

UNA MIRADA A LOS PÉPTIDOS Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN ACUICULTURA DE PECES



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO



***Una mirada a los péptidos y su potencial
aplicación en acuicultura de peces***

Dra. Fanny Guzmán Quimbayo

Dra. Paula Santana Sepúlveda

Dr. Luis Mercado Vianco

Dr. Carlos Jara Gutiérrez

Dr. Claudio Álvarez Álvarez

Dra. Nancy Alvarado Almonacid

Primera edición: julio, 2022

Santiago, Chile

Ediciones Universidad Autónoma de Chile

<https://ediciones.uautonoma.cl>

© Universidad Autónoma de Chile

Avenida Pedro de Valdivia 425, Providencia

Santiago, Chile

ISBN: 978-956-6109-98-3

Registro de propiedad intelectual: 2022-A-4911

Dirección editorial: Isidora Sesnic Humeres

Corrección de textos: Constanza Cariola Cerda

Diseño y diagramación: María Kaulen Díaz



Este material puede ser copiado y redistribuido por cualquier medio o formato, además se puede remezclar, transformar y crear a partir del material siempre y cuando se reconozca adecuadamente la autoría y las contribuciones se difundan bajo la misma licencia del material original.



MÁS UNIVERSIDAD

EDICIONES

Universidad Autónoma de Chile

UNA MIRADA A LOS PÉPTIDOS Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN ACUICULTURA DE PECES

ÍNDICE

1. Industria acuícola de peces en Chile	6
2. Química de péptidos (Dra. Fanny Guzmán)	8
2.1. ¿Qué es un péptido?	8
2.2. Síntesis química de péptidos	8
3. Evaluación biológica de péptidos antimicrobianos (Dra. Paula Santana)	13
3.1. Péptidos efectores derivados de la IL-8 en salmónidos	16
3.2. Péptidos derivados de IL-8 de salmónidos con potencial aplicación en la industria del salmón	18
4. Función inmunológica de péptidos en peces (Dr. Luis Mercado)	20
5. Estrés oxidativo y péptidos antioxidantes (Dr. Carlos Jara)	25
6. Efectos fisiológicos de péptidos en peces (Dr. Claudio Álvarez)	30
6.1. Hormonas peptídicas y desarrollo reproductivo de peces	30
6.2. Péptidos controladores de la ingesta	32
6.3. Péptidos involucrados en la activación de rutas de estrés	33
7. Métodos para la aplicación de péptidos en peces con enfoque en la encapsulación (Dra. Nancy Alvarado)	35
7.1. Microcápsulas poliméricas	36
7.2. Liposomas	38
7.3. Materiales inorgánicos	38
8. Desafíos para la aplicación de péptidos antimicrobianos en la industria acuícola	42
8.1. Usos y aplicaciones actuales de péptidos en la industria	42
8.2. Beneficios en el uso de péptidos	44
8.3. Desafíos para la aplicación de péptidos a gran escala	45
9. Agradecimientos	49



1. INDUSTRIA ACUÍCOLA DE PECES EN CHILE

Actualmente la acuicultura es una actividad económica que provee anualmente el 52% de los peces consumidos por la población mundial (FAO, 2020), lo que le confiere una gran relevancia como fuente de alimento. Esta megaindustria ha superado la producción total por pesca en los últimos diez años, dato que indica que seguirá siendo un factor económico de desarrollo primordial para todo el mundo. En particular para las exportaciones de Chile, posicionado como el primer país en producción acuícola en Latinoamérica y el quinto a nivel mundial (FAO, 2020). Actualmente, la producción chilena de peces concentra su actividad fundamentalmente en el cultivo de tres especies, en orden decreciente: salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón del Pacífico o coho (*Oncorhynchus kisutch*) (FAO, 2020). No obstante, el gobierno de Chile inició hace diez años un programa de diversificación de la acuicultura, en que se incluyeron como especies nativas candidatas a la corvina (*Cilus gilberti*), la palometa chilena (*Seriola lalandi*) y el congrio colorado (*Genypterus chilensis*), para ser cultivadas en la zona norte.

Si bien el cultivo de peces aporta tanto alimento como bienes económicos, la productividad anual de estas especies se ha visto reducida por factores como el mal estado fisiológico de los peces, la virulencia de los microorganismos, el grado de contaminación ambiental

por acumulación de fecas y comida en el fondo marino, así como el manejo específico de las balsas-jaulas de cultivo (Flores-Kossack *et al.*, 2020; Pincinato *et al.*, 2021). Todos estos factores debilitan el sistema inmunológico de estas especies, permitiendo el desarrollo de enfermedades, causadas principalmente por bacterias y virus. Estas enfermedades generan un impacto negativo en el desarrollo económico y social, de forma directa, por las pérdidas de producción, debido a los costes en los tratamientos empleados y la disminución del crecimiento de los peces durante la convalecencia. Y de forma indirecta, por el coste para la sociedad, el ajuste de las cuotas de mercado y el aumento de los precios, debido a la reducción de la oferta (Alfred & Shaahu, 2020). Por esto, una defensa rápida y efectiva contra patógenos es esencial para la sobrevivencia de los peces en cultivo, que coexisten con microorganismos oportunistas.

En respuesta, la industria acuícola ha utilizado antibióticos convencionales para frenar el crecimiento de estos microorganismos, sin considerar que las cepas bacterianas pueden generar resistencia a los mismos. Adicionalmente, hay evidencias que sugieren que los genes de resistencia a los antibióticos convencionales empleados en el entorno acuático de los peces, también pueden facilitar la transferencia horizontal de estos genes a los patógenos de otras especies marinas,



animales y humanos (Cabello *et al.*, 2020; Shah *et al.*, 2014). Por lo tanto, las grandes cantidades de antimicrobianos que se utilizan actualmente en la salmonicultura en Chile deben ser controladas para proteger el medioambiente y la salud humana (Cabello *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2018). Una estrategia alternativa para prevenir y/o controlar los patógenos de peces, y a su vez disminuir el uso intensivo de los antibióticos convencionales, es el estudio y la potencial aplicación de moléculas terapéuticas basadas en péptidos, las cuales se caracterizan por ser inocuas, compatibles con el medioambiente, además de contar con diversas propiedades, entre ellas: antimicrobianas, inmunomoduladoras antioxidantes y funcionar como hormonas.

Referencias

- Alfred, O. & Shaahu, A. (2020). An Overview on Understanding the Basic Concept of Fish Diseases in Aquaculture. *IRE Journals*, 4(6), 83-91.
- Cabello, F., Godfrey, H., Ivanova, L., Shah, S., Sørum, H. & Tomova, A. (2020). Freshwater salmon aquaculture in Chile and transferable antimicrobial resistance. *Environmental Microbiology*, 22(2), 559-563. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14891>
- FAO. (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229es>
- Flores-Kossack, C., Montero, R., Köllner, B. & Maisey, K. (2020). Chilean aquaculture and the new challenges: Pathogens, immune response, vaccination and fish diversification. *Fish and Shellfish Immunology*, 98, 52-67. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.093>
- Miranda, C., Godoy, F. & Lee, M. (2018). Current Status of the Use of Antibiotics and the Antimicrobial Resistance in the Chilean Salmon Farms. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01284>
- Pincinato, R., Asche, F., Bleie, H., Skrudland, A. & Stormoen, M. (2021). Factors influencing production loss in salmonid farming. *Aquaculture*, 532. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736034>
- Shah, S., Cabello, F., L'Abée-Lund, T., Tomova, A., Godfrey, H., Buschmann, A. & Sørum, H. (2014). Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environmental Microbiology*, 16(5), 1310-1320. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12421>



2. QUÍMICA DE PÉPTIDOS

Fanny Guzmán Quimbayo, Dra Sci. Química orgánica, Laboratorio de síntesis de péptidos, Núcleo de Biotecnología Curauma, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

Los péptidos son moléculas de alta importancia en diferentes campos de salud, alimentación y cosmética, y suponen además una herramienta útil para el estudio de diferentes enfermedades. Actualmente se encuentran disponibles varias tecnologías para su producción, entre las que destacan la síntesis química y enzimática, y mediante ADN recombinante. En este capítulo se mostrarán las bases de las diferentes metodologías usadas en la síntesis química de péptidos, así como sus ventajas y desventajas frente a otras tecnologías, destacando la síntesis química como la técnica más madura.

2.1. ¿Qué es un péptido?

Los péptidos son heteropolímeros compuestos por residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo α -amino del siguiente. La longitud puede ser desde 2 hasta 100 residuos, aunque arbitrariamente se consideran péptidos hasta una masa molecular de 6000 Dalton. Por ejemplo, la hormona insulina es un péptido de 51 residuos de aminoácidos y 5773 Da, de gran importancia en el área de la salud. En la tecnología de alimentos, tenemos como ejemplo el edulcorante aspartamo, el cual es un dipéptido de ácido aspártico y fenilalanina esterificada. En cosmética, se pueden citar varios ejemplos como el Argireline (acetil hexapéptido-8) y el matrixyl (Zhang & Falla, 2009).

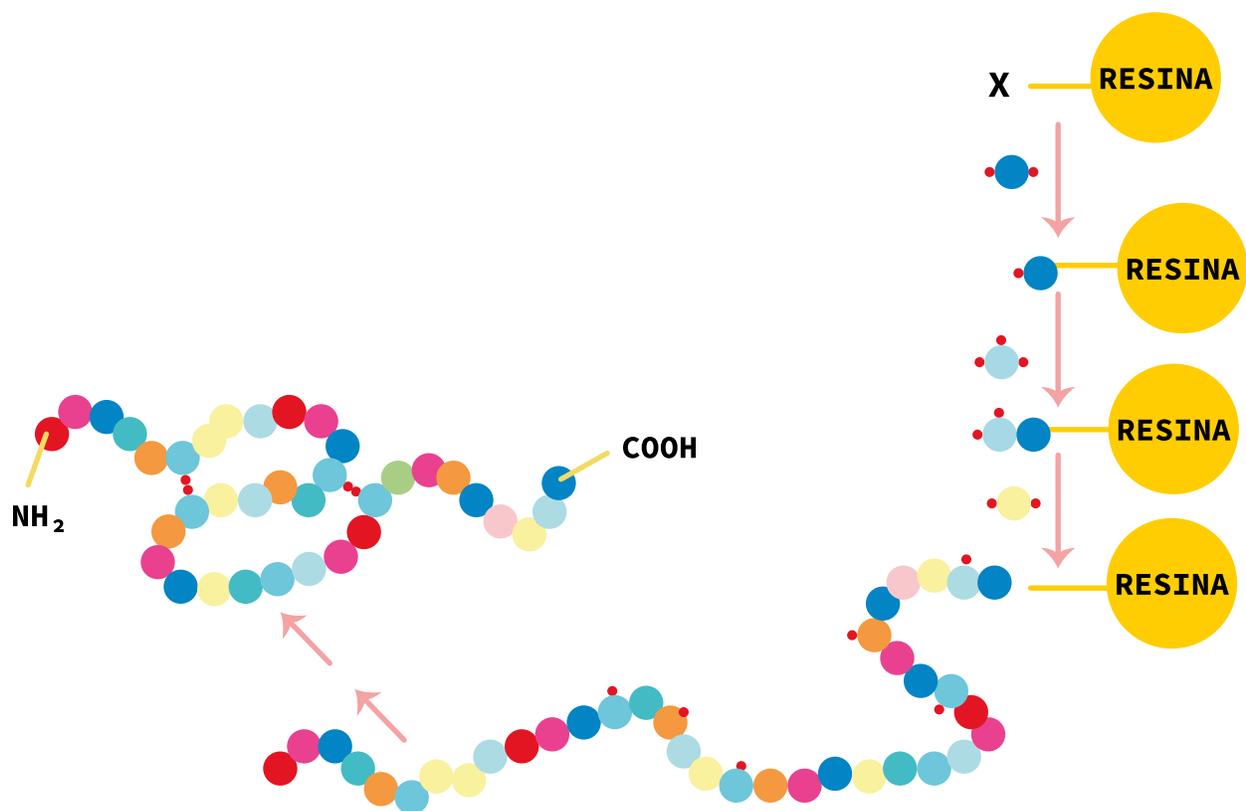
Existen diferentes tecnologías para producir péptidos y proteínas, como la extracción de fuentes naturales (Guzmán *et al.*, 2019; Intiquilla *et al.*, 2019; Nuñez *et al.*, 2020), la producción por tecnología de ADN recombinante (Klint *et al.*, 2013; Zompra *et al.*, 2009), la producción en

sistemas de expresión libres de células (Murray & Baliga, 2013), la producción en animales transgénicos (Wright *et al.*, 1991) y plantas (Cunningham & Porter, 1997) y, finalmente, la producción por síntesis química (Du Vigneaud *et al.*, 1953; Guzmán *et al.*, 2021; Merrifield, 1963) y por tecnología enzimática.

El tamaño de la molécula determina la tecnología más apta para su producción. La tecnología de ADN recombinante es particularmente adecuada para la síntesis de péptidos de gran tamaño y proteínas (Khan *et al.*, 2016; Walsh, 2005). La síntesis química es una tecnología viable para la producción de péptidos pequeños y medianos, que van de 5 a 80 residuos, aproximadamente (Kimmerlin & Seebach, 2005). Por otro lado, la síntesis enzimática está más restringida y se ha aplicado preferentemente para péptidos muy pequeños, entre 2 y 10 residuos aminoacídicos (Kumar & Bhalla, 2005).

2.2. Síntesis química de péptidos

La síntesis de péptidos se realizó originalmente en solución. Sin embargo, desde la introducción de la síntesis en fase sólida por Merrifield, esta tecnología ha adquirido más relevancia y madurez a lo largo de los años (Behrendt *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2020; Luna *et al.*, 2016). La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) consiste en el alargamiento de una cadena peptídica anclada a una matriz sólida, por la adición sucesiva de aminoácidos unidos por formación de enlaces amida (enlace peptídico) entre el grupo carboxilo del aminoácido entrante y el grupo amino del aminoácido previamente unido a la matriz, hasta que el péptido de la secuencia deseada ha sido sintetizado (Guzmán *et al.*, 2021) (figura 1). Este sistema tiene una



serie de ventajas sobre el sistema clásico en solución: la reacción se puede automatizar y se elimina el problema de la solubilización del péptido, ya que este permanece adherido a la matriz.

En las estrategias de SPPS (Fmoc o t-Boc), la naturaleza del soporte sólido, los reactivos de acoplamiento y el procedimiento de escisión del péptido de la matriz sólida son las variables más relevantes. Un esquema general de la SPPS por la metodología Fmoc se presenta paso a paso en la figura 2. El primer paso es el acoplamiento del aminoácido C-terminal a la matriz sólida, seguido de la eliminación del grupo protector Na (A) mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) en el caso de la estrategia t-Boc, y con piperidina/4-methyl piperidina/o piperazina en la estrategia Fmoc (Guzmán *et al.*, 2020; Luna *et al.*, 2016). El siguiente aminoácido de la secuencia a sintetizar (Na protegido) es acoplado al péptido cuya cadena se encuentra unida a la matriz polimérica y, una vez acoplado, el grupo amino Na es desprotegido. Este ciclo de acoplamiento-desprotección se repite hasta que la secuencia de aminoácidos deseada haya sido sintetizada. Finalmente, el complejo péptido-matriz es escindido para producir el péptido en su forma libre, un procedimiento que se lleva a cabo por la adición de ácido fluorhídrico (HF) en el caso de la metodología t-Boc, y con ácido trifluoroacético (TFA) en la metodología Fmoc.

Figura 1: Alargamiento de la cadena peptídica anclada a una matriz sólida, por la adición sucesiva de aminoácidos. Fuente: elaboración propia en base a Merrifield (1985).

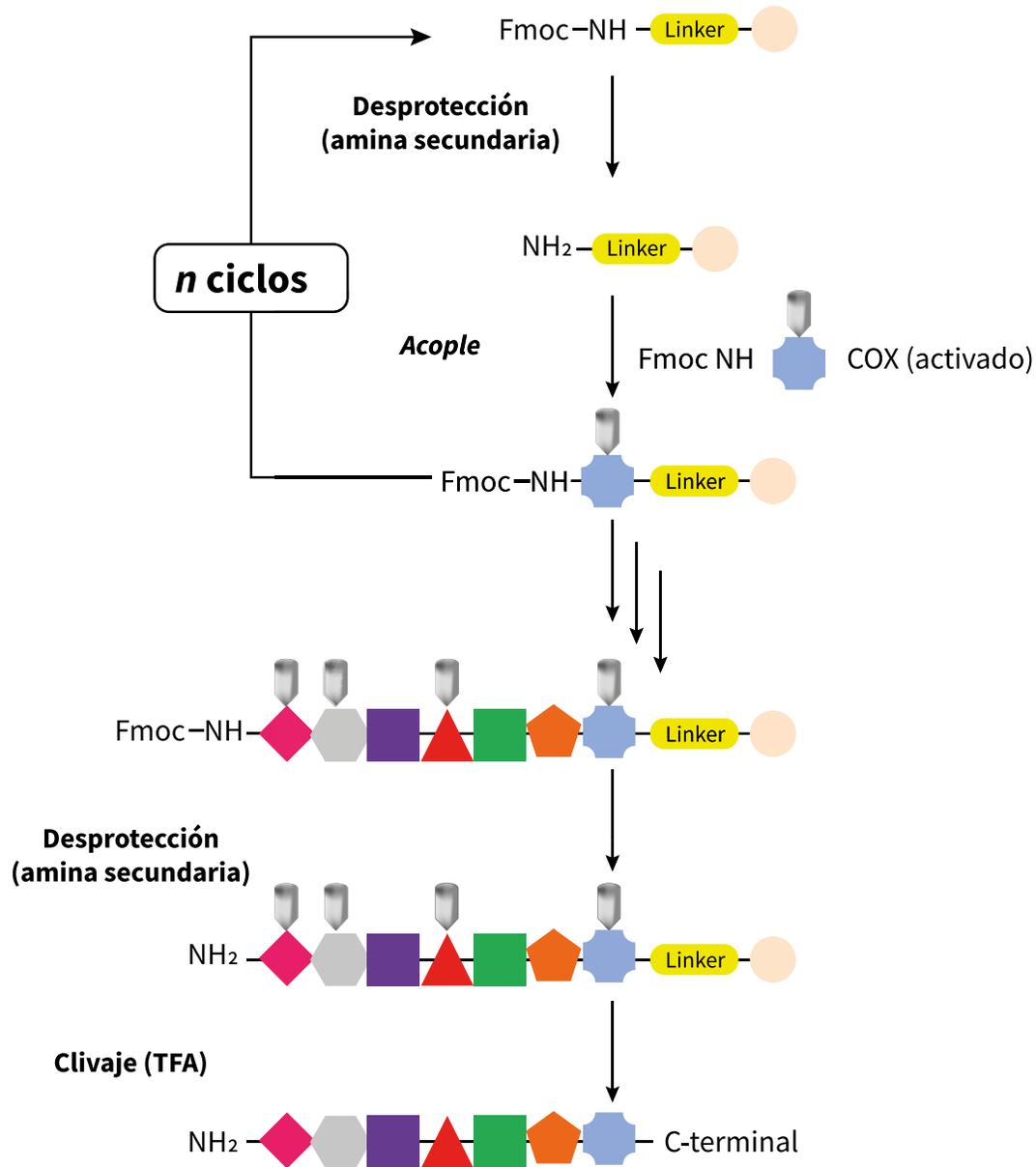


Figura 2: Esquema general de SPPS por la metodología Fmoc. Fuente: elaboración propia.

- Estrategias de protección: en SPPS existen dos esquemas principales de protección, que se conocen como estrategias t-Boc/Bzl y Fmoc/tBu (Chan & White, 2000; Jaradat, 2018). En la estrategia t-Boc/Bzl, el grupo t-Boc (ter-butoxicarbonilo) se utiliza para la protección de la función amino Na y un bencilo o ciclohexilo para la protección de la cadena lateral de varios aminoácidos. Por otro lado, en la estrategia Fmoc/tBu, el grupo Fmoc (9- fluorenil metoxicarbonilo) se utiliza para la protección la función amino Na y el grupo ter-butilo para la protección de la cadena lateral de varios aminoácidos (Albericio, 2000).
- Soportes sólidos: los soportes sólidos deben cumplir varios requisitos: las partículas deben tener un tamaño uniforme, ser mecánicamente robustos, fácilmente filtrables, químicamente inertes y estables en las condiciones de síntesis, a la vez de ser altamente accesibles a los disolventes, permitiendo la penetración de los reactivos y el alargamiento de la cadena peptídica dentro de su microestructura. Actualmente se encuentran disponibles varios soportes poliméricos que pueden derivatizarse con grupos funcionales para producir un enlace altamente estable con el péptido que se sintetiza (Barlos *et al.*, 1991). Algunos ejemplos son las resinas funcionalizadas con p-metoxibenzhidrilamina (MBHA), 4 hidroximetilfenilacetamidometilo (PAM) e hidroximetilo, típicamente utilizadas en la estrategia t-Boc/Bzl; y las resinas 4-(2',4'- dimetoxifenilaminometil)-fenoximetilpoliestireno (Rink), cloruro de 2-clorotritilo y resinas funcionalizadas con difenildiazometano utilizadas en la estrategia Fmoc/tBu.
- Reactivos de acoplamiento: varios reactivos que activan los grupos carboxilo de los aminoácidos se emplean para la reacción de acoplamiento. Los más utilizados en la actualidad son las sales de uronio (HBTU, HCTU, HATU y TBTU) y de fosfonio (Bop y PyBop) en combinación con Oxima Pure® y una base apropiada como la diisopropil-etilamina (DIEA), debido a la alta reactividad, alto rendimiento de acoplamiento y mayor especificidad que la obtenida en sistemas convencionales (Subirós-Funosas *et al.*, 2009), tales como la adición de dicitclohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC) y los anhídridos simétricos (Miranda y Alewood, 1999). Sales caotrópicas (CuLi, NaClO₄, KSCN) y mezclas de disolventes, como N,N'-dimetilformamida, trifluoroetanol, dimetilacetamida y N-metilpirrolidona, se han utilizado para mejorar la eficiencia del acoplamiento y el alargamiento de la cadena peptídica en secuencias difíciles.
- Escisión del soporte sólido: una vez que finaliza la síntesis del péptido con la secuencia deseada, debe llevarse a cabo la eliminación de la protección de las cadenas laterales y liberación del péptido desde el soporte. En la estrategia t-Boc/Bzl, esta desprotección final se realiza con ácidos fuertes que pueden conducir a reacciones secundarias no deseadas de alquilación o acilación en ciertos aminoácidos, reacciones que son promovidas por la salida de los grupos protectores. Para evitar tales reacciones, durante varias décadas se han empleado combinaciones de disolventes que actúan como nucleófilos y ácidos. Diferente es el caso de la estrategia Fmoc/tBu, en la que se emplean soluciones más simples, como TFA en combinación con grupos atrapadores de cationes como triisopropilsilano (TIS) y H₂O.

Tal como se puede constatar, la síntesis de péptidos en fase sólida es una técnica altamente estandarizada, establecida y madura, lo que ha llevado a que sea cada vez más empleada tanto en investigación científica como en la industria farmacéutica, biomédica, alimentaria y cosmética, entre otras.

Referencias

- Albericio, F. (2000). Orthogonal protecting groups for Na⁻amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase synthesis. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 55(2), 123-139.
- Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D. & Stavropoulos, G. (1991). 2-Chlorotrityl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 37(6), 513-520.
- Behrendt, R., White, P. & Offer, J. (2016). Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*, 22(1), 4-27. DOI: 10.1002/psc.2836
- Chan, W. & White, P. (2000). *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press.
- Cunningham, C. & Porter, A. (1997). *Methods in Biotechnology. Vol. 3: Recombinant proteins from plants – production and isolation of clinically useful compounds*. Humana Press.
- Du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, C., Roberts, C., Katsoyannis, P. & Gordon, S. (1953). The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *Journal of the American Chemical Society*, 75(19), 4879-4880. <https://doi.org/10.1021/ja01115a553>
- 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*, 52(8), 1201-1205. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02883-8>
- Guzmán, F., Gauna, A., Román, T., Luna, O., Álvarez, C., Pareja-Barrueto, C., Mercado, L., Albericio, F. & Cárdenas, C. (2021). Tea Bags for Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: An Example of Circular Economy. *Molecules*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26165035>
- Guzmán, F., Wong, G., Román, T., Cárdenas, C., Álvarez, C., Schmitt, P., Albericio, F. & Rojas, V. (2019). Identification of Antimicrobial Peptides from the Microalgae *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher and Bactericidal Activity Improvement. *Mar Drugs*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/md17080453>
- Intiquilla, A., Jiménez-Aliaga, K., Guzmán, F., Álvarez, C., Zavaleta, A., Izaguirre, V. & Hernández-Ledesma, B. (2019). Novel antioxidant peptides obtained by alcalase hydrolysis of *Erythrina edulis* (pajuro) protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2420-2427. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9449>
- Jaradat, D. (2018). Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. *Amino Acids*, 50(1), 39-68. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2516-0>
- Khan, S., Ullah, M., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M. & Hou, H. (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>
- Kimmerlin, T. & Seebach, D. (2005). "100 years of peptide synthesis": ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to b-peptide assemblies. *Journal of Peptide Research*, 65(2), 229-260. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2005.00214.x>
- Klint, J., Senff, S., Saez, N., Seshadri, R., Lau, H., Bende, N., Undheim, E., Rash, L., Mobli, M. & King, G. (2013). Production of recombinant disulfide-rich venom peptides for structural and functional analysis via expression in the periplasm of *E. coli*. *PLoS One*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063865>
- Kumar, A., Alhassan, M., Lopez, J., Albericio, F. & de la Torre, B. (2020). N-Butylpyrrolidinone for Solid-Phase Peptide Synthesis is Environmentally Friendlier and Synthetically Better than DMF. *ChemSusChem*, 13(19), 5288-5294. <https://doi.org/10.1002/cssc.202001647>
- Kumar, D. & Bhalla, T. (2005). Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 726-736. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0094-7>
- Luna, O., Gomez, J., Cárdenas, C., Albericio, F., Marshall, S. & Guzmán, F. (2016). Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? *Molecules*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/molecules21111542>
- Merrifield, B. (1985). Solid phase synthesis (Nobel lecture). *Bioscience Reports*, 5(5), 353-376. <https://doi.org/10.1007/BF01116553>
- Merrifield, 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>
- Miranda, L. & Alewood, P. (1999). Accelerated chemical synthesis of peptides and small proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1181-1186. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1181>
- Murray, C. & Baliga, R. (2013). Cell-free translation of peptides and proteins: from high throughput screening to clinical production. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(3), 420-426. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.014>
- Nuñez, S., Cárdenas, C., Pinto, M., Valencia, P., Cataldo, P., Guzmán, F. & Almonacid, S. (2020). Bovine skin gelatin hydrolysates as potential substitutes for polyphosphates: The role of degree of hydrolysis and pH on water-holding capacity. *Journal of Food Science*, 85(7), 1988-1996. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15299>
- Subirós-Funosas, R., Prohens, R., Barbas, R., El-Faham, A. & Albericio, F. (2009). Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chemistry*, 15(37), 9394-9403. <https://doi.org/10.1002/chem.200900614>
- Walsh, G. (2005). Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2), 151-159. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1809-x>
- Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmut, I., Garner, I. & Colman, A. (1991). High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Nature Biotechnology*, 9, 830-834. <https://doi.org/10.1038/nbt0991-830>
- Zhang, L. & Falla, T. (2009). *Cosmeceuticals and peptides*. *Clinics in Dermatology*, 27(5), 485-494. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.05.013>
- Zompra, A., Galanis, A., Werbitzky, O. & Albericio, F. (2009). Manufacturing peptides as active pharmaceutical ingredients. *Future Medicinal Chemistry*, 1(2), 361-377. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.23>



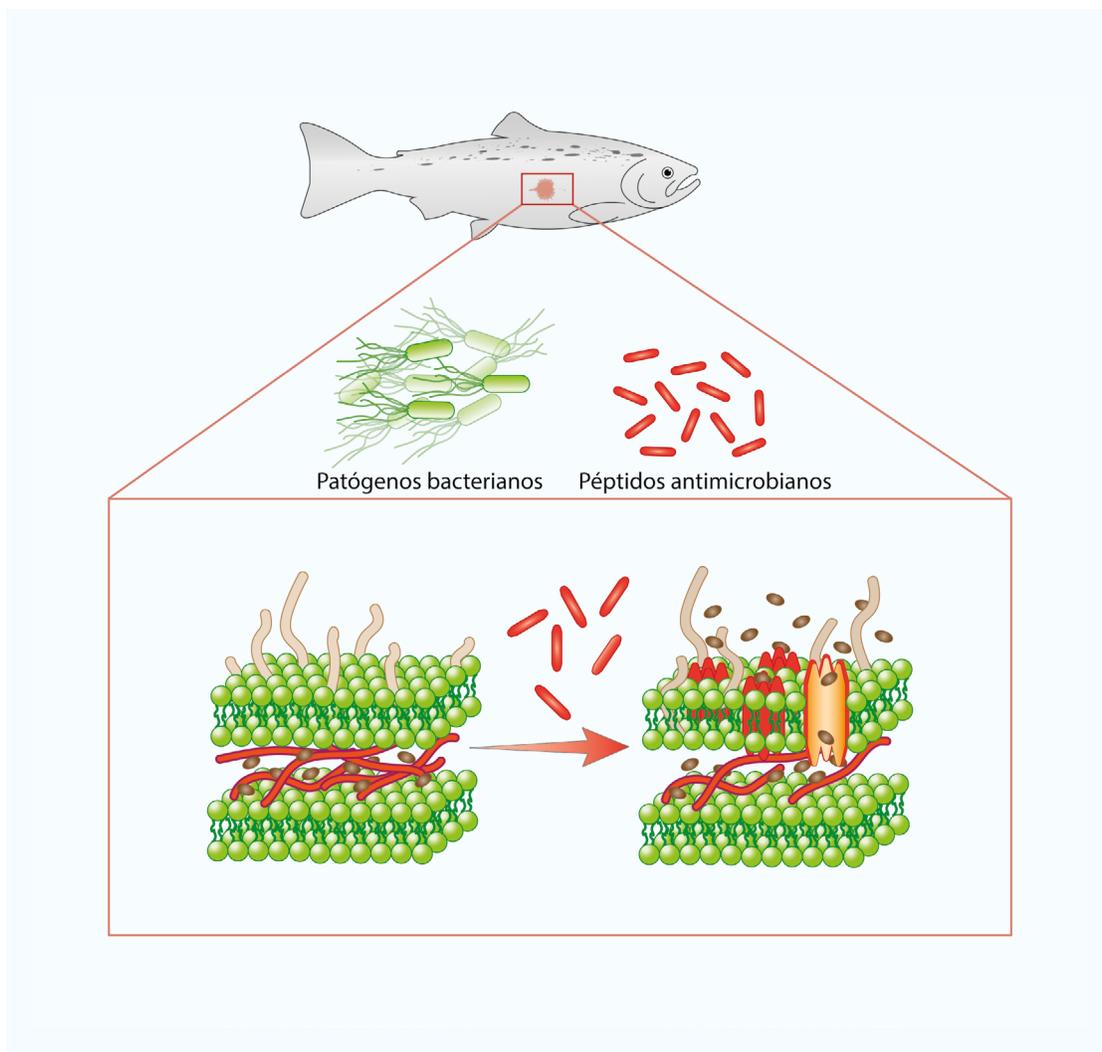
3. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Paula Santana Sepúlveda, doctora en Biotecnología, Instituto de Ciencias Químicas Aplicadas, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile.

Los péptidos antimicrobianos (PAMs), actualmente llamados péptidos de defensa del huésped (PDHs) ya que también funcionan como inmunomoduladores, se consideran moléculas efectoras claves en la inmunidad contra microorganismos patógenos. Son péptidos cortos, usualmente menores de 10 kDa, y algunos son codificados en el genoma, a diferencia de otros antimicrobianos que se generan por acción enzimática o resultan de metabolitos secundarios (Shabir *et al.*, 2018; Valero *et al.*, 2020). En su mayoría, son moléculas catiónicas, debido a su alto contenido de lisina y arginina, además de poseer una proporción de alrededor del 50% de aminoácidos hidrofóbicos. Adoptan estructuras anfipáticas, lo que les confiere propiedades para interactuar con las membranas celulares y pueden formar estructuras del tipo α hélice u hoja β (Valero *et al.*, 2020). Están altamente conservados en la naturaleza y son producidos por todos los animales complejos, insectos y plantas.

La expresión de PAMs en muchos peces es constitutiva en tejidos como el riñón, la piel, las branquias y el intestino. A nivel celular, los neutrófilos, los monocitos, los macrófagos y las células B son importantes productores de PAMs (Rieger & Barreda, 2011; Shabir *et al.*, 2018). Entre otras características que podemos destacar de los PAMs, tenemos que sintetizan hasta cien veces más rápido que una inmunoglobulina, pueden almacenarse en forma de gránulos dentro de los fagocitos en altas concentraciones, estar disponibles para actuar rápidamente y liberarse cuando las células son estimuladas al entrar en contacto con patógenos o patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs) (Guaní-Guerra *et al.*, 2010).

Los PAMs exhiben actividades de amplio espectro *in vitro* e *in vivo* frente a bacterias, hongos, virus y otros patógenos (Chaturvedi *et al.*, 2020; Mookherjee *et al.*, 2020). Asimismo, presentan múltiples mecanismos de acción tanto extra como intracelulares; entre ellos tenemos la interacción con la membrana celular (figura 3), la inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, y la producción de peróxido de hidrógeno (Li *et al.*, 2021; Valero *et al.*, 2020; Yi *et al.*, 2016).



En peces teleósteos se han identificado unas diecinueve familias de péptidos con actividades antimicrobianas y/o funciones inmunomoduladoras, pertenecientes principalmente a las familias de las piscidinas, defensinas, catelicidinas y hepcidinas (tabla 1). En 2018, nuestro grupo de investigación identificó y caracterizó por primera vez péptidos derivados de la interleucina 8 (IL-8) en salmónidos con potencial de actividad antimicrobiana (Santana *et al.*, 2018), gracias a los antecedentes descritos por Yount y Yeaman en 2004 (Yount *et al.*, 2007; Yount & Yeaman, 2004). Dicho hallazgo ha hecho atractivo el estudio de esta quimioquina, ya que no solo tiene una función quimiotáctica de las células inmunitarias, sino que también una actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram negativas como *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* (Sáenz-Martínez *et al.*, 2021), entre otras.

Figura 3: Péptidos antimicrobianos derivados de peces, que muestran un mecanismo de acción extracelular frente a bacterias. Fuente: gentileza de Salmokine (www.salmokine.com) por Jorn Bethke.

Tabla 1: Principales familias de péptidos antimicrobianos encontrados en salmónidos. Fuente: modificado de *Biological role fish antimicrobial peptides*. Tabla modificada en base a Valero *et al.* (2020).

Clase	Familia	Especie de pez	Actividades
Péptidos lineales α -hélice	Piscidinas	<i>Oplegnathus fasciatus</i> (Rock bream), <i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod), <i>Morone chrysops</i> <i>Morone saxatilis</i> (Hybrid striped, bass), <i>Morone saxatilis</i> (Striped bass), <i>Chionodraco hamatus</i> (Icefish), <i>Siniperca chuatsi</i> (Mandarin fish), <i>Oreochromis niloticus</i> (Nile tilapia), <i>Epinephelus coioides</i> (Orange-spotted grouper), <i>Epinephelus malabaricus</i> (Greasy grouper).	Antibacteriana, antifúngica y causante de necrosis.
	Péptidos derivados de quimioquinas	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout), <i>Salmo salar</i> (Atlantic salmon), <i>Channa striatus</i> (Snakehead fish).	Antibacteriana.
Un puente disulfuro	Cathelicidinas	<i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod), <i>Plecoglossus altivelis</i> (Ayu), <i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod), <i>Salvelinus alpinus</i> (Arctic charr), <i>Salvelinus fontinalis</i> (Brook trout), <i>Salmo trutta</i> (Brown trout), <i>Thymallus thymallus</i> (Grayling), <i>Salmo salar</i> (Atlantic salmon), <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout), <i>Mysine glutinosa</i> (Atlantic hagfish).	Antibacteriana, antifúngico.
	Defensinas	<i>Oreochromis niloticus</i> (Nile tilapia), <i>Siniperca chuatsi</i> (Mandarin fish), <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout).	Antibacteriana, Antiviral, quimiotaxis, inmunomodulación.
Más de 3 puentes disulfuro	Hepcidinas	<i>Acatophagus argus</i> (Spotted scat), <i>Gobicypris rarus</i> (Rare minnow), <i>Sparus aurata</i> (Gilthead seabream), <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout), <i>Paralichthys adspersus</i> (Chilean flounder), <i>schizothorax richardsonii</i> (Snow trout), <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> (Mudskipper), <i>Trachidermus fasciatus</i> (Roughskin sculpin), <i>Pagrus major</i> (Red seabream), <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> (Yellow catfish), <i>Plecoglossus altivelis</i> (Ayu), <i>Salmo salar</i> (Atlantic salmon).	Antibacteriana frente a Gram positivas y negativas, antifúngica, antitumoral, antiviral, inmunomodulación, regulación de hierro.

3.1. Péptidos efectores derivados de la IL-8 en salmónidos

La interleucina 8 (IL-8) es una quimioquina perteneciente a la familia CXC, producida por diversos tipos de células, como macrófagos, neutrófilos y células epiteliales, entre otras (Rebl *et al.*, 2014). Además, la IL-8 atrae e induce la liberación de enzimas lisosomales, principalmente en los neutrófilos; desencadena brotes respiratorios, aumenta la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular y es un regulador clave de la respuesta inmunitaria que sirve de puente entre la inmunidad innata y la adaptativa (Alejo & Tafalla, 2011; Rebl *et al.*, 2014).

Los estudios sobre la IL-8 humana han demostrado que el extremo C-terminal de esta quimioquina comparte características fisicoquímicas y estructurales similares con el péptido parecido a la cecropina Hp(2-20) y los péptidos antimicrobianos de la catelicidina LL-37. Esto demuestra que el extremo C-terminal de la IL-8 presenta actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Streptococcus pyogenes* (Björstad *et al.*, 2005; Yount *et al.* 2007). Además, mediante un análisis bioinformático, se determinó que existe una identidad estructural compartida entre los PAMs estabilizados por puentes disulfuro y las quimiocinas. Se identificó también la presencia de una firma estructural común denominada γ -core (figura 4A), que podría ser una herramienta molecular útil para predecir péptidos y moléculas efectoras de la respuesta inmune con potencial actividad antimicrobiana. Este motivo puede constituir todo el péptido o puede estar asociado a un dominio β (extremo N-terminal), a un dominio α -hélice (extremo C-terminal) o estar interpuesto entre ambos dominios, como es el caso de la IL-8 (figura 4A) (Sáenz-Martínez *et al.*, 2021; Yeaman & Yount, 2007; Yount & Yeaman, 2004). Las evidencias

sobre quimioquinas con actividad antimicrobiana directa han permitido clasificarlas como kinocidinas (kino: quimiocinas; cidin: microbicida) por su capacidad antimicrobiana en contextos biológicos específicos (Sáenz-Martínez *et al.*, 2021; Yount *et al.*, 2007).

En el caso de los peces teleósteos, solo se ha realizado un estudio para evaluar la actividad antimicrobiana de la IL-8. En el pez cabeza de serpiente Murrel (*Channa striatus*), se evaluó la actividad antimicrobiana del extremo C-terminal de la IL-8, utilizando un péptido sintético denominado WS12, que mostró actividad frente a *E. coli* y *Bacillus cereus* (Sathyamoorthi *et al.*, 2017). Sobre la base de estos antecedentes analizamos las secuencias de IL-8 de salmón y trucha, en las que, a través del análisis bioinformático, demostramos que hay una región de 17 residuos en el extremo C-terminal, que tiene una estructura secundaria de α -hélice (figura B), en que reside su actividad antimicrobiana, tal como se observa en la figura 4C frente a *Aeromonas salmonicida*. (Sáenz-Martínez *et al.*, 2021; Santana *et al.* 2018). Estos péptidos derivados del extremo C-terminal de la IL-8 de *O. mykiss* y *S. salar* se denominaron omIL-8a y sslL-8a, respectivamente.

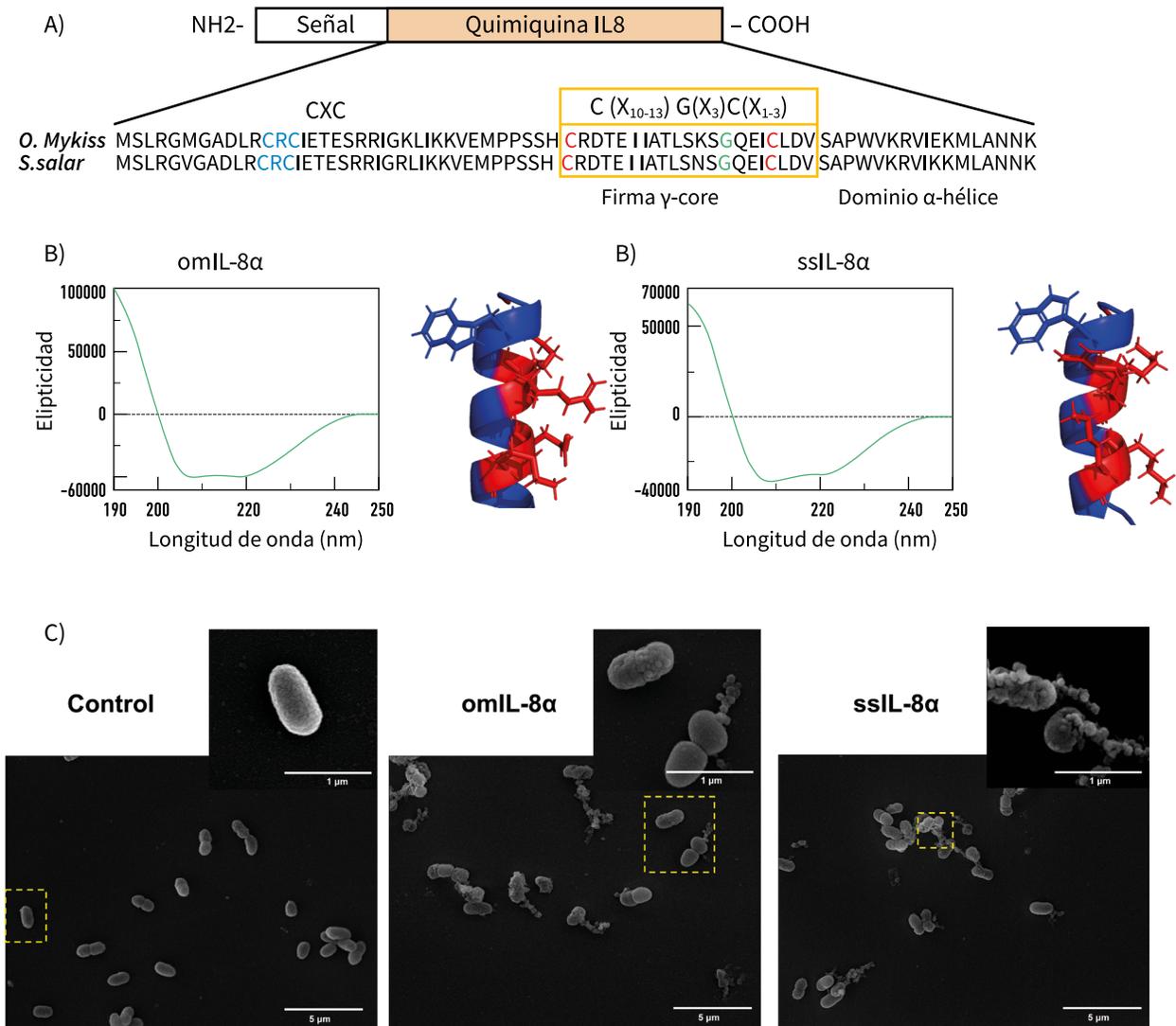


Figura 4: Secuencias, estructuras y mecanismo de acción de los péptidos derivados de la IL-8 de los salmonídeos. A) Alineación de secuencias de IL-8 de trucha y salmón, que muestra un alto nivel de conservación de aminoácidos en el motivo γ -core (cuadrado amarillo) y el dominio α -helicoidal. La estructura secundaria de estos péptidos se evaluó a través de dicroísmo circular (CD), que se muestra en B) para el péptido de trucha, omIL-8 α y C) para el péptido de salmón, ssIL-8 α . La estructura 3D de omIL-8 α y ssIL-8 α se muestra junto a cada CD. D) Micrografías SEM sin péptido (control, izquierda) tratadas con omIL-8 α (centro) y ssIL-8 α (derecha), que muestran la localización e integridad de la membrana de *A. salmonicida*. El marco segmentado indica un zoom de bacterias representativas. Fuente: A), B) y C) elaboración propia publicada en Santana *et al.*, 2018; D) elaboración propia inédita.

3.2. Péptidos derivados de IL-8 de salmónidos con potencial aplicación en la industria del salmón

Los péptidos antimicrobianos poseen un gran potencial para ser aplicados en forma sinérgica como antibióticos naturales, como adyuvantes en vacunas, en el desarrollo de vacunas inactivadas, entre otros. Lo anterior, dado que no solo eliminan microorganismos patógenos, sino que también se inducen en respuesta PMAPs, además de cumplir funciones fisiológicas en la inflamación, angiogénesis y curación de heridas, y de poseer funciones inmunomoduladoras (Lazzaro *et al.*, 2020; Valero *et al.*, 2020). Las quimioquinas participan en la comunicación celular dentro de un contexto inmunológico y son inducibles ante la presencia de PMAPs, al igual que los péptidos antimicrobianos, por lo que pueden ser utilizados como biomarcadores de susceptibilidad y resistencia a enfermedades (Abdelkhalek *et al.*, 2009; Alejo & Tafalla, 2011).

Finalmente, la actividad antimicrobiana de los péptidos requiere ser evaluada en contextos biológicos específicos, como en matrices de sangre, dado que pueden contener componentes que potencian la actividad antimicrobiana de péptidos contra patógenos blanco o pueden tener acción sinérgica con otros péptidos antimicrobianos, resultando en la amplificación de la muerte del patógeno (Lazzaro *et al.*, 2020; Yount *et al.*, 2011). El comprender la función de los péptidos en su contexto biológico es relevante para poder aplicar estas moléculas en la salmonicultura, lo cual aún requiere ser investigado.

Referencias

- Albericio, F. (2000). Orthogonal protecting groups for Na⁺-amino and Abdelkhalik, N., Komiya, A., Kato-Unoki, Y., Somamoto, T. & Nakao, M. (2009). Molecular evidence for the existence of two distinct IL-8 lineages of teleost CXC-chemokines. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(6), 763-767. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.004>
- Alejo, A. & Tafalla, C. (2011). Chemokines in teleost fish species. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1215-1222. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.011>
- Björstad, Å., Fu, H., Karlsson, A., Dahlgren, C. & Bylund, J. (2005). Interleukin-8-derived peptide has antibacterial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3889-3895. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3889-3895.2005>
- Chaturvedi, P., Bhat, R. & 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>
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. & Terán, L. M. (2010). Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology*, 135(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2009.12.004>
- Lazzaro, B., Zasloff, M. & Rolff, J. (2020). Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science*, 368. <https://doi.org/10.1126/science.aau5480>
- Li, S., Wang, Y., Xue, Z., Jia, Y., Li, R., He, C. & Chen, H. (2021). The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 103-115. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.01.005>
- Mookherjee, N., Anderson, M., Haagsman, H. & Davidson, D. (2020). Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(5), 311-332. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8>
- Rebl, A., Rebl, H., Korytář, T., Goldammer, T. & Seyfert, H. (2014). The proximal promoter of a novel interleukin-8-encoding gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is strongly induced by CEBPA, but not NF-κB p65. *Developmental and Comparative Immunology*, 46(2), 155-164. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.024>
- Rieger, A. & Barreda, D. (2011). Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1238-1245. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2011.03.009>
- Sáenz-Martínez, D., Santana, P., Aróstica, M., Forero, J., Guzmán, F. & Mercado, L. (2021). Immunodetection of rainbow trout IL-8 cleaved-peptide: Tissue bioavailability and potential antibacterial activity in a bacterial infection context. *Developmental & Comparative Immunology*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104182>
- Santana, P., Salinas, N., Álvarez, C., Mercado, L. & Guzmán, F. (2018). Alpha-helical domain from IL-8 of salmonids: Mechanism of action and identification of a novel antimicrobial function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(4), 803-809. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.061>
- Sathyamoorthi, A., Bhatt, P., Ravichandran, G., Kumaresan, V., Arasu, M., Al-Dhabi, N. & Arockiaraj, J. (2017). Gene expression and in silico analysis of snakehead murrel interleukin 8 and antimicrobial activity of C-terminal derived peptide WS12. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 190, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.06.008>
- Shabir, U., Ali, S., Magray, A., Ganai, B., Firdous, P., Hassan, T. & Nazir, R. (2018). Fish antimicrobial peptides (AMP's) as essential and promising molecular therapeutic agents: A review. *Microbial Pathogenesis*, 114, 50-56. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2017.11.039>
- Valero, Y., Saraiva-Fraga, M., Costas, B. & Guardiola, F. (2020). Antimicrobial peptides from fish: beyond the fight against pathogens. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 224-253. <https://doi.org/10.1111/raq.12314>
- Yeaman, M. & Yount, N. (2007). Unifying themes in host defence effector polypeptides. *Nature Reviews Microbiology*, 5(9), 727-740. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1744>
- Yi, L., Dang, J., Zhang, L., Wu, Y., Liu, B. & Lü, X. (2016). Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. *Food Control*, 67, 53-62. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.02.008>
- Yount, N., Cohen, S., Kupferwasser, D., Waring, A., Ruchala, P., Sharma, S., Wasserman, K., Jung, C. & Yeaman, M. (2011). Context mediates antimicrobial efficacy of kinocidin congener peptide RP-1. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026727>
- Yount, N., Waring, A., Gank, K., Welch, W., Kupferwasser, D. & Yeaman, M. (2007). Structural correlates of antimicrobial efficacy in IL-8 and related human kinocidins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(3), 598-608. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.011>
- Yount, N. & Yeaman, M. (2004). Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), 7363-7368. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401567101>



4. FUNCIÓN INMUNOLÓGICA DE PÉPTIDOS EN PECES

Luis Mercado Vianco, doctor en Bioquímica y Biología Molecular, Laboratorio de genética e inmunología molecular, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

En los últimos veinte años se ha descubierto que diferentes moléculas inicialmente caracterizadas como AMPs, poseen además importantes funciones inmunomoduladoras, lo que ha derivado en llamarlas péptidos de defensa del huésped o HDPs, por su sigla en inglés (*host defence peptides*) (Hancock *et al.*, 2016). En vertebrados superiores, se ha descrito la capacidad de los HDPs para unirse a receptores de superficie celular, purinérgicos y de quimioquinas, o atravesar la membrana plasmática y unirse a receptores citosólicos. La puesta en marcha de vías de señalización logra activar diferentes reguladores transcripcionales, los cuales se trasladan al núcleo celular y permiten la expresión de genes asociados al reclutamiento de células inmunes, la regulación de la inflamación, la estimulación de la presentación de antígenos o la cicatrización, entre otros procesos inmunológicos (Martell *et al.*, 2021).

Revisando la diversidad de efectos que producen los HDPs como inmunomoduladores se descubrió que pueden actuar como proinflamatorios/prooxidantes, pero también como antiinflamatorios/antioxidantes, es decir, favorecen fenotipos celulares de inmunidad innata M1 o M2, y de inmunidad adaptativa tipo Th1 o Th2 (Yamaguchi *et al.*, 2015). En los últimos años se ha logrado demostrar que las respuestas inmunes equilibradas tipo 1 y tipo 2 logran una mayor eficacia en la defensa contra patógenos. Respuestas inmunes polarizadas de tipo 1 pueden producir inflamación y un ambiente prooxidativo que es dañino para el organismo. Por el contrario, respuestas de tipo 2, como la activación de macrófagos M2, favorecen un ambiente antioxidante, reparador tisular y de cicatrización.

Existen pocos estudios respecto de la función de HDPs en vertebrados inferiores y particularmente en peces. No obstante, sí se conoce una cantidad importante de péptidos antimicrobianos en peces y particularmente en teleósteos, destacando entre estos a catelicidinas, hepcidina, piscidinas y beta-defensinas (Masso-Silva & Diamond, 2014; Ma *et al.*, 2020). Katzenback (2015) describe en un interesante artículo diversos AMPs como mediadores de la inmunidad innata en teleósteos. Se describe la función de algunas beta-defensinas como reguladores proinflamatorios, induciendo el incremento de IL-1 β y TNF- α , y también su capacidad inductora de interferón de tipo I, en líneas celulares de trucha arcoíris.

Miembros de la familia de las piscidinas, por su parte, son capaces de inducir la expresión de moléculas como IIL-1 β y cox-1 en la línea celular monocito/macrófago RTS11 de trucha arcoíris, mientras que en peces cebra tratados con epinecidina-1 induce la expresión de citoquinas como IL-10 e IL-15; la primera de ellas es antiinflamatoria y la segunda está asociada a la inmunidad de tipo Th2, menos caracterizada en peces. Es interesante que la modulación en la expresión de genes asociados a la respuesta inmune evaluada en el pez es más completa que cuando se estudia en línea celulares. Existen muy pocos estudios que comparen esto; uno interesante es la modulación de la inmunidad intestinal por el betaglucano zimosán de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual induce la expresión de catelicidinas, y estas regulan los niveles de IL-1 β , lo que fue demostrado tanto *in vitro* en la línea celular RT-gut como *in vivo* con peces trucha arcoíris alimentados con suplemento de betaglucano (Schmitt *et al.*,

2015). Desconocemos el rol que ejerce IL-1 β a nivel intestinal y su relación con la microbiota del pez, pero sí sabemos que esta citoquina se almacena en células Goblet, lo que nos indica su relación con el desarrollo armónico de la mucosa intestinal, favorecido por el uso del inmunoestimulante en la dieta.

Otros estudios realizados por nuestro grupo con hepcidina han logrado demostrar tanto su capacidad antibacteriana como inmunomoduladora. La hepcidina de trucha arcoíris inhibe el crecimiento de *P. salmonis*, pero además es capaz de ingresar al interior del patógeno (Álvarez *et al.*, 2014). Esta misma habilidad podría ayudar a sus funciones como HDP, donde hemos podido demostrar su capacidad para disminuir la mortalidad en lubinas desafiadas con *V. anguillarum*. Cuando estos peces fueron tratados con hepcidina sintética vía intraperitoneal, el HDP fue capaz de distribuirse, alcanzando los principales órganos inmunes centrales del pez, como riñón anterior y bazo (Álvarez *et al.*, 2016). Es interesante que la hepcidina indujo la expresión de genes proinflamatorios y antiinflamatorios, tanto en el bazo como en el riñón ante-

rior de las lubinas. Puede entonces observarse que, *in vivo*, en respuesta a un HDP se produce un efecto en el incremento simultáneo de transcritos relacionados con moléculas de función antagónica, como lo son IL-1 β /TNF- α , respecto de IL-10. Esto favorece tanto el desarrollo de procesos de defensa vía macrófagos M1 como de cicatrización vía macrófagos M2.

Las funciones inmunológicas de los péptidos antimicrobianos en peces también podrían incluir efectos propios de los HDPs. Para poder demostrarlo es apropiado poseer datos que correspondan a aproximaciones *in vivo*. Recientemente, hemos realizado estudios en salmones del Atlántico, mantenidos en centros de cultivo en el mar. Cuando los peces están infectados con *P. salmonis* incrementan significativamente la expresión de HDPs en dos órganos inmunes centrales, el bazo y el riñón anterior (figura 5).

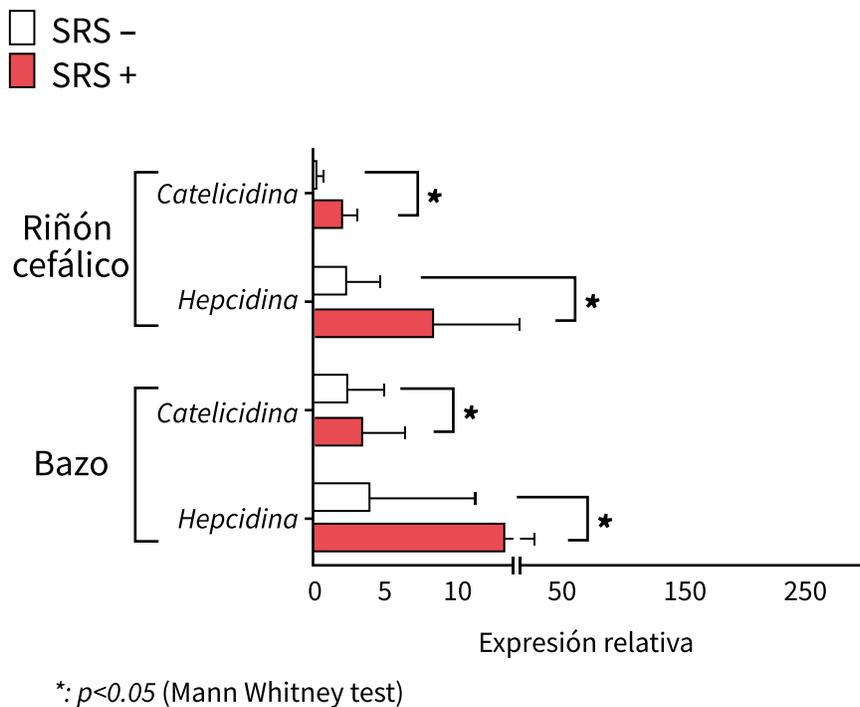


Figura 5: Salmones del Atlántico cultivados en mar diagnosticados con septicemia rickettsial salmonídea (SRS⁺) y peces no infectados (SRS⁻). SRS⁺ expresan niveles significativos de catelicidina y hepcidina en riñón anterior y bazo. Fuente: elaboración propia.

En ambos órganos la expresión tanto de hepcidina como de catelicidina es significativa en los peces SRS⁺, siendo muy probable que estas moléculas funcionen como HDPs, modulando la respuesta inmune contra el patógeno. Este tipo de muestras biológicas tomadas en campo poseen la ventaja de informar qué está sucediendo con los animales que, habiendo sido naturalmente infectados por un patógeno, están respondiendo inmunológicamente. Cuando revisamos la expresión de otros genes en los mismos órganos donde se están expresando estos HDPs, se puede intentar comprender qué está sucediendo a nivel de la modulación inmunológica. En los órganos donde la expresión de hepcidina y catelicidina es significativa, coincide con la expresión de moléculas asociadas a los fenotipos M1 y M2 de macrófagos (figura 6).

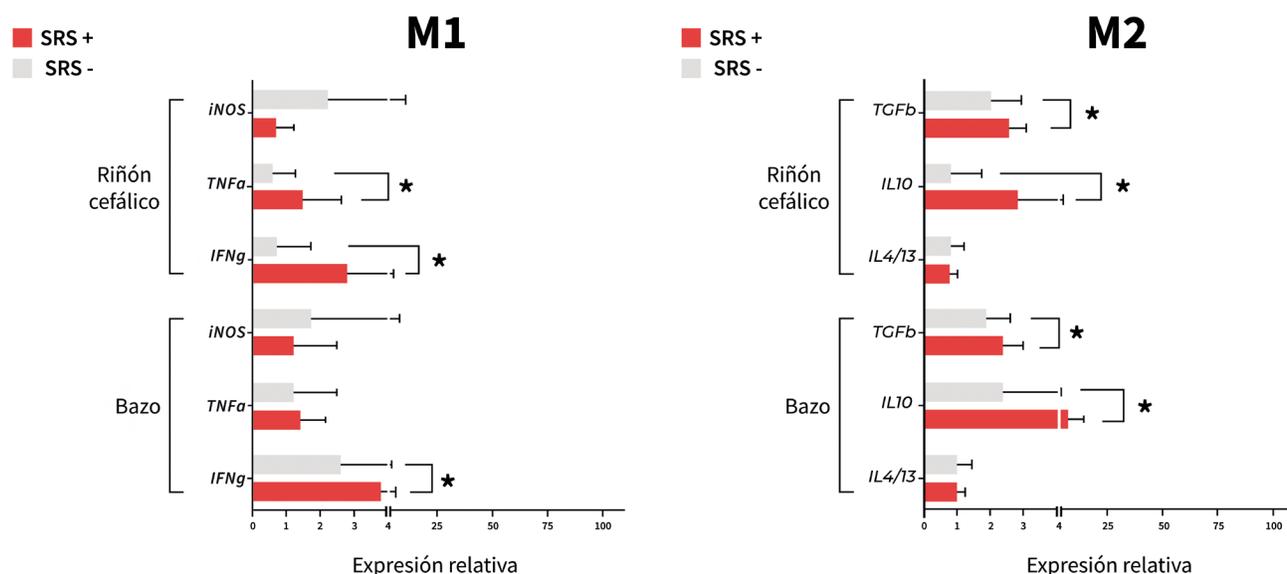


Figura 6: Perfil de expresión de genes asociados al fenotipo M1 y M2 de macrófagos en riñón anterior y bazo de salmones (*S. salar*) con septicemia rickettsial salmonídea (SRS⁺). Fuente: elaboración propia.

En el riñón anterior la expresión significativa de TNF- α e IFN- γ favorecerían un fenotipo M1, no obstante, no existe una expresión significativa de iNOS, lo que podría indicar que no se está favoreciendo la presencia de macrófagos proinflamatorios y destructivos. Mientras que en el mismo órgano también es significativa la expresión de TGF- β e IL-10, lo que podría favorecer un fenotipo M2; esto involucra un ambiente antioxidante y antiinflamatorio, probablemente cicatrizante en los peces SRS⁺. En el bazo la expresión significativa de IFN- γ , TGF- β e IL-10 podría indicar que se favorece un fenotipo de macrófagos M2. En ambos casos, tanto para el fenotipo M1 como M2, la expresión de genes asociados a estos coincide con la expresión de hepcidina y catelicidina, y por lo tanto no se puede demostrar causalidad, pero sí una correlación en la expresión de estas moléculas, las cuales podrían ser susceptibles al efecto de los HDPs que son inmunomoduladores.

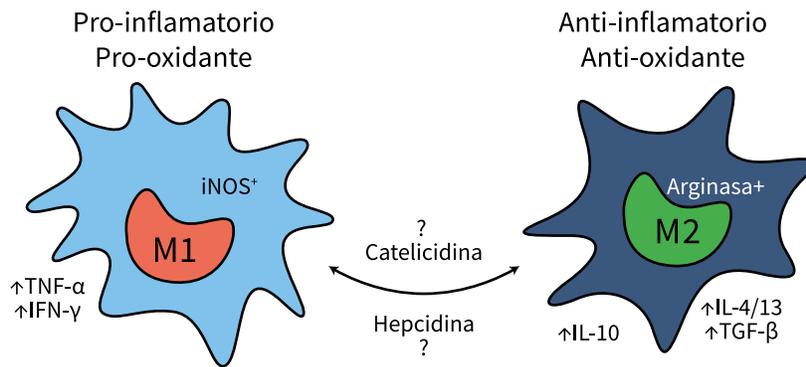


Figura 7: Esquema que muestra el fenotipo M1 y M2, como principales tipos celulares representantes de macrófagos polarizados con funciones proinflamatorias/prooxidantes (iNOS⁺) o antiinflamatorio/antioxidante (arginasa⁺). Fuente: elaboración propia.

Tal como se comentó previamente, los AMPs actuando como HDPs pueden participar a diferentes niveles moleculares en la regulación de la expresión de moléculas asociadas a la inmunidad de tipo 1 o tipo 2. Esto también se ha observado en peces teleosteos, que son los vertebrados ancestrales de la inmunidad, desde donde se prevé qué componentes celulares y moleculares de la inmunidad innata debieron alinearse con las nuevas funciones de la inmunidad adaptativa (Yamaguchi *et al.*, 2015). Los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), patógenos (PAMPs) o daño (DAMPs) son capaces de estimular la producción de diferentes citoquinas y efectores antimicrobianos en peces (figura 7). Dentro de estos últimos están los péptidos antimicrobianos como hepcidina y catelicidina, los cuales pueden actuar como inmunomoduladores, constituyendo HDPs en peces. Las funciones en que participan permiten un equilibrio en la polarización, favoreciendo la pre-

sencia tanto de macrófagos destructivos (M1) como reparadores y cicatrizantes (M2). Nuevas evidencias podrían explicar si los peces que efectivamente sobreviven al ataque de patógenos más agresivos lo logran desarrollando fenotipos inmunes tolerogénicos, en los cuales los HDPs podrían ser protagónicos.

Referencias

- Álvarez, C., Acosta, F., Montero, D., Guzmán, F., Torres, E., Vega, B. & Mercado, L. (2016). Synthetic hepcidin from fish: Uptake and protection against *Vibrio anguillarum* in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology*, 55: 662-670. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.035>
- Álvarez, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Marshall, S. & Mercado, L. (2014). Antimicrobial activity of trout hepcidin. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(1), 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.013>
- Hancock, R., Haney, E. & Gill, E. (2016). The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nature Reviews Immunology*, 16(5), 321-334. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.29>
- Katzenback, B. (2015). Antimicrobial Peptides as Mediators of Innate Immunity in Teleosts. *Biology*, 4(4), 607-639. <https://doi.org/10.3390/biology4040607>
- Ma, Y., Lee, C.-J., Kim, S.-S., Kim, D., Nam, B.-H., Kim, Y.-O., An, C.-M. & Park, J.-S. (2020). Role of Hepcidins from Black Rockfish (*Sebastes schlegelii*) in Iron-Metabolic Function and Bacterial Defense. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/jmse8070493>
- Martell, E., González-García, M., Ständker, L. & Otero-González, A. (2021). Host defense peptides as immunomodulators: The other side of the coin. *Peptides*, 146. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170644>
- Masso-Silva, J. & Diamond, G. (2014). Antimicrobial Peptides from Fish. *Pharmaceuticals*, 7(3), 265-310. <https://doi.org/10.3390/ph7030265>
- Schmitt, P., Wacyk, J., Morales-Lange, B., Rojas, V., Guzmán, F., Dixon, B. & Mercado, L. (2015). Immunomodulatory effect of cathelicidins in response to a β -glucan in intestinal epithelial cells from rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*, 51(1), 160-169. <https://doi:10.1016/j.dci.2015.03.007>
- Yamaguchi, T., Takizawa, F., Fischer, U. & Dijkstra, J. (2015). Along the Axis between Type 1 and Type 2 Immunity; Principles Conserved in Evolution from Fish to Mammals. *Biology*, 4(4), 814-859. <https://doi.org/10.3390/biology4040814>



5. ESTRÉS OXIDATIVO Y PÉPTIDOS ANTIOXIDANTES

Carlos Esteban Jara Gutiérrez, doctor en Biotecnología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Laboratorio de Bioensayos, Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

El oxígeno (O_2) corresponde a una quinta parte del aire atmosférico terrestre, por lo que es imprescindible para la vida de características aerobias. De manera paradójica, producto del metabolismo de esta molécula se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son un riesgo latente para la integridad de las biomoléculas que forman parte —tanto estructural como funcional— de las células.

Por definición, las ROS corresponden a una serie de especies químicas formadas durante el metabolismo del O_2 , el cual sufre reducciones univalentes y seriadas, mediadas por procesos bioquímicos. La reducción del O_2 , o ganancia de un electrón, comienza con la generación de anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), seguida por la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), luego con la formación de radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y finalmente con la formación de agua (H_2O) (figura 8) (Däustréaux & Toledano, 2007; Kalyanaraman, 2013; Mailloux, 2015).

Todas estas especies reactivas son generadas de forma normal en el organismo y en bajas concentraciones cumplen funciones claves durante el metabolismo celular, vías de transducción de señales específicas y mecanismos de control de microorganismos patógenos (Holmström & Finkel, 2014). A esta generación normal de ROS se le denomina fuentes endógenas, entre las cuales se encuentran algunos organelos como la mitocondria, el peroxisoma y el lisosoma, además de enzimas oxido-reductasas como NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa, xantina oxidoreductasa, entre otras (Valko *et al.*, 2006). Sumada a esta fuente, existen factores extracelulares que pueden exacerbar la producción endógena de ROS, conocidas como fuentes exógenas, entre las cuales se encuentran la exposición a metales pesados, radiación ionizante, radiación ultravioleta, pesticidas, consumo de tabaco, alcohol y drogas, etc. (figura 9) (Kalyanaraman, 2013; Valko *et al.*, 2006).



Figura 8: Reducción secuencial univalente del oxígeno. Elaboración propia en base a Mailloux (2015).

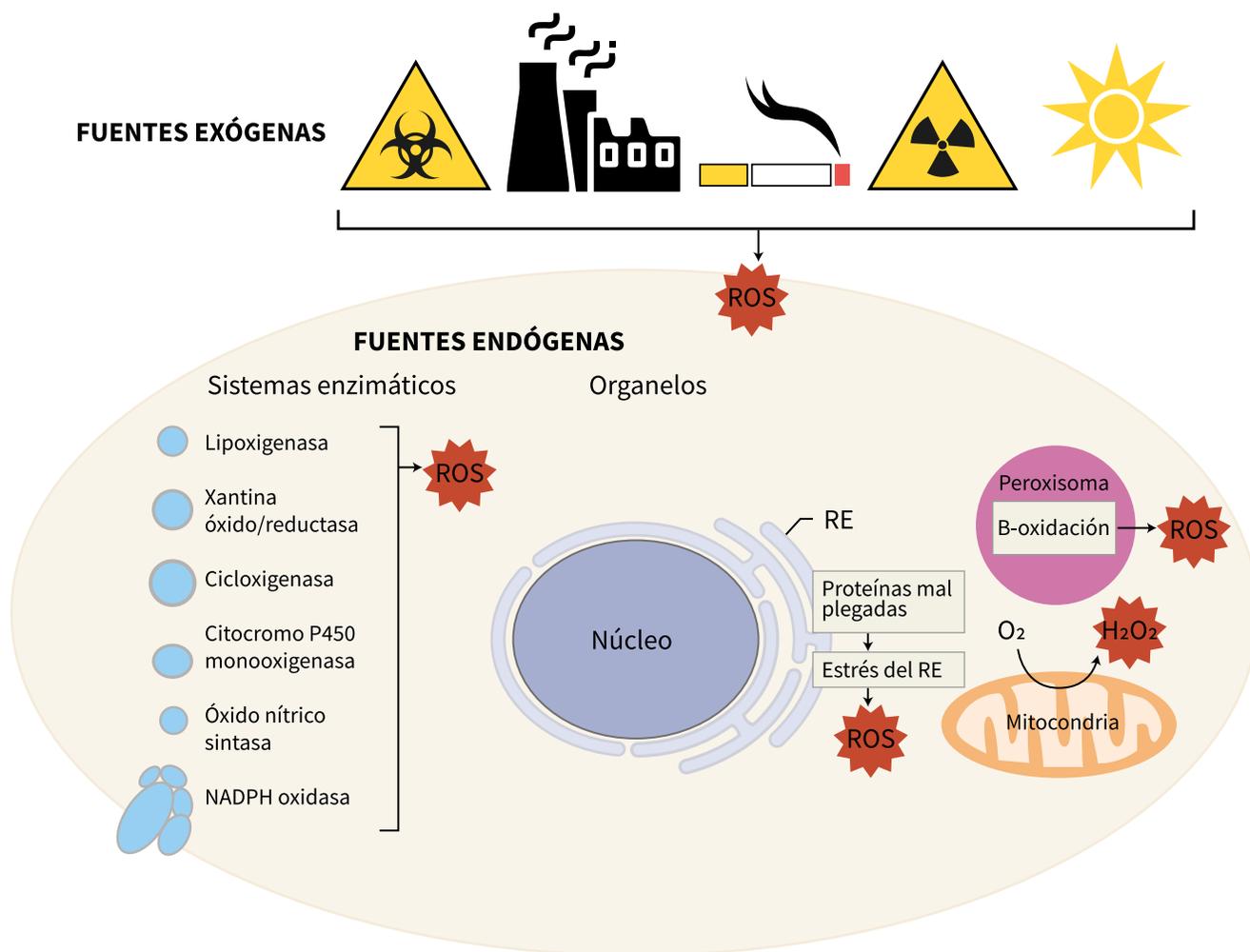


Figura 9: Algunas de las más importantes fuentes endógenas y exógenas de generación de ROS. Fuente: elaboración propia en base a Holmström & Finkel (2014).

En respuesta a ello y para evitar el daño a biomoléculas —también conocido como daño oxidativo— existe un importante control intracelular y extracelular por parte de las defensas antioxidantes endógenas (enzimas como superóxido dismutasa, catalasa, el complejo glutatión, entre otras) y exógenas (elementos incorporados vía dieta, como fenoles, ácidos grasos polinsaturados, entre otros), con la finalidad de mantener las ROS en niveles basales (Däuträux & Toledano, 2007). A pesar del elevado control, muchas veces el equilibrio entre la producción de ROS y la actividad antioxidante se pierde, generando un evento celular denominado estrés

oxidativo o desbalance redox, el cual es responsable tanto de la génesis como de la progresión de numerosas patologías (Halliwell, 2008; Sosa *et al.*, 2013). Con la idea de prevenir este desbalance, en el mundo científico ha aumentado significativamente el estudio vinculado a la búsqueda de antioxidantes de origen natural; es el caso de los péptidos antioxidantes.

Un péptido antioxidante corresponde a una secuencia corta de aminoácidos (2-20 aminoácidos) que posea la capacidad de eliminar o reducir el riesgo biológico generado por la producción de ROS (Abuine *et al.*, 2019). En este contexto, la cisteína (Cys o C) ha demostrado

un alto potencial antioxidante, debido a la presencia del grupo tiol (SH) en su estructura, el cual, al oxidarse con una ROS, puede formar puentes disulfuro (S-S) con otro aminoácido de Cys y así disminuir el riesgo de oxidación de biomoléculas como lípidos de membrana, proteínas estructurales/señal y ADN (McBean, 2017). En numerosos trabajos científicos se ha descrito que los

organismos marinos —tales como los peces— son una fuente rica de péptidos antioxidantes, los cuales son capaces de apagar o secuestrar radicales libres coloreados y estables (DPPH, HO \cdot y ABTS, radicales libres que corresponden a ROS) utilizados para la evaluación de la capacidad antioxidante total, como se muestra en la tabla 2 (Abuine *et al.*, 2019).

Tabla 2. Actividad antioxidante de péptidos purificados desde la piel de diferentes especies de peces. Fuente: elaboración propia en base a Abuine *et al.* (2019).

Especie	Actividad secuestradora de radical ($\mu\text{g/mL}$)			Secuencia del péptido	Referencia
	DPPH	HO \cdot	ABTS		
<i>Raja clavata</i>	1980	-	-	AVGAT	Lassoued <i>et al.</i> (2015)
<i>Oreochromis niloticus</i>	8,82 μm	7,56 μm	-	DPALATEPDMPF	Ngo <i>et al.</i> (2010)
	-	4,61	-	EGL	Zhang <i>et al.</i> (2012)
	-	6,45	-	YGDEY	
<i>Magalaspis cordyla</i>	72,3%	51,2%	-	NHRYDR	Sampath Kumar <i>et al.</i> (2012)
<i>Otolithes ruber</i>	79,6%	56,8%	-	GNRGFACRHA	
<i>Johnius belengerii</i>	156,2 μm	-	-	HGPLGPL	Mendis <i>et al.</i> (2005a)
<i>Navodon septentrionalis</i>	405	179	-	GSGGL	Chi <i>et al.</i> (2015)
	194	89	-	GPGGFI	
	118	73	-	FIGP	
<i>Lates calcarifer</i>	-	-	81,41 mM TE/mM péptido	GLFGPR	Sea-Leaw <i>et al.</i> (2017)
	-	-	10,4 mM TE/mM péptido	GATGPQGPLGPR	
	-	-	2,59 mM TE/mM péptido	VLGPF	
	-	-	0,5 mM TE/mM péptido	QLGLGPV	
<i>Dosidicus gigas</i>	-	-	-	FDSGPAGVL	Mendis <i>et al.</i> (2005b)
	-	-	-	DGPLQAGQPGER	
<i>Acipenser schrenckii</i>	5380	890	8	PAGT	Nikoo <i>et al.</i> (2015)
<i>Gadus microcephalus</i>	-	-	-	TCS, TGGGNV	Ngo <i>et al.</i> (2011)

Este creciente nicho investigativo nos ha incentivado a poner nuestro foco en la búsqueda de péptidos de peces que sirvan para solucionar problemáticas vinculadas a la industria salmonera. En este contexto, la alta mortalidad de peces pesquisada diariamente en las salmoneras —asociada a agentes patógenos y a la sobrepoblación— está estrechamente vinculada a eventos de estrés oxidativo y la débil respuesta oxidativa del sistema inmune de los salmónidos. Sumado a esto, se ha descrito que una de las formas de ingreso de los péptidos denominados penetrantes hacia el espacio intracelular, está mediado por procesos de redox (procesos de oxido/reducción), los cuales pueden potenciar la respuesta de algunos modelos celulares, como es el caso de los macrófagos, que sufren una preestimulación para enfrentar de mejor manera la fagocitosis y el consecuente *burst* oxidativo (Wang *et al.*, 2021).

Con esta información en mente, nos planteamos realizar un estudio *in vitro* (en las líneas celulares SHK-1 y RTS-11) vinculado a un péptido derivado de interleuquina 8 de salmónidos (omIL-8 α), el cual —de acuerdo con una recopilación bibliográfica y a la obtención de resultados preliminares por parte de nuestro grupo de investigación— posee potencial bioactivo (Santana *et al.*, 2018; Sáenz-Martínez *et al.*, 2021). Lo que buscamos comprender con los resultados de esta investigación son los mecanismos de ingreso de este péptido al espacio intracelular, su potencial actividad antioxidante y los posibles efectos sobre los parámetros redox en las líneas celulares anteriormente mencionadas (figura 10). Dicha investigación se encuentra en desarrollo y nos permitirá visualizar de mejor manera los mecanismos de acción y proyectar los potenciales usos de este péptido en un modelo *in vivo*.



Figura 10: Ciclo resumido de investigación, realizado para la búsqueda y aplicación de péptidos antioxidantes de salmónidos. Fuente: elaboración propia.

Referencias

- Abuine, R., Rathnayake, A. & Byun, H. (2019). Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(10), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s41240-019-0125-4>
- Däuträux, B. & Toledano, M. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews*, 8, 813-824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.028>
- Holmström, K. & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of REDOX-dependent signalling. *Nature Reviews*, 15, 411-421. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>
- Kalyanaraman, B. (2013). Teaching the basics of REDOX biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *REDOX Biology*, 1(1), 244-257. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.014>
- Mailloux, R. (2015). Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *REDOX Biology*, 4, 381-398. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.02.001>
- McBean, G. (2017). Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes. *Antioxidants*, 6(3), 1-13. <https://doi.org/10.3390/antiox6030062>
- Sáenz-Martínez, D., Santana, P., Aróstica, M., Forero, J., Guzmán, F. & Mercado, L. (2021). Immunodetection of rainbow trout IL-8 cleaved-peptide: Tissue bioavailability and potential antibacterial activity in a bacterial. *Developmental & Comparative Immunology*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104182>
- Santana, P., Salinas, N., Álvarez, C., Mercado, L. & Guzmán, F. (2018). Alpha-helical domain from IL-8 of salmonids: Mechanism of action and identification of a novel antimicrobial function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(4), 803-809. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.061>
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. & LLeonart, M. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 376-390. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>
- Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. (2006). Free radicals, metal and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Wang, T.-Y. & Pellois, J.-P. (2016). Peptide translocation through the plasma membrane of human cells: Can oxidative stress be exploited to gain better intracellular access? *Communicative & Integrative Biology*, 9(4). <https://doi.org/10.1080/19420889.2016.1205771>





6. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE PÉPTIDOS EN PECES

Claudio Álvarez (PhD), Laboratorio de Fisiología y Genética Marina (FIGEMA, www.figema.cl), Centro de Estudios Avanzados de Zonas Áridas (CEAZA), Coquimbo, Chile. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile.

En los peces, al igual que en los vertebrados superiores, los péptidos desempeñan diferentes funciones vitales para su desarrollo. Algunas de ellas han sido mencionadas en capítulos anteriores del presente libro, tales como su función en la defensa frente a patógenos. Sin embargo, también son capaces de alterar el metabolismo del pez, regular su comportamiento reproductivo, controlar la ingesta de alimento, entre otras funciones vitales. En este capítulo se intentará resumir algunas de las funciones que realizan estas pequeñas moléculas en el sistema endocrino de peces, detallando algunos ejemplos de aplicaciones destacadas en este campo.

6.1. Hormonas peptídicas y desarrollo reproductivo de peces

Los péptidos ejercen diferentes funciones en los peces, debido a que pueden funcionar como hormonas. De esta manera, participan en diferentes rutas que controlan procesos fisiológicos claves en estos animales; uno de ellos es controlar su reproducción. En los años setenta era aún desconocido, porque los planteles de reproductores de especies de interés comercial no eran capaces de lograr una maduración sexual exitosa en condiciones de cautiverio. En especial, las hembras no lograban generar ovocitos maduros y desovar. Fue así que el foco de las investigaciones en la biología reproductiva de peces se orientó hacia la identificación de componentes claves del eje hipotálamo-pituitario-gonadal (HPG), ruta encargada de controlar la maduración gonadal (figura 11) (Muñoz-Cueto *et al.*, 2020).

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH por su abreviación en inglés) es quizás el péptido hormonal más conocido en la industria acuícola. GnRH se

encuentra constituida por diez aminoácidos y es uno de los principales reguladores de la ruta mencionada. Su aplicación exógena es utilizada para mejorar la ovulación y desoves en diferentes especies de peces. Sin embargo, su efecto biológico ocurre en un breve periodo de tiempo, ya que enzimas presentes en los propios animales (endopeptidasas) son capaces de degradarla en fragmentos inactivos (Zohar & Mylonas, 2001).

Con el avance de la síntesis de péptidos se ha logrado generar análogos sintéticos de GnRH, los cuales resisten la acción enzimática de endopeptidasas, aumentando la vida media de estos compuestos sin afectar su función biológica, permitiendo además disminuir la dosis que se debe aplicar al plantel de reproductores (Kim *et al.*, 2020; Valdebenito, 2008). Es importante mencionar que para algunas especies de peces una sola inyección de análogos GnRH asegura desoves importantes. Sin embargo, para peces marinos como la dorada y lubina europea, se requirieron múltiples inyecciones de GnRH para inducir el mismo efecto (Zohar, 2021). Las repetidas inyecciones y la manipulación —que a menudo provocaba la muerte— obligaron a desarrollar sistemas de liberación controlada, tales como el uso de implantes hormonales (Fakriadis *et al.*, 2020). Esto último es un aspecto importante que debe ser considerado para las nuevas especies incluidas en los programas de diversificación acuícola de Chile. En este punto la academia y la industria deben trabajar en conjunto para lograr buenos resultados.

6.2. Péptidos controladores de la ingesta

En todos los organismos, la energía para su supervivencia se obtiene mediante la absorción de nutrientes desde la ingesta de alimentos. En la acuicultura de peces, el costo asociado a la alimentación puede alcanzar hasta un 60% del presupuesto total de producción (Luna *et al.*, 2019). Por lo tanto, minimizar las pérdidas asociadas al consumo de alimento es un aspecto relevante para el éxito de los cultivos de especies de interés acuícola.

El centro de control de la alimentación de los peces, al igual que en los mamíferos, se encuentra en el hipotálamo (figura 11). En esta área confluyen señales periféricas relacionadas con el contenido gastrointestinal, señales asociadas al contenido de reservas energéticas (metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas) y aquellas asociadas a la información sensorial (señales en el entorno) (Bernier & Craig, 2005). Esas señales que activan la sensación de apetito o promueven una sensación de saciedad son los neuropéptidos (el término “neuro” hace mención a que son péptidos que fueron identificados inicialmente a nivel cerebral, aun cuando pueden ser producidos en otros tejidos del pez). Para facilitar la comprensión en la forma en la que participan estos péptidos, podemos identificar a aquellos que poseen propiedades del tipo orexigénico, es decir, promueven la sensación de apetito; mientras que nos referiremos como neuropéptidos anorexigénicos a aquellos que inhiben el apetito en peces.

Uno de los principales neuropéptidos orexigénicos es el neuropéptido Y (NPY), el cual ha sido descrito en diferentes especies de peces, actuando directamente en el hipotálamo. Su inyección intraperitoneal o intracerebro-ventricular aumenta la cantidad de alimento ingerido en diferentes especies de peces, entre ellos: trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), bagre (*Ictalurus punctatus*) o tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Aldegunde & Mancebo, 2006; Carpio *et al.*, 2007; Rønnestad *et al.*, 2017; Silverstein & Plisetskaya, 2000). Estas moléculas actúan de forma sinérgica junto a otros péptidos de características similares. Por ejemplo,

algunos autores describen que el NPY requiere la presencia de otros neuropéptidos, como las orexinas A y B, y la galanina para producir efectos orexigénicos (Volkoff *et al.* 2005).

Los responsables de transmitir las señales periféricas hacia el cerebro son los neuropéptidos producidos en el tejido gastrointestinal. Uno de ellos es el péptido orexigénico grelina, cuya aplicación intraperitoneal induce una rápida respuesta en los peces, que aumenta el consumo de alimento (Tinoco *et al.*, 2014). Un estudio reciente realizado por nuestro grupo demostró que una dosis de 100 µg péptido/Kg pez es capaz de incrementar en un 30% el consumo de alimento en corvina chilena (figura 12). Por otro lado, los neuropéptidos colecistoquinina (CCK) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) realizarían el efecto contrario (Velasco *et al.*, 2019).

Los péptidos presentes en el sistema digestivo de peces no solo actúan como señalizadores, sino que también participan directamente en el control del procesamiento de la comida. Algunas de las funciones descritas para este tipo de moléculas son: regular la secreción de ácido en el estómago, promover o inhibir la absorción de nutrientes en el lumen intestinal o estimular la secreción de enzimas digestivas (Rønnestad *et al.*, 2017). Por lo tanto, son componentes que desempeñan funciones claves en la señalización y control del eje cerebro-intestino (C-I). De esta manera, el estudio funcional de estos compuestos ofrece un abanico de oportunidades para desarrollar aplicaciones biotecnológicas en el campo de la alimentación animal.

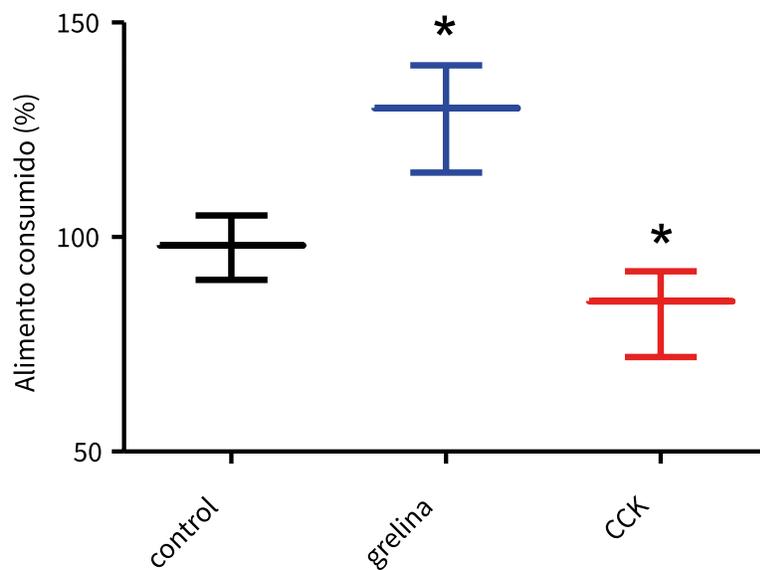


Figura 12: Efecto de péptidos gastrointestinales en el consumo de alimento de corvinas juveniles. Consumo de alimento expresado en porcentaje de alimento consumido respecto al control. En azul se muestra el efecto de inyección intraperitoneal de péptido sintético de grelina y en rojo el de CCK. (n=8, p>0.05). Fuente: Álvarez *et al.* (en revisión).

6.3. Péptidos involucrados en la activación de rutas de estrés

Cuando los peces son mantenidos en cautiverio, las condiciones de confinamiento pueden afectar diferentes procesos fisiológicos, tales como su respuesta inmunológica, alimentación y reproducción, rutas que se conectan a través de las vías de activación del estrés. Tanto en peces como en mamíferos, los estímulos que generan estrés son percibidos inicialmente por los sensores del sistema nervioso central, específicamente en el hipotálamo, donde se estimulan dos grandes ejes reguladores: el eje cerebro-simpático-cromafínico (BSC) y el eje hipotalámico-pituitario-interrenal (HPI). Este último culmina con la síntesis de cortisol, el principal modulador de las respuestas fisiológicas durante el estrés (Fabbri *et al.*, 1998; Pijanowski *et al.*, 2015) (figura 11). Podrá visualizar el lector que el tejido hipotalámico es el punto de partida para diferentes procesos fisiológicos en los peces y es la razón por la cual cualquier perturbación de su ambiente afecta el desempeño productivo de las especies acuícolas.

Diferentes neuropéptidos desempeñan funciones protagónicas en el eje HPI, uno de ellos es el factor liberador de corticotropina (CRF por sus iniciales en inglés), péptido que es sintetizado en el hipotálamo, en respuesta a un agente estresor y es descrito como uno de los gatilladores del eje (Khansari *et al.*, 2017). Desde que Wylie Vale y sus colegas identificaron y aislaron el neuropéptido CRF en 1981, la búsqueda de

moléculas con características similares que modulan las respuestas al estrés ha tenido lugar en diferentes modelos animales, incluidos los peces. Por esta razón, los neuropéptidos y sus receptores se han convertido en los objetivos preferidos para el desarrollo de nuevos fármacos, tanto en humanos como en animales.

Como se ha visto, los péptidos cumplen diferentes funciones biológicas en los peces, muchas de ellas conectadas entre sí por ser localizadas en un mismo tejido. La síntesis y aplicación exógena de estos compuestos nos ayuda a comprender la función que desempeñan, así como también explorar soluciones para mejorar las estrategias de cultivo.

Referencias

- Aldegunde, M. & Mancebo, M. (2006). Effects of neuropeptide Y on food intake and brain biogenic amines in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Peptides*, 27(4), 719-727. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.09.014>
- Bernier, N. & Craig, P. (2005). CRF-related peptides contribute to stress response and regulation of appetite in hypoxic rainbow trout. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(4), 982-990. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00668.2004>
- Carpio, Y., León, K., Acosta, J., Morales, R. & Estrada, M. (2007). Recombinant tilapia Neuropeptide Y promotes growth and antioxidant defenses in African catfish (*Clarias gariepinus*) fry. *Aquaculture*, 272(1-4), 649-655. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2007.08.024>
- Fabbri, E., Capuzzo, A. & Moon, T. (1998). The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: an overview. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, 120(2), 177-192.
- Fakriadis, I., Zanatta, E., Fleck, R., Sena Mateo, D., Papadaki, M. & Mylonas, C. (2020). Endocrine regulation of long-term enhancement of spermiation in meagre (*Argyrosomus regius*) with GnRHa controlled-delivery systems. *General and Comparative Endocrinology*, 297. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113549>
- Khansari, A., Balasch, J., Reyes-lópez, F. & Tort, L. (2017). Stressing the Inflammatory Network: Immuno-endocrine Responses to Allostatic Load in Fish. *Journal of Marine Science and Technology*, 1(2), 856-862.
- Kim, S., Hong, W., Han, S., Kwon, J., Ko, H., Lee, S. Bin, Giri, S., Kim, S., Kim, B., Jang, G., Lee, B., Kim, D. & Park, S. (2020). Use of Synthetic Salmon GnRH and Domperidone (Ovaprim®) in Sharks: Preparation for ex situ Conservation. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.571741>
- Luna, M., Llorente, I. & Cobo, A. (2019). Determination of feeding strategies in aquaculture farms using a multiple-criteria approach and genetic algorithms. *Annals of Operations Research*, 1-26. <https://doi.org/10.1007/s10479-019-03227-w>
- Mitchell, K., Zhang, W., Lu, C., Tao, B., Chen, L., Hu, W. & Trudeau, V. (2020). Targeted mutation of secretogranin-2 disrupts sexual behavior and reproduction in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(23), 12772-12783. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002004117>
- Muñoz-Cueto, J., Zmora, N., Paullada-Salmerón, J., Marvel, M., Mañanos, E. & Zohar, Y. (2020). The gonadotropin-releasing hormones: Lessons from fish. *General and Comparative Endocrinology*, 291. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113422>
- Ohga, H., Selvaraj, S. & Matsuyama, M. (2018). The roles of kisspeptin system in the reproductive physiology of fish with special reference to chub mackerel studies as main axis. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00147>
- Pijanowski, L., Jurecka, P., Irnazarow, I., Kepka, M., Szejser, E., Verburg-van Kemenade, B. & Chadzinska, M. (2015). Activity of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis (HPI axis) and immune response in carp lines with different susceptibility to disease. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5), 1261-1278. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0084-3>
- Rønnestad, I., Gomes, A., Murashita, K., Angotzi, R., Jönsson, E. & Volkoff, H. (2017). Appetite-Controlling Endocrine Systems in Teleosts. *Frontiers in Endocrinology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00073>
- Silverstein, J. & Plisetskaya, E. (2000). The Effects of NPY and Insulin on Food Intake Regulation in Fish. *American Zoologist*, 40(2), 296-308. <https://doi.org/10.1093/icb/40.2.296>
- Tinoco, A., Näslund, J., Delgado, M., de Pedro, N., Johnsson, J. & Jönsson, E. (2014). Ghrelin increases food intake, swimming activity and growth in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Physiology & Behavior*, 124, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.10.034>
- Valdebenito, I. (2008). Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: Una revisión. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 40(2), 115-123. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2008000200002>
- Velasco, C., Comesaña, S., Conde-Sieira, M., Míguez, J. & Soengas, J. (2019). Effects of CCK-8 and GLP-1 on fatty acid sensing and food intake regulation in trout. *Journal of Molecular Endocrinology*, 62(3), 101-116. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0212>
- Volkoff, H., Canosa, L., Unniappan, S., Cerdá-Reverter, J., Bernier, N., Kelly, S. & Peter, R. (2005). Neuropeptides and the control of food intake in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1-2), 3-19. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.11.001>
- Zohar, Y. (2021). Fish reproductive biology – Reflecting on five decades of fundamental and translational research. *General and Comparative Endocrinology*, 300. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113544>
- Zohar, Y. & Mylonas, C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture*, 197(1-4), 99-136. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00584-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00584-1)

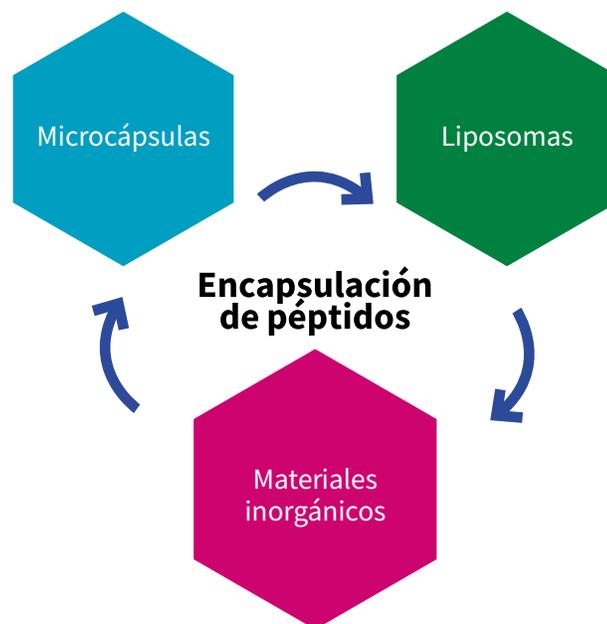


7. MÉTODOS PARA LA APLICACIÓN DE PÉPTIDOS EN PECES CON ENFOQUE EN LA ENCAPSULACIÓN

Nancy Alicia Alvarado Almonacid, doctora en Química, Instituto de Ciencias Químicas Aplicadas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Chile.

Durante las últimas décadas, la encapsulación se ha manifestado como un atractivo método ampliamente usado en diversos campos, con el fin de proteger, transportar y de liberar controladamente sustancias activas, como por ejemplo compuestos con actividad antibacteriana, antimicrobiana, antioxidantes, vitaminas, vacunas, probióticos, etc. (Miskeen *et al.*, 2021; Reque & Brandelli, 2021; Šillerová *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021). La encapsulación permite aumentar la biodisponibilidad del encapsulado, es decir, el desempeño del compuesto activo en general se ve favorecido y cobra ventaja frente a sí mismo sin encapsular. Dependiendo del objetivo final, el sistema encapsulador debe cumplir con ciertas características, como de degradación y estabilidad a ciertos intervalos de pH, propiedades mecánicas, propiedades térmicas, entre otras. A lo largo de los años, diversos sistemas de encapsulación han sido diseñados (figura 13); cada uno de ellos responde a las necesidades y objetivos de su aplicación. Algunos de ellos son: microcápsulas poliméricas, liposomas y materiales inorgánicos.

Figura 13: Esquema de algunos tipos de sistemas de encapsulación que se usan o podrían usarse en péptidos. Fuente: elaboración propia.



7.1. Microcápsulas poliméricas

Las microcápsulas o nanocápsulas, según corresponda, son una atractiva forma de encapsular compuestos activos. El uso de biopolímeros en este tipo de estructuras es común debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Alginato y quitosano son, entre otros, los biopolímeros más usados para su elaboración, dada su capacidad de formar un gel estable en presencia de cationes o aniones multivalentes (Cortés-Morales *et al.*, 2021; Phuong Ta *et al.*, 2021; Rocha *et al.*, 2021; Rodríguez *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2018). La técnica para la obtención de microcápsulas es sencilla y suele ser a través de emulsificación o spray drying. Las aplicaciones de las microcápsulas son diversas. Microcápsulas de alginato-quitosano-almidón en variadas proporciones fueron evaluadas, encapsulando probióticos para su liberación gastrointestinal en humanos (figura 14). Los estudios mostraron que las microcápsulas entregaron un ambiente seguro a los probióticos sometidos al ambiente ácido del estómago. En este sentido, las microcápsulas de alginato-almidón fueron las que mostraron la mejor viabilidad de la bacteria en ambiente gástrico (figura 15) (Phuong Ta *et al.*, 2021).

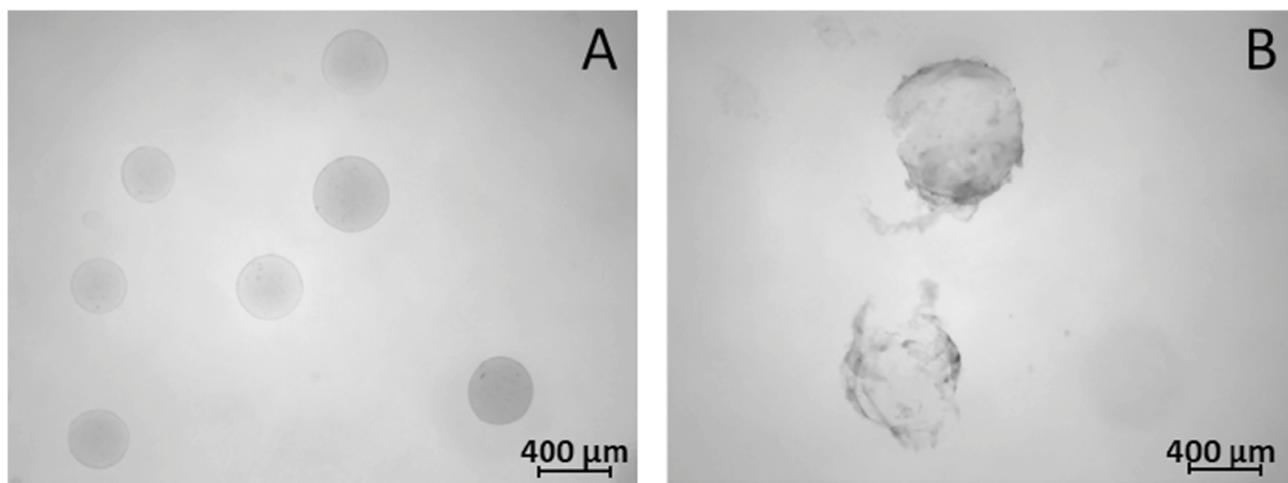


Figura 14: Imágenes obtenidas por microscopio de luz de microcápsulas de A) alginato y B) alginato recubiertas con quitosano. Fuente: Phuong Ta, *et al.* (2021).

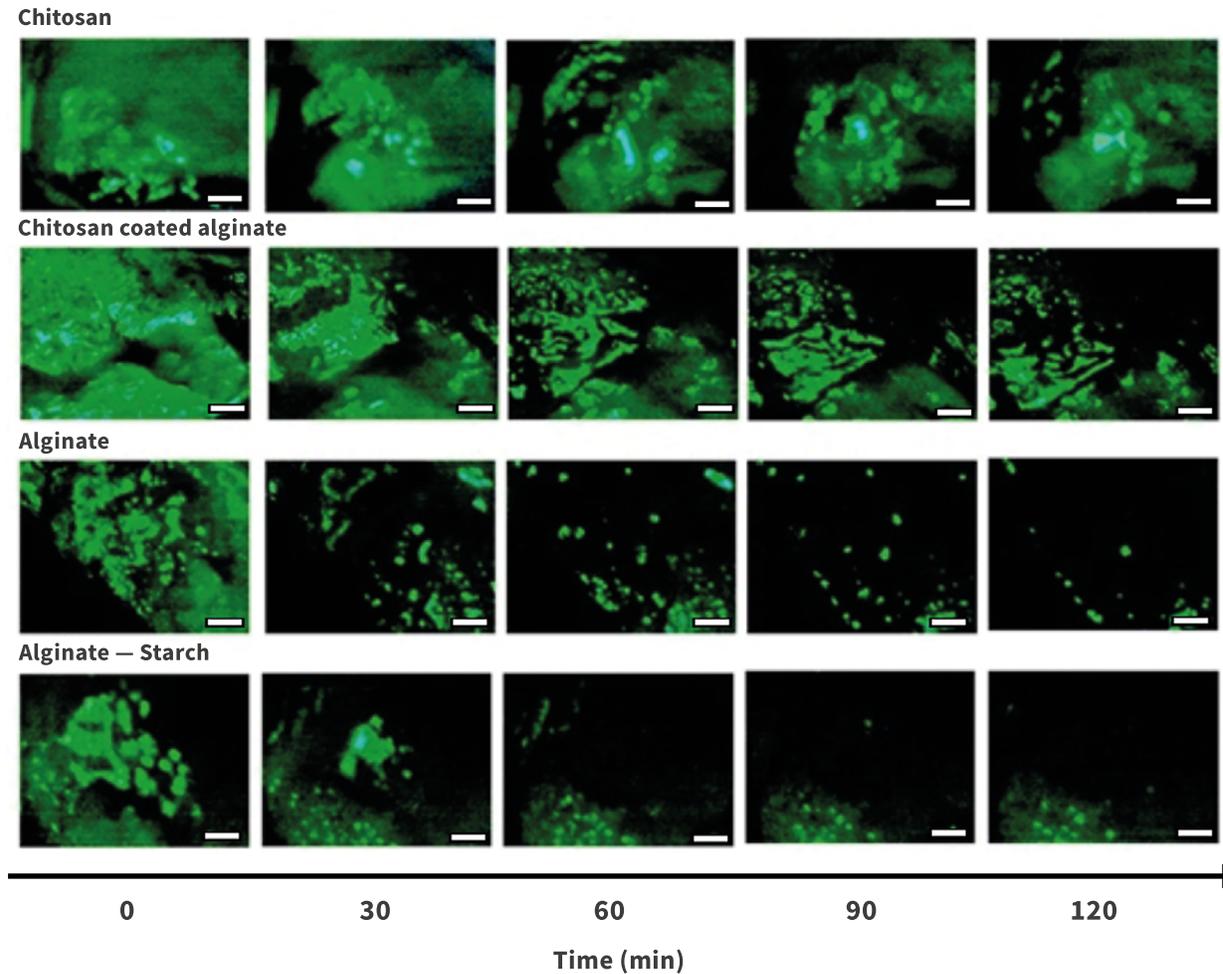


Figura 15: Imágenes de fluorescencia de las microcápsulas ensayadas, que muestran la retención de cada variación de microcápsulas en la mucosa gástrica porcina después del tiempo indicado de lavado con fluido gástrico simulado (0.2% (p/v) NaCl, pH 2). Fuente: Phuong Ta *et al.* (2021).

También fueron desarrolladas microcápsulas de alginato y alginato-bentonita para la encapsulación de enzimas exógenas para el suministro intestinal de proteasas de desechos de camarón a la especie tilapia de Nilo. El objetivo fue mejorar el proceso de digestión de dicha especie. Los resultados fueron bastante prometedores, pues mostraron que las microcápsulas desarrolladas fueron excelentes vehículos para la liberación de las enzimas. De este modo, las enzimas encapsuladas resultan en una potencial gran alternativa para ser usada como complemento en alimento para peces (Rodríguez *et al.*, 2018).

Los tocotrienoles son familia de la vitamina E y al igual que ella poseen excelente actividad antioxidante. En un estudio, los investigadores encapsularon

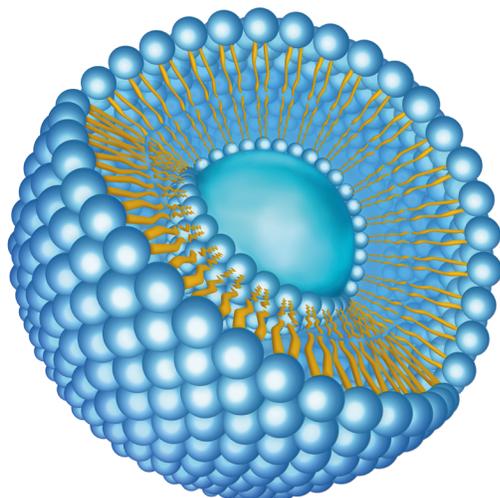
tocotrienol en microcápsulas de alginato y quitosano para realizar pruebas en condiciones de almacenaje, a 40°C, con el fin de ser usado en yogurt. Los resultados mostraron que la capacidad antioxidante del tocotrienol en general estuvo protegida mientras estuvo encapsulado en las condiciones de almacenaje mencionadas. El yogurt no fue mayormente afectado por la incorporación de las microcápsulas, en cuanto a su pH, color y textura (Tan *et al.*, 2018).

7.2. Liposomas

Los liposomas son estructuras esféricas tipo vesículas, que usualmente están formadas por una o varias capas de lípidos polares (fosfolípidos) (figura 16). Su forma de preparación es simple, con diferentes variantes dependiendo de la aplicación. Estas estructuras han sido ampliamente estudiadas por su capacidad de proteger de enzimas, pH extremos y de temperatura, entre otros, además de su capacidad de transportar y administrar sustancias activas en diversas aplicaciones (da Silva Malheiros *et al.*, 2012; Harikrishnan *et al.*, 2012; Hawkyard *et al.*, 2015; Mohan *et al.*, 2016; Rezaei *et al.*, 2020).

Fueron desarrollados liposomas para encapsular rotíferos enriquecidos con taurina para aumentar el valor nutricional de los rotíferos en larvas de lenguado de roca del norte (*Lepidopsetta polyxystra*). Los resultados mostraron que efectivamente las concentraciones de taurina presentes en las larvas de lenguado aumentaron considerablemente, mostrando como consecuencia el rápido crecimiento de la especie estudiada. Con ello se demuestra que los rotíferos enriquecidos con taurina fueron eficazmente encapsulados y la encapsulación no afectó la disponibilidad para las larvas (Hawkyard *et al.*, 2015).

Los liposomas también han sido estudiados como transportadores de vacunas en peces (Kim *et al.*, 2014). Con este fin fueron evaluados liposomas para atrapar la vacuna bacteriana de células enteras contra la infección por *Vibrio harveyi* en *Epinephelus bruneus*. Los resultados mostraron que la respuesta inmune en los peces fue positiva, lo que le entrega a la especie estudiada protección contra la infección provocada por *V. harveyi* (Harikrishnan *et al.*, 2012).



7.3. Materiales inorgánicos

Dentro de esta categoría destacan los nanotubos de carbono, los que han sido ampliamente estudiados como transportadores de compuestos activos (Jampilek & Kralova, 2021; Mehra & Palakurthi, 2016; Yazdan Madani *et al.*, 2011). Los nanotubos de carbono son láminas de grafeno enrolladas, generando una forma tubular con una red hexagonal bidimensional (figura 17). Los enlaces C-C generados son mediante hibridación sp^2 . Para su uso en sistemas biológicos, la modificación química de estos sistemas a través de la funcionalización es crucial, ya que los nanotubos de carbono deben ser hidrosolubles para ser biocompatibles. En este sentido, nanotubos de carbono funcionalizados, recubiertos con plata y bioconjugados con péptido antimicrobiano fueron desarrollados para generar un sistema antimicrobiano sinérgico. El sistema mostró una actividad antimicrobiana aumentada con respecto a Ag y al péptido antimicrobiano por separado, lo que demostró que la actividad antimicrobiana no se perdió o fue disminuida. Por otra parte, la toxicidad del sistema conjugado se vio reducida en células humanas, lo que abre las puertas a este tipo de sistemas para ser usado en sistemas biológicos (Chaudhari *et al.*, 2016).

Diversos estudios muestran el uso de nanotubos de carbono modificado como agente encapsulante en peces de cultivo, para su uso contra enfermedades causadas tanto por bacterias como por virus (Guo *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2016; B. Zhu *et al.*, 2015). Fue evaluado un sistema de transporte para el isoprinosine, fármaco antiviral inmunomodulador, mediante nanotubos de carbono. El objetivo fue combatir la enfermedad viral necrosis nerviosa, causante de grandes pérdidas a la industria de los peces de cultivo. Los resultados mostraron que isoprinosine, siendo transportado en nanotubos de carbono, controla de forma excelente la enfermedad (Zhu *et al.*, 2019).

Figura 16: Visualización estructural de un liposoma.

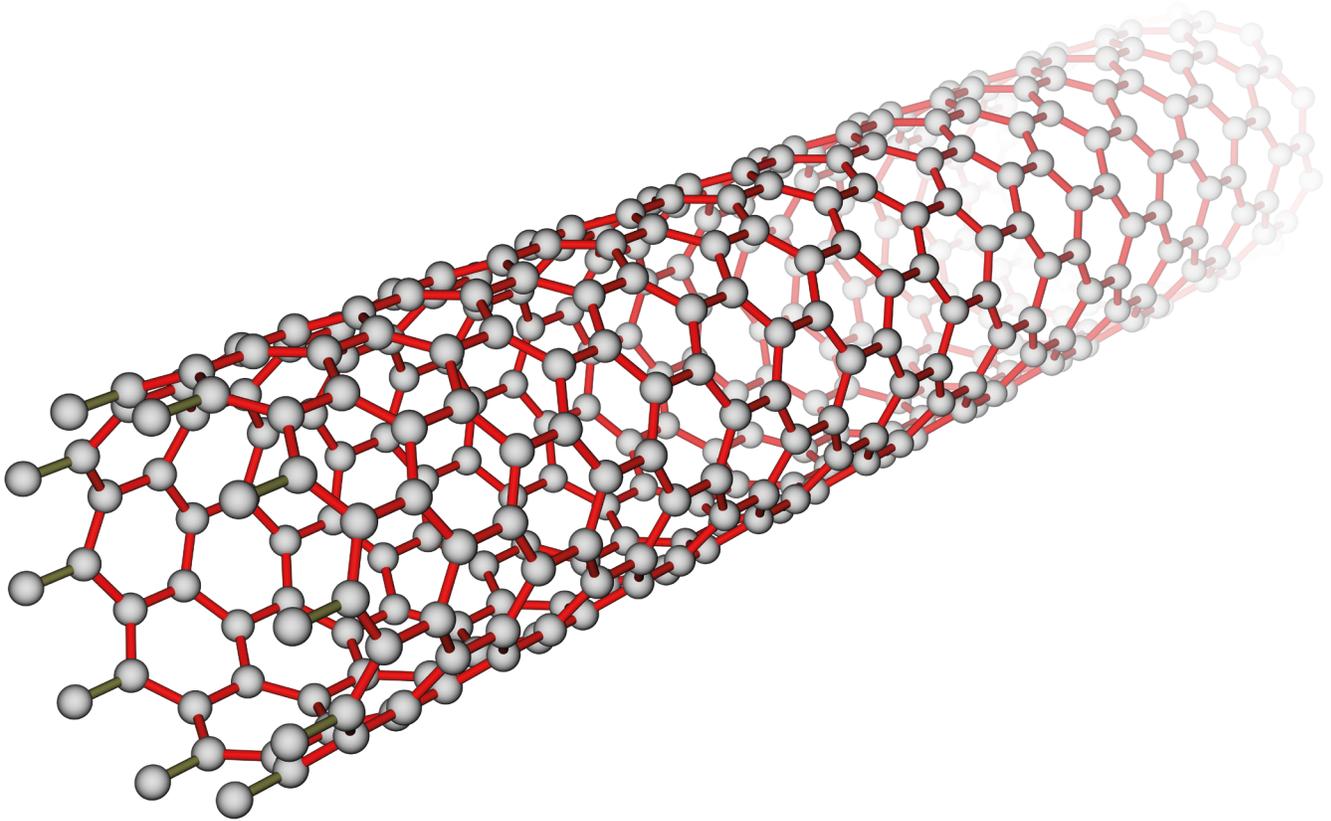


Figura 17: Visualización estructural nanotubos de carbono.

La encapsulación provee un sistema de protección y aumento de la biodisponibilidad de la sustancia activa. En cuanto a los péptidos de defensa, los sistemas revisados aquí pueden ser aplicados en peces de cultivo. Cada uno de los sistemas presentados tiene sus ventajas y desventajas en cuanto al tamaño, grado de toxicidad, biocompatibilidad, degradación, transporte a través de membranas biológicas, capacidad de carga, modificación, etc. Por lo tanto, la respuesta a la pregunta «¿qué sistema de encapsulación usar?» dependerá del objetivo de aplicación.

Referencias

- Chaudhari, A., Ashmore, D., deb Nath, S., Kate, K., Dennis, V., Singh, S., Owen, D., Palazzo, C., Arnold, R. D., Miller, M. & Pillai, S. (2016). A novel covalent approach to bio-conjugate silver coated single walled carbon nanotubes with antimicrobial peptide. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0211-z>
- Cortés-Morales, E., Mendez-Montealvo, G. & Velazquez, G. (2021). Interactions of the molecular assembly of polysaccharide-protein systems as encapsulation materials. A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 295. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102398>
- da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Utpott, M. & Brandelli, A. (2012). Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. *Food Control*, 23(1), 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.008>
- Guo, Z., Lin, Y., Wang, X., Fu, Y., Lin, W. & Lin, X. (2018). The protective efficacy of four iron-related recombinant proteins and their single-walled carbon nanotube encapsulated counterparts against *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish. *Fish and Shellfish Immunology*, 82, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.009>
- Harikrishnan, R., Kim, J., Balasundaram, C. & Heo, M. (2012). Vaccination effect of liposomes entrapped whole cell bacterial vaccine on immune response and disease protection in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 342-343(1), 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.038>
- Hawkyard, M., Laurel, B., Barr, Y., Hamre, K. & Langdon, C. (2015). Evaluation of liposomes for the enrichment of rotifers (*Brachionus* sp.) with taurine and their subsequent effects on the growth and development of northern rock sole (*Lepidopsetta polyxystra*) larvae. *Aquaculture*, 441, 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.012>
- Jampilek, J. & Kralova, K. (2021). Advances in drug delivery nanosystems using graphene-based materials and carbon nanotubes. *Materials*, 14(5), 1-39. <https://doi.org/10.3390/ma14051059>
- Kim, M., Park, J., Shon, Y., Kim, G., Shim, G. & Oh, Y. (2014). Nanotechnology and vaccine development. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(5), 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.002>
- Liu, L., Gong, Y., Liu, G., Zhu, B. & Wang, G. (2016). Protective immunity of grass carp immunized with DNA vaccine against *Aeromonas hydrophila* by using carbon nanotubes as a carrier molecule. *Fish & Shellfish Immunology*, 55, 516-522. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.026>
- Mehra, N. & Palakurthi, S. (2016). Interactions between carbon nanotubes and bioactives: A drug delivery perspective. *Drug Discovery Today*, 21(4), 585-597. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.011>
- Miskeen, S., An, Y. & Kim, J. (2021). Application of starch nanoparticles as host materials for encapsulation of curcumin: Effect of citric acid modification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.133>
- Mohan, A., McClements, D. & Udenigwe, C. (2016). Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. *Food Chemistry*, 213, 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.075>
- Phuong Ta, L., Bujna, E., Kun, S., Charalampopoulos, D. & Khutoryanskiy, V. (2021). Electrospayed mucoadhesive alginate-chitosan microcapsules for gastrointestinal delivery of probiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 597, 120342-120353. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120342>
- Reque, P. & Brandelli, A. (2021). Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 114, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.022>
- Rezaei, N., Mehrnejad, F., Vaezi, Z., Sedghi, M., Asghari, S. & Naderi-Manesh, H. (2020). Corrigendum to "Encapsulation of an endostatin peptide in liposomes: Stability, release, and cytotoxicity study" [Colloids Surf. B Biointerfaces 185 (October) (2019) 110552]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 186, 1105552-1105559. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110694>
- Rocha, C., Silva, M., Guedes, A., Carvalho, T., Eckstein, C., Ribeiro, N., Santos, D., Melo, M., Araújo, M., Martins-Filho, O., Santos, R. & Paixão, T. (2021). Alginate-chitosan microcapsules improve vaccine potential of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* against listeriosis in murine model. *International Journal of Biological Macromolecules*, 176, 567-577. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.056>
- Rodríguez, Y., Laitano, M., Pereira, N., López-Zavala, A., Haran, N. & Fernández-Gimenez, A. (2018). Exogenous enzymes in aquaculture: Alginate and alginate-bentonite microcapsules for the intestinal delivery of shrimp proteases to Nile tilapia. *Aquaculture*, 490, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.022>
- Sharma, A., Vaghasiya, K., Ray, E., Gupta, P., Kumar Singh, A., Datta Gupta, U. & Kumar Verma, R. (2019). Mycobactericidal activity of some micro-encapsulated synthetic Host Defense Peptides (HDP) by expediting the permeation of antibiotic: A new paradigm of drug delivery for tuberculosis. *International Journal of Pharmaceutics*, 558, 231-241. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.076>
- Šillerová, H., Komárek, M., Liu, C., Poch, J. & Villaescusa, I. (2015). Biosorbent encapsulation in calcium alginate: Effects of process variables on Cr(VI) removal from solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 260-270. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.032>

- Tan, P., Tan, T., Chang, H., Tey, B., Chan, E., Lai, O., Baharin, B., Nehdi, I. & Tan, C. (2018). Effects of storage and yogurt matrix on the stability of tocotrienols encapsulated in chitosan-alginate microcapsules. *Food Chemistry*, 241, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.075>
- Yang, C., Qu, J. & Wu, Z. (2021). Mechanical reliability of flexible encapsulation of III-V compound thin film solar cells. *Solar Energy*, 214, 542-550. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2020.12.014>
- Yazdan Madani, S., Naderi, N., Dissanayake, O., Tan, A. & Seifalian, A. (2011). A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2963-2979. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S16923>
- Zhu, B., Liu, G., Gong, Y., Ling, F. & Wang, G. (2015). Protective immunity of grass carp immunized with DNA vaccine encoding the vp7 gene of grass carp reovirus using carbon nanotubes as a carrier molecule. *Fish and Shellfish Immunology*, 42(2), 325-334. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.026>
- Zhu, S., Li, J., Huang, A., Huang, J., Huang, Y. & Wang, G. (2019). Anti-betanodavirus activity of isoprinosine and improved efficacy using carbon nanotubes based drug delivery system. *Aquaculture*, 512, 734377-734386. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734377>
- Zhu, Y., Wang, Z., Bai, L., Deng, J. & Zhou, Q. (2021). Biomaterial-based encapsulated probiotics for biomedical applications: Current status and future perspectives. *Materials and Design*, 210, 110018-110033. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2021.110018>

8. DESAFÍOS PARA LA APLICACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN LA INDUSTRIA ACUÍCOLA

8.1. Usos y aplicaciones actuales de péptidos en la industria

Cerca de 140 millones de toneladas de peces son producidas anualmente por la industria pesquera, de las cuales el 80% es destinado al consumo humano. Es por esto, que muchos países ubican a esta industria como su pilar económico (Benhabiles *et al.*, 2012). Además, se estima que el comercio y la producción de pescado otorgan el sustento económico a 1000 millones de personas tanto directa como indirectamente (Oosterveer, 2008; Zamora-Sillero, Gharsallaoui, & Prentice, 2018). A pesar de estas cifras, la industria pesquera y acuícola se ha encontrado con un gran número de problemas que han generado pérdidas millonarias anuales, donde las enfermedades representan un porcentaje significativo de dichas cifras. Las causas asociadas a esto se deben a la creciente demanda de transporte de ovas y larvas de peces en todo el mundo lo cual dificulta el control de la propagación de enfermedades en la industria, generando un aumento en el uso químicos (Ej. peróxido de hidrógeno y verde malaquita); agentes antihelmínticos (Ej. insecticidas piretroides y avermectina); y antibióticos (Ej. sulfonamidas y tetraciclinas). Los peligros a la salud pública asociados a los antibióticos en la acuicultura incluyen el desarrollo y propagación de la resistencia antimicrobiana, resistencia de genes y la presencia de residuos antimicrobianos en el ambiente. (Romero, Feijoo, & Navarrete, 2012; Valero, Saraiva-Fraga, Costas, & Guardiola, 2020; J. H. Wang *et al.*, 2018).

Como alternativa a las soluciones actuales para el control de estas enfermedades en acuicultura se encuentra el uso de péptidos antimicrobianos (PAMs) provenientes de peces. Estos son pequeñas moléculas que actúan en la respuesta inmune innata de los peces y son de suma importancia en la primera barrera de defensa (piel, branquias e intestino) contra diferentes tipos de patógenos (Valero *et al.*, 2020). Los peces poseen la capacidad de expresar las principales clases de PAMs, donde se incluyen las defensinas, catelicidinas, las hepcidinas, los péptidos derivados de histona y las piscidinas; y estas últimas son una clase de la familia de las cecropinas de peces. Además, los péptidos de peces poseen una actividad antimicrobiana de amplio

espectro, son inmunomoduladores y algunos pueden tolerar elevadas concentraciones salinas. Por estas razones, los PAMs provenientes de los peces poseen un especial interés para el desarrollo de tratamientos antimicrobianos en la industria acuícola de peces (Masso-Silva & Diamond, 2014).

La industria acuícola en especial la de los peces se desarrolla bajo prácticas de acuicultura intensiva, la cual es susceptible a la aparición de brotes de enfermedades, en su mayoría causadas por bacterias y virus que causan mortalidades elevadas y pérdidas de producción de las especies cultivadas. Es por esto también que se han desarrollado vacunas para prevenir enfermedades, especialmente para los salmónidos. Sin embargo, no existen vacunas eficaces para otros peces o patógenos que afectan esta industria a escala mundial (Adams, 2019; Muniesa *et al.*, 2020). Por lo tanto, la industria acuícola enfoca sus esfuerzos en el desarrollo e investigación de los péptidos antimicrobianos como solución a un problema recurrente. La tabla 3 muestra un listado de algunos PAMs de peces con potencial aplicación en la industria acuícola frente a patógenos que afectan los cultivos.

Por otra parte, la industria acuícola chilena de gran importancia para el desarrollo económico del país, se caracteriza principalmente por el cultivo de tres especies: el salmón atlántico (*Salmo salar*) la principal especie producida con un 75% de producción; seguida por el Salmon coho (*Oncorhynchus kisutch*) con un 16,3% y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con un 8,7% de la producción nacional (Flores-Kosack, Montero, Köllner, & Maisey, 2020). En Chile las enfermedades infecciosas en salmónidos provocan pérdidas cercanas a los 700 millones de dólares al año, lo que ha conllevado a un mayor uso de antibióticos, vacunas y antiparasitarios. En el caso del salmón del atlántico, el principal problema en los cultivos chilenos es la septicemia rickettsial salmonídea (SRS) causada por la bacteria *Piscirickettsia salmonis* que, junto a otros brotes de enfermedades, revelan que las vacunas no proporcionan niveles aceptables de protección inmunológica a través del tiempo (Maisey, Montero, & Christodoulides, 2017).

Tabla 3: Actividad antimicrobiana de los PAMs de peces descritos por Masso-Silva & Diamond (2014).

PAMs	Tipo de patógeno		
	Bacterias	Parásitos	Virus
β-Defensina	<i>E. coli</i> ; <i>Aeromonas salmonicida</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Aeromonas sobria</i> ; <i>Vibrio anguillarum</i> ; <i>Vibrio fluvialis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	-	El virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV); virus de la necrosis nerviosa (NNV); Virus rana grylio (RGV); Iridovirus del mero de Singapur (SGIV).
Piscidina	<i>E. coli</i> ; <i>Yersinia enterocolitica</i> ; <i>Aeromonas salmonicida</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Aeromonas sobria</i> ; <i>Aeromonas punctata</i> ; <i>Vibrio anguillarum</i> ; <i>Vibrio harveyi</i> ; <i>Vibrio alginolyticus</i> ; <i>Vibrio vulnificus</i> ; <i>Vibrio damsela</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Cytophaga columnare</i> ; <i>Cytophaga aquatilis</i> ; <i>Proteus vulgaris</i> ; <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscidida</i> ; <i>Lactococcus garviae</i> ; <i>Leucothrix mucor</i> .	<i>Trichodina</i> ; <i>Cryptocaryon theront</i> ; <i>Amyloodinium dinospore</i> ; <i>Ichthyophthirius theront</i> .	NNV; virus del bagre de canal (CCV).
Hepcidina	<i>E. coli</i> ; <i>Plesiomonas shigelloides</i> ; <i>Yersinia enterocolitica</i> ; <i>Aeromonas salmonicida</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Vibrio anguillarum</i> ; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ; <i>Vibrio fluvialis</i> ; <i>Vibrio harveyi</i> ; <i>Vibrio alginolyticus</i> ; <i>Vibrio vulnificus</i> ; <i>Vibrio damsela</i> ; <i>Edwardsiella tarda</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> .		VHSV; NNV; Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV); SGIV.
Catelicidina	<i>E. coli</i> ; <i>Aeromonas salmonicida</i> ; <i>Vibrio anguillarum</i> ; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ; <i>Vibrio fluvialis</i> ; <i>Vibrio harveyi</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	-	-
Derivado de histona	<i>E. coli</i> ; <i>Aeromonas salmonicida</i> ; <i>Aeromonas sobria</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	-	-

En la actualidad no existen reportes sobre el uso a gran escala de PAMs en la industria acuícola chilena. Sin embargo, en los últimos años la academia y las empresas relacionadas al rubro han comenzado colaboraciones en búsqueda de tecnologías basadas en PAMs que reduzcan las grandes pérdidas económicas anuales. Como consecuencia, en el año 2016 la empresa Salmones Antártica y el Laboratorio de Genómica Marina y Cultivo Celular de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción desarrollaron un proyecto Innova

de la línea de Validación de CORFO. El objetivo del proyecto era validar a escala piloto, en condiciones reales de cultivo de salmónidos, un prototipo basado en PAMs identificados en la especie *Salmo salar* y con los cuales demostraron su actividad microbicida e inmunomoduladora con un alto impacto en la calidad, la eficacia, y la dirección de la respuesta inmune conectando la inmunidad innata y adaptativa en los peces (Morales, 2016). Por otra parte, el Núcleo de Biotecnología de Curauma (NBC) de Valparaíso y su Laboratorio de Síntesis de Péptidos presta servicios

I+D+i a empresas que buscan soluciones basadas en el uso de péptidos; es por esto, que entre los años 2010-2012 ofrecieron servicios de síntesis química de epítopes para la producción de 200 mg del péptido sintético FIS (Factor for Inversion Stimulation por sus iniciales en inglés) útiles para inmunizaciones en la empresa «Pesquera Antares S.A.». Además, el NBC en el año 2017 participó en el proyecto CORFO 11IDL3-12066 denominado «Péptidos sintéticos diseñados y dirigidos contra el ensamblaje del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa IPNV» en colaboración con la Fundación Fraunhofer Chile Research cuyo objetivo era valorizar y proteger la propiedad intelectual de la tecnología y proceso para obtener péptidos sintéticos, diseñados y dirigidos contra el ensamblaje del IPNV (NBC-PUCV, 2017).

En el contexto de la falta de información respecto al uso de péptidos en la industria, es importante resaltar que sería importante el desarrollo de una base de datos que agrupe las tecnologías e innovaciones que se encuentran desarrollando en el país para mitigar las pérdidas económicas de la industria acuícola. Esto podría ayudar a direccionar el flujo de los esfuerzos hacia soluciones conjuntas academia-industria, y con el aporte de entidades del estado (CORFO, ANID, entre otros) para el enriquecimiento de esta base de datos, el motor económico acuícola se verá fortalecido para enfrentar las futuras crisis económicas y alimentarias.

8.2. Beneficios en el uso de péptidos

Como se mencionó con anterioridad, el uso de PAMs en la acuicultura chilena representa una propuesta de valor importante en el sector para solucionar los problemas causados por las enfermedades en los peces de interés comercial. Esto se debe principalmente a que son los componentes clave del sistema inmunitario innato y desempeñan diversas funciones biológicas que ofrecen inmunocompetencia y homeostasis a los organismos vivos. Los factores necesarios para la inducción de la expresión de PAMs son los patrones moleculares asociados a daños (DAMPs, por sus iniciales en inglés) y asociados a patógenos (PAMPs, por sus iniciales en inglés). Además, su inocuidad considera efectos positivos al medio ambiente en las zonas de acuicultura intensiva (Chaturvedi, Bhat, & Pande, 2020). En este contexto, diferentes tejidos de peces pueden ser fuente de obtención de los PAMs y se muestran en la tabla 4.

A pesar de la presencia de PAMs en diferentes tipos de tejidos de los peces de interés comercial, la obtención de los péptidos desde sus fuentes naturales no resulta ser un método viable para el aislamiento de estos, debido a su poca biodisponibilidad. Por lo tanto, el uso de péptidos sintéticos se proyecta como la fuente de producción más viable pensando en un proceso de aplicación a escala industrial.

Tabla 4: Fuentes de obtención de PAMs en peces.
Adaptado de Chaturvedi *et al.* (2020).

PAMs	Especies	Longitud y peso molecular	Sitio de expresión	Actividad	Referencias
Defensinas	<i>Megalobrama amblycephala</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Tetraodon</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Cyprinus carpio</i> .	29–45; 4–6 kDa.	Epitelio de la piel, testículos, hipófisis, células caliciformes mucosas.	Antibacterial and antiviral.	(Chaturvedi <i>et al.</i> , 2020; Jin <i>et al.</i> , 2010; Liang <i>et al.</i> , 2013; Zhou <i>et al.</i> , 2019).
Piscidinas	<i>Varias especies.</i>	22–55, 2.5–6 kDa.	Mastocitos de la piel, riñón, bazo, sistema digestivo y branquias.	Antiparasitaria, antiviral, antibacteriana y antitumoral.	(Macedo <i>et al.</i> , 2021; Salger, Cassady, Reading, & Noga, 2016) (Yemiskan <i>et al.</i> , 2018).
Hepcidinas	<i>Sparus aurata</i> , <i>Oreochromis niloticus</i> , <i>Scophthalmus maximus</i> .	20–26, 2.3–2.6 kDa.	Epitelio de la piel, branquias, riñón, hígado, corazón y bazo.	Antibacterial and antiviral.	(Chia, Wu, Chen, & Chi, 2010; Gui, Zhang, Zhang, & Zhang, 2016; Y.-D. Wang, Kung, & Chen, 2010).
Catelicidinas	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Salmo salar</i> , <i>Gadus morhua</i> .	36, 3.8 kDa.	Mastocitos, branquias, riñón, intestino, piel y el bazo.	Antibacterial.	(Brunner, Varga, & Dixon, 2020).
Derivados de histona.	<i>Oncorhynchus mykiss.</i> , <i>Ictalurus punctatus</i> .	69–128, 7.0–13.8 kDa.	Células caliciformes mucosas.	Antibacterial y antifúngica.	(Fernandes, Kemp, Molle, & Smith, 2002; Robinette <i>et al.</i> , 1998).

8.3. Desafíos para la aplicación de péptidos a gran escala

En los últimos años, el interés por los péptidos en la industria ha crecido significativamente, un ejemplo claro es la industria farmacéutica, con más de 50 fármacos peptídicos en el mercado, unos 170 en ensayos clínicos y más de 200 en desarrollo preclínico (Isidro-Llobet *et al.*, 2019). En este contexto, el interés de los péptidos en la acuicultura para mitigar problemas de enfermedades en la industria no ha sido ajeno a esta tendencia. Sin embargo, uno de los grandes retos de la producción de péptidos para fines comerciales, es su producción a gran escala. Como se menciona en un capítulo de química de péptidos, existen diferentes métodos para la síntesis de péptidos dentro los cuales se destacan: la tecnología de ADN recombinante, la síntesis enzimática y la síntesis química. La tecnología de producción seleccionada

depende mucho del tamaño de la molécula a sintetizar (Guzmán, Barberis, & Illanes, 2007).

En el caso de la tecnología de ADN recombinante, esta es utilizada para la síntesis de péptidos de gran tamaño y proteínas. Especialmente hormonas como la insulina humana, hormona humana del crecimiento, somatostatina y timosina α -1 (Walsh, 2005; Wengenmayer, 1983). En el caso de la síntesis enzimática, esta es más restringida ya que, su potencial se basa en la síntesis de péptidos muy pequeños, en su mayoría se reportan dipéptidos y tripéptidos (Guzmán *et al.*, 2007; Kumar & Bhalla, 2005). Respecto a la síntesis química, es una de las técnicas más empleada y puede realizarse a través de dos métodos: síntesis de péptido en fase líquida (SPFL) y síntesis de péptido en fase sólida (SPFS). La SPFL se realiza en solución, lo que requiere una cuidadosa manipulación de los grupos protectores y trabajos más complejos. El uso de este método no

es recomendable para péptidos largos y complejos, pero aún sigue vigente para la síntesis de péptidos y fragmentos de corto tamaño (Isidro-Llobet *et al.*, 2019; Verlander, 2007). Por otro lado, la SPFS previamente explicada y detallada en el capítulo de síntesis química del presente libro, consiste en la elongación de una cadena peptídica anclada a una matriz sólida mediante adiciones sucesivas de aminoácidos que se enlazan mediante la formación de enlaces amida entre el grupo carboxilo del aminoácido entrante y el grupo amino del aminoácido previamente unido a la matriz (Guzmán *et al.*, 2007). Entre las tecnologías disponibles para la síntesis de péptidos a nivel productivo, la síntesis química es la más desarrollada, y en el caso de la SPFP es la más madura y puede combinarse con la SPFL (síntesis híbrida) para la síntesis de péptidos de gran tamaño.

Usualmente péptidos con menos de 30 aminoácidos se sintetizan por SPFS secuencial, mientras que péptidos más grandes de hasta 60 aminoácidos, se producen por síntesis convergente. Péptidos muy grandes y proteínas se producen a través de la técnica de ligación química. Al ser procesos multietapa, entre más aminoácidos tenga el péptido, el número de operaciones aumenta. Por ejemplo, la síntesis de un péptido de 10 -20 aminoácidos involucra de 20-50 operaciones (acoples, desprotección y remoción), lo cual a nivel de laboratorio no es muy relevante, pero para una síntesis a escala industrial representa un desafío tecnológico debido al costo de producción y el impacto ambiental causado por los reactivos usados durante el proceso (Guzmán, 2013). Se estima que por cada kilogramo de péptido producido se producen 1000 litros de residuos líquidos los cuales tienen componentes muy nocivos para el medio ambiente (Andersson *et al.*, 2000).

Es importante destacar que, con el creciente interés por grandes cantidades de péptidos complejos, largos, modificados químicamente y extra puros para usos terapéuticos o para la investigación básica en diferentes áreas, es imperativo buscar formas alternativas y eficaces para fabricarlos. Los avances y mejoras en la química de los péptidos sintéticos, así como los materiales y reactivos utilizados para la síntesis (resinas, derivados de aminoácidos, reactivos de acoplamiento, etc.) y los sistemas de purificación se han empleado para afrontar los retos actuales en la fabricación de péptidos a gran escala (Petrou & Sarigiannis, 2018).

Aunque la SPFS es actualmente la mejor opción para la síntesis de péptidos, todavía existen desafíos que deben ser abordados. Los cuales incluyen:

- Economía del proceso de síntesis.
- Pureza del producto final.
- Seguridad del proceso.
- Tratamiento de los residuos y su impacto en el medio ambiente.

Para finalizar, existen más de 60 péptidos en el mercado, alrededor de 150 fármacos peptídicos en ensayos clínicos y más de 500 en desarrollo preclínico (Fosgerau & Hoffmann, 2015). Esto sin contar los péptidos que se utilizan en otras industrias como la acuicultura y agricultura. Además, la amplia diversidad y la existencia de lagunas del conocimiento en la aplicación de péptidos sigue llamando la atención de científicos de diferentes áreas. Por lo tanto, el uso y producción de péptidos en la acuicultura se considera un océano azul de oportunidades para aportar a desarrollo económico e industrial de Chile. El futuro es prometedor.

Referencias

- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish Shellfish Immunol*, 90, 210-214. doi:10.1016/j.fsi.2019.04.066
- Andersson, L., Blomberg, L., Flegel, M., Lepsa, L., Nilsson, B., & Verlander, M. (2000). Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers*, 55(3), 227-250. doi:10.1002/1097-0282(2000)55:3<227::Aid-bip50>3.0.Co;2-7
- Benhabiles, M. S., Abdi, N., Drouiche, N., Lounici, H., Paus, A., Goosen, M. F. A., & Mameri, N. (2012). Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. *Materials Science and Engineering: C*, 32(4), 922-928. doi:https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.013
- Brunner, S. R., Varga, J. F. A., & Dixon, B. (2020). Antimicrobial Peptides of Salmonid Fish: From Form to Function. *Biology*, 9(8). doi:10.3390/biology9080233
- Chaturvedi, P., Bhat, R. A. H., & Pande, A. (2020). Antimicrobial peptides of fish: innocuous alternatives to antibiotics. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 85-106. doi:https://doi.org/10.1111/raq.12306
- Chia, T. J., Wu, Y. C., Chen, J. Y., & Chi, S. C. (2010). Antimicrobial peptides (AMP) with antiviral activity against fish nodavirus. *Fish Shellfish Immunol*, 28(3), 434-439. doi:10.1016/j.fsi.2009.11.020
- Fernandes, J. M. O., Kemp, G. D., Molle, M. G., & Smith, V. J. (2002). Anti-microbial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochemical Journal*, 368(2), 611-620. doi:10.1042/bj20020980
- Flores-Kossack, C., Montero, R., Köllner, B., & Maisey, K. (2020). Chilean aquaculture and the new challenges: Pathogens, immune response, vaccination and fish diversification. *Fish & Shellfish Immunology*, 98, 52-67. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.093
- Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 20(1), 122-128. doi:https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003
- Gui, L., Zhang, P., Zhang, Q., & Zhang, J. (2016). Two hepcidins from spotted scat (*Scatophagus argus*) possess antibacterial and antiviral functions in vitro. *Fish & Shellfish Immunology*, 50, 191-199. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.038
- Guzmán, F. (2013). Síntesis de péptidos. In *Genómica funcional, Fundamentos y aplicaciones*. Valparaíso - Chile: USM editorial.
- Guzmán, F., Barberis, S., & Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 279-314. Retrieved from http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582007000200012&nrm=iso
- Isidro-Llobet, A., Kenworthy, M. N., Mukherjee, S., Kopach, M. E., Wegner, K., Gallou, F., . . . Roschangar, F. (2019). Sustainability Challenges in Peptide Synthesis and Purification: From R&D to Production. *The Journal of Organic Chemistry*, 84(8), 4615-4628. doi:10.1021/acs.joc.8b03001
- Jin, J.-Y., Zhou, L., Wang, Y., Li, Z., Zhao, J.-G., Zhang, Q.-Y., & Gui, J.-F. (2010). Antibacterial and Antiviral Roles of a Fish β -Defensin Expressed Both in Pituitary and Testis. *PLOS ONE*, 5(12), e12883. doi:10.1371/journal.pone.0012883
- Kumar, D., & Bhalla, T. C. (2005). Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 726-736. doi:10.1007/s00253-005-0094-7
- Liang, T., Ji, W., Zhang, G. R., Wei, K. J., Feng, K., Wang, W. M., & Zou, G. W. (2013). Molecular cloning and expression analysis of liver-expressed antimicrobial peptide 1 (LEAP-1) and LEAP-2 genes in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish Shellfish Immunol*, 35(2), 553-563. doi:10.1016/j.fsi.2013.05.021
- Macedo, M. W. F. S., Cunha, N. B. d., Carneiro, J. A., Costa, R. A. d., Alencar, S. A. d., Cardoso, M. H., . . . Dias, S. C. (2021). Marine Organisms as a Rich Source of Biologically Active Peptides. *Frontiers in Marine Science*, 8, 889. Retrieved from https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2021.667764
- Maisey, K., Montero, R., & Christodoulides, M. (2017). Vaccines for piscirickettsiosis (salmonid rickettsial septicaemia, SRS): the Chile perspective. *Expert Review of Vaccines*, 16(3), 215-228. doi:10.1080/14760584.2017.1244483
- Masso-Silva, J. A., & Diamond, G. (2014). Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 7(3), 265-310. doi:10.3390/ph7030265
- Morales, B. (2016). Investigadores de Cs. Biológicas responden a problemas de la industria salmoneera. Retrieved from http://www.udec.cl/panoramaweb2016/content/investigadores-de-cs-biol%C3%B3gicas-responden-problemas-de-la-industria-salmoneera-0
- Muniesa, A., Basurco, B., Aguilera, C., Furones, D., Reverté, C., Sanjuan-Vilaplana, A., . . . Tavorpanich, S. (2020). Mapping the knowledge of the main diseases affecting sea bass and sea bream in Mediterranean. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(3), 1089-1100. doi:https://doi.org/10.1111/tbed.13482
- NBC-PUCV. (2017). Núcleo de Biotecnología de Curauma. Retrieved from http://nbcpucv.cl/wp-content/themes/nbc/pdf/CV_NBC_2017.pdf
- Oosterveer, P. (2008). Governing global fish provisioning: Ownership and management of marine resources. *Ocean & Coastal Management*, 51(12), 797-805. doi:https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2008.08.002
- Petrou, C., & Sarigiannis, Y. (2018). 1 - Peptide synthesis: Methods, trends, and challenges. In S. Koutsopoulos (Ed.), *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering* (pp. 1-21): Woodhead Publishing.
- Robinette, D., Wada, S., Arroll, T., Levy, M. G., Miller, W. L., & Noga, E. J. (1998). Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54(5), 467-475. doi:10.1007/s000180050175

- Romero, J., Feijoo, C. G., & Navarrete, P. (2012). Antibiotics in Aquaculture@ Use, Abuse and Alternatives.
- Salger, S. A., Cassady, K. R., Reading, B. J., & Noga, E. J. (2016). A Diverse Family of Host-Defense Peptides (Piscidins) Exhibit Specialized Anti-Bacterial and Anti-Protozoal Activities in Fishes. *PLOS ONE*, *11*(8), e0159423. doi:10.1371/journal.pone.0159423
- Valero, Y., Saraiva-Fraga, M., Costas, B., & Guardiola, F. A. (2020). Antimicrobial peptides from fish: beyond the fight against pathogens. *Reviews in Aquaculture*, *12*(1), 224-253. doi:https://doi.org/10.1111/raq.12314
- Verlander, M. (2007). Industrial Applications of Solid-Phase Peptide Synthesis – A Status Report. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *13*(1), 75-82. doi:10.1007/s10989-006-9075-7
- Walsh, G. (2005). Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Appl Microbiol Biotechnol*, *67*(2), 151-159. doi:10.1007/s00253-004-1809-x
- Wang, J. H., Lu, J., Zhang, Y. X., Wu, J., Luo, Y., & Liu, H. (2018). Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes in coastal industrial mariculture systems. *Bioresour Technol*, *253*, 235-243. doi:10.1016/j.biortech.2018.01.035
- Wang, Y.-D., Kung, C.-W., & Chen, J.-Y. (2010). Antiviral activity by fish antimicrobial peptides of epinecidin-1 and hepcidin 1–5 against nervous necrosis virus in medaka. *Peptides*, *31*(6), 1026-1033. doi:https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.02.025
- Wengenmayer, F. (1983). Synthesis of Peptide Hormones using Recombinant DNA Techniques. *Angewandte Chemie International Edition in English*, *22*(11), 842-858. doi:https://doi.org/10.1002/anie.198308421
- Yemisen, E., AYDOĞDU, E. Ö. A., DOĞRUÖZ, N., GÜNGÖR, N. Ö. Ş., KESİKTAŞ, M., & YILDIZ, T. (2018). Antimicrobial Activities of Bacterial Strains Isolated from Skin Mucus of Some Elasmobranch Fishes. *Fisheries and Aquatic Sciences*.
- Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A., & Prentice, C. (2018). Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties: an Overview. *Marine Biotechnology*, *20*(2), 118-130. doi:10.1007/s10126-018-9799-3
- Zhou, Y., Lei, Y., Cao, Z., Chen, X., Sun, Y., Xu, Y., . . . Liu, C. (2019). A β -defensin gene of *Trachinotus ovatus* might be involved in the antimicrobial and antiviral immune response. *Developmental & Comparative Immunology*, *92*, 105-115. doi:https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.11.011

AGRADECIMIENTOS

Las y los autores agradecen a sus centros de investigación y especialmente:

Al proyecto Redes de investigación en Biotecnología Chile-Perú, concurso año 2019 «Implementación de una red de colaboración Chile-Perú para el control patógenos bacterianos de salmónidos a través de la aplicación de péptidos antimicrobianos». CONICYT-CONCYTEC REDBIO0009.

Al Research Program in Climate Action Planning del Concurso de fortalecimiento al desarrollo científico de centros regionales 2020-R20F0008-CEAZA.

Al Programa para la Gestión Sanitaria de la Acuicultura (PGSA)/Fondo de inversión Estratégica (FIE) del Ministerio de Economía de Chile (2017-08070149).

A los proyectos FONDECYT 1191763, 11180042, 11170244 y 1210056 de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), Chile.



Mejorar las respuestas fisiológicas de peces es una constante necesidad para incrementar la productividad de piscifactorías. Lo anterior requiere identificar moléculas que puedan ser utilizadas para modular o reforzar su respuesta inmunológica frente a patógenos, regular su sistema endocrino o facilitar su desarrollo reproductivo en cautiverio.

En este libro exploramos cómo los péptidos pueden ser utilizados en interesantes estrategias para mejorar el desempeño de peces bajo cultivo, así como también identificar aquellas brechas que aún deben trabajarse para su aplicación a gran escala.