



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA Y ACUICULTURA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MITICINAS EN
*MYTILUS CHILENSIS***

ANTONIA IGNACIA COFRÉ AGUILERA

SEMINARIO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN, CHILE 2026

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MITICINAS EN
*MYTILUS CHILENSIS***

Por

ANTONIA IGNACIA COFRÉ AGUILERA

Profesor guía

DR. CRISTIAN GALLARDO ESCÁRATE

SEMINARIO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN, CHILE 2026

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA Y ACUICULTURA

Este seminario de título ha sido realizado en la unidad de Biotecnología marina,
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Profesor guía:	Dr. Cristian Gallardo Escárate Departamento de Oceanografía crisgallardo@udec.cl Universidad de Concepción, Concepción
Comisión evaluadora:	Dr. Fernando Cruzat Cruzat (fecruzat@udec.cl) Dra. Yeny Leal Acosta (yleal@udec.cl)
Coordinador de seminario de título:	Dr. Fernando Cruzat Cruzat Departamento de Oceanografía fecruzat@udec.cl Universidad de Concepción, Concepción

DEDICATORIA

Para Victoria.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo profundamente a mi profesor guía, Dr. Cristian Gallardo Escárate, por su orientación constante, su paciencia y la confianza depositada en mí durante todo el desarrollo de este trabajo. Ha sido una experiencia invaluable.

Agradezco también al Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola (LBGA), INCAR, en el centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, Concepción, Chile y a todo su equipo por brindarme el espacio, recursos, apoyo y colaboración necesaria para llevar a cabo los experimentos y análisis que hicieron posible esta investigación. En especial, agradezco a Yeny por toda su ayuda, recomendaciones y apoyo emocional brindado durante este proceso. Así mismo, agradezco a Camila por su ayuda dentro del laboratorio, por su paciencia y disposición. Al equipo del LBGA por acogerme en su espacio e incluirme de manera tan cariñosa y considerada. Sin duda son momentos y conversaciones que se quedarán en mi memoria.

Extiendo mi agradecimiento a la profesora Dra. Allisson Astuya, por ponerme en el camino correcto a lo largo de mi paso por la universidad, justo cuando más lo necesitaba.

A mis amigos, Juan y Aranza, muchas gracias por su compañía, discusiones tanto científicas como casuales, por las risas y el apoyo incondicional en los momentos más difíciles de este proceso. Haber compartido este camino con ustedes ha sido un privilegio.

A mi familia, gracias por su cariño, comprensión y paciencia a lo largo de estos años de formación. A mi hija Victoria, por ser mi mayor inspiración y la razón más profunda para seguir adelante incluso en los días más agotadores.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Inmunidad innata en invertebrados marinos	1
1.2. AMPs.....	2
1.2.1. Caracterización molecular de los AMPs	6
1.2.2. Modelos para interpretar mecanismos de acción en AMPs	7
1.2.3. AMPs en moluscos bivalvos	8
1.3. Miticinas.....	9
1.4. Mejillón azul “ <i>Mytilus chilensis</i> ”	12
1.4.1. Defensas en <i>M. chilensis</i>	14
1.5. HIPÓTESIS.....	18
1.6. OBJETIVOS	18
1.6.1. Objetivo general	18
1.6.2. Objetivos específicos	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1. Obtención de secuencias	19
2.2. Análisis bioinformático	19
2.2.1. Análisis filogenético.....	19
2.2.2. Predicción de actividad antimicrobiana (AMPA)	20
2.2.4. Predicción de hélices transmembrana (TMHMM)	20
2.3. Diseño experimental.....	20
2.3.1. Desafío de <i>M. chilensis</i> frente a <i>V. anguillarum</i> y STM2457.	20
2.3.2. Extracción de RNA mediante TRIzol	21
2.3.3. Síntesis de cDNA	22
2.3.4. Diseño de partidores.....	22
2.3.5. RT-qPCR y análisis de expresión	23
3. RESULTADOS	25
3.1. Análisis filogenético.....	25
3.2. Análisis antimicrobiano	32
3.2.1. Predicción de actividad antimicrobiana	32
3.2.2. Análisis ProP-1.0.....	35
3.2.3. Análisis TMHMM-2.0	37
3.2.4. Análisis DeepLoc-2.1	40

3.3. Caracterización fisicoquímica	43
3.4. Evaluación de la expresión génica de miticinas en hemocitos de <i>M. chilensis</i>	46
4. DISCUSIÓN	49
5. CONCLUSIÓN	61
BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: COMPARACIÓN ENTRE MITICINA A Y B, VERSUS MITICINA C	10
TABLA 2: SECUENCIA FORWARD Y REVERSE DISEÑADAS CON GENEIOUS PRIME PARA LOS PARTIDORES ESPECÍFICOS DE CADA SECUENCIA DE MITICINA C, C-X1 Y B.	22
TABLA 3: RESULTADOS DE BLAST DE MITICINA B.....	25
TABLA 4: RESULTADOS DE BLAST DE MITICINA C.....	26
TABLA 5: RESULTADOS DE BLAST DE MITICINA C-X1.....	27
TABLA 6: LONGITUD DE LAS SECUENCIAS UTILIZADAS PARA ANÁLISIS FILOGENÉTICO.	28
TABLA 7: COMPARACIÓN DE DISTANCIAS EVOLUTIVAS Y CONSERVACIÓN ENTRE ISOFORMAS DE MITICINAS. MITICINA C MUESTRA MAYOR CONSERVACIÓN, INDICANDO PRESIÓN SELECTIVA MÁS RESTRICTIVA. MITICINA B PRESENTA VARIABILIDAD. MITICINA C-X1 MUESTRA UN PATRÓN INTERMEDIO.....	31
TABLA 8: SÍNTESIS DE PREDICCIONES ESTRUCTURALES.	34
TABLA 9: COMPOSICIÓN FÍSICOQUÍMICA DE MITICINAS B, C Y C-X1 EN M. CHILENSIS.	44
TABLA 10: COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA DE MITICINA B, C Y C-X1 EN M. CHILENSIS....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA LIBERACIÓN DE AMPs TRAS UNA ESTIMULACIÓN BACTERIANA EN <i>M. GALLOPROVINCIALIS</i> . (COSTA PORTELA, 2008, FIGURA 8, P. 51).	3
FIGURA 2: FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS AMPs (ZHANG & GALLO, 2016).	3
FIGURA 3: MODELOS PROPUESTOS DE MECANISMOS LÍTICOS DE MEMBRANA MEDIADOS POR AMP. (A) MODELO DE PORO TOROIDAL: LA AGREGACIÓN EN CASCADA DE MONÓMEROS DE PÉPTIDO EN LA MEMBRANA PROVOCA QUE LAS PORCIONES LIPÍDICAS SE PLIEGUEN HACIA EL INTERIOR, FORMANDO UN CANAL CONTINUO. (B) MODELO DE BARRIL DE DUELAS: LOS MONÓMEROS DEL PÉPTIDO SE DISPONEN PARALELOS A LOS FOSFOLÍPIDOS DE LA MEMBRANA, FORMANDO UN CANAL DE TRANSMEMBRANA HIDROFÍLICO. (C) MODELO TIPO ALFOMBRA: LA ACUMULACIÓN DE PÉPTIDOS EN LA SUPERFICIE INDUCE DEBILIDADES LOCALES Y DESCOMPONE LAS BICAPAS EN PEQUEÑAS ÁREAS REVESTIDAS POR UNIDADES DE PÉPTIDO, DANDO UN ASPECTO DE ALFOMBRA (LE ET AL., 2017).	8
FIGURA 4: ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS IDENTIFICADAS MEDIANTE ANÁLISIS BLAST.	29
FIGURA 5: ÁRBOL FILOGENÉTICO MITICINAS B, C Y C-X1. EN ROJO ESTÁ LA SECUENCIA OBTENIDA DE <i>M. CHILENSIS</i>	30
FIGURA 6: ANÁLISIS DE AMPA DE LAS SECUENCIAS COMPLETAS DE MITICINAS DE <i>M. CHILENSIS</i> . SE PRESENTA EL ÍNDICE ANTIMICROBIANO PROMEDIO (EJE Y) EN FUNCIÓN DE LA POSICIÓN AMINOACÍDICA (EJE X) PARA MITICINA B (A), MITICINA C (B) Y MITICINA C-X1 (C). LA LÍNEA HORIZONTAL PUNTEADA INDICA EL UMBRAL DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA (0.225). VALORES POR ENCIMA DEL UMBRAL INDICAN REGIONES CON CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS COMPATIBLES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DIRECTA.	34
FIGURA 7: ANÁLISIS DE SITIOS DE CLIVAJE DE PROTEASAS PREDICHOS POR PROp 1.0 EN MITICINAS DE <i>M. CHILENSIS</i> . SE PRESENTAN GRÁFICOS DEL POTENCIAL DE CLIVAJE DE PROPEPTIDO (EJE Y) EN FUNCIÓN DE LA POSICIÓN AMINOACÍDICA (EJE X) PARA MITICINA B (A), MITICINA C (B) Y MITICINA C-X1 (C). LA LÍNEA HORIZONTAL	

MAGENTA REPRESENTA EL UMBRAL DE PROBABILIDAD (0.5) PARA LA PREDICCIÓN DE CLIVAJE. LAS BARRAS AZUL CLARO REPRESENTAN EL CLIVAJE DE LA PÉPTIDO SEÑAL, MIENTRAS QUE LAS BARRAS AZUL OSCURO REPRESENTAN PREDICCIONES DE CLIVAJE DE PROPÉPTIDO.....37

FIGURA 8: ANÁLISIS PREDICTIVO TMHMM DE LAS SECUENCIAS COMPLETAS DE M. CHILENSIS. SE PRESENTAN GRÁFICOS DE PROBABILIDAD POSTERIOR PARA CADA ESTADO TOPOLÓGICO (EJE Y) EN FUNCIÓN DE LA POSICIÓN AMINOACÍDICA (EJE X) PARA MITICINA B (A), MITICINA C (B) Y MITICINA C-X1 (C). LAS BARRAS MORADAS REPRESENTAN PROBABILIDAD DE DOMINIO TRANSMEMBRANAL, BARRAS AZUL CLARO REPRESENTAN PROBABILIDAD DE REGIÓN INTRACELULAR (INSIDE) Y LAS BARRAS NARANJAS REPRESENTAN LA PROBABILIDAD DE SECRETAR A REGIONES EXTRACELULARES (OUTSIDE).....39

FIGURA 9: ANÁLISIS DE PREDICCIÓN DE PÉPTIDOS SEÑAL MEDIANTE DEEPLOC-2.1 EN MITICINAS DE M. CHILENSIS. SE PRESENTAN GRÁFICOS DE PREDICCIÓN DE PÉPTIDO SEÑAL PARA MITICINA B (A), MITICINA C (B) Y MITICINA C-X1 (C). LA COLORACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA INDICA LA PROBABILIDAD DE PERTENENCIA A UNA REGIÓN DE PÉPTIDO SEÑAL (AZUL) O REGIÓN EN AUSENCIA DE ESTA SEÑAL CONVENCIONAL (NARANJA Y ROJA).....43

FIGURA 10: EXPRESIÓN RELATIVA DE MRNA DE MITICINA B, C Y C-X1 EN HEMOCITOS DE M. CHILENSIS BAJO DIFERENTES ESTÍMULOS INMUNOLÓGICOS. SE PRESENTAN GRÁFICOS DE BARRAS DE EXPRESIÓN RELATIVA DE ARNm (EJE Y) PARA LAS MITICINAS PROPUESTAS BAJO CUATRO CONDICIONES: GRUPO CONTROL (SÓLO HEMOLINFA), GRUPO G1 (HEMOLINFA + V. ANGUILLARUM), GRUPO G2 (HEMOLINFA + V. ANGUILLARUM + STM2457) Y GRUPO G3 (HEMOLINFA + STM2457). LOS ASTERISCOS INDICAN LA SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA COMPARATIVA ENTRE CONDICIONES: NS (NO SIGNIFICATIVO), * ($P < 0.05$), *** ($P < 0.001$) Y **** ($P < 0.0001$).....47

RESUMEN

La inmunidad innata en invertebrados marinos se caracteriza por ser una respuesta inmediata y no específica que no requiere contacto previo con patógenos. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) constituyen componentes efectores críticos de esta defensa, actuando mediante mecanismos principalmente físicos que dificultan la adquisición de resistencia bacteriana. Las miticinas representan una de las familias más diversas de AMPs identificados en invertebrados marinos, constituyendo un pilar fundamental en el sistema inmune innato del género *Mytilus*. Dentro de este, *Mytilus chilensis*, una especie endémica de las costas del Pacífico sur posee una gran importancia económica para Chile al ser el segundo productor mundial de mejillones y principal exportador global. Sin embargo, el ambiente marino chileno enfrenta presiones ambientales únicas que favorecen la presencia de patógenos como *Vibrio spp.*, lo que provoca mortalidades catastróficas para la acuicultura nacional. A pesar de su relevancia, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares específicos de defensa antimicrobiana de *M. chilensis* permanece fragmentado, lo que limita las estrategias preventivas adaptadas a la especie. Este seminario caracterizó, a nivel molecular, las miticinas en *M. chilensis* mediante un análisis bioinformático integrado (filogenético, predictivo de actividad antimicrobiana, clivaje proteolítico, topología membranal y localización celular) y evaluó su expresión génica en hemocitos bajo estímulos inmunológicos con *Vibrio anguillarum* y con un inhibidor de METTL3. Los resultados identificaron tres isoformas de miticinas (B, C y C-X1) con propiedades fisicoquímicas que pueden presentar actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Innate immunity in marine invertebrates is characterized as an immediate and non-specific response that does not require prior contact with pathogens. Antimicrobial peptides (AMPs) constitute critical effector components of this defense, acting through predominantly physical mechanisms that make it difficult for bacteria to acquire resistance. Myticins represent one of the most diverse families of AMPs identified in marine invertebrates, constituting a fundamental pillar of the innate immune system of the genus *Mytilus*. Within this genus, *Mytilus chilensis*, an endemic species from the south Pacific coast, is of great economic importance to Chile as the world's second-largest mussel producer and the principal global exporter. However, the Chilean marine environment faces unique environmental pressures that favor the presence of pathogens such as *Vibrio spp.*, leading to catastrophic mortality in national aquaculture. Despite this relevance, knowledge of the specific molecular mechanisms of antimicrobial defense in *M. chilensis* remains fragmented, limiting the development of prevention strategies tailored to the species. This seminar characterized myticins at the molecular level in *M. chilensis* through integrated bioinformatic analysis (phylogenetic, antimicrobial activity prediction, proteolytic cleavage, membrane topology, and cellular localization) and evaluated their gene expression in hemocytes under immunological stimuli with *Vibrio anguillarum* and an METTL3 inhibitor. Results identified three myticin isoforms (B, C, and C-X1) with physicochemical properties that could confer antimicrobial activity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Inmunidad innata en invertebrados marinos

Los primeros organismos multicelulares surgieron en los océanos del mundo hace más de 500 millones de años, enfrentándose a una exposición constante a una carga microbiana extremadamente alta. Sin embargo, muchos de estos organismos no solo sobrevivieron, sino que prosperaron sin desarrollar sistemas inmunológicos adaptativos como los que caracterizan a los vertebrados y, en su lugar, evolucionaron mecanismos de inmunidad innata muy sofisticados que han permanecido funcionales durante más de medio milenio (Rathinam et al., 2024). El estudio de estos sistemas inmunológicos ancestrales proporciona, tanto una ventana histórica hacia la evolución de defensas biológicas, como un recurso potencial sin explotar para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en medicina moderna (Guryanova & Ovchinnikova, 2022).

La inmunidad innata en invertebrados marinos se caracteriza por ser una respuesta inmediata y no específica, la cual no requiere contacto previo con un patógeno para manifestarse (Williams & Gilmore, 2022). En contraste con la inmunidad adaptativa de los vertebrados, que se basa en la recombinación somática de genes y en la generación de memoria inmunológica a través de células T y B, los invertebrados marinos carecen por completo de estos mecanismos especializados. Estos organizan sus defensas en torno a barreras fisicoquímicas (membranas, mucosas, epitelio), factores humorales (péptidos antimicrobianos, lectinas, proteínas del complemento) y respuestas celulares (hemocitos) que operan según patrones de reconocimiento evolutivamente conservados a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Figueras et al., 2021).

El sistema innato de reconocimiento de patógenos en invertebrados marinos depende fundamentalmente de los PRRs, como los “Toll-like receptors” (TLRs), cuyo origen evolutivo se remonta a al menos 650 millones de años. Estos receptores, caracterizados por dominios ricos en leucina (LRR) para la unión de patógenos y dominios TIR para la señalización intracelular, actúan como vigilantes moleculares que detectan patrones asociados a patógenos (PAMPs) y a daño (DAMPs) (Rathinam et al., 2024). La activación

de estos receptores desencadena cascadas de señalización que conducen a la activación de factores de transcripción, como NF- κ B, que, a su vez, regulan la expresión de péptidos antimicrobianos, citoquinas proinflamatorias y otras moléculas efectoras críticas para la defensa inmunológica (Figueras et al., 2021).

Dados estos mecanismos de reconocimiento innato, los péptidos antimicrobianos (AMPs) emergen como los componentes efectores más importantes de esta estrategia defensiva. A diferencia de los antibióticos convencionales que requieren mecanismos específicos de resistencia genética para ser eludidos, los AMPs operan mediante mecanismos de acción principalmente físicos, como la disrupción de membranas bacterianas, la formación de poros, la interferencia con la síntesis intracelular, que hacen mucho más difícil la adquisición de resistencia bacteriana (Tincu & Taylor, 2004). Esta característica, combinada con su pequeño tamaño molecular que facilita su síntesis recombinante, ha posicionado a los AMPs provenientes de invertebrados marinos como candidatos prometedores para el desarrollo farmacéutico de nuevos antibióticos (Guryanova et al., 2023).

1.2. AMPs

Los AMPs son moléculas polipeptídicas de pequeño tamaño, generalmente menores a 100 residuos de aminoácidos, que poseen actividad antimicrobiana directa o indirecta contra bacterias, hongos, virus y en algunos casos contra células parasitarias (Figura 2) (Satchanska et al., 2024). Contrario a la percepción de que estas moléculas constituyen un mecanismo defensivo “primitivo”, el reconocimiento contemporáneo los posiciona como componentes críticos y altamente especializados del sistema inmunológico innato, presente de manera ubicua desde organismos acuáticos simples hasta mamíferos, sugiriendo una estrategia ancestral de defensa que ha sido seleccionada positivamente a través de más de mil millones de años de evolución (Huan et al., 2020). En la Figura 2 se observa cómo los AMPs pueden atacar a los microbios mediante dos mecanismos complementarios. El primero involucra una acción directa contra la membrana bacteriana mediante interacciones electrostáticas que provocan la disrupción membranal o la

inhibición intracelular. El segundo mecanismo es indirecto, en el que los AMP actúan como moléculas señalizadoras que reclutan y activan células inmunitarias (neutrófilos, monocitos, linfocitos T), modulan la inflamación mediante receptores TLR y mejoran el reconocimiento de patógenos (Zhang & Gallo, 2016).

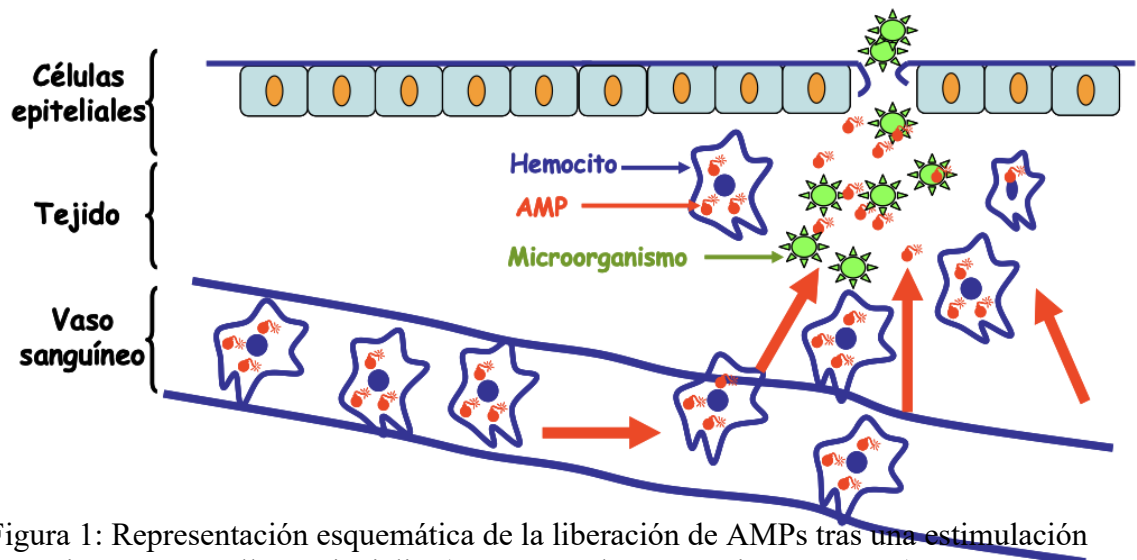


Figura 1: Representación esquemática de la liberación de AMPs tras una estimulación bacteriana en *M. galloprovincialis*. (Costa Portela, 2008, Figura 8, p. 51).

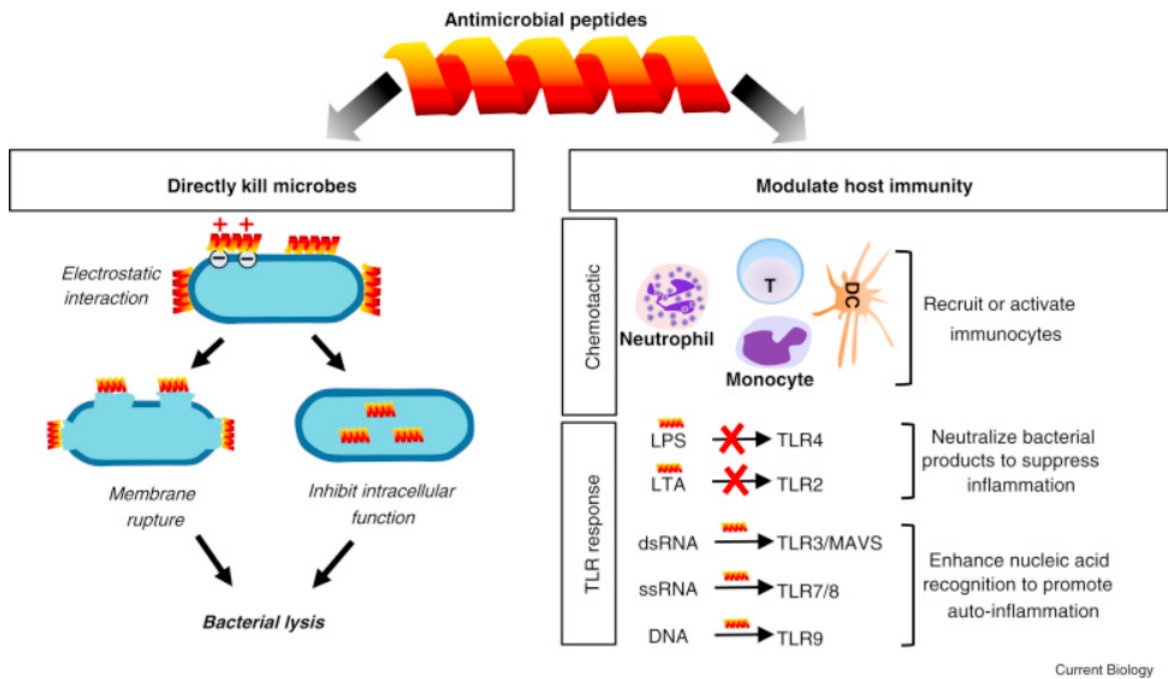


Figura 2: Función biológica de los AMPs (Zhang & Gallo, 2016).

Los AMPs exhiben una diversidad estructural notablemente mayor que la típicamente asociada a proteínas funcionales y se clasifican en varias categorías principales según su estructura secundaria: péptidos α -helicoidales anfipáticos, péptidos con estructura de lámina- β estabilizados por puentes de disulfuro, péptidos con composición anómala (extremadamente ricos en uno o dos aminoácidos específicos), péptidos cíclicos y oligopéptidos (Huan et al., 2020). Esta diversidad estructural refleja las diversas estrategias evolutivamente probadas para lograr actividad antimicrobiana. No existe una única estructura óptima, sino múltiples soluciones funcionales adaptadas a diferentes contextos ecológicos y roles biológicos (Lazzaro et al., 2020).

A pesar de sus variaciones en estructura y tamaño, estos suelen caracterizarse por su naturaleza catiónica e hidrofóbica, lo cual se considera crucial para la interacción inicial entre el péptido y la membrana bacteriana (Hancock & Chapple, 1999). Según investigaciones previas, su modo de acción era semejante a la formación de poros o bien a un efecto detergente, independientemente de la acción específica (Destoumieux et al., 2000).

Los AMPs intracelulares ejercen su actividad mediante la penetración selectiva de membranas bacterianas, sin causar disrupción membranar significativa, e ingresan al citoplasma mediante transportadores bacterianos específicos que reconocen, a nivel molecular, la estructura del AMP, lo que permite la translocación a través de la bicapa lipídica con un mínimo daño físico a la membrana (Le et al., 2017). Una vez dentro de la célula, estos AMPs ejercen mecanismos de acción múltiples y simultáneos como la inhibición de la síntesis y la replicación del ADN, la inhibición de proteínas bacterianas, la inhibición de chaperonas proteicas y la modulación de la topología de ácidos nucleicos (Sneideris et al., 2023).

Desde una perspectiva evolutiva, la adopción de AMPs como estrategia defensiva confiere múltiples ventajas adaptativas a los organismos que los producen (Zhang et al., 2025). En primer lugar, los AMPs presentan un bajo costo energético de síntesis debido a su tamaño reducido, lo que permite que los organismos produzcan grandes cantidades de estas proteínas con una mínima inversión metabólica, confiriéndoles una eficiencia energética

que los posiciona como una solución óptima para la inmunidad innata ante presiones de recursos limitados (Sadeeq et al., 2025).

En segundo lugar, los AMPs ofrecen una capacidad de respuesta inmediata sin requerir la síntesis de novo cuando se almacenan constitutivamente en gránulos citoplásmicos de hemocitos y otras células efectoras, lo que les permite liberarse rápidamente durante una activación inmunológica y generar una respuesta defensiva en minutos en lugar de las horas requeridas para la síntesis de novo de proteínas de defensa (Shandala & Brooks, 2012).

Adicionalmente, los AMP exhiben una especificidad de acción selectiva que minimiza el daño colateral a la microbiota simbiótica del hospedero (Lei et al., 2021). En contraste con los antibióticos convencionales, que típicamente matan bacterias comensales beneficiosas, los AMPs pueden diseñarse para exhibir selectividad diferencial entre patógenos y comensales, mediante mecanismos de discriminación basados en la composición de la membrana bacteriana, patrones de reconocimiento de patógenos o expresión de receptores específicos (Ostaff et al., 2013).

Además, exhiben resistencia práctica a la adquisición de resistencia bacteriana frente a antibióticos convencionales, ya que mientras las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos de mecanismo único, típicamente en escalas de meses a años bajo presión selectiva, la adquisición de resistencia a AMPs es lenta y de magnitud limitada (Spohn et al., 2019).

Estas características integradas convierten a los AMP en candidatos excepcionales para el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas en contextos en los que los antibióticos convencionales han perdido eficacia (Zhang et al., 2025). Los AMP resultan efectivos contra infecciones causadas por bacterias multirresistentes, en las que la combinación de resistencia antimicrobiana ha desactivado el arsenal de antibióticos disponibles (Guryanova et al., 2023). También, el uso de AMPs en sinergia con antibióticos que han perdido su efectividad abre la posibilidad de que estos puedan recuperar sus capacidades antimicrobianas, que los caracterizaban como fármacos abandonados (Gonçalves et al., 2025).

1.2.1. Caracterización molecular de los AMPs

La caracterización molecular de los AMP constituye un esfuerzo interdisciplinario que integra herramientas de bioinformática, biología molecular, proteómica y ensayos funcionales. Este enfoque integrado es necesario, ya que la identificación de una sola secuencia peptídica no es suficiente para comprender sus propiedades estructurales, mecanismos de acción, regulación génica y potencial de aplicación (Suárez-Ulloa et al., 2013). En el contexto específico de bivalvos como *Mytilus chilensis*, la caracterización molecular de AMP es particularmente desafiante, dado que muchas de estas moléculas no tienen homólogos bien caracterizados en bases de datos disponibles, lo que requiere combinaciones de búsqueda de homología, modelado de novo y validación experimental.

Los métodos bioinformáticos constituyen el punto de entrada natural para la identificación de AMPs en genomas y transcriptomas recientemente secuenciados. El enfoque clásico combina búsquedas de homología BLAST contra bases de datos de AMPs conocidos (como APD3 o AMPDB) con análisis predictivos que utilizan machine learning para identificar secuencias con propiedades típicas de AMPs incluso con ausencia de homología (Duwadi et al., 2018). Herramientas como iAMPCN utilizan redes neuronales profundas entrenadas con proteínas conocidas para predecir tanto la probabilidad de que una secuencia sea un AMP como su actividad antimicrobiana probable, lo que permite la identificación de candidatos novedosos (Yan et al., 2023).

La secuenciación de ARN (RNA-seq) ha revolucionado el estudio de la expresión génica de AMPs en bivalvos, permitiendo cuantificar con precisión los niveles de transcripción bajo diferentes condiciones, como el estrés, los desafíos inmunológicos y los cambios ambientales, entre otros. A diferencia de otras técnicas, esta proporciona información tanto de genes conocidos como la capacidad de descubrir transcriptos completamente novedosos (Gerdol et al., 2014). Por ejemplo, el análisis transcriptómico de hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* estimulados con diferentes patógenos ha revelado que distintas familias de AMPs se inducen diferencialmente en respuestas a bacterias gram positivas versus negativas, o frente a estímulos virales, sugiriendo mecanismos de reconocimiento

y respuesta más sofisticados de lo previamente sospechado (Moreira et al., 2020; Philipp et al., 2012).

1.2.2. Modelos para interpretar mecanismos de acción en AMPs

Se han propuesto tres modelos para interpretar los mecanismos de acción; el modelo de barril de duelas (barrel-stave pore model), el modelo toroidal (toroidal pore model) y el modelo tipo alfombra (carpet model) (Figura 4) (Cheng-Hua et al., 2009). Los tres modelos se basan en la presunción de que los AMPs podrían interactuar inicialmente con la membrana citoplasmática bacteriana mediante una unión electrostática entre el péptido catiónico y los componentes cargados negativamente presentes en la envoltura externa bacteriana, tales como los grupos fosfato de los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativas o los ácidos presentes en las superficies de las bacterias gram positivas (Cheng-Hua et al., 2009).

El modelo de barril de duelas consiste en que los péptidos unidos se agregan e insertan en la bicapa de la membrana de modo que las regiones hidrofóbicas de este se alineen con la región del núcleo lipídico mientras que las regiones hidrofílicas del péptido forman la región interior del poro, permeabilizando la membrana por poros transmembrana compuestos por un haz de hélices anfipáticas (Figura 3B) (Shai, 2002). En el modelo de poro toroidal los lípidos se intercalan entre las hélices orientadas perpendicularmente a la superficie de la membrana, de modo que las caras polares de las hélices y las cabezas polares de los lípidos constituyen el revestimiento del poro, resultando en que ambas capas de la membrana formen una superficie continua que permita la libre difusión de lípidos entre la capa externa e interna de la membrana (Figura 3A) (Benfield & Henriques, 2020).

El modelo tipo alfombra fue propuesto debido a que hay AMPs que no se insertan en el núcleo hidrofóbico de la membrana para formar canales transmembrana, sino que tras unirse a la superficie bacteriana los AMPs se reorientan de manera que su cara hidrofóbica queda orientada hacia los lípidos y la cara hidrofílica hacia los grupos fosfato de las cabezas de los fosfolípidos. Cuando los péptidos alcanzan una concentración umbral, estos entran en contacto con los grupos de fosfolípidos durante la formación de poros

transitorios, lo que finalmente conduce a la desintegración de la membrana (Figura 3C) (Shai, 2002).

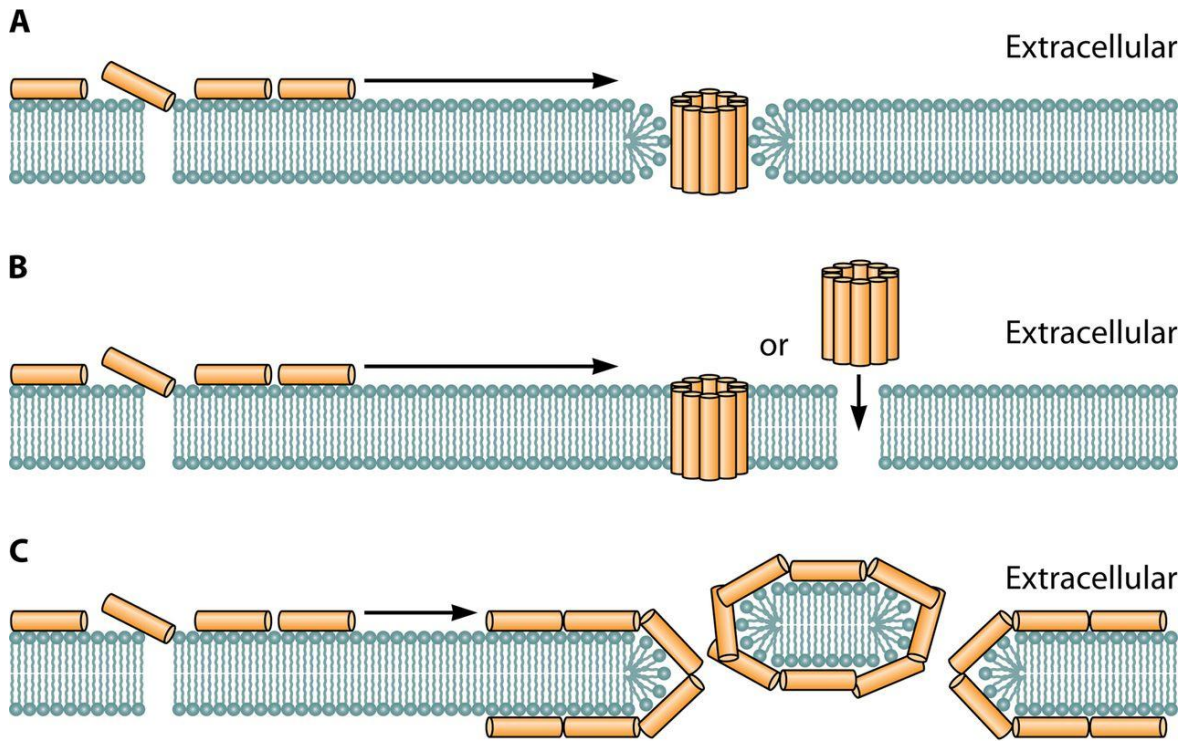


Figura 3: Modelos propuestos de mecanismos líticos de membrana mediados por AMP. (A) Modelo de poro toroidal: la agregación en cascada de monómeros de péptido en la membrana provoca que las porciones lipídicas se plieguen hacia el interior, formando un canal continuo. (B) Modelo de barril de duelas: los monómeros del péptido se disponen paralelos a los fosfolípidos de la membrana, formando un canal de transmembrana hidrofílico. (C) Modelo tipo alfombra: la acumulación de péptidos en la superficie induce debilidades locales y descompone las bicapas en pequeñas áreas revestidas por unidades de péptido, dando un aspecto de alfombra (Le et al., 2017).

1.2.3. AMPs en moluscos bivalvos

Para la acuicultura, donde cepas bacterianas multirresistentes emergentes causan mortalidades catastróficas, la oportunidad de derivar AMPs de organismos acuáticos locales y aplicarlos sin contribuir a un reservorio global de resistencia bacteriana representa una ventaja sustancial frente a los antibióticos convencionales (Guryanova et al., 2023).

Los moluscos bivalvos representan uno de los linajes de invertebrados marinos más productivos en términos de diversidad de péptidos antimicrobianos (Cheng-Hua et al., 2009). Estos organismos, que combinan la exposición extrema a patógenos propios del ambiente marino filtrante con la ausencia de inmunidad adaptativa, han desarrollado un arsenal notablemente complejo de AMPs especializados. A diferencia de otros invertebrados como artrópodos que delegan la síntesis de AMPs a órganos especializados, los moluscos bivalvos producen sus AMPs principalmente a través de hemocitos circulantes, células que simultáneamente realizan funciones de fagocitosis y secreción coordinada de factores antimicrobianos (Cheng-Hua et al., 2009).

Las familias de AMPs identificadas en bivalvos son estructural y funcionalmente diversas, lo que refleja una larga historia de especialización adaptativa (Greco et al., 2020). Hasta ahora se han identificado nueve familias de AMPs en mejillones tales como las defensinas (Hubert et al., 1996), mitilinas (Mitta et al., 2000), mitimicinas (Sonthi et al., 2011), big defensinas y mitimacinas (Gerdol et al., 2012), myticucinas (Liao et al., 2013), mitiquitinas (Qin et al., 2014), miticalinas (Leoni et al., 2017) y miticinas (Mitta et al., 1999). Algunos de estos AMPs presentan una extraordinaria diversidad en su estructura y función, lo que podría estar relacionado con una defensa más específica y eficaz frente a los patógenos (Rey-Campos, Moreira, et al., 2020).

1.3. Miticinas

Las miticinas representan una de las familias más sofisticadas y diversas de AMPs identificados en invertebrados marinos, constituyendo un pilar fundamental en el sistema inmune innato del género *Mytilus*. Estructuralmente, se caracterizan por ser péptidos catiónicos ricos en cisteína, sintetizados inicialmente como preproteínas que incluyen un péptido señal altamente conservado, una región pro-secuenciada de longitud variable y un péptido maduro en el segmento C-terminal, que exhibe la mayor variabilidad en la secuencia (Mitta et al., 1999). Estas moléculas maduras suelen presentar un peso molecular que oscila entre 4 y 6 kDa y un punto isoeléctrico (pI) elevado, generalmente superior a 9.0, lo que les confiere una gran carga neta positiva crucial para su interacción

con las superficies celulares aniónicas bajo condiciones fisiológicas marinas (Mitta et al., 2000). La presencia de múltiples residuos de cisteína en la región madura permite la formación de puentes de disulfuro intramoleculares (generalmente cuatro), que confieren a la molécula una estructura terciaria rígida y compacta, esencial para mantener su estabilidad y actividad biológica en la alta fuerza iónica característica del medio marino (Roch et al., 2008).

La clasificación de las miticinas se ha establecido tradicionalmente en tres grupos principales; Miticina A, B y C, basándose en su secuencia de aminoácidos y su patrón de puentes de disulfuro (Pallavicini et al., 2008). Recientemente, el advenimiento de técnicas de secuenciación masiva ha permitido identificar nuevas variantes que expanden este repertorio clásico, sugiriendo la existencia de isoformas adicionales (como la mitocinas D y E en ciertas poblaciones) que podrían responder a presiones selectivas locales específicas, aunque su caracterización funcional permanece en etapas preliminares (Vera et al., 2011).

Las miticinas A y B fueron las primeras en ser caracterizadas, destacándose por su potente actividad antimicrobiana directa. Ambas isoformas han demostrado eficacia inhibitoria frente a un amplio espectro de bacterias gram positivas y gram negativas, así como contra ciertos hongos filamentosos (Mitta et al., 2000). Su mecanismo de acción se atribuye a su carácter anfipático y a su carga neta positiva, lo que facilita la interacción electrostática con los fosfolípidos aniónicos de las membranas microbianas, provocando su desestabilización y la consecuente lisis celular, o la interferencia con procesos intracelulares vitales (Sonthi et al., 2011).

Tabla 1: Comparación entre Miticina A y B, versus Miticina C

Característica o función	Miticina A y B	Miticina C
Actividad antimicrobiana	Potente actividad antimicrobiana directa.	Actividad antibacteriana moderada con propiedades antivirales y quimiotácticas excepcionales

Actividad antibacteriana	Actividad inhibitoria frente a gram positivas y gram negativas, así como contra ciertos hongos filamentosos	Moderada
Eficacia inhibitoria	Eficacia inhibitoria frente a gram positivas y gram negativas, así como contra ciertos hongos filamentosos.	Eficacia inhibitoria frente a virus de bivalvos y herpesvirus humanos (HSV-1/HSV-2)
Impacto en la salud humana	Sin aplicaciones clínicas reportadas	Inhibir la replicación de virus humanos, como el virus del herpes simple (HSV-1/2)
Impacto en la acuicultura	Potencial como agente protector en cultivos	Inhibir la replicación de virus patógenos de gran impacto en la acuicultura
Aplicación en biotecnología	Defensa estándar definida de AMPs.	Regeneración tisular, acelerando el cierre de heridas mediante la activación de genes relacionados con el citoesqueleto y la migración celular,

Sin embargo, la miticina C ha revelado un paradigma funcional más complejo, trascendiendo la definición clásica de antibiótico natural. A diferencia de las isoformas A y B, la miticina C exhibe una actividad antibacteriana más moderada, pero posee propiedades antivirales y quimiotácticas excepcionales (Rey-Campos, Moreira, et al., 2020). Estudios funcionales han demostrado que la miticina C puede inhibir la replicación de virus patógenos de gran impacto en la acuicultura y de virus humanos, como el virus del herpes simple (HSV-1/2), actuando no solo mediante el bloqueo directo de la entrada

viral, sino también interfiriendo en etapas intracelulares del ciclo viral (Novoa et al., 2016). Además de sus propiedades de defensa inmunológica, se ha descubierto que la miticina C posee propiedades de regeneración tisular, acelerando el cierre de heridas mediante la activación de genes relacionados con el citoesqueleto y la migración celular, lo que abre nuevas vías para su aplicación biotecnológica (Rey-Campos, Moreira, et al., 2020). Adicionalmente, esta isoforma actúa como una citoquina, promoviendo el reclutamiento de hemocitos hacia los sitios de infección y modulando la expresión de otros genes inmunes, lo que sugiere que las miticinas han evolucionado para integrar las funciones de defensa directa y regulación inmunológica (Balseiro et al., 2011).

Desde una perspectiva evolutiva y genética, los genes que codifican las miticinas, en particular la isoforma C, están sujetos a una intensa presión selectiva. Esto se manifiesta en un polimorfismo de secuencia extraordinariamente alto, que supera la variabilidad neutra esperada. Este fenómeno se interpreta bajo la hipótesis de la “Reina Roja”, según la cual el hospedador diversifica continuamente su repertorio de péptidos defensivos para contrarrestar la rápida evolución de los factores de virulencia de los patógenos marinos (Padhi & Verghese, 2008). Esto explica la existencia de numerosas variantes alélicas dentro de una misma especie y entre especies emparentadas como *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*. En el caso de *M. chilensis*, la identificación de variantes específicas con distintas características moleculares y puntos isoeléctricos refuerza la idea de que la diversidad de miticinas no es redundante, sino que proporciona un arsenal versátil capaz de operar en diferentes condiciones fisiológicas y frente a distintos tipos de agresores biológicos (Núñez-Acuña & Gallardo-Escárate, 2013).

1.4. Mejillón azul “*Mytilus chilensis*”

M. chilensis, conocido comúnmente como mejillón azul o chorito, es una especie endémica de molusco bivalvo que habita exclusivamente en las costas del pacífico de América del Sur, distribuida desde la región de Los Lagos en el sur de Chile hasta el norte de Perú. Esta distribución geográfica restringida contrasta claramente con sus parientes cercanos, *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis*, lo que sugiere una larga historia evolutiva independiente bajo presiones selectivas particulares del ambiente costero chileno (Gallardo-Escárate et al., 2022).

La importancia económica de *M. chilensis* en la acuicultura y pesca nacional ha mantenido un crecimiento sostenido en las últimas tres décadas, consolidando al país como una potencia alimentaria global al posicionarse como el segundo productor mundial de mejillones cultivados, después de China, y el principal exportador global de este recurso (SUBREI, 20205). Esta industria ha alcanzado una madurez productiva significativa, registrando cosechas anuales superiores a 400.000 toneladas en los últimos años (Sernapesca, 2025; AmiChile, 2025).

En Chile el mejillón chileno representa una fuente crítica de proteína de bajo costo, empleo rural y exportación de valor agregado en regiones del sur del país (Salazar et al., 2025). Sin embargo, esta intensificación productiva ha coincidido con la emergencia de enfermedades graves, particularmente aquellas causadas por bacterias patógenas del género *Vibrio*, que han provocado mortalidades catastróficas en hatcheries, con mortalidades larval superiores al 90% (Rojas et al., 2015), lo que ha impactado significativamente la viabilidad económica de las operaciones acuícolas, especialmente durante períodos de estrés ambiental (Dubert et al., 2017).

El ambiente marino chileno enfrenta presiones ambientales únicas que contribuyen a la emergencia de patologías en la acuicultura. Los eventos de hipoxia costera son cada vez más frecuentes y severos como consecuencia del cambio climático, lo que altera drásticamente la composición de las comunidades microbianas en aguas costeras (Muñoz et al., 2025). Estos cambios selectivos favorecen la proliferación de bacterias oportunistas, particularmente de *Vibrio spp.*, que normalmente permanecen en concentraciones bajas, pero bajo estrés hipóxico, alcanzan densidades que generan infección sistémica en bivalvos filtradores (Muñoz et al., 2025). Adicionalmente, factores como la eutrofización costera, la acidificación oceánica progresiva y la contaminación por plaguicidas agrícolas comprometen la capacidad inmunológica innata de *M. chilensis*, lo que amplifica la susceptibilidad a patógenos (Baker-Austin et al., 2024; Dubert et al., 2017).

1.4.1. Defensas en *M. chilensis*

A pesar de su alta relevancia económica y epidemiológica, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares específicos de defensa antimicrobiana de *M. chilensis* permanece fragmentado. Mientras que *M. galloprovincialis* ha sido intensivamente caracterizada en el contexto europeo, generando datos sobre expresión génica, familias de AMPs, y respuestas inmunológicas a patógenos específicos, la información comparable para *M. chilensis* es muy baja (Gerdol et al., 2014; Moreira et al., 2020).

La ausencia de datos sobre los mecanismos específicos de defensa antimicrobiana de *M. chilensis* conlleva importantes consecuencias para la sostenibilidad de la acuicultura chilena. Esto limita la capacidad de seleccionar y desarrollar líneas de mejora genética para una mayor resistencia a enfermedades, impidiendo que los productores identifiquen individuos con mayores capacidades inmunológicas inherentes o genotipos optimizados para patógenos locales. La falta de conocimiento sobre qué péptidos antimicrobianos específicos expresa *M. chilensis* en respuesta a distintos patógenos compromete el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas adaptadas a la especie. Si bien se sabe que *M. galloprovincialis* produce miticinas, mitilinas y otras familias de AMPs con actividades diferenciales contra patógenos específicos (Gerdol et al., 2014; Moreira et al., 2020), no se cuenta con una caracterización equivalente para la especie chilena, lo que significa que cualquier intervención inmunológica se basa en extrapolaciones de especies europeas que pueden no reflejar la realidad biológica local.

Este vacío de información es particularmente crítico considerando que *M. chilensis* enfrenta un ambiente sanitario único, con presiones patogénicas que pueden diferir sustancialmente de las del Mediterráneo, donde predominan especies de *Vibrio* diferentes, patógenos virales locales, y microambientes con variables fisicoquímicas distintas. Por lo tanto, la falta de conocimiento sobre defensas específicas de *M. chilensis* aumenta la vulnerabilidad de los cultivos a brotes de enfermedades emergentes no anticipadas (Montúfar-Romero et al., 2025)

Actualmente, aunque no se han reportado eventos masivos de mortalidad en bivalvos asociados a patógenos en Chile, la industria opera sin conocimiento detallado de su

potencial inmunológico basal ni de cómo las variantes locales de patógenos como *Vibrio spp.* Interactúan con las defensas específicas de *M. chilensis* (Santibáñez et al., 2022). Además, estresores ambientales crecientes, como la hipoxia, comprometen la microbiota asociada a las branquias y glándulas digestivas de *M. chilensis*, causando disbiosis microbiana con desplazamiento hacia patógenos oportunistas como *Vibrio*, *Aeromonas* y *Arcobacter*, lo cual perjudica la salud y supervivencia del hospedero al reducir funciones microbianas críticas asociadas al metabolismo de nutrientes y al soporte inmunológico (Montúfar-Romero et al., 2025). Este fenómeno subraya la urgencia de caracterizar cómo los sistemas de defensa específicos de *M. chilensis* responden a estas condiciones de estrés múltiple.

El estudio del sistema inmunológico de *Mytilus spp.* tiene raíces que se remontan a cuatro décadas aproximadamente (Figueras et al., 2019), comenzando con descripciones generales de hemocitos y sus capacidades fagocíticas, evolucionando progresivamente hacia caracterizaciones moleculares detalladas del genoma, transcriptoma, y proteoma inmunológico durante los últimos quince años (Gerdol et al., 2020). Esta trayectoria investigativa refleja tanto la mejora de las tecnologías disponibles como el reconocimiento de la creciente importancia académica de estos organismos como modelos de inmunidad innata en invertebrados. *Mytilus galloprovincialis* ha sido el foco principal de investigación inmunológica en los bivalvos. Un conjunto de artículos fundamentales ha documentado la existencia de un repertorio complejo de genes relacionados a su inmunidad innata, incluyendo múltiples isoformas de receptores tipo Toll, lectinas, proteínas de complemento y familias expandidas de genes que codifican péptidos antimicrobianos (Philipp et al., 2012). Estudios posteriores sobre el estímulo inmunológico revelaron patrones de expresión génica diferenciales, en los que diferentes AMPs se inducen selectivamente en respuesta a distintos tipos de patógenos, lo que sugiere que el sistema inmunológico de estos organismos, aunque carente de un adaptativo, es sofisticado en el reconocimiento de patógenos (Moreira et al., 2020).

Desde una perspectiva evolutiva y filogenética, ciertos rasgos del sistema inmunológico de *M. galloprovincialis* también podrían encontrarse en *M. chilensis*, aunque con diferencias en isoformas específicas y en patrones de expresión adaptados a la ecología

local. En primer lugar, el repertorio de receptores de reconocimiento de patógenos sugiere que ambas especies, como bivalvos, probablemente poseen múltiples isoformas de receptores tipo Toll (TLRs) y lectinas, aunque la diversidad y funciones específicas entre especies podrían diferir significativamente. *M. galloprovincialis* expresa múltiples variantes de TLRs y lectinas en hemocitos y tejidos epiteliales; *M. chilensis*, como especie con historia poblacional distinta y aislamiento geográfico, probablemente ha evolucionado isoformas particulares de estos receptores adaptadas a su ecología específica (Gerdol et al., 2020).

En cuanto a la diversidad de AMPs, *M. galloprovincialis* produce repertorios bien caracterizados de miticinas, mitilinas, mitimicinas y otras familias de AMPs con actividades diferenciales contra bacterias gram positivas, gram negativas, hongos y virus. En contraste, aunque se ha documentado la presencia de péptidos antimicrobianos en *M. chilensis* con aislamiento de miticinas en tejidos de branquias, la caracterización molecular completa de todas las familias de AMPs y sus isoformas específicas no ha sido descrita. Sin embargo, es plausible que *M. chilensis* posea un repertorio cualitativamente similar de familias de AMPs, pero con variación cuantitativa y de isoformas, lo que refleja una adaptación local a patógenos específicos del ambiente chileno, donde prevalecen *Vibrio* spp. diferentes a las del mediterráneo, creando presión selectiva diferencial para la evolución de actividades antimicrobianas especializadas (Dubert et al., 2017).

Por último, las respuestas inmunológicas diferenciales frente a patógenos demuestran que *M. galloprovincialis* presenta patrones de expresión génica específicos ante distintos estímulos patogénicos (Moreira et al., 2020). Por analogía, *M. chilensis* probablemente posee capacidades similares de discriminación patogénica, aunque la magnitud y la especificidad de tales respuestas podrían reflejar la composición de los patógenos prevalentes en sus ecosistemas locales.

Un estudio transcriptómico integral identificó 20.306 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes relacionados con la inmunidad en una población de *M. chilensis*, incluyendo variaciones genéticas en genes de receptores tipo Toll, adaptadores de señalización y posiblemente AMPs (Núñez-Acuña & Gallardo-Escárate, 2013). Este

trabajo sugiere que existe una considerable variabilidad genética en capacidades inmunológicas entre individuos de la misma especie, pero este no procede a caracterizar específicamente cuáles AMPs se expresan, como se regulan bajo diferentes condiciones de estrés, o cómo esta variabilidad genética se correlaciona con resistencia a patógenos (Núñez-Acuña & Gallardo-Escárate, 2013).

Un desarrollo relevante para el desarrollo de este trabajo fue la caracterización de variabilidad genética en genes de miticinas en *M. galloprovincialis*, donde se documentó que diferentes isoformas de AMPs varían significativamente entre individuos de población natural (Rey-Campos, Novoa, et al., 2020). Esta observación sugiere con fuerza que *M. chilensis*, como especie con historia poblacional distintiva y aislamiento geográfico, probablemente ha evolucionado isoformas particulares de AMPs adaptadas a su ecología específica. La hipótesis de adaptación local de AMPs es particularmente plausible dado que diferentes *Vibrio spp.* prevalecen en aguas chilenas frente a mediterráneas, creando una presión selectiva diferencial para la evolución de actividades antimicrobianas especializadas (Dubert et al., 2017).

Este vacío de conocimiento resulta particularmente notable, considerando que *M. chilensis* enfrenta un ambiente sanitario único, con presiones patogénicas que pueden diferir sustancialmente de las del Mediterráneo. La especialización evolutiva de esta especie en un ambiente particular durante cientos de miles de años puede haber generado adaptaciones inmunológicas específicas, no presentes en sus parientes europeos, así como AMP o patrones de expresión génica que reflejan respuestas optimizadas a patógenos locales (Gallardo-Escárate et al., 2022).

La convergencia de tres factores críticos tales como la importancia económica, desafíos sanitarios de magnitud creciente y vacío prácticamente completo en caracterización molecular de sus defensas antimicrobianas, crean una justificación imperativa para una investigación urgente. Mientras que estudios de transcriptómica han identificado variabilidad genética en genes inmunológicos de *M. chilensis*, esta información se limita a polimorfismos de secuencia sin caracterización funcional o bioquímica (Núñez-Acuña & Gallardo-Escárate, 2013).

1.5. HIPÓTESIS

Las miticinas de *M. chilensis* presentan expresión diferencial en hemocitos ante estímulos inmunológicos, y sus secuencias contienen regiones con propiedades fisicoquímicas compatibles con actividad antimicrobiana.

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo general

Caracterizar, a nivel molecular, las miticinas en *M. chilensis* mediante análisis bioinformáticos y evaluar su expresión génica en hemocitos bajo distintos estímulos inmunológicos.

1.6.2. Objetivos específicos

1. Identificar y caracterizar, a nivel molecular, las miticinas presentes en *M. chilensis* mediante análisis filogenético y estructural, y la predicción de su actividad antimicrobiana.
2. Evaluar la expresión génica de miticinas caracterizadas en hemocitos de *M. chilensis* sometidos a estímulos de *Vibrio anguillarum* y a un inhibidor de la metiltransferasa STM2457.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de secuencias

Las secuencias de las miticinas B, C y C-X1 de *M. chilensis* fueron obtenidas del genoma completo de la especie publicado por (Gallardo-Escárate et al., 2022). Las secuencias fueron identificadas mediante búsquedas BLASTn y BLASTp (Altschul et al., 1990), utilizando como queries secuencias conocidas de miticinas de especies relacionadas (*Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis*, *Mytilus coruscus*) disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2. Análisis bioinformático

2.2.1. Análisis filogenético

Para el análisis filogenético, se realizó una búsqueda exhaustiva en la base de datos NCBI para identificar secuencias homólogas de miticinas B, C y C-X1 en especies de moluscos bivalvos relacionados. Se recolectó un total de 21 secuencias de referencia de las siguientes especies: *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus edulis* y *Mytilus coruscus*. Estas fueron descargadas en formato FASTA y analizadas junto con las tres secuencias objetivo del estudio, obteniéndose un total de 24 secuencias para el análisis comparativo. El alineamiento múltiple de secuencias se realizó utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) implementado en el software Geneious Prime v2024.0.4 (Biomatters Ltd., Auckland, Nueva Zelanda). Los parámetros de alineamiento empleados fueron de 15 iteraciones. La construcción del árbol filogenético se llevó a cabo mediante el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) con el modelo evolutivo de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), que incorpora diferentes frecuencias de equilibrio de bases y considera tasas diferenciales de transiciones y transversiones. El árbol resultante fue visualizado y editado en Geneious Prime.

2.2.2. Predicción de actividad antimicrobiana (AMPA)

La predicción de regiones con potencial actividad antimicrobiana en las secuencias completas de miticinas B, C y C-X1 se realizó utilizando la herramienta bioinformática AMPA (Antimicrobial Peptide Database predictor, disponible en <http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do>) (Torrent et al., 2009). Los parámetros de búsqueda empleados fueron; un score mínimo de probabilidad de 0.5 y un análisis de propiedades fisicoquímicas incluyendo momento hidrofóbico, índice de Boman e índice alifático.

2.2.3. Predicción de sitios de procesamiento proteolítico (ProP)

Los sitios potenciales de clivaje por proteasas propeptídicas fueron predichos utilizando el servidor ProP 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/ProP-1.0/>) (Duckert et al., 2004). Esta herramienta identifica sitios de reconocimiento para proteasas de la familia proprotein convertase subtilisin/kexin (PCSK), que procesan precursores de péptidos antimicrobianos en sitios con motivos básicos, típicamente Arg-Lys o Arg-Arg. El análisis se realizó con un umbral de 0.5 para considerar un sitio probable de clivaje. Los resultados se reportaron indicando la posición del aminoácido en la secuencia, el score de probabilidad y el contexto de la secuencia.

2.2.4. Predicción de hélices transmembrana (TMHMM)

La presencia de dominios transmembrana fue evaluada mediante el servidor TMHMM 2.0 (Transmembrane prediction using Hidden Markov Models, disponible en <https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (Krogh et al., 2001). Este algoritmo predice hélices transmembrana mediante HMM entrenados con proteínas de membrana cuya topología se ha determinado experimentalmente.

2.3. Diseño experimental

2.3.1. Desafío de *M. chilensis* frente a *V. anguillarum* y STM2457.

Doce individuos de *M. chilensis* fueron recolectados en la región de Los Lagos y posteriormente transportados al Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola

(LBGA) de la Universidad de Concepción, donde fueron inyectados con *Vibrio anguillarum* y STM2457, estando expuestos a la infección durante aproximadamente 12 horas. Se establecieron los siguientes grupos experimentales; control (sólo hemolinfa), G1 (hemolinfa y *V. anguillarum*), G2 (hemolinfa, *V. anguillarum* y STM2457) y G3 (hemolinfa y STM2457). Estos especímenes, de 8 centímetros de longitud, fueron conservados en hielo. Para la recolección de la hemolinfa, se perforó la concha de cada individuo para extraer el líquido del músculo aductor utilizando una aguja de calibre 25 y una jeringa de 1 mL. Una vez obtenida, la hemolinfa se colocó en tubos de centrifuga y se centrifugó a 600 g durante 10 minutos a 4 °C. Luego se descartó el sobrenadante (plasma) y se lavó el pellet de hemocitos con PBS. Se resuspendió el pellet en 500 µL de TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), se homogeneizó mediante pipeteo y se almacenó a -80 °C hasta la extracción del ARN.

2.3.2. Extracción de RNA mediante TRIzol

La extracción de ARN total de hemocitos se realizó mediante el método TRIzol (Chomczynski & Sacchi, 1987), siguiendo el protocolo del fabricante, con modificaciones optimizadas para moluscos bivalvos.

Se incubaron las muestras en TRIzol a temperatura ambiente durante 5 minutos, se le adhirieron 200 µL de cloroformo por cada mL de TRIzol, se agitó durante 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente durante tres minutos y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Una vez centrifugado, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se agregaron 500 µL de isopropanol, se incubó durante la noche a -20 °C y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se volvió a descartar el sobrenadante y se lavó el pellet con 1mL de etanol al 75%, se centrifugó a 7500 g durante 15 minutos a 4°C. Este proceso se repitió: se lavó y se secó el pellet a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se resuspendió el ARN en 20-50 µL de agua libre de RNasas, se incubó a 55°C durante 10 minutos y se almacenó a -80°C. Para eliminar la contaminación por ADN, el ARN extraído fue tratado con DNase siguiendo el protocolo del fabricante.

2.3.3. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA fue realizada utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente fue diluido en razón 1 a 5 con agua libre de nucleasas y almacenado a -20 °C hasta su uso.

2.3.4. Diseño de partidores

El diseño de partidores específicos para la amplificación de los genes codificantes de las miticinas B, C y C-X1 se realizó con el software Geneious Prime, que integra el algoritmo Primer3 (Untergasser et al., 2012) para optimizar los parámetros de diseño (Tabla 2). El cual permitió amplificar las secuencias mediante la aplicación de criterios rigurosos de diseño, como la optimización de temperaturas de fusión (TM), contenido de GC y la ausencia de estructuras secundarias problemáticas como horquillas y dímeros de partidores.

Tabla 2: Secuencia forward y reverse diseñadas con Geneious Prime para los partidores específicos de cada secuencia de miticina C, C-X1 y B.

Partidor	Gen	Secuencia 5'-3'	T° Alineamiento (°C)
α -tub F	α -tubulina	GAGCCGTCTGCATGAGC	60
α -tub R	α -tubulina	TGGACGAAAGCACGTTTGGC	60
MCH004303.1 F	Miticina C	GTGGGTTAGGTGGTTGCTCA T	60
MCH004303.1 R	Miticina C	CTCGTTCACATTCCTAGCGC	60
MCH004304.1 F	Miticina C-X1	CGGTTAATGTGTTGGGAGGC	60
MCH004304.1 R	Miticina C-X1	CTCTCGTGCAATTGACCAGT G	60
MCH000946.1 F	Miticina B	AGACTTTCGAAAACCAGGG AT	57

MCH000946.1 R	Miticina B	TGAACTAGCGCGGCAAATA G	57
---------------	------------	--------------------------	----

Los criterios aplicados para el diseño de partidores fueron: longitud del amplicón entre 80 y 200 pares de base (pb) para la optimización en la eficiencia de qPCR, temperatura de fusión (T_m) entre 58 y 62 °C, contenido de GC entre 40 y 60 % y ausencia de estructuras secundarias (hairpins) y dímeros. Se diseñaron dos pares de primers alternativos (F1-R1 y F2-R2) para cada gen, a fin de permitir la validación de los resultados.

Para la estandarización de los partidores, se realizó una PCR convencional con gradiente de temperatura (VeriFlex™) con el objetivo de determinar la temperatura de fusión (T_m) óptima de amplificación. Se evaluaron tres temperaturas distintas (57, 60 y 63 °C) con tres réplicas por cada miticina, además de un control negativo incubado a 60 °C, totalizando 12 reacciones. En cada tubo se dispensaron 10,5 µL de la mezcla de reacción correspondiente.

2.3.5. RT-qPCR y análisis de expresión

Para el análisis de RT-qPCR de expresión de ARN de las miticinas en los grupos descritos se utilizó el kit de PowerUp SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando partidores descritos previamente y el cDNA sintetizado Utilizando Termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para determinar la cuantificación relativa se utilizó como gen normalizador α -tubulina gen procedente del LBGA.

2.3.6. Análisis estadístico

La cuantificación relativa de expresión génica se realizó mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Schmittgen, 2001), que permite normalizar los datos de expresión respecto a un gen de referencia y comparar los cambios en esta entre diferentes condiciones experimentales. Este método calcula primero los valores de ciclo de amplificación (Ct), definidos como el número de ciclos requeridos para que la fluorescencia de la reacción de qPCR supere el umbral de detección (threshold) establecido en la fase exponencial de amplificación.

Los valores ΔCt para cada muestra fueron calculados como la diferencia entre el Ct del gen de interés y el Ct del gen normalizador ($\Delta Ct = Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ gen referencia}$). Posteriormente, se calcularon los valores $\Delta\Delta Ct$ normalizando cada tratamiento respecto al grupo control ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tratamiento} - \Delta Ct \text{ control}$), lo que permitió la comparación relativa de niveles de expresión entre los grupos experimentales. El cálculo de expresión relativa final fue obtenido mediante la fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, generando un valor que expresa cuántas veces se expresa el gen en la condición de tratamiento respecto al grupo control aproximadamente.

El análisis estadístico formal se realizó con el software GraphPad Prism v10.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Se empleó un análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) seguido de una prueba post-hoc de Tukey HSD para comparaciones múltiples entre los cuatro grupos experimentales (control, G1, G2, G3). Se estableció un nivel de significancia estadística de $\alpha = 0.05$, considerándose estadísticamente significativos los resultados con $p < 0.05$. Los grados de significancia fueron reportados como: ns (no significativo, $p > 0.05$), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), y **** ($p < 0.0001$). Los resultados fueron presentados como gráficos de barras con desviaciones estándar (SD) y valores individuales de puntos superpuestos, permitiendo una visualización clara de la variabilidad dentro de cada grupo y de las diferencias entre tratamientos.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis filogenético

Posteriormente, se realizó una búsqueda exhaustiva en la base de datos NCBI para identificar genes de la misma familia en especies de bivalvos relacionadas. Para acompañar la búsqueda, se realizó un análisis BLAST para identificar secuencias homólogas (Tablas 3, 4 y 5), lo que permitió la construcción de un conjunto de datos comparativos robusto (Figura 4). Se identificaron un total de 21 secuencias diferentes para llevar a cabo el análisis, estas fueron descargadas en formato fasta y procesadas para su incorporación en análisis comparativos con las secuencias objetivo, haciendo un total de 24 secuencias (Figura 5).

Tabla 3: Resultados de BLAST de Miticina B.

GN	Descripción	Bit score	E value	%GC	% Pairwise identity	Query coverage
MCH000946.1	Miticina B					
AF162336	<i>Mytilus galloprovincialis</i> mytilin B	180.721	1.24e-39	43.9%	97.2%	5.91%
AF177540	<i>Mytilus galloprovincialis</i> mytilin B2	142.851	3.11e-28	36.6%	69.6%	19.79%
FJ973154	<i>Mytilus coruscus</i> mytilin B precursor	191.542	6.84e-43	41.6%	97.3%	6.25%
GU324722	<i>Mytilus coruscus</i> mytilin-7	146.457	2.55e-29	46.4%	83.3%	7.63%
GU324721	<i>Mytilus coruscus</i> mytilin-6 precursor	141.949	3.11e-28	45.7%	82.6%	7.63%

GU324722	<i>Mytilus coruscus</i> mytilin-7 precursor	141.949	3.11e-28	47.1%	82.6	7.63%
HQ693567	<i>Mytilus chilensis</i> mytilin	185.23	2.91e-31	43.9%	98.1%	5.91%
MN883578	<i>Mytilus galloprovincialis</i> mytilin	167.196	7.81e-36	40.2%	94.4%	5.91%

Tabla 4: Resultados de BLAST de Miticina C.

GN	Descripción	Bit score	E value	%GC	% Pairwise identity	Query coverage
MCH004303.1	Miticina C					
EU927446	<i>Mytilus galloprovincialis</i> clone G7.1 myticin C	1,751.46	0	30.8%	91.2%	100%
JF990645	<i>Mytilus galloprovincialis</i> isolate 14_01 myticin C	2,096.8	0	30.8%	97.7%	100%
JF990646	<i>Mytilus galloprovincialis</i> isolate 14_02 myticin C	1,609.89	0	31.4%	95.5%	80.59%
JF990653	<i>Mytilus galloprovincialis</i> isolate 16_01 myticin C	2,079.67	0	30.3%	97.2%	100%
JF990692	<i>Mytilus galloprovincialis</i> isolate 31_04 myticin C	1,599.07	0	31.0%	95.3%	80.59%
JF990707	<i>Mytilus galloprovincialis</i> isolate 33_21 myticin C	1,784.82	0	30.6%	91.8%	100%

JF990709	<i>Mytilus galloprovincialis</i> isolate 33_23 myticin C	1,775.8	0	30.9%	91.7%	100%
JF990710	<i>Mytilus galloprovincialis</i> isolate 33_52 myticin C	1,780.31	0	30.7%	91.8%	100%

Tabla 5: Resultados de BLAST de Miticina C-X1

GN	Descripción	Bit score	E value	%GC	% Pairwise identity	Query coverage
MCH004304.1	Miticina C-X1					
EU927417	<i>Mytilus galloprovincialis</i> clone G1.2 myticin C	1,581.94	0	30.7%	88.6%	100%
EU927441	<i>Mytilus galloprovincialis</i> clone G2.1 myticin C	1,429.55	0	31.5%	91%	82.32%
EU927444	<i>Mytilus galloprovincialis</i> clone G5.1 myticin C	1,703.67	0	30.9%	91.2%	100%
EU927445	<i>Mytilus galloprovincialis</i> clone G6.1 myticin C	1,423.24	0	31.6%	90.8%	82.32%
EU927448	<i>Mytilus galloprovincialis</i> clone G9.1 myticin C	1,420.54	0	31.7%	90.8%	82.32%

Tabla 6: Longitud de las secuencias utilizadas para análisis filogenético.

n °	Nombre	Longitud de la secuencia	n°	Nombre	Longitud de la secuencia
-	<i>M. chilensis</i> miticina B	1809	10	<i>M. galloprovincialis</i> miticina C clon G9.1	1007
-	<i>M. chilensis</i> miticina C	1247	11	<i>M. galloprovincialis</i> miticina C clon G6.1	1008
-	<i>M. chilensis</i> miticina C X1	1165	12	<i>M. galloprovincialis</i> miticina C aislado 31	1017
1	<i>M. chilensis</i> mitilina	107	13	<i>M. galloprovincialis</i> miticina C aislado 14_02	1018
2	<i>M. galloprovincialis</i> mitilina B 2	107	14	<i>M. galloprovincialis</i> miticina C clon G5.1	1211
3	<i>M. galloprovincialis</i> mitilina M	107	15	<i>M. galloprovincialis</i> miticina C clon G1.2	1224
4	<i>M. galloprovincialis</i> mitilina B 3	113	16	<i>M. galloprovincialis</i> miticina C clon G7	1251
5	<i>M. coruscus</i> mitilina 6	138	17	<i>M. galloprovincialis</i> miticina C aislado 14	1249
6	<i>M. coruscus</i> mitilina 7	138	18	<i>M. galloprovincialis</i> miticina C aislado 16	1252
7	<i>M. coruscus</i> mitilina B	138	19	<i>M. galloprovincialis</i>	1249

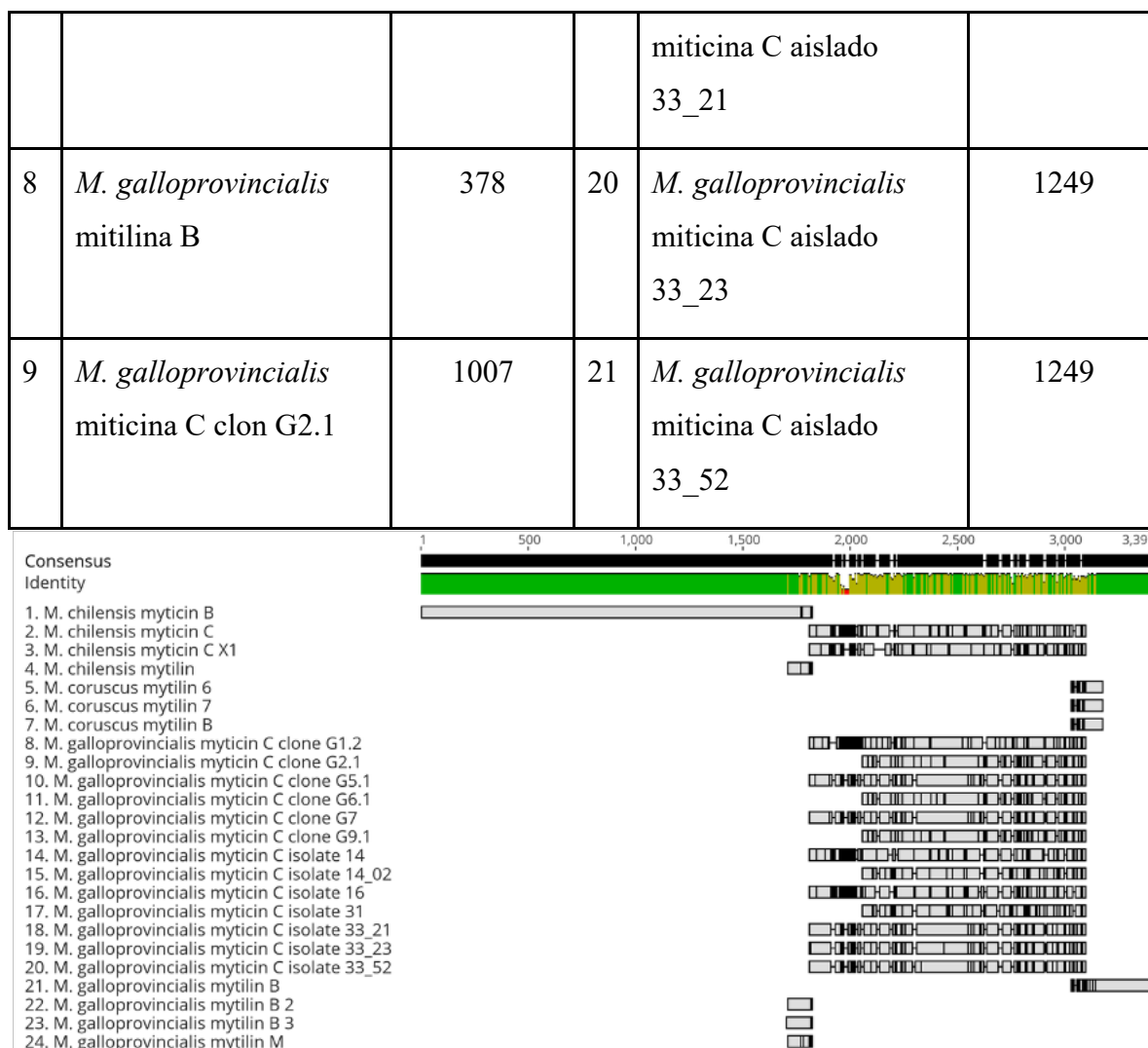


Figura 4: Alineamiento de las secuencias identificadas mediante análisis BLAST.

Para establecer las relaciones evolutivas, todas las secuencias se ingresaron en el programa Geneious Prime para construir un árbol filogenético. Este análisis se realizó utilizando el método Neighbor-Joining con el modelo evolutivo Tamura-Nei, que considera las diferentes frecuencias de equilibrio de las bases y permite que las transiciones y las transversiones ocurran a tasas distintas.

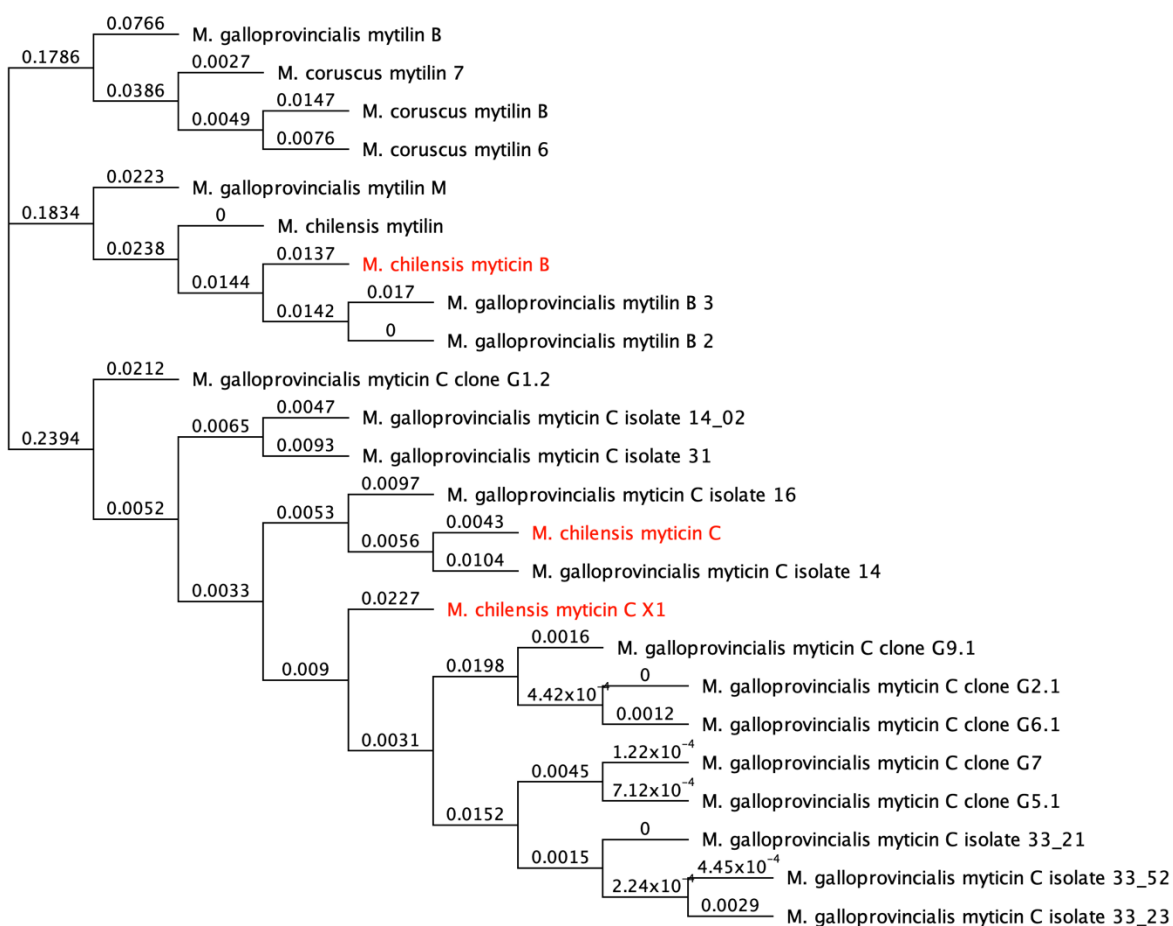


Figura 5: Árbol filogenético Miticinas B, C y C-X1. En rojo está la secuencia obtenida de *M. chilensis*.

El análisis filogenético arrojó una estructura con múltiples nodos principales que separan a las miticinas en linajes evolutivos distintos. La distancia evolutiva máxima observada en la rama basal es de 0.2394, lo que indica una divergencia temporal significativa entre los principales linajes de miticinas. El árbol agrupa preferentemente las secuencias por tipo de miticina antes de origen taxonómico, lo que sugiere una divergencia funcional temprana.

La miticina B de *M. chilensis* se ubica en una rama con distancia evolutiva de 0.0137 desde su nodo más cercano, agrupándolos dentro de un clúster principal que incluye múltiples variantes de *M. galloprovincialis*. Esta posición refleja una relación de ortología con las miticinas B de otras especies de *Mytilus*. Los pequeños valores de diferencia entre

M. chilensis y sus ortólogos de *M. galloprovincialis* (0.0 a 0.0076) indican una alta conservación de la secuencia y una divergencia reciente en términos evolutivos. La miticina C de *M. chilensis* ocupa una posición basal en el árbol con una distancia de 0.0043 desde su nodo asociado. Esta ubicación más cercana a la raíz sugiere que esta miticina representa una forma ancestral más antigua que la anterior. Las distancias evolutivas reducidas entre miticina C de distintas especies (0.0 a 0.0056) demuestran una mayor conservación de la secuencia a lo largo del tiempo evolutivo, lo que indica una presión selectiva más fuerte para mantener esta variante.

Ambas muestran patrones de divergencia evolutiva diferenciados. La miticina B presenta una distribución más dispersa en el árbol, asociada con distancias evolutivas mayores, hasta 0.0137, mientras que la miticina C, en conjunto con su isoforma, muestra una concentración más cerrada, con distancias menores (0.0043).

El agrupamiento de miticinas de *M. chilensis* con múltiples secuencias de *M. galloprovincialis* en ramas equivalentes confirma que estos péptidos divergieron por especiación, en lugar de duplicación génica. La presencia de miticinas de *M. coruscus* en posiciones intermedias sugiere que estos organismos comparten un ancestro común reciente con *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*.

Tabla 7: Comparación de distancias evolutivas y conservación entre isoformas de miticinas. Miticina C muestra mayor conservación, indicando presión selectiva más restrictiva. Miticina B presenta variabilidad. Miticina C-X1 muestra un patrón intermedio

Característica	Miticina B	Miticina C	Miticina C-X1
Distancia evolutiva máxima	0.0137	0.0043	0.0089
Rango de distancias entre grupos	0.0 – 0.0076	0.0 – 0.0056	0.0 – 0.0082
Posición en el árbol filogenético	Dispersa	Basal	Central
Implicación funcional	Variabilidad evolutiva	Conservada	Intermedia

3.2. Análisis antimicrobiano

3.2.1. Predicción de actividad antimicrobiana

AMPA utiliza un algoritmo basado en modelos ocultos de Markov (HMM) para identificar segmentos peptídicos con características fisicoquímicas típicas de AMPs, incluyendo carga neta positiva, hidrofobicidad, anfipaticidad y tendencia a formar estructuras α -hélice o β -lámina.

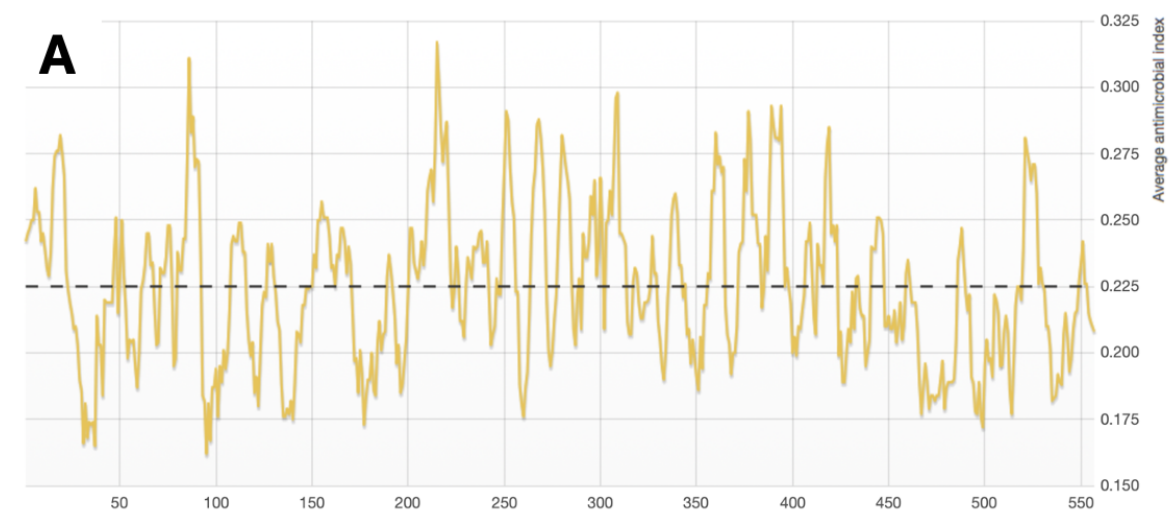
Su análisis para miticina B (Figura 6A) reveló un perfil de índice antimicrobiano caracterizado por fluctuaciones pronunciadas a lo largo de toda la secuencia. El índice antimicrobiano promedio osciló entre 0.150 y 0.325, con una línea de umbral establecida en 0.225. Se identificaron múltiples regiones con índice antimicrobiano superior al umbral, distribuidas de manera uniforme a lo largo de la secuencia completa. El pico más prominente de toda la secuencia se sitúa en 0.325, aproximadamente en las posiciones 275 a 325, lo que indica la región con mayor probabilidad de actividad antimicrobiana directa y se propone como el candidato principal para un péptido maduro activo. Sin embargo, cada pico de índice antimicrobiano sobre el umbral probablemente corresponde a un fragmento peptídico funcional liberado durante el procesamiento post-traduccional.

La miticina C (Figura 6B) mostró un perfil con características distintivas respecto a la miticina B, con un índice antimicrobiano que osciló entre 0.125 y 0.300. Entre las posiciones 200-300 se presenta el valor más alto por sobre el umbral con valores entre 0.250 a 0,275, sugiriendo que esta región representa el candidato principal para el péptido maduro activo de esta miticina. Comparativamente, el perfil de miticina C muestra una menor amplitud de fluctuación que el de miticina B, con picos aproximadamente un 10 % más bajos.

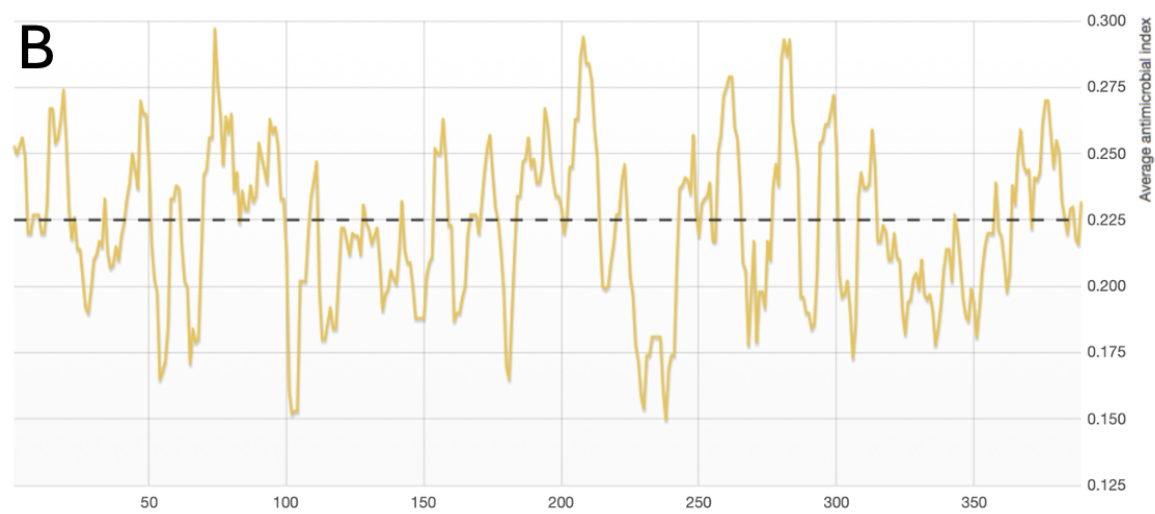
Para miticina C-X1 (Figura 6C) reveló un perfil de índice antimicrobiano con características que la distinguen de las otras miticinas, con un índice antimicrobiano entre 0.10 y 0.40. Entre las posiciones 75-125, se observó el pico más prominente de todas las

miticinas analizadas (0.40), lo que constituye un punto de actividad antimicrobiana excepcional dentro de la familia de miticinas de *M. chilensis*.

Miticina B



Miticina C



Miticina C-X1



Figura 6: Análisis de AMPA de las secuencias completas de miticinas de *M. chilensis*. Se presenta el índice antimicrobiano promedio (eje Y) en función de la posición aminoacídica (eje X) para miticina B (A), miticina C (B) y miticina C-X1 (C). La línea horizontal punteada indica el umbral de actividad antimicrobiana (0.225). Valores por encima del umbral indican regiones con características fisicoquímicas compatibles con actividad antimicrobiana directa.

Tabla 8: Síntesis de predicciones estructurales.

Propiedad	Miticina B	Miticina C	Miticina C-X1
AMPA score	0.30	0.32	0.40
Localización de puntaje AMPA más alto.	Distribuido	Región central (250-300)	Región central (75-125)
Clivaje ProP 1.0	Distribuido (N-terminal hacia central)	Concentrado (región central)	Concentrado (región central)
Dominio transmembrana	Sí posee	No posee	No posee
pI	9.73	10.01	9.46

Mecanismos de acción (Predicción)	Defensa directa, se inserta en la membrana	Regulador del sistema inmune, antiviral	Actividad antimicrobiana especializada
-----------------------------------	--	---	--

3.2.2. Análisis ProP-1.0

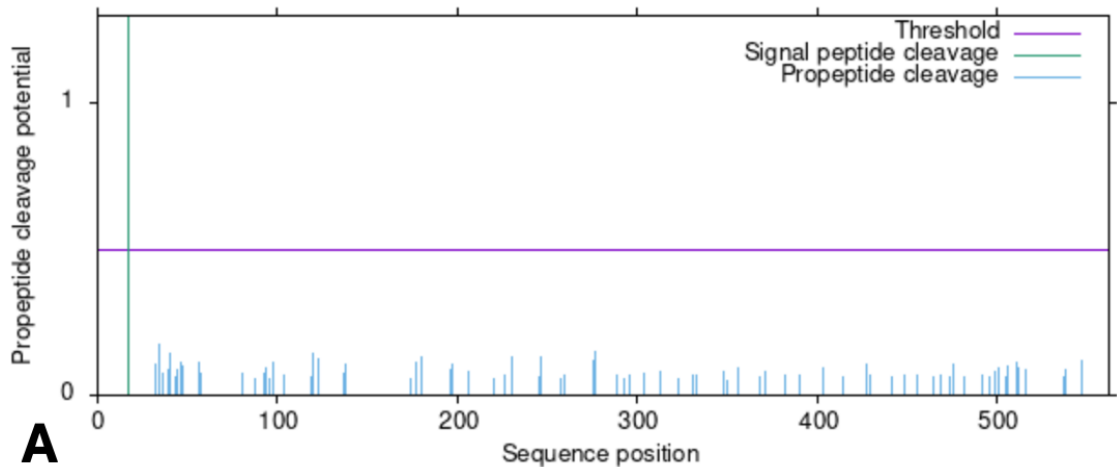
El análisis ProP 1.0 de miticina B (Figura 7A) reveló un perfil de predicción de clivaje con múltiples sitios de clivaje. La línea horizontal magenta representa el umbral de probabilidad (0.5), por encima del cual los sitios se consideran probables de clivaje. La línea azul claro en la región N-terminal corresponde a la predicción de clivaje de péptido señal, lo que identifica el probable sitio de eliminación de la secuencia post-translocación en el retículo endoplasmático. El patrón de distribución de sitios de clivaje de propéptido mostró una concentración predominante en dos regiones principales, la N-terminal y la región central, con la región posterior presentando una menor densidad de sitios predichos, aunque no logran superar el umbral. Este modelo de procesamiento moderado es coherente con los hallazgos del análisis AMPA previo, en el que se identificaron múltiples picos de actividad antimicrobiana de magnitud moderada, distribuidos uniformemente.

El análisis ProP 1.0 de miticina C (Figura 7B) mostró un perfil diferente al de miticina B, lo que refleja una estrategia de procesamiento más extensa y compleja. Se observó una densidad moderada en la región N-terminal temprana, que aumenta significativamente hacia la región central, donde, entre las posiciones 250 y 350, se observa el patrón más relevante del análisis, alcanzando un valor cercano a 1.0. Esto se correlaciona con el incremento de la actividad antimicrobiana observado en el análisis AMPA de la región central.

El análisis ProP 1.0 de miticina C-X1 (Figura 7C) comienza con densidad moderada en los sitios de clivaje en su región N-terminal, similar al patrón observado en miticina C, aumentando la densidad de sitios de clivaje en la región central con una probabilidad de clivaje entre 0.6 a 0.8, y disminuyendo para la región posterior. Al igual que miticina B, esta no supera el umbral.

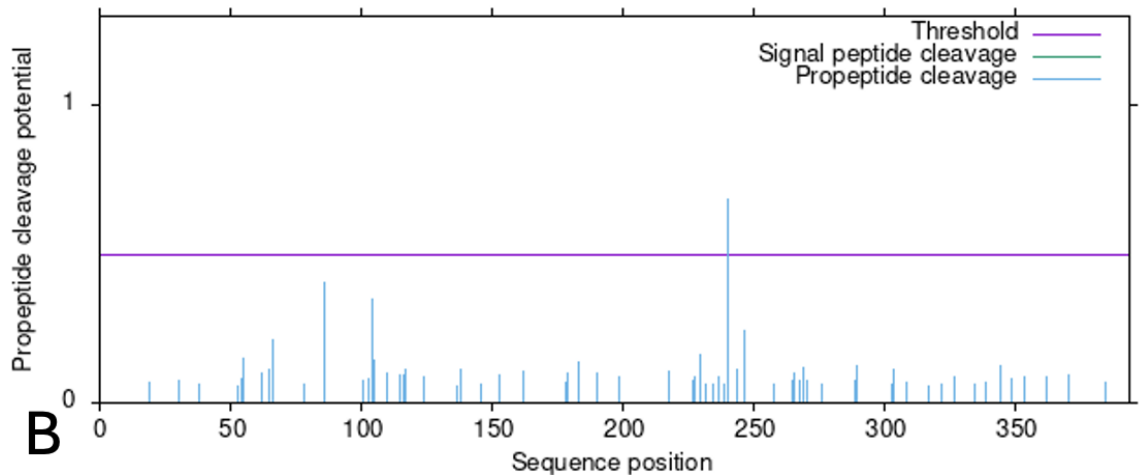
Miticina B

ProP 1.0: predicted propeptide cleavage sites in MCH000946.1_{Chromosome1} translation, furin-specific predic



Miticina C

ProP 1.0: predicted propeptide cleavage sites in MCH004303.1_{Chromosome1} translation, furin-specific predic



Miticina C-X1

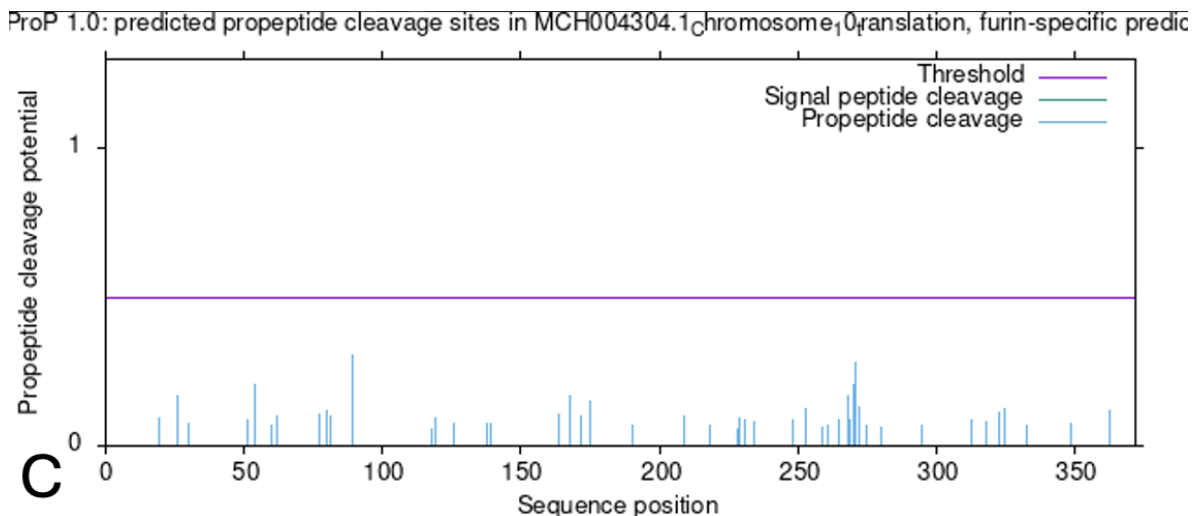


Figura 7: Análisis de sitios de clivaje de proteasas predichos por ProP 1.0 en miticinas de *M. chilensis*. Se presentan gráficos del potencial de clivaje de propéptido (eje Y) en función de la posición aminoacídica (eje X) para miticina B (A), miticina C (B) y miticina C-X1 (C). La línea horizontal magenta representa el umbral de probabilidad (0.5) para la predicción de clivaje. Las barras azul claro representan el clivaje de la péptido señal, mientras que las barras azul oscuro representan predicciones de clivaje de propéptido.

3.2.3. Análisis TMHMM-2.0

El análisis proporcionó el número de hélices transmembrana predichas, posiciones de inicio y término de cada segmento transmembranal, el número esperado de aminoácidos en regiones transmembrana versus regiones extra e intracelulares, la probabilidad de orientación del extremo N-terminal y una representación gráfica de la probabilidad posterior de que cada residuo se encuentre en la región transmembranal.

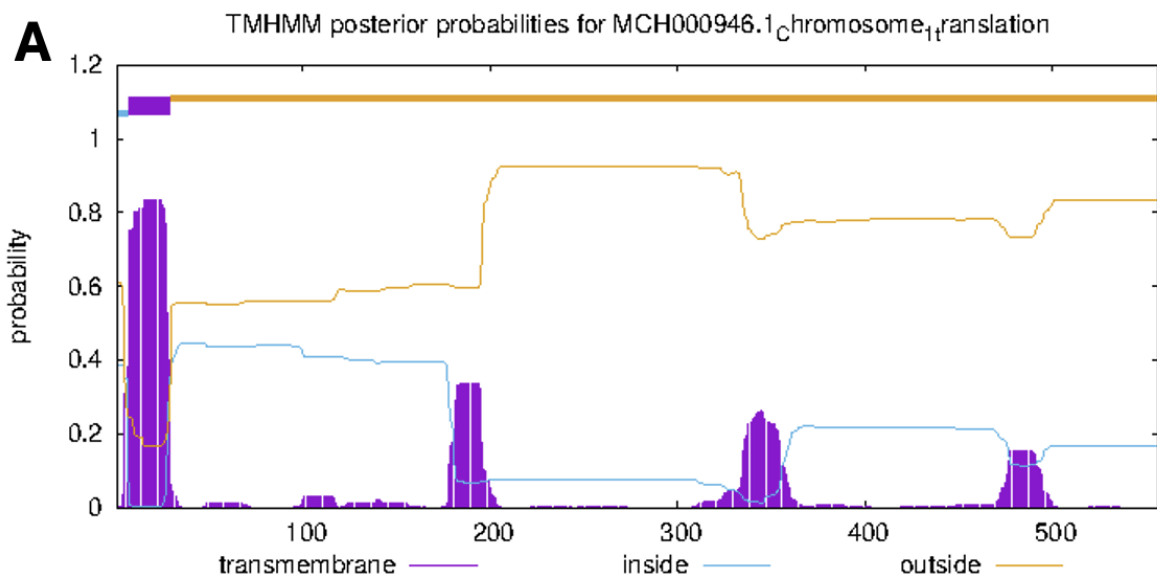
Para la secuencia de Miticina B (Figura 8A) se observa un pico prominente de probabilidad transmembranal que alcanza un valor aproximado a 1.0. Este se ve definido y localizado, indicando la presencia de una primera hélice transmembranal en los primeros 30 aminoácidos de la secuencia. Luego, en la región central, se observan picos moderados con una distribución no uniforme, sugiriendo la presencia de posibles dominios transmembranales débiles o parciales, en contraste con la mayor probabilidad en la región

N-terminal. Estos patrones disminuyen a medida se avanza a la región posterior de la secuencia.

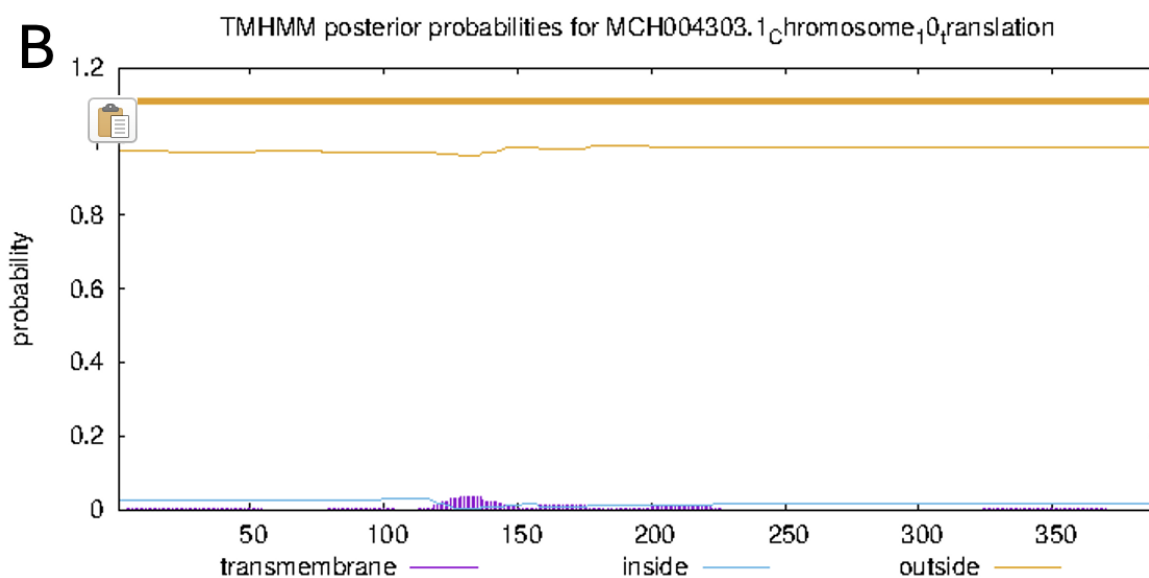
Para miticina C (Figura 8B) se presenta un patrón mucho más simple y distinto comparado al de miticina B. Se observan picos discretos y muy pequeños de probabilidad transmembranal, con máximos aproximados de sólo 0.05 a 0.08, prácticamente imperceptibles. En el gráfico se observa que la región N-terminal es completamente extracelular, predicción que se mantiene a lo largo de la secuencia.

Para miticina C-X1 (Figura 8C) se mostró un patrón similar al de miticina C, reflejando las características compartidas entre estas dos isoformas. La diferencia se encuentra en la estructura de la péptido señal que se presenta de forma más evidente al comienzo de la secuencia.

Miticina B



Miticina C



Miticina C-X1

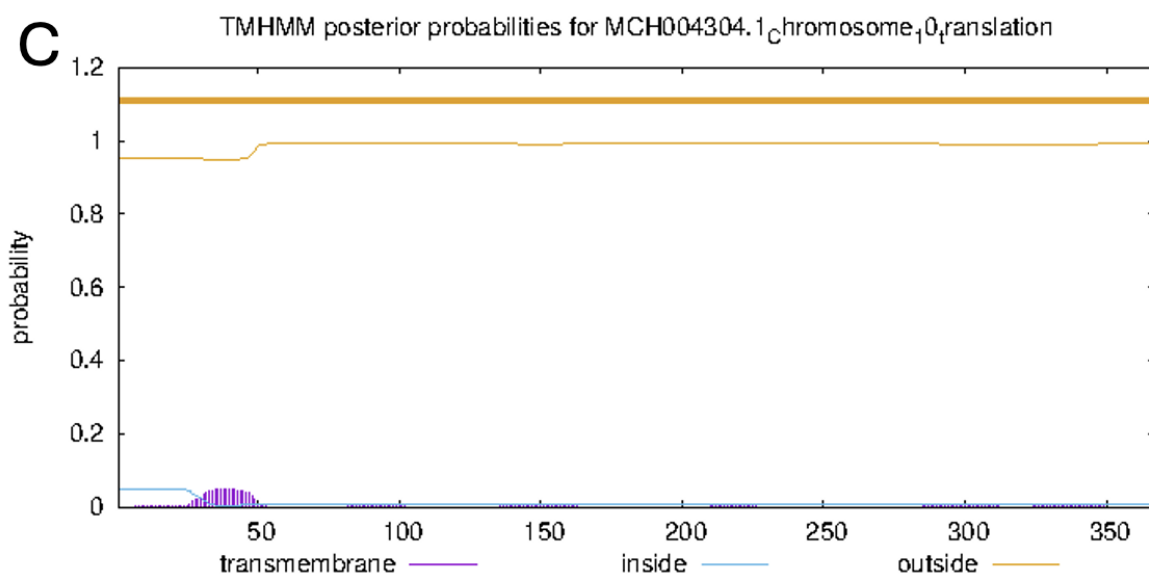


Figura 8: Análisis predictivo TMHMM de las secuencias completas de *M. chilensis*. Se presentan gráficos de probabilidad posterior para cada estado topológico (eje Y) en función de la posición aminoacídica (eje X) para miticina B (A), miticina C (B) y miticina C-X1 (C). Las barras moradas representan probabilidad de dominio transmembranal, barras azul claro representan probabilidad de región intracelular (inside) y las barras naranjas representan la probabilidad de secretar a regiones extracelulares (outside).

3.2.4. Análisis DeepLoc-2.1

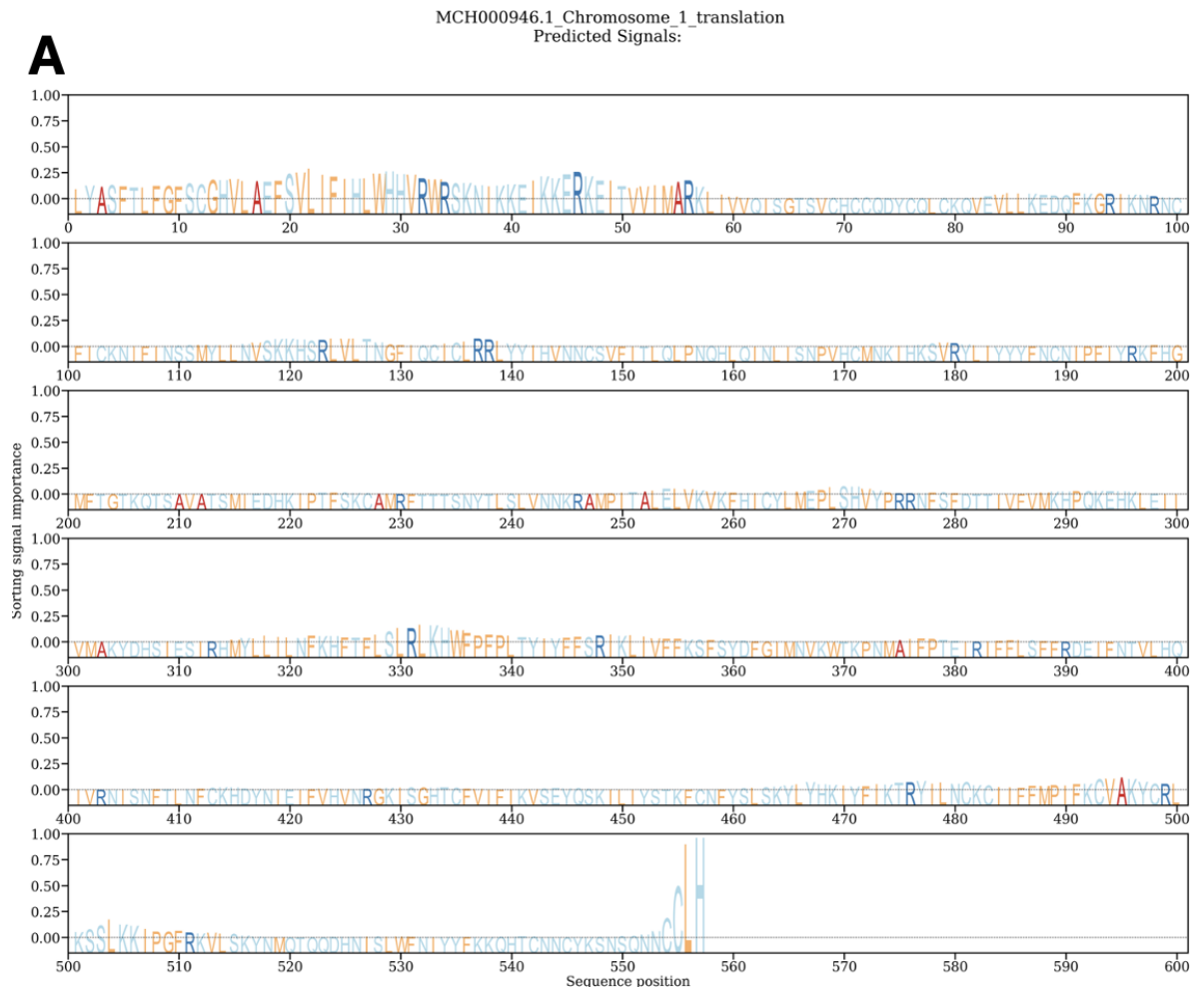
El análisis DeepLoc-2.1 fue empleado para validar y ampliar las predicciones de localización obtenidas mediante TMHMM, proporcionando información sobre estrategias de distribución y retención celular de cada miticina.

Para Miticina B (Figura 9A) se identificó un patrón característico de una péptido señal, pero débil. La visualización muestra seis paneles separados correspondientes a diferentes regiones de la secuencia, comenzando por el primer panel donde se observa una coloración inicial mayormente naranja y roja, con unos puntos azules dispersos. La coloración de la secuencia aminoacídica indica la probabilidad de pertenencia a una región de péptido señal (azul) o región en ausencia de esta señal convencional (naranja y roja).

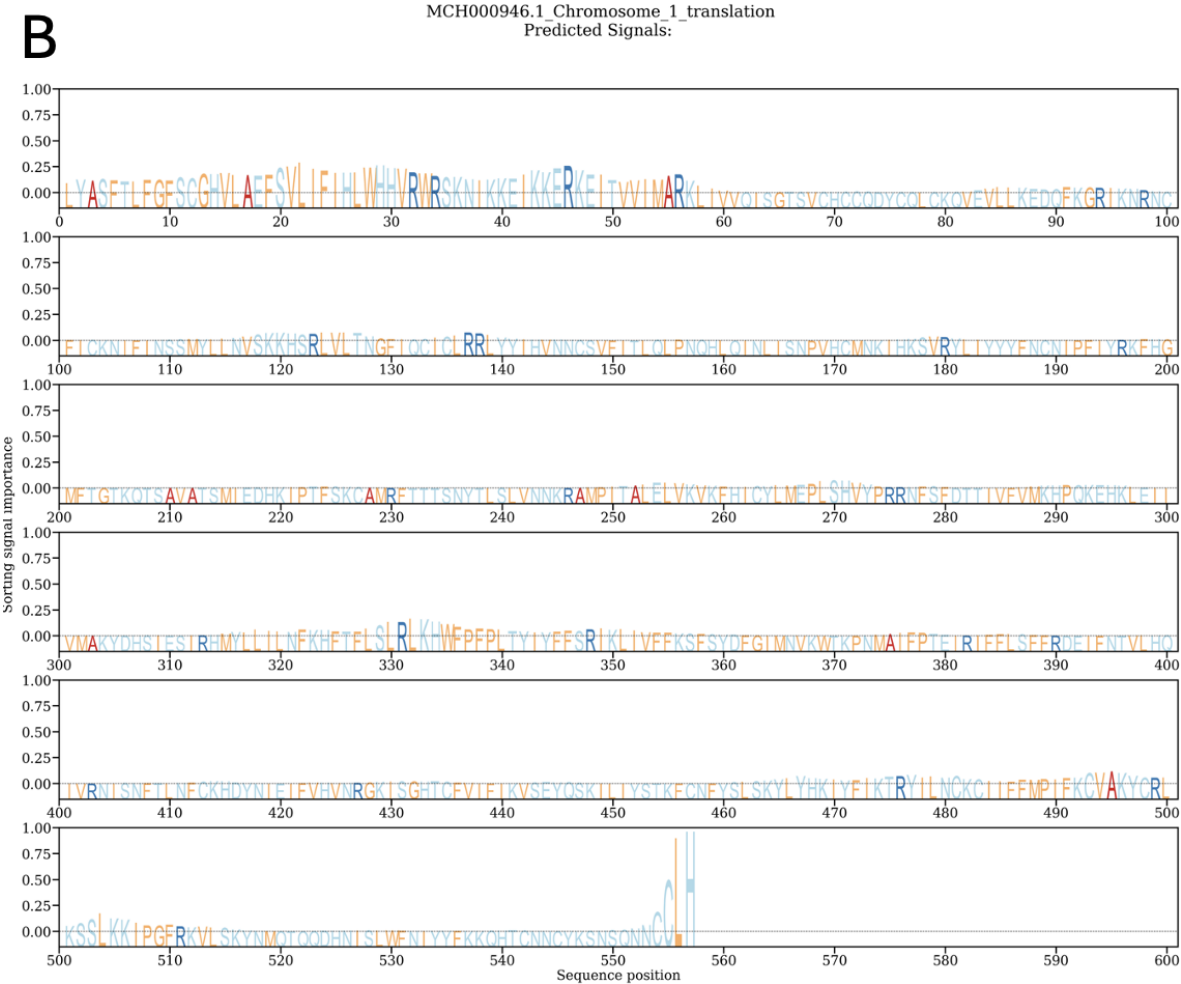
Para miticina C (Figura 9B) se mostró un patrón más definido que en Miticina B y se observan 6 paneles correspondientes a la secuencia completa. Se observa un patrón mayormente naranja y rojo en las posiciones iniciales, seguido por una zona con puntos azules dispersos. A diferencia de la miticina anterior, en esta se puede ver una tendencia ligeramente mayor de coloración azul en esta región inicial, sugiriendo la presencia de residuos catiónicos e hidrofóbicos ligeramente mejor organizados. Por lo tanto, se observa una péptido señal más notable que en miticina B.

Miticina C-X1 (Figura 9C) refleja diferencias en su región N-terminal y se observan 4 paneles correspondientes a la secuencia completa. Se observa un patrón predominante de naranja y rojo en posiciones iniciales consistentes con las miticinas B y C. Sin embargo, entre las posiciones 20-60 se observan múltiples puntos azules distribuidos, indicando la presencia de residuos con características de péptido señal. En las posiciones 50-60 se puede observar un alza de densidad en componentes azules. Para la sección final de esta secuencia se vuelve a observar una concentración de residuos azules, probablemente correspondientes al punto de clivaje anteriormente identificado en el análisis ProP 1.0.

Miticina B



Miticina C



Miticina C-X1

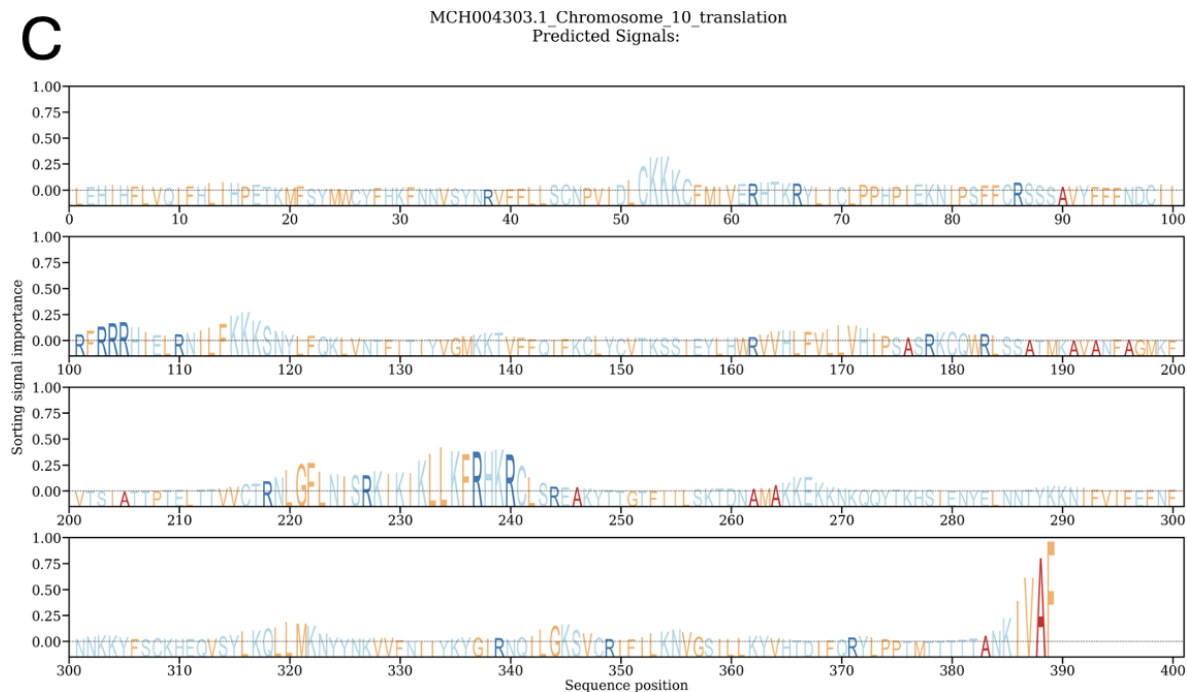


Figura 9: Análisis de predicción de péptidos señal mediante DeepLoc-2.1 en miticinas de *M. chilensis*. Se presentan gráficos de predicción de péptido señal para miticina B (A), miticina C (B) y miticina C-X1 (C). La coloración de la secuencia aminoacídica indica la probabilidad de pertenencia a una región de péptido señal (azul) o región en ausencia de esta señal convencional (naranja y roja).

3.3. Caracterización fisicoquímica

El análisis fisicoquímico realizado con la herramienta ProtParam (Tabla 7) revela diferencias notables en el tamaño de las variantes estudiadas en *M. chilensis*. La miticina B se distingue por ser la isoforma más extensa y pesada, compuesta por 557 aminoácidos y con una masa molecular de 66,7 kDa. En contraste, las variantes miticina C y C-X1 presentan dimensiones más reducidas y similares entre sí, con longitudes de 389 y 367 residuos y pesos moleculares de 46,4 y 44,1 kDa, respectivamente. No obstante, todas las proteínas comparten un perfil básico, evidenciado por sus puntos isoeléctricos teóricos (pI) elevados, que oscilan entre 9,46 y 10,01, siendo la miticina C la que exhibe el mayor carácter catiónico.

Tabla 9: Composición fisicoquímica de Miticinas B, C y C-X1 en *M. chilensis*.

	Miticina B	Miticina C	Miticina C-X1
Número de Aminoácidos	557	389	367
pI teórico	9.73	10.01	9.46
Peso molecular	66652.06	46442.26	44128.22

Tabla 10: Composición aminoacídica de Miticina B, C y C-X1 en *M. chilensis*.

Aminoácidos	Miticina B		Miticina C		Miticina C-X1	
Ala (A)	11	2.0%	12	3.1%	5	1.4%
Arg (R)	25	4.5%	20	5.1%	15	4.1%
Asn (N)	38	6.8%	27	6.9%	29	7.9%
Asp (D)	9	1.6%	4	1.0%	13	3.5%
Cys (C)	26	4.7%	14	3.6%	11	3.0%
Gln (Q)	18	3.2%	10	2.6%	22	6.0%
Glu (E)	16	2.9%	13	3.3%	12	3.3%
Gly (G)	11	2.0%	7	1.8%	5	1.4%
His (H)	28	5.0%	15	3.9%	17	4.6%
Ile (I)	58	10.4%	35	9.0%	30	8.2%
Leu (L)	47	8.4%	34	8.7%	35	9.5%

Lys (K)	52	9.3%	44	11.3%	32	8.7%
Met (M)	15	2.7%	9	2.3%	13	3.5%
Phe (F)	51	9.2	35	9.0%	25	6.8%
Pro (P)	14	2.5%	10	2.6%	10	2.7%
Ser (S)	40	7.2%	23	5.9%	30	8.2%
Thr (T)	28	5.0%	27	6.9%	21	5.7%
Trp (W)	5	0.9%	3	0.8%	2	0.5%
Tyr (Y)	31	5.6%	21	5.4%	25	6.8%
Val (V)	34	6.1%	26	6.7%	15	4.1%
Pyl (O)	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%

La composición aminoacídica de las tres miticinas proporciona una perspectiva sobre cómo cada isoforma adquiere su carácter básico y su especialización funcional. Miticina C exhibe 44 residuos de lisina (K, 11,3%) y 20 de arginina (R, 5,1%), lo que suma un total de 64 residuos catiónicos en su secuencia de 389 aminoácidos. En contraste, miticina B presenta 52 lisinas (9,3%) y 25 argininas (4,5%), con un total de 77 residuos catiónicos en 557 aminoácidos, lo que da como resultado una menor proporción relativa de carga positiva por residuo (aproximadamente 13,8% de carga positiva total en miticina B versus 14,4% en miticina C).

Miticina C-X1, por su parte, presenta 32 residuos de lisina (8,7%) y 15 residuos de arginina (4,1%), con una densidad de carga catiónica similar a miticina B (aproximadamente 12,8%). Sin embargo, la disposición específica de estos residuos

sugiere que miticina C-X1 podría ser un producto de proteólisis selectiva que retiene uno o varios dominios funcionales críticos de la proteína parental (Clark et al., 2021).

Miticina B contiene 58 isoleucinas (10,4%), 47 leucinas (8,4%) y 51 fenilalaninas (9,2%), lo que suma 156 residuos hidrofóbicos (27,9% de la secuencia). Miticina C presenta 35 isoleucinas (9,0%), 34 leucinas (8,7%) y 35 fenilalaninas (9,0%), con un total de 104 residuos hidrofóbicos (26,7% de la secuencia). Miticina C-X1 contiene 30 isoleucinas (8,2%), 35 leucinas (9,5%) y 25 fenilalaninas (6,8%), lo que suma 90 residuos hidrofóbicos (24,5% de la secuencia).

3.4. Evaluación de la expresión génica de miticinas en hemocitos de *M. chilensis*

Se evaluó la expresión génica relativa de las tres miticinas identificadas en hemocitos de *M. chilensis* bajo múltiples condiciones experimentales. Los tratamientos incluyeron un grupo control sin estimulación solo hemolinfa; un grupo G1: Hemolinfa y desafío con *V. anguillarum*; grupo G2: Hemolinfa y desafío con *V. anguillarum* y STM2457 y finalmente un grupo G3: Hemolinfa y desafío con STM2457. Los hemocitos fueron extraídos después de la estimulación, se aisló ARN total, se sintetizó cDNA y se realizó una cuantificación de expresión génica mediante qPCR.

El análisis de expresión génica de miticina C (Figura 10A) en el grupo control indicó una expresión basal detectable, pero reducida, en hemocitos no estimulados. Al ser estimulada con *V. anguillarum* (G1), se observó un incremento en la expresión de miticina C. Al observar la expresión del grupo G2, se identificó el nivel de expresión más elevado. Este incremento es altamente significativo estadísticamente, donde la combinación de estimulación bacteriana en conjunto con STM2457 produce un efecto potenciador sobre la expresión de miticina C. Para el grupo G3 la expresión disminuye notablemente, indicando que este tratamiento no mantiene la inducción de miticina C esperada y observada en los grupos anteriores.

El análisis de expresión génica de miticina C-X1 (Figura 10B) demostró, en el grupo control, un nivel de expresión similar al observado anteriormente, lo que predice que esta proteína es sintetizada a bajo nivel basal. La estimulación con G1 produjo un incremento

moderado en expresión siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$, indicado por *). El resultado del desafío del grupo G2 mostró un nivel de expresión elevado, lo que sugiere que este gen presenta una gran inducción ante la combinación de estos estímulos. Finalmente, en el grupo G3, la expresión disminuyó significativamente en comparación con los grupos anteriores.

La expresión génica de miticina B (Figura 10C) reveló un patrón distinto a las miticinas C y C-X1. Su grupo control se mantuvo expresado a condiciones bajas, sin embargo, los resultados cambian para los grupos G1 y G2. Para G1 se observó un incremento descrito solo para esta miticina, siendo el grupo con mayor expresión en comparación con las anteriores. En el grupo G2 se observó una disminución notable en comparación con los grupos anteriores en la expresión génica de esta proteína, mientras que en los grupos anteriores se observó una alta expresión. Esto sugiere que, bajo condiciones como las propuestas en un desafío inmunológico intenso, los hemocitos reducen la síntesis de miticina B. Para el grupo G3 la expresión aumenta ligeramente, sugiriendo una recuperación parcial entre la respuesta del grupo anterior. Miticina B fue la única proteína con un patrón de expresión distinto a las otras dos.

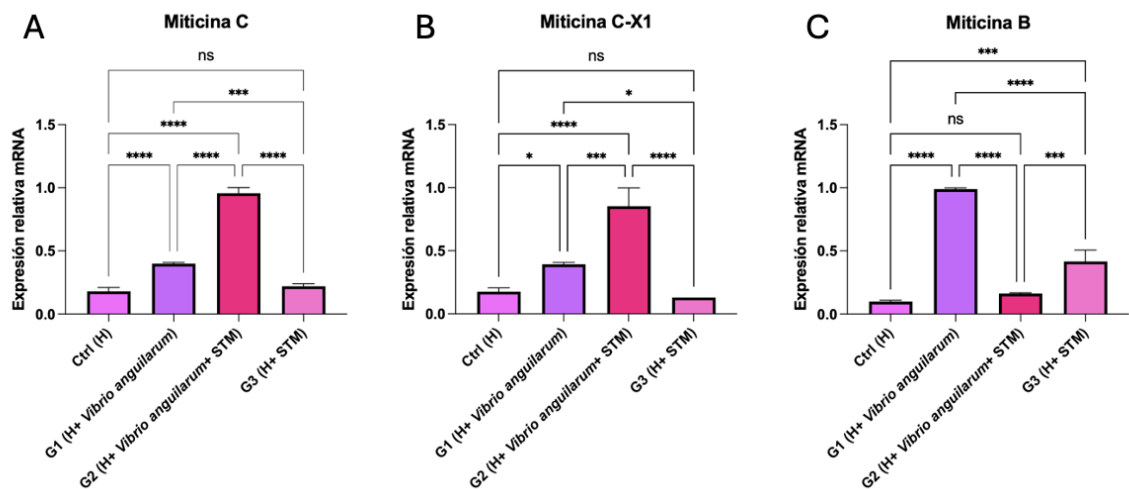


Figura 10: Expresión relativa de mRNA de Miticina B, C y C-X1 en hemocitos de *M. chilensis* bajo diferentes estímulos inmunológicos. Se presentan gráficos de barras de expresión relativa de ARNm (eje Y) para las miticinas propuestas bajo cuatro condiciones: Grupo control (sólo hemolinfa), grupo G1 (hemolinfa + *V. anguillarum*), grupo G2

(hemolinfa + *V. anguillarum* + STM2457) y grupo G3 (hemolinfa + STM2457). Los asteriscos indican la significancia estadística comparativa entre condiciones: ns (no significativo), * ($p < 0.05$), *** ($p < 0.001$) y **** ($p < 0.0001$).

4. DISCUSIÓN

El análisis filogenético de las miticinas en *M. chilensis* reveló patrones de divergencia evolutiva que proporcionan información crucial sobre la historia de esta familia de péptidos antimicrobianos. La distancia evolutiva máxima observada en miticina B fue de 0.0137, comparada con la de miticina C, de 0.0043, lo que sugiere diferencias significativas en el tiempo de divergencia desde el último ancestro común compartido entre *M. chilensis* y sus parientes cercanos del género *Mytilus* (Padhi & Verghese, 2008).

La mayor conservación de miticina C, reflejada en su menor distancia evolutiva, indica que esta isoforma ha estado bajo una presión selectiva restrictiva más fuerte a lo largo del tiempo evolutivo, lo que sugiere un rol funcional fundamental y conservado que es crítico para la supervivencia del hospedador (Leoni et al., 2017). Esta diferencia sugiere que la miticina C ha experimentado cambios acumulativos menores en su secuencia a lo largo de la evolución, posiblemente debido a restricciones funcionales más estrictas o a una mayor importancia en la defensa antimicrobiana.

Este patrón de conservación diferencial es consistente con lo observado en otros estudios sobre la evolución de péptidos antimicrobianos, donde se ha documentado que la presión selectiva puede variar de forma constante entre miembros de la misma familia génica (Lazzaro et al., 2020). La menor diversidad nucleotídica en miticina C podría reflejar una función inmunológica más crítica y menos tolerante a cambios, mientras que la mayor variabilidad observada en miticina B sugiere una función que puede acomodar más variaciones sin perder su eficacia (Rey-Campos, Novoa, et al., 2020).

La observación de que miticina C ocupa una posición más basal en el árbol filogenético similar con *M. galloprovincialis* (distancia de 0.0043-0.0056), sugiere que esta es la forma ancestral de miticina que ha sido preservada a través de múltiples eventos de especiación, la cual puede ser encontrada en su sorprendente variabilidad de la secuencia y los niveles de expresión de las miticinas en los mejillones, confirmando el papel fundamental de estos antibióticos naturales en la antigua interacción huésped-patógeno de estrategias de

inhibición mutua, evasión y adaptación (Pallavicini et al., 2008). Esto reconoce a miticina C como una forma de AMP altamente polimórfica con un largo historial evolutivo.

En contraste, miticina B, con su mayor distancia evolutiva (0.0076 a 0.0137), podría representar una forma que ha divergido entre las especies de *Mytilus*. Esta diferencia sugiere que *M. chilensis* ha desarrollado versiones especializadas de miticina B para que sean adaptadas a su ambiente marino en específico, mientras que miticina C mantiene una forma ancestral compartida estrechamente con sus parientes europeos (Ver tabla 2) (Kireta et al., 2025).

Los análisis bioinformáticos de la estructura predicha revelaron diferencias fundamentales entre las tres isoformas de miticinas presentadas, con implicaciones importantes para sus funciones biológicas. El análisis AMPA mostró que miticina C-X1 posee un score de actividad antimicrobiana de 0.40, miticina C uno de 0.32 y miticina B uno de 0.30. Este hallazgo, considerando que la miticina C-X1 es la más compacta de las tres, sugiere que esta miticina podría representar una versión más refinada evolutivamente, con una mayor densidad de propiedades antimicrobianas por unidad de masa molecular (Torrent et al., 2009). Esta última isoforma podría presentar actividad antimicrobiana directa y potente, potencialmente mediante una interacción más eficiente con las membranas bacterianas (Duwadi et al., 2018).

Los patrones de procesamiento proteolítico predichos por ProP 1.0 revelaron estrategias diferenciadas de maduración de péptidos entre las isoformas, en el caso de la Miticina B mostró sitios de clivaje distribuidos a lo largo de la secuencia, con concentraciones particulares en la región N-terminal y región central. Este patrón es consistente con el análisis comparativo realizado por (Rey-Campos, Novoa, et al., 2020) en *M. galloprovincialis*, quienes caracterizaron 106 variantes de péptidos antimicrobianos ricos en cisteína e identificaron sitios de clivaje altamente conservados en posiciones críticas del precursor proteico. Estos sitios son reconocidos específicamente por convertasas de proteína y generan el péptido maduro catiónico a partir de una región aniónica de extensión C-terminal, revelando estrategias de procesamiento enzimático diferenciadas, específicas de cada isoforma.

Por otro lado, (Domeneghetti et al., 2015) caracterizaron estructuralmente múltiples isoformas de miticina C sintetizadas en forma reducida y oxidada en *M. galloprovincialis*, demostrando que fragmentos que incluyen elementos β -estructurales específicos resultan en diferentes rangos de inhibición contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, estos hallazgos sugieren que la densidad y distribución de sitios de clivaje proteolítico predichos por ProP 1.0 en miticina B (concentrados en regiones N-terminal y central) pueden generar múltiples péptidos bioactivos secundarios durante el procesamiento post-traducciona, ampliando su arsenal antimicrobiano.

En contraste, tanto miticina C como miticina C-X1 mostraron un patrón de clivaje más concentrado, con sitios de clivaje principalmente en la región central de la secuencia. Este patrón diferencial sugiere que miticina B podría generar múltiples fragmentos peptídicos potencialmente activos mediante procesamiento proteolítico por proteasas, mientras que las miticinas C y C-X1 podrían producir péptidos maduros más definidos (Duckert et al., 2004). Este mecanismo diferencial de procesamiento podría contribuir a la capacidad de miticina B de actuar rápidamente ante una amenaza inmediata, generando múltiples variantes activas simultáneamente. Esta estrategia de respuesta rápida es consistente con la expresión constitutiva y altamente localizada de miticinas en hemocitos de las branquias de *M. galloprovincialis*, el primer tejido en contacto directo con patógenos potenciales.

Adicionalmente, (Balseiro et al., 2011) proponen que la presencia masiva de hemocitos expresando miticinas en la base de los pliegues branquiales podría sugerir un papel específico de estas isoformas en una respuesta inmunológica rápida. Experimentalmente, miticina B representa una de las respuestas génicas más rápidamente inducidas en hemocitos cuando se activa la cascada de respuesta antimicrobiana, siendo significativamente regulada en tiempos tempranos post-estimulación inmunológica, lo que indica su potencial como mediador de defensa innata rápida y coordinada en la línea defensiva branquial de los mejillones.

El análisis de topología de membrana utilizando TMHMM 2.0 reveló la diferencia funcional más crítica entre las isoformas: la presencia de un dominio transmembranal predicho prominentemente en miticina B en comparación con la ausencia de éste en las

miticinas C y C-X1. Este hallazgo representa una diferencia estructural fundamental que podría explicar, en parte, las estrategias de procesamiento proteolítico diferenciadas observadas en cada isoforma y sus respectivos mecanismos antimicrobianos. Específicamente, miticina B mostró una probabilidad estimada de 0.85-0.95 de poseer al menos un dominio transmembrana, mientras que las miticinas C y C-X1 mostraron probabilidades inferiores a 0.1 de presentar helicoides transmembranales.

Un dominio de estas características en miticina B sugiere que esta molécula está optimizada para una inserción directa en membranas bacterianas, lo cual es consistente con un mecanismo de acción que forma poros o perturba la integridad membranal (Hancock & Chapple, 1999; Le et al., 2017). En contraste, la ausencia de dominios transmembranales en miticinas C y C-X1 sugiere que estos péptidos actúan principalmente en el citoplasma bacteriano o funcionan como moléculas señalizadoras sin requerir inserción en la membrana del patógeno (Verbeke et al., 2017).

Esta interpretación es respaldada por una investigación que documenta que miticina C actúa como una citoquina importante en la modulación de la respuesta inmunológica, reclutando hemocitos y activando genes de inmunidad (Balseiro et al., 2011). El mecanismo de acción de citoquina no requeriría inserción transmembranal, sino más bien interacciones con receptores en la superficie de esta. La miticina C también ha sido documentada como poseedora de propiedades antivirales (Novoa et al., 2016), participación en la regeneración de tejidos y propiedades quimiotácticas (Balseiro et al., 2011), todas las funciones consistentes con una molécula soluble que actúa a través de receptores celulares específicos en lugar de disrupción física de membranas (Ver tabla 3).

La combinación de herramientas como TMHMM y DeepLoc-2.1 permite validar e integrar predicciones de topología de membrana con análisis más sofisticados de localización y distribución celular, proporcionando una comprensión más completa de las estrategias de secreción y retención intracelular de proteínas y péptidos (Almagro Armenteros et al., 2017)

Los resultados del análisis DeepLoc-2.1 para miticina B revelan un patrón caracterizado por un péptido señal débilmente definida, con una coloración predominantemente naranja

y roja distribuida a lo largo de la secuencia aminoacídica inicial, intercalada con puntos azules dispersos. Esta coloración, donde el azul indica probabilidad de pertenencia a una región de péptido señal y el naranja/rojo indica ausencia de características convencionales de péptido señal, sugiere una arquitectura de N-terminal ambigua (Almagro Armenteros et al., 2017). La débil señalización predicha para miticina B es consistente con hallazgos anteriores que documentan que esta miticina posee actividades antimicrobianas directas contra bacterias gram positivas y gram negativas, pero presenta una menor sofisticación en su arquitectura de señal peptídica comparada con otras miticinas (Gerdol et al., 2014).

Esta característica estructural podría reflejar una estrategia de defensa clásica, donde el péptido se sintetiza como pre-proteína pero requiere procesamiento proteolítico menos complejo para alcanzar su estado funcional. La débil predicción de péptido señal en miticina B podría indicar que, aunque es sintetizada para su secreción, su región N-terminal carece de las características de hidrofobicidad concentrada típicas de péptidos señal canónicos bien definidos (Petersen et al., 2011; von Heijne, 1990). Este débil péptido señal sugiere una localización intracelular en hemocitos, donde miticina B podría ejercer sus funciones antimicrobianas de manera más local o constitutiva, actuando como primera línea de defensa directa contra patógenos bacterianos sin requerir una secreción sistémica altamente eficiente.

La coloración azul, ligeramente más predominante en las posiciones iniciales de miticina C que en miticina B, indica una mejor organización de residuos catiónicos e hidrofóbicos en su región N-terminal, sugiriendo la presencia de un péptido señal más robusta y optimizada (Almagro Armenteros et al., 2017).

Esta diferencia estructural es particularmente significativa considerando que miticina C, a diferencia de miticina B, posee funciones inmunorreguladoras además de actividad antimicrobiana directa. Se ha documentado que miticina C actúa como molécula quimiotáctica y reguladora inmunológica, capaz de modular la expresión de otros péptidos antimicrobianos en respuesta a estímulos patogénicos (Balseiro et al., 2011). Este tipo de péptido señal podría reflejar la necesidad de secreción y procesamiento más eficiente, dado que miticina C debe ser liberada en la hemolinfa para ejercer sus funciones

quimiotácticas y reguladoras del sistema inmune, lo que requiere un sistema de transporte más elaborado que el requerido para péptidos con funciones locales o constitutivas. El patrón de coloración azul más pronunciado sugiere que esta miticina posee una maquinaria de reconocimiento y secreción más sofisticada, permitiendo una distribución sistémica que amplifica su alcance biológico y su capacidad de coordinar respuestas inmunológicas a través de la hemolinfa del hospedero (Moreira et al., 2020).

Miticina C-X1 presenta un perfil de predicción que refleja diferencias significativas en su región N-terminal respecto a las miticinas B y C. El análisis demuestra un patrón que comienza con naranja/roja en posiciones iniciales, pero se diferencia en las posiciones 20-60, donde se observa una distribución múltiple de puntos azules que indica la presencia de residuos con características de péptido señal dispersa a lo largo de esta región intermedia. Este patrón sugiere una estructura de señalización fragmentada o modular (Almagro Armenteros et al., 2017), en la que los elementos de reconocimiento de señal no se concentran en una región compacta, sino que se distribuyen a lo largo de la secuencia. La concentración de residuos con características de péptido señal en su región intermedia podría corresponder a un sitio secundario de procesamiento, donde tales regiones frecuentemente se asocian a sitios de clivaje de proteasas convertasas, enzimas que reconocen motivos de aminoácidos básicos multiargínicos como (K/R)-X-X-(K/R) y son responsables del procesamiento de precursores de neuropéptidos y AMPs en el aparato de Golgi (Colon & Bhavé, 2016; Duckert et al., 2004).

El análisis bioinformático también revela una concentración de residuos azules al final de la secuencia de miticina C-X1, que corresponde al punto de clivaje predicho por ProP 1.0. La coincidencia entre la concentración de predicción azul en DeepLoc-2.1 (indicativa de características tipo péptido señal o de procesamiento) y los sitios predichos por ProP 1.0 sugiere que estos puntos corresponden a sitios funcionales de proteólisis, donde proteasas del hospedero o serina proteasas antimicrobianas inherentes al péptido podrían liberar el dominio maduro funcional del precursor (Van den Steen et al., 2002). Esta estructura sugiere una estrategia evolutiva en la que un único transcrito de preproproteína puede generar múltiples péptidos bioactivos, maximizando la diversidad funcional y permitiendo flexibilidad en la respuesta inmunológica (Petersen et al., 2011).

Las propiedades fisicoquímicas de los AMPs representan determinantes críticas de su función biológica, afectando mecanismos de acción, especificidad contra patógenos y potencial terapéutico. Características como el peso molecular, la carga neta y el punto isoelectrico (pI) no son meramente descriptivas, sino que son funcionalmente relevantes para la interacción de estos péptidos con membranas bacterianas y su distribución celular (Osorio et al., 2015). El análisis fisicoquímico realizado mediante la herramienta ProtParam nos permite interpretar las estrategias moleculares empleadas por diferentes miticinas de *M. chilensis* en su función defensiva.

La miticina B se distingue por ser la isoforma más extensa y pesada, compuesta por 557 aminoácidos y con una masa molecular de 66,7 kDa. En contraste, las variantes miticina C y C-X1 presentan dimensiones reducidas y similares entre sí, con longitudes de 389 y 367 residuos y pesos moleculares de 46,4 y 44,1 kDa, respectivamente. Esta disparidad de tamaño, de aproximadamente un 30 % mayor para miticina B que para las otras dos variantes, sugiere estrategias funcionales fundamentalmente distintas.

El mayor tamaño de estas miticinas despierta interés considerando que la mayoría de péptidos antimicrobianos reportados en la literatura científica oscilan entre 12 y 100 residuos (Zhang & Gallo, 2016), con longitudes óptimas generalmente entre 20 y 40 aminoácidos (Osorio et al., 2015). La presencia de una miticina B con 557 residuos sugiere que esta proteína no representa un AMPs en el sentido convencional, sino que probablemente sea un precursor de pro proteasas o una proteína multidominio de la que pueden derivarse péptidos maduros más pequeños mediante procesamiento proteolítico (Couture et al., 2011). Esta interpretación es congruente con el análisis anterior de predicción de péptidos señal mediante DeepLoc-2.1, que sugería múltiples sitios de clivaje en estas miticinas.

En contraste, el compacto tamaño de miticinas C y C-X1 (389 y 367 residuos) se alinea mejor con proteínas multidominio pequeñas o péptidos maduros derivados de proteólisis limitada, los cuales siguen siendo más grandes que los AMPs canónicos clásicos, pero más pequeños que miticina B, sugiriendo que estas isoformas pueden representar productos de procesamiento proteolítico parcial o proteínas estructuralmente distintas

optimizadas para funciones específicas sin requerir proteólisis adicional para alcanzar una óptima actividad antimicrobiana (Kireta et al., 2025).

A pesar de sus diferencias en tamaño, todas las proteínas comparten un perfil básico evidenciado por sus puntos isoeléctricos teóricos (pI) elevados, que oscilan entre 9,46 y 10,01. Miticina C exhibe el mayor carácter catiónico con un pI de 10,01, seguida por miticina B con un pI de 9,73 y miticina C-X1 con un pI de 9,46. Los valores de pI superiores a 10 son muy característicos de péptidos antimicrobianos naturales, reflejando una abundancia de residuos catiónicos básicos (lisina y arginina) que confieren carga neta positiva incluso a pH fisiológico (Osorio et al., 2015). La carga positiva que resulta de este alto pI es determinante de una actividad antimicrobiana, ya que facilita la atracción electrostática hacia las membranas bacterianas cargadas negativamente (Lopez Cascales et al., 2018).

El análisis de la composición aminoacídica de las tres isoformas de miticinas reveló patrones distintivos que reflejan diferencias funcionales especializadas. Aunque todas exhiben carácter catiónico marcado, típico de péptidos antimicrobianos, la densidad relativa de carga positiva varía. Miticina C exhibe la proporción más alta (14,4% residuos catiónicos), seguida por miticina B (13,8%) y miticina C-X1 (12,8%). Estas diferencias sugieren que cada isoforma está optimizada para diferentes estrategias de interacción membranal.

En cuanto a contenido hidrofóbico, miticina B exhibe la mayor densidad (27,9% residuos hidrofóbicos), seguida por miticina C (26,7%) y miticina C-X1 (24,5%). La composición diferencial de residuos catiónicos e hidrofóbicos entre isoformas, combinada con su disposición específica en la secuencia, sugiere especialización funcional divergente.

Un hallazgo particularmente relevante es que las tres miticinas mantienen un balance relativamente consistente de carga catiónica versus hidrofobicidad, con ratios de aproximadamente 12-14% residuos catiónicos versus 25-28% residuos hidrofóbicos. Esta proporción cae dentro del rango óptimo conocido para eficacia antimicrobiana (Lopez Cascales et al., 2018). Estudios previos han demostrado que el equilibrio entre residuos catiónicos e hidrofóbicos es crítico, ya que un exceso de carga catiónica (>14-16%) puede

reducir la actividad antimicrobiana al aumentar la tendencia del péptido a precipitar o a ser repelido por cambios electrostáticos en la membrana bacteriana, mientras que la deficiencia de residuos catiónicos (<8-10%) resulta en una atracción electrostática insuficiente para iniciar la interacción membrana-péptido (Oñate-Garzón et al., 2017).

La presencia de múltiples residuos de cisteína también es importante, miticina B contiene 26 cisteínas (4,7%), miticina C contiene 14 (3,6%), y miticina C-X1 contiene 11 (3,0%). La presencia de estos residuos en proporciones elevadas (3-5% de la secuencia) es característico de AMPs derivados de invertebrados marinos como bivalvos (Gerdol et al., 2012). Los puentes disulfuro formados por cisteínas no sólo estabilizan la estructura de estas proteínas, sino que también confieren resistencia a proteólisis, permitiendo que miticinas mantengan actividad incluso en ambientes de pH variable o presencia de proteasas, como los de la hemolinfa marina donde experimentan condiciones de hipoxia, estrés salino, y presencia de bacterias proteolíticamente activas (Novoa et al., 2016).

Cuando el pH del medio ambiente iguala el pI de una proteína, la proteína tiende a precipitar y perder función biológica (Osorio et al., 2015). Las miticinas con pI cercano a 10, son básicas y permanecerán cargadas positivamente en prácticamente todos los ambientes biológicos fisiológicos (pH 5,5-8,5). Esta característica asegura máxima solubilidad en los ambientes donde funcionan hemolinfa (pH ~7,8), gránulos hemolíticos (pH variable pero típicamente neutro a levemente ácido), y potencialmente dentro de vesículas ácidas tras ingestión por células inmunológicas, sin embargo, en ambientes ácidos el pH podría aproximarse a valores donde estas proteínas podrían modular su carga, mejorando su interacción con membranas como se ha documentado para miticina C de *M. galloprovincialis* (Novoa et al., 2016).

La cuantificación mediante qPCR de la expresión relativa de genes que codifican AMPs en hemocitos proporciona una ventana molecular directa hacia cómo estos organismos discriminan y responden a desafíos patogénicos específicos. El presente análisis de expresión génica de miticinas B, C y C-X1 en hemocitos de *M. chilensis* bajo desafíos con *Vibrio anguillarum* y tratamiento con STM2457, un inhibidor selectivo de METTL3 (methyltransferase-like 3), revela estrategias especializadas de regulación inmunológica y

potenciales roles de la metilación del ARN (m6A) en la organización de defensas antimicrobianas. Miticina C mostró un incremento significativo ($p < 0.0001$) en el grupo desafiado con *Vibrio anguillarum* y STM2457 (G2), lo que representó el nivel de expresión máximo entre todos los tratamientos evaluados. Esta alza de expresión en G2 sugiere un efecto potenciador en el que la inhibición de METTL3 amplifica la respuesta transcripcional a la estimulación bacteriana (Cao et al., 2024). En contraste, la disminución en el desafío con STM2457 (G3) indica que la inhibición de metilación m6A no sostiene la inducción previamente observada, sugiriendo que la vía de METTL3/m6A requiere activación simultánea de receptores de reconocimiento de patógenos (TLRs, específicamente TLR4 por lipopolisacáridos bacterianos de *Vibrio*) para mantener su efecto potenciador (Cao et al., 2024; Pallavicini et al., 2008).

Miticina C-X1 presentó un patrón de expresión similar, con un incremento en el grupo G1 ($p < 0.05$) y una alta expresión en G2 ($p < 0.0001$), confirmando que ambas isoformas C responden a la combinación de estimulación bacteriana e inhibición a la metilación de m6A. Sin embargo, miticina B exhibió un patrón distinto, siendo esta la única proteína que alcanzó su máxima expresión en respuesta a *Vibrio anguillarum* (G1), con una pronunciada supresión en el grupo G2 donde las miticinas C y C-X1 alcanzaron su máxima expresión. Esto sugiere que miticina B y sus homólogos podrían estar sometidas a regulaciones epigenéticas opuestas en el contexto de la metilación de m6A, consistente con estudios recientes que documentan roles divergentes de m6A en la regulación de distintos mediadores inmunológicos (Liang et al., 2023; Zhang et al., 2021).

La inhibición selectiva de METTL3 mediante STM2457 actúa como herramienta molecular para interrogar el papel específico de la regulación epigenética dependiente de m6A en la expresión diferencial de miticinas (Bedi et al., 2023). Los cambios observados en los niveles de expresión sugieren al menos dos estrategias regulatorias distintas operando en paralelo (Zaccara et al., 2019). La primera estrategia es llevada a cabo a través de liberación por desmetilación, hecha por ambas isoformas de miticina C. La regulación positiva de ambas isoformas de miticina C en el grupo G2, se inhibió METTL3 bajo desafío con *V. anguillarum*, sugiere un mecanismo en el cual estas isoformas podrían estar sometidas a represión epigenética basal dependiente de m6A. De ser así, la inhibición de

METTL3 con STM2457 reduciría los niveles de m6A globales y alteraría selectivamente la estabilidad de mRNA relacionados inmunológicamente, permitiendo que genes específicos de Miticina C y C-X1 fueran regulados de forma positiva (Sun et al., 2024). Este patrón sería consistente con modelos donde lectores de m6A como YTHDF2 reconocen marcas de m6A en la región cercana al codón de parada de los transcritos, reclutando un complejo que mediaría la degradación del mRNA (Wang et al., 2014). Cuando STM2457 reduce la metilación m6A mediada por METTL3, se elimina esta marca represiva, evitando el reconocimiento por YTHDF2 y aumentando la estabilidad del mRNA (Du et al., 2016). La presencia de *V. anguillarum* (G2) amplía este efecto mediante activación de PRRs, que convergen sobre vías de activación transcripcional que cooperan con el cambio epigenético para generar una máxima inducción (Lou et al., 2021). De este modo, la liberación por desmetilación de miticinas C y C-X1 sugiere que estas isoformas están optimizadas para una respuesta inmunológica sostenida bajo estrés múltiple, donde la represión basal es removible contextualmente.

La segunda estrategia consiste en la expresión diferencial de Miticina B, que sugiere un mecanismo inverso al anterior. La expresión máxima de Miticina B en el grupo G1 (desafiado solo con *V. anguillarum*) contrasta con su supresión en el grupo G2, sugiriendo que el mRNA precursor de miticina B contiene marcas de m6A que promueven su traducción rápida bajo condiciones bacterianas agudas. Esto es consistente con el modelo de lectores YTHDF1, que al estar asociado a marcas de m6A cercanas al codón de parada o en sitios de splicing específicos, reclutan complejos de traducción y factores de estabilización, permitiendo traducción eficiente y reclutamiento de ribosomas (Chen et al., 2023; Du et al., 2016; Patil et al., 2018). Cuando METTL3 es inhibido (G2), se reduce la metilación de m6A del transcrito de miticina B mediante eliminación de la actividad del complejo metiltransferasa (Karandashov et al., 2024), lo que resultaría en la pérdida de estas marcas facilitadoras para la traducción. La rápida respuesta de miticina B a *V. anguillarum* con expresión máxima en G1 sugiere que el transcrito de miticina B es un objetivo directo de estabilización y traducción dependiente de m6A que ocurre en tiempos muy cortos post-estimulación (Sun et al., 2024). Por lo tanto, miticina B representa una

defensa antimicrobiana rápida y optimizada epigenéticamente para una respuesta inmediata.

Una posible interpretación de los patrones de expresión observados es que podrían ser compatibles con roles funcionales distintos para cada isoforma de miticina, tal como se ha propuesto en otros sistemas regulados por m6A. Miticina B con su estructura que sugiere un procesamiento proteolítico distribuido e inserción transmembranal según el análisis bioinformático previo, aparenta comportarse como un efector de respuesta rápida que requiere traducción coordinada para generar múltiples fragmentos bioactivos capaces de actuar sinérgicamente en la formación de poros durante la fase aguda de la respuesta inmunológica. El hecho de que su expresión disminuya cuando se inhibe METTL3 es consistente con un escenario en el que la metilación de m6A facilitaría la traducción de miticina B, aunque este mecanismo no fue evaluado directamente en este trabajo y permanece como una hipótesis a contrastar en estudios futuros (Zhang et al., 2021).

En contraste, el comportamiento de miticinas C y C-X1 sugiere una dinámica con mayor compatibilidad a una respuesta sostenida y especializada, en la que la acumulación progresiva de transcritos bajo la inhibición de METTL3 podría indicar algún tipo de regulación epigenética flexible, potencialmente asociada a mecanismos de represión y liberación dependientes de m6A descritos en otros modelos (Chen et al., 2023; Wang et al., 2014).

En conjunto, los perfiles de expresión en respuesta a *V. anguillarum* sugieren una posible estrategia de discriminación patógena, donde miticina B participa preferentemente en una fase de respuesta rápida, mientras que miticinas C y C-X1 contribuirían a una respuesta prolongada y moduladora. Esta idea es coherente con antecedentes que muestran la expresión constitutiva de miticina C en hemocitos de branquias de *M. galloprovincialis*, asociada a la vigilancia frente a patógenos (Balseiro et al., 2011), pero en *M. chilensis* la contribución de mecanismos dependientes de m6A sigue siendo especulativa y requerirá estudios específicos a nivel de metilación para ser confirmada. Sin embargo, el análisis en *M. chilensis* muestra que, bajo estimulación activa con *V. anguillarum*, la regulación depende de m6A.

5. CONCLUSIÓN

La intensificación de la acuicultura ha generado una crisis de salud global debido a la sobrecarga de antibióticos convencionales en sistemas de producción intensiva, lo que acelera la emergencia de bacterias multirresistentes que se transfieren entre entornos acuáticos, sistemas terrestres y poblaciones humanas. En el ambiente acuático, los genes de resistencia antimicrobiana se transfieren de forma horizontal entre patógenos, comensales y la microbiota ambiental, constituyendo un reservorio crítico para la diseminación global de la resistencia. Para los bivalvos, particularmente mejillones y ostras, los cuales representan 20 millones de toneladas anuales de producción global aproximadamente, la presencia de patógenos como OsHV-1, *Vibrio spp.*, norovirus y bacteriófagos ha impulsado una búsqueda urgente de alternativas a los antibióticos que sean sostenibles, ecológicamente amigables y eficaces. En este contexto, los péptidos antimicrobianos endógenos, como las miticinas, emergen como una solución intrínsecamente adaptada al ambiente marino, capaz de reforzar la bioseguridad de los sistemas de cultivo sin incrementar la carga de resistencia antimicrobiana en los ecosistemas costeros. De este modo, el estudio de la inmunidad innata de *M. chilensis* se alinea directamente con las prioridades globales en resiliencia sanitaria y con el enfoque One Health, integrando salud humana, animal y ambiental en un mismo marco conceptual.

El presente seminario ha confirmado la presencia de miticinas en *M. chilensis*, con expresión diferencial en hemocitos frente a estímulos inmunológicos. El análisis filogenético confirmó la existencia de tres isoformas ortólogas de miticinas en *M. chilensis* y estableció su relación evolutiva con homólogos de *M. galloprovincialis* y *M. edulis*. La predicción multidimensional mediante AMPA, ProP 1.0, TMHMM 2.0 y DeepLoc-2.1 demostró que todas las isoformas propuestas exhiben propiedades físicoquímicas distintivas de AMPs funcionales tales como puntos isoeléctricos elevados (9,46-10,01), contenido de cisteínas característico (3,0-4,7%) y una péptido señal conservado. Miticina B presenta procesamiento proteolítico distribuido e inserción transmembranal predicha, lo que sugiere la generación de múltiples fragmentos bioactivos para la formación de poros. Miticinas Cy C-X1 exhiben dominios más compactos compatibles con funciones

moduladoras. En conjunto, estos resultados integran coherentemente la evidencia evolutiva, estructural y topológica, consolidando a las miticinas de *M. chilensis* como un sistema de modelo en el que es posible vincular, de manera directa, variaciones de secuencias, organización de dominios y función inmunológica.

Su composición aminoacídica reveló una especialización funcional diferenciada. Miticina C exhibe la mayor densidad de carga catiónica (14,4% residuos K y R), seguida por miticina B (13,8%) y C-X1 (12,8%), optimizando interacciones electrostáticas con membranas bacterianas. Miticina B presenta una alta hidrofobicidad (27,9% de residuos I, L y F), facilitando inserción membranal, mientras que las miticinas C (26,7%) y C-X1 (24,5%) balancean hidrofobicidad con flexibilidad estructural. La distribución espacial de residuos críticos sugiere que miticina C-X1 podría representar un fragmento proteolítico funcional, ampliando diversidad desde un repertorio génico limitado. Este modelo caracterizado por sus núcleos catiónicos e hidrofóbicos redistribuidos en cada isoforma, respalda la idea de un diseño evolutivo fino en el que pequeñas modificaciones en la secuencia permiten ajustar la especificidad frente a distintos patógenos y ambientes. En particular, la compacidad de miticina C-X1 la posiciona de manera prometedora para el diseño racional de péptidos sintéticos o recombinantes, en los que se pueda maximizar la potencia antimicrobiana y minimizar el costo energético de síntesis para el hospedero.

Los ensayos de qPCR demostraron una expresión diferencial genuina de miticinas en hemocitos frente a *V. anguillarum*. Miticina B alcanzó su máxima inducción en el grupo G1, lo que confirma su rol como efector primario de la respuesta aguda. Paradójicamente, las miticinas C y C-X1 presentaron su máxima expresión en el grupo G2, lo que sugiere una regulación epigenética completa. Estos resultados validan la hipótesis central y revelan un escenario previamente no documentado para *M. chilensis*.

El hallazgo más significativo fue la evidencia indirecta de dos estrategias regulatorias dependientes epigenéticamente de METTL3. Miticina B mostró una gran dependencia de esta para su máxima expresión en hemocitos, lo que sugiere que la metilación de m6A facilita la traducción rápida requerida para una respuesta inmunológica aguda. En contraste, las miticinas C y C-X1 exhibieron represión basal removible mediante la

inhibición de METTL3, lo que indica una regulación negativa dependiente de m⁶A que se desactiva bajo estrés inmunológico múltiple. *M.chilensis* demuestra así una discriminación patogénica sofisticada; una defensa inmediata seguida de una modulación sostenida. La incorporación explícita de la metilación de ARN en la interpretación de la respuesta inmune de *M. chilensis* abre una nueva dimensión de estudio en inmunología de invertebrados marinos.

Aunque se confirmaron una estructura molecular y una expresión diferencial, ningún péptido maduro fue aislado, purificado ni evaluado funcionalmente mediante espectrometría de masas o ensayos MIC/MBC. La interpretación de los mecanismos de m⁶A permanece especulativa, sin validación directa. Estas limitaciones restringen las conclusiones sobre una actividad antimicrobiana real y sobre mecanismos regulatorios moleculares precisos.

En un contexto de crisis global ante una creciente resistencia antimicrobiana, donde organismos como los bivalvos producen cerca de 20 millones de toneladas anuales enfrentándose a patógenos como *Vibrio* spp y OsHV-1, las miticinas propias y nativas de estos ofrecen alternativas sostenibles y ecológicamente visibles a los antibióticos convencionales. Para la industria acuícola chilena, esta caracterización molecular habilita múltiples estrategias prácticas de aplicación inmediata, como la selección de organismos con genotipos de alta expresión de miticinas para generar hatcheries resistentes, una optimización de condiciones ambientales que maximicen la expresión basal sin una intervención farmacológica, desarrollo de dietas funcionales enriquecidas con precursores aminoácidos específicos (lisina, arginina, isoleucina, leucina, fenilalanina) que potencien la síntesis de estas proteínas bajo estrés ambiental, y establecimiento de biomarcadores pasados en qPCR para monitoreo inmunológico continuo de poblaciones en cultivo.

Desde una perspectiva biotecnológica, las miticinas representan candidatos prometedores para síntesis recombinante dada su alta carga catiónica (pI > 9,4), facilitando una producción en sistemas bacterianos. Además, su potencial de sinergia con antibióticos

excluidos por generar resistencia abre posibilidades de recuperación terapéutica en un contexto donde las opciones farmacológicas se reducen progresivamente.

M. chilensis se posiciona como modelo emergente de inmunidad innata sofisticada, demostrando que los invertebrados marinos pueden poseer una amplia diversidad funcional desde repertorio génicos limitados mediante regulación epigenética compleja. Las variantes genéticas de miticinas identificadas proveen herramientas moleculares innovadoras para evaluar resiliencia poblacional frente a hipoxia costera, acidificación oceánica y patógenos emergentes, información crítica para el manejo sostenible de recursos genéticos tanto silvestres como acuícolas.

La agenda de investigación prioritaria incluye aislamiento proteico y caracterización estructural mediante HPLC, ensayos funcionales MIC/MBC contra *Vibrio spp.*, y otros patógenos locales, validación directa de mecanismos de m6A mediante m6A-RIP, MeRIP-seq o metatranscriptómica, análisis de variación poblacional para identificar alelos resistentes, y estudios comparativos de expresión espacial entre hemocitos branquiales, digestivos y gonadales. Este trabajo establece así la plataforma molecular para la optimización sostenible de la industria acuícola chilena, posicionando las miticinas de *M. chilensis* como paradigma emergente de bioseguridad acuícola en la era de la resistencia antimicrobiana global. Adicionalmente, la integración futura de estas herramientas moleculares con programas de selección genética, dietas funcionales y estrategias de manejo no farmacológicas permitirá diseñar esquemas de producción en los que la robustez inmunológica de *M. chilensis* sea un atributo central, y no un subproducto, del sistema productivo. La generación de paneles de biomarcadores basados en la expresión de miticinas y su regulación por m6A podría traducirse en sistemas de monitoreo temprano del estado inmunológico de los cultivos, facilitando decisiones de manejo preventivo frente a brotes infecciosos y eventos de estrés ambiental extremo.

BIBLIOGRAFÍA

- Almagro Armenteros, J. J., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., & Winther, O. (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*, 33(21), 3387–3395.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403–410.
- Baker-Austin, C., Lake, I., Archer, E., Hartnell, R., Trinanes, J., & Martinez-Urtaza, J. (2024). Stemming the rising tide of Vibrio disease. *The Lancet Planetary Health*, 8(7), e515–e520.
- Balseiro, P., Falcó, A., Romero, A., Dios, S., Martínez-López, A., Figueras, A., Estepa, A., & Novoa, B. (2011). Mytilus galloprovincialis myticin C: a chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties. *PloS one*, 6(8), e23140.
- Bedi, R. K., Huang, D., Li, Y., & Caflisch, A. (2023). Structure-based design of inhibitors of the m6A-RNA writer enzyme METTL3. *ACS bio & med chem Au*, 3(4), 359–370.
- Benfield, A. H., & Henriques, S. T. (2020). Mode-of-action of antimicrobial peptides: membrane disruption vs. intracellular mechanisms. *Frontiers in Medical Technology*, 2, 610997.
- Cao, L., Huang, G., Fan, J., Liu, X., & Ma, Z. (2024). Role of N6-methyladenosine methylation in head and neck cancer and its regulation of innate immune pathways. *Frontiers in Immunology*, 15, 1458884.
- Chen, L., Gao, Y., Xu, S., Yuan, J., Wang, M., Li, T., & Gong, J. (2023). N6-methyladenosine reader YTHDF family in biological processes: structures, roles, and mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 14, 1162607.
- Cheng-Hua, L., Jian-Min, Z., & Lin-Sheng, S. (2009). A review of advances in research on marine molluscan antimicrobial peptides and their potential application in aquaculture. *Molluscan Research*, 29(1), 17.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156–159.
- Clark, S., Jowitt, T. A., Harris, L. K., Knight, C. G., & Dobson, C. B. (2021). The lexicon of antimicrobial peptides: a complete set of arginine and tryptophan sequences. *Communications biology*, 4(1), 605.
- Colon, S., & Bhawe, G. (2016). Proprotein convertase processing enhances peroxidase activity to reinforce collagen IV. *Journal of Biological Chemistry*, 291(46), 24009–24016.
- Couture, F., D'Anjou, F., & Day, R. (2011). On the cutting edge of proprotein convertase pharmacology: from molecular concepts to clinical applications. *Biomol Concepts*, 2(5), 421–438. <https://doi.org/10.1515/bmc.2011.034>

- Destoumieux, D., Munoz, M., Bulet, P., & Bachère*, E. (2000). Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(8), 1260–1271.
- Domeneghetti, S., Franzoi, M., Damiano, N., Norante, R., M. El Halfawy, N., Mammi, S., Marin, O., Bellanda, M., & Venier, P. (2015). Structural and antimicrobial features of peptides related to Myticin C, a special defense molecule from the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(42), 9251–9259.
- Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., Liu, M., Ma, J., & Wu, L. (2016). YTHDF2 destabilizes m6A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4–NOT deadenylase complex. *Nature communications*, 7(1), 12626.
- Dubert, J., Barja, J. L., & Romalde, J. L. (2017). New insights into pathogenic *Vibrios* affecting bivalves in hatcheries: present and future prospects. *Frontiers in microbiology*, 8, 762.
- Duckert, P., Brunak, S., & Blom, N. (2004). Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Engineering Design and Selection*, 17(1), 107–112.
- Duwadi, D., Shrestha, A., Yilma, B., Kozlovski, I., Sa-Eed, M., Dahal, N., & Jukosky, J. (2018). Identification and screening of potent antimicrobial peptides in arthropod genomes. *Peptides*, 103, 26–30.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792–1797.
- Figueras, A., Marino, R., Melillo, D., & Pinsino, A. (2021). Immunity in marine invertebrates: integrating transcriptomics to proteomics and metabolomics. In (Vol. 12, pp. 755839): Frontiers Media SA.
- Figueras, A., Moreira, R., Sendra, M., & Novoa, B. (2019). Genomics and immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* in a changing environment. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 440–445.
- Gallardo-Escárate, C., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Valenzuela-Miranda, D., Tapia, F., Yévenes, M., Gajardo, G., Toro, J. E., Oyarzún, P. A., & Arriagada, G. (2022). The native mussel *Mytilus chilensis* genome reveals adaptative molecular signatures facing the marine environment. *bioRxiv*, 2022.2009.2006.506863.
- Gerdol, M., De Moro, G., Manfrin, C., Milandri, A., Riccardi, E., Beran, A., Venier, P., & Pallavicini, A. (2014). RNA sequencing and de novo assembly of the digestive gland transcriptome in *Mytilus galloprovincialis* fed with toxinogenic and non-toxic strains of *Alexandrium minutum*. *BMC research notes*, 7(1), 722.
- Gerdol, M., De Moro, G., Manfrin, C., Venier, P., & Pallavicini, A. (2012). Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 36(2), 390–399.
- Gerdol, M., Moreira, R., Cruz, F., Gómez-Garrido, J., Vlasova, A., Rosani, U., Venier, P., Naranjo-Ortiz, M. A., Murgarella, M., & Greco, S. (2020). Massive gene

- presence-absence variation shapes an open pan-genome in the Mediterranean mussel. *Genome biology*, 21(1), 275.
- Gonçalves, R. M., Monges, B. E. D., Oshiro, K. G. N., Cândido, E. d. S., Pimentel, J. P. F., Franco, O. L., & Cardoso, M. H. (2025). Advantages and challenges of using antimicrobial peptides in synergism with antibiotics for treating multidrug-resistant bacteria. *ACS Infectious Diseases*, 11(2), 323–334.
- Greco, S., Gerdol, M., Edomi, P., & Pallavicini, A. (2020). Molecular diversity of mytilin-like defense peptides in mytilidae (Mollusca, bivalvia). *Antibiotics*, 9(1), 37.
- Guryanova, S. V., Balandin, S. V., Belogurova-Ovchinnikova, O. Y., & Ovchinnikova, T. V. (2023). Marine invertebrate antimicrobial peptides and their potential as novel peptide antibiotics. *Marine Drugs*, 21(10), 503.
- Guryanova, S. V., & Ovchinnikova, T. V. (2022). Innate immunity mechanisms in marine multicellular organisms. *Marine Drugs*, 20(9), 549.
- Hancock, R. E., & Chapple, D. S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(6), 1317–1323.
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial peptides: classification, design, application and research progress in multiple fields. *Frontiers in microbiology*, 11, 582779.
- Hubert, F., Noël, T., & Roch, P. (1996). A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *European Journal of Biochemistry*, 240(1), 302–306.
- Karandashov, I., Kachanov, A., Dukich, M., Ponomareva, N., Brezgin, S., Lukashev, A., Pokrovsky, V. S., Chulanov, V., Kostyusheva, A., & Kostyushev, D. (2024). m6A methylation in regulation of antiviral innate immunity. *Viruses*, 16(4), 601.
- Kireta, D., Decarli, P., Riommi, D., Gualandi, N., Greco, S., Pallavicini, A., & Gerdol, M. (2025). Tracing the Evolutionary Expansion of a Hyperdiverse Antimicrobial Peptide Gene Family in *Mytilus* spp.: The MyticalinDB Resource. *Genes*, 16(7), 816.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305(3), 567–580.
- Lazzaro, B. P., Zasloff, M., & Rolff, J. (2020). Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science*, 368(6490), eaau5480.
- Le, C.-F., Fang, C.-M., & Sekaran, S. D. (2017). Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(4), 10.1128/aac.02340–02316. <https://doi.org/doi:10.1128/aac.02340-16>
- Lei, M., Jayaraman, A., Van Deventer, J. A., & Lee, K. (2021). Engineering selectively targeting antimicrobial peptides. *Annual review of biomedical engineering*, 23(1), 339–357.
- Leoni, G., De Poli, A., Mardirossian, M., Gambato, S., Florian, F., Venier, P., Wilson, D. N., Tossi, A., Pallavicini, A., & Gerdol, M. (2017). Myticalins: a novel

- multigenic family of linear, cationic antimicrobial peptides from marine mussels (*Mytilus* spp.). *Marine Drugs*, 15(8), 261.
- Liang, J., Sun, J., Zhang, W., Wang, X., Xu, Y., Peng, Y., Zhang, L., Xiong, W., Liu, Y., & Liu, H. (2023). Novel insights into the roles of N6-methyladenosine (m6A) modification and autophagy in human diseases. *International journal of biological sciences*, 19(2), 705.
- Liao, Z., Wang, X.-c., Liu, H.-h., Fan, M.-h., Sun, J.-j., & Shen, W. (2013). Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(2), 610–616.
- Lopez Cascales, J. J., Zenak, S., García de La Torre, J., Lezama, O. G., Garro, A., & Enriz, R. D. (2018). Small cationic peptides: influence of charge on their antimicrobial activity. *ACS omega*, 3(5), 5390–5398.
- Lou, X., Wang, J.-J., Wei, Y.-Q., & Sun, J.-J. (2021). Emerging role of RNA modification N6-methyladenosine in immune evasion. *Cell Death & Disease*, 12(4), 300.
- Mitta, G., Hubert, F., Noël, T., & Roch, P. (1999). Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *European Journal of Biochemistry*, 265(1), 71–78.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzert, M., & Roch, P. (2000). Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12954–12962.
- Montúfar-Romero, M., Valenzuela-Miranda, D., Valenzuela-Muñoz, V., Morales-Rivera, M. F., & Gallardo-Escárate, C. (2025). Microbiota Dysbiosis in *Mytilus chilensis* Is Induced by Hypoxia, Leading to Molecular and Functional Consequences. *Microorganisms*, 13(4), 825.
- Moreira, R., Romero, A., Rey-Campos, M., Pereiro, P., Rosani, U., Novoa, B., & Figueras, A. (2020). Stimulation of *Mytilus galloprovincialis* hemocytes with different immune challenges induces differential transcriptomic, miRNomic, and functional responses. *Frontiers in Immunology*, 11, 606102.
- Muñoz, R., Tapia, F. J., & Sobarzo, M. (2025). Temporal variability of bottom hypoxia in open and semi-enclosed coastal areas in an upwelling region. *Progress in Oceanography*, 233, 103435.
- Novoa, B., Romero, A., Álvarez, Á. L., Moreira, R., Pereiro, P., Costa, M. M., Dios, S., Estepa, A., Parra, F., & Figueras, A. (2016). Antiviral Activity of Myticin C Peptide from Mussel: an Ancient Defense against Herpesviruses. *Journal of Virology*, 90(17), 7692–7702. <https://doi.org/doi:10.1128/jvi.00591-16>
- Núñez-Acuña, G., & Gallardo-Escárate, C. (2013). Identification of immune-related SNPs in the transcriptome of *Mytilus chilensis* through high-throughput sequencing. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1899–1905.
- Oñate-Garzón, J., Manrique-Moreno, M., Trier, S., Leidy, C., Torres, R., & Patiño, E. (2017). Antimicrobial activity and interactions of cationic peptides derived from *Galleria mellonella* cecropin D-like peptide with model membranes. *The Journal of antibiotics*, 70(3), 238–245.

- Osorio, D., Rondón-Villarreal, P., & Torres, R. (2015). Peptides: a package for data mining of antimicrobial peptides.
- Ostaff, M. J., Stange, E. F., & Wehkamp, J. (2013). Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO molecular medicine*, 5(10), 1465–1483.
- Padhi, A., & Verghese, B. (2008). Molecular diversity and evolution of myticin-C antimicrobial peptide variants in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Peptides*, 29(7), 1094–1101.
- Pallavicini, A., del Mar Costa, M., Gestal, C., Dreos, R., Figueras, A., Venier, P., & Novoa, B. (2008). High sequence variability of myticin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host–pathogen interactions. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(3), 213–226.
- Patil, D. P., Pickering, B. F., & Jaffrey, S. R. (2018). Reading m6A in the transcriptome: m6A-binding proteins. *Trends in cell biology*, 28(2), 113–127.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10), 785–786.
- Philipp, E. E., Kraemer, L., Melzner, F., Poustka, A. J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S., & Rosenstiel, P. (2012). Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PloS one*, 7(3), e33091.
- Qin, C.-l., Huang, W., Zhou, S.-q., Wang, X.-c., Liu, H.-h., Fan, M.-h., Wang, R.-x., Gao, P., & Liao, Z. (2014). Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 362–370.
- Rathinam, R. B., Acharya, A., Robina, A. J., Banu, H., & Tripathi, G. (2024). The immune system of marine invertebrates: Earliest adaptation of animals. *Comparative Immunology Reports*, 7, 200163.
- Rey-Campos, M., Moreira, R., Romero, A., Medina-Gali, R. M., Novoa, B., Gasset, M., & Figueras, A. (2020). Transcriptomic Analysis Reveals the Wound Healing Activity of Mussel Myticin C. *Biomolecules*, 10(1), 133.
- Rey-Campos, M., Novoa, B., Pallavicini, A., Gerdol, M., & Figueras, A. (2020). Comparative genomics reveals a significant sequence variability of myticin genes in *Mytilus galloprovincialis*. *Biomolecules*, 10(6), 943.
- Roch, P., Yang, Y., Toubiana, M., & Aumelas, A. (2008). NMR structure of mussel mytilin, and antiviral–antibacterial activities of derived synthetic peptides. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(3), 227–238.
- Rojas, R., Miranda, C. D., Opazo, R., & Romero, J. (2015). Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of Invertebrate Pathology*, 124, 61–69.

- Sadeeq, M., Li, Y., Wang, C., Hou, F., Zuo, J., & Xiong, P. (2025). Unlocking the power of antimicrobial peptides: advances in production, optimization, and therapeutics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1528583.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406–425.
- Salazar, C., Jaime, M., Villalba, M., & Oliva, C. (2025). Convergencias y divergencias en la percepción de actores clave frente a los impactos de la industria acuícola. Caso de la mitilicultura en la Región de los Lagos, Chile. *Revista de Geografía Norte Grande*(91), 0–0.
- Santibáñez, P., Romalde, J., Fuentes, D., Figueras, A., & Figueroa, J. (2022). Health status of *Mytilus chilensis* from intensive culture areas in Chile assessed by molecular, microbiological, and histological analyses. *Pathogens*, 11(5), 494.
- Satchanska, G., Davidova, S., & Gergova, A. (2024). Diversity and mechanisms of action of plant, animal, and human antimicrobial peptides. *Antibiotics*, 13(3), 202.
- Schmittgen, T. D. (2001). Real-time quantitative PCR.
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 66(4), 236–248.
- Shandala, T., & Brooks, D. A. (2012). Innate immunity and exocytosis of antimicrobial peptides. *Communicative & integrative biology*, 5(2), 214–216.
- Sneideris, T., Erkamp, N. A., Ausserwöger, H., Saar, K. L., Welsh, T. J., Qian, D., Katsuya-Gaviria, K., Johncock, M. L. L. Y., Krainer, G., Borodavka, A., & Knowles, T. P. J. (2023). Targeting nucleic acid phase transitions as a mechanism of action for antimicrobial peptides. *Nature communications*, 14(1), 7170. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42374-4>
- Sonthei, M., Toubiana, M., Pallavicini, A., Venier, P., & Roch, P. (2011). Diversity of coding sequences and gene structures of the antifungal peptide mytimycin (MytM) from the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Marine biotechnology*, 13(5), 857–867.
- Spohn, R., Daruka, L., Lázár, V., Martins, A., Vidovics, F., Grézal, G., Méhi, O., Kintses, B., Számel, M., & Jangir, P. K. (2019). Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. *Nature communications*, 10(1), 4538.
- Suárez-Ulloa, V., Fernández-Tajes, J., Manfrin, C., Gerdol, M., Venier, P., & Eirín-López, J. M. (2013). Bivalve omics: State of the art and potential applications for the biomonitoring of harmful marine compounds. *Marine Drugs*, 11(11), 4370–4389.
- Sun, X., Chen, Y.-L., Xin, F., & Zhang, S. (2024). Transcriptome-wide identification and analysis reveals m6A regulation of metabolic reprogramming in shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) under virus infection. *BMC genomics*, 25(1), 1103.

- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512–526.
- Tincu, J. A., & Taylor, S. W. (2004). Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(10), 3645–3654.
- Torrent, M., Nogués, V. M., & Boix, E. (2009). A theoretical approach to spot active regions in antimicrobial proteins. *BMC bioinformatics*, 10(1), 373.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115–e115.
- Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. A., & Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 37(6), 375–536.
- Vera, M., Martínez, P., Poisa-Beiro, L., Figueras, A., & Novoa, B. (2011). Genomic organization, molecular diversification, and evolution of antimicrobial peptide myticin-C genes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *PloS one*, 6(8), e24041.
- Verbeke, F., De Craemer, S., Debunne, N., Janssens, Y., Wynendaele, E., Van de Wiele, C., & De Spiegeleer, B. (2017). Peptides as quorum sensing molecules: measurement techniques and obtained levels in vitro and in vivo. *Frontiers in neuroscience*, 11, 183.
- von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *The Journal of membrane biology*, 115(3), 195–201.
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., & Jia, G. (2014). N 6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 505(7481), 117–120.
- Williams, L. M., & Gilmore, T. D. (2022). An innate ability: How do basal invertebrates manage their chronic exposure to microbes? *PLoS Pathogens*, 18(10), e1010897.
- Yan, K., Lv, H., Guo, Y., Peng, W., & Liu, B. (2023). sAMPpred-GAT: prediction of antimicrobial peptide by graph attention network and predicted peptide structure. *Bioinformatics*, 39(1), btac715.
- Zaccara, S., Ries, R. J., & Jaffrey, S. R. (2019). Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(10), 608–624.
- Zhang, H., Lv, J., Ma, Z., Ma, J., & Chen, J. (2025). Advances in antimicrobial peptides: mechanisms, design innovations, and biomedical potential. *Molecules*, 30(7), 1529.
- Zhang, L.-j., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14–R19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>
- Zhang, X., Zhang, S., Yan, X., Shan, Y., Liu, L., Zhou, J., Kuang, Q., Li, M., Long, H., & Lai, W. (2021). m6A regulator-mediated RNA methylation modification

patterns are involved in immune microenvironment regulation of periodontitis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(7), 3634–3645.

ANEXOS

1.1. Extracción de ARN

1. Limpiar y esterilizar gabinete de bioseguridad
2. Preparar 1mL de TRIzol en un tubo eppendorf de 2mL, agregar esfera de cerámica estéril y rotular.
3. Sobre una placa de Petri, cortar entre 30-100 mg de tejido del cual se extraerá ARN y llevarlos a el tubo eppendorf previamente preparado.
4. Homogenizar en Tissuelyser y configurar su frecuencia a 24 oscilaciones, durante 10 minutos.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
6. Centrifugar durante 5 minutos a 4°C a una velocidad de 12000g.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 2mL, descartar pellet, rotular y retirar esfera de cerámica.
8. Dentro del gabinete de bioseguridad añadir 200µL de cloroformo al tubo nuevo, voltear manualmente 15 veces y dejar incubar en hielo durante 3 min.
9. Centrifugar durante 15 minutos a 4°C a una velocidad de 12000g.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5mL y rotular.
11. Dentro del gabinete de bioseguridad añadir 500µL de isopropanol, voltear manualmente e incubar durante mínimo 40 min a -20°C o -80°C.
12. Retirar de incubadora y manejar muestra sobre recipiente con hielo, centrifugar durante 10 min a 4°C a una velocidad de 12000g.
13. Descartar sobrenadante y añadir 1mL de etanol al 75%
14. Aplicar vortex hasta lavar pellet.
15. Centrifugar durante 5 min a 4°C a una velocidad de 7500rpm.
16. Repetir paso 13 y 14
17. Descartar la cantidad máxima de sobrenadante posible, utilizar spin de ser necesario.
18. Secar el tubo sobre hielo durante 10 min.

19. En base a la cantidad de pellet, utilizar entre 20-50 μ L de agua BM (Grado biología molecular), homogenizar en vortex durante 20 segundos y spin.
20. Cuantificar en Nanodrop (Analizar concentración 260/280 y 260/230)
21. Finalmente determinar la integridad mediante electroforesis en gel MOPS 1.2% (Gel MOPS: 4 μ L gel Red, 900 μ L formalina, 50mL MOPS y 0,6g de agarosa) por pocillo añadir 4 μ L (2 μ L de azul y 2 μ L de muestra).
22. Una vez analizada la integridad y pureza, en un nuevo tubo de 1,5 mL rotulado concentrar la muestra a 200ng/ μ L, utilizando RNA y agua BM.

1.2. Síntesis de cDNA

1. En un tubo estéril de 0,2 mL añadir:
 - a. 1µL de RNA (200ng/µL).
 - b. 1µL de Random Primer u Oligo (dt), según se requiera.
 - c. 10µL de agua BM.
 - d. Dar vortex y mezclar con micropipeta.
 - e. 4µL de Buffer reaction (5X).
 - f. 1µL de inhibidor de RNasa Ribolock (20U/µL)
 - g. 2µL de dNTP Mix
 - h. Agregar 1µL de transcriptasa inversa RevertAid H Minus (200 U/µl)

Reactivo	Reacción 1X (10µL)	Reacción 1X (20µL)
Random Primer / Oligo (dt)	0.5	1
Buffer reaction (5X)	2	4
Agua BM	4.5	9
Ribolock (20U/µL)	0.5	1
dNTP Mix	1	2
RevertAid H Minus (200 U/µl)	0.5	1

2. Homogenizar en vortex, luego aplicar spin.
3. Ubicar tubo en el termociclador Esco Swift Maxi, utilizando el siguiente programa:

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Ciclo	25	5
Ciclo	42	60
Ciclo	70	5

4. Una vez finalizado el programa añadir 80 μ L de agua BM y almacenar muestras según sea necesario (máximo una semana a -20°C o 5 años a -80°C)

1.3. qPCR SYBR Green

1. Descongelar las muestras de cDNA sobre un recipiente con hielo sin aplicar vortex o spin.
2. Esterilizar en gabinete de bioseguridad materiales a utilizar: guantes, micropipetas, puntas de micropipeta, agua BM, gradilla, placa de qPCR, film óptico de placa, soporte de placa, recipiente de puntas, lápiz y tubos eppendorf, utilizando el filtro UV de la cámara de bioseguridad durante 15 minutos.
3. Configurar el programa a utilizar y la placa en el computador y encender el termociclador QuantStudio 3,
4. En un tubo eppendorf de 1,5 mL preparar mix de reacción a trabajar.

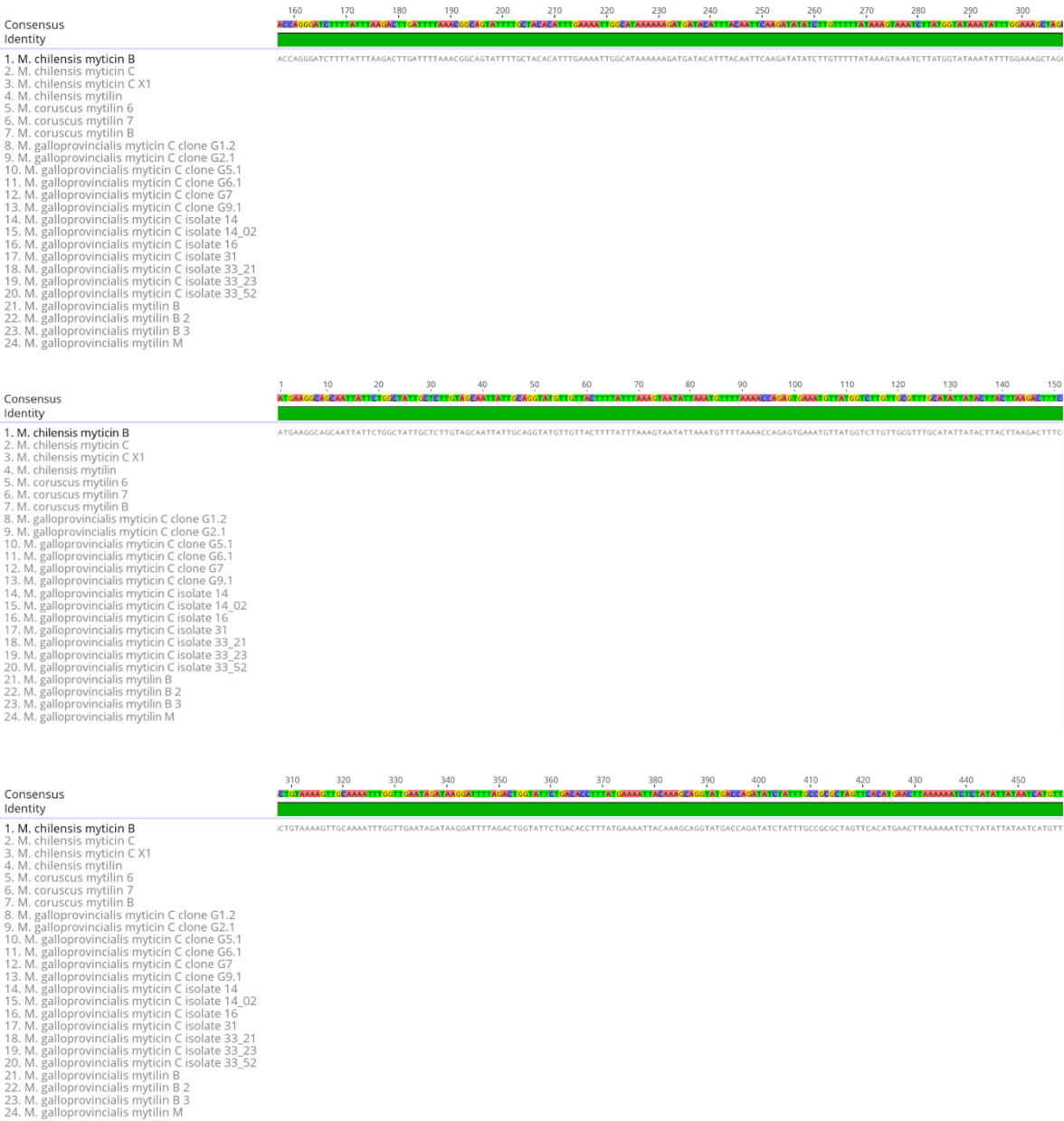
Reactivo	Reacción 1X (μL)
Agua BM	1,75
PowerUp SYBR Green Master Mix (2X)	5
Primer Forward	0,625
Primer Reverse	0,625
cDNA	2
Volumen final	10

5. En cada pocillo de la placa cargar 8 μL de mix sin cDNA, evitando la formación de burbujas
6. Luego, se toman 2 μL de cDNA homogenizando con la micropipeta y repetir la misma maniobra de manera exacta por cada muestra.
7. Sellar la placa con film óptico y dar spin para eliminar las posibles burbujas que se puedan haber formado. En caso de encontrar burbujas, repetir.
8. Ubicar placa en el termociclador y continuar

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
50	2 min	Hold

95	2-10min	1
95	15 seg	40
$T_m \geq 60$	1 min	40
Para curva de melting utilizar los valores por defecto		
50	2 min	Hold
95	2-10 min	1
95	15 seg	40
T_m 55-60	1 min	40
Para curva de melting utilizar los valores por defecto		

1.4. Alineamiento ampliado



Consensus Identity

460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

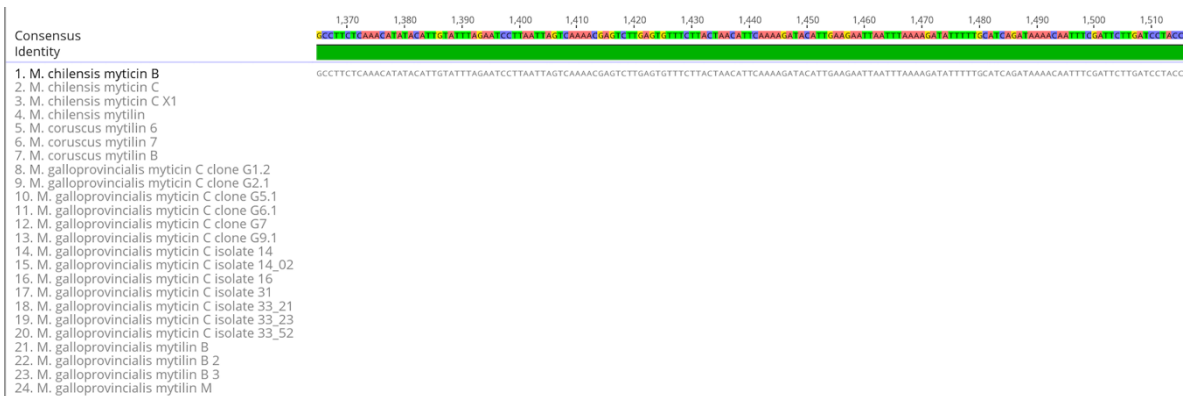
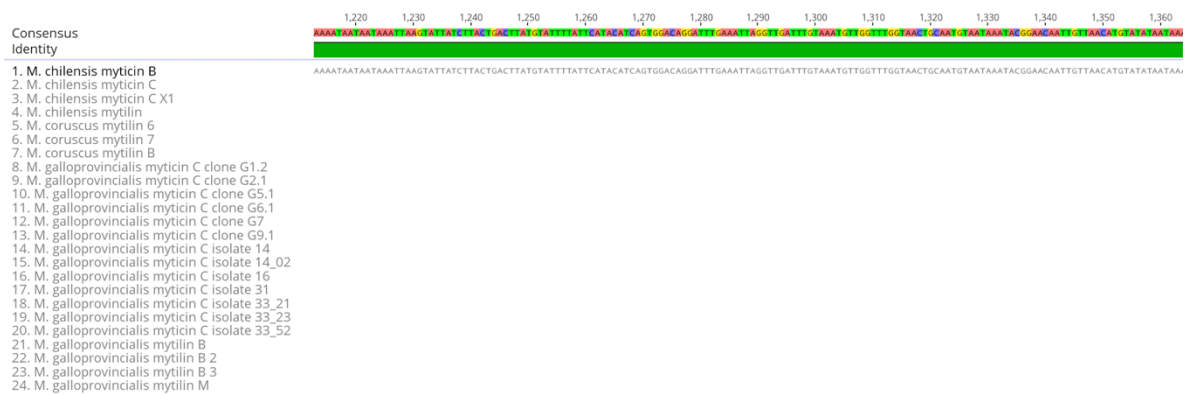
TACAAATGCAAGTAAAGTGCTCATATATTCTAACATTTGTGAAGTTATACCGTAATAAAAATTCATCTCGAAAAAAGACAAGAAAAATATCTTATTCTGTGGAAATATAGCCATGTTTTATGGTTTGCATTTA

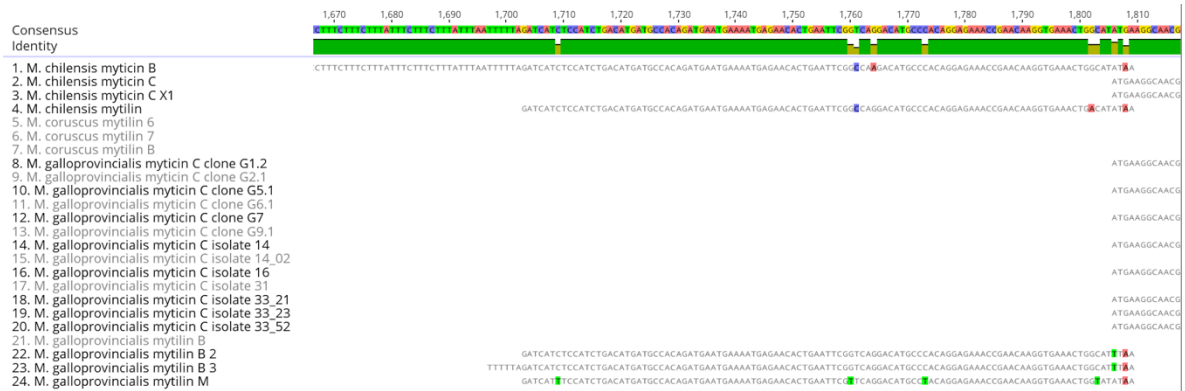
1. M. chilensis myticin B
2. M. chilensis myticin C
3. M. chilensis myticin C X1
4. M. chilensis mytilin
5. M. coruscus mytilin 6
6. M. coruscus mytilin 7
7. M. coruscus mytilin B
8. M. galloprovincialis myticin C clone G1.2
9. M. galloprovincialis myticin C clone G2.1
10. M. galloprovincialis myticin C clone G5.1
11. M. galloprovincialis myticin C clone G6.1
12. M. galloprovincialis myticin C clone G7
13. M. galloprovincialis myticin C clone G9.1
14. M. galloprovincialis myticin C isolate 14
15. M. galloprovincialis myticin C isolate 14_02
16. M. galloprovincialis myticin C isolate 16
17. M. galloprovincialis myticin C isolate 31
18. M. galloprovincialis myticin C isolate 33_21
19. M. galloprovincialis myticin C isolate 33_23
20. M. galloprovincialis myticin C isolate 33_52
21. M. galloprovincialis mytilin B
22. M. galloprovincialis mytilin B 2
23. M. galloprovincialis mytilin B 3
24. M. galloprovincialis mytilin M

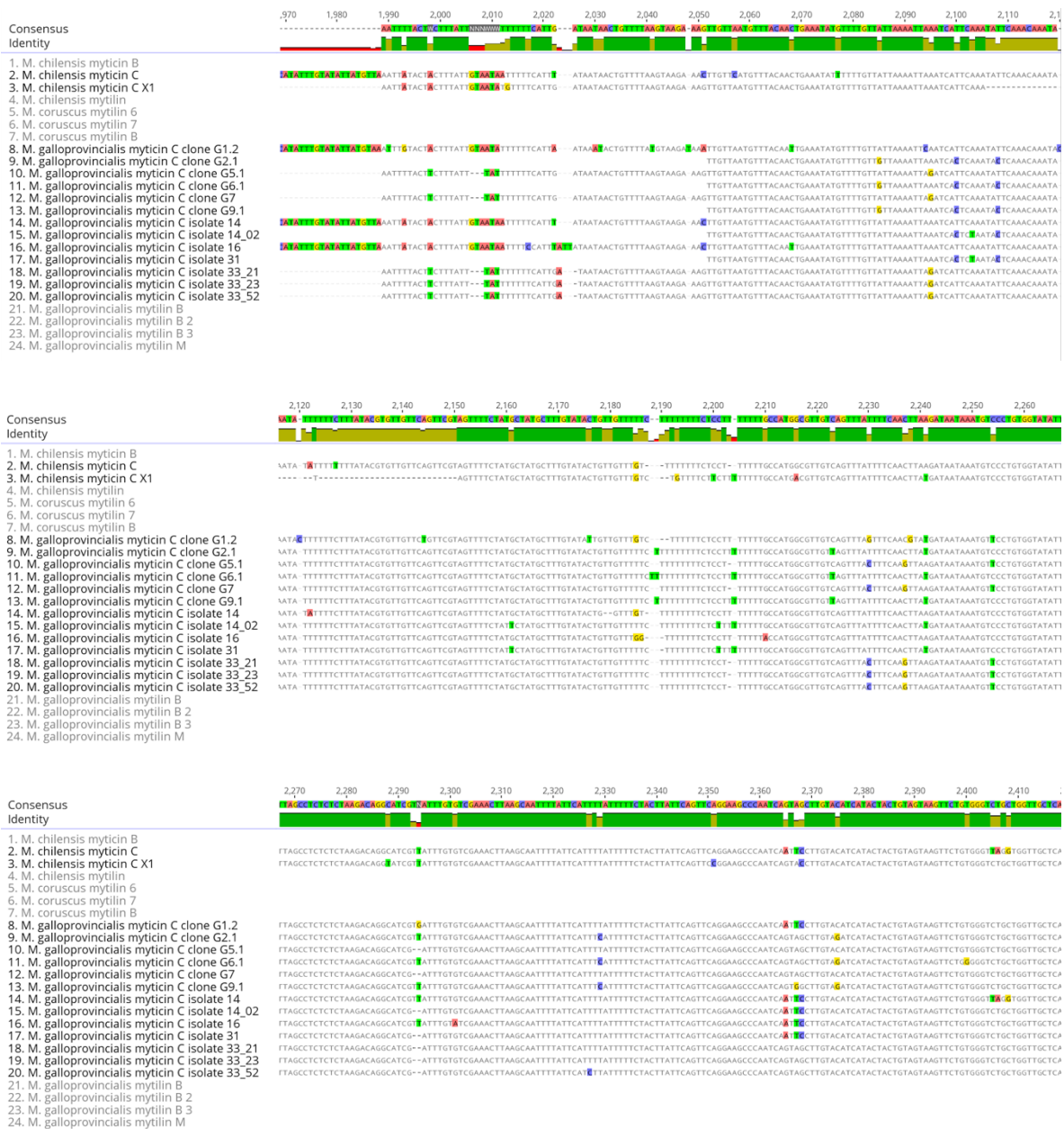
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760
Consensus Identity	GGTCATGATGCCGAATCATAACTAAATGACTTCAAAAAACACAATAATTATGTGCGGCAGAGAAAATAATGATGTTAACTATGAAACTAAGGAACAATGTTTTAATCTCAGCGAGAGAACTAAGTGAAATGTTTAACAT															
1. M. chilensis mytilin B																
2. M. chilensis mytilin C																
3. M. chilensis mytilin C X1																
4. M. chilensis mytilin																
5. M. coruscus mytilin 6																
6. M. coruscus mytilin 7																
7. M. coruscus mytilin B																
8. M. galloprovincialis mytilin C clone G1.2																
9. M. galloprovincialis mytilin C clone G2.1																
10. M. galloprovincialis mytilin C clone G5.1																
11. M. galloprovincialis mytilin C clone G6.1																
12. M. galloprovincialis mytilin C clone G7																
13. M. galloprovincialis mytilin C clone G9.1																
14. M. galloprovincialis mytilin C isolate 14																
15. M. galloprovincialis mytilin C isolate 14_02																
16. M. galloprovincialis mytilin C isolate 16																
17. M. galloprovincialis mytilin C isolate 31																
18. M. galloprovincialis mytilin C isolate 33_21																
19. M. galloprovincialis mytilin C isolate 33_23																
20. M. galloprovincialis mytilin C isolate 33_52																
21. M. galloprovincialis mytilin B																
22. M. galloprovincialis mytilin B 2																
23. M. galloprovincialis mytilin B 3																
24. M. galloprovincialis mytilin B																

Consensus Identity	770780790800810820830840850860870880890900910														
1. <i>M. chilensis</i> mytillin B	TTAATTTAGGATCAAAAGATACATGTGTACCTAATAGACTCAATAACTATGTAGTCATATTTGGCCATAAATCTTATATTTCCAAGTTTGTCATCTTTTGTGGTCAGTGGTTTCTACATGACAAAACTTAAATAGTTGTGTCAAA														
2. <i>M. chilensis</i> mytillin C															
3. <i>M. chilensis</i> mytillin C X1															
4. <i>M. chilensis</i> mytillin															
5. <i>M. coruscus</i> mytillin 6															
6. <i>M. coruscus</i> mytillin 7															
7. <i>M. coruscus</i> mytillin 8															
8. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C clone G1.2															
9. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C clone G2.1															
10. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C clone G5.1															
11. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C clone G6.1															
12. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C clone G7															
13. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C clone G9.1															
14. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C isolate 14															
15. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C isolate 14_02															
16. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C isolate 16															
17. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C isolate 31															
18. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C isolate 33_21															
19. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C isolate 33_23															
20. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin C isolate 33_52															
21. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin B															
22. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin B 2															
23. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin B 3															
24. <i>M. galloprovincialis</i> mytillin M															

	920	930	940	950	960	970	980	990	1,000	1,010	1,020	1,030	1,040	1,050	1,060
Consensus Identity	AAAAAAAAAGGCGGGATATACATGAGATAACGGTCCCAAAATTAACAAGATGAATACCGTTACCAAGCTTCACAGGCACCAAGCCTAATTGGTTACATCATGTGCTCTTTGTTTAGTACCACAGGTCAGAGGTAGTAGTACT														
1. M. chilensis myticin B	IAAAAAATTACGGCTGGATATACATGAGATAACGGTCCCAATTAATTAACAAGATGAATAACTTTACCTATCAAGCTCACGGCTGAATTGGTTACATCATGTGCTCTTTGTTTAGTACCACAGGTCAGAGGTAGTAGTACT														
2. M. chilensis myticin C															
3. M. chilensis myticin C X1															
4. M. chilensis mytilin															
5. M. coruscus mytilin 6															
6. M. coruscus mytilin 7															
7. M. coruscus mytilin B															
8. M. galloprovincialis myticin C clone G1.2															
9. M. galloprovincialis myticin C clone G2.1															
10. M. galloprovincialis myticin C clone G5.1															
11. M. galloprovincialis myticin C clone G6.1															
12. M. galloprovincialis myticin C clone G7															
13. M. galloprovincialis myticin C clone G9.1															
14. M. galloprovincialis myticin C isolate 14															
15. M. galloprovincialis myticin C isolate 14_02															
16. M. galloprovincialis myticin C isolate 16															
17. M. galloprovincialis myticin C isolate 31															
18. M. galloprovincialis myticin C isolate 33_21															
19. M. galloprovincialis myticin C isolate 33_23															
20. M. galloprovincialis myticin C isolate 33_52															
21. M. galloprovincialis mytilin B															
22. M. galloprovincialis mytilin B 2															
23. M. galloprovincialis mytilin B 3															
24. M. galloprovincialis mytilin M															









1.5. Porcentaje de identidad de alineamiento

	M. chilensis mytacin B	M. chilensis mytacin C	M. chilensis mytacin C X1	M. chilensis mytilin	M. coruscus mytilin 6	M. coruscus mytilin 7	M. coruscus mytilin B	M. galloprovincialis mytacin C clone G1.2
M.chilensis mytacin B		75.0	75.0	98.1	0.0	0.0	0.0	75.0
M. chilensis mytacin C	75.0		88.3	75.0	53.3	53.3	53.3	92.2
M. chilensis mytacin C X1	75.0	88.3		75.0	51.7	51.7	53.3	85.9
M. chilensis mytilin	98.1	75.0	75.0		0.0	0.0	0.0	75.0
M. coruscus mytilin 6	0.0	53.3	51.7	0.0		98.6	97.8	51.7
M. coruscus mytilin 7	0.0	53.3	51.7	0.0	98.6		97.8	51.7
M. coruscus mytilin B	0.0	53.3	53.3	0.0	97.8	97.8		51.7
M. galloprovincialis mytacin C clone G1.2	75.0	92.2	85.9	75.0	51.7	51.7	51.7	
M. galloprovincialis mytacin C clone G2.1	0.0	93.8	90.9	0.0	50.0	50.0	51.7	94.4
M. galloprovincialis mytacin C clone G5.1	75.0	90.6	90.8	75.0	50.0	50.0	50.0	89.0
M. galloprovincialis mytacin C clone G6.1	0.0	93.6	90.7	0.0	50.0	50.0	51.7	94.2
M. galloprovincialis mytacin C clone G7	75.0	90.7	90.8	75.0	50.0	50.0	50.0	89.1
M. galloprovincialis mytacin C clone G9.1	0.0	93.7	90.7	0.0	50.0	50.0	51.7	94.3
M. galloprovincialis mytacin C isolate 14	75.0	97.6	88.2	75.0	53.3	53.3	53.3	91.8
M. galloprovincialis mytacin C isolate 14 02	0.0	95.5	89.2	0.0	50.0	50.0	50.0	94.3
M. galloprovincialis mytacin C isolate 16	75.0	97.2	88.3	75.0	51.7	51.7	51.7	92.1
M. galloprovincialis mytacin C isolate 31	0.0	95.0	88.8	0.0	53.3	53.3	53.3	93.8
M. galloprovincialis mytacin C isolate 33 21	75.0	91.2	90.8	75.0	51.7	51.7	51.7	89.3
M. galloprovincialis mytacin C isolate 33 23	75.0	91.0	90.6	75.0	51.7	51.7	51.7	89.1
M. galloprovincialis mytacin C isolate 33 52	75.0	91.1	90.8	75.0	51.7	51.7	51.7	89.2
M. galloprovincialis mytilin B	0.0	58.3	56.7	0.0	88.4	88.4	89.1	56.7
M. galloprovincialis mytilin B 2	97.2	50.0	50.0	97.2	0.0	0.0	0.0	50.0
M. galloprovincialis mytilin B 3	97.3	50.0	50.0	97.2	0.0	0.0	0.0	50.0
M. galloprovincialis mytilin M	94.4	75.0	75.0	94.4	0.0	0.0	0.0	75.0

	M. galloprovincialis mytacin C clone G2.1	M. galloprovincialis mytacin C clone G5.1	M. galloprovincialis mytacin C clone G6.1	M. galloprovincialis mytacin C clone G7	M. galloprovincialis mytacin C clone G9.1
M.chilensis mytacin B	0.0	75.0	0.0	75.0	0.0
M. chilensis mytacin C	93.8	90.6	93.6	90.7	93.7
M. chilensis mytacin C X1	90.9	90.8	90.7	90.8	90.7
M. chilensis mytilin	0.0	75.0	0.0	75.0	0.0
M. coruscus mytilin 6	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
M. coruscus mytilin 7	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
M. coruscus mytilin B	51.7	50.0	51.7	50.0	51.7
M. galloprovincialis mytacin C clone G1.2	94.4	89.0	94.2	89.1	94.3
M. galloprovincialis mytacin C clone G2.1		95.1	99.8	95.1	99.8
M. galloprovincialis mytacin C clone G5.1	95.1		94.9	99.9	94.9
M. galloprovincialis mytacin C clone G6.1	99.8	94.9		94.9	99.6
M. galloprovincialis mytacin C clone G7	95.1	99.9	94.9		94.9
M. galloprovincialis mytacin C clone G9.1	99.8	94.9	99.6	94.9	
M. galloprovincialis mytacin C isolate 14	93.9	90.7	93.8	90.8	93.8
M. galloprovincialis mytacin C isolate 14 02	93.6	93.5	93.4	93.5	93.5
M. galloprovincialis mytacin C isolate 16	94.7	90.7	94.5	90.8	94.6
M. galloprovincialis mytacin C isolate 31	92.7	92.3	92.5	92.3	92.6
M. galloprovincialis mytacin C isolate 33 21	95.0	98.8	94.8	98.8	94.8
M. galloprovincialis mytacin C isolate 33 23	94.8	98.5	94.6	98.6	94.6
M. galloprovincialis mytacin C isolate 33 52	94.9	98.7	94.7	98.8	94.7
M. galloprovincialis mytilin B	55.0	53.3	55.0	53.3	55.0
M. galloprovincialis mytilin B 2	0.0	50.0	0.0	50.0	0.0
M. galloprovincialis mytilin B 3	0.0	50.0	0.0	50.0	0.0
M. galloprovincialis mytilin M	0.0	75.0	0.0	75.0	0.0

	M. galloprovincialis mytacin C isolate 14	M. galloprovincialis mytacin C isolate 14 02	M. galloprovincialis mytacin C isolate 16	M. galloprovincialis mytacin C isolate 31	M. galloprovincialis mytacin C isolate 33 21
M.chilensis mytacin B	75.0	0.0	75.0	0.0	75.0
M. chilensis mytacin C	97.6	95.5	97.2	95.0	91.2
M. chilensis mytacin C X1	88.2	89.2	88.3	88.8	90.8
M. chilensis mytilin	75.0	0.0	75.0	0.0	75.0
M. coruscus mytilin 6	53.3	50.0	51.7	53.3	51.7
M. coruscus mytilin 7	53.3	50.0	51.7	53.3	51.7
M. coruscus mytilin B	53.3	50.0	51.7	53.3	51.7
M. galloprovincialis mytacin C clone G1.2	91.8	94.3	92.1	93.8	89.3
M. galloprovincialis mytacin C clone G2.1	93.9	93.6	94.7	92.7	95.0
M. galloprovincialis mytacin C clone G5.1	90.7	93.5	90.7	92.3	98.8
M. galloprovincialis mytacin C clone G6.1	93.8	93.4	94.5	92.5	94.8
M. galloprovincialis mytacin C clone G7	90.8	93.5	90.8	92.3	98.8
M. galloprovincialis mytacin C clone G9.1	93.8	93.5	94.6	92.6	94.8
M. galloprovincialis mytacin C isolate 14		95.2	96.5	94.0	91.1
M. galloprovincialis mytacin C isolate 14 02	95.2		95.1	97.9	94.0
M. galloprovincialis mytacin C isolate 16	96.5	95.1		94.3	91.3
M. galloprovincialis mytacin C isolate 31	94.0	97.9	94.3		93.1
M. galloprovincialis mytacin C isolate 33 21	91.1	94.0	91.3	93.1	
M. galloprovincialis mytacin C isolate 33 23	90.9	93.8	91.0	92.9	99.8
M. galloprovincialis mytacin C isolate 33 52	91.0	93.9	91.2	93.0	99.9
M. galloprovincialis mytilin B	58.3	55.0	56.7	58.3	56.7
M. galloprovincialis mytilin B 2	50.0	0.0	50.0	0.0	50.0
M. galloprovincialis mytilin B 3	50.0	0.0	50.0	0.0	50.0
M. galloprovincialis mytilin M	75.0	0.0	75.0	0.0	75.0

	M. galloprovincialis myticin C isolate 33 23	M. galloprovincialis myticin C isolate 33 52	M. galloprovincialis mytilin B	M. galloprovincialis mytilin B 2	M. galloprovincialis mytilin B 3	M. galloprovincialis mytilin M
M.chilensis myticin B	75.0	75.0	0.0	97.2	97.3	94.4
M. chilensis myticin C	91.0	91.1	58.3	50.0	50.0	75.0
M. chilensis myticin C X1	90.6	90.8	56.7	50.0	50.0	75.0
M. chilensis mytilin	75.0	75.0	0.0	97.2	97.2	94.4
M. coruscus mytilin 6	51.7	51.7	88.4	0.0	0.0	0.0
M. coruscus mytilin 7	51.7	51.7	88.4	0.0	0.0	0.0
M. coruscus mytilin B	51.7	51.7	89.1	0.0	0.0	0.0
M. galloprovincialis myticin C clone G1.2	89.1	89.2	56.7	50.0	50.0	75.0
M. galloprovincialis myticin C clone G2.1	94.8	94.9	55.0	0.0	0.0	0.0
M. galloprovincialis myticin C clone G5.1	98.5	98.7	53.3	50.0	50.0	75.0
M. galloprovincialis myticin C clone G6.1	94.6	94.7	55.0	0.0	0.0	0.0
M. galloprovincialis myticin C clone G7	98.6	98.8	53.3	50.0	50.0	75.0
M. galloprovincialis myticin C clone G9.1	94.6	94.7	55.0	0.0	0.0	0.0
M. galloprovincialis myticin C isolate 14	90.9	91.0	58.3	50.0	50.0	75.0
M. galloprovincialis myticin C isolate 14 02	93.8	93.9	55.0	0.0	0.0	0.0
M. galloprovincialis myticin C isolate 16	91.0	91.2	56.7	50.0	50.0	75.0
M. galloprovincialis myticin C isolate 31	92.9	93.0	58.3	0.0	0.0	0.0
M. galloprovincialis myticin C isolate 33 21	99.8	99.9	56.7	50.0	50.0	75.0
M. galloprovincialis myticin C isolate 33 23		99.7	56.7	50.0	50.0	75.0
M. galloprovincialis myticin C isolate 33 52	99.7		56.7	50.0	50.0	75.0
M. galloprovincialis mytilin B	56.7	56.7		0.0	0.0	0.0
M. galloprovincialis mytilin B 2	50.0	50.0	0.0		100.0	95.3
M. galloprovincialis mytilin B 3	50.0	50.0	0.0	100.0		95.3
M. galloprovincialis mytilin M	75.0	75.0	0.0	95.3	95.3	