



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

**Análisis comparativo de duplicaciones genómicas asociadas a resistencia
farmacológica en poblaciones del sur de Chile del piojo de mar *Caligus
rogercresseyi***

Matías Ariel Benavente González

Seminario de Título presentado al

DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

Para optar al Título de

BIOLOGO MARINO

Concepción – Chile

2022

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

Este seminario de título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor guía

Dr. Cristian Gallardo Escárate

Director de tesis

Dr. Gustavo Núñez Acuña

Ha sido aprobada por la

Siguiente comisión

Dr. Cristian Gallardo Escárate

Evaluadora

Dr. Gustavo Núñez Acuña

Dra. Allisson Astuya Villalón

Dr. Marco Yévenes Soto

Jefe de carrera

Dr. Ariel Valenzuela Saldías

Agradecimientos.

Agradezco al Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola por permitir el desarrollo de esta tesis. Al doctor Cristian Gallardo por brindarme esta oportunidad, a mi director de tesis Gustavo Núñez y a Constanza Sáez por sus enseñanzas y apoyo. También agradezco al equipo del Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuática.

Finalmente, agradezco a mi familia y amigos, con su apoyo han sido fundamentales en este proceso.

INDICE DE CONTENIDOS

1.	Resumen	1
1.1.	Abstract	3
2.	Introducción	5
2.1.	Industria salmonera en Chile.....	5
2.2.	Caligidosis.....	7
2.3.	<i>Caligus rogercresseyi</i>	8
2.4.	Control de <i>C. rogercresseyi</i> en centros de cultivo de salmones.....	11
2.5.	Resistencia farmacológica de <i>C. rogercresseyi</i>	13
2.5.1.	Mutaciones puntuales en proteínas target de fármacos	14
2.5.2.	Detoxificación celular	16
2.5.3.	Resistencia por engrosamiento de la cutícula	17
2.6.	Duplicaciones de genes asociados a la resistencia farmacológica	17
2.7.	Hipótesis.....	18
2.8.	Objetivos	18
2.8.1.	Objetivo general.....	18
2.8.2.	Objetivos específicos.....	18
3.	Materiales y métodos.....	19
3.1.	Obtención de muestras.....	19
3.2.	Extracción de DNA para generación de bases de datos y secuenciación	19
3.2.1.	Extracción DNA	19
3.2.2.	Preparación de base de datos y secuenciación mediante tecnología Nanopore	20
3.3.	Remoción de adaptadores	20
3.4.	Polishing y mapeo de datos.....	20
3.4.1.	Reads polishing	20
3.4.2.	Mapeo	21
3.5.	Identificación de genes asociados con la respuesta a fármacos	21
3.6.	Identificación de CNVs <i>in silico</i>	21
3.7.	Extracción de DNA para validación de duplicaciones genéticas.....	22
3.8.	Diseño y estandarización de partidores.....	22
3.9.	Validación de CNVs por PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).....	23

3.10.	Cálculo Fold Change, “gain” o “no change”	23
4.	Resultados.....	24
4.1.	Lecturas mapeadas y éxito de pulido	24
4.2.	CNVs y valores Fold Change de genes de interés	24
4.3.	Validación de duplicaciones genómicas mediante qPCR.....	33
5.	Discusión.....	37
6.	Conclusión.....	41
7.	Bibliografía.....	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Listado de principales enfermedades en peces cultivados en Chile	7
Tabla 2: Productos antiparasitarios para el control de caligidosis en salmónidos con registro en el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG)	13
Tabla 3: Listado de genes asociados a resistencia farmacológica por barrio con sus respectivos valores de Fold Change y P-value	29
Tabla 4: Partidores para cada gen de interés, con su secuencia, temperatura óptima de funcionamiento y longitud. MDRP: proteínas de resistencia a múltiples fármacos	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico salmónidos más cosechados en Chile	6
Figura 2: Estructura y morfología de hembra <i>C. rogercresseyi</i>	10
Figura 3: Ciclo de vida <i>C. rogercresseyi</i>	10
Figura 4: Gráfico CNVs de genes de interés por región del genoma de <i>C. rogercresseyi</i>	28
Figura 5: Gráfico de los valores de Fold Change para acetilcolinesterasa obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR	29
Figura 6: Gráfico de los valores de Fold Change para proteínas de resistencia a múltiples fármacos obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR	30
Figura 7: Gráfico de los valores de Fold Change para canales de calcio dependientes de voltaje obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR	30
Figura 8: Gráfico de los valores de Fold Change para proteína cuticular obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR	31
Figura 9: Gráfico de los valores de Fold Change para citocromo c oxidasa obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR	31
Figura 10: Gráfico de los valores de Fold Change para intercambiadores sodio/potasio/calcio NCKX30C obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR	32
Figura 11: Gráfico con porcentajes de “gain” y “no change” por cada gen de interés en el barrio 2	34

Figura 12: Gráfico con porcentajes de “gain” y “no change” por cada gen de interés en el barrio 3A	34
Figura 13: Gráfico con porcentajes de “gain” y “no change” por cada gen de interés en el barrio 9A	35
Figura 14: Gráfico con porcentajes de “gain” y “no change” por cada gen de interés en el barrio 28B	35
Figura 15: Gráfico con porcentajes de “gain” y “no change” por cada gen de interés en el barrio 59	36

1. Resumen

Actualmente el primer productor mundial de salmón es Noruega y en segundo lugar se encuentra Chile. A comienzos de la década del 2000, en Chile, se generan alrededor de 1000 millones de dólares anuales de ganancia, durante los últimos años se ha escalado a cerca de 4600 millones de dólares anuales. Sin embargo, la industria del salmón no ha estado exenta de problemáticas, como por ejemplo la presencia de enfermedades bacterianas, virales, parasitarias y micóticas. Dentro de las enfermedades parasitarias, la más importante es la caligidosis, ocasionada por el ectoparásito marino *Caligus rogercresseyi*. Esta enfermedad consiste en la presencia de estos ectoparásitos, también llamados piojos de mar, adheridos a la piel de peces hospedero, ocasionando estrés, daño en la piel, inmunosupresión y potenciales brotes de enfermedades secundarias, entre otras condiciones perjudiciales para el bienestar de peces. El control del piojo de mar en centros de cultivo de salmónes se basa principalmente en la aplicación de productos farmacológicos antiparasitarios, sin embargo, se ha observado pérdida de eficacia en los medicamentos, y evidencias de desarrollo de resistencia farmacológica por parte de *C. rogercresseyi*. Sin embargo, los mecanismos moleculares detrás de la resistencia farmacológica no están completamente descritos en esta especie. El objetivo de este trabajo es encontrar duplicaciones genómicas que se asocian a la resistencia farmacológica y de esta manera dilucidar potenciales mecanismos asociados a respuesta a fármacos en *C. rogercresseyi*. Para llevar a cabo este estudio, se realizó extracción de DNA de ejemplares de piojo de mar provenientes de los barrios 2, 3A, 9A, 28B y 59 con los cuales se generaron bases de datos utilizando tecnología Nanopore. A los datos de la biblioteca Nanopore se les realizó remoción de adaptadores para recortar determinadas regiones y mejorar la calidad de los datos combinándolos con tecnología Illumina. Posteriormente se realizó un mapeo de los datos y se extrajo una secuencia de consenso para cada barrio, en las cuales se identificaron CNVs de genes asociados a resistencia farmacológica. Finalmente se realizaron nuevas extracciones de DNA para 8 ejemplares de *C. rogercresseyi* para los barrios mencionados con la finalidad de validar los datos obtenidos *in silico*. Para la validación, las muestras de DNA se sometieron a la técnica

qPCR para identificar duplicaciones genómicas. Los resultados de este trabajo, entregan importante información respecto a las duplicaciones genómicas en los diferentes barrios, por ejemplo, que las duplicaciones para el gen citocromo c oxidasa están presentes en todos los barrios, teniendo una importante presencia en el barrio 9A, donde las duplicaciones de este gen equivalen a 45 veces más que las duplicaciones en el barrio 2. Con este estudio, se puede dilucidar los mecanismos de resistencia farmacológica presentes en los barrios estudiados, realizar una estimación del mecanismo predominante, evaluar la sensibilidad comparativa entre los 5 barrios estudiados y permite plantear futuros estudios para aportar información genómica relevante para el control de este parásito.

1.1. Abstract

Currently the world's leading producer of salmon is Norway and in second place is Chile. At the beginning of the 2000s, in Chile around 1 billion dollars of profit are generated annually, during the last years it has climbed to about 4.6 billion dollars per year. However, the salmon industry has not been without its problems such as the presence of bacterial, viral, parasitic and fungal diseases. Among the parasitic diseases, the most important is caligidosis caused by the marine ectoparasite *Caligus rogercresseyi*. This disease consists of the presence of these ectoparasites, also called sea lice, attached to the skin of host fish causing stress, skin damage. Immunosuppression and potential outbreaks of secondary diseases among other conditions harmful to fish welfare. The control of sea lice in salmon farming centers it is mainly based on the application of antiparasitic pharmacological products however, there has been a loss of efficacy in drugs, and evidence of the development of drug resistance by *C. rogercresseyi*. However, the molecular mechanisms behind drug resistance are not fully described in this species. The objective of this work is to find genomic duplications that are associated with drug resistance and in this way enhance in terms of molecular research of this species. To carry out this study, DNA extraction was performed from sea lice specimens from neighborhoods 2, 3A, 9A, 28B and 59 with which databases were generated using Nanopore technology. Data from de Nanopore library was removed from adapters crop certain regions and improve data quality by combining it with Illumina technology. Subsequently a mapping of the data is carried out and a consensus sequence is extracted for each neighborhoods in wich CNVs of genes associated with drug resistance are identified. Finally, new DNA extractions are carried out for 8 specimens of *C. rogercresseyi* for the aforementioned neighborhoods in order to validate the data obtained *in silico*. For validation, DNA samples are subjected to the qPCR technique to identify genomic duplications. The results of this work provide important information regarding genomic duplications in different neighborhoods for example, that duplications for the cytochrome c oxidase gene are present in all neighborhoods, having an important presence in neighborhood 9A, where duplications of this gene are equivalent to 45 times more than duplications in the neighborhood 2.

With this study it is possible to identify the mechanisms of pharmacological resistance present in the neighborhoods studied, estimate the predominant mechanism, evaluate the comparative sensitivity between the 5 neighborhoods studied and allows future studies to be proposed to provide relevant genomic information for the control of this parasite.

2. Introducción

2.1. Industria salmonera en Chile

Las primeras introducciones en Chile datan de fines del siglo XX (1905-1930), los que fueron realizados con fines de pesca recreativa (Bravo, 2013). En 1969 se dio inicio al programa de introducción del Salmón del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) en Chile mediante la firma de un convenio de cooperación entre los gobiernos de Japón y Chile, lo cual se considera la base del auge acuícola de la década del 80 (Amtmann & Blanco, 2001). Los gobiernos chilenos comenzaron a definir una política ambiental integral, sistemática y preventiva acompañada de una institucionalidad acorde al momento y con la capacidad de ser perfeccionada. Así fue desplegándose un régimen regulatorio con leyes y reglamentos, por ejemplo, la ley n°20434 del 2010 modificó la Ley General de Pesca y Acuicultura (LGPA) en materia de acuicultura, instaurándose la agrupación de concesiones de salmónidos (ACS), también conocidos como barrios, esto contribuyó a ordenar la actividad e involucrar a los productores en el marco regulatorio (Stormansan, 2018).

En cuanto a producción de salmón en cultivo, Chile es un importante actor a nivel mundial, situándose en el segundo lugar después de Noruega, generando cerca de un millón de toneladas de salmón al año (Alvarez et al., 2022). Las exportaciones de salmónes y truchas han experimentado un crecimiento exponencial, desde un total de envíos de 20 mil toneladas en el año 1990 a 200 mil toneladas en el año 2000 (Buschmann & Pizarro, 2001). Se generan alrededor de 1000 millones de dólares anuales de ganancia a comienzos de la década del 2000, durante los últimos años se ha escalado a aproximadamente US\$4600 millones al año (Alvarez et al., 2022). Las tres principales especies de cultivo del sector salmonero en Chile son el Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Salmón del Pacífico o Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Figura 1) (Sernapesca, 2022).

En el caso del salmón chileno, la rápida y exitosa expansión de la industria puede atribuirse a ventajas naturales, ya que el mar es adecuado para el rango, nicho y ciclo que necesitan los cultivos marinos (Montero, 2004). Los cultivos de salmónes se ubican en la primera capa de aguas marinas, donde la temperatura fluctúa entre los 8 y 13°C (Riquelme et al., 2017). Este es un rango de temperatura mayor que el de países nórdicos y permite tener un pez del peso requerido en menos tiempo (Montero, 2004). Sin embargo, la industria ha debido enfrentar problemas, como por ejemplo el deterioro de hábitats naturales por excreciones y alimentos no consumidos, contaminación visual, impacto sobre la biodiversidad de especies endémicas y transmisión de enfermedades (Cerde, 2019). En Chile se han detectado enfermedades de tipo bacterianas, virales, parasíticas y micóticas (Tabla 1) (Smith et al., 2001). De las problemáticas que ha debido enfrentar la industria, los casos más relevantes son el florecimiento de algas nocivas, la crisis del virus ISA (Cerde, 2019) y la caligidosis, enfermedad parasitaria más importante que genera pérdidas económicas principalmente por los costos de los tratamientos de control (Costello, 2009).

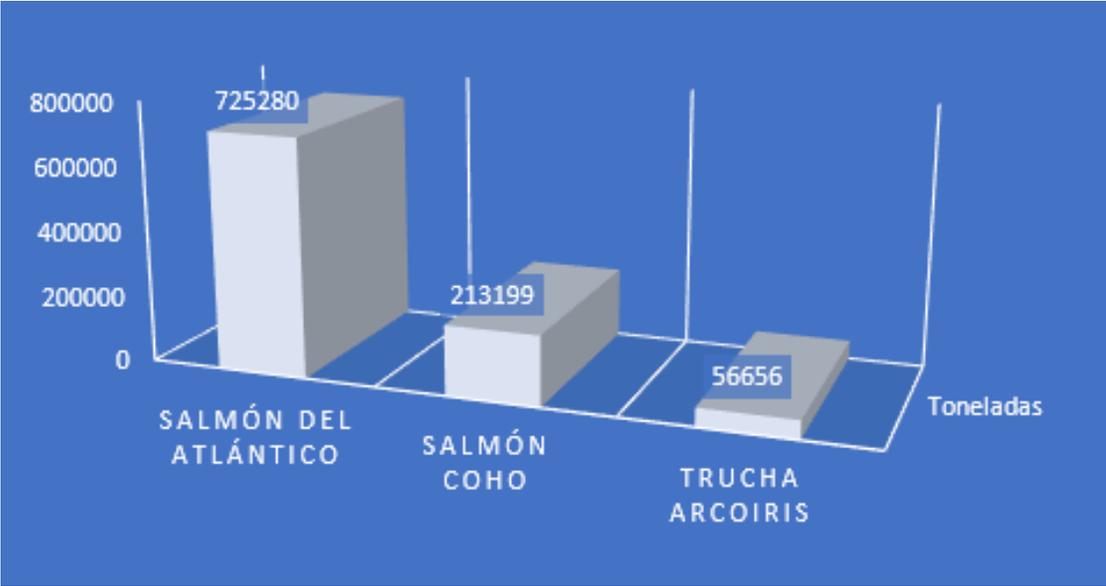


Figura 1: Gráfico salmónidos más cosechados en Chile. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 1: Listado de principales enfermedades en peces cultivados en Chile. BKD: Enfermedad bacteriana del riñón; IPN: Necrosis pancreática infecciosa; ISA: Anemia infecciosa del salmón; Ich: Enfermedad del punto blanco (Valenzuela, 2012)

	Bacterianas	Virales	Fúngicas	Parásitos
Agua dulce	Flavobacteriosis BKD	IPN	Saprolegniasis	Ich
Lagos	Flavobacteriosis BKD Yersiniosis Furunculosis atípica Francisellosis	IPN	Saprolegniasis	Ich Costiasis
Estuario	Flavobacteriosis BKD Estreptococosis Piscirickettsiosis	IPN	Micosis sistémica	Caligidosis
Mar	BKD Furunculosis atípica Vibriosis Piscirickettsiosis	IPN	Micosis sistémica	Caligidosis

2.2. Caligidosis

Esta enfermedad es ocasionada por el ectoparásito marino *Caligus rogercresseyi*, generando uno de los principales problemas en la salud de los peces. La existencia de caligidosis en Chile data del año 1940 (Riquelme et al., 2017). La infestación por estos ectoparásitos genera daño en el bienestar y salud de los peces, ya que el daño que ocasionan se relaciona con enfermedades que inciden en el déficit de crecimiento y en la mortalidad, lo cual afecta la rentabilidad de la industria (Gallardo, 2018). Los piojos de mar pueden causar lesiones en la piel, desequilibrio osmótico y una mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas y virales a través de la supresión de las respuestas inmunitarias y el daño en la piel del huésped (Boxaspen, 2006). El daño se debe a que puede alimentarse de la piel y mucus de peces (Frazer et al., 2012), por lo que la severidad de las infecciones dependen de la carga de parásitos y otros factores como la especie huésped, edad y estado de desarrollo del pez (Bravo, 2010a). Dentro de las tres especies de salmónidos más cultivados en Chile, *O. kisutch* es resistente a las

infecciones, debido a una rápida respuesta inmunitaria localizada en la piel induciendo hiperplasia de las células epiteliales y una respuesta inflamatoria más dispersa que contribuye al rechazo del parásito (Vargas-Chacoff et al., 2016). Sin embargo, el salmón del Atlántico, que es la principal especie de cultivo acuícola en Chile (Sernapesca, 2022), es más susceptible a las infecciones de este parásito (Vargas-Chacoff et al., 2016).

2.3. *Caligus rogercresseyi*

El piojo de mar *C. rogercresseyi* es un copépodo marino de la familia Caligidae que posee un cefalotórax con 9 pares de apéndices pareados, anténula, antena, mandíbula, maxilo, maxilípodo, 4 patas torácicas y un tronco post cefálico de 10 segmentos (llamados somitas) y constituido por 6 pares de patas más un par de ramas caudales. Estos ectoparásitos se caracterizan por tener un cuerpo aplanado dorso-ventralmente y poseer un segmento genital en la parte posterior (Figura 2) (Rohde, 2005). *C. rogercresseyi* presenta un marcado dimorfismo sexual, donde el complejo genital en machos es más redondo y en forma de barril, mientras que en la hembra es más cuadrado y con presencia de puntas lateroposteriores (Bravo, 2010b). El ciclo de vida (Figura 3) comprende 8 estados de desarrollo (González & Carvajal, 2003). Tres estados son planctónicos y cinco parasíticos, los estadios planctónicos son nauplius I y II que corresponden a las etapas de vida libre y una etapa copepodito que es la infectante (Boxaspen, 2006). El copepodito se posa sobre el huésped, sujetándolo con su par de antenas en forma de gancho. Durante la muda el copepodito despliega su filamento frontal para adherirse al pez, ocurrido esto, continúa el ciclo con cuatro estadios de crecimiento denominados chalimus I, II, III y IV aumentando de tamaño hasta llegar a la etapa adulta (González & Carvajal, 2003). El parásito muda en las cuatro etapas de chalimus siempre unidas al huésped por un filamento frontal (González & Carvajal, 2003). Para pasar de un estado de desarrollo a otro, *Caligus* depende principalmente de la temperatura del agua, el ciclo de vida puede durar 45 días si la temperatura del agua es de 10°C (Bravo, 2010b). La temperatura predominante en la X región chilena ronda los 12°C y el ciclo de vida del parásito se completa en unos 32 días. Los adultos pueden clasificarse como adultos indistinguibles (macho o hembra) o hembras con huevos, estas

últimas son consideradas como la etapa más relevante ya que representan el potencial crecimiento de la infestación mediante la producción de huevos (Hamilton-West et al., 2012). Aunque las hembras son más grandes en primavera-verano, se produce un mayor número de huevos en invierno. El número de huevos reportado para hembras de *C. rogercresseyi* es de aproximadamente 45 por saco ovífero, produciendo hasta 11 sacos por cópula. Pese a que esta especie está influenciada negativamente por la baja salinidad, en sitios donde la salinidad es mayor y más constante a lo largo del año, la producción de huevos puede disminuir a hasta 9 huevos por saco en verano (Bravo, 2010b). Los nauplius no mudan a copepodito a salinidades iguales o inferiores a 15ppm. Los adultos de este parásito pueden sobrevivir por ciertos períodos de tiempo a bajas salinidades (Marinkovic, 2012).

C. rogercresseyi está presente en el 99% de las jaulas de cultivo de salmones y se ha descrito que existe un comportamiento de preferencia a aguas acondicionadas con peces salmónidos, lo que sugiere que existe un reconocimiento químico para la infestación exitosa (Pino-Marambio et al., 2007).

El Instituto Técnico del Salmón (INTESAL) realizó un programa de monitoreo en los piojos de mar en el sur de Chile, entre 1999 y 2002 se informó un recuento de 3,38 parásitos en promedio por pez. En 2004 se contaron 5, 10 y 3 parásitos para *O. mykiss*, *S. salar* y *O. kisutch* respectivamente. A principios del 2007 el recuento del parásito era de 20, 34 y 29 para las mismas especies, esto considerando parásitos en etapas juveniles y adultos (Zagmutt-Vergara et al., 2005).

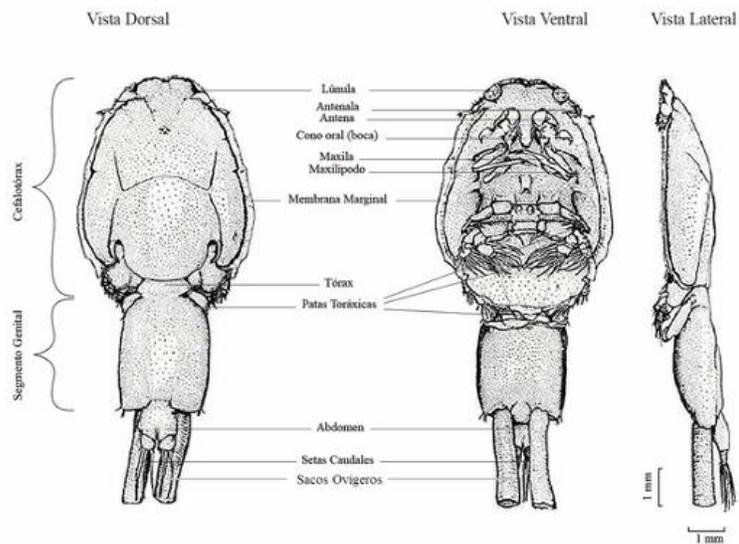


Figura 2: Estructura y morfología de hembra *C. rogercresseyi* (León, 2016)

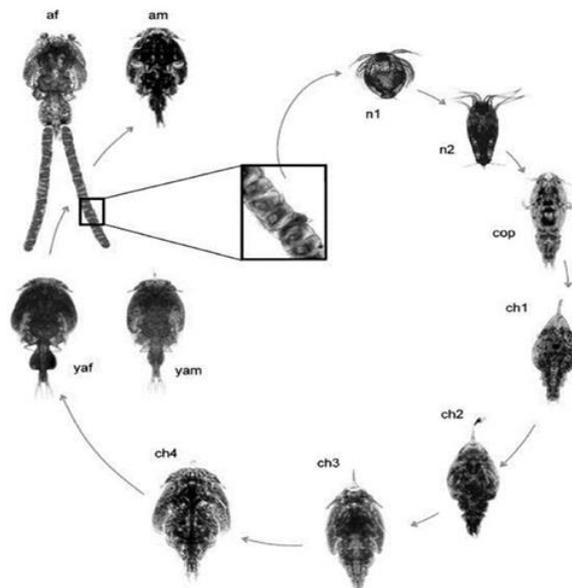


Figura 3: Ciclo de vida *C. rogercresseyi*. n1: nauplius I; n2: nauplius II; n3: cop: copepodito; ch1: chalmus I; ch2: chalmus II; ch3: chalmus III; ch4: chalmus IV; yaf: hembra adulta joven; yam: macho adulto joven; am: adulto macho; af: adulto hembra grávida. En cuadro central se observa a mayor aumento parte de un saco ovígero de hembra grávida (León, 2016)

2.4. Control de *C. rogercresseyi* en centros de cultivo de salmones

C. rogercresseyi ha sido reportado como uno de los parásito de mayor riesgo sanitario para los salmones de cultivo en Chile (Bravo et al., 2015). El control del piojo de mar en centros de cultivo de salmón se basa casi principalmente en tratamientos farmacológicos. La mayoría de los productos farmacológicos introducidos en Chile han sido utilizados primeramente en países salmonicultores del hemisferio norte, para el control de *Lepeophtheirus salmonis* (León, 2016). Los primeros productos usados para el control de *C. rogercresseyi* en Chile fueron aplicados por baños de inmersión (Bravo et al., 2015). La ivermectina fue uno de los tratamientos antiparasitarios primeramente utilizados, sin embargo, fue retirada del mercado debido a su efecto negativo sobre los peces de cultivo y el medio marino (Collier & Pinn, 1998). La ivermectina fue reemplazada por el benzoato de emamectina que fue la única droga autorizada en Chile entre los años 2000 al 2007, este producto tiene efecto sobre todos los estados de desarrollo del parásito (Bravo et al., 2015). Posterior a la evidencia de resistencia desarrollada por *C. rogercresseyi* al benzoato de emamectina en el año 2007 (Bravo et al., 2008), se introdujeron los piretroides, los que son análogos sintéticos de las piretrinas, químicos derivados de la flor del crisantemo *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Velíšek et al., 2007). En el año 2009 se autorizó el inhibidor de quitina diflubenzuron, en el año 2010 el piretroide cipermetrina y a partir del 2011 el organofosforado azametifos (Bravo et al., 2015). La industria del salmón utilizó 874 litros de piretroides (ingrediente activo) en el año 2012, lo cual era un 129% más alto que en el año anterior (Martabid, 2016). Los piretroides actúan interfiriendo la conducción iónica a través de las membranas neuronales del parásito causando su parálisis y muerte (Gomez, 2016). En Chile los piretroides comenzaron a utilizarse mediante baños a partir del año 2007, presentando alta eficacia contra el estado adulto de *C. rogercresseyi* (Gomez, 2016). Sin embargo, se encontró que hubo un desarrollo de resistencia de *Caligus* a los piretroides desde el año 2008 (Helgesen et al., 2014).

En respuesta a la pérdida de eficacia de los piretroides, se introdujeron los tratamientos basados en compuestos organofosforados, especialmente el compuesto azametifos (Arriagada et al., 2020; Gomez, 2016). La toxicidad de los pesticidas organofosforados

es elevada, de ahí su gran efectividad, y se basa en la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) mediante fosforilación en las terminaciones nerviosas con la consecuente pérdida de funcionalidad enzimática (García, 2013). Los compuestos organofosforados son un grupo de sustancias orgánicas derivadas de la estructura química del fósforo y tiene un gran número de aplicaciones y utilidades, entre ellas como insecticidas (Fernández et al., 2010). En Chile el organofosforado azametifos se comenzó a utilizar en el año 2013, suministrado a través de baños a los salmones, mostrando gran efectividad (Jimenez et al., 2018). Sin embargo, también se reportó pérdida de eficacia a partir de los años 2015-2017 (Arriagada et al., 2020), por lo que se han vuelto a introducir otros compuestos farmacológicos como son la nueva generación de benzoilureas. El mecanismo de acción de benzoilureas, es que generan interferencia en la síntesis de quitina e interrupción en el proceso de muda, provocando la muerte de los parásitos (Kahl et al., 2015). Actualmente, los compuestos de esa naturaleza que se utilizan en la industria salmonera corresponden a lufenurón y hexaflumurón.

En el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) están registrados 11 productos antiparasitarios para el control de caligidosis (Tabla 2) (Sernapesca, 2019).

Tabla 2: Productos antiparasitarios para el control de caligidosis en salmónidos con registro en el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) (Sernapesca, 2019)

N° Registro SAG	Titular	Nombre comercial	Principio Activo	Familia	Concentración Comercial	Forma Farmacéutica y vía de empleo	Dosis (por día de tratamiento)		Tiempo	Periodo de resguardo
							Principio Activo	Producto Comercial		
655	INTERVET CHILE LTDA.	Slice	Benzoato de Emamectina	Avemectinas	0,2% 2,0 mg/g - 2,0 g/kg	Polvo, oral, en el alimento	50 µg/kg peso	25 mg/kg peso	7 días	60 días antes de la cosecha
2068	FARMACOLOGÍA EN AQUACULTURA VETERINARIA FAV S.A.	Calishot	Diflubenzuron	Benzoilureas	80% 800 mg/g - 800 g/kg	Polvo oral, en el alimento	6 mg/kg peso	7,5 mg/kg peso	14 días	300 grados días
2079	PHARMAQ AS CHILE LTDA.	AMX	Deltametrina	Deltametrina	1% 10 mg/ml	Solución externa para inmersión	2 mg/mt3 agua	0,3 ml/mt3 agua	30 - 40 minutos	10 grados días
2085	ELI LILLY INTERAMÉRICA INC. Y CIA. LTDA.	Betamax	Cipermetrina	Piretroides	5% 50% mg/ml	Solución externa para inmersión	15 mg/mt agua	0,3 ml/mt3 agua	30 minutos	30 grados días
2093	FARMACOLOGÍA EN AQUACULTURA VETERINARIA FAV S.A.	Deltafav	Deltametrina	Piretroides	1% 10 mg/ml	Solución externa para inmersión	3 mg/mt3 agua	0,3 ml/mt3 agua	40 minutos	20 grados días
2189	FISH VET GROUP SPA	Purisan	Azametifos	Organofosforado	50% 500 mg/g - 500 g/kg	Solución externa para inmersión	100 mg/mt3 agua	200 mg/mt3 agua	30 - 60 minutos	10 grados día
2240	FARMACOLOGÍA EN AQUACULTURA VETERINARIA FAV S.A.	CalFree	Azametifos	Organofosforado	50% 500 mg/g - 500 g/kg	Solución externa para inmersión	100 mg/mt3 agua	200 mg/mt3 agua	30 - 60 minutos	20 grados días.
2299	CENTROVET LTDA.	Azasure	Azametifos	Organofosforado	50% 500 mg/g - 500 g/kg	Solución externa para inmersión	100 mg/mt3 agua	200 mg/mt3 agua	30 - 60 minutos	10 grados días.
2325	ELI LILLY INTERAMÉRICA INC. Y CIA. LTDA.	Imvixa	Lufenurón	Benzoilureas	10% 100 gr/1000 gr	Polvo, oral, en el alimento (solo en pisciculturas con sistema de tratamiento de efluentes)	5 mg/kg peso	50 mg/kg peso	7 días	2.050 grados días.
2411	PHARMAQ AS CHILE LTDA.	Alpha Flux	Hexaflumuron	Benzoilureas	10% 100 gr/1000 ml	Solución externa para inmersión	2 mg/1000 ml agua	20 ml/1000 ml agua	120 minutos	1923 grados días
2435	SOLVAY PERÓXIDOS DE LOS ANDES IND. Y COM. LTDA.	Paramove	Peróxido de Hidrógeno	--	50% 500 gr/1000 ml	Solución externa para inmersión	800 - 2000 ppm o mg/lt	800 - 2000 ppm o mg/lt	20 minutos	Cero (0) grados días.

2.5. Resistencia farmacológica de *C. rogercresseyi*

La resistencia farmacológica en insectos se define como la capacidad de tolerar tóxicos en dosis que para otras poblaciones de la misma especie serían letales (Brown, 1958). La resistencia puede producirse como consecuencia de la presión de selección que se ejerce con las aplicaciones de insecticidas (Brattsten, 1990). Entre los años 2000 al 2007, la única alternativa farmacológica autorizada frente al parásito fue el uso oral de benzoato de emamectina (EMB) pero la falta de protocolo para la administración de este medicamento originó la insensibilidad frente a este principio activo, desencadenando una crisis sanitaria en 2007 (Bravo et al., 2008). El año 2008 se reportó la pérdida de sensibilidad de *C. rogercresseyi* para piretroides (Helgesen et al., 2014). También se estudió la respuesta de genes asociados a la cutícula en piojos de mar, observando una respuesta consistente en el engrosamiento cuticular como respuesta a la exposición a medicamentos antiparasitarios (Chávez-Mardones et al., 2016). Y recientemente se ha establecido que azametifos estaría perdiendo eficacia en el tratamiento para controlar este parásito (Sáez-Vera et al., 2022). Se han descrito 3 mecanismos de resistencia

contra fármacos, los cuales son las mutaciones puntuales en proteínas target de fármacos, la detoxificación celular y la resistencia mediante engrosamiento cuticular (Chávez-Mardones et al., 2016; Fonseca & Quiñonez, 2005; Rodríguez-Vivas et al., 2012).

2.5.1. Mutaciones puntuales en proteínas target de fármacos

La resistencia de este tipo se debe a mutaciones que afectan la capacidad del fármaco para unirse a sitios objetivo, un ejemplo de esto se da en el sitio de unión de organofosforados por mutaciones en acetilcolinesterasa (AChE) que afectan la eficacia de los fármacos (Denholm et al., 2002; Jones et al., 1992). Mutaciones en la expresión de proteínas target que otorgan mayor resistencia farmacológica ha sido reportado en *Haemonchus contortus* restándole eficacia a los tratamientos con avermectinas (Blackhall et al., 1998). También se ha reportado resistencia a piretroides a partir de mutaciones puntuales en el sitio objetivo para el piojo de mar predominante en el hemisferio norte *Lepeophtheirus salmonis* (Blackhall et al., 1998).

Dentro de este tipo de resistencia farmacológica, la acetilcolinesterasa (AChE) juega un rol importante ya que es target de organofosforados (Essandoh et al., 2013). La acetilcolina (ACh) es el primer neurotransmisor identificado (Kruse et al., 2012), se sintetiza a partir de la colina y del acetil CoA, en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa (Flores Soto & Segura Torres, 2005). El efecto de ACh termina por la actividad de AChE, ya que AChE hidroliza a ACh en acetato y colina un milisegundo después de ser liberada, regulando la concentración del neurotransmisor (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008). Los organofosforados actúan como inhibidores de AChE provocando una sobreestimulación de los sistemas nervioso y muscular, lo que resulta en parálisis y posterior muerte del parásito (Haya et al., 2005; Walsh et al., 2007). Los organofosforados se unen a la AChE e inhiben su actividad por fosforilación irreversible (Cárdenas et al., 2010).

Los canales de calcio dependientes de voltaje también están implicados en la resistencia por mutaciones puntuales, siendo target de piretroides (Narahashi, 1986). En la membrana plasmática de todas las células hay muchos canales iónicos, intercambiadores

y transportadores, entre estos canales se encuentran los canales de calcio dependientes de voltaje (Lozano Jiménez & Sánchez Mora, 2020). Estos canales son la vía más importante para la entrada de Ca^{2+} en las células excitables (Izaguirre & Zavaleta, 1998). Para lograr funciones diversas, diferentes canales de calcio se activan a diferentes voltajes y con distintas cinéticas (Fernández-Quintero et al., 2021). Al abrirse permiten el flujo selectivo de iones Ca^{2+} a través del poro del canal, iniciándose una variedad de procesos intracelulares como la contracción muscular, secreción de neurotransmisores, expresión génica, etc. (Izaguirre & Zavaleta, 1998). Para garantizar un control adecuado, la mayoría de los canales iónicos se abren en respuesta a estímulos específicos, lo que se conoce como “gating” (Fernández-Quintero et al., 2021). Estos canales están ampliamente distribuidos en el reino animal y son parte esencial de muchas células (Hofmann et al., 1999). Los piretroides generan efecto sobre los canales de calcio dependientes de voltaje y están clasificados como agentes neurotóxicos (Rodríguez Gutiérrez, 2018).

Otro gen implicado en la resistencia farmacológica mediante mutaciones en proteínas target es el intercambiador sodio/potasio/calcio NCKX30C. Los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependientes de K^+ (NCKX) son una familia de transportadores de genes de cinco miembros descritos (Hassan & Lytton, 2020). Las proteínas NCKX pertenecen al grupo de transportadores secundarios, muchos de los cuales utilizan la energía almacenada en el gradiente transmembrana de Na^+ para el transporte ascendente de otros sustratos (Altimimi & Schnetkamp, 2007). Son fundamentales para la rápida extrusión de calcio, que sigue a la estimulación de una variedad de células excitables. NCKX30C funciona en la eliminación de calcio y mantenimiento de la homeostasis del calcio (Haug-Collet et al., 1999). Se cree que operan a través del llamado modelo de acceso alterno en el que un solo conjunto de sitios de unión de iones o sustratos cambia su accesibilidad desde el entorno extracelular al citosol y viceversa (Altimimi & Schnetkamp, 2007).

2.5.2. Detoxificación celular

La reducción en la biodisponibilidad del fármaco es uno de los mecanismos de resistencia más frecuente, ya sea aumentando el metabolismo intracelular del fármaco o expulsándolo desde las células diana en el momento de su interacción con la membrana plasmática o después de su metabolización (Gamarro & Castanys, 1997). Se ha reportado este mecanismo de resistencia en *Drosophila melanogaster* frente a insecticidas (Kalajdzic et al., 2013).

Una de las principales familias involucradas en la detoxificación celular es la familia del citocromo p450 (CYP), está constituida por 57 genes que codifican enzimas que metabolizan un gran número de fármacos (Gueguen et al., 2006). Participan en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas y pesticidas (Orellana & Guajardo, 2004). CYP es el principal responsable del metabolismo de la mayoría de los fármacos (Quiñones et al., 2008). Codifica enzimas encargadas de catalizar la oxidación de compuestos xenobióticos para obtener productos más polares y facilitar su excreción (Pérez Albaladejo, 2017). Estas enzimas catalizan reacciones de fase I de biotransformación de xenobióticos, generalmente introduciendo o exponiendo un grupo funcional hidrofílico en el fármaco (Quiñones et al., 2008).

Las proteínas de unión a ATP, ATP-binding cassette (ABC), son transportadores unidos a la membrana que acoplan la hidrólisis de ATP a la translocación de sustratos a través de membranas biológicas (Chen et al., 2012). Se agrupan en ocho subfamilias (ABCA-H), las subfamilias B, C y G son las más asociadas con la resistencia de fármacos (Dermauw & Van Leeuwen, 2014). La subfamilia ABCC es diversa funcionalmente y comprende el canal de cloruro CFTR (regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística), los receptores de membrana SURs (receptores de sulfonilurea) y transportadores de amplia especificidad llamados proteínas asociadas a la resistencia de múltiples fármacos (MRP) (Sturm et al., 2009). MRP también es de gran importancia en la resistencia farmacológica mediante detoxificación, presente en tejidos normales donde probablemente funciona como un transportador activo de aniones antifolatos. También se presume que transporta las drogas a las que confiere resistencia. A diferencia de otros

miembros de la superfamilia ATP-binding Cassette, MRP y varias proteínas relacionadas tienen 3 potenciales dominios transmembrana. La familia de proteínas asociadas a la resistencia de múltiples fármacos contiene unos 7 miembros. Las MRP contribuyen a la defensa contra los iones metales pesados, contra algunas de las toxinas que las bacterias producen. La mayoría de las células seleccionadas por fármacos que sobreexpresan MRP, muestran una disminución en la acumulación del fármaco acompañada de un mayor flujo de salida de drogas (Lautier et al., 1996).

2.5.3. Resistencia por engrosamiento de la cutícula

Este tipo de resistencia implica una disminución en la penetración del insecticida a través de la cutícula del insecto (Yadav et al., 2010). La cutícula se ve fortalecida afectando la penetración del fármaco, este mecanismo de resistencia fue descrito en *Bactrocera dorsalis*, donde se demostró que la cutícula de cepas resistentes a β -cipermetrina es más gruesa que la de cepas susceptibles (Lin et al., 2012). El factor cuticular en la resistencia a insecticidas es evidentemente un mecanismo muy complejo, e incluiría alteraciones en la regulación/expresión de genes que codifican la biosíntesis de proteínas cuticulares (Dulbecco et al., 2019). Dentro de los genes asociados a esta forma de resistencia, está la proteína cuticular. Durante el desarrollo post embrionario de los insectos, las células de la epidermis sintetizan durante cada ciclo de muda un nuevo exoesqueleto o cutícula lo suficientemente mayor que la anterior. Esta matriz extracelular es un material compuesto esencialmente de un conjunto de fibras de quitina y proteínas, por lo tanto, los genes que codifican las proteínas de la cutícula son buenos modelos para estudiar los mecanismos moleculares de señalización que regulan la muda y la metamorfosis en los insectos (Charles, 2010).

2.6. Duplicaciones de genes asociados a la resistencia farmacológica

La duplicación de genes es uno de los componentes claves de la adaptación a corto plazo (Weetman et al., 2018). La duplicación de genes consiste en la reiteración de un segmento de DNA para generar una o más copias adicionales en el genoma de un organismo (Bass & Field, 2011). Adicionalmente, son los genes duplicados otra fuente de variaciones genéticas como polimorfismos puntuales del tipo SNPs (Weetman et al.,

2018). Los insecticidas generan una fuerte presión que impulsa al rápido cambio fenotípico (Weetman et al., 2018) y una ruta que conduce a un metabolismo mejorado es la duplicación o amplificación de los genes estructurales (Bass & Field, 2011). Este mecanismo fue descrito por primera vez en la década de 1960 en *Escherichia coli*, desde entonces se ha demostrado que es un mecanismo de evolución adaptativo en la resistencia a insecticidas (Horiuchi et al., 1963). Cuando se producen variaciones genómicas estructurales que van desde 1kb a 5Mb, comprenden principalmente Copy Number Variants (CNV) o variación en el número de copias (Scherer et al., 2007). Los CNV son cambios en la estructura genómica que incluyen inserciones, deleciones y duplicaciones (Alkan et al., 2011). Los CNV pueden influir en la resistencia a los insecticidas al amplificar la expresión de genes asociados a la respuesta a fármacos (Weetman et al., 2018). En *C. rogercresseyi* no se han descrito CNVs asociados a la respuesta a fármaco, pero las evidencias proporcionadas por estudios genómicos y transcriptómicos sugieren su presencia en genes de respuesta a antiparasitarios.

2.7. Hipótesis

Existen duplicaciones de genes con función en la respuesta a fármacos antiparasitarios en *C. rogercresseyi*, con variaciones en su número de copias (CNVs) en distintas poblaciones del parásito provenientes de centros de cultivo de salmónidos de distintas regiones del sur de Chile.

2.8. Objetivos

2.8.1. Objetivo general

- Identificar duplicaciones genómicas potencialmente asociadas con resistencia farmacológica en distintas poblaciones de *C. rogercresseyi* mediante evaluación de marcadores CNVs en genes de interés.

2.8.2. Objetivos específicos

- Identificar presencia de genes con función de respuesta a fármacos en genomas de *C. rogercresseyi* obtenidos por resecuenciación de DNA.

- Evaluar duplicaciones de genes identificados mediante identificación de CNVs en poblaciones de *C. rogercresseyi*.
- Validar duplicaciones genómicas mediante PCR en tiempo real sobre genes con CNVs diferencial en poblaciones de *C. rogercresseyi*.

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención de muestras

Se seleccionaron 8 individuos (4 machos y 4 hembras) de *C. rogercresseyi* para cada uno de los barrios estudiados: 2, 3A, 9A, 28B y 59. Los barrios 3A y 9A presentan mayor resistencia farmacológica, el barrio 2 presenta resistencia farmacológica, pero a menor nivel que en los barrios previamente mencionados. El barrio 28B muestra resistencia sólo ante un fármaco (deltametrina) y el barrio 59 es contrastante a todos los demás, debido a que presenta los niveles de resistencia a antiparasitarios más bajos.

3.2. Extracción de DNA para generación de bases de datos y secuenciación

3.2.1. Extracción DNA

El DNA había sido extraído previo a la realización del presente trabajo, en dicho proceso se aisló DNA de acuerdo con protocolos previamente estandarizados. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se agruparon 10 piojos de mar para cada población (5 machos y 5 hembras). Los parásitos fueron homogenizados por vórtex con buffer de lisis e incubados durante la noche a 56°C. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente durante 1 minutos a 5000 rpm, se recuperó el sobrenadante o fase acuosa, se agrega un volumen de etanol y se centrifuga por 1 minuto a 8500 rpm. Después de 2 pasos de lavado, el DNA se diluyó en 30 µl de agua DEPC, y la integridad del DNA se evaluó a través de electroforesis. Luego, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, la concentración de DNA se estimó por fluorescencia en un Qubit 4 (Thermo Scientific, USA) con el kit de ensayo de DNA BR (Thermo Scientific).

3.2.2. Preparación de base de datos y secuenciación mediante tecnología Nanopore

El DNA genómico se purificó utilizando perlas Agencout AMPure XP (Beckam Coulter, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados fueron cuantificados por Qubit 4 (Thermo Scientific, USA) y utilizados para la preparación de la biblioteca de Nanopore. La calidad de las bibliotecas obtenidas fue confirmada a través de Tape Station Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA), utilizando DNA screen tape (Agilent, USA), y la cantidad se estimó por fluorescencia con un Qubit 4 (Thermo Scientific, USA). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, las 5 bibliotecas se agruparon y secuenciaron uniformemente en una plataforma Nanopore MinIon (Oxford Nanopore Technologies, UK) utilizando la flowcell MK1 spot-on-flow-min107-r9.

3.3. Remoción de adaptadores

Los datos de la biblioteca Nanopore fueron sometidos al proceso denominado “trimming”, el cual consiste en la remoción de adaptadores Nanopore. Para llevar a cabo el proceso de la búsqueda y remoción de lecturas Oxford Nanopore, se utilizó el software Porechop. Los adaptadores en los extremos de las lecturas se descartan y cuando una lectura tiene un adaptador en el medio se trata como quimérica y se corta en lecturas separadas.

3.4. Polishing y mapeo de datos

3.4.1. Reads polishing

Utilizando el programa CLC Genomic Workbench (v22.0, Quiagen Bioinformatics, Alemania), se actualizó la calidad de los datos obtenidos por Nanopore, la cual presenta lecturas largas, combinándolas con la tecnología Illumina, en la cual las lecturas son más cortas, pero de mejor calidad. El proceso de polishing consistió en el mapeo de los datos de Illumina a las referencias que fueron los reads largos obtenidos por Nanopore utilizando el programa Minimap 2 (Li, 2016). Luego es utilizado el programa Racon (V1.5.0, <https://github.com/isovic/racon>), para reemplazar la calidad de los datos

Nanopore en función de la calidad de los datos de Illumina mapeados, en ventanas de evaluación de 500pb.

3.4.2. Mapeo

Para realizar el mapeo, se seleccionan los reads “pulidos”, utilizando las herramientas del software CLC Genomic Workbench, utilizando el soporte para mapeos de lecturas largas basadas en Minimap 2. En este caso la referencia correspondió a la versión pública del genoma completo de *C. rogercresseyi* (Gallardo-Escárate et al., 2021). Los parámetros de mapeo utilizados fueron, match score: 2, mismatch cost: 4, gap open cost: 4, gap extend cost: 2, long gap open cost: 24 y long gap extend cost: 1. Posteriormente se extrae una secuencia de consenso para cada población secuenciada.

3.5. Identificación de genes asociados con la respuesta a fármacos

Para la obtención de CNVs se utilizó un BlastX, que realiza una comparación de 2 bases de datos, en este caso en particular se comparó una base de secuencia nucleotídica contra una base de secuencia de proteínas asociadas a la respuesta a fármacos. En la detección de CNVs se buscan genes de interés y el criterio de selección son aquellos que contengan un valor de E-value menor a 1E-05.

3.6. Identificación de CNVs *in silico*

Este proceso se llevó a cabo utilizando la herramienta Copy Number Variant Detection, la cual está diseñada para detectar CNVs en experimentos de resecuenciación. La herramienta toma asignaciones de regiones y produce anotaciones de amplificación. Estas asignaciones se generan mediante un método de “cobertura profunda”, el cual se basa en un marco estadístico logarítmico utilizando el método CONTRA (Li et al., 2012). El umbral de Fold Change y P-value para la identificación de CNVs fue de 1.5 y 0.05 respectivamente.

La representación de CNVs se realizó utilizando el software CIRCOS, los datos obtenidos en el punto 3.6. se exportaron al software, el cual genera una representación gráfica de los CNVs en el genoma de *C. rogercresseyi* para cada uno de los 5 barrios estudiados.

3.7. Extracción de DNA para validación de duplicaciones genéticas

Se realizó extracción de DNA de *C. rogercresseyi* de cinco poblaciones, correspondientes a los barrios 2, 3A, 9A, 28B y 59. El procedimiento para la extracción de DNA comienza seleccionando individuos y cortarlos en pequeñas fracciones, en tubos de 2 ml se debe agregar 1 ml de Buffer de lisis, 40 µl de SDS, 5 µl de proteinasa k y agregar 1 individuo previamente cortado por tubo. Cada tubo se debe incubar a 37°C por 1 hora y durante este proceso se debe dar vórtex cada 10 minutos. Bajo cámara de extracción se debe añadir un volumen de fenol cloroformo a cada tubo, se aplica vórtex y se centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se obtiene la fase acuosa y se traspasa a un tubo nuevo, se agrega un volumen de cloroformo y se da vórtex a los tubos, se centrifuga nuevamente a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se recupera la fase acuosa y se traspasa a un tubo nuevo de 1.5 ml, se agrega un volumen de isopropanol, se aplica vórtex y se deja por lo menos 30 minutos a -20°C para luego centrifugar a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se elimina el sobrenadante y se adiciona 1 ml de etanol al 75% y se realiza vórtex para posteriormente centrifugar a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C, se descarte el etanol y se repite el paso mencionado previamente. Se deja secar la muestra y se diluye con 30 µl de agua, se agregan 0.5 µl de RNasa y finalmente se deja en una termoplaca a 37°C por 35 minutos.

3.8. Diseño y estandarización de partidores

En base a los resultados obtenidos *in silico* se seleccionaron 6 genes para la validación de los CNVs identificados: intercambiadores sodio/potasio/calcio NCKX30C, citocromo c oxidasa, acetilcolinesterasa, canales de calcio dependientes de voltaje, proteínas asociadas a la resistencia de múltiples fármacos y proteína cuticular. Se diseñaron partidores específicos para cada gen utilizando el software CLC Genomic Workbench. Los parámetros utilizados en el diseño fueron temperatura de melting entre los 53 y los 63°C, %Guanina-Citocina (%GC) mínimo de 50% y el tamaño de los partidores de entre 19 a 22 pares de bases. Posteriormente se seleccionaron las temperaturas más apropiadas para cada partidore. para esto se consideró la mejor amplificación y el descarte de

aquellas con presencia de dímeros. Esta selección se realizó utilizando la técnica de PCR en tiempo final. Para llevar a cabo PCR en tiempo final se debe preparar un mix que contenga 1.25 μ l de buffer, 0.25 μ l de BSA, 0.25 μ l de dntps, 0.75 μ l de $MgCl_2$, 0.625 μ l de primer forward, 0.625 μ l de primer reverse, 0.15 μ l de taq polimerasa, 6.6 μ l de agua y 2 μ l de DNA. Posteriormente las muestras se llevan a un termociclador en el cual pasan por un proceso que consta de 3 fases, la fase 1, llamada hold stage, que cuenta con 2 pasos los que se realizan a 50°C por 2 minutos y 95°C por mismo tiempo respectivamente. En esta fase se produce la desnaturalización ya que, en las muestras, las 2 hebras de DNA se separan debido al aumento de la temperatura. La fase 2, PCR stage, con 2 pasos a 95°C por 15 segundos el primero, y en el segundo paso se utilizaron diferentes temperaturas para probar la mejor eficiencia de los partidores. En esta fase se produce un descenso en la temperatura que permite que los primers o partidores se apareen por complementariedad de bases con el DNA molde. Y la última fase, melt curve stage, que comprende 3 pasos, a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto y a 95°C por 15 segundos cada paso respectivamente. En la última fase el DNA polimerasa cataliza la síntesis simultanea de las 2 cadenas a partir de cada fragmento que actúa como partidior.

3.9. Validación de CNVs por PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

Se empleó la técnica de qPCR, preparando un mix que contenga 5 μ l de buffer, 0.625 μ l de primer forward, 0.625 μ l de primer reverse, 1.75 μ l de agua y 2 μ l de DNA. Una vez preparado el mix, las muestras se llevan a termociclador, con temperaturas, fases y pasos como se explicaron en el ítem 3.8., con una única variación en el paso 2 de la fase 2, donde se utilizó la temperatura óptima para cada uno de los partidores.

3.10. Cálculo Fold Change, “gain” o “no change”

El umbral de ciclos o cycle threshold (Ct), es el número de ciclos en que la señal fluorescente cruza el umbral. El umbral se comprende como el nivel de la señal fluorescente que representa un incremento estadísticamente significativo respecto al nivel basal (Serrano-Cumplido et al., 2021). Para calcular el valor Fold Change, se debe realizar una resta entre el Ct de las muestras a las cuales se les realizó qPCR y el Ct de

muestras de β tubulina correspondiente a los mismos barrios. A cada uno de los valores obtenidos, se les debe restar el promedio de las restas de Ct de las muestras del barrio 2 con las de β tubulina, esto se realiza debido a que los barrios se compararon contra el barrio 2. Al valor que se obtiene, lo llamaremos X y se debe reemplazar en la fórmula: $2 \cdot (2^{-X})$, cada uno de los valores obtenidos deben ser divididos entre los valores $2 \cdot (2^{-X})$ del barrio 2. A los valores obtenidos de la división se les calcula Log2 y de acuerdo al signo que se obtenga, es el signo que llevará el valor de la división, y este es el valor correspondiente a Fold Change. Para cuantificar este valor y comprender cuántas veces las duplicaciones se expresan más, se debe utilizar el valor de Fold Change, realizando la operación: $2^{\text{Fold Change}}$.

El valor de Fold Change es una medida que describe el cambio entre una medición de interés con una de referencia. Los valores de Fold Change superiores a 1.5 se consideran como “gain” o ganancia en cuanto a la variación en el número de copias, valores menores a -1.5 se consideran “loss” o pérdida y valores dentro del rango previamente mencionado, se consideran como “no change” o que no presentan cambio en cuanto a su variación.

4. Resultados

4.1. Lecturas mapeadas y éxito de pulido

El porcentaje de lecturas mapeadas en cada genoma fue de 52.8% en el barrio 2, 61.2% para el barrio 3A, 84.8% en barrio 9A, 61% en barrio 28B y 56.7% en barrio 59. Mientras que el porcentaje de éxito de pulido es de 19.9%, 5.4%, 17.7%, 20% y 9.1% para los mismos barrios mencionados.

4.2. CNVs y valores Fold Change de genes de interés

Mediante el análisis *in silico* se obtuvieron 501, 1751, 375, 289 y 362 CNVs para los barrios 2, 3A, 9A, 28B y 59 respectivamente. En la figura 4 es posible visualizar el total de los CNVs en el genoma de *C. rogercresseyi* para cada uno de los barrios estudiados. Cada barra graficada en cada barrio representa una variante genómica con su respectiva ubicación a nivel cromosómico, el largo de la barra es un indicador del valor de su Fold

Change, mientras las barras tienen mayor longitud el Fold Change es mayor. Se puede observar que el barrio con mayor número de CNVs es el 3A, mientras que los barrios contrastantes son 28B y 59. Los barrios 9A y 2 muestran un número de variación en el número de copias intermedia entre los barrios mencionados con anterioridad. Las variaciones genómicas en el barrio 59 muestran valores de Fold Change menores, indicada por la longitud de las barras, al contrastar con los resultados obtenidos en los otros barrios. Es posible apreciar que para los 5 barrios de estudio se identificaron CNVs en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 20 y 21, lo cual es un indicador que son zonas genómicas de interés, ya que, pese a que son identificaciones genómicas correspondientes a zonas diferentes, comparten dichas áreas en cuanto al desarrollo de CNVs. De los 5 barrios estudiados, solo el barrio 59 presenta CNVs en todos los cromosomas. El barrio 28B presenta solo ausencia de variación en el número de copias en el cromosoma 9. Los barrios 9A y 3A no muestran CNVs en 3 cromosomas, el 5, 14 y 16 para el primer barrio mencionado y para el segundo barrio los cromosomas 5, 8 y 14. El barrio 2 no tiene CNVs en los cromosomas 9 y 16.

El número de CNVs directamente asociados a mecanismos de resistencia farmacológica fue de 18 para el barrio 2, de 53 para el barrio 3A, 20 en el barrio 9A, 17 en el barrio 28B y 17 en el barrio 59. Entre los CNVs encontrados, se hallaron una serie de genes potencialmente asociados a la resistencia farmacológica, como por ejemplo reguladores de proteínas de unión a GTP, inxina, anhidrasa carbónica, synaptic functional FMR1 y metiltransferasa por mencionar algunos. Pero los genes en los que se enfocó este trabajo debido a su presencia en los barrios y a que representan diferentes tipos de resistencia farmacológica, son proteínas asociadas a la resistencia de múltiples fármacos, proteína cuticular, canales de calcio dependientes de voltaje, intercambiador sodio/potasio/calcio NCKX30C, citocromo c oxidasa y acetilcolinesterasa. El número de CNVs de genes asociados a la resistencia farmacológica para el barrio 2, 3A, 9A, 28B y 59 es de 18, 53, 20, 17 y 17 respectivamente.

Mediante el trabajo realizado *in silico*, se encontró presencia de duplicaciones para los genes de interés en los cuales se enfoca el presente estudio. En el barrio 2 se detectaron duplicaciones genómicas para acetilcolinesterasa. En el barrio 3A se encontraron

duplicaciones para cada uno de los 6 genes de interés, es decir, para acetilcolinesterasa, proteína cuticular, canales de calcio dependientes de voltaje, intercambiador sodio/potasio/calcio NCKX30C, proteínas de resistencia a múltiples fármacos y citocromo c oxidasa. El barrio 9A muestra duplicaciones para los genes citocromo c oxidasa, canales de calcio dependientes de voltaje e intercambiador sodio/potasio/calcio NCKX30C. El barrio 28B posee duplicaciones en el gen de citocromo c oxidasa. El barrio 59 muestra el mismo resultado que el barrio 28B (Tabla 3).

Según los datos obtenidos en CLC Genomic Workbench, se registraron duplicaciones genómicas para acetilcolinesterasa en el barrio 2 y en el barrio 3A con valores de Fold Change de -2.73 y -1.55 respectivamente, mientras que mediante la técnica qPCR y empleando los cálculos especificados en materiales y métodos, se obtuvieron valores de Fold Change de 0.35, -0.54, 0.3, 0.04 y 0.63 para los barrios 2, 3A, 9A, 28B y 59 respectivamente (Figura 5). En cuanto a las duplicaciones de proteínas asociadas a la resistencia de múltiples fármacos mediante el análisis informático, solo se registró en el barrio 3A con un Fold Change de -2.18, mientras que, mediante el análisis de laboratorio y posterior realización de los cálculos correspondientes, los valores de Fold Change fueron de -0.02, 0.54, 0.03, 0.29 y -0.13 para la totalidad de los barrios en el mismo orden mencionado previamente (Figura 6). Las duplicaciones que se encontraron de manera bioinformática para los canales de calcio dependientes de voltaje, se hallaron en los barrios 3A y 9A con valores de Fold Change de -1.71 y -2.23 para cada uno, los valores obtenidos para la totalidad de los barrios, mediante el trabajo de laboratorio fue de 0.01, 0.19, -0.63, -0.56 y -0.19 (Figura 7). Para la proteína cuticular se encontró duplicaciones solo en el barrio 3A según el trabajo realizado en software, con -1.8 como valor de Fold Change, en base a la información procesada tras el trabajo en base a qPCR, los valores que se obtuvieron para los barrios fueron de -0.05, -0.06, -0.69, -0.23 y 0.45 (Figura 8). Bioinformáticamente, se registraron duplicaciones de citocromo c oxidasa en los barrios 3A, 9A, 28B y 59 con valores de Fold Change de -1.23, 1.15, 2.77 y 1.28 respectivamente. Los valores que se obtuvieron para todos los barrios en laboratorio fueron de 0.27, 2.44, 5.51, 4.34 y 0.94 (Figura 9). En el gen intercambiador sodio/potasio/calcio NCKX30C, utilizando el software se identificaron CNVs en los

barrios 3A y 9A con valores de Fold Change de -1.77 y -2.11, de acuerdo al trabajo de laboratorio, los Fold Change calculados para los barrios fueron de 0.25, 0.97, -0.32, 1.88 y 1.02 (Figura 10).

Los partidores utilizados para la identificación de duplicaciones de los genes correspondientes a proteínas de resistencia a múltiples fármacos, proteína cuticular, acetilcolinesterasa, canales de calcio dependientes de voltaje y citocromo c oxidasa se detallan en la tabla 4, con sus respectivas secuencias, temperatura óptima de funcionamiento para el partidos y longitud.

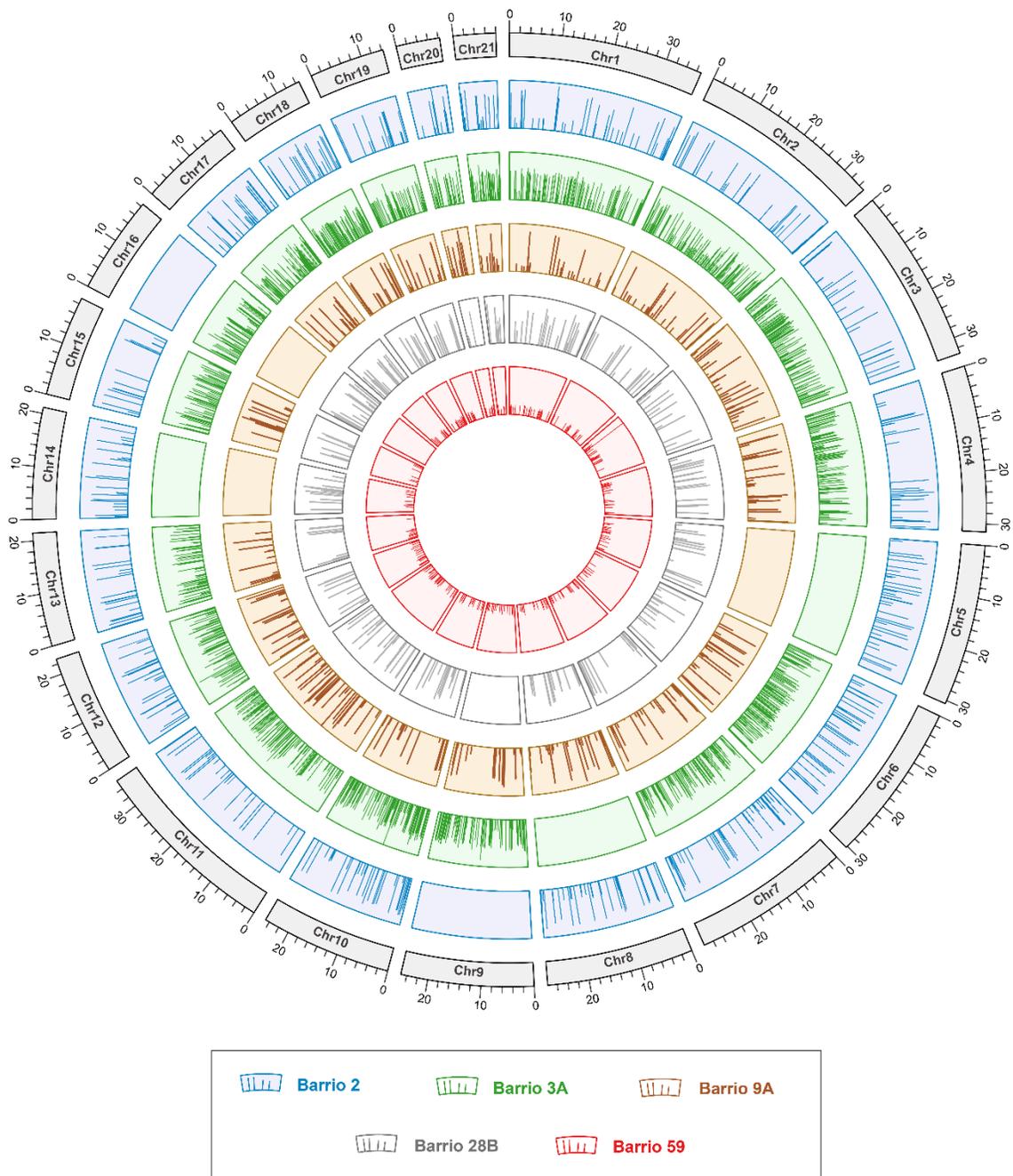


Figura 4: Gráfico CNVs de genes de interés por región del genoma de *C. rogercresseyi*. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3: Listado de genes asociados a resistencia farmacológica por barrio con sus respectivos valores de Fold Change y P-value. Fuente: Elaboración propia.

Barrio	Gen	Fold Change	P-value
2	Acetilcolina	-2.73	9.14E-04*
3A	Citocromo c oxidasa	-1.23	6.25E-11*
3A	Acetilcolina	-1.55	3.52E-03*
3A	Canal de calcio dependiente de voltaje	-1.71	3.59E-03*
3A	Proteína de resistencia a múltiples fármacos	-2.18	5.28E-04*
3A	Proteína cuticular	-1.8	1.35E-03*
3A	Intercambiador sodio/potasio/calcio NCKX30C	-1.77	1.78E-03*
9A	Intercambiador sodio/potasio/calcio NCKX30C	-2.11	6.85E-04*
9A	Canal de calcio dependiente de voltaje	-2.23	4.07E-04*
9A	Citocromo c oxidasa	1.15	1.17E-12*
28B	Citocromo c oxidasa	2.77	1.56E-04*
59	Citocromo c oxidasa	1.28	0

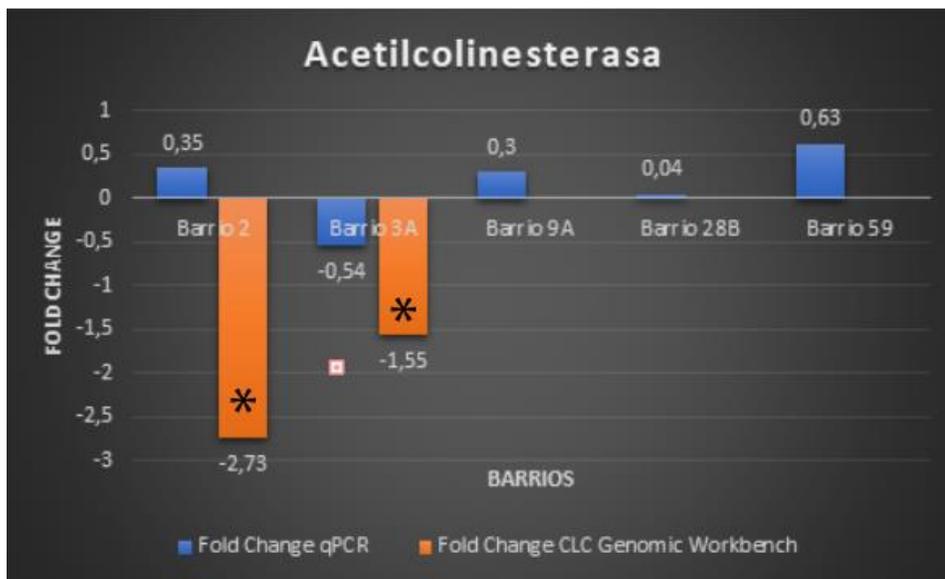


Figura 5: Gráfico de los valores de Fold Change para acetilcolinesterasa obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR. Fuente: Elaboración propia.

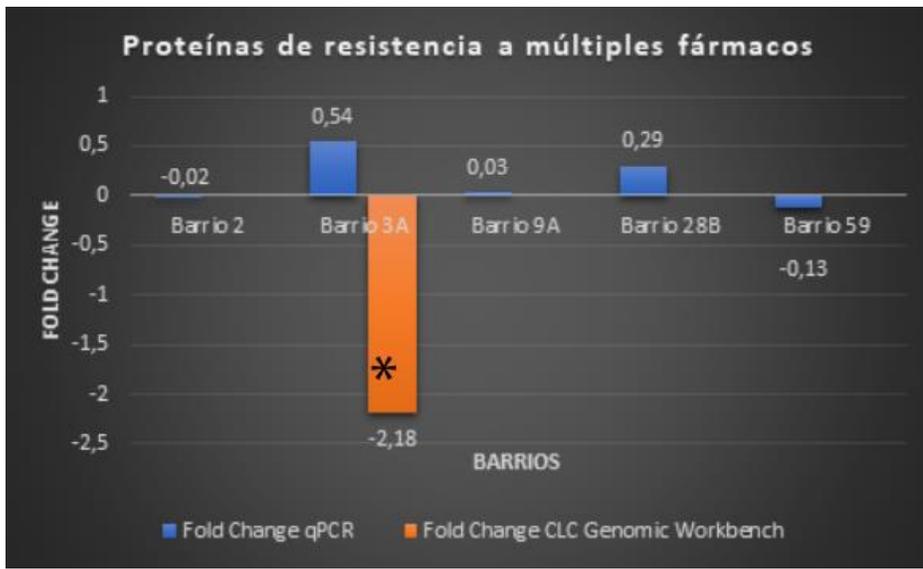


Figura 6: Gráfico de los valores de Fold Change para proteínas de resistencia a múltiples fármacos obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR. Fuente: Elaboración propia.

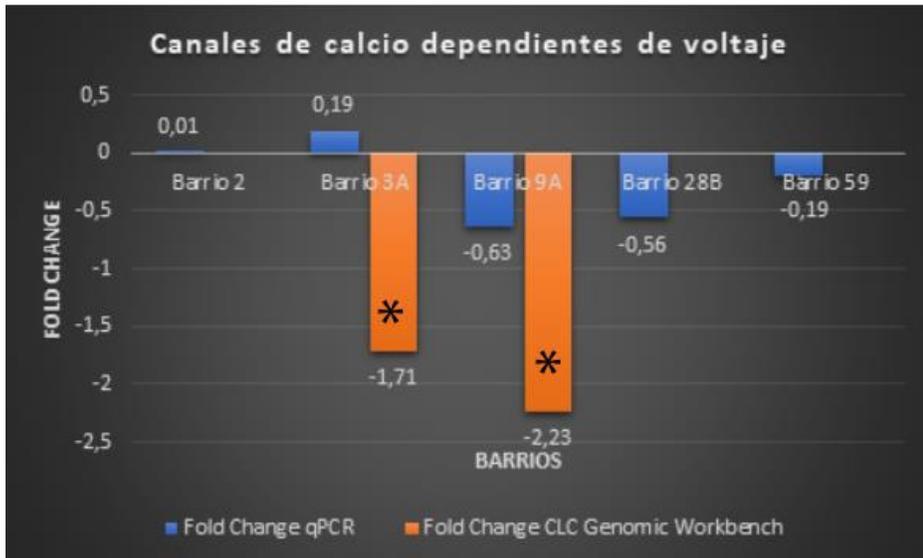


Figura 7: Gráfico de los valores de Fold Change para canales de calcio dependientes de voltaje obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR. Fuente: Elaboración propia.

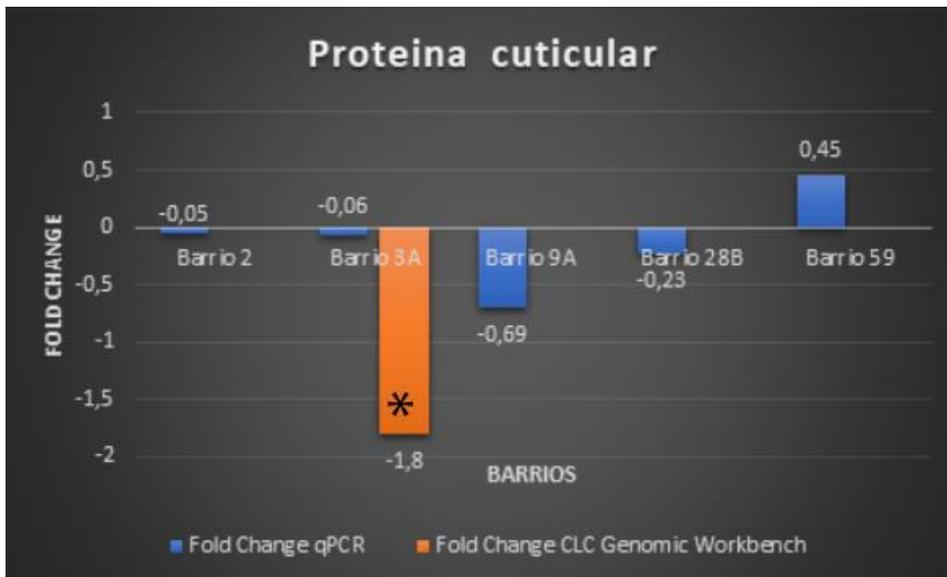


Figura 8: Gráfico de los valores de Fold Change para proteína cuticular obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR. Fuente: Elaboración propia.

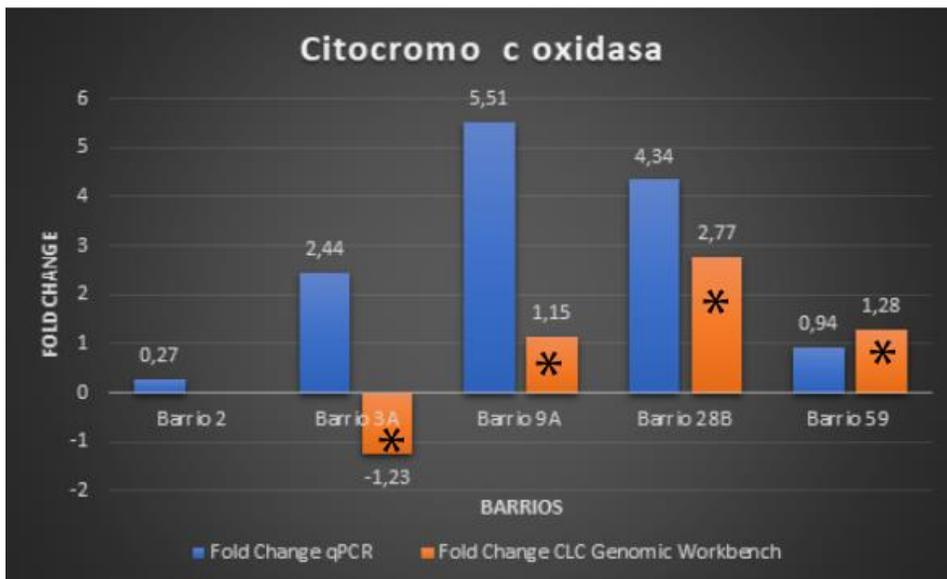


Figura 9: Gráfico de los valores de Fold Change para citocromo c oxidasa obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR. Fuente: Elaboración propia.

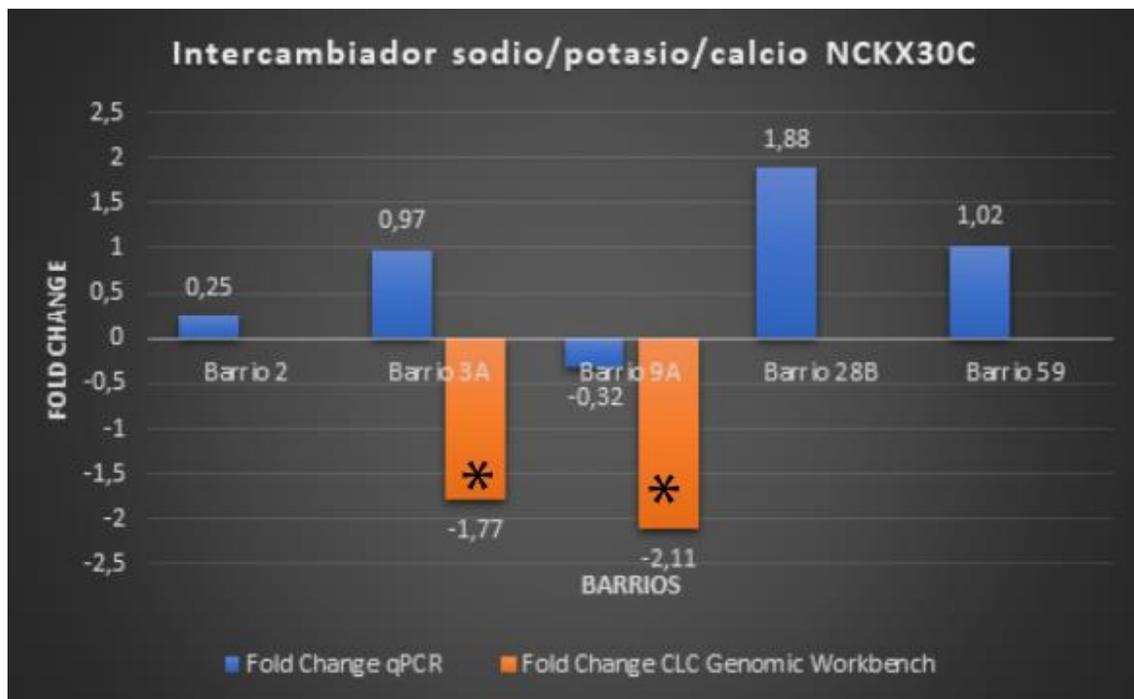


Figura 10: Gráfico de los valores de Fold Change para intercambiadores sodio/potasio/calcio NCKX30C obtenidos en el software CLC Genomic Workbench contrastados con los valores obtenidos en base a la técnica qPCR. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4: Partidores para cada gen de interés, con su secuencia, temperatura óptima de funcionamiento y longitud. MDRP: proteínas de resistencia a múltiples fármacos. Cut: proteína cuticular. Nckx30C: intercambiador sodio/potasio/calcio NCKX30C. AChE: acetilcolinesterasa. VDCCh: canales de calcio dependientes de voltaje. COX: Citocromo c oxidase. Fuente: Elaboración propia.

Primer	Secuencia	TM (°C)	Longitud
MDRP-F	GTCTTCACTCATATCGGCT	56	127
MDRP-R	CCCGGACTGATGTGTTTT		
Cut-F	TCCCTCGTATTTAACGTCA	56	137
Cut-R	TCAACGCTCAAGAAACCA		
Nckx30C-F	AACCTCCATTCCAGACTT	59	140
Nckx30C-R	AGCCTCCATCTTCATTCA		
AChE-F	GTTGGAAACAGTTCGGAT	56	146
AChE-R	GGAGAAAAAGAAAGAAGGGG		
VDCCh-F	CCAAACTCAGGGATCACC	63	81
VDCCh-R	CCATCCTTCCATGCTCAC		
COX-R	ACTTGTAAGGATGAGGCTTTTG	56	137
COX-F	GCTGTGAAATACGCCCGA		

4.3. Validación de duplicaciones genómicas mediante qPCR

Con los datos obtenidos a partir de la técnica qPCR, se realizó el cálculo de “gain”, “loss” o “no change” para los 6 genes de interés del presente estudio en los 5 barrios analizados. Para esto, del total de ejemplares analizados en el laboratorio, se observó cuantos mostraban una ganancia, pérdidas o no presentaban cambios respecto al gen de referencia y los datos se expresaron en porcentajes. Para el barrio 2, se observó una ganancia en el 25% de individuos para citocromo c oxidasa, para el 75% restante, no se detectaron cambios. Para los genes de proteínas asociadas a resistencia farmacológica, intercambiadores sodio/potasio/calcio NCKX30C, canales de calcio dependientes de voltaje, acetilcolinesterasa y proteína cuticular se detectó un 12% de ganancia, el 88% restante no mostró cambios (Figura 11). En el barrio 3A se obtuvo una ganancia del 75% y un 25% de no cambio para el gen citocromo c oxidasa, para intercambiadores sodio/potasio/calcio NCKX30C hubo un 50% de ganancia y un 50% no registró cambio, en el último gen que se registró ganancia fue en proteínas asociadas a resistencia de múltiples fármacos con un 25%, en el 75% restante no hubo cambio y para los genes canales de calcio dependientes de voltaje, acetilcolinesterasa y proteína cuticular, el 100% no presenta cambio (Figura 12). En el barrio 9A, para citocromo c oxidasa, el 100% mostró ganancia, proteínas asociadas a resistencia de múltiples fármacos y acetilcolinesterasa registraron un 12% de ganancia y 88% sin cambios, intercambiadores sodio/potasio/calcio NCKX30, canales de calcio dependientes de voltaje y proteína cuticular presentan un no cambio del 100% (Figura 13). En el barrio 28B, el gen que mostró mayor ganancia fue citocromo c oxidasa, con un 87%, luego sigue intercambiadores sodio/potasio/calcio NCKX30C con una ganancia del 75%, acetilcolinesterasa tuvo una ganancia del 12% y los genes de proteínas asociadas a resistencia en múltiples fármacos, canales de calcio dependientes de voltaje y proteína cuticular tuvieron un 100% de no cambio (Figura 14). En el barrio 59, los genes que mostraron ganancia fueron intercambiadores sodio/potasio/calcio NCKX30C (50%), citocromo c oxidasa (25%), proteína cuticular (25%) y acetilcolinesterasa (12%), los

genes de proteínas asociadas a la resistencia farmacológica y canales de calcio dependientes de voltaje mostraron un 100% de no cambio (Figura 15).

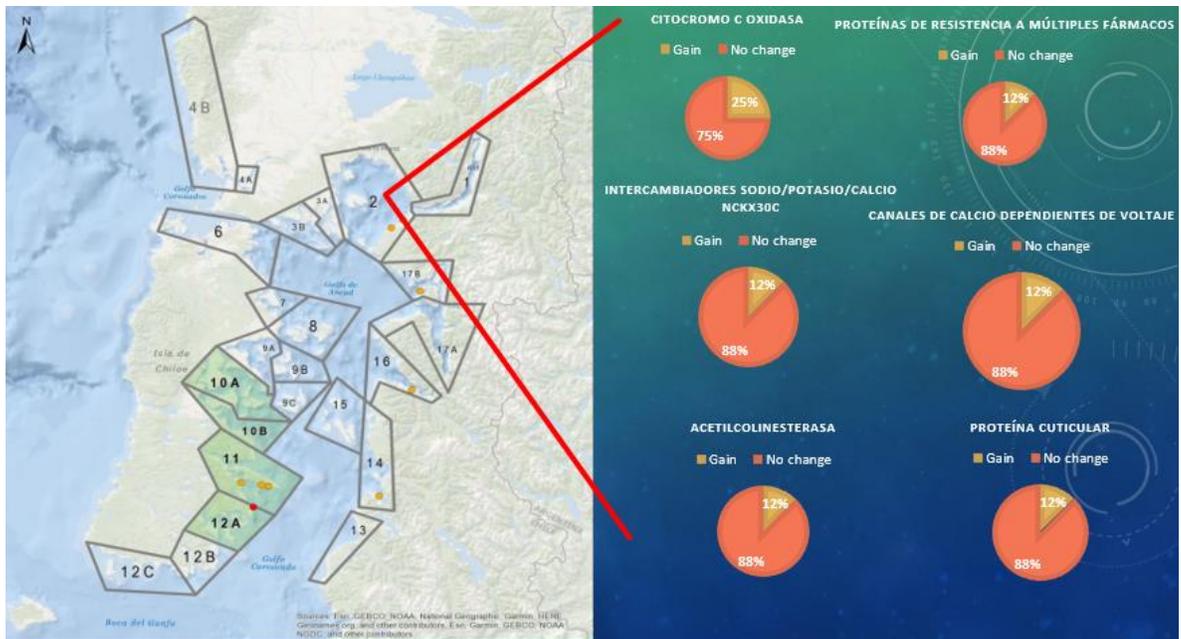


Figura 11: Gráfico con porcentajes de “gain” y “no change” por cada gen de interés en el barrio 2. Fuente: Elaboración propia.

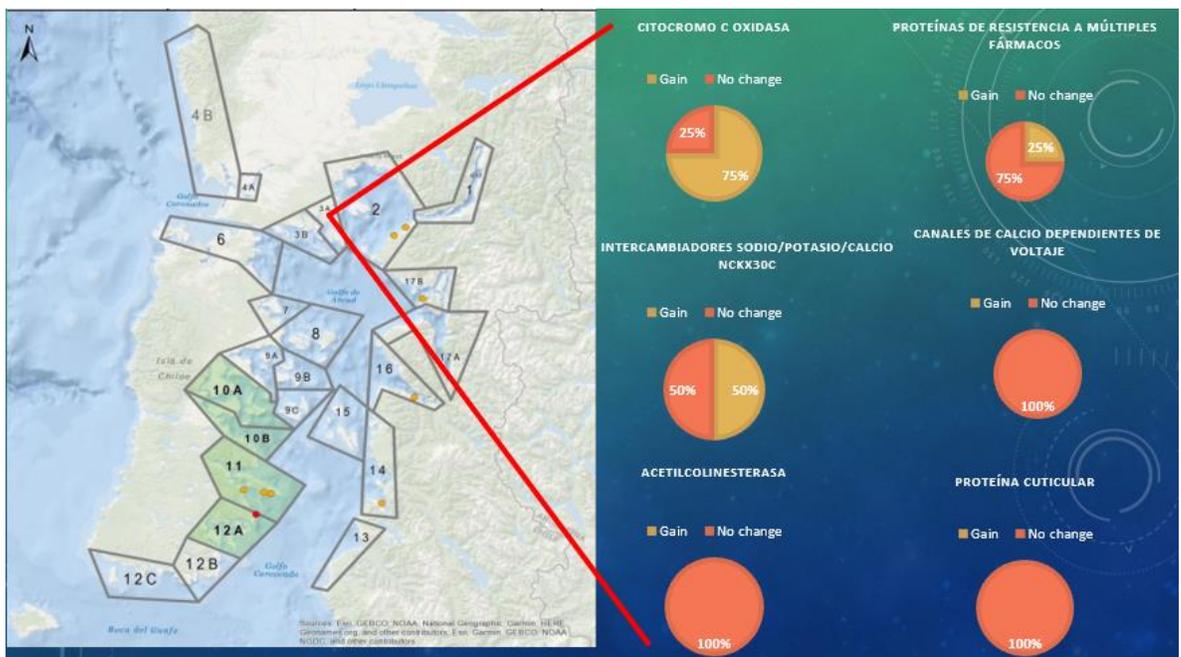


Figura 12: Gráfico con porcentajes de “gain” y “no change” por cada gen de interés en el barrio 3A. Fuente: Elaboración propia.

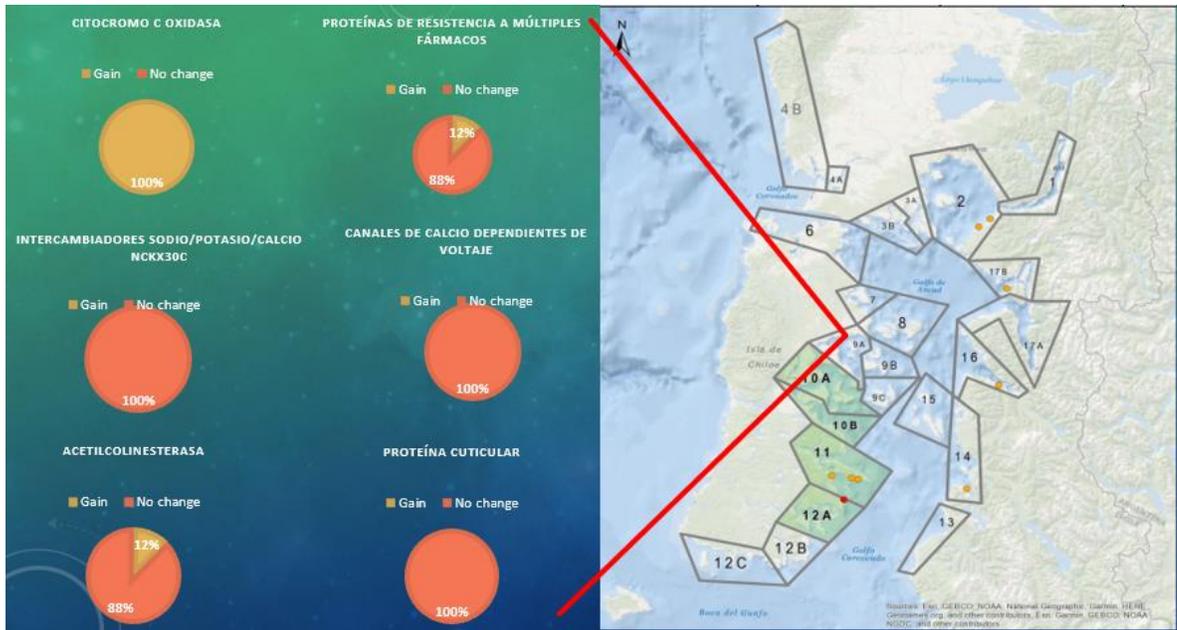


Figura 13: Gráfico con porcentajes de “gain” y “no change” por cada gen de interés en el barrio 9A. Fuente: Elaboración propia.

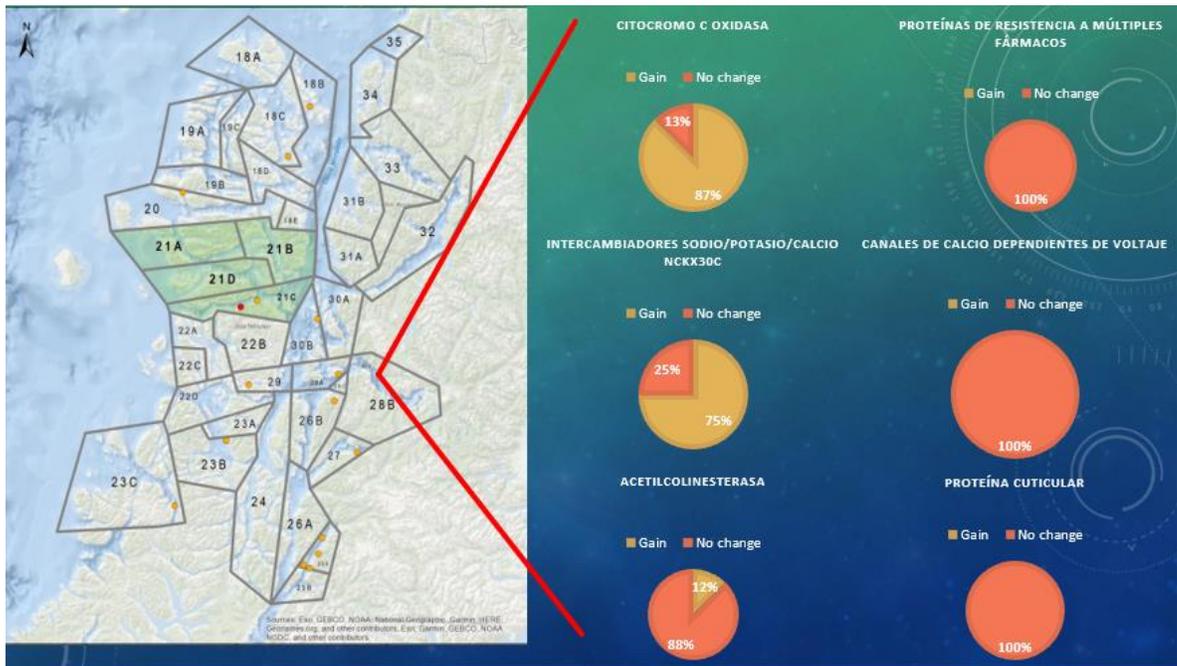


Figura 14: Gráfico con porcentajes de “gain” y “no change” por cada gen de interés en el barrio 28B. Fuente: Elaboración propia.

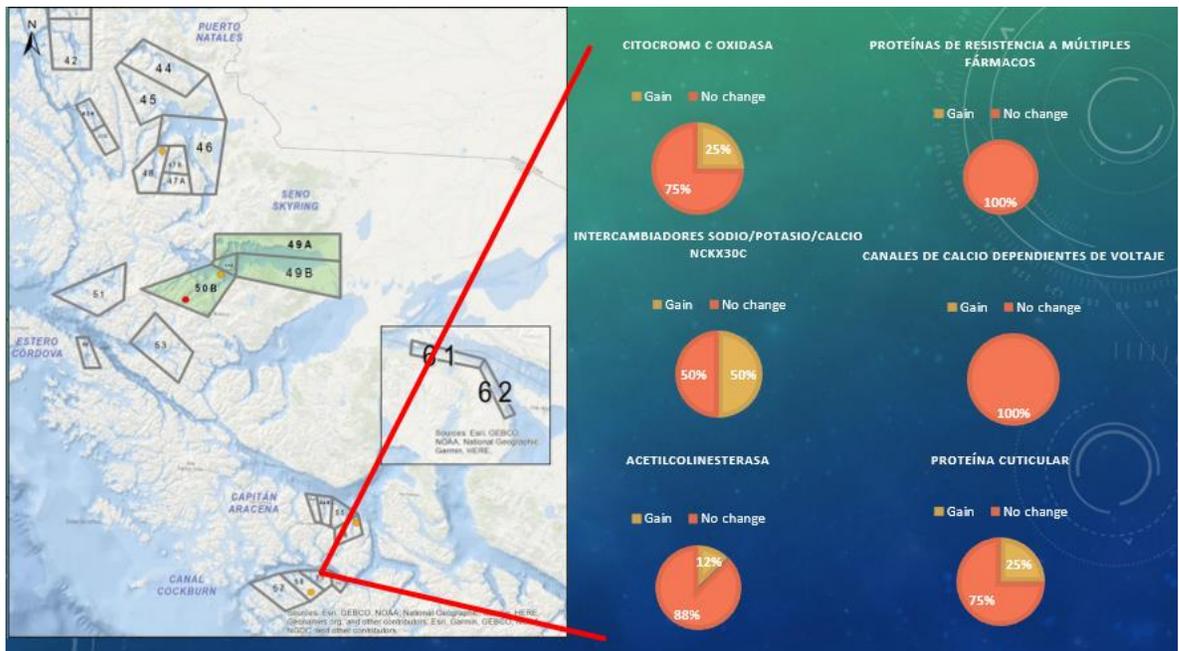


Figura 15: Gráfico con porcentajes de “gain” y “no change” por cada gen de interés en el barrio 59.
 Fuente: Elaboración propia.

5. Discusión

La resistencia farmacológica es un concepto que se conoce desde el año 1914 (Crow, 1957). En los análisis realizados a los ejemplares de *C. rogercresseyi* se encontraron genes asociados a los 3 mecanismos de resistencia farmacológica mencionados en el punto 2.5., aunque en los barrios se aprecian variantes en el número de copias diferentes entre sí. Esto permiten plantear que los mecanismos de resistencia predominantes varían de acuerdo al barrio, esto está influenciado por la exposición que tengan las poblaciones de *Caligus* a antiparasitarios y probablemente a factores importantes para el desarrollo de la especie, como son la temperatura y salinidad, ya que con diferentes condiciones en estos factores se genera una influencia que puede ser positiva o negativa para el desarrollo del parásito y para el número de huevos que producen. Además, se detectó la presencia de otros genes asociados a la resistencia farmacológica, los que en posteriores estudios podrían complementar con información que permita conocer si para esta especie hay algún mecanismo de resistencia farmacológica predominante o de qué manera influye cada uno de los 3 mecanismos de resistencia ante fármacos. Otro punto considerable, es la diferencia de CNVs en los barrios, siendo los barrios 28B y 59 los que presentan menor número, tanto en los CNVs en general como en los de genes directamente asociados a la resistencia contra fármacos. Como ya se mencionó, las condiciones ambientales son importantes para el piojo de mar, sin embargo, el factor fundamente cuando de resistencia farmacológica se trata, es la exposición continua a fármacos antiparasitarios.

En cuanto a los barrios mencionados, que son los que se ubican más al sur, los estudios de Fold Change nos muestran que, en comparación con el barrio de referencia, barrio 2, el citocromo c oxidasa es el gen que más se diferencia en cuanto a las duplicaciones, siendo cerca de 20 veces más las variantes de copias que hay en el barrio 28B contra el barrio de referencia. Para el barrio 59 las variaciones más grandes con el gen de referencia se dan en los intercambiadores sodio/potasio/calcio NCKX30C, teniendo duplicaciones de un poco de 2 veces más que en el barrio referencial. Esto nos permite pensar que, para el barrio 28B hay una estructuración genómica poblacional más diferencial contra el barrio 2 debido a la mayor presencia de duplicaciones genómicas de

citocromo c oxidasa, y que en el barrio 59 el mecanismo de resistencia predominante contra el barrio referencial sería mediante mutaciones puntuales en proteínas target de fármacos. Los cálculos realizados respecto al barrio 9A y 3A, muestran que las duplicaciones más predominantes contra el barrio 2, son en el gen de citocromo c oxidasa, teniendo niveles de variaciones a favor de 45 y 5 veces más respectivamente. Lo que indica que los niveles de variación en cuanto a la estructuración genómica son muy considerables, sobre todo en el barrio 9A, que muestra un nivel de duplicaciones tremendamente elevado para el citocromo c oxidasa, que es un gen indicador de diferenciación en la estructura genética, mostrando un preocupante desarrollo en las variantes de este gen en dicho barrio. Alcanzar variaciones de este tipo es algo muy perjudicial, ya que muestra que la población de *Caligus* tiene un alto grado de diferenciación y resistencia, muy probablemente por la exposición desmedida a antiparasitarios.

Por otra parte, en el barrio 2, en comparación con el genoma usado de referencia, en este caso la versión pública del genoma de *C. rogercresseyi*, mostró que el gen con más variación en el número de copias fue el gen acetilcolinesterasa, 1.27 veces más que contra su referencia, lo cual indica que las mutaciones puntuales en proteínas target sería el mecanismo de desarrollo predominante realizando la comparación respectiva. Como se mencionó, AChE es target para fármacos de la familia de los organofosforados en los cuales encontramos azametifos. AChE muestra más duplicaciones en el genoma de este barrio contra la referencia, lo que indica en este caso, que el sitio de unión de azametifos se ve afectado produciendo que el fármaco tenga una eficacia menor en este barrio. Canales de calcio dependientes de voltaje e intercambiadores sodio/potasio/calcio NKX30C son target de piretroides como la cipermetrina y deltametrina, en los barrios se encontró mayor presencia de duplicaciones del segundo gen mencionado que del primero, con valores de Fold Change positivos en todos los barrios excepto el barrio 9A, mostrando que el mecanismo de resistencia mediante mutaciones puntuales también está afectando la susceptibilidad del piojo de mar frente a antiparasitarios de la familia de los piretroides.

Este es un claro ejemplo de por qué es importante considerar los estudios genómicos antes de llevar a cabo tratamientos de control, ya que, sin considerar la información respecto a la variación en el número de copias de genes relacionados con la resistencia farmacológica, solo se terminará potenciando más el desarrollo ante cierto tratamiento. Esto generará un gran conflicto, teniendo parásitos muy resistentes, lo que se traduce en perjuicios para la producción de salmones, dañando a sus huéspedes e involucrando más gastos económicos para mantener cierto control sobre el piojo de mar.

En cuanto a la validación de duplicaciones se condice con el trabajo de los gráficos de Fold Change, mostrando porcentajes de ganancia mayores en los genes ya mencionados para cada barrio, con excepción del barrio 2, en donde el trabajo realizado mediante qPCR mostró que el porcentaje de ganancia mayor es para citocromo c oxidasa (25%), mostrando que hay una ganancia en cuanto a las duplicaciones mayor para este gen que como se mencionó anteriormente, es un indicador de cambios estructurales genómicos. También los análisis muestran porcentajes de ganancia iguales para todos los demás genes con un 12%, esto permite pensar que los 3 mecanismos de resistencia farmacológica están activos en la población de este barrio.

El método de resistencia a la penetración de fármacos, según los datos analizados, sería el mecanismo de resistencia menos observable en los barrios estudiados, sin embargo, es un mecanismo a tener en consideración, ya que el trabajo de validación de duplicaciones mostró que hay una ganancia en cuanto a la variación en el número de copias en los barrios 2 y 59, de un 12% y 25% respectivamente para la proteína cuticular. Esto nos indica que la resistencia a la penetración farmacológica mediante el fortalecimiento cuticular es un mecanismo presente, y tal vez, analizando detalladamente los demás genes que muestran una variación en el número de copias asociados a la resistencia farmacológica en *Caligus*, se podría dictaminar si es un mecanismo que se está potenciando o si muestra un nivel de relevancia en la supervivencia del piojo de mar más importante de lo que se cree actualmente.

Los estudios genómicos en *C. rogercresseyi* permiten evaluar la susceptibilidad de la especie ante tratamientos farmacológicos. Es importante realizar estudios genómicos en

los diferentes barrios ya que no todas las poblaciones de piojo de mar tienen la misma sensibilidad ante fármacos antiparasitarios. Comprender la estructura genómica en *Caligus* y las variaciones que sufre es fundamental para poder tomar medidas en cuanto al control del parásito. Pasar por alto la importancia en las duplicaciones de genes asociados a la resistencia o suministrar fármacos sin considerar esto, culminará potenciando más la resistencia farmacológica del piojo de mar, afectando a la industria en cuanto al gasto económico, deteriorando la calidad de vida de los salmónidos y dañando la sustentabilidad de la industria.

Estudios a considerar son el análisis de la presencia de duplicaciones de otros genes asociados a resistencia farmacológica y el estudio genómico de poblaciones provenientes de otros barrios de la zona sur de Chile para comprender y contribuir con el conocimiento a nivel genómico del piojo de mar.

6. Conclusión

Los resultados obtenidos muestran la presencia de CNVs en los barrios estudiados. Entre estos CNVs hay variaciones en el número de copias de genes asociados a la resistencia farmacológica en *C. rogercresseyi* para cada uno de los barrios, sugiriendo que hay resistencia a fármacos. La presencia de duplicaciones de todos los genes estudiados indica que los 3 mecanismos de resistencia están presentes en esta especie, siendo el más predominante el de mutaciones puntuales, ya que hay presencia de duplicaciones de intercambiadores sodio/potasio/calcio en 4 de los 5 barrios estudiados. Las proteínas de resistencia a múltiples fármacos indican que también habría resistencia farmacológica mediante detoxificación y la presencia de variantes en el número de copias de proteína cuticular es un indicador que también hay fortalecimiento de la cutícula que afecta con la penetración del fármaco. En cuanto a las duplicaciones de citocromo c oxidasa, fue el único gen que mostró ganancia en todos los barrios.

7. Bibliografía

- Alkan, C., Coe, B. P., & Eichler, E. E. (2011). Genome structural variation discovery and genotyping. *Nature reviews genetics*, 12(5), 363-376.
- Altimimi, H. F., & Schnetkamp, P. P. (2007). Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchangers (NCKX): functional properties and physiological roles. *Channels*, 1(2), 62-69.
- Alvarez, R., Araos, F., Diestre, F., Riquelme, W., Brañas, F., Torrijos, C., Cursach, J., & Stock, M. (2022). ¿ Es sustentable la salmonicultura en Chile? Enmarcando narrativas en disputa sobre la actividad salmonera en la Patagonia. *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, 59.
- Amtmann, C. A., & Blanco, G. (2001). Efectos de la salmonicultura en las economías campesinas de la Región de Los Lagos, Chile. *Revista Austral de Ciencias Sociales*(5), 93-106.
- Arriagada, G., Figueroa, J., Marín, S. L., Arriagada, A. M., Lara, M., & Gallardo-Escárate, C. (2020). First report of the reduction in treatment efficacy of the organophosphate azamethiphos against the sea lice *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000). *Aquaculture Research*, 51(1), 436-439.
- Bass, C., & Field, L. M. (2011). Gene amplification and insecticide resistance. *Pest management science*, 67(8), 886-890.
- Blackhall, W. J., Liu, H. Y., Xu, M., Prichard, R. K., & Beech, R. N. (1998). Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin-and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Molecular and biochemical parasitology*, 95(2), 193-201.
- Boxaspen, K. (2006). A review of the biology and genetics of sea lice. *ICES Journal of marine Science*, 63(7), 1304-1316.
- Brattsten, L. (1990). Resistance mechanisms to carbamate and organophosphate insecticides. In. ACS Publications.
- Bravo, S. (2010a). "Evaluación epidemiológica de *Caligus rogercresseyi* en seis zonas de la Décima Región" UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE].
- Bravo, S. (2010b). The reproductive output of sea lice *Caligus rogercresseyi* under controlled conditions. *Experimental parasitology*, 125(1), 51-54.
- Bravo, S. (2013). Situación y condiciones del cultivo de salmónidos en Chile. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola*, 7(7).
- Bravo, S., Pozo, V., & Silva, M. T. (2015). Evaluación de la efectividad del tratamiento con agua dulce para el control del piojo de mar *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000. *Latin american journal of aquatic research*, 43(2), 322-328.
- Bravo, S., Sevatdal, S., & Horsberg, T. E. (2008). Sensitivity assessment of *Caligus rogercresseyi* to emamectin benzoate in Chile. *Aquaculture*, 282(1-4), 7-12.
- Brown, A. W. A. (1958). Insecticide resistance in arthropods. *Insecticide resistance in arthropods*.
- Buschmann, A., & Pizarro, R. (2001). El costo ambiental de la salmonicultura en Chile. *Análisis de Políticas Públicas*, 5, 1-8.

- Cárdenas, O., Silva, E., & Ortiz, J. E. (2010). Uso de plaguicidas inhibidores de acetilcolinesterasa en once entidades territoriales de salud en Colombia, 2002-2005. *Biomédica*, 30(1), 95-106.
- Cerda, E. (2019). Productividad y competitividad en la industria del salmón en Chile. *CIEPLAN. Publicacion especial Santiago Chile, 2019*, 108.
- Charles, J.-P. (2010). The regulation of expression of insect cuticle protein genes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 40(3), 205-213.
- Chávez-Mardones, J., Valenzuela-Muños, V., & Gallardo-Escárate, C. (2016). In silico transcriptome analysis of cuticle-related genes associated with delousing drug responses in the sea louse *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, 450, 123-135.
- Chen, J. J., Sun, Y. L., Tiwari, A. K., Xiao, Z. J., Sodani, K., Yang, D. H., Vispute, S. G., Jiang, W. Q., Chen, S. D., & Chen, Z. S. (2012). PDE 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, reverse multidrug resistance by inhibiting the efflux function of multidrug resistance protein 7 (ATP-binding Cassette C 10) transporter. *Cancer science*, 103(8), 1531-1537.
- Collier, L. M., & Pinn, E. H. (1998). An assessment of the acute impact of the sea lice treatment ivermectin on a benthic community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 230(1), 131-147.
- Costello, M. (2009). The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of fish diseases*, 32(1), 115.
- Crow, J. F. (1957). Genetics of insect resistance to chemicals. *Annual review of entomology*, 2(1), 227-246.
- Denholm, I., Devine, G. J., Horsberg, T. E., Sevatdal, S., Fallang, A., Nolan, D. V., & Powell, R. (2002). Analysis and management of resistance to chemotherapeutants in salmon lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 58(6), 528-536.
- Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2014). The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, 45, 89-110.
- Dulbecco, A. B., Juárez, M. P., & Girotti, J. R. (2019). Rol de los citocromos P450 (clan CYP4) del integumento de *Triatoma infestans* en la resistencia a deltametrina. *Investigación Joven*, 6(Especial), 118-118.
- Essandoh, J., Yawson, A. E., & Weetman, D. (2013). Acetylcholinesterase (Ace-1) target site mutation 119S is strongly diagnostic of carbamate and organophosphate resistance in *Anopheles gambiae* ss and *Anopheles coluzzii* across southern Ghana. *Malaria journal*, 12(1), 1-10.
- Fernández-Quintero, M. L., El Ghaleb, Y., Tuluc, P., Campiglio, M., Liedl, K. R., & Flucher, B. E. (2021). Structural determinants of voltage-gating properties in calcium channels. *Elife*, 10, e64087.
- Fernández, D. G., Mancipe, L. C., & Fernández, D. C. (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista Med*, 18(1), 84-92.
- Flores Soto, M., & Segura Torres, J. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci*, 6(4), 315-326.
- Fonseca, I., & Quiñonez, M. L. (2005). Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. *Revista Colombiana de Entomología*, 31(2), 107-115.

- Frazer, L. N., Morton, A., & Krkošek, M. (2012). Critical thresholds in sea lice epidemics: evidence, sensitivity and subcritical estimation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1735), 1950-1958.
- Gallardo-Escárate, C., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Valenzuela-Miranda, D., Gonçalves, A. T., Escobar-Sepulveda, H., Liachko, I., Nelson, B., Roberts, S., & Warren, W. (2021). Chromosome-scale genome assembly of the sea louse *Caligus rogercresseyi* by SMRT sequencing and Hi-C analysis. *Scientific data*, 8(1), 1-12.
- Gallardo, C. M. (2018). Análisis Técnico Económico de Problemática CALIGUS Post Tratamiento de Azametifos en Centro de Cultivo de Salmónidos "JORGE", Región de Aysén.
- Gamarro, F., & Castanys, S. (1997). Mecanismo molecular de resistencia a fármacos en parásitos. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 38(2-3), 137-149.
- García, M. E. F. (2013). Resistencia a insecticidas en *Bemisia tabaci* (Gennadius): nivel de resistencia, resistencias cruzadas y mecanismos implicados. *Master disertation, Universidad Politécnica de Cartagena*.
- Gomez, V. J. M. (2016). Evaluación del efecto de piretroides y organofosforados sobre la tasa de fijación del estado copepodito *Caligus rogercresseyi* (Boxshall y Bravo, 2000)(Copepoda: Caligidae) y su sobrevivencia al estado adulto en condiciones experimentales.
- González, L., & Carvajal, J. (2003). Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220(1-4), 101-117.
- Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J., Batt, A., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., & Gourmelon, P. (2006). Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Annales de biologie clinique*,
- Hamilton-West, C., Arriagada, G., Yatabe, T., Valdés, P., Hervé-Claude, L. P., & Urcelay, S. (2012). Epidemiological description of the sea lice (*Caligus rogercresseyi*) situation in southern Chile in August 2007. *Preventive veterinary medicine*, 104(3-4), 341-345.
- Hassan, M. T., & Lytton, J. (2020). Potassium-dependent sodium-calcium exchanger (NCKX) isoforms and neuronal function. *Cell Calcium*, 86, 102135.
- Haug-Collet, K., Pearson, B., Webel, R., Szerencsei, R., Winkfein, R., Schnetkamp, P., & Colley, N. (1999). Cloning and characterization of a potassium-dependent sodium/calcium exchanger in *Drosophila*. *The Journal of cell biology*, 147(3), 659-670.
- Haya, K., Burridge, L., Davies, I., & Ervik, A. (2005). A review and assessment of environmental risk of chemicals used for the treatment of sea lice infestations of cultured salmon. *Environmental effects of marine finfish aquaculture*, 305-340.
- Helgesen, K., Bravo, S., Sevatdal, S., Mendoza, J., & Horsberg, T. (2014). Deltamethrin resistance in the sea louse *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo) in Chile: bioassay results and usage data for antiparasitic agents with references to Norwegian conditions. *Journal of fish diseases*, 37(10), 877-890.
- Hofmann, F., Lacinova, L., & Klugbauer, N. (1999). Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 139*, 33-87.
- Horiuchi, T., Horiuchi, S., & Novick, A. (1963). The genetic basis of hyper-synthesis of β -galactosidase. *Genetics*, 48(2), 157.
- Izaguirre, V., & Zavaleta, A. (1998). Canales de calcio voltajes dependientes. *Ciencia e Investigación*, 1(1), 49-61.

- Jimenez, D. F., Ibarra, R., Artacho, P., Primus, A. E., & Tello, A. (2018). Prolonging Azamethiphos bath increases the effectiveness of field treatments against *Caligus rogercresseyi* in Atlantic salmon in Chile (*Salmo salar*). *Aquaculture*, *493*, 186-191.
- Jones, M., Sommerville, C., & Wootten, R. (1992). Reduced sensitivity of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*, to the organophosphate dichlorvos. *Journal of fish diseases*, *15*(2), 197-202.
- Kahl, M., Kleisinger, G., Behr, E., De Carli, R., Paraná, A. C. I. E., & Privada, P. A. (2015). Eficacia y persistencia de insecticidas para el control de orugas defoliadoras en soja. *SERIE EXTENSIN N 76*, 59.
- Kalajdzic, P., Markaki, M., Oehler, S., & Savakis, C. (2013). Imidacloprid does not induce Cyp genes involved in insecticide resistance of a mutant *Drosophila melanogaster* line. *Food and chemical toxicology*, *60*, 355-359.
- Kruse, A. C., Hu, J., Pan, A. C., Arlow, D. H., Rosenbaum, D. M., Rosemond, E., Green, H. F., Liu, T., Chae, P. S., & Dror, R. O. (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, *482*(7386), 552-556.
- Lautier, D., Canitrot, Y., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (1996). Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochemical pharmacology*, *52*(7), 967-977.
- León, H. R. P. (2016). DISTRIBUCIÓN TISULAR DE PROTEÍNAS DE RESISTENCIA MLTIPLE A FÁRMACOS EN CALIGUS ROGERCRESSEYI.
- Li, H. (2016). Minimap and miniasm: fast mapping and de novo assembly for noisy long sequences. *Bioinformatics*, *32*(14), 2103-2110.
- Li, J., Lupat, R., Amarasinghe, K. C., Thompson, E. R., Doyle, M. A., Ryland, G. L., Tothill, R. W., Halgamuge, S. K., Campbell, I. G., & Gorringer, K. L. (2012). CONTRA: copy number analysis for targeted resequencing. *Bioinformatics*, *28*(10), 1307-1313.
- Lin, Y., Jin, T., Zeng, L., & Lu, Y. (2012). Cuticular penetration of β -cypermethrin in insecticide-susceptible and resistant strains of *Bactrocera dorsalis*. *Pesticide biochemistry and physiology*, *103*(3), 189-193.
- Lozano Jiménez, Y. Y., & Sánchez Mora, R. M. (2020). Canales de calcio como blanco de interés farmacológico. *Nova*, *18*(34), 57-76.
- Marinkovic, G. A. P. (2012). *Diseño, construcción y evaluación de un sistema de incubación de sacos ovígeros y cultivo larval de Caligus rogercresseyi y Lepeophtheirus mugiloidis* PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO].
- Martabid, F. N. K. (2016). *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000) en cuatro centros de cultivo de la X Región".
- Montero, C. (2004). *Formación y desarrollo de un cluster globalizado: el caso de la industria del salmón en Chile*. Cepal.
- Narahashi, T. (1986). Nerve membrane ionic channels as the target of toxicants. Toxic Interfaces of Neurones, Smoke and Genes: Proceeding of the European Society of Toxicology Meeting Held in Kuopio, June 16–19, 1985,
- Orellana, M., & Guajardo, V. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile*, *132*(1), 85-94.
- Pérez Albaladejo, E. (2017). Uso de líneas celulares como modelos in vitro para la evaluación de toxicidad y mecanismos de acción de contaminantes ambientales.
- Pino-Marambio, J., Mordue, A., Birkett, M., Carvajal, J., Asencio, G., Mellado, A., & Quiroz, A. (2007). Behavioural studies of host, non-host and mate location by the Sea Louse, *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae). *Aquaculture*, *271*(1-4), 70-76.

- Quiñones, L., Rosero, M., Roco, Á., Moreno, I., Sasso, J., Varela, N., Cáceres, D., & Saavedra, I. (2008). Papel de las enzimas citocromo p450 en el metabolismo de fármacos antineoplásicos: Situación actual y perspectivas terapéuticas. *Revista médica de Chile*, 136(10), 1327-1335.
- Riquelme, R., Olivares-Ferretti, P., Fonseca-Salamanca, F., & Parodi, J. (2017). Deep water, an effect on the temperature for the management of caligidosis in the atlantic salmon (Salmon Salar)/Aguas profundas, un efecto en la temperatura para el manejo de caligidosis en el salmon del atlantico (Salmo Salar). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(1), 33-43.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Hodgkinson, J. E., & Trees, A. J. (2012). Resistencia a los acaricidas en Rhipicephalus (Boophilus) microplus: situación actual y mecanismos de resistencia. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3, 9-24.
- Rodríguez Gutiérrez, J. L. (2018). Distribución y efectos del piretroide ciflutrin sobre el sistema nervioso central.
- Rohde, K. (2005). *Marine parasitology*. Csiro publishing.
- Sáez-Vera, C., Núñez-Acuña, G., & Gallardo-Escárate, C. (2022). Sensitivity assessment to azamethiphos by time-to-response bioassay and biomarkers in the sea louse Caligus rogercresseyi. *Aquaculture*, 546, 737340.
- Sánchez-Chávez, G., & Salceda, R. (2008). Enzimas Polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), 44-51.
- Scherer, S. W., Lee, C., Birney, E., Altshuler, D. M., Eichler, E. E., Carter, N. P., Hurles, M. E., & Feuk, L. (2007). Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nature genetics*, 39(Suppl 7), S7-S15.
- Serrano-Cumplido, A., Garcia, A. R., Segura-Fragoso, A., Olmo-Quintana, V., Pérez, R. M., Barquilla-García, A., & Morán-Bayón, A. (2021). Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) de PCR en la COVID-19. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 47(5), 337-341.
- Smith, P., Larenas, J., Vera, P., Contreras, J., Venegas, C., Rojas, M. E., & Guajardo, A. (2001). Principales enfermedades de los peces salmonídeos cultivados en Chile. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 21(2).
- Stormansan, J. R. Y. (2018). Desarrollo sustentable y evolución de la salmonicultura chilena. Análisis desde una óptica normativa-institucional. *Revista Debates*, 12(2), 57.
- Sturm, A., Cunningham, P., & Dean, M. (2009). The ABC transporter gene family of Daphnia pulex. *BMC genomics*, 10(1), 1-18.
- Vargas-Chacoff, L., Muñoz, J., Hawes, C., Oyarzún, R., Pontigo, J., Saravia, J., González, M., Morera, F., Labbé, B., & Bertrán, C. (2016). Atlantic salmon (Salmo salar) and Coho salmon (Oncorhynchus kisutch) display differential metabolic changes in response to infestation by the ectoparasite Caligus rogercresseyi. *Aquaculture*, 464, 469-479.
- Velíšek, J., Jurčíková, J., Dobšíková, R., Svobodova, Z., Piačková, V., Machova, J., & Novotný, L. (2007). Effects of deltamethrin on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(3), 297-301.
- Walsh, T. K., Lyndon, A. R., & Jamieson, D. J. (2007). Identification of cDNAs induced by the organophosphate trichlorophon in the parasitic copepod Lepeophtheirus salmonis (Copepoda; Caligidae). *Pesticide biochemistry and physiology*, 88(1), 26-30.
- Weetman, D., Djogbenou, L. S., & Lucas, E. (2018). Copy number variation (CNV) and insecticide resistance in mosquitoes: evolving knowledge or an evolving problem? *Current opinion in insect science*, 27, 82-88.

- Yadav, A., Singh, P., & Shrivastava, V. (2010). Pyrethroid resistance in Chagas disease vectors: The case of *Triatoma infestans* cuticle. *A Biannual Newsletter of the Center for Integrated Plant Systems (CIPS) in Cooperation with the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) and the Western Regional Coordinating Committee (WRCC-60)*, 19(2), 59.
- Zagmutt-Vergara, F. J., Carpenter, T. E., Farver, T. B., & Hedrick, R. P. (2005). Spatial and temporal variations in sea lice (Copepoda: Caligidae) infestations of three salmonid species farmed in net pens in southern Chile. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(2), 163-173.