	ICs apolar- apolar	NIS charged	NIS apolar	Total ICs
AS5372	-8,6	0,52	2	0	11	0	10	21	31,96	34,9	44

7 Discusión

7.1 Eficacia de péptidos seleccionados mediante modelo QSAR

Los péptidos antimicrobianos (AMP), son pequeñas moléculas biológicamente activas producidas por diferentes organismos a través de su sistema inmune innato, y han captado un interés creciente en la investigación de nuevas terapias. La mayoría de estos péptidos presentan dos mecanismos de acción principales: lisis directa y modulación de la inmunidad, aunque su actividad más común es antibacteriana, también se han descrito efectos antifúngicos, antivirales y antiparasitarios (El-Dirany et al., 2021).

La AChE es una enzima esencial en la transmisión sináptica del sistema nervioso, cuya función principal es la hidrólisis rápida de la acetilcolina en la hendidura sináptica, lo que permite la finalización de la señal nerviosa tanto en vertebrados como en invertebrados (Du et al., 2010; Voros et al., 2024). Dada su relevancia funcional, AChE se ha convertido en un blanco estratégico para el desarrollo de agentes terapéuticos e insecticidas, especialmente en el contexto del control de patógenos que dependen de una regulación neuromuscular precisa, como es el caso de los ectoparásitos marinos *Lepeophtheirus salmonis* y *Caligus rogercresseyi* (Agusti et al., 2016; Agusti-Ridaura et al., 2018b; Kaur et al., 2015a; Núñez-Acuña et al., 2020).

En este estudio, con el fin de identificar potenciales inhibidores naturales de AChE, se utilizaron secuencias peptídicas derivadas del mucus de *Salmo salar* como fuente biológica inicial. Este enfoque se fundamenta en la relevancia inmunológica del mucus, ya que constituye una de las primeras barreras de defensa de los peces frente a agentes patógenos, especialmente a nivel de piel y branquias (Alvarez-Pellitero, 2008; Huttenhuis et al., 2006). Estos tejidos secretan una matriz compleja rica en glicoproteínas, enzimas y péptidos bioactivos, entre ellos péptidos antimicrobianos (AMPs) que han sido reconocidos por sus efectos antibacterianos, antivirales e incluso antiparasitarios (Masso-Silva & Diamond, 2014; Robledo et al., 2018; Su, 2011; Umasuthan et al., 2016). Aunque tradicionalmente los estudios se han centrado en sus propiedades frente a bacterias y virus, investigaciones recientes han comenzado a explorar el efecto de estos péptidos frente a ectoparásitos como *C. rogercresseyi*, reforzando su potencial como fuente terapéutica (Álvarez et al., 2024; Santana et al., 2024a). Por esta razón, el mucus de *S. salar* fue seleccionado como matriz de partida para el cribado in silico mediante un modelo QSAR previamente validado para predecir actividad inhibidora sobre AChE.

El estudio proteómico del mucus realizado por Fæste et al. (2020b), permitió compilar una base de datos inicial de proteínas expresadas en *S. salar*. Estas proteínas fueron sometidas a digestión proteolítica *in silico* para generar un conjunto de 959 péptidos candidatos, con longitudes entre 9 y 20 aminoácidos, rango que facilita tanto la síntesis química como la estabilidad estructural de los péptidos. A partir de este conjunto, se aplicó un modelo QSAR previamente entrenado para predecir la actividad inhibidora sobre AChE, estimada a través de valores de IC₅₀. Solo se seleccionaron los 21 péptidos que presentaron los valores más bajos de IC₅₀ predictivo, es decir, aquellos que teóricamente requerirían menores concentraciones para lograr la inhibición enzimática.

Este porcentaje de selección (~2%) es consistente con otros estudios *in silico* basados en QSAR. Por ejemplo, Fischer et al. (Fischer et al., 2021) utilizaron un modelo QSAR para predecir inhibidores de enzimas proteolíticas, y de más de 2.000 compuestos analizados, apenas un 1–3% mostró actividad significativa en ensayos experimentales. Del mismo modo, en el estudio de Yu et al. (Yu et al., 2020) sobre inhibidores peptídicos de colinesterasas, de 120 péptidos candidatos, solo seis mostraron inhibición superior al 50% en condiciones *in vitro*. En nuestro caso, de los 21 péptidos seleccionados por el modelo, solo cuatro (AS4525, AS4528, AS4531 y AS4532) demostraron actividad antiparasitaria significativa contra *C. rogercresseyi*, lo que representa un 19% de éxito experimental dentro del subconjunto seleccionado.

Este resultado, aunque puede parecer limitado, es representativo de la naturaleza predictiva de los modelos QSAR: eficaces para reducir el universo de búsqueda y aumentar la probabilidad de éxito experimental, pero no infalibles en cuanto a resultados biológicos directos. Factores como la estabilidad estructural, solubilidad, permeabilidad o la interacción con blancos secundarios pueden influir en que péptidos con bajo IC₅₀ teórico no muestren efectos biológicos *in vivo* o en ensayos funcionales. No obstante, la identificación de AS4532 como un inhibidor competitivo efectivo y con acción antiparasitaria representa una validación sólida del enfoque QSAR aplicado en esta investigación.

Mediante la evaluación de actividad antiparasitaria, se logró determinar que los péptidos AS4525, AS4528, AS4531 y AS4532 poseen actividad antiparasitaria significativa contra *C. rogercresseyi* en el estadio nauplius II, lo que concuerda con la predicción del modelo QSAR, que entregó valores de IC₅₀ predictivos que varían de 0,7 a 7 µM. Entre ellos, AS4532 destacó por su alta efectividad a bajas concentraciones (Figura 11). Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que reportan la eficacia de péptidos bioactivos contra *C. rogercresseyi* (Álvarez et al., 2024; Santana et al., 2024a),

lo que refuerza su papel como alternativas sostenibles en el control de la caligidosis. El rápido efecto letal del péptido AS4532, incluso a bajas concentraciones, sugiere una posible interacción directa con la enzima AChE, tal como se logra evidenciar en el docking donde penetra en la hendidura del sitio activo (Figura 20).

7.2 Conservación de secuencia y estructura en AChE de diferentes especies

El análisis de alineamiento de AChE la evidenció como una proteína altamente conservada tanto a nivel de secuencia, como de estructura entre diferentes especies, incluyendo los ectoparásitos *C. rogercresseyi* y *L. salmonis*. Para *L. salmonis*, se han reportado dos variantes, 1A y 1B, ambas bastante similares entre sí con una identidad del 83,7%, conservando los residuos clave en ambas variantes. En el caso de *C. rogercresseyi*, también se han reportado dos variantes, pero con una identidad de solo el 55% entre ellas. Además, la variante 1B no presenta los residuos de la tríada catalítica y carece de muchos otros residuos importantes. Esto apoya lo descrito por Agusti-Ridaura, quien propone que esta proteína como una variante alternativa que podría actuar como un depurador, pero sin activación a nivel sináptico (Agusti-Ridaura et al., 2018b). La comparación estructural también refleja estos resultados, con las menores diferencias de RMSD observadas entre las proteínas más similares.

Considerando la alta conservación de la AChE entre distintas especies, en este estudio se detectó una banda proteica de aproximadamente 70 kDa en extractos enzimáticos de *Caligus rogercresseyi*, compatible con el peso molecular del monómero de AChE, lo que sugiere similitud estructural con la enzima descrita en otras especies, como *Electrophorus electricus* (Ganeshpurkar et al., 2022). Sin embargo, la detección de la proteína no implica necesariamente que se encuentre funcionalmente activa, ya que el reconocimiento inmunológico permite identificar la presencia de la molécula, pero no evaluar su capacidad catalítica. Por esta razón, se realizaron mediciones de actividad enzimática que respaldan la participación funcional de la AChE de *C. rogercresseyi*, lo que refuerza su potencial como blanco terapéutico en el diseño de inhibidores antiparasitarios. La identidad estructural fue adicionalmente confirmada mediante inmunodetección con anticuerpos específicos, tal como se ha reportado en estudios similares realizados en *Lepeophtheirus salmonis* (Kaur et al., 2015b).

7.3 Mecanismo de acción de los péptidos seleccionados

Aprovechando la alta conservación estructural de la enzima AChE, el análisis de docking no entrega un alta confianza para identificar péptidos del mucus de salmónidos capaces de interactuar con la enzima. El análisis se realizó con los cuatro péptidos que mostraron actividad contra el parásito. Los cuales poseen diversas propiedades fisicoquímicas, pero manteniendo todos ellos un índice alifático alto y la presencia de aminoácidos aromáticos, lo que podría facilitar la interacción con los residuos aromáticos ubicados en la entrada de la hendidura del sitio activo de la enzima (Voros et al., 2024). De hecho, el análisis de docking de estos péptidos con la variante 1A de *C. rogercresseyi* reveló dos comportamientos distintos: dos de los péptidos, AS4528 y AS4531, se mantuvieron posicionados en la entrada del sitio activo, aparentemente obstruyendo la entrada de la hendidura, mientras que los otros dos péptidos AS4525 y AS4532, penetraron en la hendidura. En el caso de la mutación (F318V), solo el péptido AS4531 permaneció en la entrada, mientras que con la variante 1B, todos los péptidos entraron en el sitio activo (Figura 20).

Respecto a las interacciones establecidas con los residuos claves, se muestra que los péptidos AS4528 y AS4531, están bloqueando la entrada de la hendidura en un efecto tipo paraguas de manera similar al péptido reportado por Siano et al., con la butirilcolinesterasa (Siano et al., 2017). Las interacciones se establecen entre los residuos del centro de cada péptido, y los aminoácidos aromáticos en la entrada de la hendidura de la enzima AChE. Sin embargo, aunque el péptido AS4528 se ubica de amino a carboxi viéndolo de frente en la Figuras 20 y el péptido AS4531 se encuentra en dirección opuesta de carboxi a amino, no se observa interacción con ningún residuo clave, presentando estos dos péptidos las menores interacciones con la variante 1A (Tabla Suplementaria S5).

Estos hallazgos se relacionan con los resultados experimentales de la actividad enzimática. Los patrones inhibitorios competitivos, no competitivos y mixtos son predominantes en los inhibidores. Para determinar el patrón inhibitorio de los péptidos en AChE, se construyeron gráficos de dobles recíprocos utilizando el método Lineweaver-Burk. Se pudo encontrar que las pendientes de las líneas rectas aumentaron con las concentraciones crecientes para los péptidos AS4528, AS4531, and AS4532, interceptando entre sí en el eje y . El V_{max} (obtenido de los valores de intersección del eje vertical) no se modificó, pero K_m (obtenido de los valores de intersección del eje horizontal) aumentó con el aumento de las concentraciones de cada péptido. Esto confirmó que AS4528, AS4531, y AS4532 inhibieron la AChE por el modo típico de inhibición competitiva, uniéndose competitivamente al sitio activo de AChE. En base a esto, el péptido AS4532 muestra la mayor

afinidad inhibitoria ($K_i = 64,8 \mu\text{M}$). Este comportamiento concuerda con la literatura, donde inhibidores competitivos de AChE tienden a bloquear la unión del sustrato al sitio activo (Zare-Zardini et al., 2013b). La capacidad del péptido AS4532 para lograr una inhibición más efectiva sugiere una interacción más fuerte con residuos clave del sitio activo, lo que podría estar relacionado con su estructura. Estos resultados son consistentes con el análisis de docking, ya que el péptido que muestra el comportamiento más prometedor es AS4532, que estableció contactos con numerosos residuos clave, incluyendo la tríada catalítica, penetrando eficazmente en el sitio activo de todas las variantes de AChE.

En contraste, el péptido AS4525 no mostró actividad inhibitoria de AChE a las concentraciones evaluadas, posiblemente debido a su incapacidad para interactuar con residuos críticos en el sitio activo, como se evidencia en el docking molecular. Esto sugiere que AS4525 podría estar ejerciendo su efecto antiparasitario a través de una vía alternativa, interactuando con otros objetivos moleculares en el parásito o alterando procesos biológicos específicos. Por lo tanto, explorar y discutir estos posibles mecanismos alternativos podría ser relevante para dilucidar este proceso.

Una comparación del análisis de docking de azametifos con las variantes de AChE de *C. rogersesseyi* mostró una mayor energía de interacción, lo que indica una menor afinidad de unión para este compuesto (Tabla S 7). Sin embargo, es importante señalar que los análisis de acoplamiento no son capaces de reproducir interacciones covalentes, como las involucradas en la interacción de azametifos con AChE (Parsons et al., 2020; Voros et al., 2024). Por lo tanto, estos valores no reflejan con precisión la verdadera interacción de este compuesto que, como se observó experimentalmente, es capaz de matar parásitos dentro de la primera hora de exposición. Además, debido a su menor tamaño, es más probable que el azametifos ingrese al sitio activo de la enzima, como se refleja en los análisis de acoplamiento. Por el contrario, la interacción de los péptidos ocurre a través de interacciones más débiles, como las hidrofóbicas o de tipo π . Estas diferencias pueden explicar la variación en los tiempos de acción sobre los parásitos. Sin embargo, la baja toxicidad, biodegradabilidad y bajo potencial para generar resistencia, hacen de los péptidos una alternativa prometedora con menor impacto ambiental que los productos químicos organofosforados (Mulla et al., 2020).

Otros estudios han demostrado la actividad inhibidora de AChE generada por péptidos, principalmente como una alternativa en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Sanchis et al. (Sanchis et al., 2020) demostraron que un péptido de 19 residuos de *Boana pulchella* fue capaz de

inhibir AChE humano en un 84% a una concentración de 400 μM , interactuando con el sitio aniónico periférico (PAS) en la superficie de la enzima. Además, Yu et al. (Yu et al., 2018) informaron que un péptido corto, KLPFG, derivado de la albúmina exhibió una actividad inhibitoria del 61% a una concentración de 89 μM (50 $\mu\text{g/ml}$), mientras que Zare-Zardini et al. (Zare-Zardini et al., 2013a) encontraron que el péptido Snakin-Z de la fruta *Zizyphus jujuba*, que consta de 31 residuos, inhibió AChE en un 80% a una concentración de 450 μM (1,5 mg/ml) (Siano et al., 2017). En un estudio en el que diseñaron péptidos para inhibir las enzimas colinesterasas, probaron el péptido P1-Hp-1971 y sus versiones más cortas principalmente para la inhibición de la butiril-colinesterasa. También evaluaron su actividad sobre la AChE, identificando dos análogos peptídicos que inhiben la enzima. El primero, péptido 5-21, mostró más del 50% de inhibición a 200 y 400 μM , pero también mostró una actividad hemolítica superior al 20% a 200 μM . El segundo análogo, el péptido 7-21, exhibió una inhibición entre el 20-30% a 200 y 400 μM . El estudio de Yaneva et al. (Yaneva et al., 2017) informó sobre algunos compuestos peptídicos acoplados a galantamina (OGal) con alta actividad de inhibición contra la AChE. Entre ellos, el péptido I5 (Boc-VNLAG-OGal) mostró la mejor actividad, con una CI_{50} de 3,4 μM . Sin embargo, no hay información sobre qué parte del compuesto (el péptido o la galantamina) realizó los principales contactos con la enzima. A diferencia de los estudios previos, en este trabajo se observó inhibición de AChE a concentraciones considerablemente más bajas, destacando al péptido AS4532 con un K_i de 64,8 μM . Este valor experimental es inferior a la mayoría de los reportados en la literatura, donde se requieren concentraciones más elevadas para obtener efectos comparables.

7.4 Potencial tratamiento para combatir *C. rogercresseyi*

La alta conservación de esta enzima en diferentes especies (Figura 14) hace que estos péptidos sean inhibidores potenciales en cualquiera de ellas, como lo reflejan los resultados de docking, que muestran valores de interacción similares para todas las AChE analizadas (Tabla Suplementaria S6). Frente a esto, existen consideraciones adicionales al analizar los posibles efectos que estos péptidos podrían tener sobre el huésped. A pesar de la alta actividad antiparasitaria, los péptidos pueden enfrentar algunos inconvenientes y restricciones críticas, como su acción en la interrupción de la membrana celular eucariota pudiendo desencadenar efectos hemolíticos adversos (Naiel et al., 2023). Los resultados obtenidos en este estudio indican un bajo porcentaje de hemólisis en eritrocitos de *Salmo salar* ($\leq 5\%$ en todas las concentraciones evaluadas), y, según las predicciones de B3Pred (Tabla 6), no se espera que crucen la barrera hematoencefálica, lo que posiciona estos péptidos como alternativas terapéuticas prometedoras en peces. Por otro lado, se realizó la medición de la viabilidad

celular en RTgill, evaluando que el AS4532 presenta una disminución en la viabilidad celular a concentraciones de 200–400 μM tras 36-60 h de exposición, lo que sugiere que podría haber efectos secundarios en tejidos específicos. Este comportamiento podría estar relacionado con propiedades fisicoquímicas como la hidrofobicidad o la capacidad de penetración celular (Huang et al., 2010), lo que se intentó mejorar al hacer las posteriores modificaciones peptídicas para minimizar efectos colaterales.

7.5 Aumento de efectividad de péptidos modificados

La estrategia de optimización del péptido original AS4532 (VHWYVGEGMEEGEF) se orientó a mejorar su desempeño estructural, funcional y su aplicabilidad en un entorno biológico complejo, como el entorno marino donde se encuentra el ectoparásito *Caligus rogercresseyi*. En primer lugar, se diseñó el derivado AS5372, una versión acortada del péptido, mediante la eliminación de los tres residuos terminales GEF. Según los resultados del análisis de acoplamiento molecular, estos residuos no participaban directamente en la interacción con el sitio activo de la enzima AChE, lo que permitió conservar los residuos esenciales para la unión, mejorando el ajuste dentro de la cavidad catalítica y favoreciendo una interacción más específica y eficiente (Kurcinski et al., 2015). Además, la reducción en la longitud de la secuencia disminuyó el peso molecular, lo que puede traducirse en una mayor estabilidad estructural, mejor difusión y menores costos de síntesis (Leonte et al., 2021). Complementariamente, la eliminación del residuo fenilalanina, de carácter hidrofóbico y aromático, podría favorecer la solubilidad en medios acuosos, reduciendo la tendencia a la agregación (Bera et al., 2021).

Por otro lado, se incorporó una modificación estructural puntual mediante la sustitución de la arginina en configuración L por su isómero D, con el objetivo de aumentar la resistencia del péptido frente a la degradación por peptidasas y proteasas presentes en el mucus de peces o en el medio marino. Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada para aumentar la vida media de péptidos bioactivos en ambientes enzimáticamente activos, ya que las proteasas tienen menor afinidad por residuos D (Knappe et al., 2010; Zhao et al., 2021). Aunque esta modificación representa un incremento en el costo de síntesis, se justifica por su contribución a preservar la actividad funcional del péptido en condiciones reales de aplicación.

Las pruebas funcionales realizadas evidenciaron que la variante AS5372 presentó una menor citotoxicidad en células RTgill y una mayor actividad antiparasitaria en comparación con la molécula original AS4532, reflejada en una disminución del valor de K_i . Desde un enfoque cinético, este

descenso en el K_i implica una mayor afinidad del inhibidor por su blanco enzimático, confirmando que las modificaciones estructurales no solo no comprometieron la actividad inhibitoria sobre AChE, sino que la potenciaron. Estos resultados refuerzan el postulado de que AChE es un blanco de acción válido y eficaz para el control de ectoparásitos en salmonicultura, destacando la importancia de equilibrar propiedades funcionales y de bioseguridad en el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas.

Adicionalmente, se incorporó una modificación química mediante la acetilación del extremo N-terminal del péptido AS5372, dando origen a la variante Ac-VHWYVGEGrEE. Esta estrategia tiene como objetivo aumentar la estabilidad del péptido frente a la degradación por peptidasas, una característica crucial dado el ambiente enzimáticamente activo en el que se aplicaría. La acetilación N-terminal ha demostrado ser una modificación efectiva para mejorar la vida media, solubilidad y resistencia proteolítica de péptidos bioactivos, además de reducir su inmunogenicidad (D'Accolti et al., 2023; Li et al., 2021). En este contexto, se esperaba obtener una disminución en el valor de K_i , reflejando una mayor afinidad por su blanco enzimático. Sin embargo, los resultados funcionales indicaron lo contrario: la variante acetilada no solo no mejoró su actividad inhibitoria, sino que presentó una pérdida significativa de eficacia frente a AChE. Esta disminución en la actividad podría estar asociada al bloqueo estérico generado por el grupo acetilo en el extremo N-terminal, región que, según los análisis de acoplamiento molecular, participa directamente en la penetración inicial del péptido dentro de la cavidad catalítica de la enzima. Al interferir con esta interacción clave, la acetilación podría impedir un adecuado anclaje al sitio activo, comprometiendo así su funcionalidad (McTiernan et al., 2025). Este hallazgo resalta la importancia de considerar no solo la estabilidad química en el diseño racional de péptidos terapéuticos, sino también su orientación estructural y modo de interacción con el blanco molecular, especialmente en sistemas enzimáticos con sitios activos altamente definidos.

No obstante, si bien se logró potenciar la actividad inhibitoria del péptido, resulta fundamental abordar aspectos vinculados a su modo de administración. A futuro, será necesario proponer estrategias que aseguren que la concentración del péptido en aplicación se mantenga en niveles eficaces pero seguros, minimizando el riesgo de efectos adversos sobre los peces. Este trabajo representa una primera aproximación al diseño racional de péptidos bioactivos, orientado a identificar secuencias con potencial terapéutico, pero también sienta las bases para el desarrollo de formulaciones aplicables en condiciones de cultivo, donde la estabilidad, la dosificación y la eficacia biológica deberán ser validadas experimentalmente.

8 Conclusión

El modelo QSAR desarrollado, complementado con análisis de docking molecular, permitió seleccionar cuatro péptidos con potencial actividad inhibitoria sobre la enzima AChE de *Caligus rogercresseyi*, de los cuales AS4532 demostró afinidad efectiva por el sitio activo y una letalidad significativa contra el parásito en estadio naupliu II.

Mediante modificaciones químicas, incluyendo el acortamiento de la secuencia y la incorporación de D-arginina, se obtuvo el derivado AS5372, el cual evidenció un aumento en la actividad inhibitoria de la enzima AChE (\downarrow Ki), una mayor actividad antiparasitaria y una menor citotoxicidad en células RTgill, en comparación con el péptido original.

En conjunto, estos resultados permiten demostrar que los péptidos seleccionados mediante QSAR y optimizados químicamente incrementan su eficacia contra *C. rogercresseyi*. Este estudio no solo aporta evidencia funcional sobre la inhibición de AChE como blanco terapéutico, sino que también sienta las bases para el desarrollo de estrategias innovadoras y sostenibles de control antiparasitario en salmonicultura.

9 Proyecciones

Los resultados de este estudio destacan el gran potencial del péptido AS5372 como una alternativa terapéutica innovadora para combatir la caligidosis en la salmonicultura. Su alta actividad antiparasitaria, combinada con una baja toxicidad en células del hospedador, refuerza su viabilidad como agente terapéutico. No obstante, será fundamental optimizar las formulaciones para maximizar su eficacia en condiciones de campo, es decir con peces infectados. Además, factores ambientales como la salinidad y la presencia de materia orgánica en el entorno acuático podrían influir en la actividad de estos péptidos, lo que subraya la necesidad de evaluar su desempeño en escenarios reales.

Una estrategia prometedora para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad de los péptidos es su encapsulación en nanopartículas. Este enfoque podría potenciar su eficacia al facilitar una liberación controlada y superar barreras asociadas a la solubilidad y degradación en ambientes acuáticos. La encapsulación no solo optimizaría la interacción del péptido con el parásito, sino que también podría integrarse en tratamientos más sostenibles y específicos para la industria salmonicultura.

Dado el creciente interés por mitigar el impacto ambiental de los tratamientos en acuicultura, resulta esencial investigar el efecto de estos péptidos tanto en el microbioma de los peces como en el ecosistema acuático en general. Estudios adicionales sobre la seguridad y los posibles impactos ambientales serán determinantes para garantizar una implementación eficaz y responsable de estas soluciones terapéuticas.

Este trabajo constituye un análisis orientado a identificar péptidos con potencial bioactivo. Sin embargo, las proyecciones futuras incluyen no solo la evaluación de su eficacia *in vivo* contra la caligidosis en salmónidos, sino también el desarrollo de estrategias optimizadas de administración y entrega. Estas líneas de investigación serán clave para consolidar el uso de péptidos como herramientas terapéuticas seguras y efectivas en la práctica salmonicultura.

10 Productos

Artículos científicos

- ▶ Guzmán, F., Gauna, A., Luna, O., Román, T., Álvarez, C., Albericio, F., & Cárdenas, C. (2020). The tea-bag protocol for comparison of Fmoc removal reagents in solid-phase peptide synthesis. *Amino Acids*, 1-5.
- ▶ Guzmán, F., Gauna, A., Roman, T., Luna, O., Álvarez, C., Pareja-Barrueto, C., & Cárdenas, C. (2021). Tea Bags for Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: An Example of Circular Economy. *Molecules*, 26(16), 5035.
- ▶ Sánchez-Martínez, A., Acevedo-Sáenz, L., Alzate-Ángel, J. C., Álvarez, C. M., Guzmán, F., Roman, T., & Velilla, P. A. (2022). Functional Profile of CD8+ T-Cells in Response to HLA-A* 02: 01-Restricted Mutated Epitopes Derived from the Gag Protein of Circulating HIV-1 Strains from Medellín, Colombia. *Frontiers in Immunology*, 13, 793982-793982.
- ▶ Fanny Guzmán, Mónica Aróstica, Tanya Román, Dina Beltrán, Adriana Gauna, Fernando Albericio, Constanza Cárdenas (2023). Peptides, solid-phase synthesis and characterization: Tailor-made methodologies. *Electronic Journal of Biotechnology*, Volume 64, Pages 27-33, ISSN 0717-3458, <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2023.01.005>.
- ▶ Román, T.; Acosta, G.; de la Torre, B.G.; Cárdenas, C.; Guzmán, F.; Albericio, F. Improving 2-Chlorotriyl Chloride (2-CTC) Resin Activation. *Methods Protoc.* 2023, 6, 82. <https://doi.org/10.3390/mps6050082>.
- ▶ Román, T.; Acosta, G.; Cárdenas, C.; de la Torre, B.G.; Guzmán, F.; Albericio, F. Protocol for Facile Synthesis of Fmoc-N-Me-AA-OH Using 2-CTC Resin as Temporary and Reusable Protecting Group. *Methods Protoc.* 2023, 6, 110. <https://doi.org/10.3390/mps6060110>
- ▶ Santana, P.A.; Arancibia, C.; Tamayo, L.; Cumillaf, J.P.; Roman, T.; Cárdenas, C.; Paillan Suarez, C.; Álvarez, C.A.; Guzman, F. First Insights about Antiparasitic and Action Mechanisms of the Antimicrobial Peptide Hepcidin from Salmonids against *Caligus rogercresseyi*. *Pharmaceutics* 2024, 16, 378. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16030378>

- ▶ Álvarez, C. A., Toro-Araneda, T., Juan Pablo Cumillaf, Vega, B., María José Tapia, Roman, T., Constanza Cárdenas, Córdova-Alarcón, V., Jara-Gutiérrez, C., Santana, P. A., & Guzmán, F. (2024). Evaluation of the Biological Activities of Peptides from Epidermal Mucus of Marine Fish Species from Chilean Aquaculture. *Marine Drugs*, 22(6), 248–248. <https://doi.org/10.3390/md22060248>

- ▶ Sánchez-Martínez, A., Sofía Giraldo Hoyos, Juan Carlos Alzate-Ángel, Guzmán, F., Roman, T., Velilla, P. A., & Acevedo-Sáenz, L. (2024). CD8+T-cell response to mutated HLA-B*35-restricted Gag HY9 and HA9 epitopes from HIV-1 variants from Medellin, Colombia. *Heliyon*, 10(12), e33143–e33143. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33143>

- ▶ Pereira AE, Suarez L, Roman T, Guzmán F, Sierra L, Rincón-Orozco B, Hidalgo W. *Achatina fulica* haemocyanin-derived peptides as novel antimicrobial agents. *Biochimie*. 2025 Apr;231:84-97. doi: 10.1016/j.biochi.2024.12.007. Epub 2024 Dec 15. PMID: 39681185.

- ▶ Nuñez SM, García A, Roman T, Aguilar L, Tarnok ME, Guzmán F, Cárdenas C, Ponce S, Vásquez D, Carrasco S, Valín JL. Antioxidant and Cytotoxic Evaluation of Aqueous Extracts from *Hymenochaetaceae* Fungi Associated with Endemic Chilean Sclerophyll Forest Trees. *Int J Mol Sci*. 2025 Jun 19;26(12):5877. doi: 10.3390/ijms26125877. PMID: 40565340; PMCID: PMC12193641.

Presentación en eventos científicos

- ▶ Fanny Guzmán, Tanya Román, Constanza Cárdenas. “Design and development of acetylcholinesterase (AChE) inhibitor peptides with application in aquaculture: a bioinformatics approach through QSAR”. 3rd Aachen Protein Engineering Symposium AcES2021. European Federation of Biotechnology, online (Septiembre 1-3, 2021). [Poster].

- ▶ Fanny Guzmán, Tanya Román, Constanza Cárdenas. “Péptidos potenciales inhibidores de AChE para combatir *Caligus rogercresseyi*” 5to Workshop “Péptidos terapéuticos para bioaplicaciones”. Núcleo de Biotecnología, NBC II, PUCV, Campus Curauma, Valparaíso (Octubre 17-18, 2021). [Poster].

- ▶ Román, T., Guzmán, F., Álvarez, C., Santana P., & Cárdenas, “New antiparasitic peptides with application in aquaculture: a Bioinformatics approach through QSAR”; C.36th European and 12th International Peptide Symposium, Barcelona, España, entre el 28 de Agosto al 2 de Septiembre 2022. [Poster].

- ▶ Román, T., Guzmán, F., Álvarez, C., Santana P., & Cárdenas, “Novel antiparasitic peptides with potential activity against *Caligus rogercresseyi*”; 28th American Peptide Symposium in Scottsdale, Arizona which took place June 24th to June 29th, 2023. [Poster].

- ▶ Román, T., Guzmán, F., Álvarez, C., Santana P., & Cárdenas, “Búsqueda de péptidos antiparasitarios con potencial actividad contra *Caligus rogercresseyi*”; 6to Workshop de “Péptidos terapéuticos para bioaplicaciones”, Santiago, Chile, entre el 11 y 12 de Enero 2024. [Presentación Oral].

Becas y financiamiento

2019-2023: Beca “Doctorado Nacional ANID”

2020-2022: Beca “Gastos Operacionales ANID”

2022: Beca “Pasantía ANID” Instituto de Química Avanzada de Cataluña (ICAQ), Barcelona España.

2022: Beca “Asistencia a Evento científico (UTFSM)”, 36th European and 12th International Peptide Symposium, Barcelona, España

2022: Beca “Inscripción a Evento científico (EPS)”

2023: Beca “Termino de escritura de Tesis (ANID)”

2023: Beca “Asistencia a Evento científico (PUCV)”, 28th American Peptide Symposium (APS), Arizona , EEUU.

2023: Beca “Inscripción a Evento científico (APS)”

2023: Beca “Asistencia a Evento científico (UTFSM)”, 36th European and 12th International Peptide Symposium, Barcelona, España

2024: Beca “Termino de escritura de Tesis (PUCV)”

2024: Beca “Termino de escritura de Tesis (UTFSM)”

2024: Beca “Pasantía Innova Ciencia 2024 (UTFSM)”

11 Referencias

- Aaen, S. M., Helgesen, K. O., Bakke, M. J., Kaur, K., & Horsberg, T. E. (2015). Drug resistance in sea lice: A threat to salmonid aquaculture. In *Trends in Parasitology* (Vol. 31, Issue 2, pp. 72–81). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>
- Abbasitabar, F., & Zare-Shahabadi, V. (2012). Development predictive QSAR models for artemisinin analogues by various feature selection methods: a comparative study. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 23(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2011.623316>
- Abbasitabar, F., & Zare-Shahabadi, V. (2017). QSAR Study of Artemisinin Analogues as Antimalarial Drugs by Neural Network and Replacement Method. *Drug Research*, 67(8), 476–484. <https://doi.org/10.1055/S-0043-108553>
- Agusti, C., Bravo, S., Contreras, G., Bakke, M. J., Helgesen, K. O., Winkler, C., Silva, M. T., Mendoza, J., & Horsberg, T. E. (2016). Sensitivity assessment of *Caligus rogercresseyi* to anti-louse chemicals in relation to treatment efficacy in Chilean salmonid farms. *Aquaculture*, 458, 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.006>
- Agusti-Ridaura, C., Dondrup, M., Horsberg, T. E., Leong, J. S., Koop, B. F., Bravo, S., Mendoza, J., & Kaur, K. (2018a). *Caligus rogercresseyi* acetylcholinesterase types and variants: A potential marker for organophosphate resistance. *Parasites and Vectors*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3151-7>
- Agusti-Ridaura, C., Dondrup, M., Horsberg, T. E., Leong, J. S., Koop, B. F., Bravo, S., Mendoza, J., & Kaur, K. (2018b). *Caligus rogercresseyi* acetylcholinesterase types and variants: A potential marker for organophosphate resistance. *Parasites and Vectors*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3151-7>
- Albericio, F. (2000). Orthogonal Protecting Groups for N-Amino and C-Terminal Carboxyl Functions in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Biopoly*, 55, 123–139. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:2](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:2)
- Albericio, F. (2004). Developments in peptide and amide synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(3), 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.03.002>
- Álvarez, C. A., Toro-Araneda, T., Cumillaf, J. P., Vega, B., Tapia, M. J., Roman, T., Cárdenas, C., Córdova-Alarcón, V., Jara-Gutiérrez, C., Santana, P. A., & Guzmán, F. (2024). Evaluation of the Biological Activities of Peptides from Epidermal Mucus of Marine Fish Species from Chilean Aquaculture. *Marine Drugs*, 22(6), 248. <https://doi.org/10.3390/MD22060248/S1>
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126(3–4), 171–198. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2008.07.013>
- Ángeles Esteban, M. (2012). An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunology*, 2012, 1–29. <https://doi.org/10.5402/2012/853470>
- Asen, N. D., & Aluko, R. E. (2022). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities of antioxidant peptides obtained from enzymatic pea protein hydrolysates and their ultrafiltration peptide fractions. *Journal of Food Biochemistry*, 46(11), e14289. <https://doi.org/10.1111/JFBC.14289>
- Bajda, M., Więckowska, A., Hebda, M., Guzior, N., Sotriffer, C. A., & Malawska, B. (2013). Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5608–5632. <https://doi.org/10.3390/IJMS14035608>
- Benfenati, E., Toropov, A. A., Toropova, A. P., Manganaro, A., & Gonella Diaza, R. (2011). CORAL software: QSAR for anticancer agents. *Chemical Biology and Drug Design*, 77(6), 471–476. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01117.x>

- Bera, S., Dong, X., Krishnarjuna, B., Raab, S. A., Hales, D. A., Ji, W., Tang, Y., Shimon, L. J. W., Ramamoorthy, A., Clemmer, D. E., Wei, G., & Gazit, E. (2021). Solid-state packing dictates the unexpected solubility of aromatic peptides. *Cell Reports Physical Science*, 2(4). <https://doi.org/10.1016/j.xcrp.2021.100391>
- Boxshall, A., & Bravo, S. (2000). On the identity of the common Caligus (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen systems in southern Chile. In *Contributions to Zoology*. SPB Academic Publishing bv.
- Bravo, S., Nuñez, M., & Silva, M. T. (2013). Efficacy of the treatments used for the control of Caligus rogercresseyi infecting Atlantic salmon, Salmo salar L., in a new fish-farming location in Region XI, Chile. *Journal of Fish Diseases*, 36(3), 221–228. <https://doi.org/10.1111/jfd.12023>
- Bravo, S., Sevatdal, S., & Horsberg, T. E. (2008). Sensitivity assessment of Caligus rogercresseyi to emamectin benzoate in Chile. *Aquaculture*, 282(1–4), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.011>
- Burka, J. F., Fast, M. D., & Revie, C. W. (2012). Lepeophtheirus salmonis and Caligus rogercresseyi. *Fish Parasites*, 350–370. <https://www.islandscholar.ca/islandora/object/ir%3A1754/>
- Burridge, L., Weis, J. S., Cabello, F., Pizarro, J., & Bostick, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306(1–4), 7–23. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2010.05.020>
- Cárdenas, C., Guzmán, F., Carmona, M., Muñoz, C., Nilo, L., Labra, A., & Marshall, S. H. (2020). Synthetic Peptides as a Promising Alternative to Control Viral Infections in Atlantic Salmon. *Pathogens* 2020, Vol. 9, Page 600, 9(8), 600. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9080600>
- Chaturvedi, P., Bhat, R. A. H., & Pande, A. (2020). Antimicrobial peptides of fish: innocuous alternatives to antibiotics. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 85–106. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12306>
- Chen, N., Chen, J., Yao, B., & Li, Z. (2018). QSAR Study on Antioxidant Tripeptides and the Antioxidant Activity of the Designed Tripeptides in Free Radical Systems. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23061407>
- Chen, N., & Jiang, C. (2023). Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 255, 115377. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2023.115377>
- Costello, M. J. (2009). The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of Fish Diseases*, 32(1), 115–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.01011.x>
- D'Accolti, M., Bellotti, D., Dzień, E., Leonetti, C., Leveraro, S., Albanese, V., Marzola, E., Guerrini, R., Caselli, E., Rowińska-Żyrek, M., & Remelli, M. (2023). Impact of C- and N-terminal protection on the stability, metal chelation and antimicrobial properties of calcitermin. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45437-0>
- Deng, B., Ni, X., Zhai, Z., Tang, T., Tan, C., Yan, Y., Deng, J., & Yin, Y. (2017). New Quantitative Structure-Activity Relationship Model for Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Dipeptides Based on Integrated Descriptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(44), 9774–9781. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.7B03367>
- Dresdner, J., Chávez, C., Quiroga, M., Jiménez, D., Artacho, P., & Tello, A. (2019). Impact of Caligus treatments on unit costs of heterogeneous salmon farms in Chile. *Aquaculture Economics and Management*, 23(1), 1–27. <https://doi.org/10.1080/13657305.2018.1449271>
- Du, D., Ye, X., Cai, J., Liu, J., & Zhang, A. (2010). Acetylcholinesterase biosensor design based on carbon nanotube-encapsulated polypyrrole and polyaniline copolymer for amperometric detection of organophosphates. *Biosensors & Bioelectronics*, 25(11), 2503–2508. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2010.04.018>
- El-Dirany, R., Shahrour, H., Dirany, Z., Abdel-Sater, F., Gonzalez-Gaitano, G., Brandenburg, K., Martinez de Tejada, G., & Nguewa, P. A. (2021). Activity of Anti-Microbial Peptides (AMPs)

- against Leishmania and Other Parasites: An Overview. *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 984, 11(7), 984. <https://doi.org/10.3390/BIOM11070984>
- Ellis, A. E. (n.d.). *Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria*. www.elsevier.com/locate/devcompimm
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Erdem Büyükkiraz, M., & Kesmen, Z. (2022). Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 132(3), 1573–1596. <https://doi.org/10.1111/JAM.15314>
- Fæste, C. K., Tartor, H., Moen, A., Kristoffersen, A. B., Dhanasiri, A. K. S., Anonsen, J. H., Furmanek, T., & Grove, S. (2020a). Proteomic profiling of salmon skin mucus for the comparison of sampling methods. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1138. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.121965>
- Fæste, C. K., Tartor, H., Moen, A., Kristoffersen, A. B., Dhanasiri, A. K. S., Anonsen, J. H., Furmanek, T., & Grove, S. (2020b). Proteomic profiling of salmon skin mucus for the comparison of sampling methods. *Journal of Chromatography B*, 1138, 121965. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.121965>
- Fæste, C. K., Tartor, H., Moen, A., Kristoffersen, A. B., Dhanasiri, A. K. S., Anonsen, J. H., Furmanek, T., & Grove, S. (2020c). Proteomic profiling of salmon skin mucus for the comparison of sampling methods. *Journal of Chromatography B*, 1138, 121965. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121965>
- Fast, M. D. (2014). Fish immune responses to parasitic copepod (namely sea lice) infection. In *Developmental and Comparative Immunology* (Vol. 43, Issue 2, pp. 300–312). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.019>
- Fischer, A., Sellner, M., Mitusińska, K., Bzówka, M., Lill, M. A., Góra, A., & Smieško, M. (2021). Computational selectivity assessment of protease inhibitors against sars-cov-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22042065>
- Ganeshpurkar, A., Singh, R., Shivhare, S., Divya, Kumar, D., Gutti, G., Singh, R., Kumar, A., & Singh, S. K. (2022). Improved machine learning scoring functions for identification of *Electrophorus electricus*'s acetylcholinesterase inhibitors. *Molecular Diversity*, 26(3), 1455–1479. <https://doi.org/10.1007/S11030-021-10280-W>
- George, N., Chauhan, P. S., Sondhi, S., Saini, S., Puri, N., & Gupta, N. K. (2014). Biodegradation and Analytical Methods for Detection of Organophosphorous Pesticide: Chlorpyrifos. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 20, 79–94. https://www.researchgate.net/publication/318393184_Biodegradation_and_Analytical_Methods_for_Detection_of_Organophosphorous_Pesticide_Chlorpyrifos
- González, L., & Carvajal, J. (2003a). Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220(1), 101–117. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00512-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00512-4)
- González, L., & Carvajal, J. (2003b). Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220(1–4), 101–117. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00512-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00512-4)
- Guo, F. C., & Woo, P. T. K. (2009). Selected parasitosis in cultured and wild fish. *Veterinary Parasitology*, 163(3), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.016>
- Guzmán, F., Aróstica, M., Román, T., Beltrán, D., Gauna, A., Albericio, F., & Cárdenas, C. (2023). Peptides, solid-phase synthesis and characterization: Tailor-made methodologies. *Electronic Journal of Biotechnology*, 64, 27–33. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2023.01.005>
- Guzmán, F., Barberis, S., & Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: Chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 279–314. <https://doi.org/10.2225/VOL10-ISSUE2-FULLTEXT-13>

- Guzmán, F., Gauna, A., Roman, T., Luna, O., Álvarez, C., Pareja-Barrueto, C., Mercado, L., Albericio, F., & Cárdenas, C. (2021a). Tea Bags for Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: An Example of Circular Economy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26165035>
- Guzmán, F., Gauna, A., Roman, T., Luna, O., Álvarez, C., Pareja-Barrueto, C., Mercado, L., Albericio, F., & Cárdenas, C. (2021b). Tea Bags for Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: An Example of Circular Economy. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 5035, 26(16), 5035. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26165035>
- Helgesen, K. O., Bravo, S., Sevatdal, S., Mendoza, J., & Horsberg, T. E. (2014). Deltamethrin resistance in the sea louse *Caligus rogercresseyi* (Boxhall and Bravo) in Chile: Bioassay results and usage data for antiparasitic agents with references to Norwegian conditions. *Journal of Fish Diseases*, 37(10), 877–890. <https://doi.org/10.1111/jfd.12223>
- Herrera, J. M., Zunino, M. P., Dambolena, J. S., Pizzolitto, R. P., Gañan, N. A., Lucini, E. I., & Zygadlo, J. A. (2015). Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. *Industrial Crops and Products*, 70, 435–442. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.03.074>
- Houghten, R. A. (1985). General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(15), 5131–5135. <https://doi.org/10.1073/PNAS.82.15.5131>
- Huang, Y., He, L., Li, G., Zhai, N., Jiang, H., & Chen, Y. (2014). Role of helicity of α -helical antimicrobial peptides to improve specificity. *Protein & Cell*, 5(8), 631–642. <https://doi.org/10.1007/S13238-014-0061-0>
- Huang, Y., Huang, J., & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & Cell*, 1(2), 143–152. <https://doi.org/10.1007/S13238-010-0004-3>
- Huttenhuis, H. B. T., Grou, C. P. O., Taverne-Thiele, A. J., Taverne, N., & Rombout, J. H. W. M. (2006). Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(4), 586–596. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2005.07.008>
- Jimeno-Romero, A., Gwinner, F., Müller, M., Mariussen, E., Soto, M., & Kohl, Y. (2021). Sea Bass Primary Cultures versus RTgill-W1 Cell Line: Influence of Cell Model on the Sensitivity to Nanoparticles. *Nanomaterials* 2021, Vol. 11, Page 3136, 11(11), 3136. <https://doi.org/10.3390/NANO11113136>
- Kaur, K., Bakke, M. J., Nilsen, F., & Horsberg, T. E. (2015a). Identification and Molecular Characterization of Two Acetylcholinesterases from the Salmon Louse, *Lepeophtheirus salmonis*. *PLOS ONE*, 10(5), e0125362. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0125362>
- Kaur, K., Bakke, M. J., Nilsen, F., & Horsberg, T. E. (2015b). Identification and Molecular Characterization of Two Acetylcholinesterases from the Salmon Louse, *Lepeophtheirus salmonis*. *PLOS ONE*, 10(5), e0125362. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0125362>
- Kazemi, M., Tahmasbi, A., Valizadeh, R., Naserian, A., & Soni, A. (2012). *Organophosphate pesticides: A general review*.
- Knappe, D., Henklein, P., Hoffmann, R., & Hilpert, K. (2010). Easy strategy to protect antimicrobial peptides from fast degradation in serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9), 4003–4005. <https://doi.org/10.1128/AAC.00300-10>
- Krause, F., Voigt, K., Di Ventura, B., & Öztürk, M. A. (2023). ReverseDock: a web server for blind docking of a single ligand to multiple protein targets using AutoDock Vina. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2023.1243970>
- Kurcinski, M., Jamroz, M., Blaszczyk, M., Kolinski, A., & Kmiecik, S. (2015). CABS-dock web server for the flexible docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W419–W424. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv456>
- Leboulanger, C., Bouvy, M., Pagano, M., Dufour, R. A., Got, P., & Cecchi, P. (2009). Responses of planktonic microorganisms from tropical reservoirs to paraquat and deltamethrin exposure.

- Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(1), 39–51. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9164-z>
- León, R., Ruiz, M., Valero, Y., Cárdenas, C., Guzman, F., Vila, M., & Cuesta, A. (2020). Exploring small cationic peptides of different origin as potential antimicrobial agents in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 98, 720–727. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2019.11.019>
- Leszczynski, J. (2017). *Advances in QSAR Modeling*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56850-8>
- Lhorente, J. P., Gallardo, J. A., Villanueva, B., Carabaño, M. J., & Neira, R. (2014). Disease Resistance in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Coinfection of the Intracellular Bacterial Pathogen *Piscirickettsia salmonis* and the Sea Louse *Caligus rogercresseyi*. *PLoS ONE*, 9(4), e95397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095397>
- Li, D., Yang, Y., Li, R., Huang, L., Wang, Z., Deng, Q., & Dong, S. (2021). N-terminal acetylation of antimicrobial peptide L163 improves its stability against protease degradation. *Journal of Peptide Science*, 27(9). <https://doi.org/10.1002/psc.3337>
- Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A. L., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A., Giulianotti, M. A., Apidianakis, Y., Bradfute, S., Ferguson, A. L., Cherkasov, A., Seleem, M. N., Pinilla, C., de la Fuente-Nunez, C., Lazaridis, T., Dai, T., Houghten, R. A., Hancock, R. E. W., & Tegos, G. P. (2020). The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(9), e216–e230. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3)
- Marín, S. L., Ibarra, R., Medina, M. H., & Jansen, P. A. (2015). Sensitivity of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo 2000) to pyrethroids and azamethiphos measured using bioassay tests-A large scale spatial study. *Preventive Veterinary Medicine*, 122(1–2), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.09.017>
- Masso-Silva, J. A., & Diamond, G. (2014). Antimicrobial Peptides from Fish. *Pharmaceuticals*, 7(3), 265. <https://doi.org/10.3390/PH7030265>
- McTiernan, N., Kjosås, I., & Arnesen, T. (2025). Illuminating the impact of N-terminal acetylation: from protein to physiology. In *Nature Communications* (Vol. 16, Issue 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-55960-5>
- Mehta, D., Anand, P., Kumar, V., Joshi, A., Mathur, D., Singh, S., Tuknait, A., Chaudhary, K., Gautam, S. K., Gautam, A., Varshney, G. C., & Raghava, G. P. S. (2014). ParaPep: a web resource for experimentally validated antiparasitic peptide sequences and their structures. *Database*, 2014. <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAU051>
- Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/JA00897A025>
- Mulla, S. I., Ameen, F., Talwar, M. P., Eqani, S. A. M. A. S., Bharagava, R. N., Saxena, G., Tallur, P. N., & Ninnekar, H. Z. (2020). Organophosphate Pesticides: Impact on Environment, Toxicity, and Their Degradation. *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*, 265–290. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1891-7_13
- Naiel, M. A. E., Ghazanfar, S., Negm, S. S., Shukry, M., & Abdel-Latif, H. M. R. (2023). Applications of antimicrobial peptides (AMPs) as an alternative to antibiotic use in aquaculture - A mini-review. *Annals of Animal Science*, 23(3), 691–701. <https://doi.org/10.2478/AOAS-2022-0090>
- Núñez-Acuña, G., Sáez-Vera, C., Valenzuela-Muñoz, V., Valenzuela-Miranda, D., Arriagada, G., & Gallardo-Escárate, C. (2020). Tackling the Molecular Drug Sensitivity in the Sea Louse *Caligus rogercresseyi* Based on mRNA and lncRNA Interactions. *Genes* 2020, Vol. 11, Page 857, 11(8), 857. <https://doi.org/10.3390/GENES11080857>
- Oluwaseye, A., Uzairu, A., Shallangwa, G. A., & Abechi, S. E. (2020). Quantum chemical descriptors in the QSAR studies of compounds active in maxima electroshock seizure test. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 75–83. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2018.02.009>
- Osorio, D., Rondón-Villarreal, P., & Torres, R. (2015). Peptides: A package for data mining of antimicrobial peptides. *R Journal*, 7(1), 4–14. <https://doi.org/10.32614/RJ-2015-001>

- ParaPep-Database of Anti-parasitic peptides*. (n.d.). Retrieved 8 September 2024, from <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/parapep/>
- Parsons, A. E., Escobar-Lux, R. H., Sævik, P. N., Samuelsen, O. B., & Agnalt, A. L. (2020). The impact of anti-sea lice pesticides, azamethiphos and deltamethrin, on European lobster (*Homarus gammarus*) larvae in the Norwegian marine environment. *Environmental Pollution*, 264, 114725. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.114725>
- Petrou, C., & Sarigiannis, Y. (2018). Peptide synthesis: Methods, trends, and challenges. *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100736-5.00001-6>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/PRO.3943>
- Pino-Marambio, J., Mordue (Luntz), A. J., Birkett, M., Carvajal, J., Asencio, G., Mellado, A., & Quiroz, A. (2007). Behavioural studies of host, non-host and mate location by the Sea Louse, *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae). *Aquaculture*, 271(1–4), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.025>
- Pohanka, M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 155(3), 219–230. <https://doi.org/10.5507/BP.2011.036>
- Pohanka, M. (2012). Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 - present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 22(8), 871–886. <https://doi.org/10.1517/13543776.2012.701620>
- Prasasty, V., Radifar, M., & Istyastono, E. (2018). Natural Peptides in Drug Discovery Targeting Acetylcholinesterase. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 2344, 23(9), 2344. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23092344>
- Radman, A., Gredičak, M., Kopriva, I., & Jerić, I. (2011). Predicting antitumor activity of peptides by consensus of regression models trained on a small data sample. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 8415–8430. <https://doi.org/10.3390/IJMS12128415>
- Ribeiro, R., Costa, L., Pinto, E., Sousa, E., & Fernandes, C. (2023). Therapeutic Potential of Marine-Derived Cyclic Peptides as Antiparasitic Agents. *Marine Drugs* 2023, Vol. 21, Page 609, 21(12), 609. <https://doi.org/10.3390/MD21120609>
- Rivera-Fernández, N., Anacleto-Santos, J., Casarrubias-Tabarez, B., López-Pérez, T. de J., Rojas-Lemus, M., López-Valdez, N., & Fortoul, T. I. (2022). Bioactive Peptides against Human Apicomplexan Parasites. *Antibiotics* 2022, Vol. 11, Page 1658, 11(11), 1658. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11111658>
- Robertson, J. L., Preisler, H. K., Ng, S. S., Hickle, L. A., & Gelernter, W. D. (1995). Natural Variation: A Complicating Factor in Bioassays with Chemical and Microbial Pesticides. *Journal of Economic Entomology*, 88(1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/JEE/88.1.1>
- Robledo, D., Gutiérrez, A. P., Barría, A., Yáñez, J. M., & Houston, R. D. (2018). Gene Expression Response to Sea Lice in Atlantic Salmon Skin: RNA Sequencing Comparison Between Resistant and Susceptible Animals. *Frontiers in Genetics*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2018.00287>
- SalmonChile. (2024). *SalmonChile | Asociación gremial de Salmoneras en Chile*. <https://www.salmonchile.cl/>
- Sanchis, I., Spinelli, R., Aschemacher, N., Humpola, M. V., & Siano, A. (2020). Acetylcholinesterase inhibitory activity of a naturally occurring peptide isolated from *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) and its analogs. *Amino Acids*, 52(3), 387–396. <https://doi.org/10.1007/S00726-019-02815-1/FIGURES/6>
- Santana, P. A., Álvarez, C. A., Sáenz-Martínez, D. E., Salinas-Parra, N., Guzmán, F., Paradela, A., & Mercado, L. (2021). New insight to the role of α -enolase (Eno-1) as immunological marker in rainbow trout fry. *Developmental & Comparative Immunology*, 123, 104163. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2021.104163>

- Santana, P. A., Arancibia, C., Tamayo, L., Cumillaf, J. P., Roman, T., Cárdenas, C., Paillan Suarez, C., Álvarez, C. A., & Guzman, F. (2024a). First Insights about Antiparasitic and Action Mechanisms of the Antimicrobial Peptide Hepcidin from Salmonids against *Caligus rogercresseyi*. *Pharmaceutics*, *16*(3), 378. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS16030378/S1>
- Santana, P. A., Arancibia, C., Tamayo, L., Cumillaf, J. P., Roman, T., Cárdenas, C., Paillan Suarez, C., Álvarez, C. A., & Guzman, F. (2024b). First Insights about Antiparasitic and Action Mechanisms of the Antimicrobial Peptide Hepcidin from Salmonids against *Caligus rogercresseyi*. *Pharmaceutics*, *16*(3), 378. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS16030378/S1>
- Sernapesca. (2018). *Sernapesca publica Informe Sanitario 2018 – sernapesca*. <https://www.sernapesca.cl/noticias/sernapesa-publica-informe-sanitario-2018/>
- Shirakol, S., Kalyanshetti, M., & Hosamani, S. M. (2019). QSPR Analysis of certain Distance Based Topological Indices. *Applied Mathematics and Nonlinear Sciences*, *4*(2), 371–386. <https://doi.org/10.2478/AMNS.2019.2.00032>
- Siano, A., Garibotto, F. F., Andujar, S. A., Baldoni, H. A., Tonarelli, G. G., & Enriz, R. D. (2017). Molecular design and synthesis of novel peptides from amphibians skin acting as inhibitors of cholinesterase enzymes. *Journal of Peptide Science*, *23*(3), 236–244. <https://doi.org/10.1002/PSC.2974>
- Siwicki, A. K., Terech-Majewska, E., Grudniewska, J., Malaczewska, J., Kazun, K., & Lepa, A. (2010). Influence of deltamethrin on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *29*(3), 489–491. <https://doi.org/10.1002/ETC.75>
- Su, Y. (2011). Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, *158*(2), 149–154. <https://doi.org/10.1016/J.CBPPB.2010.11.002>
- Subpesca. (2018). *Tabla de contenido*. www.sernapesca.cl
- Subramanian, S., MacKinnon, S. L., & Ross, N. W. (2007). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, *148*(3), 256–263. <https://doi.org/10.1016/J.CBPPB.2007.06.003>
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., & Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science (New York, N.Y.)*, *253*(5022), 872–879. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1678899>
- Tam, Ja. P., Heath, W. F., & Merrifield, R. B. (1983). SN 1 and SN 2 mechanisms for the deprotection of synthetic peptides by hydrogen fluoride. Studies to minimize the tyrosine alkylation side reaction. *International Journal of Peptide and Protein Research*, *21*(1), 57–65. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3011.1983.TB03078.X>
- Tippe, A. (1987). Evidence for Different Mechanisms of Action of the Three Pyrethroids, Deltamethrin, Cypermethrin, and Fenvalerate, on the Excitation Threshold of Myelinated Nerve. In *PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY* (Vol. 28).
- Toropov, A. A., Barnes, D. A., Toropova, A. P., Roncaglioni, A., Irvine, A. R., Masereeuw, R., & Benfenati, E. (2023). CORAL Models for Drug-Induced Nephrotoxicity. *Toxics*, *11*(4), 293. <https://doi.org/10.3390/TOXICS11040293/S1>
- Toropov, A. A., Toropova, A. P., Roncaglioni, A., & Benfenati, E. (2023). In silico prediction of the mutagenicity of nitroaromatic compounds using correlation weights of fragments of local symmetry. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *891*, 503684. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2023.503684>

- Umasuthan, N., Mothishri, M. S., Thulasitha, W. S., Nam, B. H., & Lee, J. (2016). Molecular, genomic, and expressional delineation of a piscidin from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) with evidence for the potent antimicrobial activities of Of-Pis1 peptide. *Fish & Shellfish Immunology*, *48*, 154–168. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2015.11.005>
- Valero, Y., Arizcun, M., Cortés, J., Ramírez-Cepeda, F., Guzmán, F., Mercado, L., Esteban, M. Á., Chaves-Pozo, E., & Cuesta, A. (2020). NK-lysin, dicentracin and hepcidin antimicrobial peptides in European sea bass. Ontogenetic development and modulation in juveniles by nodavirus. *Developmental & Comparative Immunology*, *103*, 103516. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2019.103516>
- Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., Tartakovsky, M., Managadze, G., Grigolava, M., Makhatazde, G. I., & Pirtskhalava, M. (2018). Predictive Model of Linear Antimicrobial Peptides Active against Gram-Negative Bacteria. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *58*(5), 1141–1151. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.8B00118>
- Voros, C., Dias, J., Timperley, C. M., Nachon, F., Brown, R. C. D., & Baati, R. (2024). The risk associated with organophosphorus nerve agents: from their discovery to their unavoidable threat, current medical countermeasures and perspectives. *Chemico-Biological Interactions*, *395*, 110973. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2024.110973>
- Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., Wang, X., Wang, R., & Fu, C. (2022). Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy* *2022 7:1*, *7*(1), 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>
- Wellings, D. A., & Atherton, E. (1997). Standard Fmoc protocols. *Methods in Enzymology*, *289*, 44–67. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)89043-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)89043-X)
- Wiesner, J., Kříz, Z., Kuca, K., Jun, D., & Koca, J. (2007). Acetylcholinesterases--the structural similarities and differences. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *22*(4), 417–424. <https://doi.org/10.1080/14756360701421294>
- Xue, L. C., Rodrigues, J. P., Kastritis, P. L., Bonvin, A. M., & Vangone, A. (2016). PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. *Bioinformatics*, *32*(23), 3676–3678. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW514>
- Yaneva, S. A., Stoykova, I. I., Ilieva, L. I., Vezekov, L. T., Marinkova, D. A., Yotova, L. K., Raykova, R. N., & Danalev, D. L. (2017). Acetylcholinesterase inhibition activity of peptide analogues of galanthamine with potential application for treatment of Alzheimer's disease. In *Bulgarian Chemical Communications*.
- Yen, T. H., & Lin, J. L. (2004). Acute poisoning with emamectin benzoate. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, *42*(5), 657–661. <https://doi.org/10.1081/CLT-200026968>
- Yu, Z., Dong, W., Wu, S., Shen, J., Zhao, W., Ding, L., Liu, J., & Zheng, F. (2020). Identification of ovalbumin-derived peptides as multi-target inhibitors of AChE, BChE, and BACE1. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(6), 2648–2655. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10295>
- Yu, Z., Wu, S., Zhao, W., Ding, L., Fan, Y., Shiuan, D., Liu, J., & Chen, F. (2018). Anti-Alzheimers activity and molecular mechanism of albumin-derived peptides against AChE and BChE. *Food & Function*, *9*(2), 1173–1178. <https://doi.org/10.1039/C7FO01462G>
- Zare-Zardini, H., Tolueinia, B., Hashemi, A., Ebrahimi, L., & Fesahat, F. (2013a). Antioxidant and cholinesterase inhibitory activity of a new peptide from *Ziziphus jujuba* fruits. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, *28*(7), 702–709. https://doi.org/10.1177/1533317513500839/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1533317513500839-FIG6.JPG
- Zare-Zardini, H., Tolueinia, B., Hashemi, A., Ebrahimi, L., & Fesahat, F. (2013b). Antioxidant and cholinesterase inhibitory activity of a new peptide from *Ziziphus jujuba* fruits. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, *28*(7), 702–709. <https://doi.org/10.1177/1533317513500839>
- Zhao, X., Zhang, M., Muhammad, I., Cui, Q., Zhang, H., Jia, Y., Xu, Q., Kong, L., & Ma, H. (2021). An Antibacterial Peptide with High Resistance to Trypsin Obtained by Substituting D-Amino

Acids for Trypsin Cleavage Sites. *Antibiotics*, 10(12).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10121465>

Zhou, P., Jin, B., Li, H., & Huang, S. Y. (2018). HPEPDOCK: a web server for blind peptide–protein docking based on a hierarchical algorithm. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W443–W450.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKY357>

12 Material Suplementario

Tabla S 1: Compuestos utilizados para construir el modelo QSAR, que exhiben actividad inhibitoria contra la enzima acetilcolinesterasa con valores reportados en la literatura y sus respectivos SMILES. 'BindingDB MonomerID' corresponde al código de los compuestos obtenido de la base de datos BindingDB. 'Clasificación' representa cómo los compuestos fueron divididos aleatoriamente en un conjunto de entrenamiento (+), un conjunto de entrenamiento invisible (-), un conjunto de calibración (#), y un conjunto de validación externa (*). SMILES y log(1/x) son los formatos en los que se ingresan los valores en el programa CORAL.

BindingDB MonomerID	Clasificación	Nº	SMILES	log(1/x)
189365	-	1	<chem>N=c1oc2ccc3ccc(=O)oc3c2cc1C(=O)NC1CC1</chem>	-2,903
50440427	-	2	<chem>Cc1cccc(C[n+]2cccc(e2)C2C(C#N)C(=N)Oe3c2c(=O)oc2cccc32)c1</chem>	-2,898
10456	+	3	<chem>C(CCCCCNc1ccnc2cccc12)CCCCNc1ccnc2cccc12</chem>	-2,895
50099593	+	4	<chem>Cc1nc(cc2c3cccc3[nH]c12)C(=O)NCCCCCCCCCNc1c2CCCCe2nc2cccc12</chem>	-2,894
19127	-	5	<chem>CC[C@H](C)C(=O)N[C@H]1CC=C2C[C@@H]3[C@@H](CC[C@H]2[C@]1(C)\C=N\Cc1cccc1)[C@]1(C)C[C@@H](O)[C@H]([C@H](C)N(C)C)[C@@]1(C)CC3=O</chem>	-2,892
50079186	+	6	<chem>CCN(CC)C(=O)Oe1ccc2C(=O)\C(Oc2c1)=C\c1ccc(OCCN2CCCC2)cc1</chem>	-2,892
50075593	#	7	<chem>O=C1N(CCCCCCNc2cccc2)C(=O)c2cccc12</chem>	-2,888
9412	+	8	<chem>CN(CCC1CCN(Cc2cccc2C)CC1)C(=O)c1cccc1</chem>	-2,886
50037142	-	9	<chem>CCN(CCCCN1C(=O)c2ccc(cc2C1=O)[N+](O)=O)CCc1cccc1</chem>	-2,886
50004319	+	10	<chem>COc1ccc(OCe2nn3c(nnc3s2)-e2cenc2)cc1</chem>	-2,886
50179308	-	11	<chem>O=c1oc(nc2sc3CN(Cc4cccc4)CCc3c12)N1CCOCC1</chem>	-2,886
50088662	#	12	<chem>CCN(CCCCCOe1cccc(e1)-c1cc(=O)c2c(O)c(OC)c(O)c2o1)Cc1cccc1OC</chem>	-3,104
10474	+	13	<chem>C(CCCNc1c2CCCCe2nc2cccc12)CCCc1cccc1</chem>	-2,591
189371	-	14	<chem>COc1ccc(cc1)C(C)NC(=O)c1cc2c(ccc3ccc(=O)oc23)oc1=N</chem>	-2,591
198158	-	15	<chem>CC(=O)C1=C(C)NC(Sc2cccc2CC(N)=O)=NC1c1ccc(OCc2cccc2)cc1</chem>	-2,591
50039219	#	16	<chem>[O-][N+](=O)c1cccc(CN2CCC(CCC(=O)c3ccc4CCCCNc4c3)CC2)c1</chem>	-2,591

50002854	+	17	Oc1c(C(=O)NC2CCN(Cc3ccccc3)CC2)c(=O)n(Cc2ccccc2)c2ccccc12	-2,591
50053568	-	18	O=c1n2CCc2nc2ccc(OCCCCCCCCCN3CCCC3)cc12	-2,591
50075589	-	19	Fe1ccc(CNCCCCCCCN2C(=O)c3ccccc3C2=O)cc1	-2,558
50099599	-	20	CC1N([C@@H](Cc2c1[nH]c1ccccc21)C(=O)NCCCCCNc1c2CCc2nc2ccccc12)C(=O)OC(C)(C)C	-2,590
50073142	-	21	Cc1c(C)c2OC(C)(CCc2c(C)c1O)C(=O)NCCCCCCCCCNc1c2CCc2nc2ccccc12	-2,588
19101	+	22	CC(C)C1=N[C@H]2CC=C3C[C@@H]4[C@@H](CC[C@H]3[C@]2(C)CO1)[C@]1(C)C[C@@H](O)[C@H]([C@H](C)N(C)C)[C@@]1(C)CC4=O	-1,491
50053435	+	23	C(COc1ccc2N=C3CCCN3Cc2c1)CN1CCCC1	-1,826
50194134	-	24	CCNC(=S)Nc1cc(nen1)-n1ene(CN2CCCC2)c1	-1,826
50079503	+	25	FC(F)(F)c1cc(=O)oc2cc(OCCN3CCN(CCCNc4c5CCCCc5nc5ccccc45)CC3)ccc12	-1,826
50099601	-	26	CC(C)(C)OC(=O)N[C@@H](Cc1c[nH]c2ccccc12)C(=O)NCCCCCNc1c2CCc2nc2ccccc12	-1,826
50079511	+	27	O=c1ccc2ccc(OCCCCCN3CCN(CCCNc4c5CCCCc5nc5ccccc45)CC3)cc2o1	-1,820
50199516	+	28	CN(CCCCCCCCCCN(C)Cc1cccn1)CC(=O)N1CCC[C@@H]2[C@@H]3Cc4[nH]c(=O)ccc4[C@]12CC(C)=C3	-1,818
9010	#	29	Clc1ccc2nc3CCCCc3c(NCCCCC(=O)NCCc3c[nH]c4ccccc34)c12	-1,813
50004028	-	30	CC(=O)N(CCC1CCN(Cc2ccccc2)CC1)c1ccc(F)c1	-1,813
50440446	+	31	COc1ccc(cc1OC)C1c2c(N)c3CCCCc3ne2Oe2c1c(=O)oc1ccccc21	-1,633
50039227	+	32	Fe1ccccc1CN1CCC(CCC(=O)c2ccc3NCCc3e2)CC1	-1,633
50053438	+	33	CCN(CC)CCCOc1ccc2nc3CCCCn3c(=O)c2c1	-1,633
50053437	-	34	O=c1n2CCCCc2nc2ccc(OCCCN3CCCC3)cc12	-1,633
50273060	+	37	CCN(CC)CCc1ccc(OC2Cc3cc(OC)c(OC)cc3C2=O)cc1	-1,624
50199526	-	38	CN(CCCCCCCCCN(C)Cc1cccn1)CC(=O)N1CCC[C@@H]2[C@@H]3Cc4[nH]c(=O)ccc4[C@]12CC(C)=C3	-1,623
13539	+	39	COc1ccc(cc1OC)c1OC)C(=O)NCCCC(=O)NNc1c2CCc2nc2ccccc12	-1,420
50199549	#	40	CN(CCCCCCCCCN(C)CCCN1CCC[C@@H]2[C@@H]3Cc4[nH]c(=O)ccc4[C@]12CC(C)=C3)CCCN1CCC[C@@H]2[C@@H]3Cc4[nH]c(=O)ccc4[C@]12CC(C)=C3	-1,418
50032398	+	41	COc1ccc(cc1)C(=O)NC(=S)NCCOCCN(C)Cc1ccccc1	-1,415
10948	+	43	CN(CCCCCCCCCCN(C)CCC(=O)N1CCC[C@@H]2C3Cc4[nH]c(=O)ccc4[C@]12CC(C)=C3)CCC(=O)N1CCC[C@@H]2C3Cc4[nH]c(=O)ccc4[C@]12CC(C)=C3	-1,401
9015	-	44	COc1ccc2[nH]cc(CCNc(=O)CCCCNc3c4CCCCc4nc4cc(Cl)ccc34)c2c1	-1,079
10489	-	45	FC(F)(F)C(=O)c1ccc(CNc2c3CCCCc3nc3ccc(Cl)c23)s1	-1,079
8960	-	46	COc1cc2CC(CC3CCN(Cc4ccccc4)CC3)C(=O)c2cc1OC	-1,079
50087161	-	47	COc1ccc2CN(CCCCCCCCC[N+])3=Cc4ccc(OC)c5OC6C[C@@H](O)C=C[C@@]6(CC3)c45)CC[C@@]34C=C[C@H](O)C[C@@H]3Oc1c24	-1,079

Tabla S2: Péptidos generados por hidrólisis *in silico* a partir de proteínas del mucus de *Salmo salar* obtenidas de UniProt con las enzimas quimotripsina, tripsina y pepsina, y péptidos documentados en la literatura del mucus de salmón.

Uniprot ID	Secuencia	Nº residuos
B5XGV3	EVVDKSGTSVKKF	13
	TKPEDSVKEL	10
	KAIRIRSDKN	10
	IKDAVDTTAN	10
	KRKTPTKQSSATGK	14
	LLNPNTLATLVK	12
	YDIIVILEVVDK	12
	LHSVLEDLVLIPVHTK	16
	ELDELYDVFLEVTK	14
	TDNVMILGDFNADGSYLSK	19
	DAVDTTANTGNDNTYDR	17
	IVIYGDDMLDAIVPNSAK	18
	GLSEEDALK	9
	VSDHYPVEVELK	12
	VKIVSRDYDIIVIL	13
	EVVDKSGTSVKKF	13
	VNTWQYEDNQAGDVDAF	17
	IPVHTKPEDSVKEL	14
	EVTKKWKTDNVMIL	14
	MKAIRIRSDKNF	12
DAIVPNSAKPF	11	
KVSDHYPVEVEL	12	
KRKTPTKQSSATGK	14	
O42161	AGDDAPRAVF	10
	PSIVGRPRH	9
	ASGRTTGIVM	10
	TTTAEREIVRDIKEKL	16

	GTAASSSSL	9
	PDGQVITIGN	10
	KCDVDIRKDL	10
	KIKIIPPERKY	12
	DESGPSIVH	9
	MEDEIAALVVDNGSGMCK	18
	AGFAGDDAPR	10
	AVFPSIVGR	9
	HQGVMVGMGQK	11
	DSYVGDEAQS	10
	YPIEHGIVTNWDDMEK	16
	IWHHTFYNELR	11
	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	18
	GYSFTTTAER	10
	ELPDGQVITIGNER	14
	DLYANTVLS	9
	EITSLAPSTMK	11
	EYDESGPSIVHR	12
	VVDNGSGMCKAGF	13
	AGDDAPRAVF	10
	RVAPEEHPVL	10
	NPKANREKMT	10
	NTPAMYVAIQAVL	13
	TTTAEREIVRDIKEKL	16
	PDGQVITIGNERF	13
	EQEMGTAASSSSL	13
	AERVGAGAPVY	11
	GGVTIAQGGVL	11
B5X851	AGLQFPVGR	9
	AEILELAGNAAR	12
	VGAGAPVYLAAVLEYLT	17
	GGVTIAQGGVL	11
B5DG40	CDDDETTAL	9

	AGDDAPRAVF	10
	PSIVGRPRH	9
	ASGRTTGIVL	10
	VTTAEREIVRDIKEKL	16
	ATAASSSSL	9
	PDGQVITIGN	10
	KCDIDIRKDL	10
	KIKIIPPERKY	12
	DEAGPSIVH	9
	AGFAGDDAPR	10
	AVFPSIVGR	9
	HQGVMVGMGQK	11
	IWHHTFYNELR	11
	YPIEHGIITNWDDMEK	16
	GYSFVTTAER	10
	SYELPDGQVITIGNER	16
	LSGGTMYPGIADR	14
	EITALAPSTMK	11
	QEYDEAGPSIVHR	14
	MCDDDETTAL	10
	RVAPEEHPTL	10
	YASGRTTGIVL	11
	PDGQVITIGNERF	13
	ENEMATAASSSSL	13
	ASGVTVTDEVITVF	14
	EDEKKRKKAVL	12
	VGTTIADPY	9
	ETKETKKEDL	10
B5XB84	SKDAIKKKF	9
	EDIKDRRTL	9
	VGTTIADPYLHFVK	14
	YALYDATYETK	11
	MASGVTVTDEVITVF	15

	SEDKKHIVL	9
	PADDCRYAL	9
	VGTTIADPYL	10
	SKDAIKKKF	9
	TGIKHEWQVNGL	12
	EDIKDRRTL	9
	YDATYETKETKKEDL	15
	TVKSSSSGAAPRSF	14
	SGPSQGATRQSY	12
	APITAVQVN	9
	QGQTTTRSN	9
	IETKDGKVVSETSEVVDD	18
	QIAEAEERGEM	11
	EGEEDRIATGIQSIN	15
	QSEIDSVKG	9
	QGQIKDTSVVVEM	13
	DSIVAEVRAQ	10
	RSTKTEIADL	10
	IKKDVDEAY	9
	KSRAEAETW	9
B5X320	VVSETSEVVDD	11
	EYQELMNVK	9
	LQSEIDSVK	9
	ANLENQIAEAEER	13
	YEEMQTSATR	10
	LESLTDEINFLR	12
	DTSVVVEMDNSR	12
	NLDMDSIVAEVR	12
	WNLLQGQTTTR	11
	GMGGGFGAG	9
	IATGIQSINISK	12
	QLDGLGNDK	9
	SNIDAMFEAYISN	13

	LEADLHNMQGLVEDFK	16
	TECENDFVLIK	11
	SLLAPLNLEIDPNIQI	16
	VRTNEKEQIKGL	12
	QGQTTTRSNIAMF	14
	PMESANSTYSSGYSSGF	17
	QRAKQDMARQIREYQEL	17
	RSTKTEIADL	10
	QSEIDSVKG	9
	IKKDVDEAYMN	11
	DMSIVAEVRAQ	12
	ENQIAEAEERGEMAVKDAKL	20
	TVDQIRAIM	9
	NMSVIAHVDHGK	12
	STLTDSLVS	10
	VSKAGIAGSRAGETRF	17
	VVVDVSGVCVQTETVL	17
	RQAIAERIKPVL	12
	IDPVIQTVGF	10
	GSAERCKKVEDM	12
	DSEDKEKEGKPL	12
	EGPGDDEAAM	10
C0H9N2	VPTTDKGRF	9
	VEPIEDVPCGN	11
	IKPIQRTIL	9
	SVSPVVRVAVEAKN	14
	KKSDPVVSY	9
	RETVSESEVM	11
	AEDIEKGDVSPRQEL	15
	DVSEARKIW	9
	IIPARRVL	9
	EIKDSVVAGF	10
	VEIQCPQVGGIY	14

MVNFTVDQIR	10
ALLELQLEPEDLFQTFQR	18
APLMMYISK	9
TGTITTFEQAHNMR	14
SDPMVQCIEE	11
EGVLCEENMR	10
VLYACQLTAQPR	12
IWCFGPDGTGPN	12
TAIVVAETR	9
AYLPVNESFGFTADLR	16
EGIPALDNYLDK	12
PPPDGLAEDIEK	12
VSKAGIIAGSRAGETRF	17
IDSPGHVDF	9
VVVDCVSGVCVQTETVL	17
DSEDKEKEGKPL	12
GSAERCKKVEDMMKKL	16
PVTAQKYRCEL	11
MMNKMDRAL	9
RQAIAERIKPVL	12
KVRIMGPNF	9
EQAHNMRVMKF	11
YIKPIQRTIL	10
VEIQCPEQVVGGIYGVL	17
EESQVMGTP	9
IIPARRVL	9
HTDAIHRGGGQ	11
CEENMRAVRF	10
AEDIEKGDVSPRQEL	15
MDVTKGVQYL	10
QWAVKEGVL	9
EEDHAGIPL	9
SVSPVVRVAVEAKNPADL	18

	ADKYEWDVSEARKIWCF	17
	RSNTGGQAF	9
	GVKCCSDTPPEDCERDVADL	20
	CCEKTAAERTH	11
	QSAVCSSETL	10
	TTCCGEAEAQTCF	13
	AIAKRVAEL	9
	GDRVVKAKKL	10
	PAADQCEDF	9
	VDKIVATVAPCCSGDM	16
	KPDPKPDGL	9
	ADIAAVCQTF	10
	AGSDIDKKITDETDY	15
	KDKCCAAEDQAACF	14
	ACCKDEPGH	9
	VDEVCADESVL	11
	MQWLSVCSLLVLLSVLSR	18
Q03156	SRSQAQNQICTIF	13
	SQAQNQICTIFTEAK	15
	IAEALAMGVK	10
	CCSDTPPEDCER	12
	AELPAADQCEDFK	13
	SNPMLPPHVVLAIK	15
	ATFQHAIK	9
	MPQASFQEMAGMVDK	15
	TLVDEVCADESVLSR	15
	TALAGSDIDK	10
	AAGLSACCK	9
	TTITEDHLK	9
	CCAAEDQAACFTEEAPK	17
	DEPGHFVLPCAEEK	14
	ITDETDYYK	9
	TTCCGEAEAQTCF	13

	YGVVRHKTTITEDHL	15
	HMVSETVHDVL	11
	EKSMMVYYTRIMPQASF	17
	HACCKDEPGHF	11
	QHAIKRVAEL	11
	TKTPDVAMGKL	11
	CIVHKKYGDRVVKAKKL	17
	PAADQCEDF	9
	DHKAKIPRDL	10
	VDEVCADESVL	11
	KMCCEKTAAERTHCF	15
	SEHYDVHADIAAVCQTF	17
	CCEKTAAERTH	11
	PAADQCEDF	9
	TTCCGEAEAQTCF	13
	GDRVVKAKKL	10
	VDKIVATVAPCCSGDM	16
	VDEVCADESVL	11
	KPDPKPDGL	9
	ADIAAVCQTF	10
	AGSDIDKKITDETDY	15
	MQWLSVCSLLVLLSVLSR	18
P21848	SQAQNQICTIFTEAK	15
	IAEALAMGVK	10
	CCSDTPPEDCER	12
	DVADLFQSAVCSSETLVEK	19
	AELPAADQCEDFK	13
	SNPMLPPHVVLAIK	15
	ATFQHAVMK	9
	AAGLSACCK	9
	TTCCGEAEAQTCF	13
	TALAGSDIDK	10
	ITDETDYYK	9

	TTITEDHLK	9
	TLVDEVCADESVLSR	15
	MPQASFQEMGGMVDK	15
	SRSQAQNQICTIF	13
	QSAVCSSETL	10
	YGVVRHKTTITEDHL	15
	SKGPAVGIDL	10
	DDGVVQSDM	9
	DKKVG AERN	9
	DSQRQATKDAGTISGL	16
	RTACERAKRTL	11
	SSSTQASIEIDSL	13
	VGGSTRIPKIQKL	13
	EVKSTAGDTH	10
	GIETAGGVM	9
	GAAVQAAIL	9
	TGIPPAPRGVPQIEVTF	17
	QGKISDEDKTKIL	13
	KCEDDVQRDKVSSKN	15
B5DFX7	VSAADKSTGKEN	12
	KSTVEDEKL	9
	VEIANDQGNR	11
	TTPSYVAFTDSER	13
	MNPCNTVFDK	11
	FDDGVVQSDMK	11
	HWPFEVINDSTR	12
	DAGTISGLNVLR	12
	TVNNAVVTVPAYFNDSQR	18
	STAGDTHLGGEDFDNR	16
	FEELNADLFR	10
	LLQDFENGK	9
	AQVHDIVLVGGSTR	14
	SLESYAFNMK	10

	CNEVIGWLDK	10
	FELTGIPPAPR	11
	DANGIMNVSAADK	13
	GVPQIEVTFDI	11
	MSKGPAVGIDL	11
	GTTYSCVGVF	10
	IGDAAKNQVA	10
	DDGVVQSDMKHWPF	14
	EVINDSTRPKL	11
	QVEYKGETKSF	11
	VKMKEIAEAYL	11
	GKTVNNAVVTVPAYF	15
	NDSQRQATKDAGTISGL	17
	RIINEPTAAA	10
	EVKSTAGDTHL	11
	DKKVGAEARNVL	11
	KRKYKKDISDNKRAVRRL	18
	SSSTQASIEIDSL	13
	RTACERAKRTL	11
	GIETAGGVMTVL	12
	DKNQTAEKEEYEHHQKEL	18
	QGKISDEDKTKIL	13
	IQVYEGERAMTKDNNL	16
	TTYSDNQPGVL	11
	KVCNPIITKL	10
	SGDKSENVQDL	11
	VGGSTRIPKIQKL	13
	RDAMDKAQVHDIVL	15
	TGIPPAPRGVPQIEVTF	17
	EKCNEVIGWL	10
	NMKSTVEDEKL	11
B5X2B3	AAPAEIVKW	10
	SCVRKDGSF	9

QAIKGGEADAITL	13
AVAVAKKGTAFA	11
AGIEDRPVESAVSDF	15
ASCAPGATM	9
CKGDCSRSH	9
KDGAGDVAF	9
AVVSRKDPEL	10
AVPAAEKASY	10
KKSQATGASSRAIKW	15
AEKGKCDTW	9
RKEADAIAVDGGEVY	15
AVAVAKKGSGL	11
SKGCAPGSEVGSPF	14
CAQCKGSGKAVGDEY	15
VEDAGDVAF	9
GSSGSDSSF	9
AVITRPETR	9
RCKARSEEQY	10
TIVPESTDGN	10
CQDGTTQPVTKF	12
RKCSDESTSDL	10
QEIPKGTKY	9
EPYYDYAGAFQCLK	14
DGAGDVAFIK	10
PLAVPAAEK	9
VPAHAVVSR	9
DFNLFSSDGAAK	13
SQATGASSR	9
IDCQDAPTVEECIK	14
CGLVPVMVEQYDADLCS	17
APGEASSYYAVAVAK	15
EADAIAVDGGEVYTAGK	17
CLVEDAGDVAFI	12

WCAVGHAEK	9
GCAPGSEVGSPFCAQCK	17
SEEQYYGYTGAFR	13
HTIVPESTDGNGPDWAK	17
VPAHAVITR	9
GDVVSILLELQAK	13
ACTFHSCQQK	10
CSDSTSLEK	10
SSDFELLCQDGTTPVTK	18
FGSSGSDSSFR	11
SCVRKDGSF	9
QAIKGGEADAITL	13
RGKKSCHTGL	10
GKSAGWNIPIGTL	13
NASCAPGATMGS	12
KDGAGDVAF	9
DGGDIYTAGL	10
SSDGYAAKNL	10
ARVPAHAVVSRKDPEL	16
CQDGTTPVTKF	12
AKVPAHAVITRPETR	15
GSSGSDSSF	9
GRTAGWNIPMGL	12
KGKRSCHTGL	10
RKSDSTSLEK	10
GAEYMSTIRSL	11
VPVMVEQYDADL	12
AVPAAEKASYEL	12
IHQETNDCDF	10
SKGCAPGSEVGSPF	14
QEIPKGTKYQDF	12
VEDAGDVAF	9
ASIDSYKTCHL	11

	AAPAEGIVKW	10
	QAIKGGEADAITL	13
	SCVRKDGSF	9
	AVAVAKKGTAF	11
	ASCAPGATM	9
	AGIEDRPVESAVSDF	15
	AVPAAEKASY	10
	AVAVAKKGSGL	11
	VEDAGDVAF	9
	QEIPKGTKY	9
	KDGAGDVAF	9
	KKSQATGASSRAIKW	15
	AVVSRKDPEL	10
	RKCSDESTDL	10
	CKGDCSRSH	9
	AVITRPETR	9
B5X2B3	TIVPESTDGN	10
	RCKARSEEQY	10
	CAQCKGSGKAVGDEY	15
	SKGCAPGSEVGSPF	14
	CQDGTTQPVTKF	12
	RKEADAIAVDGGEVY	15
	AEKGKCDTW	9
	GSSGSDSSF	9
	SCVRKDGSF	9
	QAIKGGEADAITL	13
	DGGDIYTAGL	10
	VPAHAVVSR	9
	EPYYDYAGAFQCLK	14
	DGAGDVAFIK	10
	PLAVPAAEK	9
	IDCQDAPTVEECIK	14
	VPAHAVITR	9

GDVVSILLELQAK	13
CLVEDAGDVAFI	12
ACTFHSCQQK	10
HTIVPESTDGNGPDWAK	17
EADAIAVDGGEVYTAGK	17
SQATGASSR	9
VEDAGDVAF	9
SKGCAPGSEVGSPF	14
CSDSTSLEK	10
FGSSGSDSSFR	11
KGKRSCHTGL	10
GCAPGSEVGSPFCAQCK	17
WCAVGHAEK	9
DFNLFSSDGAAK	13
APGEASSYYAVAVAK	15
CGLVPVMVEQYDADLCS	17
PSDKTRGGGDDSF	13
RGKKSCHTGL	10
GKSAGWNIPIGTL	13
NASCAPGATMGS	12
AVPAAEKASYEL	12
KDGAGDVAF	9
ARVPAHAVVSRKDPEL	16
ASIDSYKTCHL	11
VPVMVEQYDADL	12
QEIPKGTKYQDF	12
RKCSDESTDL	10
AKVPAHAVITRPETR	15
CQDGTTQPVTKF	12
SAIAAIKTKRSIQF	14
RGDVVPKDVN	10
IHQETNDCDF	10
GRTAGWNIPMGL	12

	GAEYMSTIRSL	11
	GSSGSDSSF	9
	CKGDCSRSHKEPYDYAGAF	20
	GGGDDSFNTFFSETGAGK	18
	EPTVIDEVRTGIYRQL	16
	EDAANNYAR	9
	EPTVIDEVRTGIY	13
	ITGKEDAN	9
	QLFHPEQLITGK	12
	TIGKEIIDIVL	11
	IGQIVSSITA	10
	APVISAEKAY	10
	AKVQRAVCM	9
	EEVGTDSVGEDEEGEEY	18
	DIERPSYTNL	10
	VHWYVGEGMEEGEF	14
	AIFVDLEPTVIDEVR	15
B5DH01	LIGQIVSSITA	11
	IHFPLATYAPVISA EK	16
	TVVPGGDLAK	10
	AVCMLSNTTAIAEAWAR	17
	SIQFVDWCPTGFK	13
	DVNSAIAAIK	10
	YMACCLLYR	9
	LEFAVYPAPQVSTA	14
	GVRGRCGAM	9
	GKDGKEAAL	9
	SNTTAIAEAWARL	13
	AKVQRAVCML	10
	KVGINYQPP	9
	MVDNEAIYDICRRNL	15
	IGQIVSSITA	10
	AVYPAPQVSTA	11

	VVEPYNSIL	9
	SVDYGKKSIL	10
	SVADITNACF	10
	MGPYTITYFGVR	12
	MGPYTITYFGVR	12
	IMMADQGQEWK	11
	SARPKIKAF	9
	MGPYTITYF	9
	EAVMAKNKTGF	11
	EILIDFSDWMK	11
	ASCVFGQLPK	10
B5XGZ2	LVLYQSNAIRL	11
	EAALIDMMCDGVEDLR	16
	MIYQEYDTGK	10
	AFLGSDAYK	9
	DITIGDTPAGRIEM	14
	ADVVPKTAEN	10
	KMSARPKIKAF	11
	IDMMCDGVEDL	11
	GRNHDAYGKDGKEAAL	16
	VYFDITIGDTPAGR	14
	IEMELFADVVPK	12
	MCQGGDFTNHNGTGK	16
	DITIGDTPAGRIEMEL	16
	VVEGLNIIASMEK	13
	VAIADCGEL	9
B5DG94	KASQVAIDIRDN	12
	VEDGAEPQAL	10
	GPKPSIPPGTPDDEKVDTS	19
	ADVVPKTAENF	11
	TNHNGTGKSIYGKFK	16
	SMANAGPNTNGSQF	14
	SDKTQIQVL	9

	ASQVAIDIR	9
	PSIPPGTPDDEK	12
	GALYMISDASGSMK	14
	KSSAVASSSPF	11
	RVEDGDKVAVDPSSY	15
	KDKDQTTGPSKAY	13
	AEERTGAPKIAKDY	14
	VEDGAEPQAL	10
	PISTIKQGAEPPTF	14
	GGASADVSEGKEPAGF	16
	RGVGASEEEM	10
	SVEEVPGDF	9
	IGGTSRKGQTGTGSTR	18
	VDDGKGKVQIW	11
	GGAPVQVRVTQGGQEP	16
	MWETDPLER	9
C0PU67	SPDAMFVWR	9
	GGQTGTGSTR	10
	HMVEDGAEPQAL	12
	DNGVDKNVF	9
	GGASADVSEGKEPAGF	16
	SSAVASSSPFK	11
	QAMLTAEECYILDNGVDK	18
	TQIQVLPAGGETTLFK	16
	VEQVPFDASSLHSNK	15
	EQHIIYTWQGLK	12
	LDDSMGGAPVQVR	13
	CTQDELAASAFMTVK	15
	GVGASEEEMAAAK	13
	EPAGFWSALGGK	12
	HVVGILGGSASDVSEGK	17
	PMMVHIGGTSR	11
	DYVDS DPSGR	10

	NMAAQHGMVDDGK	13
	AVEVEPSASFLNANDV	16
	KASQVAIDIRDN	12
	VEDGAEPQAL	10
	GPKPSIPPGTPDDEKVDTS	19
	PISTIKQGAEPPTF	14
	QAWDPKMWETDPL	13
	QNMVKPPRL	9
	IKEKGYSKDTQIQVL	15
	GPKPSIPPGTPDDEKVDTS	19
	GGREQHIIYTWQGL	14
	SDWKDKDQTTGPSKAYSIGR	20
	ERKAAMSAAQKF	12
	VWKGPKANTS	10
	DDSMGGAPVQVRVTQGQEPP	20
	IGGTSRKGQGTGTGSTRL	18
	GGAPVQVRVTQGQEPP	16
	ASQVAIDIR	9
	LHMVEDGAEPQALTEALGPK	20
	GALYMISDASGSMK	14
	KSSAVASSSPF	11
	SDKTQIQVL	9
	KDKDQTTGPSKAY	13
	VDDGKGKVQIW	11
	RVEDGDKVAVDPSSY	15
B5X1B	EQHIIYTWQGLK	12
	PISTIKQGAEPPTF	14
	VSDPSGRRGL	11
	AEERTGAPKIAKDY	14
	GGASDVSEGKEPAGF	16
	RGVGASEEEM	10
	IRQSSTRATRAVEVEPSASF	20
	DYVSDPSGR	10

	MWETDPLER	9
	SSAVASSSPFK	11
	KASQVAIDIRDNERNGRAKL	20
	GPKPSIPPGTPDDEKVDTS	19
	HMVEDGAEPQAL	12
	PSIPPGTPDDEK	12
	QAMLTAEECYILDNGVDK	18
	NMAAQHGMVDDGK	13
	VEQVPFDASSLHSNK	15
	CTQDELAASAFMTVK	15
	LDDSMGGAPVQVR	13
	GVGASEEEMAAAK	13
	EPAGFWSALGGK	12
	PMMVHIGGTSR	11
	HVVGILGGSASDVSEGK	17
	AVEVEPSASFLNANDV	16
	SPDAMFVWR	9
	TQIQVLPAGGETTLFK	16
	GGQTGTGSTR	10
	HLMSLFQGK	9
	TPVASGPAEPPRN	13
	TPVASGPAEPPRN	13
	KTSKIVADKDY	11
	DNGVDKNVF	9
	IKEKGYSKDTQIQVL	15
	ERKAAMSAAQKF	12
	VWKGPKANTS	10
	SDWKDKDQTTGPSKAYSIGR	20
	GGREQHIIYTWQGL	14
	PISTIKQGAEPPTF	14
	QAWDPKMWETDPL	13
B5X4K4	LLTPVASGPAEPPR	14
	DLADELALVDVMEDK	15

	GELMDLQHGSFLK	14
	SRIVVVSAGVRQQEGESRL	19
	KVTVVGVGM	9
	PKHRVIGSGTNL	12
	DYAVTANSR	9
	VIGSGTNLDSAR	12
	LNPEFGLDGDK	11
	IHPVSTMVK	9
	GYTNWAIGLSVADLTESIHK	20
	SAETLWGIQK	10
	IVVVSAGVR	9
	SIDAVKRKIKVL	12
	QQADEAEERAETL	14
	EAEKAADESERGM	14
	IVVSNPVDVL	10
	IIPQIVKHSPNCTL	14
	KGYTNWAIGL	10
	VGSVINMTL	9
	MANSIDAVK	9
	EQAEAEVASLNR	12
	VLQQADEAEER	12
	RASKDEEKM	9
	ERTEERAEL	9
	KEAETRAEF	9
	MANSIDAVKRKIKVL	15
C0H9C0	QQADEAEERAETL	14
	KEAKHIAEEA	10
	MEMQEIQLK	9
	LVIIEGDLER	10
	TIDDLEDALANAK	13
	EENVNIHATLDK	12
	AELAEGNAR	9
	AGDDAPRAVF	10

	ASGRTTGIVL	10
	DRKYEEVARKL	11
	ERTEERAEL	9
	ANAKEENVNIHATL	14
	QASEDKYSQKE	11
	DKYEEEIKIL	10
	KEAETRAEF	9
	SGFAGDDAPR	10
	HVGIMVGMGQK	11
	YPIDHGIVTNWDDMEK	16
	TTTAEREIVRDVKEKL	16
	KCDVDIRKDL	10
	PDGQVITIGSERF	13
	KIKIISPPERKY	12
	DESGPAIVH	9
	MVEDEVAAL	9
	VIDNGSGMCKSGF	13
	SGIADRMQKEVSAL	14
	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	18
B5XFZ3	YELPDGQVITIGSER	15
	MEYDESGPAIVHR	13
	SGGSTMFSGIADR	13
	EVSALAPTTMK	11
	IWHHTFYNELR	11
	DSYVGDEAQ	9
	AVFPSIVGR	9
	GYSFTTTAER	10
	GDGECSEGAVW	11
	QAQQVKGKPTM	11
	VSVAIGCATRDRTVAF	16
	AVAGSSSSL	9
	TTTAEREIVRDVKEKL	16
	RVAPEEHPVL	10

	NSPAMYVAIQAVL	13
	YASGRITGIVL	11
	NPKNNREKM	9
	MEYDESGPAIVHRKCF	16
	DSGDGVTHTVPIYEGYAL	18
	PDGQVITIGSERF	13
	AGDDAPRAVF	10
	GHAAPILYAAWAEAGFVK	18
	IDSLEGHPTPK	12
	LGQSEAAPLK	10
	GQSSQRVVAL	10
	KIGDKVATRKAY	12
	CGVSIGEDGPSQM	13
	PSDGVSTERSVEL	13
	SSARATGGRIITVEDH	16
	SAVGEEPGIM	10
	MANYHKPDEKTL	12
	SDPRNQCNDRF	11
	YAAWAEAGF	9
	ALWQAQQVK	9
B5X4R7	GIENMDNWHGK	11
	TICPELPNEDTAPA	14
	DLEAQIQPNK	11
	DLSPITLPSPPNYK	14
	AIPTCTLFYPSDGVSTER	18
	NSTFSEMFHK	10
	MAAVSESNINLAGSH	15
	PLDAATILSSAR	12
	PQELLDLYGISAK	13
	TVAFASTFAAFLSR	14
	TEVVCGAPSIY	11
	AIGTGKTASPAQA	13
	GDGECSEGAVWEAMAF	16

	GAACGMAYTGKHF	13
	KHDMDVYRKRCEAF	14
	GWNTYVVDGHDVEEL	15
	WQAQQVKGKPTM	12
	EAQIQNPNTICPEL	15
	GQSSQRVVAL	10
	SAVGEEPGIMVTRL	14
	YPSDGVSTERSVEL	14
	YGISAKHIANAVRQTF	16
	ASEGVNIRVIDPF	13
	GAFTGEISPAMIK	14
	CAHAENGL	9
	DEREAGITEKVIN	13
	GVIACIGEKL	10
	GGSVTGGTCKEL	12
	VGGNWKMNGDKASL	14
	DPNTEVVCGAPSIYL	15
	AAQNCYKVKGGAF	13
	WVFGETDELIGQK	13
	DVGVHVVILGHSER	14
	LDPNTEVVCGAPSIYLEFAR	20
B5DGL3	VVLAYEPVWAIGTGK	15
	DVDGFLVGGAALK	13
	IYGGSVTGGTCK	13
	ANVSEAVANSVR	12
	ADDGSPAKAEF	11
	VGDRDASVVGf	11
	DLLVAYYDVDYEK	13
	TGEISPAMIKDVGVHVVIL	19
	GHSERRWVF	9
	GVIACIGEKL	10
	ADNIKDWSKVVL	12
	IGQKCAHAL	9

	GGMKDVDGF	9
	DEREAGITEKVINAQTKHF	19
	IGDHGMILVEFFAPWCGHCK	20
	VDCTVHNNVCQK	12
	DGEDAGPYDGPR	12
	DGPRTADGIVSH	12
	RDGEDAGPY	9
	PVVGIRTAKGDKY	13
	EEETSKKKKKN	11
	DGPVKTVVAEN	11
	DSKIGDHGMIL	11
	APWCGHCKKL	10
	TADGIVSHLK	10
	DASVVGFFADDGSPAK	16
	FSEDFTNAK	10
B5X1H7	HSVEGEGILFR	12
	DVLIEFYAPWCGHCK	15
	TVVAENFDAIVNEEDK	16
	GFPTIFFAPAGQK	13
	MDATANDVPSQYEV	15
	AEMGLDASSGELPVVGIR	18
	YVMTEEFSR	9
	VVGARRSAW	9
	ADDGSPAKAEF	11
	EEETSKKKKKNEL	13
	PVVGIRTAKGDKYVMTEEF	19
	ENNDGPVKTVVAENF	15
	DAIVNEEDKDVL	12
	YDDMAASMK	9
	EVTEQGGELSNEER	14
B5XF08	VISSIGQKTEGSDKKL	16
	AEVASGDDKTATIEN	15
	AMVNEYREKVEGEL	14

	DICNDVLELLNK	12
	YLIENSTNAESK	12
	YLAEVASGDDK	11
	QAFDDAIAELDK	12
	EMDPHTPIR	9
	EAGEAGENEN	10
	DSTLIMQLLR	10
	LGLALNFSVFFYE	13
	AKIGQPAPQF	10
	KATAVVDGQF	10
	DTIVPDIQKSKEF	13
	VISSIGQKTEGSDKKL	16
	SVAYKNVVGARRSAWR	16
	DISKEMDPHTPIRL	15
	MKGDYYRYL	9
	EAGEAGENEN	10
	WTSDNAPEEGEGG	13
	NEESYKDSTL	10
	IENSTNAESKVF	12
	DDAIAEL	7
	NSPEKACSL	9
	DTIVPDIQK	9
	RKIGCEVIGASTDSH	15
	VCPTEIVGF	9
	PVGRSVDETL	10
	DIQLSDYMGK	10
	DTIVPDIQKSKEF	13
B5XBY3	PVGRSVDETL	10
	QHTDKYGEVCPAGWKPGS	18
	LVQAFQHTDK	10
	YGEVCPAGWK	10
	QITINDLPVGR	11
	IGQPAPQFK	9

	ATAVVDGQFK	10
	SAAKAICDH	9
	ISTVQQRGA AVIAARK	16
	DQGIAYRGL	9
	AWINTPRKQGGL	12
	RKIGCEVIGASTDSHF	16
	TQSISRDIYGV L	11
	SDYMGKYVVF	10
	VCPT EIVGF	9
	KATAVVDGQF	10
	MSSGNAKIGQPAPQF	15
	DTAVTFLSA	9
	GAFISTVQQR	10
	VTGAAGQIAY	10
	VEERDTAVTF	10
	IAAKSAPSVPKEN	13
	RCGVPATQVK	10
	REVIPTDKEDVAF	13
	MSAEPVRVL	9
	VEERDTAVTF	10
	LSSAMSAAK	9
	VNMAGSDLACF DAVK	15
B5X2Q1	CGVPATQVK	9
	M DATAAE LVEER	12
	DLDAAILVGSMPR	13
	VLVVGNPANTNCLIAAK	17
	VDGLAINDFSR	11
	VAVAVSSSL	9
	IAKRGKRIPQTL	12
	AEDKDIQKVAEDF	14
	SRGKMDATAAEL	12
	VGSMPRREGMERKDL	15
	DAVKDDDWL	9

	REVIPTDKEDVAF	13
	ISTVQQRGAAVIAARK	16
	PVHIKDKQWKI	11
	VVGNPANTNCL	11
	VTGAAGQIAYSL	12
	MSAEPVRVL	9
	IAAKSAPSVPKENF	14
	PLMVIFHLEDCPHSASMK	18
	VADEDFIILNLVYETTDK	18
	IIFVDPSMTVR	11
	TVRADITGRY	10
	VAVAVSSSL	9
	AKPEKNIAKRGKRIPQTL	18
	IWAQTYEEAL	10
Q2V6Q8	MYAYEPSDIK	10
	VEEKRVKEVVKKH	13
	TVKVDTGEPM	10
	VAERVTVITKH	11
	VYETTDKHL	9
	AEDKDIQKVADEDF	14
	EDCPHSASMKKVF	13
	SNMQKAKKL	9
	ELISNASDALDK	12
	IDVIPNVEER	10
	TLTLIDTGIGMTK	13
	GTIAKSGTKAF	11
	VRGVVDSIDL	10
Q9W6K6	ITGESKDQVAN	11
	PEDEEEKKKM	10
	DKKVEKVTVSN	11
	VSSPCCIVTSTY	12
	GIDDDEVIPEEPTSAPAPDEIPPL	24
	EGDDDASRM	9

	YHSSQSGDELTSLTEYLTR	19
	DQVANSAFVER	11
	LSSGFSLDDPQTHSNR	16
	RQEEEAETF	9
	GTIAKSGTKAF	11
	TVKVDTGEPM	10
	ADLINNLGTIAK	12
	AFMEALQAGA	10
	EDQTEYVEEK	10
	HSQFIGYPITLFVEK	15
	IEDVGSDDDEEDSK	13
	GVVDSIDLPLNISR	14
	NPDDITMEEYGE	12
	SLTNDWEEHLAVK	13
	DSCEELIPEYLNFR	15
	CMELFGELAEDR	12
	DNSTMGYMMAK	11
	HLEINPDHPIVETLR	15
	GFEVLYMTEPIDEYCVQQLK	20
	HFSVEGQLEFR	11
	LGIHEDSQNR	10
	DLVILLFETAL	11
	AGVTAAEIKAM	11
	VEEKRVKEVVKKH	13
	VAERVTVITKH	11
	VRGVVDSIDL	10
	ITGESKDQVAN	11
	PEDEEEKKKM	10
	VSSPCCIVTSTY	12
	DKKVEKVTVSN	11
	DNLHTEGDHTLDVK	14
B5X518	SITIAKSGQTL	11
	VQEAAICGSEAGKESVW	17

	AGVTAAEIKAMMSL	14
	PTATDTNSYSITIAK	15
	ASDMMQYLR	9
	SGQTLIIVK	9
	AAITKDSTEESEN	12
	PTKGGKTAAGKM	12
	AAKRGPAKSKKVGKIPGKL	18
	MAWDGYITNL	10
	DIPGGKINIKASDMMQYL	18
	QVHPDTGISNK	11
	AMNICHNFITDLFER	15
	ERIASEASKL	10
	REIQTVVRL	9
	AVSEGTKAVN	10
B5XEY5	MAAITKDSTEESEN SHVNTSL	20
	ERIASEASKL	10
	AVYNKKSTITG	11
	LILPGELAK	9
	ETYFIYIYK	9
	AKHAVSEGTKAVNKF	15
	REIQTVVRL	9
	FKDGEDAGAYDGPR	14
	EATNPLVAQEEK	12
	GKPDVVVSEDEEWR	14
	AFAVGGLGSIVR	12
Peptidos from Fæste et al., 2020	GF EKPSDNSSAILLQWHEK	19
	SLALGGTFLIQK	12
	ITDVGGVPYL VPLVK	15
	QGPYDVVFLPGGALGAQH	18
	LSEPAVK	8
	DVYLV PDASLEDARK	15
	EIDGFALNR	9
	TITVIGSGLIGR	12

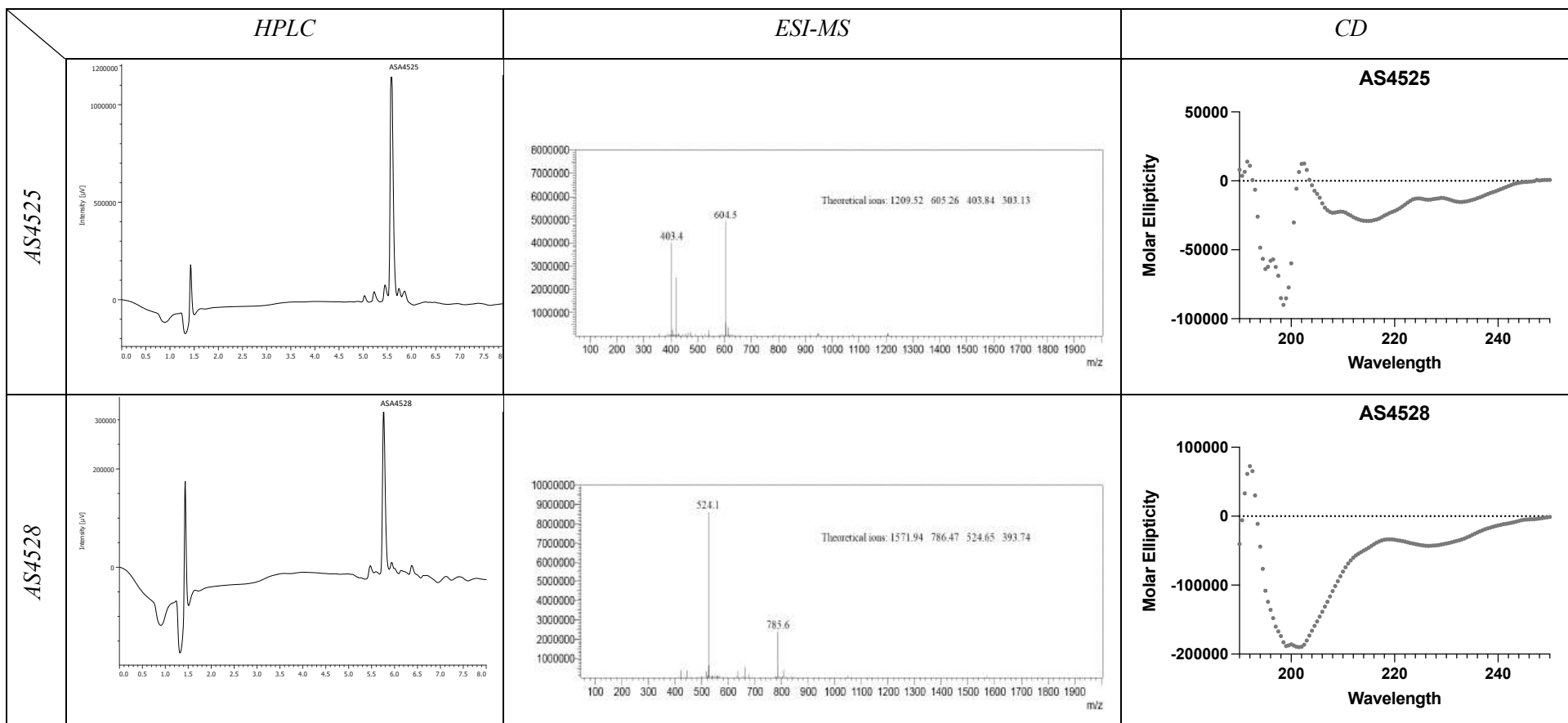
ILESVGIEADNTR	13
NVEEVIAQGYGK	12
LNIEGVVEFASYSCLK	15
DAEDAVYELDGK	12
LNHTIYINNLNEK	13
SMQGFPHYDKPMR	13
VSLEDLYNGK	10
EISFAYEVLTNPEKK	15

Tabla S 3: Resumen de los péptidos generados por hidrólisis *in silico*. Se muestra el número de péptidos entre 9 y 20 residuos obtenidos por la hidrólisis de las proteínas del mucus de *Salmo salar* obtenidas de Uniprot con cada enzima.

N° péptidos (9 - 20 residuos)				
Uniprot ID	Quimiotripsona	Tripsina	Pepsina	Total
B5XGV3	5	9	9	23
O42161	9	13	8	30
B5X851	2	3	1	6
B5DG40	10	10	5	25
B5XB84	6	2	8	16
B5X320	13	16	9	38
C0H9N2	21	12	23	56
Q03156	14	16	13	43
P21848	9	15	3	27
B5DFX7	15	16	27	58
B5X2B3	24	21	23	68
B5X2B3	24	25	20	69
B5DH01	11	11	11	33
B5XGZ2	4	8	5	17
B5DG94	3	3	7	13
C0PU67	18	17	15	50
B5X1B	18	18	11	47
B5X4K4	5	8	7	20
C0H9C0	6	8	8	22
B5XFZ3	8	12	13	33
B5X4R7	8	14	13	35
B5DGL3	5	10	10	25
B5X1H7	8	12	6	26
B5XF08	4	9	13	26
B5XBY3	5	8	10	23
B5X2Q1	7	9	13	29
Q2V6Q8	4	4	7	15
Q9W6K6	14	19	8	41

B5X5I8	3	4	5	12
B5XEY5	6	5	2	13
Peptides	(Fæste et al., 2020c)			20
Total				959

Tabla S 4: Caracterización de péptidos sintéticos con potencial actividad antiparasitaria. HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. ESI-MS: Espectrometría de masas por electrospray y dicroísmo circular.



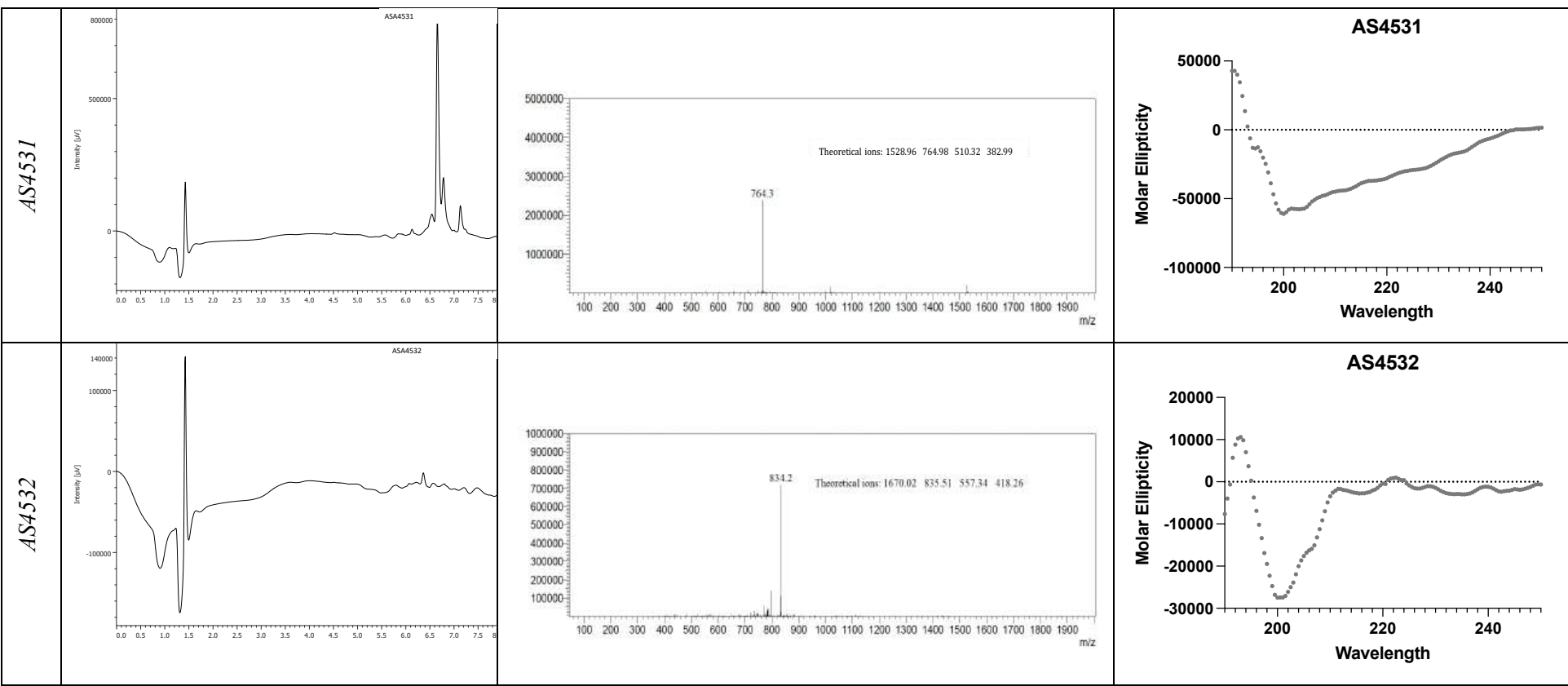


Tabla S5: Resumen de las interacciones con los residuos clave para las tres variantes de la AChE de *C. rogercresseyi*. La numeración de *T. californica* se muestra entre corchetes cuadrados, en negrita los dos residuos aromáticos que cambian en el parásito.

Key rol	Calro1A	Calro 1B	AS4525			AS4528			AS4531			AS4532			
			1A	Mut	1B	1A	Mut	1B	1A	Mut	1B	1A	Mut	1B	
Triada Catalítica	S196[221]	T192			1		1	2		1	3	2	2	3	
	E324[348]	D318						1			1				
	H438[461]	Q432			1		1	2		2	3	2	2	3	
Residuos Aromáticos	PAS	V98[Y91]	I60	1	3	2	1	2	2	2	3	1	1	2	2
	Unión a colina	W112[105]	W74		1	2		3	2		4	2	1	1	2
	PAS	Y149[142]	F114	1	2	4	1	5		1	4	5	4	4	3
		Y158[151]	Y123					2	1		1	1	1	1	1
	Bolsillo acilo	W260[254]	W225									2	1	1	1
	PAS	W308[300]	W271	6	7	3	3		4	4	3		5	4	3
	Bolsillo acilo	F318*[311]	I281	1	1	1		2	2			2	2	1	1
		Y358[351]	P321		1	1	1	4	3		3	2	3	3	1
	Bolsillo acilo	F359[352]	D322	1	1	2		4	2		2	2	3	3	1
	PAS	Y362[355]	Y325	3	4	5	3	3	4	2	3	4	4	4	4
		W461[453]	W424			1			1						
		D471[Y463]	E434								1	1			
F224[218]GESAG229[223]	E226[220]	G191					1	1		1	1	2	1	1	
Agujero oxianiónico	A228[222]	A193						1			1	2	2		
	G146[139]	G111		1	2		4	3		2	3	2	2	2	
	G147[140]	G112			2		4	2		1	3	2	2	2	
TOTAL				13	21	27	9	36	33	9	31	37	37	35	30

* Este residuo cambia a Val en la variante mutante. PAS: Sitio aniónico periférico

Tabla S6. Resumen del análisis post docking con PRODIGY para las 6 AChE's con los péptidos seleccionados. ΔG es la afinidad de unión predicha, K_d es la constante de disociación a 25 °C (los valores más bajos están en negrita), los ICs corresponden a contactos intermoleculares totales definidos a 5,5 Å de distancia.

Péptido	AChE	ΔG (kcal mol ⁻¹)	K_d (M) at °C	Total ICs
AS4525	Calro1A	-8.3	8.30E-07	54
	Calro1A_V318	-8.9	3.00E-07	65
	Calro1B	-7.6	2.80E-06	58
	Lepsm1A	-7.4	4.00E-06	40

	Lepsm1B	-10.4	2.20E-08	78
	Salsa	-10.1	4.20E-08	75
	Oncmy	-7.5	2.90E-06	47
	Oncki	-8	1.40E-06	55
	Saltr	-7.8	1.80E-06	47
	Cypca	-7.9	1.60E-06	47
	Ampoc	-9.4	1.30E-07	70
	Eleel	-7.2	5.10E-06	52
	Mouse	-9.1	2.20E-07	68
	Human	-7.8	1.80E-06	58
	Tetcf	-8.9	3.20E-07	66
	Pluxy	-7.6	2.70E-06	54
	Calro1A	-10.1	3.70E-08	60
	Calro1A_V318	-10.1	4.00E-08	86
	Calro1B	-8.2	9.30E-07	63
	Lepsm1A	-9.5	1.00E-07	63
	Lepsm1B	-9.6	9.20E-08	70
	Salsa	-9.5	1.10E-07	65
	Oncmy	-9.6	8.50E-08	70
AS4528	Oncki	-12.2	1.10E-09	85
	Saltr	-10.8	1.20E-08	86
	Cypca	-9	2.40E-07	50
	Ampoc	-10.4	2.20E-08	79
	Eleel	-7.6	2.50E-06	54
	Mouse	-6.6	1.50E-05	47
	Human	-9.1	2.20E-07	87
	Tetcf	-8.9	2.90E-07	51
	Pluxy	-9.4	1.30E-07	62
	Calro1A	-8.1	1.10E-06	55
	Calro1A_V318	-10.3	2.70E-08	63
	Calro1B	-11.3	5.50E-09	78
	Lepsm1A	-9.6	9.90E-08	60
AS4531	Lepsm1B	-12.6	5.50E-10	73
	Salsa	-9.9	5.40E-08	73
	Oncmy	-10.5	1.90E-08	60
	Oncki	-9.5	1.00E-07	62
	Saltr	-10.1	3.70E-08	72
	Cypca	-9.2	1.90E-07	52

	Ampoc	-11.5	3.80E-09	89
	Eleel	-9.3	1.50E-07	62
	Mouse	-8.7	3.90E-07	72
	Human	-9.5	1.10E-07	67
	Tetcf	-10.9	1.00E-08	75
	Pluxy	-9.9	5.70E-08	58
	Calro1A	-7.9	1.50E-06	56
	Calro1A_V318	-8.2	9.10E-07	59
	Calro1B	-8	1.40E-06	59
	Lepsm1A	-8.2	9.00E-07	57
	Lepsm1B	-10.2	3.20E-08	71
	Salsa	-9	2.30E-07	54
	Oncmy	-8.8	3.60E-07	52
AS4532	Oncki	-8	1.40E-06	52
	Saltr	-8.2	9.10E-07	56
	Cypca	-9.7	7.70E-08	64
	Ampoc	-8.8	3.40E-07	75
	Eleel	-7.7	2.40E-06	49
	Mouse	-7	7.30E-06	55
	Human	-7.6	2.70E-06	68
	Tetcf	-8.7	4.10E-07	49
	Pluxy	-8.9	3.10E-07	64

Tabla S7. Energía libre de unión de azametifos con las variantes Calro de AChE, los residuos correspondientes a la tríada catalítica, o sus análogos, están en negrita.

AChE	ΔG (kcal mol ⁻¹)	Residuos de interacción
Calro 1A	-7.46	V67, V68, D69, Y118, W 277, F328, Y331, Y332
Calro1A_V ₃₁₈	-6.72	V67, D69, W81, G115, Y118, S119, G120, E195, H438 , G439
Calro 1B	-7.56	D62, W74, G111, F114, S115, T192 , Y325, Q432 , G433, I436

	Calro1A	Calro1A_Mut	Calro1B	Lepsm1A	Lepsm1B	Salsa	Oncmy	Oncki	Saltr	Cypca	Ampoc	Eleel	Mouse	Human	TetCF	Pluxy
Calro1A	0.00	0.09	0.66	0.36	0.39	0.75	0.74	0.74	0.74	0.73	0.73	0.71	0.84	0.84	0.78	0.49
Calro1A_Mut		0.00	0.66	0.37	0.39	0.75	0.74	0.72	0.74	0.74	0.72	0.70	0.84	0.83	0.77	0.48
Calro1B			0.00	0.61	0.61	0.72	0.76	0.72	0.70	0.71	0.70	0.70	0.87	0.83	0.74	0.65
Lepsm1A				0.00	0.31	0.70	0.74	0.72	0.70	0.73	0.70	0.70	0.88	0.83	0.76	0.49
Lepsm1B					0.00	0.69	0.72	0.71	0.69	0.70	0.70	0.67	0.87	0.83	0.74	0.48
Salsa						0.00	0.45	0.46	0.29	0.30	0.27	0.37	0.64	0.63	0.51	0.77
Oncmy							0.00	0.33	0.50	0.50	0.48	0.52	0.70	0.68	0.70	0.79
Oncki								0.00	0.44	0.48	0.46	0.50	0.69	0.70	0.67	0.78
Saltr									0.00	0.28	0.35	0.33	0.66	0.64	0.49	0.75
Cypca										0.00	0.35	0.34	0.67	0.62	0.53	0.78
Ampoc											0.00	0.37	0.61	0.65	0.46	0.74
Eleel												0.00	0.65	0.61	0.49	0.73
Mouse													0.00	0.61	0.73	0.83
Human														0.00	0.75	0.82
TetCF															0.00	0.79
Pluxy																0.00

Figura S1. Porcentaje de identidad para la comparación de alineaciones PIR de secuencias de AChE en la Tabla 1. Los valores están indicados de menor a mayor, de blanco a gris oscuro.

	Calro1A	Calro1A_Mut	Calro1B	Lepsm1A	Lepsm1B	Salsa	Oncmy	Oncki	Saltr	Cypca	Ampoc	Eleel	Mouse	Human	TetCF	Pluxy
Calro1A	100	99.9	55.3	91.3	79.6	45.5	45.5	45	45.2	44.2	44.9	43.9	44.4	44.8	43	55.14
Calro1A_Mut		100	57.1	91.03	79.8	45.7	45.7	45.1	45.3	44.1	45.1	43.8	44.7	45.1	42.8	54.9
Calro1B			100	51.8	54.3	38.9	38.7	38.9	38.9	38.1	38.7	38	37.7	38	39.2	46.2
Lepsm1A				100	83.7	41.2	41.5	41.2	41.4	40.8	41.1	40.3	40.2	41.3	42.9	54.8
Lepsm1B					100	43.2	43.6	43.5	43.5	41.9	44.3	41.9	43.1	43.6	45.6	56.1
Salsa						100	97.6	93	93.5	78.3	82.6	76.7	59.4	59.4	62.5	40.1
Oncmy							100	92.2	93.2	77.2	82.2	76.6	59.5	59.6	62.2	40.1
Oncki								100	98.1	79.3	83.7	77	58.7	58.9	62.9	40.8
Saltr									100	79.1	83.5	77.3	59.2	59.5	62.7	40.5
Cypca										100	78.9	79.8	59.6	58.4	60.5	39.7
Ampoc											100	76.2	60.9	60.1	65.1	39.6
Eleel												100	59	58.2	60.7	40.1
Mouse													100	88.4	54.6	40.8
Human														100	53.6	41.3
TetCF															100	41.3
Pluxy																100

Figura S2. RMSD en Angstroms para la comparación estructural de las estructuras 3D de AChE en la Tabla 1. Los valores están indicados de menor a mayor, de blanco a gris oscuro.

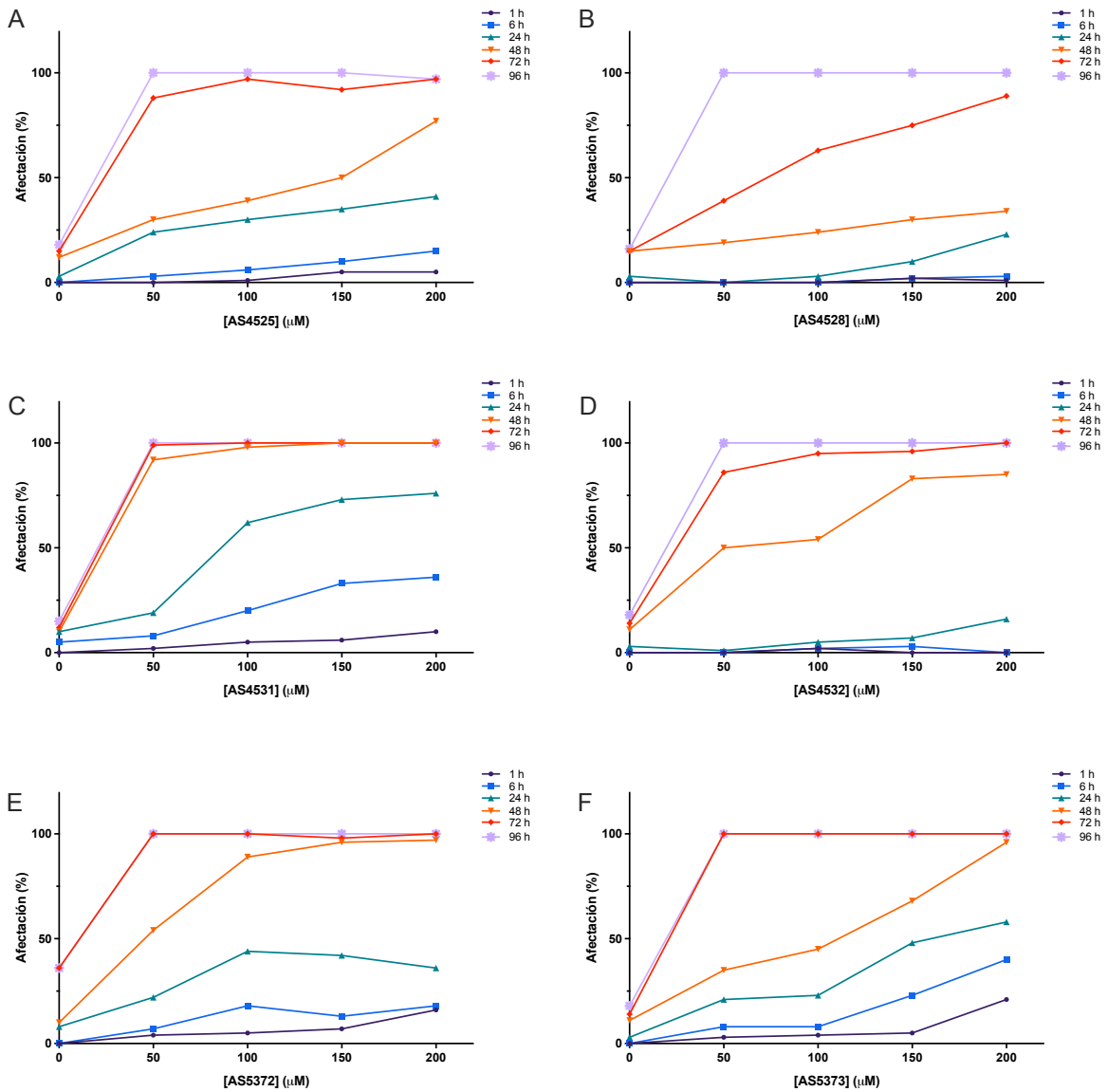


Figura S3. Curvas dosis respuesta de los péptidos seleccionados y modificados. (A) AS4525. (B) AS4528. (C) AS4531. (D) AS4532. (E) AS5372. (F) AS5373. Todos evaluados tras 1 h (negro), 6 h (azul), 24 h (verde), 48 h (naranja), 72 h (rojo) y 96 h (lila).

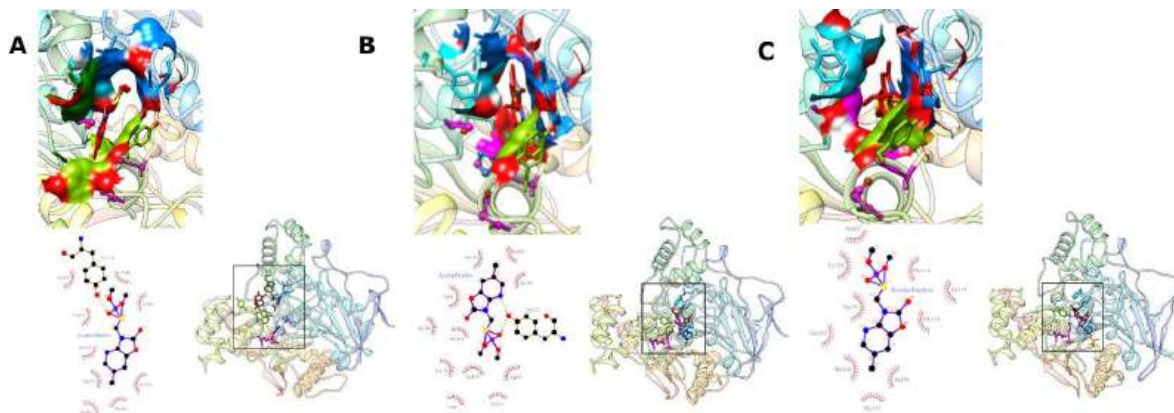


Figura S4. Análisis de docking de azamethiphos con variantes de Calro. (A) Variante Calro1A. (B). Calro1_V318. (C). Variante Calro1B. El panel derecho de cada figura muestra la estructura completa acoplada a cada péptido, en el lado izquierdo se muestra un primer plano del sitio de interacción de la superficie y en la parte inferior se muestra un diagrama 2D de la interacción creada con Ligplot ++.