



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

**IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE GENES  
ASOCIADOS AL SISTEMA PROFENOLOXIDASA DE  
*CALIGUS ROGERCRESSEYI* Y SU RESPUESTA  
TRANSCRIPTÓMICA FRENTE A LOS ANTIPARASITARIOS  
DELTAMETRINA, CIPERMETRINA Y AZAMETIFOS.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

FREDY OMAR VERA BIZAMA

CONCEPCIÓN-CHILE

2017

Profesor Guía: Cristian Gallardo Escárte

Profesor Co- guía: Juan Valdes

Dpto. de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor tutor

---

Dr. Cristian Gallardo Escárate  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Profesor Co-tutor

---

Dr. Juan Antonio Valdés  
Universidad Andrés Bello

Comisión Evaluadora:

---

Dr. Sebastián Boltaña  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dra. Amparo Uribe  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Director de Programa

---

Dra. Violeta Morín  
Facultad de Ciencias Biológicas

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo brindado y financiamiento para el desarrollo de esta tesis el cual se realizó en base al proyecto FONDAP (15110027) denominado “Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR)”. Además agradezco a la empresa Marine Harvest Chile (MHCh) por facilitar sus instalaciones para la realización de los bioensayos con *C. rogercresseyi*.

También agradezco al apoyo entregado durante mi formación como profesional, entre los cuales se encuentra el Dr. Cristian Gallardo, el Dr. Sebastián Boltaña y todo el equipo que conforma el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola (LBGA-INCAR).

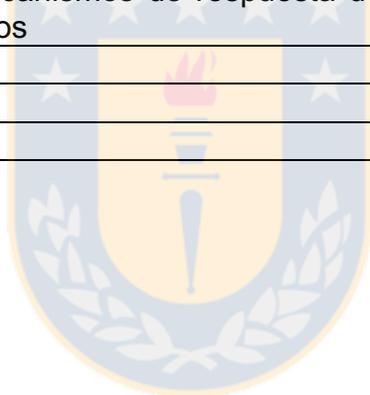
Para finalizar agradezco a mis padres, hermano y amigos que fueron parte importante en el desarrollo de esta etapa académica.



## TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
Índice de figuras	VI
Índice de tablas	VIII
Resumen	IX
Abstract	XI
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Sistema profenoloxidasa	1
1.1.1 Respuesta inmune	1
1.1.2 Síntesis de cutícula	3
1.1.3 Pesticidas	7
1.2 Procesos moleculares asociados a la respuesta a fármacos	8
1.2.1 Sistema antioxidante	8
1.2.2 Transportadores ABC	10
1.2.3 Síntesis Cutícula	12
1.3 <i>Caligus rogercresseyi</i> : modelo de estudio animal	14
1.3.1 Tratamientos antiparasitarios en Chile	15
1.3.2 Efectividad de tratamientos	16
1.3.3 Efectividad de tratamientos en Chile	18
1.4 Secuenciación de última generación	18
1.5 Justificación del estudio	20
<b>HIPOTESIS DE TRABAJO</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
2.1 Identificación de genes asociados sistema profenoloxidasa en <i>C. rogercresseyi</i>	23
2.1.1 Condiciones de laboratorio para el cultivo de piojo de mar	23
2.1.2 Identificación in silico de genes asociados sistema profenoloxidasa en <i>C. rogercresseyi</i>	23
2.1.3 Análisis RNA-seq	24
2.1.4 Diseño y estandarización de primers	24
2.2 Análisis bioensayos	25
2.2.1 Obtención de muestras y bioensayos con antiparasitarios	25
2.2.2 Secuenciación masiva de transcriptoma de <i>C. rogercresseyi</i>	26
2.2.3 Análisis RNA-seq <i>C. rogercresseyi</i> provenientes de bioensayos	26
2.2.4 Identificación de SNP	27
2.2.5 Análisis de RNA-seq de <i>C. rogercresseyi</i> provenientes de distintas regiones expuestos a azametifos y deltametrina	27
2.3 Análisis de expresión	28
2.3.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	28
2.3.2 Validación por RT-qPCR	28
2.3.3 Análisis Estadístico	29
<b>3. Resultados</b>	<b>30</b>
3.1 Evaluación de genes involucrados en el sistema profenoloxidasa en diferentes etapas de desarrollo de <i>C. rogercresseyi</i>	30

3.1.1. Caracterización <i>in silico</i> de genes asociados al sistema profenoloxidasa en <i>C. rogercresseyi</i> .	30
3.1.2 Validación por RT-qPCR	33
3.2 Análisis del sistema profenoloxidasa en <i>C. rogercresseyi</i> expuestos a antiparasitarios	37
3.2.1 Análisis de RNA-seq	37
3.2.2 Validación por RT-qPCR	39
3.2.3 Identificación de SNP	40
3.3 Análisis genes relacionados con antiparasitarios	41
3.3.1 Análisis de RNA-seq de <i>C. rogercresseyi</i> expuestos a antiparasitarios	41
3.3.2 Identificación de SNP	43
3.3.3 Validación por RT-qPCR	44
3.3.4 Análisis RNA-seq de <i>C. rogercresseyi</i> provenientes de diferentes zonas expuestos a azametifos y deltametrina	47
<b>4. Discusión</b>	<b>50</b>
4.1 Evaluación de genes involucrados en el sistema profenoloxidasa en diferentes etapas de desarrollo de <i>C. rogercresseyi</i>	50
4.2 Análisis de mecanismos de respuesta de <i>C. rogercresseyi</i> expuestos a antiparasitarios	54
<b>CONCLUSION</b>	<b>60</b>
<b>PROYECCIONES</b>	<b>61</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>62</b>



---

INDICE DE FIGURAS

---

N° Figura	Contenido	Página
1	Modelo general de la activación del Sistema profenoloxidasa en insectos.	2
2	Rol de fenoloxidasa en la síntesis de melanina.	4
3	Diagrama de la síntesis y actividad de PO granular, dopamina y dopa descarboxilasa (DDC) durante la melanización cuticular en <i>Manduca sexta</i> .	6
4	Heat map de genes relacionados con el sistema antioxidante evaluados en distintos estados de <i>C. rogercresseyi</i>	9
5	Heat map de los niveles de expresión génica de los transportadores ABC identificados en <i>C. rogercresseyi</i> , entre los controles adultos, los adultos expuestos a 3 ppb de azametifos y adultos expuestos a 2 ppb de deltametrina.	11
6	Heat map de los niveles de expresión génica de los genes de biosíntesis de cutícula en <i>C. rogercresseyi</i> , entre los controles adultos, los adultos expuestos a 3 ppb de azametifos y adultos expuestos a 2 ppb de deltametrina.	13
7	Ciclo de vida de <i>C. rogercresseyi</i>	14
8	Heat-map de los genes relacionados con el proPO en cinco etapas de desarrollo: nauplius I, nauplius II, copépodo, chalimus, macho y hembra del transcriptoma de <i>C. rogercresseyi</i> .	31
9	Esquema hipotético del sistema proPO de <i>C. rogercresseyi</i> .	32
10	Expresión temporal de <i>Masquerade</i> ( <i>Cr_Masquerade</i> ), homólogo de serina proteasa 1 ( <i>Cr_SPH1</i> ), homólogo de serina proteasa 2 ( <i>Cr_SPH2</i> ), <i>Serpin 3</i> ( <i>Cr_serpin 3</i> ), factor activador de profenoloxidasa I ( <i>Cr_PPAF I</i> ), factor activador de profenoloxidasa II ( <i>Cr_PPAF II</i> ), profenoloxidasa ( <i>Cr_PPO</i> ) y fenoloxidasa ( <i>Cr_PO</i> ) de diferentes etapas de desarrollo.	34-35
11	Análisis de componentes principales de genes de <i>C. rogercresseyi</i> expresados en diferentes etapas de desarrollo	36
12	Heat-map de los genes relacionados al sistema proPO en <i>C. rogercresseyi</i> expuestos a Azametifos, Deltametrina y Cipermetrina	38

---

13	Análisis de expresión de transcritos de <i>Masquerade</i> (Cr_Masquerade), <i>factor activador de profenoloxidasa II</i> (Cr_PPAF II), <i>profenoloxidasa</i> (Cr_PPO) y <i>fenoloxidasa</i> (Cr_PO) en <i>C. rogercresseyi</i> expuestos a Azametifos, Deltametrina y Cipermetrina	39
14	Heat-map de los genes involucrados en distintos procesos relacionados con la respuesta a antiparasitarios en <i>C. rogercresseyi</i> expuestos a Azametifos, Deltametrina y Cipermetrina.	42
15	Expresión de genes relacionados con distintos procesos moleculares asociados a antiparasitarios en <i>C. rogercresseyi</i> expuestos a azametifos, deltametrina y cipermetrina. Donde A) Genes blanco de azametifos y piretroides; B) Genes asociados a resistencia; C) Genes relacionados con procesos de detoxificación y D) Genes relacionados con la síntesis de quitina	45-46
16 A	Heat-map de los genes relacionados con distintos procesos moleculares en <i>C. rogercresseyi</i> expuestos a Azametifos provenientes de zonas con diferentes eficacias de tratamientos (XI Región (mayor eficacia) y X Región (menos eficacia)).	48
16 B	Heat-map de los genes relacionados con distintos procesos moleculares en <i>C. rogercresseyi</i> expuestos a Deltametrina provenientes de zonas con diferentes eficacias de tratamientos (XI Región (mayor eficacia) y X Región (menos eficacia)).	49

---

## INDICE DE TABLAS

---

N° Tabla	Contenido	Página
1	Resultados Blastx de los genes relacionados con el sistema proPO.	30
2	Listado de primers utilizados en este estudio.	33
3	Identificación de SNP no sinónimos en genes relacionados con el sistema profenoloxidasa en <i>C. rogercresseyi</i> .	40
4	Identificación de SNP no sinónimos en genes relacionados con procesos moleculares de respuesta frente a antiparasitarios en <i>C. rogercresseyi</i> .	43

---



## RESUMEN:

El sistema profenoloxidasa (proPO) es esencial para inducir la melanización. Este proceso implica la síntesis rápida de melanina en el sitio de infección y lesión. Además de su papel en la inmunidad innata, el sistema proPO también es importante en procesos como la esclerotización de la cutícula y por consiguiente posee un rol clave en la respuesta a pesticidas. Por estos antecedentes, sumado a una pérdida y a su vez diferencia en la efectividad de los tratamientos contra el copépodo ectoparásito *Caligus rogercresseyi*, que uno de los objetivos de este estudio fue el identificar genes del sistema proPO, además de su relación con la respuesta inmune en invertebrados, su rol en procesos como esclerotización de la cutícula y respuesta frente a pesticidas. De esta manera se evaluó la modulación de este sistema frente tres antiparasitarios: azametifos, deltametrina y cipermetrina. Información obtenida por secuenciación masiva de transcriptomas desde cuatro etapas de desarrollo de *C. rogercresseyi*, ocho transcritos involucrados en el sistema proPO fueron identificados. Los niveles de expresión fueron analizados mediante RNA-seq y posteriormente validados por RT-qPCR. Se observaron patrones similares de expresión génica para los transcritos anotados de *Factor activador de Profenoloxidasa I y II*, *homólogo de serina proteasa 1* y *masquerade* frente a cipermetrina y deltametrina. *Fenoloxidasa* presento un patrón similar frente a azametifos y cipermetrina (sobreexpresada), mientras que en *profenoloxidasa* presento una sobreexpresión frente a azametifos y deltametrina. Un segundo objetivo de esta investigación fue el identificar SNPs en genes previamente descritos que están relacionados con la respuesta transcriptómica de *C. rogercresseyi* frente a antiparasitarios, además de evaluar su expresión en respuesta a azametifos, deltametrina y cipermetrina. Por último se realizó una comparación mediante RNA-seq con datos de secuenciación de individuos provenientes de zonas donde se observó diferencias en la efectividad de estos antiparasitarios. Con respecto a la identificación de SNP, se lograron detectar 18 SNPs en total en la región codificante de las secuencias de los genes analizados. Entre los SNPs identificados se observaron 10 transversiones y 8

transiciones. Del análisis in silico y de RT-qPCR, se observó que el *transportador de Na-K* fue sobre expresado frente a azametifos y cipermetrina; *prohibitina 2* fue sobreexpresado frente a deltametrina y suprimido frente a los demás antiparasitarios. A cerca de *carboxilesterasa* este es sobre expresada frente a deltametrina y suprimida en su expresión frente a azametifos y cipermetrina, mientras que *P-gp* es sobre expresado frente a estos últimos antiparasitarios y suprimida frente a deltametrina. Por otra parte el *receptor neuronal de acetilcolina (nACh)* es suprimido frente a azametifos; *tropomiosina* es sobre expresado solo en respuesta a azametifos mismo patron observado en *transportador ABC\_C*; con respecto a *colágeno alfa* este es sobre expresado frente a los piretroides. Por otra parte *glutación-s-transferasa* es sobre expresado frente a los tres antiparasitarios; mientras que *quitinasa* es suprimido. Además, se observa que en el caso de *citocromo P-450*, este solo es sobre expresado frente a cipermetrina. Por último, *acetilcolinesterasa (AChE)* muestra una supresión frente a azametifos y cipermetrina. En relación al análisis transcriptómico de *C. rogercresseyi* provenientes de distintas regiones se observó que en el caso de los individuos desafiados con azametifos presentan variaciones en los niveles de expresión entre poblaciones. Con respecto al caso de los *C. rogercresseyi* desafiados con deltametrina, se observa que gran parte de los genes analizados presentan diferencias en los niveles de expresión entre regiones. Sin embargo *AChE* y *nACh*, genes blancos de azametifos no evidencian diferencias de expresión entre regiones. En resumen se sugiere que estas variaciones se explicarían debido a la presencia de los SNP presentes en los individuos provenientes de la XI región los cuales no están presentes en los individuos de la X región. Además, estos resultados proporcionan información para comprender las diferencias en efectividad de los tratamientos entre diferentes zonas, información con la cual se logra entregar nuevas aproximaciones para la comprensión de la resistencia farmacológica de este ectoparásito.

## ABSTRACT

The profenoloxidase system (porPO) is essential for inducing melanization. This process involves the rapid synthesis of melanin at the site of infection and injury. In addition to its role in innate immunity, the proPO system is also important in processes such as sclerotization of the cuticle and therefore plays a key role in the response to pesticides. For this background, in addition to a loss and in turn difference in the effectiveness of the treatments against the ectoparasite copepod *Caligus rogercresseyi*, one of the objectives of this study was to identify genes of the proPO system, in addition to its relation with the immune response in Invertebrates, their role in processes such as sclerotization of the cuticle and response to pesticides. In this way the modulation of this system was evaluated against three antiparasites: azamethiphos, deltamethrin and cypermethrin. Information obtained by massive sequencing of transcripts from four stages of development of *C. rogercresseyi*, eight transcripts involved in the proPO system were identified. Expression levels were analyzed by RNA-seq and later validated by RT-qPCR. Similar patterns of gene expression were noted for the annotated transcripts of *Profenoloxidase activating factor I* and *II*, *homologous to serine protease 1* and *masquerade* against cypermethrin and deltamethrin. *Phenoloxidase* presented a similar pattern against azamethiphos and cypermethrin (overexpressed), while in *profenoloxidase* there was an overexpression against azamethip and deltamethrin. A second objective of this research was to identify SNPs in previously described genes that are related to *C. rogercresseyi* transcriptomic response to antiparasitic agents, in addition to evaluating their expression in response to azamethiphos, deltamethrin and cypermethrin. Finally, a RNA-seq comparison was performed with sequencing data from individuals from areas where differences in the effectiveness of these antiparasitics were observed. With respect to SNP identification, we were able to detect 18 SNPs in total in the coding region of the analyzed gene sequences. Among the identified SNPs, 10 transversions and 8 transitions were observed. From the *in silico* analysis and from RT-qPCR, it was observed that the *Na-K transporter* was overexpressed against

azamethiphos and cypermethrin; *Prohibitin 2* was overexpressed against deltamethrin and suppressed against the other antiparasitics. In relation with *carboxylesterase* this is over expressed against deltamethrin and suppressed in its expression against azamethiphos and cypermethrin, while *P-gp* is overexpressed against the latter antiparasitic and suppressed against deltamethrin. On the other hand, the *neuronal acetylcholine receptor (nACh)* is suppressed against azamethiphos; *Tropomyosin* is over expressed only in response to azamethiphos same pattern observed on *ABC\_C transporter*; with respect to *alpha collagen* this is over expressed against pyrethroids. On the other hand *glutathione-s-transferase* is over expressed against the three antiparasitic; While *chitinase* is suppressed. In addition, it is observed that in the case of *cytochrome P-450*, this alone is over expressed against cypermethrin. Finally, *acetylcholinesterase (AChE)* shows a suppression against azamethiphos and cypermethrin. In relation to the transcriptomic analysis of *C. rogercresseyi* from different regions, it was observed that in the case of individuals challenged with azamethiphos, there are variations in expression levels between populations. With respect to the case of *C. rogercresseyi* challenged with deltamethrin, it is observed that a large part of the analyzed genes present differences in expression levels between regions. However *AChE* and *nACh*, while azamethiphos genes do not show differences in expression between regions. In summary, it is suggested that these variations would be explained by the presence of SNPs present in individuals from the XI region which are not present in the individuals of the X region. In addition, these results provide information to understand the differences in the effectiveness of treatments between different zones, information with which it is possible to provide new approaches for the understanding of the pharmacological resistance of this ectoparasite.

# 1. Introducción

## 1.1 Sistema profenoloxidasa

### 1.1.1 Respuesta inmune

La respuesta de organismos invertebrados frente a la presencia de patógenos se basa principalmente en la inmunidad innata, mediada por respuestas celulares y humorales. Una respuesta de tipo celular involucra el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), lo que permite la formación de nódulos, encapsulación y fagocitosis de los microorganismos patógenos (Jiravanichpaisal et al., 2006). Por otra parte, la respuesta basada en una defensa humoral involucra la producción y secreción de péptidos antimicrobianos (AMP) (Lavine and Strand, 2002), proteinasas e inhibidores, los cuales son asociados con procesos como coagulación y con la melanización en hemolinfa.

La función de la melanización es la reparación de tejidos, defensa frente a otros patógenos como hongos, agentes virales y bacterias gram positivas y gram negativas (Ayres and Schneider, 2008). Esta respuesta es conducida por una enzima llamada fenoloxidasa (PO) y está estrechamente regulada por la cascada de activación de profenoloxidasa (proPO), denominado también como sistema proPO (Amparyup et al., 2013). La activación de este sistema, posterior a la identificación microbiana, continúa con la activación secuencial de una cascada de serina proteasas, un *factor activador de profenoloxidasa (PPAF)*, para activar profenoloxidasa generándose posteriormente fenoloxidasa (Nappi and Christensen, 2005, Cerenius and Söderhäll, 2004). Esta última, una vez activada es capaz de oxidar fenoles a quinonas con el fin de producir melanina y otros intermediarios citotóxicos para encapsular aquellos microorganismos que no logran ser fagocitados y, posteriormente eliminar al patógeno (Nappi and Christensen, 2005, González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2012)(Fig. 1).

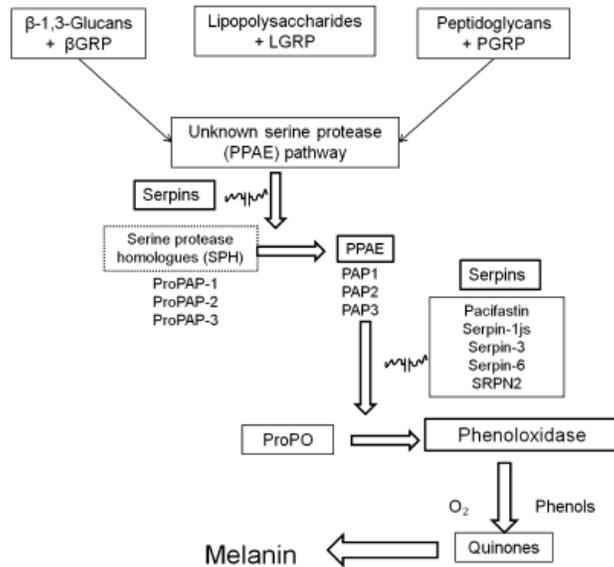


Figura 1. Modelo general de la activación del Sistema profenoloxidasa en insectos.  $\beta$ GRP: proteína de reconocimiento de  $\beta$  1,3- glucano, LGRP: proteína de reconocimiento de lipopolisacáridos, PRGP: proteína de reconocimiento de peptidoglucanos, ProPAP: proteína activadora de profenoloxidasa, PPAE: enzima activadora de profenoloxidasa, PAP: proteína activadora de serina proteasa, ProPO: fenoloxidasa. Fuente: González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2012.

La activación de este sistema, posterior a la identificación microbiana, continúa con la activación secuencial de una cascada de serina proteasas, un *factor activador de profenoloxidasa (PPAF)*, para activar profenoloxidasa generándose posteriormente fenoloxidasa (Nappi and Christensen, 2005, Cerenius and Söderhäll, 2004). Esta última, una vez activada es capaz de oxidar fenoles a quinonas con el fin de producir melanina y otros intermediarios citotóxicos para encapsular aquellos microorganismos que no logran ser fagocitados y, posteriormente eliminar al patógeno (Nappi and Christensen, 2005, González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2012)(Fig. 1).

En mosquitos adultos se ha observado que el proceso de melanización es un método efectivo para la muerte del parásito que genera malaria (Clayton et al., 2014). En moscas negras, se ha detectado la activación de PO 24 horas posterior a la infección por *Onchocerca* evidencia un aumento en el nivel de ARN mensajero (Hagen et al., 1997). Estudios con el mosquito *Anopheles gambiae* han mostrado

que encapsulan a los parásitos de la malaria después de que los parásitos penetren el epitelio del intestino medio (Collins et al., 1986). Otros estudios utilizando el mismo modelo demostraron la participación de PO en la encapsulación melanótica de oocinetes del parásito de la malaria la lámina basal del epitelio del intestino delgado y cerca de los parásitos encapsulados (Paskewitz et al., 1988, Paskewitz et al., 1989).

Durante el proceso de melanización son importantes tanto los productos intermedios (quinonas, difenoles, superóxido, peróxido de hidrógeno) como una de sus enzimas activadoras: fenoloxidasa (PO), siendo ésta última la responsable de la activación de este proceso en respuesta a varios patógenos en invertebrados (Cerenius and Söderhäll, 2004).

#### 1.1.2 Síntesis de cutícula

Además de su rol en la inmunidad innata, el sistema proPO también es importante en procesos de pigmentación y formación de cutícula, evento importante durante la morfogénesis de los insectos (Jang et al., 2011). La melanina es un pigmento formado por la oxidación de dopa o dopamina (Fig. 2). Para su formación, el primer paso es producir dopa a partir de tirosina, utilizando la enzima tirosina hidroxilasa (TH) (True et al., 1999, Futahashi and Fujiwara, 2005, Gorman et al., 2007) (Fig. 2).

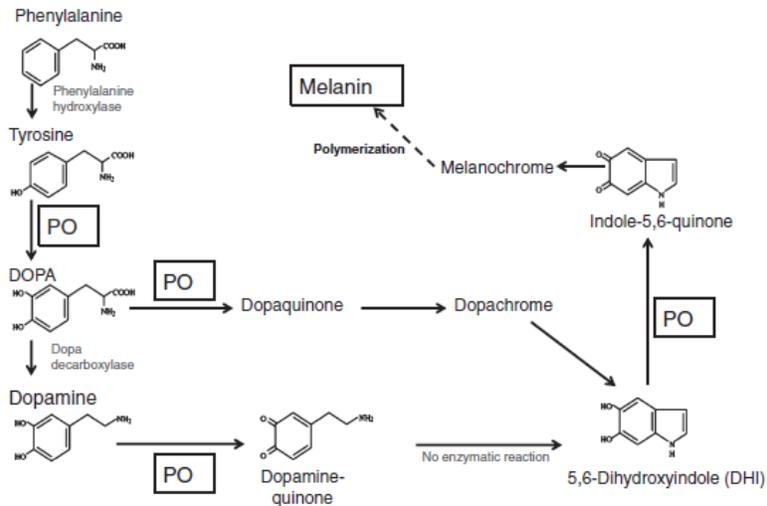
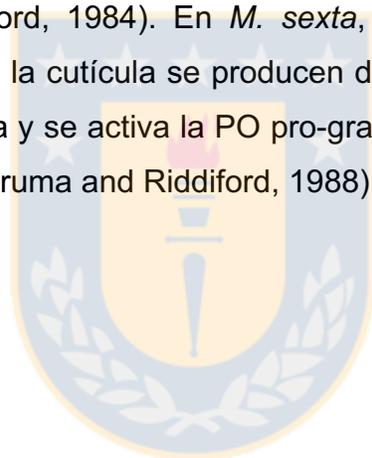


Figura 2. Rol de fenoloxidasas en la síntesis de melanina. La fenoloxidasas participa en la formación de DOPA a partir de tirosina (Tyr). PO también convierte DOPA en dopaquinona y 5,6-dihidroxiindol (DHI) en indol-5,6-quinona. Se observa la forma alternativa de obtener DHI de la dopamina, en la que también participan los PO. Fuente: González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2012.

Estudios en la mariposa *Papilio xuthus*, donde se utilizó un inhibidor competitivo de TH, 3-yodo-tirosina (3IT), se observó que la presencia de éste inhibidor inhibió la melanización larvaria cuticular, pero la adición de dopa rescató su inhibición in vitro, indicando que tirosina hidroxilasa es una enzima clave responsable del primer paso de melanización cuticular (Futahashi and Fujiwara, 2005, Futahashi and Fujiwara, 2007). La oxidación de dopa o dopamina requiere entonces fenoloxidasas (PO) y se piensa que las etapas subsiguientes son auto-oxidativas aunque también pueden estar implicadas estas enzimas (Figura 2). Se ha reportado que la cutícula *M. sexta* contiene una melanina de dopamina (Hiruma and Riddiford, 1984), sugiriendo que los insectos tienen una melanina dependiente de dopamina (True et al., 1999, Koch et al., 2000). Por lo tanto, también se requiere la enzima Dopadecarboxilasa (DDC), que cataliza la conversión de dopa en dopamina (Figura 2). Los pigmentos de melanina en insectos generalmente se depositan en la cutícula, ya sea en dispersión aleatoria o en gránulos definitivos (Kayser-Wegmann, 1976).

En las larvas negras de *M. sexta*, la epidermis sintetiza y deposita los gránulos que contienen los proPO (gránulos de premelanina) en la cutícula recién formada durante una muda, luego se activa la enzima y se produce melanización dentro de los gránulos ( Fig. 3). El grado de melanización depende del número de gránulos de melanina presentes (Hiruma and Riddiford, 1984). En *M. sexta*, la PO granular implicado en la melanización cuticular es electroforética y antigénicamente distinta de la hemolinfa y otras PO cuticulares (Hiruma and Riddiford, 1988)(Hiruma and Riddiford, 1988). A diferencia de otras PO de insectos, tanto el ácido siálico como la manosa se incorporaron a esta PO, lo que indica que la PO granular es una glicoproteína (Hiruma and Riddiford, 1988).

Por el contrario, DDC se encuentra en la epidermis, así como en otros tejidos (Hiruma and Riddiford, 1984). En *M. sexta*, la síntesis epidérmica y la deposición de dopamina en la cutícula se producen después de que se depositan los gránulos de premelanina y se activa la PO pro-granular, que es poco antes del inicio de la melanización (Hiruma and Riddiford, 1988) (Fig. 3).



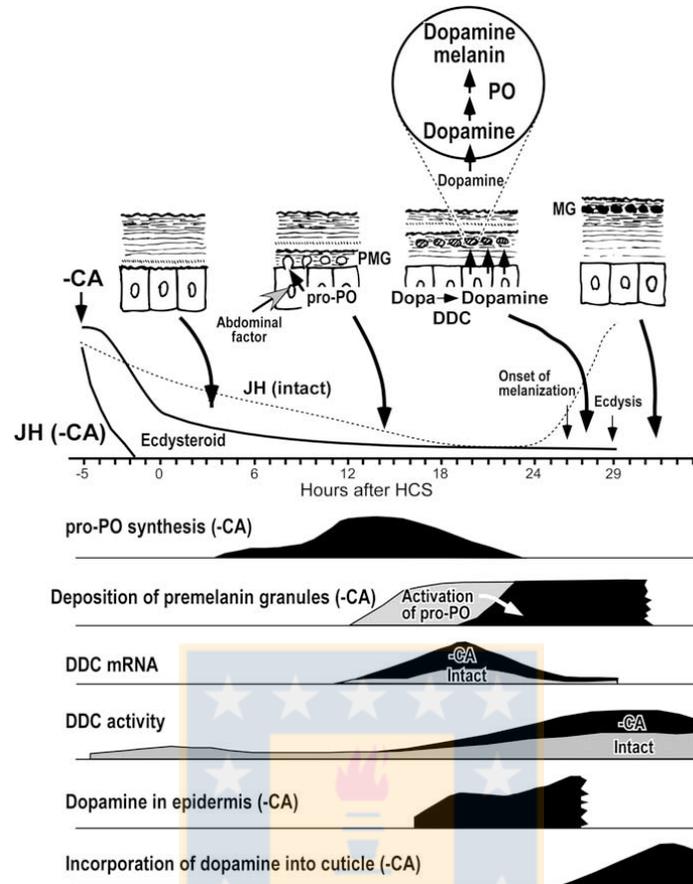


Figura 3. Diagrama de la síntesis y actividad de PO granular, dopamina y dopa descarboxilasa (DDC) durante la melanización cuticular en *Manduca sexta*. PMG: gránulos de premelanina; MG: gránulos de melanina; JH hormona juvenil; HCS: Desviación de la cápsula de la cabeza; pro-PO: profenoloxidasa granular; DDC: dopa descarboxilasa. Fuente: Hiruma and Riddiford, 2009.

### 1.1.3 Pesticidas

Se sabe que la resistencia a los insecticidas se debe a cambios de comportamiento, modificaciones fisiológicas y desintoxicación metabólica (Liu et al., 2006). La penetración de la cutícula del insecto está implicada en modificaciones fisiológicas, y algunos insecticidas deben pasar a través de la cutícula del insecto para alcanzar el sitio de la acción antes de que los efectos letales puedan ocurrir. Algunos reportes indican que la disminución de la penetración confiere una resistencia de 2-3 veces por sí misma (Liu et al., 2009). Es muy poca la información que relacione directamente la actividad de la fenoloxidasa (PO) en la resistencia a los insecticidas, aunque PO está implicada en el endurecimiento y la estabilización del exoesqueleto recién segregado. Sin embargo, se debe prestar más atención a esta enzima cuando se estudia la resistencia a insecticidas, porque PO es una de las enzimas clave del proceso de muda de insectos. Además, PO influye en la estructura de la cutícula para permitir la penetración del insecticida (Liu et al., 2009). Sin embargo existen algunos estudios en hongos donde se ha planteado la idea de que las fenoloxidasas incluyendo peroxidasas (por ejemplo, manganeso y lignina peroxidasa) y polifenoloxidasas (por ejemplo lacasas), tienen una amplia especificidad de sustrato y son capaces de transformar una amplia gama de compuestos tóxicos, incluyendo pesticidas (del Pilar Castillo et al., 1997, del Pilar Castillo et al., 2000, von Wirén-Lehr et al., 2001)

## 1.2 Procesos moleculares asociados a la respuesta a fármacos

### 1.2.1 Sistema antioxidante

Los piretroides se dividen en dos grupos dependiendo del radical libre presente en su anillo de ciclopropano (Sogorb and Vilanova, 2002). Con respecto a la biodegradación biológica de, el piretroide tipo II, deltametrina, ésta se genera principalmente a través de dos vías: primero la hidrólisis del éster central mediada por carboxilesterasas; y la oxidación de los grupos metilo de la estructura ciclopropil en la posición 2', 4' y 5' de deltametrina lo que es mediado por la enzima citocromo P450 (CYP) (Soderlund et al., 2002). Esta biodegradación genera un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y radical hidroxilo ( $OH^-$ ). Para combatir los efectos producto del incremento de ROS se genera un aumento en la expresión del sistema antioxidante, con lo cual se contrarrestan los efectos de la oxidación en el organismo (Shashikumar and Rajini, 2010). Un estudio en *C. rogercresseyi* ha identificado la presencia de genes involucrados en el sistema antioxidante, los cuales fueron evaluados in silico durante las etapas de desarrollo del ectoparásito (Fig. 4). Además en el mismo estudio se evidenció que deltametrina modula la expresión de dichos genes, ejemplo de ello se evidenció al evaluar la expresión a nivel transcripcional de 11 genes del sistema antioxidante expuestos a deltametrina revelando que a las 2 ppb la actividad transcripcional de *Cr\_superóxido dismutasa*, *Cr\_catalasa*, *Cr\_peroxirredoxina 6*, *Cr\_fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa 1* y *Cr\_fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa 1* fueron sobre expresados significativamente. Esto permitiría a *C. rogercresseyi* generar una biodegradación a este antiparasitario; además se observó un patrón de expresión sexo- específica (Chavez-Mardones and Gallardo-Escárate, 2014, Seeb et al., 2011). El mismo comportamiento se observó en un posterior estudio donde se evaluaron genes asociados con estrés oxidativo sobre *C. rogercresseyi* expuestos a  $H_2O_2$  (Chávez-Mardones et al., 2015).

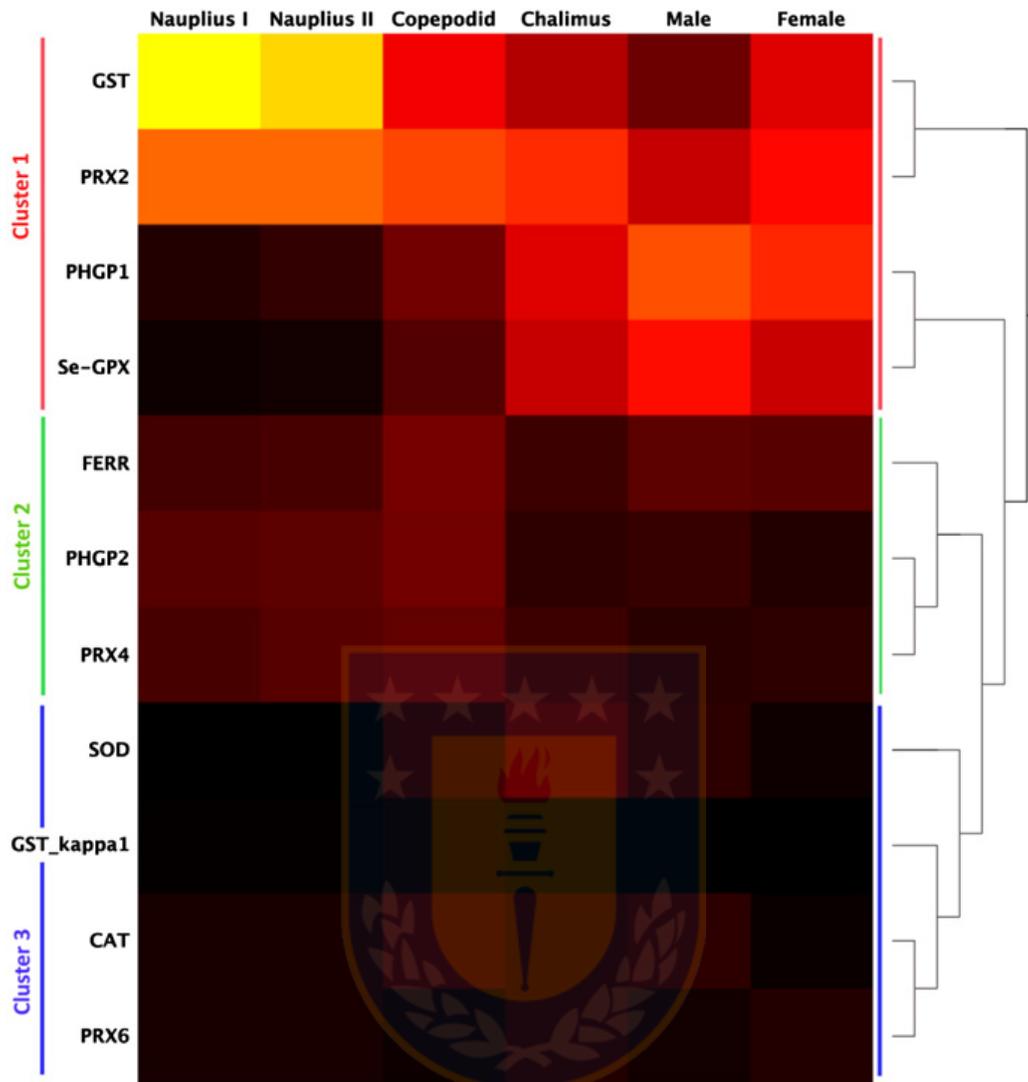


Figura 4: Heat map de genes relacionados con el sistema antioxidante evaluados en distintos estados de *C. rogercresseyi*. En color amarillo los transcritos más expresados y en color negro los menos expresados. Fuente: Chávez-Mardones and Gallardo-Escárate, 2014.

### 1.2.2 Transportadores ABC

La familia de transportadores ABC se encuentra constituida por subfamilias que son diferenciadas de acuerdo a la estructura de sus dominios y secuencia (Dermauw and Van Leeuwen, 2014), la subfamilia ABCB, es especialmente estudiada, debido a que presenta la habilidad de transportar drogas (Massey et al., 2014). Glicoproteína P (P-gp), fue el primer transportador identificado (Bourguinat et al., 2008). Otros transportadores identificados se han observado en las familias ABCC y ABCG (Juranka et al., 1989). Debido al rol detoxificador de estas proteínas es que son denominadas como proteína de resistencia a multidroga (PRM). Las PRMs en invertebrados como *C. elegans* o *A. Aegypti* han demostrado tener relación con la generación de resistencia (Bariami et al., 2012). En los ectoparásitos *L. salmonis* y *C. rogercresseyi* se ha observado una estrecha relación en la generación de la resistencia a benzoato de emamectina (EMB) con la respuesta transcriptómica de P-gp (Cárcamo et al., 2011). Para *L. salmonis*, se han caracterizado otros cuatro MRPs, sin embargo, estos no presentaron diferencias de en los niveles de transcritos entre cepas resistentes y susceptibles a EMB (Heumann et al., 2014). Con respecto a *C. rogercresseyi* se han identificado diferentes familias de transportadores ABC, además de evaluar los cambios de expresión en *C. rogercresseyi* expuestos a deltametrina y azametifos; evidenciándose cambios en la regulación de la expresión de las subfamilias ABCB y ABCC en respuesta a dichos fármacos (Fig. 5), lo que permite sugerir que estos transportadores serían cruciales para el proceso de detoxificación en *C. rogercresseyi* frente a antiparasitarios (Valenzuela-Muñoz et al., 2015b).

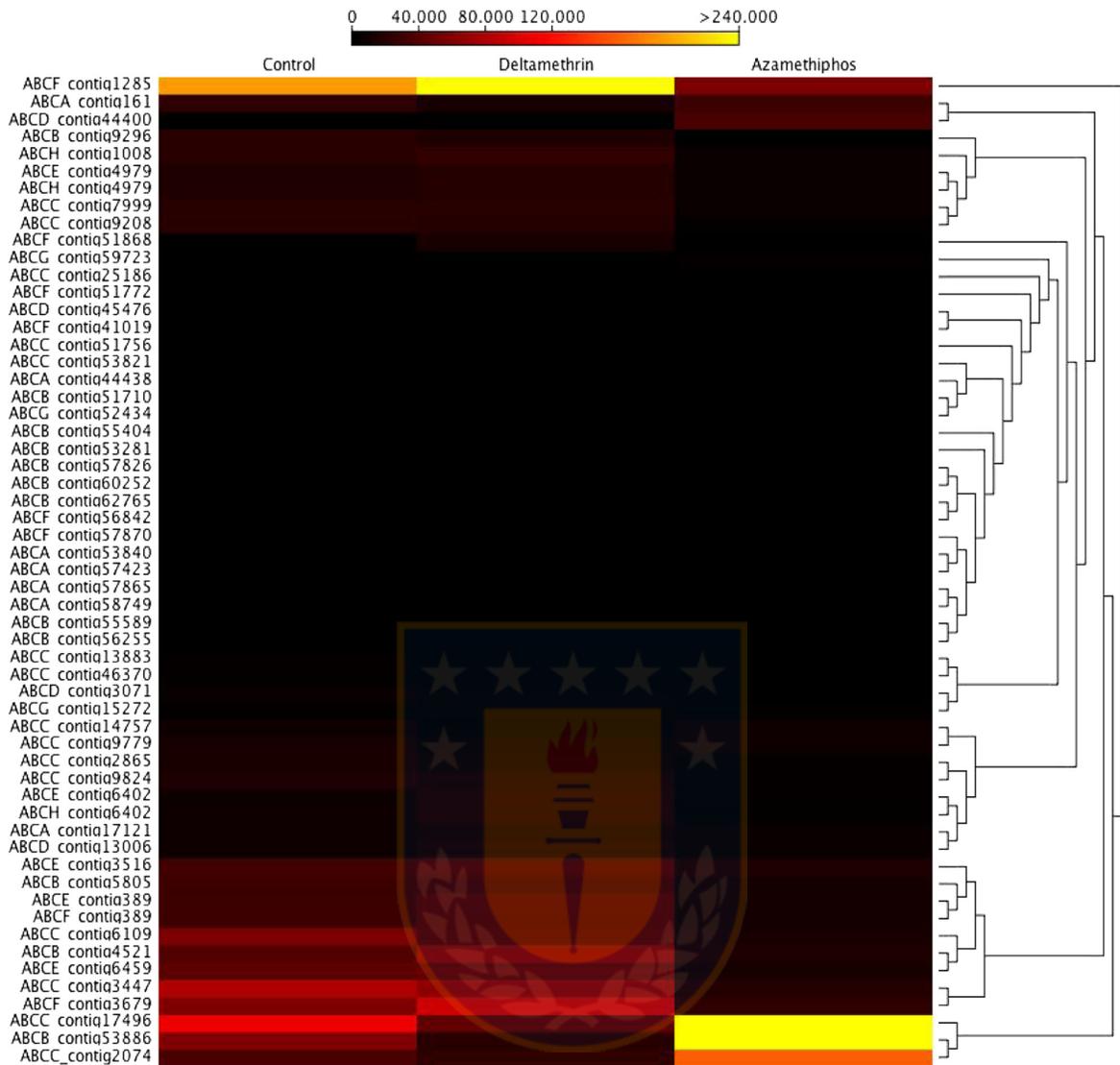


Figura 5. Heat map de los niveles de expresión génica de los transportadores ABC identificados en *C. rogercresseyi*, entre los controles adultos, los adultos expuestos a 3 ppb de azametifos y adultos expuestos a 2 ppb de deltametrina. En color amarillo los transcritos más expresados y en color negro los menos expresados. Fuente: Valenzuela-Muñoz et al., 2015b.

### 1.2.3 Síntesis Cutícula

La muda es un proceso fisiológico esencial para el crecimiento somático de los artrópodos. Durante este proceso la quitinasa degrada la cutícula dando paso a la síntesis de una cutícula nueva. Este procesos está regulado por la hormona esteroide denominada ecdysteroide y la hormona juvenil (Charles, 2010). Dentro de los efectos fenotípicos que se podrían generar en respuesta a fármacos, podría ser el engrosamiento de la cutícula, ya que las tasas de penetración de insecticidas son afectadas por las cutículas engrosadas (Livak and Schmittgen, 2001). Esto sugiere que la disminución de las tasas de penetración del insecticida a través de la cutícula, facilita los procesos de desintoxicación metabólica por parte del organismo (Joussen et al., 2012). El engrosamiento de la cutícula ha sido asociado con la resistencia a piretroides en el vector de la enfermedad Chagas, *Triatoma infestans* (Pedrini et al., 2009).

Un estudio in silico de genes involucrados en la síntesis de cutícula de *C. rogerscresseyi* expuestos a deltametrina y azametifos exhibieron cambios en la regulación de la expresión de genes estos genes (Fig. 6). En dicho estudio se sugiere que aquellos organismos que logran sobrevivir a fármacos son aquellos que presentan un mayor grosor de la cutícula, lo que le permitiría disminuir la eficacia a piretroides, debido a una disminución en la penetración del fármaco (Chávez-Mardones et al., 2016).

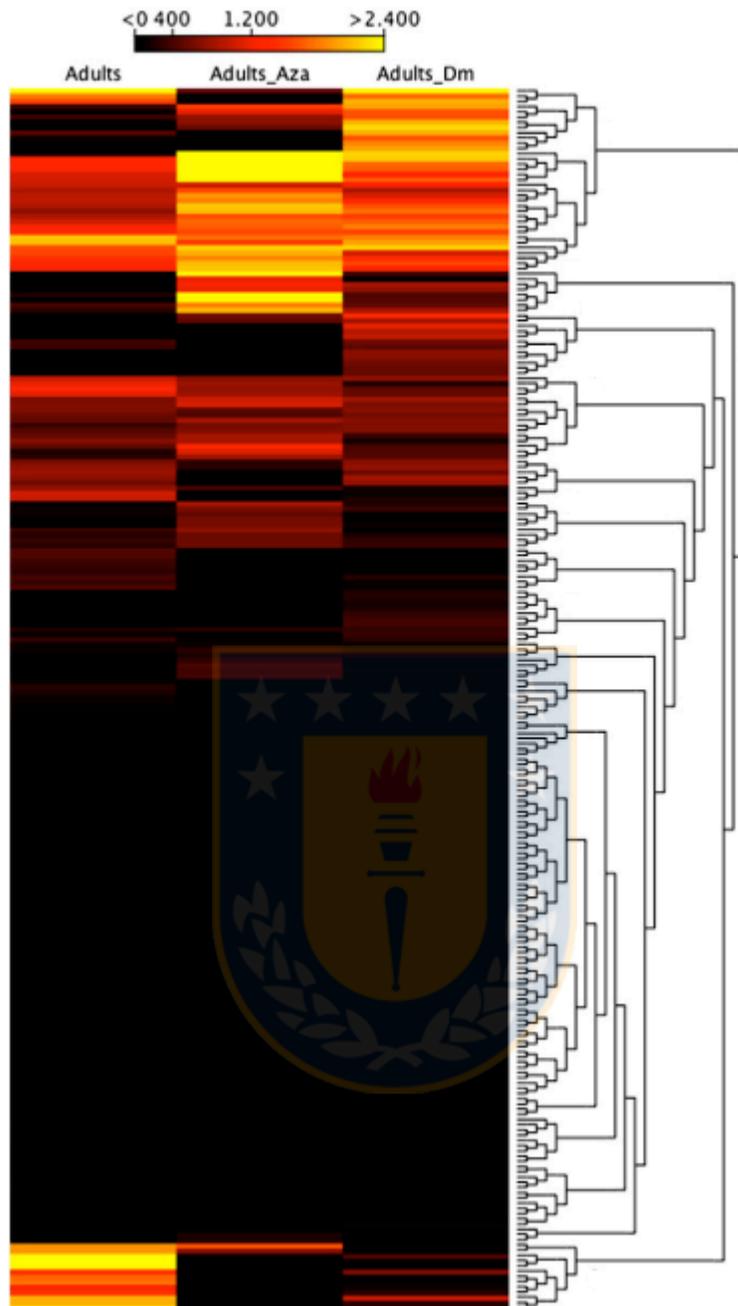


Figura 6: Heat map de los niveles de expresión génica de los genes de biosíntesis de cutícula en *C. rogercresseyi*, entre los controles adultos, los adultos expuestos a 3 ppb de azametifos y adultos expuestos a 2 ppb de deltametrina. En color amarillo los transcritos más expresados y en color negro los menos expresados. Fuente: Chávez-Mardones et al., 2016.

### 1.3 *Caligus rogercresseyi*: modelo de estudio animal

Los piojos de mar (Copépoda, Caligidae), copépodos ectoparásitos generan la patología denominada caligidosis, estos representan uno de los principales desafíos a afrontar por la industria del salmón, el cual es generado en el hemisferio norte por *Lepeophtheirus salmonis* y por *Caligus rogercresseyi* en el hemisferio sur (Hamilton-West et al., 2012). *C. rogercresseyi* es un ectoparásito endémico de diversas especies nativas de Chile, con un ciclo de vida que consta de ocho estados de desarrollo (Fig. 6). Este ectoparásito se ha adaptado progresivamente infestando los centro de cultivos de salmónidos en el sur de Chile, principalmente salmón Atlántico y trucha arcoíris (Costello, 2006).

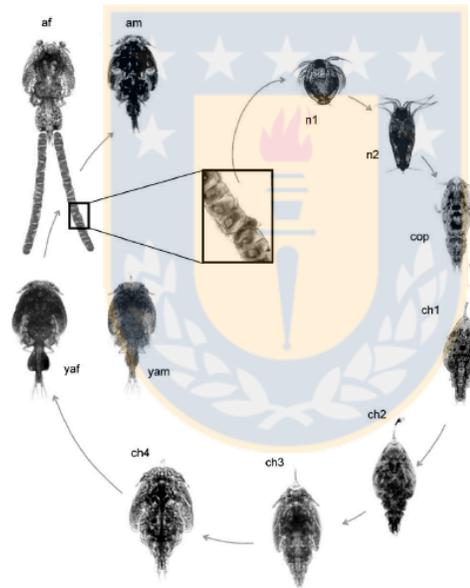


Figura 7. Ciclo de vida de *C. rogercresseyi* (González & Carvajal 2003). N1: nauplius I, n2: nauplius II, cop: copepodito, ch1: chalimus 1, ch2: chalimus 2, ch3: chalimus 3, ch4: chalimus 4, yaf: juvenil femenino, yam: juvenil masculino, af: hembra adulta y am: macho adulto. Fuente: González & Carvajal 2003.

### 1.3.1 Tratamientos antiparasitarios en Chile.

*C. rogercresseyi* fue detectado por primera vez en Chile fue en el año 1997. A partir de ese año hasta 2007 el método de control utilizado en la industria salmonicultora fue benzoato de emamectina. Luego de este período, y debido a la baja en la efectividad de este antiparasitario, el gobierno de Chile autorizó el uso de otras alternativas como deltametrina y azametifos (Bravo et al., 2013). Benzoato de emamectina (EMB) actúa sobre el sistema nervioso periférico de artrópodos, específicamente sobre los receptores de GABA (ácido gamma-aminobutírico) manteniendo su apertura, generando un aumento de la concentración de cloruro. De esta manera se induce la hiperpolarización del músculo y el nervio, y la inhibición de la transmisión neural (Grant, 2002). EMB es administrada como aditivo alimenticio para el tratamiento contra piojos de mar de peces salmónidos (SAG, 2014).

Otro grupo de antiparasitarios son los piretroides, los cuales son análogos sintéticos de las piretrinas, químicos derivados de la flor del crisantemo *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Velíšek et al., 2007). Su mecanismo de acción genera la modificación en la dinámica de los canales de sodio dependientes de voltaje presentes en la membrana de células nerviosas, provocando la prolongación de la corriente de sodio a través de la membrana de la célula nerviosa, lo cual genera una parálisis y posteriormente la muerte del parásito (Narahashi, 2000). De este tipo de antiparasitarios se han utilizado Deltametrina y Cipermetrina, debido a su acción selectiva, limitada persistencia ambiental, y baja toxicidad para los organismos no objetivos (Parvez and Raisuddin, 2006).

Los organofosforados son neurotóxicos que actúan como un inhibidor de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), generando una sobre estimulación del sistema nervioso y muscular, lo que provoca parálisis y posterior muerte del parásito (Walsh et al., 2007). En Chile el organofosforado azametifos se comenzó a utilizar en 2011, bajo el nombre de Salmosan el que es

suministrado a través de baños a los salmones, mostrando hasta la fecha una gran efectividad (Haya et al., 2005). Por otra parte, se han utilizado inhibidores de la síntesis de quitina, necesaria para la formación de cutícula, como (Lepsidon™) y teflubenzuron (Calicidae™), los cuales al inhibir la síntesis de quitina limitan el proceso de muda en el piojo de mar, por lo cual no logran avanzar al estado adulto (Langford et al., 2014).

### 1.3.2 Efectividad de tratamientos

Los tratamientos con fármacos han evidenciado una pérdida en su efectividad, debido a la generación de resistencia por parte de los organismos objetivo. Dicha resistencia se ha basado en mecanismos moleculares que generan cambios en los target moleculares, vía de detoxificación, y la alteración en el flujo de fármacos (ffrench-Constant et al., 2004). Entre los mecanismos de resistencia que generan dichos cambios, se encuentran i) mecanismos cinéticos, los que se asocian con la disminución en la acumulación de la sustancia activa generado por el incremento en la actividad de transportadores de membrana tipo ABC; ii) mecanismos metabólicos como el incremento en la actividad inespecífica de esterasas, oxidasas, u otras enzimas metabólicas asociadas con la vía de detoxificación; iii) presencia de mutaciones que resultan en la alteración de los blancos farmacológicos (Wolstenholme et al., 2004).

La presencia de mutaciones en genes blancos puede generar cambios en las funciones moleculares y procesos biológicos. Una posible mutación es a través de las variaciones por Polimorfismo de Único Nucleótido (SNP), el que consiste en el cambio de una base dentro de una secuencia nucleotídica, encontrándolos más frecuentemente en las regiones no codificantes (Seeb et al., 2011). Cuando se presenta en la región codificante, se clasifican en dos tipos: el SNP no - sinónimo el cual altera la secuencia aminoacídica de las proteínas y el SNP sinónimo, o también llamadas mutaciones silenciosas, la cual no afecta la estructura primaria de la proteína (Liao and Lee, 2010).

Por ejemplo, se han identificado 13 polimorfismos en distintas subfamilias de transportador ABC en humanos, los cuales han permitido relacionar las respuestas individuales y distintos tratamientos con fármacos terapéuticos (Iida et al., 2002). Por otra parte, un estudio con el nemátodo *Onchocerca volvulus* presenta alteraciones en las funciones del transportador de P-gp en asociación con la presencia de SNPs los cuales generan cambios no sinónimos (Bourguinat et al., 2008). Otros estudios funcionales en nemátodos resistentes evidencian la presencia de mutaciones SNP que generan cambios de un solo aminoácido en las subunidades de GluCl y GABA-Cl que generan una disminución en la sensibilidad a ivermectinas (Njue Al et al., 2004; McCavera S. et al., 2009). Otro gen objetivo de antiparasitarios, específicamente organofosforados, es Acetilcolinesterasa (AChE), del cual se han reportado varias mutaciones las que se asocian con la reducción de la sensibilidad contra organofosforados en diversos artrópodos (Hotelier et al., 2010). En un estudio en *Leptinotarsa decemlineata* se identificaron un total de 3 SNPs no sinónimos en AChE que generan las mutaciones T29P, R30K, y S291G en todas las poblaciones resistentes. De ellas, la mutación T29P se encontró en las cuatro poblaciones de campo evaluadas y se sugiere que contribuye a la insensibilidad de AChE (Malekmohammadi et al., 2016). Por otra parte, estudios en *Lepeophtheirus salmonis*, identificaron SNP en la secuencia codificante del gen AChE, polimorfismo que genera el cambio aminoacídico Phe362Tyr, el cual está presente solo en individuos menos susceptibles a Azametifos y que explicaría la reducción en la efectividad de dicho pesticida (Kaur et al., 2015).

Estudios relacionados con la resistencia/susceptibilidad en *A. gambiae* (Vontas et al., 2007) y *L. salmonis* (Carmichael et al., 2013), han desarrollado análisis de microarreglos para evaluar cambios de expresión de los genes blanco de fármacos con la finalidad de evaluar cepas resistentes y susceptibles a piretroides y benzoato de emamectina. Dichos análisis evidenciaron una expresión diferencial de genes relacionados con procesos de detoxificación como citocromo P450 y del receptor GABA.

### 1.3.3 Efectividad de tratamientos en Chile

En relación a la efectividad de los tratamientos realizados en Chile para el control de *C. rogercresseyi*, existen estudios que reportan una baja en su efectividad. En el año 2007 se evidenció una reducción en la eficacia de deltametrina y benzoato de emamectina (Bravo et al., 2013). Un estudio realizado por Helgesen et al. 2014, demuestra a través de comparación de bioensayos la generación de pérdida de sensibilidad de *C. rogercresseyi* a deltametrina. Para ello se compararon bioensayos realizados previo a la introducción de deltametrina en la industria salmonícola Chilena en el año 2007, con bioensayos realizados en 2008, 2012, 2013, los resultados de estas comparaciones muestran que entre 2008 y 2012 los *C. rogercresseyi* presentan menor susceptibilidad a deltametrina, además del estudio se observa que entre 2012-2013 existe una diferencia de susceptibilidad entre machos y hembras de *C. rogercresseyi* (Helgesen et al., 2014). En relación al fármaco cipermetrina, otro piretroide que se utiliza desde 2010 en Chile, un estudio realizado en 2014 demuestra que este fármaco aun presenta alta eficacia en el tratamiento de *C. rogercresseyi* disminuyendo significativamente la cantidad de *C. rogercresseyi* vivos en peces tratados con este fármaco, en relación a lo observado en peces no tratados (Marín et al., 2015).

### 1.4 Secuenciación de última generación

Para lograr generar estudios como la identificación de genes y observar el comportamiento del transcriptoma de *C. rogercresseyi* es necesario contar con tecnologías que permitan la caracterización a gran escala de la genética del parásito. En los últimos años se ha desarrollado una nueva tecnología, la secuenciación de última generación (Skern-Mauritzen et al.). Esta tecnología presenta un alto potencial por su capacidad para obtener el transcriptoma completo de una especie en particular. NGS tiene ventajas considerables para examinar la estructura fina del transcriptoma como la detección de nuevos transcritos, expresión alelo-específico y uniones de empalme. La tecnología de NGS no depende de la anotación previa del genoma para la selección de la sonda

y evita los sesgos asociados durante la hibridación de microarrays. Sin embargo, NGS plantea nuevos retos algorítmicos y logísticos para el análisis y almacenamiento de datos (Zhao et al., 2014).

Con esta tecnología que se logró identificar cambios transcriptómicos en seis etapas de desarrollo de *Caligus rogercresseyi*. A partir del ensamble *de novo* se obtuvo 84.023 contigs de alta calidad, que permitieron la identificación de 29 mil genes sobre la base de las proteínas conocidas (Gallardo-Escárte et al., 2014). Este análisis permitió identificar cambios de expresión entre los diferentes estados del parásito, por ejemplo entre nauplius I-II y copepodito se encontraron 604 transcritos diferencialmente expresados, copepodito y chalimus se identificaron 2426 transcritos, y finalmente entre machos y hembras se encontraron 2478 transcritos diferencialmente expresados. En la actualidad esta base de datos posee alrededor de 184.978 contigs de alta calidad (Valenzuela-Muñoz et al., 2015c).



## 1.5 Justificación del estudio

En relación a la información expuesta, se ha evidenciado que el sistema proPO está relacionado tanto con el sistema inmune de invertebrados como con procesos de formación de cutícula. Este último aspecto es afectado por el uso de fármacos, el objetivo de este estudio será en primera instancia identificar genes involucrados en el sistema proPO, para luego evaluar dichos genes en *C. rogercresseyi* enfrentados a los antiparasitarios Deltametrina, Cipermetrina y Azametifos y analizar si existe alguna incidencia de dichos antiparasitarios en el sistema proPO. Para ello se realizó una búsqueda bioinformática en la base de datos del transcriptoma de *C. rogercresseyi*, con el fin de identificar genes relacionados con el sistema proPO, los cuales analizados en sus distintas etapas de desarrollo mediante RNA-seq y una posterior validación por RT-qPCR. Posteriormente se procederá a la secuenciación de individuos adultos de *C. rogercresseyi* expuestos a estos antiparasitarios, para luego evaluar el comportamiento de los genes del sistema proPO frente a dichos antiparasitarios.

Además, con el fin de buscar una aproximación en los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta de *C. rogercresseyi* frente a antiparasitarios se procederá a evaluar un grupo de genes como los blanco de antiparasitarios, genes involucrados en procesos de detoxificación, síntesis de cutícula, genes que por bibliografía se han asociado a antiparasitarios, con el fin de determinar posibles mecanismos que determinen las diferencias entre fármacos y entre distintas regiones con diferencias de efectividad de antiparasitarios. Para ello se evaluará el comportamiento de genes presentes en dichos procesos en individuos adultos de *C. rogercresseyi* expuestos a azametifos, deltametrina y cipermetrina, para luego, mediante los datos obtenidos de la secuenciación, generar los análisis de RNA-seq, validación por RT-qPCR e identificación de SNP frente a cada antiparasitario, en dichos genes. Por último se realizará un análisis de RNA-seq con el fin de comparar los niveles de expresión con los individuos obtenidos en este estudio, y datos de secuenciación previos de

individuos provenientes de la X región, y así poder relacionar la diferencia en la efectividad de tratamientos y la presencia de SNP.

Con este estudio se obtendrá nueva información con respecto a la relación entre el efecto de antiparasitarios y el sistema proPO, además de identificar SNP en genes involucrados en la respuesta frente a antiparasitarios y relacionarlos con las diferencias en la efectividad de antiparasitarios, información que en la actualidad es inexistente.



## **HIPOTESIS DE TRABAJO:**

1. Los genes vinculados al sistema profenoloxidasa de *Caligus rogercresseyi* son modulados negativamente por los antiparasitarios Deltametrina, Cipermetrina y Azametifos.
2. Existe una alteración en la expresión de genes asociados a la respuesta transcriptómica frente a antiparasitarios en *Caligus rogercresseyi* con la presencia de SNP.

## **OBJETIVOS:**

### **General**

Identificar y evaluar los genes asociados al sistema profenoloxidasa y a la respuesta transcriptómica en *Caligus rogercresseyi* frente a los antiparasitarios Deltametrina, Cipermetrina y Azametifos.

### **Específicos**

1. Identificar y caracterizar genes relacionados con el sistema profenoloxidasa en diferentes estados de desarrollo de *C. rogercresseyi*.
2. Evaluar mediante RNA-seq el efecto de los antiparasitarios deltametrina, cipermetrina y azametifos en genes relacionados con el sistema profenoloxidasa y con otros procesos en individuos en etapa adulta de *C. rogercresseyi*.
3. Identificar polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en genes relacionados con el sistema profenoloxidasa y genes relacionados con diferentes mecanismos relacionados con la respuesta de *C. rogercresseyi* frente a antiparasitarios.
4. Analizar la respuesta a nivel transcripcional de genes involucrados en la respuesta a antiparasitarios con anotación de SNP de *C. rogercresseyi* frente a deltametrina, cipermetrina y azametifos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Identificación de genes asociados sistema profenoloxidasa en *C. rogercresseyi*

#### 2.1.1. Condiciones de laboratorio para el cultivo de piojo de mar

Hembras ovígeras de *C. rogercresseyi* se obtuvieron de la estación de biología marina de la Universidad de Concepción ubicado en Dichato, región del Bío-Bio Chile. A estas hembras se les quitaron los sacos ovígeros y se colocaron en cubetas de cultivo suministrados con el flujo de agua de mar filtrada (12° C) y aireación suave. Luego de la eclosión se controlaron condiciones como temperatura y salinidad para lograr el óptimo desarrollo desde nauplius a copepodito, los que se utilizaron para infectar salmón del Atlántico para seguir el proceso de desarrollo el ectoparásito hasta fase adulta. El procedimiento de cultivo se llevó a cabo de acuerdo con (Bravo, 2010). Se tomaron muestras de todas las etapas de desarrollo de *C. rogercresseyi* las que fueron fijadas en RNA Later (Ambion).

#### 2.1.2 Identificación *in silico* de genes asociados sistema profenoloxidasa en *C. rogercresseyi*

A partir de la base de datos EST de *C. rogercresseyi* (Gallardo-Escárate et al., 2014), que actualmente cuenta con 184.978 contigs, y utilizando el software CLC Genomic Workbench (Version 6.0.1, CLC Bio, Denmark) se realizó la identificación de genes relacionados con el sistema profenoloxidasa en *C. rogercresseyi*. Para ello se realizó un análisis tBLASTx contra secuencias de genes del sistema profenoloxidasa reportadas en GeneBank para insectos, arácnidos y especies de artrópodos. Para esto se consideró como cutoff un E-value  $\leq 1E-90$ .

### 2.1.3 Análisis RNA-seq

Para comparar los niveles de expresión de cada secuencia identificada para *C. rogercresseyi*, se realizó un análisis de RNA-seq con los Illumina reads obtenidos para cada etapa de desarrollo de *C. rogercresseyi* (nauplius, copepodito, chalimus, y adultos macho y hembra) (Gallardo-Escárate et al., 2014). Los reads fueron mapeados con las contigs que mostraron alta homología con genes del sistema profenoloxidasa utilizando el software CLC Genomic Workbench software (version 9.0, CLCBio, Qiagen, Germany). Los ajustes de RNA-seq eran una fracción de longitud mínima = 0,6 y una fracción de similitud mínima (lecturas largas) = 0,5. Los valores de expresión se establecieron como transcripciones por millón (TPM), una modificación de lecturas por kilobase de transcripción por millón de lecturas mapeadas (RPKM) diseñadas para ser consistentes entre muestras. Estas normalizaciones permiten las evaluaciones de transcripciones sobreexpresadas entre los diferentes grupos (Wagner et al., 2012). La agrupación jerárquica de los valores TPM se calculó en el mismo software y un Heatmap se construyó en base a distancias Manhattan (Eisen et al., 1998) y una vinculación completa para visualizar los cambios de expresión.

### 2.1.4 Diseño y estandarización de primers

A partir de las secuencias identificadas se realizó el diseño de los partidores con la herramienta Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) incluidas en el software Pro Geneious (Tabla 1). La estandarización de los partidores se realizó por PCR en tiempo final en termociclador Veriti (Applied Biosystem). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 12,5 µl con Taq Polimerasa 1X (Thermo), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µg/µl BSA, 1 X Buffer. Las condiciones fueron: 94°C por 2 minutos y 30 segundos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, Ta°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos y finalmente 72°C por 5 minutos.

## 2.2. Análisis bioensayos

### 2.2.1 Obtención de muestras y bioensayos con antiparasitarios

Las muestras de adultos hembras y machos fueron colectados desde centros de comercial localizado en la XI Región en Chile (41°40'48.5"S; 73°02'31.34"O). El permiso para la colección de los piojos de mar fue autorizada por Marine Harvest S.A, Ruta 226, Km. 8, Camino El Tepual, Puerto Montt, Chile. Estas especies fueron usadas para generar los bioensayos y la subsecuente librería ADNc MiSeq.

Para la realización de los bioensayos se utilizaron tres antiparasitarios: Azametifos (Calfree®), Deltametrina (ALPHA MAX®) y Cipermetrina (Betamax®). Las concentraciones utilizadas fueron: 0-1-3-8-10-30-100 ppb para Azametifos, 0-0.5-1.5-5-15-20-50 ppb para Deltametrina y 0-0.5-1.5-5-15-20-50 ppb para el caso de Cipermetrina. Diez piojos de mar adultos (9 hembras y 1 macho) fueron expuestos a cada concentración de Azametifos, Deltametrina y Cipermetrina usando placas Petri con 50 ml de agua de mar. Cada experimento se realizó por triplicado. El tiempo de exposición para Azametifos y Cipermetrina fue de 30 minutos, y en el caso de Deltametrina fue de 40 minutos. Durante la exposición, los piojos de mar fueron mantenidos a 12°C. Después de 24hr, los organismos fueron fijados en RNAlater® RNA Stabilization Reagent (Ambion, USA) y almacenados a -80° para la subsecuente extracción de RNA. Los protocolos para los bioensayos fueron realizados de acuerdo al Consorcio SEACH (2006). Además cada bioensayo fue considerado válido con un valor igual o superior a 80% de supervivencia en los controles (Helgesen and Horsberg, 2013).

Todas las infecciones y el laboratorio de cultivo se llevaron a cabo bajo las directrices aprobadas por el comité de ética de la Universidad de Concepción y supervisión veterinaria adecuada.

### 2.2.2 Secuenciación masiva de transcriptoma de *C. rogercresseyi*

Los individuos que sobrevivieron a la exposición a los antiparasitarios (basados en el EC50), fueron seleccionados para la preparación de librerías. El ARN total fue extraído desde pools de individuos para cada sexo con RiboPure™ Kit (Ambion®, Life Technologies™, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad, cantidad y pureza del ARN extraído fue medido en TapeStation 2200 (Agilent technologies INC., Santa Clara, CA, USA) usando el Kit R6K Reagent de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Subsecuentemente, se construyó la librería de ADNc de doble cadena usando TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina®, San Diego, CA, USA). La cuantificación de las librerías se realizó con KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems, Boston, Massachusetts, USA), de esta forma asegurar una óptima densidad de clusters en la plataforma de secuenciación Illumina. Dos replicas biológicas por cada muestra de pool fueron secuenciadas por la plataforma MiSeq (Illumina®) a una concentración de 12.5pM. Las corridas de secuenciación fueron de 2 x 251 paired-end en el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola, Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR), Universidad de Concepción, Chile.

### 2.2.3 Análisis RNA-seq *C. rogercresseyi* provenientes de bioensayos.

Para la realización de esta actividad se siguió el mismo protocolo establecido en el punto 1.3, pero utilizando los reads obtenidos de la secuenciación de los individuos obtenidos de los bioensayos. Además se realizó el análisis de RNA-seq con genes de procesos moleculares asociados a la respuesta frente a antiparasitarios.

#### 2.2.4 Identificación de SNP

Con los datos de la secuenciación de los individuos provenientes de los bioensayos se aplicó a la búsqueda de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) mediante el uso del software CLC Genomics Workbench software (Version 7.1, CLC Bio, Denmark). Los parámetros de ensamble usados fueron un costo de desajuste de 2, un costo de delección de 3, un costo de inserción de 3, un largo mínimo del contig de 200 pb, y un valor de calidad de trimming de 0.05. Para excluir variantes de secuencias parálogas, se consideró un criterio de superposición de 70% and una similaridad de 0.9. Los parámetros utilizados para ubicar el SNP candidato fueron los siguientes: longitud de la ventana 11, intervalo máximo de desviación e incompatibilidad 2, calidad media mínima de las bases circundantes 15, calidad mínima de la base central 25, cobertura máxima 100, cobertura mínima 8, frecuencia mínima de la variante (%) 1/4 35.0, y variaciones máximas esperadas (ploidy) 2.

#### 2.2.5 Análisis de RNA-seq de *C. rogercresseyi* provenientes de distintas regiones expuestas a azametifos y deltametrina.

Además se realizó una comparación mediante RNA-seq con los datos de secuenciación obtenidos en este estudio (XI Región (mayor efectividad tratamientos) con datos previos de azametifos y deltametrina de estudios previos (Chavez-Mardones and Gallardo-Escárate, 2014) (X Región (menor efectividad tratamientos)).

## 2.3 Análisis de expresión

### 2.3.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Para evaluar los patrones de expresión génica en distintos estadios de *C. rogercresseyi*, se realizaron extracciones de ARNm desde pools de individuos (N=10 para chalimus y adultos; N=100 en el caso de copepoditos y nauplius). Además, para el análisis de expresión de genes relacionados con procesos moleculares asociados a la respuesta a antiparasitarios se utilizarán los individuos provenientes de los bioensayos. La extracción se realizó con Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA), según las instrucciones del fabricante, lo mismo se realizó con los individuos provenientes de los bioensayos (control, azametifos, cipermetrina y deltametrina). La concentración y pureza del ARN obtenido fue determinado mediante espectrofotometría en Nanodrop ND-1000 (NanoDrop® Technologies, Inc.). Mientras que la integridad del ARN total fue observada por electroforesis en gel denaturante al 1.2% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente a partir de 200 ng de ARN se realizó la síntesis de ADNc utilizando RevertAid™-H Minus (Thermo Scientific, Maryland, USA) de acuerdo a lo especificado por el fabricante.

### 2.3.2 Validación por RT-qPCR

Para la validación del análisis de RNA-seq se realizó una evaluación cuantitativa de la expresión de los genes involucrados en el sistema profenoloxidasa en *C. rogercresseyi*, se siguió el mismo procedimiento tanto para las muestras de diferentes estados de desarrollo (nauplius, copepodito, chalimus, macho y hembra); como con las obtenidas de los bioensayos (control, azametifos, cipermetrina y deltametrina). Lo mismo se realizó con los genes relacionados con la respuesta frente a antiparasitarios. El análisis se realizó mediante PCR cuantitativa a través del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) en el termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Se diseñaron partidores específicos para cada gen en estudio (Tabla 2). El método de

análisis requiere valores de eficiencia cerca de 100%, y, se realizaron ensayos de rango dinámico para calcular la eficiencia de la reacción de cada gen. Para normalizar los datos se utilizó el gen  $\beta$ -Tubulina como gen housekeeping (HKG). La reacción de RT-qPCR se llevó a cabo en un volumen total de 10  $\mu$ l usando kit Power UP Master (Applied Biosystem) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C por 10min (etapa de calentamiento), 40 ciclos a 9°C por 30seg (denaturación), 60°C (T° annealing) por 30seg, y 72°C por 30seg (extensión).

### 2.3.3 Análisis Estadístico

El análisis de expresión génica se llevó a cabo con el software JMP. Los datos obtenidos se analizaron mediante el test de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos. Los datos con una distribución paramétrica se evaluaron con una prueba de ANOVA, y para determinar las diferencias entre condiciones se realizó el test de multicomparación Tukey-HSD. Los datos que no paramétricos fueron evaluados a través del test K-Wallis. Los datos estadísticamente significativas presentaron un  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. Evaluación de genes involucrados en el sistema profenoloxidasa en diferentes etapas de desarrollo de *C. rogercresseyi*

3.1.1. Caracterización *in silico* de genes asociados al sistema profenoloxidasa en *C. rogercresseyi*.

A partir del análisis Blastx, ocho contigs presentaron homología con genes relacionados con el sistema profenoloxidasa, los cuales son *masquerade-like*, *homólogo de serina proteasa 1 (SPH 1)*, *homólogo de serina proteasa 2 (SPH 2)*, *factor activador de profenoloxidasa I (PPAF I)*, *factor activador de profenoloxidasa II (PPAF II)*, *fenoloxidasa (PO)* y *profenoloxidasa (PPO)* (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados Blastx de los genes relacionados con el sistema proPO.  
Fuente: Elaboración propia.

Nombre	Especie	Descripción	E- value	Largo contig (pb)
Cr_PO	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Phenoloxidase subunit 1 partial cds	2e-86	793
Cr_PPO	<i>Cherax quadricarinatus</i>	Prophenoloxidase partial cds	2e-68	947
Cr_Masquerade	<i>Penaeus monodon</i>	Masquerade-like protein complete cds	8e-28	757
Cr_PPAF I	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Prophenoloxidase activating factor complete cds	3e-36	735
Cr_PPAF II	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Prophenoloxidase activating factor II complete cds	2e-56	737
Cr_SPH1	<i>Nasonia vitripennis</i>	Serine protease homolog complete cds	4e-72	1730
Cr_SPH2	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Serine protease homolog 2 complete cds	2e-10	2460

El análisis de RNA-seq se realizó utilizando los datos obtenidos de seis estados de desarrollo de *C. rogercresseyi*: nauplius I, nauplius II, copepodito, chalimus, macho y hembra. Del análisis RNA-Seq se observan 3 clusters, uno para los estados adultos macho y hembra, otro para estados copepodito y chalimus, y un tercer cluster para los estados larvales nauplius I y II (Fig. 8). En los

estados nauplius I y II se observan altos niveles de expresión de los contigs anotados como: *homólogo de serina proteasa 1*, *Factor activador de Profenoloxidasa I y II* en relación a los otros estados analizados (Fig. 8). Con respecto a las secuencias anotadas como *homólogo de serina proteasa 2* y *serpina 3* se observan altos niveles de expresión en las etapas de copepodito y chalimus (Fig. 8). Por otra parte, la secuencia identificada para *masquerade* muestra mayores niveles de expresión en los estados nauplius I y macho adulto (Fig. 8). Por último, los genes *fenoloxidasa* y *profenoloxidasa* presentan una upregulación en los estados chalimus, macho y hembra adultos (Fig. 8).

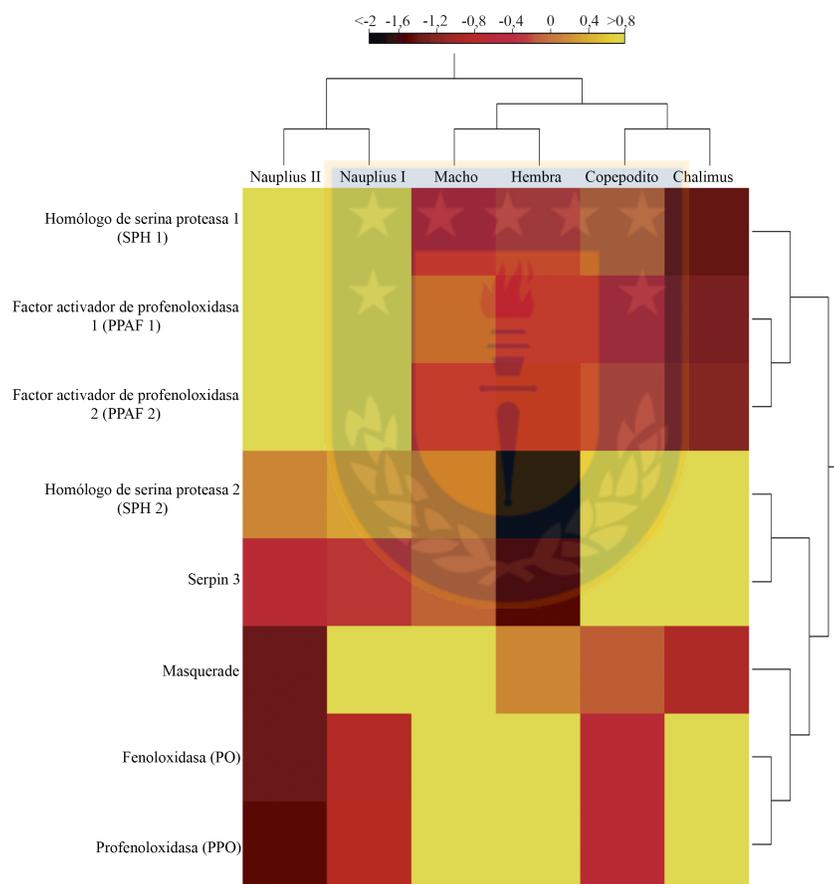


Figura 8. Heat-map de los genes relacionados con el proPO en cinco etapas de desarrollo: nauplius I, nauplius II, copépodo, chalimus, macho y hembra del transcriptoma de *C. rogercresseyi*. La abundancia de transcritos se representa como valores de TPM. Las escalas de color muestran la expresión relativa del transcrito negro (bajo), rojo (medio) a amarillo (alto). Fuente: Elaboración propia.

De estos resultados se propone el siguiente esquema del sistema ProPO para *C. rogercresseyi* (Fig. 9), el cual fue desarrollado mediante el análisis con el servidor KASS y comparación con esquemas realizados en otros estudios (Amparyup et al., 2013, Cerenius et al., 2008). En este esquema, la cascada del sistema proPO se inicia con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), incluyendo lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas, peptidoglicanos (PGN) de bacterias Gram-positivas y  $\beta$ -1,3-glucanos de hongos. Posteriormente ocurre la activación de *homólogo de serina proteasa* (*Cr\_SPH1* y *Cr\_SPH2*) y *Cr\_masquerade*, los cuales son capaces de convertir en funcionales los *factores activadores de profenoloxidasa* (*Cr\_PPAF I* y *Cr\_PPAF II*). Dicha estimulación generada en *Cr\_PPAF I* y *Cr\_PPAF II* permite la posterior activación de *Cr\_profenoloxidasa* (*Cr\_PPO*), por consiguiente se estimula *Cr\_fenoloxidasa* (*Cr\_PO*) y el posterior proceso de melanización.

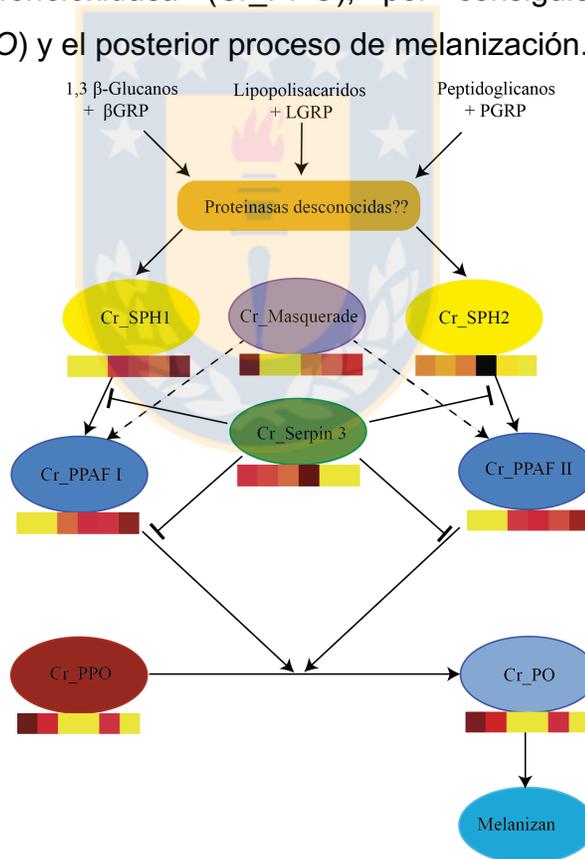


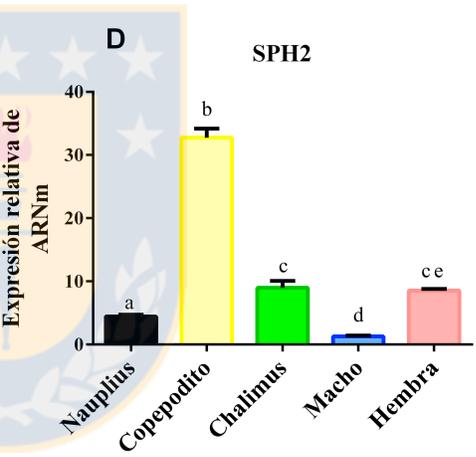
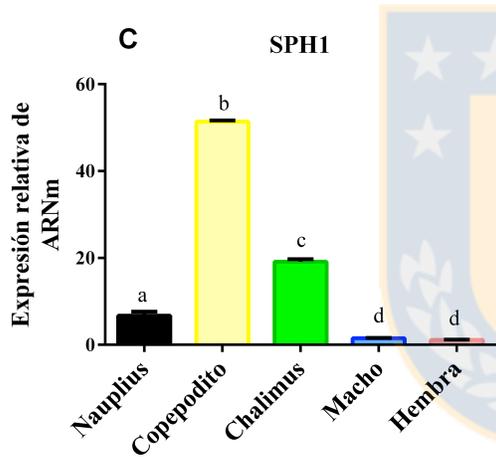
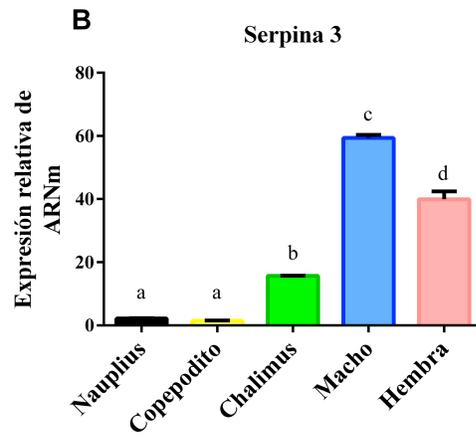
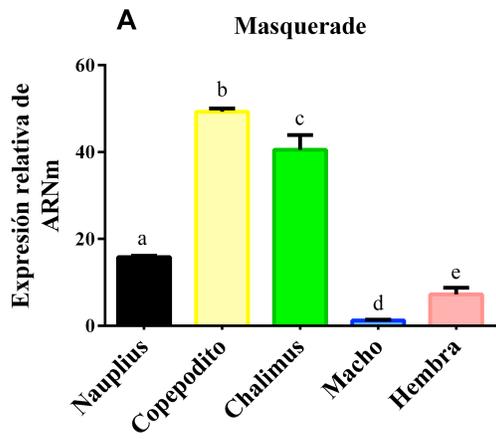
Figura 9. Esquema hipotético del sistema proPO de *C. rogercresseyi*. Las barras de color debajo de cada uno de los genes candidatos representan los niveles de expresión (negro (bajo), rojo (medio) a amarillo (alto)) para nauplius I, nauplius II, copépodo, chalimus y adultos (macho y hembra). Fuente: Elaboración propia.

### 3.1.2 Validación por RT-qPCR

A partir de los partidores diseñados (Tabla 2) se realizó el análisis de expresión transcriptómica desde RNA total extraído de diferentes etapas de desarrollo de *C. rogerscresseyi*. La expresión relativa fue normalizada utilizando  $\beta$ -tubulina como housekeeping. Se observa que tanto *masquerade*, *SPH1*, *PPO* y *PO*, presentan un patrón de expresión similar, siendo sobreexpresados en las etapas de infección copepodito y chalimus (Fig. 10 A, B, G y H respectivamente). Por otra parte se observa que *SPH2* y *PPAF I* solo son sobreexpresados notoriamente en la etapa de copepodito (Fig. 10 C y E). En cambio, al analizar a *serpina 3* y *PPAF II* se observa una sobre expresión principalmente en individuos en etapa adulta (macho y hembra) (Fig. 10 D y F respectivamente).

Tabla 2. Listado de primers utilizados en este estudio. Fuente: Elaboración propia.

Nombre	Secuencia (5'- 3')	Tm °C	Eficiencia (%)
Cr_B tubulin F2	TTTGTGTGTGAGCTCTGGG	60	94
Cr_B tubulin R2	GCTGATCTCCGAAAACCTTGC		
Cr_PPAF I F2	GAAGGACAAGGACACCTGCA	61	92
Cr_PPAF I R2	TTCCCTTCAACTCCGCAGTC		
Cr_PPAF II F2	TGGATGAGGATTTCAAGTTGGC	57	85,9
Cr_PPAF II R2	GATGACCTGGTACTCGCCCA		
Cr_SPH1 F2	GTGGCAAAGCAATCCTTGT	56	100
Cr_SPH1 R2	TCCTCTCTTCGATCCACGCA		
Cr_SPH2 R1	CATGCTGTGTGCGGGTGATC	60	110
Cr_SPH2 F2	CCAGCCAACAACAAAGCCTC		
Cr_Masquerade F2	CCCAACAAGAAATCGAGCCC	59	86,8
Cr_Masquerade R2	GGTGTCAACATGAGGAGCCA		
Cr_PO F1	CACAGGCTCGTTCTTGATG	58	104,2
Cr_PO R1	TATCCTTGCTCTCCCTGATTTGC		
Cr_PPO F2	CATTCATTGGTGTTAACGCC	56	75,8
Cr_PPO R2	AATCCTTGCCGCTCGTGCA		
Cr_Serpin 3 F2	ACTGAGGATGGATCTTCACGT	60	95
Cr_Serpin 3 R2	TGGAGTAGTTTTGACCGGAGC		



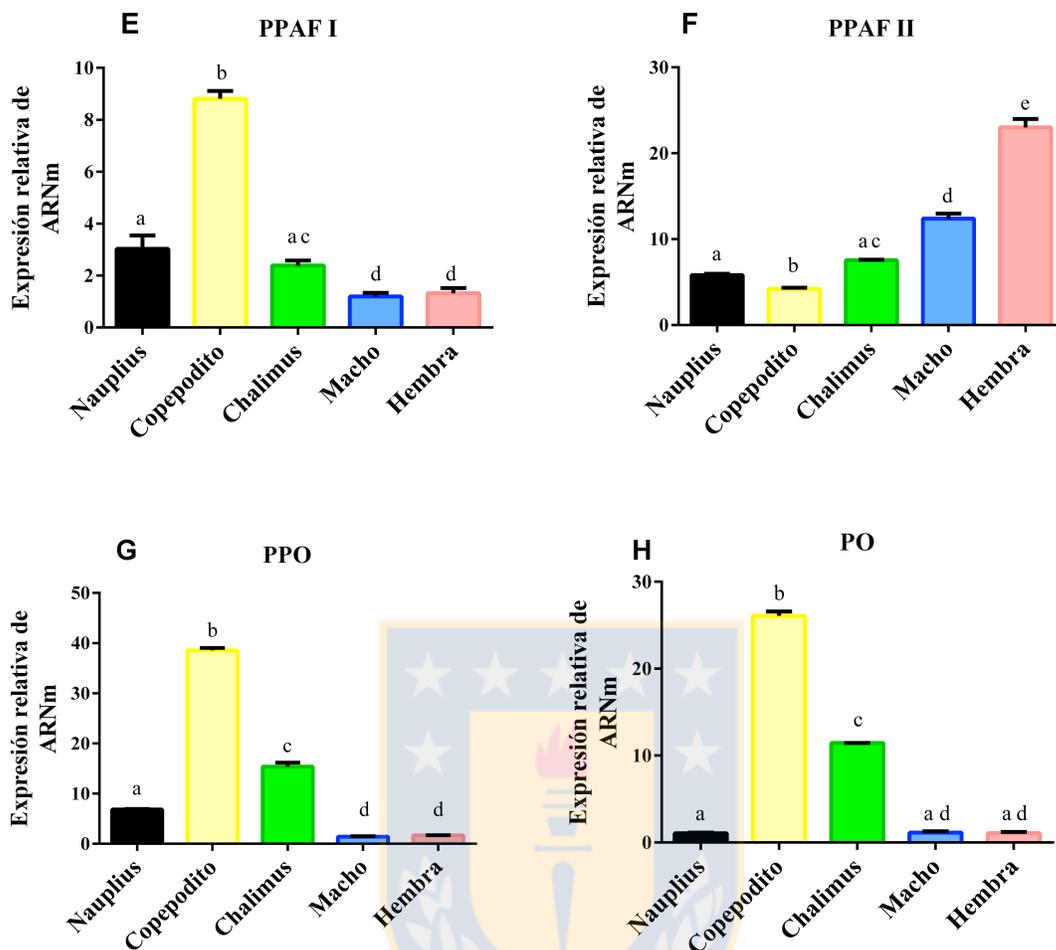


Figura 10. Expresión temporal de *Masquerade* (*Cr\_Masquerade*), homólogo de *serina proteasa 1* (*Cr\_SPH1*), homólogo de *serina proteasa 2* (*Cr\_SPH2*), *Serpin 3* (*Cr\_serpin 3*), *factor activador de profenoloxidasa I* (*Cr\_PPAF I*), *factor activador de profenoloxidasa II* (*Cr\_PPAF II*), *profenoloxidasa* (*Cr\_PPO*) y *fenoloxidasa* (*Cr\_PO*) de diferentes etapas de desarrollo. El nivel de expresión se normalizó mediante el control endógeno  $\beta$  tubulina. Los datos se presentan como la expresión media  $\pm$  desviación estándar. Las letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas para diferentes etapas de desarrollo (Tukey HSD prueba,  $P < 0,05$ ). Fuente: Elaboración propia.

El análisis PCA revela el comportamiento de los niveles de expresión de los genes evaluados RT-qPCR. Mostrando una separación que define la respuesta a las diferentes etapas de desarrollo del ectoparásito. Se observa que en las primeras etapas de desarrollo de los piojos de mar, el patrón de respuesta se observa principalmente por los genes *Masquerade*, *SPH1*, *SPH2*, *PPAF II*, *PPO* y *PO*. Por otro lado, en la etapa de adulto, macho y hembra, sólo se observan *Serpin 3* y *PPAF I* (Fig. 11).

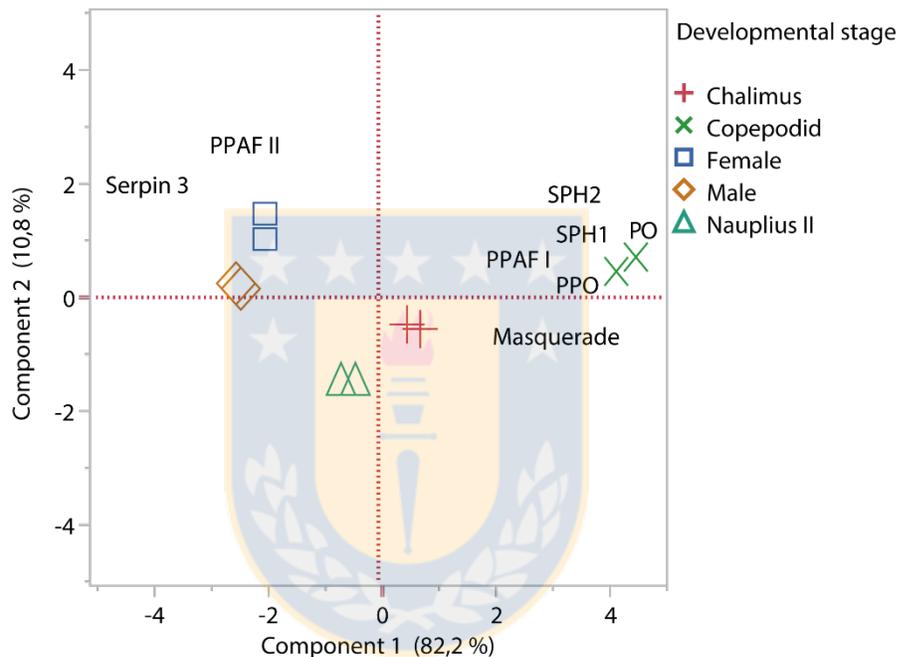


Figura 11. Análisis de componentes principales de genes de *C. rogercresseyi* expresados en diferentes etapas de desarrollo. El patrón revelado por los componentes principales representó el 82,2% de la variabilidad del conjunto de datos. Fuente: Elaboración propia.

## 3.2. Análisis del sistema profenoloxidasa en *C. rogercresseyi* expuestos a antiparasitarios.

### 3.2.1 Análisis de RNA-seq

Del análisis RNA-seq frente a antiparasitarios, se observa que genes como *Factor activador de Profenoloxidasa I y II*, *homólogo de serina proteasa 1* y *masquerade* presentan un patrón de expresión similar frente a cipermetrina y deltametrina (piretroides), además de observarse una sobreexpresión de dichos genes en comparación al grupo control. Con respecto a *serpina 3*, esta no presenta variaciones en entre el grupo control, azametifos y cipermetrina, pero si frente a deltametrina, mientras que *homólogo de serina proteasa 2* no presenta variaciones en ningún caso. Por último, *fenoloxidasa* presenta un patrón de expresión similar frente a azametifos y cipermetrina además de observarse una sobre expresión en comparación al control y a los individuos con deltametrina, mientras que en *profenoloxidasa* se observa un patrón similar de expresión a azametifos y deltametrina (Fig. 12), pero estos genes presentan una supresión al ser comparados con el grupo control.

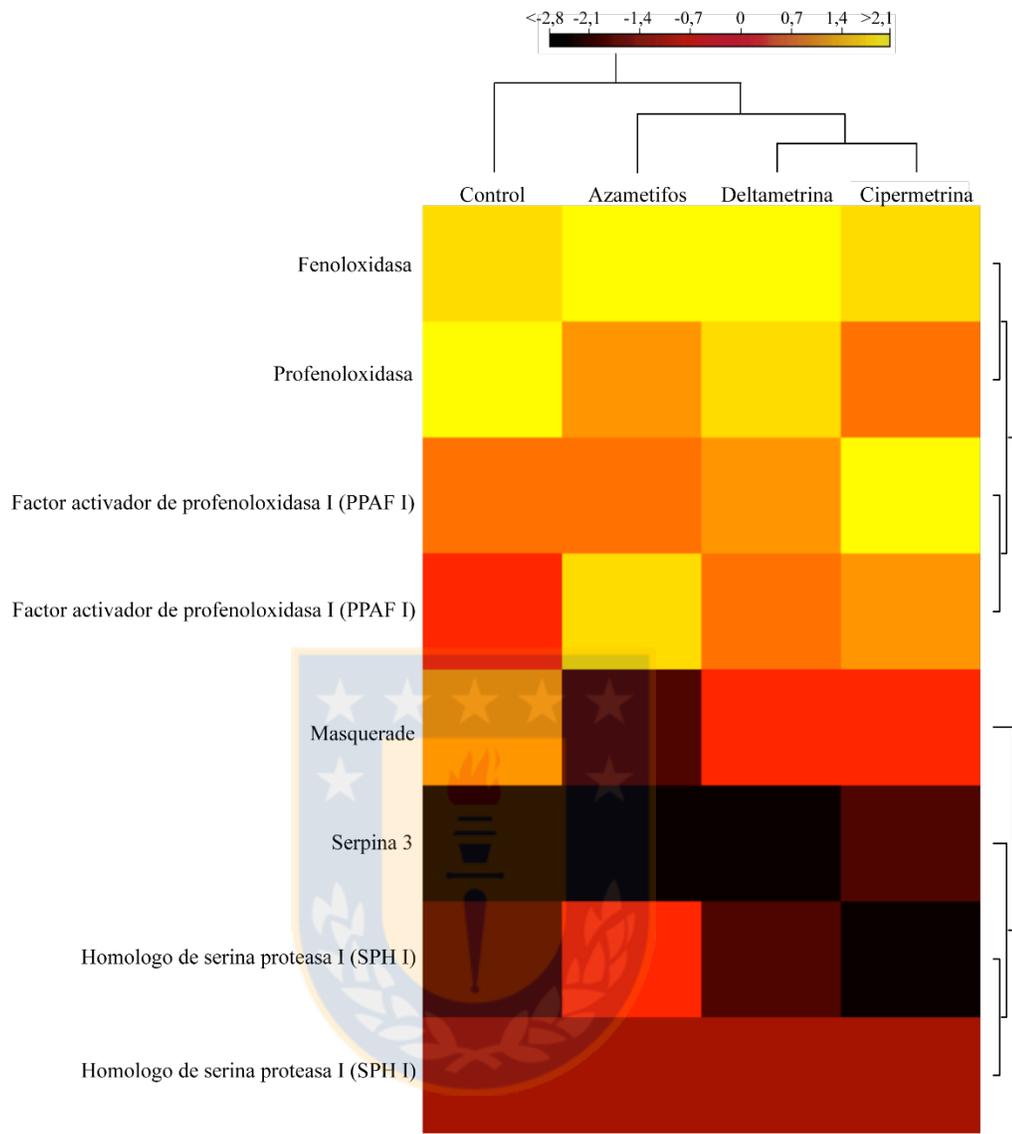


Figura 12. Heat-map de los genes relacionados al sistema proPO en *C. rogerscresseyi* expuestos a Azametifos, Deltametrina y Cipermetrina. La abundancia de transcritos se representa como valores de TPM. Las escalas de color muestran la expresión relativa del transcrito negro (bajo), rojo (medio) a amarillo (alto). Fuente: Elaboración propia.

### 3.2.2 Validación por RT-qPCR.

Se observa que *masquerade* presenta un patrón similar al observado en el análisis de RNA-seq (Fig.13), el cual presenta menores niveles de expresión frente a los antiparasitarios en relación al control, además de presentar un patrón de expresión similar frente a cipermetrina y deltametrina. Por otra parte se observa que *PPO* es suprimido frente a los quimioterapéuticos al compararlos con el control. Por ultimo *PO* se sobre expresa frente a los quimioterapéuticos observándose además un patrón de expresión similar frente a azametifos y cipermetrina (Fig. 13).

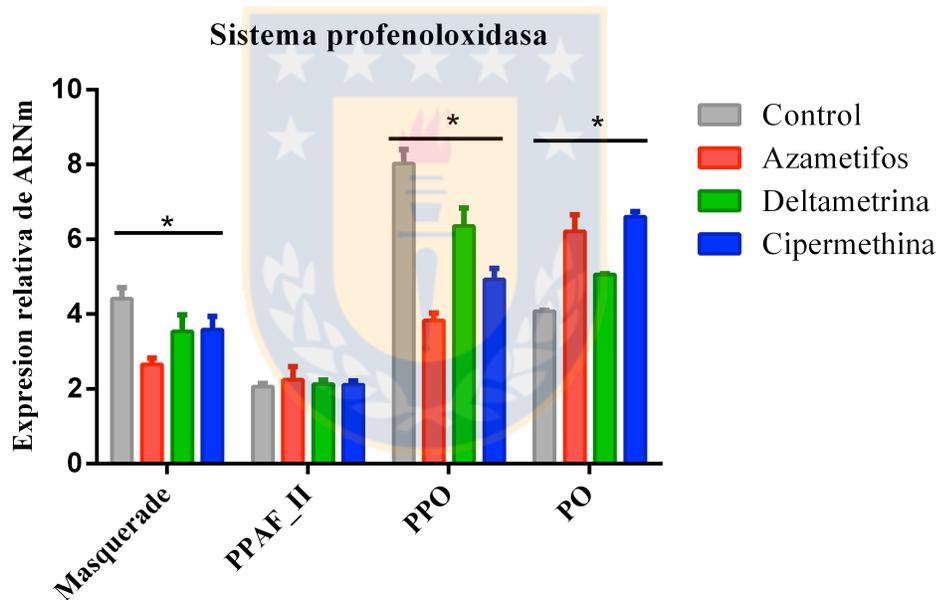


Figura 13. Análisis de expresión de transcritos de *Masquerade* (Cr\_Masquerade), *factor activador de profenoloxidasa II* (Cr\_PPAF II), *profenoloxidasa* (Cr\_PPO) y *fenoloxidasa* (Cr\_PO) en *C. rogercresseyi* expuestos a Azametifos, Deltametrina y Cipermetrina. El nivel de expresión se normalizó mediante el control endógeno  $\beta$  tubulina. Los datos se presentan como la expresión media  $\pm$  desviación estándar. Los asteriscos en la parte superior de las barras indican diferencias significativas para diferentes etapas de desarrollo (prueba Tukey HSD,  $P < 0,05$ ). Fuente: Elaboración propia.

### 3.2.3 Identificación de SNP

A partir de los reads obtenidos de la secuenciación de los individuos provenientes de los bioensayos (XI Región), se identificaron 9 SNPs en total de las secuencias de los genes analizados. Entre los SNPs identificados se observaron 5 transversiones y 4 transiciones (Tabla 3), dichos SNPs se encuentran la región codificante de cada secuencia.

Tabla 3. Identificación de SNP no sinónimos en genes relacionados con el sistema profenoloxidasa en *C. rogercresseyi*. Fuente: Elaboración propia.

Gen	Posicion	SNP	Frecuencia	Cambio aminoacidico	Mutacion
Fenoloxidasa	288	T/A	78,9	Asp/Glu	Transversion
ProFenoloxidasa	188	A/G	53,4	Asp/Gly	Transición
Factor activador de Profenoloxidasa I (PPAF I)	218	A/C	73	Asn/Thr	Transversion
Factor activador de Profenoloxidasa II (PPAF II)	160	T/C	82,4	Phe/Leu	Transición
Factor activador de Profenoloxidasa II (PPAF II)	416	A/C	70,0	Tyr/Ser	Transversion
Homologo de serina proteasa I (SPH I)	491	G/A	89,2	Arg/Lys	Transición
Homologo de serina proteasa II (SPH II)	900	A/T	72	Glu/Asp	Transversion
Masquerade	350	C/A	80	Ser/Tyr	Transversion
Masquerade	490	A/G	75	Thr/Arg	Transición

### 3.3. Análisis genes relacionados con antiparasitarios

#### 3.3.1 Análisis de RNA-seq de *C. rogercresseyi* expuestos a antiparasitarios

El análisis de RNA-seq se realizó utilizando los datos obtenidos de la secuenciación de *C. rogercresseyi* provenientes de los distintos bioensayos: control, azametifos, deltametrina y cipermetrina. Del análisis se observa que el *transportador de Na-K* presenta una sobre expresión en los individuos control, azametifos y cipermetrina y es suprimido en los individuos desafiados con deltametrina (Fig. 14), por otra parte *prohibitina 2* muestra un patrón contrario al observado con *transportador de Na-K*, siendo sobre expresado frente a deltametrina y suprimido frente a los demás antiparasitarios (Fig. 14). Con respecto a *carboxilesterasa* y *glicoproteína P (P-gp)* se evidencia un patrón de expresión inverso entre ellas, por una parte *carboxilesterasa* es sobre expresada frente a deltametrina y reprimida su expresión frente a azametifos y cipermetrina, mientras que *P-gp* es sobre expresada frente a estos últimos antiparasitarios y reprimida frente a deltametrina (Fig. 14). Por otra parte se observa que el *receptor neuronal de acetilcolina (nACh)*, *tropomiosina*, *transportador ABC\_C* y *colageno alfa* presentan un patrón de expresión similar frente a deltametrina y cipermetrina (Fig. 14). Con respecto a *glutation-s-transferasa (gst)* este es sobre expresado frente a los tres antiparasitarios; mientras que *quitinasa* es reprimido. Además, se observa que en el caso de *citocromo P-450*, este solo es sobre expresado frente a cipermetrina y frente a los demás antiparasitarios no muestra variaciones en sus niveles de expresión (Fig. 14). Por último, *acetilcolinesterasa (AChE)* es reprimido frente a azametifos y cipermetrina, mientras que es sobre expresado frente a deltametrina (Fig. 14).

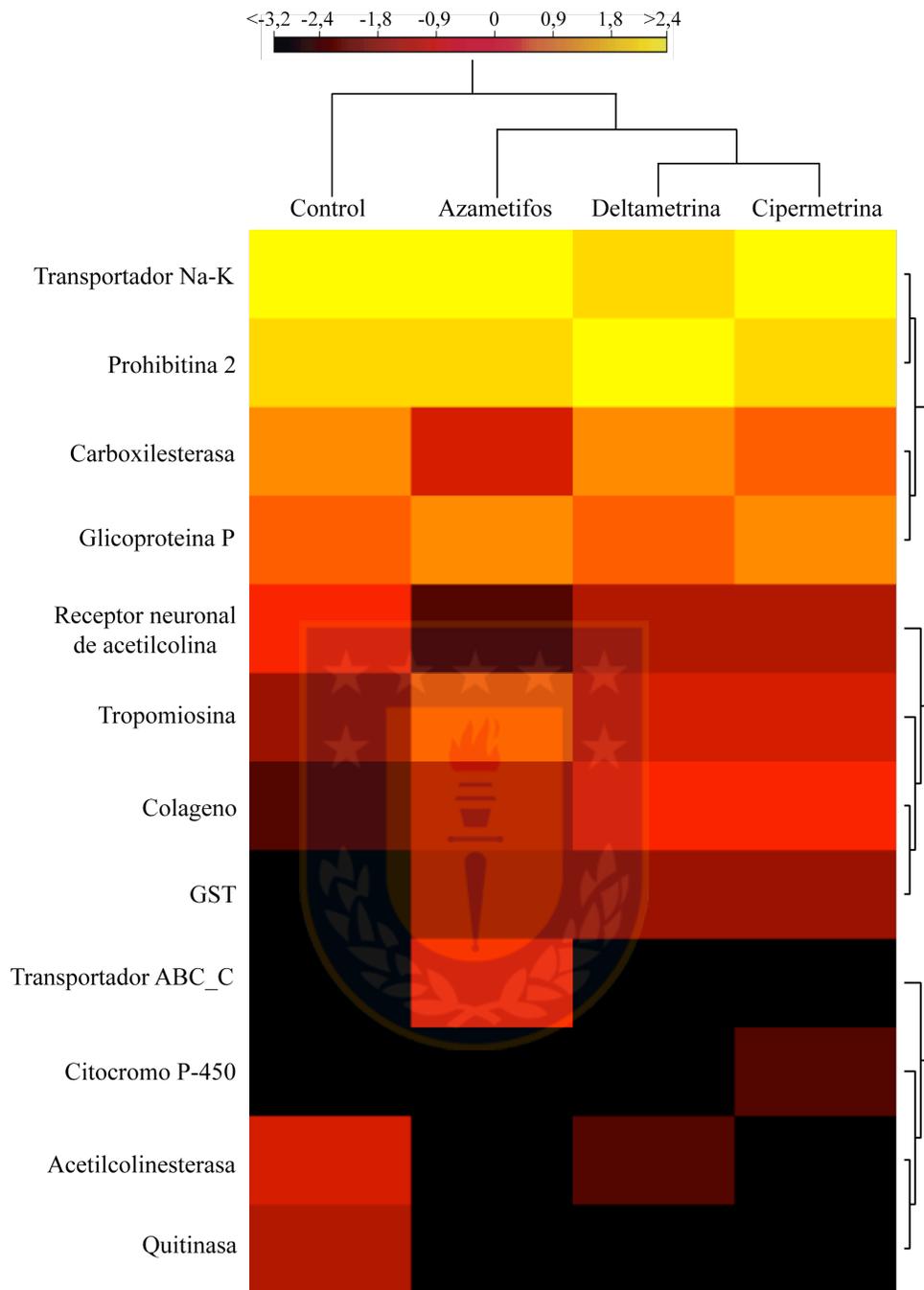


Figura 14. Heat-map de los genes involucrados en distintos procesos relacionados con la respuesta a antiparasitarios en *C. rogercresseyi* expuestos a Azametifos, Deltametrina y Cipermetrina. La abundancia de transcritos se representa como valores de TPM. Las escalas de color muestran la expresión relativa del transcrito negro (bajo), rojo (medio) a amarillo (alto). Fuente: Elaboración propia.

### 3.3.2 Identificación de SNP

A partir de los reads obtenidos de la secuenciación de los individuos provenientes de los bioensayos (XI Región), se identificaron 18 SNPs en total de las secuencias de los genes analizados. Entre los SNPs identificados se observaron 10 transversiones y 8 transiciones (Tabla 4), dichos SNPs se encuentran la región codificante de cada secuencia.

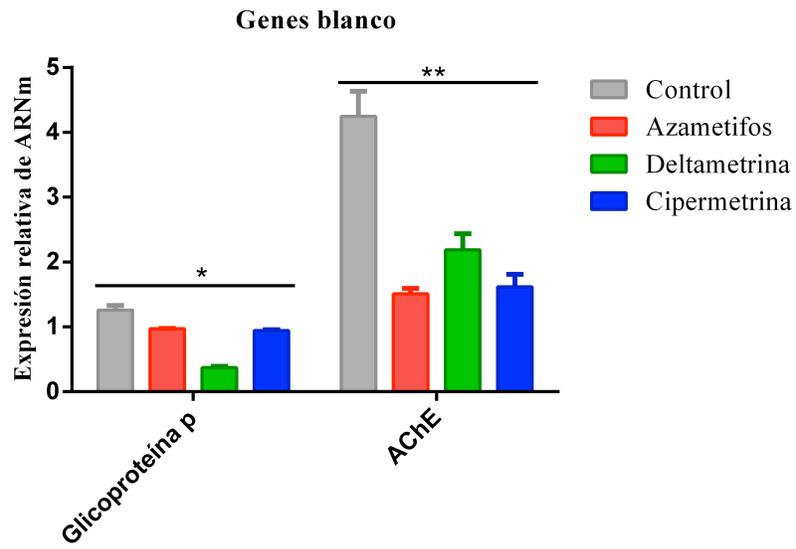
**Tabla 4.** Identificación de SNP no sinónimos en genes relacionados con procesos moleculares de respuesta frente a antiparasitarios en *C. rogercresseyi*. Fuente: Elaboración propia.

	Gen	Posicion	SNP	Frecuencia	Cambio aminoacido	Mutación
Azametifos	AChE	3143	A/C	66,7	Lys/Gln	Transversión
	Citocromo P-450	2042	T/G	93,3	Gln/His	Transversión
	Carboxilesterasa	1733	C/A	82,1	ASP/Glu	Transversión
	Colageno	2127	G/C	56,5	Ser /Thr	Transversión
	Prohibitina-2	406	C/A	87,2	Arg/Ser	Transversión
	nACh	628	C/T	50	Pro/Ser	Transición
	Tropomiosina	2711	G/A	47,1	Val/Ile	Transición
Deltametrina/ Cipermetrina	P-gp	2286	G/C	75	Gln/His	Transversión
	Citocromo P-450	2053	T/G	91,5	Leu/Arg	Transversión
	Carboxilesterasa	1460	A/G	50	Glu/Gly	Transición
	Transportador ABC_C	2500	T/C	73,7	Phe/Leu	Transición
	Colageno	3877	C/T	56,7	Leu/Val	Transición
	Prohibitina-2	724	T/G	93,8	Tyr/Asp	Transversión
	nACh	802	G/T	50	Gly/Trp	Transversión
Deltametrina	Tropomiosina	2064	G/A	73,7	Ala/Glu	Transición
	Transportador Na-K	2017	C/A	75,0	Glu/Lys	Transversión
Cipermetrina	GST	816	T/G	55,6	His/Glu	Transversión
	Transportador Na-K	817	A/G	81,5	Val/Ile	Transición

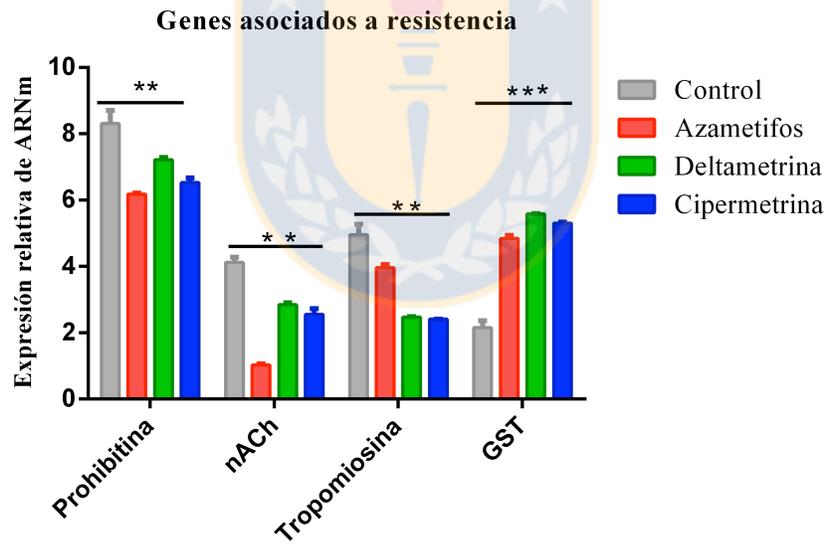
### 3.3.3 Validación por RT-qPCR

A partir de partidores diseñados en estudios previos se realizó el análisis de expresión transcriptómica desde RNA total extraído de *C. rogerscresseyi* de cada bioensayo. La expresión relativa fue normalizada utilizando  $\beta$ - tubulina como housekeeping. Se observa que *P-gp* y *AChE*, genes blanco de piretroides (deltametrina y cipermetrina) y organofosforados (azametifos) son reprimidos en su expresión frente a los tres antiparasitarios (Fig. 15A). Por otra parte se observa que *prohibitina 2*, *nACh* y *tropomiosina*, genes relacionados con resistencia a antiparasitarios descritos por bibliografía, también son reprimidos frente a los antiparasitarios empleados y en casos como *tropomiosina* y *nACh* se observan niveles de expresión similares frente a los piretroides, sin embargo *GST* es sobre expresado (Fig. 15B). Con respecto a los genes relacionados con procesos de detoxificación se observa que *carboxilesterasa* y *transportador de Na-K* son reprimidos frente a los antiparasitarios, a excepción de *citocromo p-450* y *ABC*, quienes son sobreexpresados frente a cipermetrina y azametifos respectivamente; *carboxilesterasa* muestra un patrón de expresión similar frente a piretroides (Fig. 15C). Por último, al analizar los genes relacionados con la síntesis de quitina, se observa que *quitinasa* y *colágeno alfa* son reprimidos mayormente frente a azametifos y a su vez presentan un patrón de expresión similar frente a los piretroides (Fig. 15D).

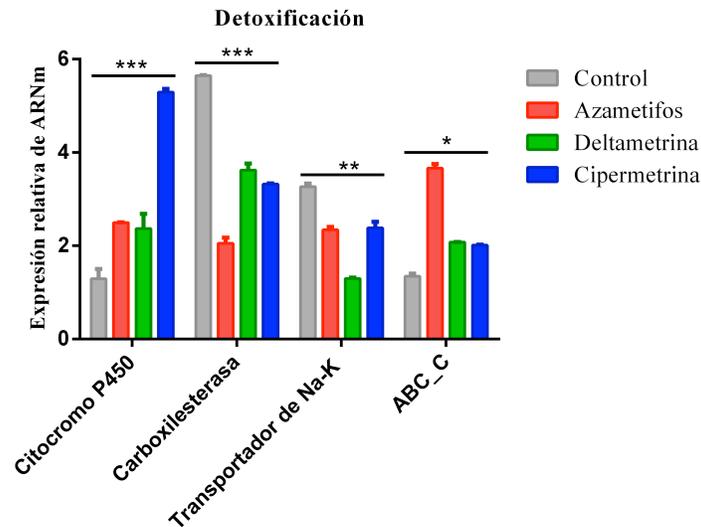
A



B



C



D

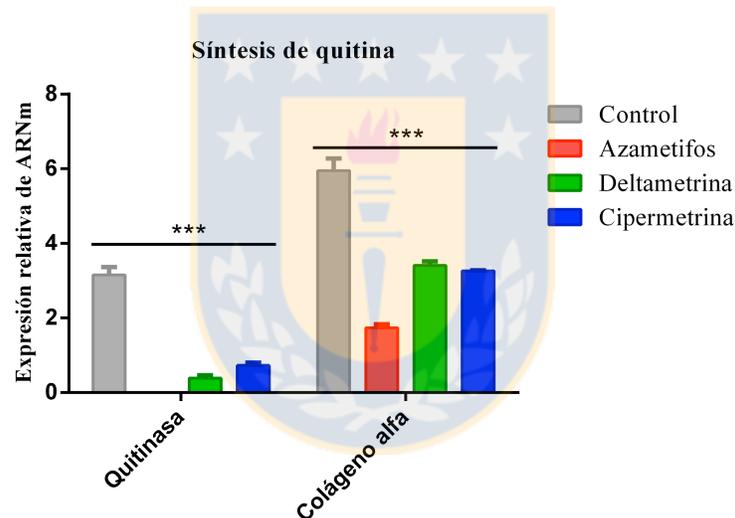


Figura 15. Expresión de genes relacionados con distintos procesos moleculares asociados a antiparasitarios en *C. rogercresseyi* expuestos a azametifos, deltametrina y cipermetrina. Donde A) Genes blanco de azametifos y piretroides; B) Genes asociados a resistencia; C) Genes relacionados con procesos de detoxificación y D) Genes relacionados con la síntesis de quitina. El nivel de expresión se normalizó mediante el control endógeno  $\beta$  tubulina. Los datos se presentan como la expresión media  $\pm$  desviación estándar. Asteriscos en la parte superior de las barras indican diferencias significativas en relación al control (Prueba Tukey HSD,  $P < 0,05$ ). Fuente: Elaboración propia.

### 3.3.4 Análisis RNA-seq de *C. rogercresseyi* provenientes de diferentes zonas expuestos a azametifos y deltametrina

Por otra parte se realizó una comparación, mediante RNA-seq, en los niveles de expresión de los distintos grupos de genes analizados previamente en individuos provenientes de dos zonas con diferentes grados de efectividad de azametifos y deltametrina, siendo los individuos provenientes de la X Región aquellos que han evidenciado una menor efectividad a antiparasitarios y la XI Región los que presentan una mayor efectividad. Se observa que en el caso de los individuos desafiados con azametifos presentan variaciones en los niveles de expresión entre poblaciones, y solo uno de los genes analizados, *nACh* no evidencia variaciones entre zonas (Fig. 16A). Con respecto al caso de los caligus desafiados con deltametrina, se observa que gran parte de los genes analizados presentan diferencias en los niveles de expresión entre regiones, sin embargo *AChE* y *nACh*, genes blanco de azametifos no evidencian diferencias de expresión entre zonas (Fig. 16B). Se sugiere que estas variaciones se explicarían debido a la presencia de los SNP presentes en los individuos provenientes de la XI región (Tabla 4) los cuales no están presentes en los individuos de la X Región.

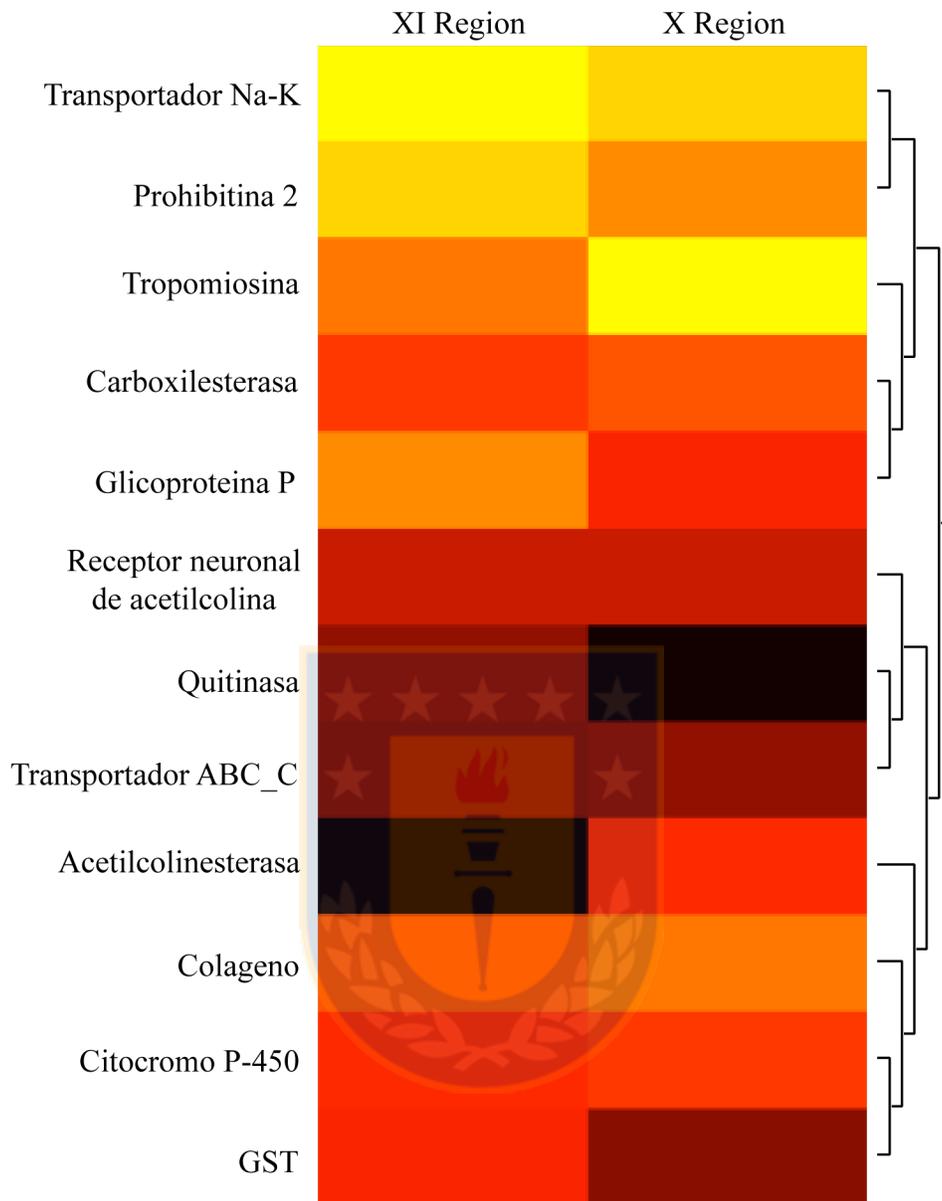


Figura 16 A. Heat-map de los genes relacionados con distintos procesos moleculares en *C. rogercresseyi* expuestos a Azametifos provenientes de zonas con diferentes eficacias de tratamientos (XI Región (mayor eficacia) y X Región (menos eficacia) ).La abundancia de los transcritos se representa como valores de TPM Las escalas de color muestran la expresión relativa del transcrito negro (bajo), rojo (medio) a amarillo (alto). Fuente: Elaboración propia.

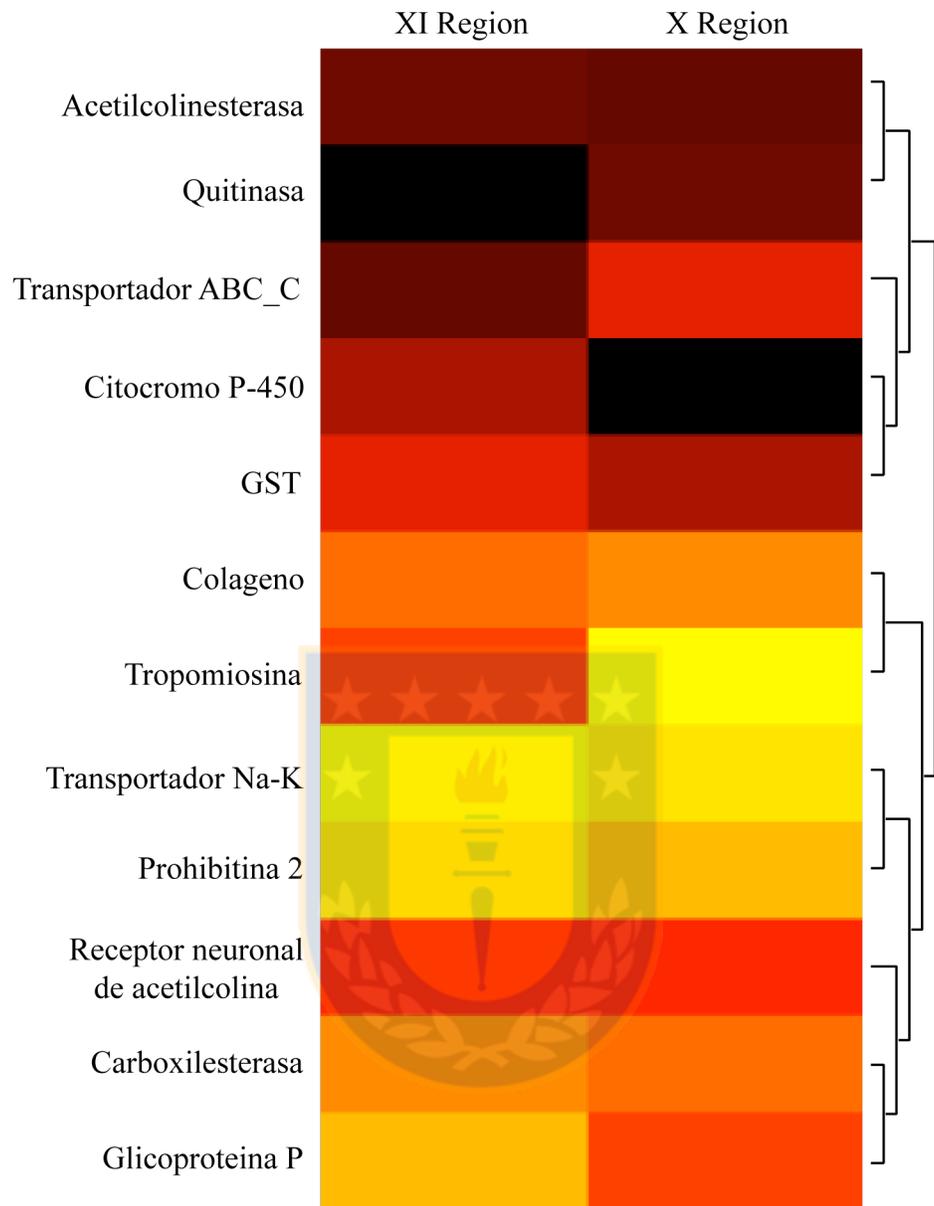


Figura 16 B. Heat-map de los genes relacionados con distintos procesos moleculares en *C. rogercresseyi* expuestos a Deltametrina provenientes de zonas con diferentes eficacias de tratamientos (XI Región (mayor eficacia) y X Región (menos eficacia)). La abundancia de los transcritos se representa como valores de TPM. Las escalas de color muestran la expresión relativa del transcrito negro (bajo), rojo (medio) a amarillo (alto). Fuente: Elaboración propia.

## 4. Discusión

### 4.1 Evaluación de genes involucrados en el sistema profenoloxidasa en diferentes etapas de desarrollo de *C. rogercresseyi*

La activación del sistema profenoloxidasa en invertebrados es fundamental para llevar a cabo el proceso de melanización, generando con esto la muerte de parásitos, hongos y bacterias (Cerenius and Söderhäll, 2004, Cerenius et al., 2008, González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2012). En estudios previos de genes relacionados con la respuesta inmune de *C. rogercresseyi* se ha observado diferencias de expresión a nivel transcripcional de genes relacionados con las vías TLR e IMD durante diferentes etapas de desarrollo de *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Muñoz and Gallardo-Escárdate, 2014). Además, se ha reportado un incremento en los niveles de expresión de los genes de las vías TLR e IMD en *C. rogercresseyi* durante la infestación en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y salmon coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Vera-Bizama et al., 2015). En este estudio se identificaron ocho genes relacionados con el sistema profenoloxidasa en el transcriptoma de *C. rogercresseyi*, los cuales fueron evaluados durante las etapas de desarrollo de este ectoparásito. Del análisis RT-qPCR, se observa una sobreexpresión de genes como *masquerade*, *SPH1*, *SPH2*, *PPAF I*, *PPO* y *PO* en las etapas de copepodito y chalimus de *C. rogercresseyi*, etapas en las cuales comienza la infestación y asentamiento de *C. rogercresseyi* en su hospedador. Por otra parte, la activación del sistema profenoloxidasa durante el asentamiento de *C. rogercresseyi* en su hospedero, podría deberse a la presencia de microbiota en la superficie del pez (Landeira-Dabarca et al., 2013), la cual juega un rol crítico en la defensa contra invasión por patógenos. Esta microbiota podría ser reconocida por parte de *C. rogercresseyi* debido a la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Landeira-Dabarca et al., 2013), ya que se ha observado en estudios con cangrejos de río que en presencia de PAMP se genera una activación de *PPA* y la siguiente cascada de señalización del sistema proPO (Aspán et al., 1990). Por otra parte, la presencia de proteasas secretadas por el pez al momento de la infección, podría ser además otra manera mediante la

cual se activaría el sistema profenoloxidasa de este ectoparásito, lo que le permitiría continuar con el proceso de infestación en su hospedero. Esta secreción de proteasas como mecanismo de respuesta a ectoparásitos se ha reportado en salmónidos infectados con *Lepeophtheirus salmonis*, evidenciándose que frente a este ectoparásito se elevan los niveles de proteasas con el fin de contrarrestar la infestación (Lewis et al., 2014). En estudios realizados en cultivos celulares utilizando hemocitos de *Ciona intestinalis* mostraron que en presencia de proteasas se observa un aumento en la actividad de profenoloxidasa como mecanismo de respuesta (M. and N., 2009), lo cual permite sugerir que en respuesta a proteasas secretadas por el pez, *C. rogercresseyi* sería capaz de responder mediante el sistema proPO.

Adicionalmente, se sabe que la melanina producida por la activación del sistema proPO poseen una alta afinidad a metales y radicales libres, como los producidos por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wang et al., 1995, Gan et al., 1976, Commoner et al., 1954). Asimismo, se ha observado en células melánicas de *Cryptococcus neoformans* muestran ser más resistentes a ROS frente a aquellas no melánicas (Wang et al., 1995). Por otra parte, peces infectados por *L. salmonis* presentan un incremento de tiorredoxina en la piel, metaloproteinasas y citoquinas pro-inflamatorias y amiloide A sérico, provocando un aumento en la producción de ROS en la piel de los peces (M. and N., 2009, Hatanaka et al., 2011, Del Carlo et al., 2007, Sutherland et al., 2014, Tadiso et al., 2011). Es por estos antecedentes que el sistema proPO podría ser utilizado como una respuesta de *C. rogercresseyi* frente al mecanismo de defensa gatillado en su hospedador durante la infestación.

Por otra parte, existen antecedentes que vinculan al sistema profenoloxidasa, con la esclerotización de cutícula, debido a que los quinones citotóxicos que se generan producto de la melanización son utilizados en dicho proceso (Lu et al., 2014). La formación de melanina en insectos ocurre durante el endurecimiento y oscurecimiento de la cutícula luego de la muda durante el desarrollo del individuo o en respuesta a heridas (Marmaras et al., 1996). Se ha evidenciado que en *Ceratitis capitata* existe una generación de tirosinas reactivas

generadas por la actividad de *fenoloxidasa*, que permiten la generación de proteínas de quitina que son utilizadas durante el proceso de esclerotización (Marmaras et al., 1996). Estudios realizados en el mosquito *Anopheles stephensi* desafiados con el parásito de la malaria *Plasmodium berghei* mostraron una alta actividad de *PO*, además al evaluar la expresión de *PPO* durante diferentes etapas de desarrollo de este mosquito, se observaron altos niveles en etapas larvales, pupa y adultos (Cui et al., 2000). Además, se ha observado que durante la etapa prepupa de *Manduca sexta* existe un aumento de protirosinasa en la hemolinfa, la que actúa como precursor de tirosinasas cuticulares, las cuales se encargan de sintetizar catecolaminas y quinonas utilizadas para la estabilización cuticular y pigmentación (Aso et al., 1985). Por otra parte, estudios en *L. salmonis* muestran que *Clip domain containing serine peptidases (CSP)*, involucrada en la activación de *profenoloxidasa*, es sobre expresada durante el desarrollo de este ectoparásito en tejido subcuticular (Skern-Mauritzen et al., 2007). En relación a *C. rogercresseyi*, estudios previos han identificado y evaluado *in silico* genes involucrados con la biosíntesis de cutícula, observándose altos niveles de transcripción de genes como *cuticulin* y *P4H* en etapas tempranas de este ectoparásito (Chávez-Mardones et al., 2016). Es por lo anterior que es posible plantear la idea de que los altos niveles de expresión de genes involucrados en el sistema profenoloxidasa, durante las etapas de copepodito y chalimus, podrían participar en la síntesis y endurecimiento de cutícula durante los periodos de muda de *C. rogercresseyi*.

Otro de los objetivos en este estudio fue analizar si existía una modulación del sistema profenoloxidasa frente a antiparasitarios, para ello se analizaron estos genes, en *C. rogercresseyi* enfrentados a azametifos, deltametrina y cipermetrina, mediante RNA-seq y RT-PCR. De dichos análisis se observó que genes como *Factor activador de Profenoloxidasa I y II*, *homólogo de serina proteasa 1* y *masquerade* presentan un patrón de expresión similar frente a cipermetrina y deltametrina (piretroides), mientras que *fenoloxidasa* presenta un patrón de expresión similar frente a azametifos y cipermetrina, que es mayor en relación al control, en cambio *profenoloxidasa* presenta un patrón frente a azametifos y

deltametrina. Es conocido que la cutícula es una de las barreras físicas importante en el factor de penetración de antiparasitarios (Vannini et al., 2014). Estudios en distintas especies de insectos han demostrado que las variaciones en el grosor de la cutícula tienen un efecto significativo en la susceptibilidad a los insecticidas (Vannini et al., 2014). Otro ejemplo que vincula el grosor de la cutícula con diferencias en la susceptibilidad frente a antiparasitarios es el observado en cepas resistentes y susceptibles a  $\beta$ -cipermetrina donde se observó que individuos menos susceptibles al antiparasitario presentaron un grosor 6  $\mu\text{m}$  que los altamente susceptibles al antiparasitario (Lin et al., 2012). Estudios en *C. rogercresseyi*, evaluaron genes relacionados con la síntesis de quitina en individuos expuestos a azametifos y deltametrina, observándose variaciones en los niveles de transcripción de proteínas asociadas con la formación de cutícula, evidenciándose que las proteínas cutáneas variaron principalmente durante la exposición a la deltametrina (Chávez-Mardones et al., 2016). Teniendo en cuenta estos antecedentes dicho estudio sugiere que individuos menos susceptibles a antiparasitarios presentarían una cutícula mas gruesa, disminuyendo así la tasa de absorción del antiparasitario, evitando con ello la inoculación de los órganos internos y permitiendo una desintoxicación metabólica efectiva (Chávez-Mardones et al., 2016). En el mismo estudio se observó que *C. rogercresseyi* expuestos a azametifos mostraron variaciones en los niveles de transcripción de genes precursores cutáneos, incluyendo *PDI*, *P4H*, *colágeno*, *quitinasa* y *quitina sintasa* (Chávez-Mardones et al., 2016).

Los efectos tóxicos de los organofosforados se deben a que generan una hiperactividad del sistema colinérgico como resultado de la acumulación de *ACh* en la hendidura sináptica. Por ende la ruptura de la señalización neuronal y endocrina provoca una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, por lo cual para mantener la homeostasis se debe expulsar dicho  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de la energía, que dependen bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  ATP impulsada por intercambiadores  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Racay et al., 1996, Marín et al., 1998, Ermak and Davies, 2002). Por otra parte, en el sistema de proPO, se requiere  $\text{Ca}^{2+}$  para la conversión de *Factor activador de Profenoloxidasa (PPAF)* a una proteinasa

activa que transforma *PO* a *PO* activo (Gollas-Galván et al., 1999). Con respecto a *fenoloxidasa* y *profenoloxidasa* frente a pesticidas solo se existen estudios previos frente a organofosforados. En un estudio con *Macrobrachium rosenbergii* se analizó la relación de estos genes frente al organofosforado Triclorfón, evidenciándose que en presencia de este pesticida se observa un aumento en la actividad de *fenoloxidasa* (Chang et al., 2013). Por otra parte, observaron que en una etapa más tardía de exposición de Triclorfón se generaba una disminución en la expresión de *profenoloxidasa* (Chang et al., 2013). Estas variaciones también fueron observadas en este estudio, las cuales podrían deberse a una consecuencia del ingreso de  $Ca^{2+}$  extracelular, involucrado en la activación de enzimas proteolíticas intracelulares para activar sistema proPO.

#### **4.2 Análisis de mecanismos de respuesta de *C. rogercresseyi* expuestos a antiparasitarios.**

Con el fin de mitigar la infestación por *C. rogercresseyi*, se han empleado una amplia gama de antiparasitarios, sin embargo se ha observado que este ectoparásito ha presentado una pérdida en la sensibilidad frente a dichos tratamientos (Helgesen et al., 2014, Fallang et al., 2004). Sin embargo no existen estudios que busquen relacionar molecularmente estas diferencias en la efectividad de antiparasitarios. Entre los mecanismos que podrían limitar la efectividad de los antiparasitarios están por ejemplo los relacionados con la presencia de SNP en genes blanco de los antiparasitarios.

En este estudio se analizaron genes relacionados con los blancos de organofosforados y piretroides, así como genes relacionados con procesos de detoxificación y síntesis de cutícula, en *C. rogercresseyi* desafiados con azametifos, deltametrina y cipermetrina. Con respecto a *acetilcolinesterasa* (*AChE*), uno de los genes blanco de azametifos analizado, se observa que individuos expuestos a este antiparasitario presentaron una represión en su expresión en comparación al control, mismo patrón observado en *nACh*, lo que se debería a que su objetivo es actuar sobre dichos genes, los cuales están

relacionados con el sistema nervioso y muscular de los individuos, sobreestimulándolos para provocar la parálisis y posterior muerte del parásito (Walsh et al., 2007, Smulders et al., 2004). En estudios previos donde se evaluó la modulación transcripómica de *C. rogercresseyi* expuestos a pesticidas, se observó este mismo patrón de expresión de *nACh* en individuos expuestos a azametifos (Valenzuela-Muñoz et al., 2015a). Con respecto a *AChE*, estudios en *Tetranychus urticae* expuestos a organofosforados han evidenciado que individuos resistentes a este tipo de antiparasitarios presentan una sobre expresión de *AChE*, mientras que aquellos susceptibles presentaban una supresión (Kwon et al., 2012). En base a los resultados obtenidos de estos genes y comparando con estudios previos confirmaría un efecto directo de este antiparasitario sobre estos receptores de los individuos de *C. rogercresseyi* analizados. Además se observó un patrón de expresión similar frente a piretroides en *tropomiosina*, *gst* y *prohibitina 2*. Con respecto a *tropomiosina*, este está involucrado en procesos de contracción muscular, sin embargo se ve reprimido frente a piretroides, esto permite sugerir que este tipo de antiparasitario causaría un efecto mayor en este gen que el generado por azametifos. Con respecto a *gst*, estudios previos en *C. rogercresseyi* expuestos a deltametrina han evidenciado una sobre expresión frente a dicho antiparasitario (Chavez-Mardones and Gallardo-Escárte, 2014), lo mismo observado en este estudio, lo cual permite evidenciar el efecto antioxidante de debe desarrollar *C. rogercresseyi* en presencia de estos antiparasitarios. Existen antecedentes en *Palaemon serratus*, donde evaluaron la actividad de *gst* luego de ser expuestos a diferentes concentraciones de deltametrina durante 96 hr, evidenciándose que la actividad de *gst* se incrementa significativamente tras el aumento de la concentración de deltametrina (Oliveira et al., 2012). Con respecto a *prohibitina 2*, gen importante en procesos como reproducción en *C. rogercresseyi* (Farlora et al., 2015), este evidenció una sobre expresión frente a deltametrina, lo cual permitiría sugerir que este tipo de antiparasitario sería importante al afectar procesos como la reproducción de *C. rogercresseyi*.

Con respecto a las proteínas involucradas en el proceso de detoxificación, estas son capaces de reconocer el sustrato y transportarlos a nivel celular,

evitando así daños celulares (Pohl et al., 2012). En relación a genes involucrados con procesos de detoxificación, *P-gp* mostró una sobre expresión frente a azametifos y cipermetrina, en cambio frente a deltametrina no mostro diferencias con el control, lo cual podría deberse a que frente a deltametrina no genera un correcto proceso de detoxificación, en cambio frente a cipermetrina y azametifos si. Estudios en *L. salmonis* (Tribble et al., 2007) y *C. rogercresseyi* (Cárcamo et al., 2011) han logrado relacionar la pérdida de la sensibilidad a benzoato de emamectina (EMB) con la respuesta transcriptómica de *P-gp*. Por ejemplo, en el estudio realizado en *L. salmonis* se encontró que el gen *P-gp* aumenta significativamente su nivel de expresión tras la exposición a 10ppb de EMB durante 24hr (Tribble et al., 2007). De la misma forma, el trabajo realizado en *C. rogercresseyi* revela que el gen *P-gp* es sobre expresado tras la exposición a EMB, al igual que los genes del *citocromo P450* (*CYP2K1*, *CYP2M1*, *CYP3A* y *CYP3A27*) (Cárcamo et al., 2011). Además se ha determinado que individuos expuestos a deltametrina también evidencian una sobre expresión de *P-gp* (Valenzuela-Muñoz et al., 2015c). Por otra parte *carboxilesterasa* presentó variaciones frente a azametifos (reprimido) y cipermetrina (sobreeexpresado), lo que permite sugerir que frente a azametifos se ve afectado, quizás limitando el proceso de detoxificación del antiparasitario, en cambio frente a cipermetrina podría verse involucrado en la detoxificación de este antiparasitario. Con respecto a *citocromo P-450* este estaría siendo activado frente a cipermetrina, un patrón similar se ha observado en estudios previos en *C. rogercresseyi* expuestos a deltametrina, donde se observó que aquellos individuos menos susceptibles a deltametrina evidencian una sobre expresión de *citocromo P-450* (Valenzuela-Muñoz et al., 2015b). Con respecto al *transportador ABC\_C* este es sobre expresado frente a deltametrina. Este transportador fue identificado previamente en *C. rogercresseyi* expuestos a deltametrina y azametifos donde se observó que este transportador es modulado frente a dichos antiparasitarios, por lo cual se les confiere un rol importante en el proceso de detoxificación de *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Muñoz et al., 2015b).

Como se ha planteado anteriormente la cutícula es una de las primeras barreras contra insecticidas, y se han observado diferencias en los niveles de transcripción de genes relacionados con la cutícula en cepas de *Cimex lectularius* resistentes a piretroides, lo que explica en parte esta resistencia (Koganemaru et al., 2013). Una observación similar fue realizada en *Melita plumulosa* expuesta a la piretroide bifentrina, donde hubo un nivel disminuido de transcripciones de proteínas asociadas con la cutícula y la quitina (Hook et al., 2014). En *C. rogercresseyi*, se ha observado que azametifos parece afectar la regulación de las proteínas de la cutícula incluso en las etapas post-larvales del piojo del salmón, con menores niveles de transcripción encontrados en adultos expuestos a azametifos en comparación con el control (Chávez-Mardones et al., 2016). En este estudio se observó una represión frente a todos los antiparasitarios, lo cual permitiría sugerir que no solo azametifos afectaría al proceso de cutícula, sino que también los piretroides como se ha visto en estudios previos. Con respecto a *colágeno alfa* este es sobreexpresado frente a piretroides lo cual permitiría relacionar a dichos antiparasitarios con una estimulación en, por ejemplo la formación de cutícula. Se ha evidenciado que el colágeno está implicado en matrices extracelulares, la cual se produce de la trimerización de las tres cadenas de colágeno monoméricas (Page and Johnstone, 2007). En nematodos se ha establecido que el colágeno está involucrado en la formación de dos distintas estructuras, la membrana basal y la cutícula (Johnstone, 2000).

Por otra parte existen estudios donde se ha observado una pérdida en la sensibilidad de *C. rogercresseyi* frente a benzoato de emamectina y deltametrina en varios centros de cultivo, lo que se coincide con un alto valor de EC50, alto número de tratamientos y alta tasa de re infestación. Además en este mismo estudio se evidenció diferencias en la sensibilidad entre *C. rogercresseyi* machos y hembras a los distintos antiparasitarios. Estos antecedentes indican un grave problema en la variación de la efectividad de los tratamientos en una misma macro zona (Agusti et al., 2016). En este estudio se realizó una comparación, mediante RNA-seq, en los niveles de expresión de los distintos grupos de genes analizados previamente en individuos provenientes de dos zonas con diferencias en la

efectividad de azametifos y deltametrina, siendo los individuos provenientes de la X Región aquellos que han evidenciado una menor efectividad a antiparasitarios y la XI Región los que presentan una mayor efectividad, observándose una variación en prácticamente todos los genes analizados. Es por estos antecedentes y los resultados de esta investigación que se sugiere que las diferencias observadas tanto entre pesticidas y grupo control; y a su vez entre poblaciones se podría deber a que esta expresión de dichos genes podrían ser influenciadas por la presencia de polimorfismos moleculares, como los SNP identificados dentro de la secuencia codificante, lo cual causaría las diferencias observadas. Existen estudios donde evalúan la diferencia de efectividad/susceptibilidad a fármacos relacionados con la presencia de SNP. Estudios en *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus decoloratus* han evidenciado la presencia de un SNP en un gen relacionado con canales de sodio dependientes de voltaje, el cual genera el cambio aminoacídico Leu64Ile, snp presente solo en aquellos individuos menos susceptibles a cipermetrina (Wyk et al., 2016). Por otra parte estudios en *Aedes aegypti* identificaron los SNP que generan los cambios aminoacídicos V1016I y F1534C presentes en individuos que presentaron una menor susceptibilidad a deltametrina (Dusfour et al., 2015).

Además, se han realizado estudios relacionados con la pérdida de sensibilidad a organofosforados, uno de ellos en *Culex pipiens*, han evidenciado la presencia de 22 SNPs localizados en la región codificante de *AChE1* los cuales con análisis posteriores se determinó que confieren una pérdida en la sensibilidad al tratamiento con organofosforados (Mao et al., 2013). Un estudio de Kaur et al., 2015 logró identificar a *AChE*, en *L. salmonis* y a partir de esto evaluar si existía una asociación de este gen con la resistencia a organofosforados (azametifos). En dicho estudio evaluaron a una población de *L. salmonis* resistente y otra población sensible a azametifos, evidenciándose la presencia de un polimorfismo no sinónimo que genera la mutación Phe362Tyr en *L. salmonis*, mutación presente en todos los individuos pertenecientes a la población resistente (Kaur et al., 2015). Al analizar la frecuencia del alelo mutante (362Tyr) en las cepas resistentes, bioensayos y ensayos enzimáticos permitió indicar la asociación de la mutación

Phe362Tyr en *L. salmonis* con la reducción de la sensibilidad frente a azametifos (Kaur et al., 2015). Posteriormente se realizó un estudio centrado en validar el mecanismo de resistencia de *L. salmonis* previamente planteado, analizando centros de cultivo que previamente han reportado diferencias en sensibilidad de *L. salmonis* a antiparasitarios en Noruega (Jansen et al., 2016). En este estudio se evidenció la presencia de la mutación Phe362Tyr en las zonas donde el uso de azametifos es más frecuente. Al realizar bioensayos y una posterior genotipificación de *L. salmonis* sobrevivientes y moribundos se observó una regulación negativa en relación a la frecuencia en los alelos de resistencia con respecto a la probabilidad de morir frente a la exposición a azametifos, información con la cual ellos proponen que la mutación identificada es el factor responsable de la resistencia generada por *L. salmonis* a organofosforados (Kaur et al., 2016)



## Conclusión

Este es el primer trabajo en cual se identificó el sistema profenoloxidasa en el ectoparásito *C. rogercresseyi* y además se logró establecer como este sistema es modulado frente a antiparasitarios. Con respecto a los análisis realizados si existe una modulación de este sistema en respuesta a cada antiparasitario, información que podría ser utilizada en posteriores estudios de desafíos.

Por otra parte es el primer trabajo en evaluar el efecto de tres antiparasitarios: azametifos, deltametrina y cipermetrina en *C. rogercresseyi* de un mismo centro de cultivo y además de lograr comparar estos datos con información previamente obtenida de un anterior bioensayo y lograr observar molecularmente como varía la expresión de genes entre distintas regiones. En base a los resultados obtenidos es posible sugerir que estas variaciones entre los individuos expuestos a fármacos y el grupo control; así como las diferencias observadas entre distintas regiones se podrían atribuir a la presencia de SNP no sinónimos en los genes analizados.

Con esta información, se contribuye a un nuevo grupo de genes a estudiar, como los identificados en el sistema profenoloxidasa, así como poder contribuir a comprender molecularmente las diferencias en la efectividad de los antiparasitarios utilizados en la industria nacional. Sin embargo aún faltan estudios donde se evalúen estos genes en *C. rogercresseyi* de más zonas de cultivo de salmónidos, para así evaluar si alguno de los SNP identificados se conservan entre zonas, información con la cual se podría determinar una de las posibles causas en la diferencia en la efectividad de los pesticidas utilizados en la industria nacional.

## PROYECCIONES

Este estudio representa nuevos antecedentes genómicos en *Caligus rogercresseyi*, los cuales permiten una mejor comprensión con respecto a otro posible mecanismo de defensa, como lo sería el sistema profenoloxidasa, frente a antiparasitarios, además de obtener resultados que entregan información que explicarían las diferencias en efectividad de los tratamientos entre diferentes zonas. Sin embargo es necesario el desarrollo de nuevos estudios que permitan profundizar lo planteado en este estudio. Para ello se podrían estudiar de generación de ARN interferentes (ARNi), lo que implicaría el silenciamiento en el estado postranscripcional de un gen blanco. Se sugiere que esto se podría realizar con alguno de los genes del sistema profenoloxidasa identificados en este estudio y ver si dicho silenciamiento afectaría la efectividad de los antiparasitarios estudiados. Por otra parte se podrían realizar estudios a nivel poblacional y epidemiológico basados en la búsqueda de SNP en individuos presentes en diferentes centros de cultivo, con el fin de identificar algún polimorfismo común que encuentre en aquellas zonas con menor eficacia en los tratamientos con el fin de asociar la resistencia farmacológica a la presencia de SNP. Con esta información permitirán el desarrollo de futuros estudios para la generación de cepas resistentes y susceptibles a antiparasitarios, información que en la actualidad es inexistente.

## Referencias

- Agusti, C., Bravo, S., Contreras, G., Bakke, M.J., Helgesen, K.O., Winkler, C., Silva, M.T., Mendoza, J. & Horsberg, T.E. (2016). Sensitivity assessment of *Caligus rogercresseyi* to anti-lice chemicals in relation to treatment efficacy in Chilean salmonid farms. *Aquaculture*, 458: 195-205. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.006>
- Amparyup, P., Charoensapsri, W. & Tassanakajon, A. (2013). Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 34: 990-1001. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.019>
- Aso, Y., Kramer, K.J., Hopkins, T.L. & Lookhart, G.L. (1985). Characterization of haemolymph protyrosinase and a cuticular activator from *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochemistry*, 15: 9-17. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/0020-1790\(85\)90038-1](http://dx.doi.org/10.1016/0020-1790(85)90038-1)
- Aspán, A., Sturtevant, J., Smith, V.J. & Söderhäll, K. (1990). Purification and characterization of a prophenoloxidase activating enzyme from crayfish blood cells. *Insect Biochemistry*, 20: 709-718. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/0020-1790\(90\)90085-9](http://dx.doi.org/10.1016/0020-1790(90)90085-9)
- Ayres, J.S. & Schneider, D.S. (2008). A Signaling Protease Required for Melanization in *Drosophila* Affects Resistance and Tolerance of Infections. *PLoS Biol*, 6: e305. DOI 10.1371/journal.pbio.0060305
- Bariami, V., Jones, C.M., Poupardin, R., Vontas, J. & Ranson, H. (2012). Gene Amplification, ABC Transporters and Cytochrome P450s: Unraveling the Molecular Basis of Pyrethroid Resistance in the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6: e1692. DOI 10.1371/journal.pntd.0001692
- Bourguinat, C., Ardelli, B.F., Pion, S.D.S., Kamgno, J., Gardon, J., Duke, B.O.L., Boussinesq, M. & Prichard, R.K. (2008). P-glycoprotein-like protein, a possible genetic marker for ivermectin resistance selection in *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 158: 101-111. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.017>
- Bravo, S. (2010). The reproductive output of sea lice *Caligus rogercresseyi* under controlled conditions. *Experimental Parasitology*, 125: 51-54. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.12.001>
- Bravo, S., Nuñez, M. & Silva, M.T. (2013). Efficacy of the treatments used for the control of *Caligus rogercresseyi* infecting Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in a new fish-farming location in Region XI, Chile. *Journal of Fish Diseases*, 36: 221-228. DOI 10.1111/jfd.12023
- Cárcamo, J.G., Aguilar, M.N., Barrientos, C.A., Carreño, C.F., Quezada, C.A., Bustos, C., Manríquez, R.A., Avendaño-Herrera, R. & Yañez, A.J. (2011). Effect of emamectin benzoate on transcriptional expression of cytochromes P450 and the multidrug transporters (Pgp and MRP1) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the sea lice *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, 321: 207-215. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.012>
- Carmichael, S.N., Bron, J.E., Taggart, J.B., Ireland, J.H., Bekaert, M., Burgess, S.T.G., Skuce, P.J., Nisbet, A.J., Gharbi, K. & Sturm, A. (2013). Salmon lice

- (*Lepeophtheirus salmonis*) showing varying emamectin benzoate susceptibilities differ in neuronal acetylcholine receptor and GABA-gated chloride channel mRNA expression. *BMC Genomics*, 14: 408-408. DOI 10.1186/1471-2164-14-408
- Cerenius, L., Lee, B.L. & Soderhall, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in immunology*, 29: 263-71. DOI 10.1016/j.it.2008.02.009
- Cerenius, L. & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198: 116-126. DOI 10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x
- Clayton, A.M., Dong, Y. & Dimopoulos, G. (2014). The Anopheles innate immune system in the defense against malaria infection. *Journal of innate immunity*, 6: 169-181. DOI 10.1159/000353602
- Collins, F.H., Sakai, R.K., Vernick, K.D., Paskewitz, S., Seeley, D.C., Miller, L.H., Collins, W.E., Campbell, C.C. & Gwadz, R.W. (1986). Genetic selection of a Plasmodium-refractory strain of the malaria vector Anopheles gambiae. *Science (New York, NY)*, 234: 607-10.
- Commoner, B., Townsend, J. & Pake, G.E. (1954). Free Radicals in Biological Materials. *Nature*, 174: 689-691.
- Costello, M.J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology*, 22: 475-483. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.006>
- Cui, L., Luckhart, S. & Rosenberg, R. (2000). Molecular characterization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria mosquito Anopheles stephensi. *Insect molecular biology*, 9: 127-37.
- Chang, C.-C., Rahmawaty, A. & Chang, Z.-W. (2013). Molecular and immunological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to the organophosphorus insecticide, trichlorfon. *Aquatic Toxicology*, 130-131: 18-26. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.024>
- Charles, J.P. (2010). The regulation of expression of insect cuticle protein genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 205-213. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.12.005>
- Chávez-Mardones, J., Asencio, G., Latuz, S. & Gallardo-Escárate, C. (2015). Hydrogen peroxide modulates antioxidant system transcription, evidencing sex-dependent responses in *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture Research*: n/a-n/a. DOI 10.1111/are.12939
- Chavez-Mardones, J. & Gallardo-Escárate, C. (2014). Deltamethrin (AlphaMax™) reveals modulation of genes related to oxidative stress in the ectoparasite *Caligus rogercresseyi*: Implications on delousing drug effectiveness. *Aquaculture*, 433: 421-429. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.017>
- 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. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.017>

- Del Carlo, M., Schwartz, D., Erickson, E.A. & Loeser, R.F. (2007). Endogenous production of reactive oxygen species is required for stimulation of human articular chondrocyte matrix metalloproteinase production by fibronectin fragments. *Free Radical Biology and Medicine*, 42: 1350-1358. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.035>
- Del Pilar Castillo, M., Ander, P. & Stenstrom, J. (1997). Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations. *Biotechnology Techniques*, 11: 701-706. DOI 10.1023/a:1018423829918
- Del Pilar Castillo, M., Ander, P., Stenström, J. & Torstensson, L. (2000). Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in two solid substrate fermentation systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 289-295. DOI 10.1023/a:1008936617596
- 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. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.001>
- Dusfour, I., Zorrilla, P., Guidez, A., Issaly, J., Girod, R., Guillaumot, L., Robello, C. & Strode, C. (2015). Deltamethrin Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* Populations from Three French Overseas Territories Worldwide. *PLoS Negl Trop Dis*, 9: e0004226. DOI 10.1371/journal.pntd.0004226
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. & Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 14863-8.
- Ermak, G. & Davies, K.J.A. (2002). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Molecular Immunology*, 38: 713-721. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00108-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00108-0)
- Fallang, A., Ramsay, J.M., Sevattal, S., Burka, J.F., Jewess, P., Hammell, K.L. & Horsberg, T.E. (2004). Evidence for occurrence of an organophosphate-resistant type of acetylcholinesterase in strains of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer). *Pest Management Science*, 60: 1163-1170. DOI 10.1002/ps.932
- Farlora, R., Nuñez-Acuña, G. & Gallardo-Escárate, C. (2015). Prohibitin-2 gene reveals sex-related differences in the salmon louse *Caligus rogercresseyi*. *Gene*, 564: 73-80. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.03.045>
- Ffrench-Constant, R.H., Daborn, P.J. & Goff, G.L. (2004). The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics*, 20: 163-170. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2004.01.003>
- Futahashi, R. & Fujiwara, H. (2005). Melanin-synthesis enzymes coregulate stage-specific larval cuticular markings in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Development genes and evolution*, 215: 519-29. DOI 10.1007/s00427-005-0014-y
- Futahashi, R. & Fujiwara, H. (2007). Regulation of 20-hydroxyecdysone on the larval pigmentation and the expression of melanin synthesis enzymes and yellow gene of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Insect Biochemistry*

- and *Molecular Biology*, 37: 855-864. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.02.014>
- Gallardo-Escárate, C., Valenzuela-Muñoz, V. & Nuñez-Acuña, G. (2014). RNA-Seq Analysis Using *De Novo* Transcriptome Assembly as a Reference for the Salmon Louse *Caligus rogercresseyi*. *PLoS ONE*, 9: e92239. DOI 10.1371/journal.pone.0092239
- Gan, E.V., Haberman, H.F. & Menon, I.A. (1976). Electron transfer properties of melanin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 173: 666-672. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90304-0](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(76)90304-0)
- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. & Vargas-Albores, F. (1999). Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 122: 77-82. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10143-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10143-8)
- González L, Carvajal J (2003) Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture* 220:101-117.
- González-Santoyo, I. & Córdoba-Aguilar, A. (2012). Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142: 1-16. DOI 10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x
- Gorman, M.J., An, C. & Kanost, M.R. (2007). Characterization of tyrosine hydroxylase from *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 1327-1337. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.08.006>
- Grant, A.N. (2002). Medicines for sea lice. *Pest Management Science*, 58: 521-527. DOI 10.1002/ps.481
- Hagen, H.-E., Kläger, S.L., Mckerrow, J.H. & Ham, P.J. (1997). *Simulium damnosum*. 1.: Isolation and Identification of Prophenoloxidase Following an Infection with *Onchocerca* spp. Using Targeted Differential Display. *Experimental Parasitology*, 86: 213-218. DOI <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1997.4165>
- 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: 341-345. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.12.002>
- Hatanaka, E., Dermargos, A., Armelin, H.A., Curi, R. & Campa, A. (2011). Serum amyloid A induces reactive oxygen species (ROS) production and proliferation of fibroblast. *Clinical and experimental immunology*, 163: 362-7. DOI 10.1111/j.1365-2249.2010.04300.x
- Haya, K., Burrige, L.E., Davies, I.M. & Ervik, A. (2005). A Review and Assessment of Environmental Risk of Chemicals Used for the Treatment of Sea Lice Infestations of Cultured Salmon. IN Hargrave, B.T. (Ed.) *Environmental Effects of Marine Finfish Aquaculture*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Helgesen, K.O., Bravo, S., Sevatdal, S., Mendoza, J. & Horsberg, T.E. (2014). Deltamethrin resistance in the sea louse *Caligus rogercresseyi* (Boxhall and Bravo) in Chile: bioassay results and usage data for antiparasitic agents

- with references to Norwegian conditions. *Journal of fish diseases*, 37: 877-890. DOI 10.1111/jfd.12223
- Helgesen, K.O. & Horsberg, T.E. (2013). Single-dose field bioassay for sensitivity testing in sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*: development of a rapid diagnostic tool. *Journal of Fish Diseases*, 36: 261-272. DOI 10.1111/jfd.12053
- Heumann, J., Carmichael, S.N., Bron, J.E. & Sturm, A. (2014). Isolation and characterisation of four partial cDNA sequences encoding multidrug resistance-associated proteins (MRPs) in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837). *Aquaculture*, 424–425: 207-214. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.015>
- Hiruma, K. & Riddiford, L.M. (1984). Regulation of melanization of tobacco hornworm larval cuticle in vitro. *The Journal of experimental zoology*, 230: 393-403. DOI 10.1002/jez.1402300308
- Hiruma, K. & Riddiford, L.M. (1988). Granular phenoloxidase involved in cuticular melanization in the tobacco hornworm: Regulation of its synthesis in the epidermis by juvenile hormone. *Developmental Biology*, 130: 87-97. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90416-2](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(88)90416-2)
- K. Hiruma, L.M. Riddiford, The molecular mechanisms of cuticular melanization: The ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39(4) (2009) 245-253.
- Hook, S.E., Osborn, H.L., Spadaro, D.A. & Simpson, S.L. (2014). Assessing mechanisms of toxicant response in the amphipod *Melita plumulosa* through transcriptomic profiling. *Aquatic Toxicology*, 146: 247-257. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.001>
- Iida, A., Saito, S., Sekine, A., Mishima, C., Kitamura, Y., Kondo, K., Harigae, S., Osawa, S. & Nakamura, Y. (2002). Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8. *J Hum Genet*, 47: 285-310.
- Jang, I.K., Pang, Z., Yu, J., Kim, S.K., Seo, H.C. & Cho, Y.R. (2011). Selectively enhanced expression of prophenoloxidase activating enzyme 1 (PPAE1) at a bacteria clearance site in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *BMC Immunol*, 12: 70. DOI 10.1186/1471-2172-12-70
- Jansen, P.A., Grontvedt, R.N., Tarpai, A., Helgesen, K.O. & Horsberg, T.E. (2016). Surveillance of the Sensitivity towards Antiparasitic Bath-Treatments in the Salmon Louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *PLoS One*, 11: e0149006. DOI 10.1371/journal.pone.0149006
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L. & Soderhall, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211: 213-36. DOI 10.1016/j.imbio.2005.10.015
- Johnstone, I.L. (2000). Cuticle collagen genes. Expression in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in genetics : TIG*, 16: 21-7.
- Joussen, N., Agnolet, S., Lorenz, S., Schone, S.E., Ellinger, R., Schneider, B. & Heckel, D.G. (2012). Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to

- fenvaterate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 15206-11. DOI 10.1073/pnas.1202047109
- Juranka, P.F., Zastawny, R.L. & Ling, V. (1989). P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 3: 2583-92.
- Kaur, K., Helgesen, K.O., Bakke, M.J. & Horsberg, T.E. (2015). Mechanism behind Resistance against the Organophosphate Azamethiphos in Salmon Lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *PLoS One*, 10: e0124220. DOI 10.1371/journal.pone.0124220
- Kaur, K., Jansen, P.A., Aspehaug, V.T. & Horsberg, T.E. (2016). Phe362Tyr in AChE: A Major Factor Responsible for Azamethiphos Resistance in *Lepeophtheirus salmonis* in Norway. *PLoS One*, 11: e0149264. DOI 10.1371/journal.pone.0149264
- Kayser-Wegmann, I. (1976). Differences in black pigmentation in lepidopteran cuticles as revealed by light and electron microscopy. *Cell and tissue research*, 171: 513-21.
- Koch, P.B., Behnecke, B. & Ffrench-Constant, R.H. (2000). The molecular basis of melanism and mimicry in a swallowtail butterfly. *Current Biology*, 10: 591-594. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00494-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00494-2)
- Koganemaru, R., Miller, D.M. & Adelman, Z.N. (2013). Robust cuticular penetration resistance in the common bed bug (*Cimex lectularius* L.) correlates with increased steady-state transcript levels of CPR-type cuticle protein genes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106: 190-197. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.01.001>
- Kwon, D.H., Choi, J.Y., Je, Y.H. & Lee, S.H. (2012). The overexpression of acetylcholinesterase compensates for the reduced catalytic activity caused by resistance-conferring mutations in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 212-219. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.12.003>
- Landeira-Dabarca, A., Sieiro, C. & Álvarez, M. (2013). Change in food ingestion induces rapid shifts in the diversity of microbiota associated with cutaneous mucus of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, 82: 893-906. DOI 10.1111/jfb.12025
- Langford, K.H., Øxnevad, S., Schøyen, M. & Thomas, K.V. (2014). Do Antiparasitic Medicines Used in Aquaculture Pose a Risk to the Norwegian Aquatic Environment? *Environmental Science & Technology*, 48: 7774-7780. DOI 10.1021/es5005329
- Lavine, M.D. & Strand, M.R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1295-1309. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Lewis, D.L., Barker, D.E. & Mckinley, R.S. (2014). Modulation of cellular innate immunity by *Lepeophtheirus salmonis* secretory products. *Fish & Shellfish Immunology*, 38: 175-183. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.03.014>

- Liao, P.-Y. & Lee, K.H. (2010). From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. *Biochemical Engineering Journal*, 49: 149-158. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.021>
- Lin, Y., Jin, T., Zeng, L. & Lu, Y. (2012). Cuticular penetration of  $\beta$ -cypermethrin in insecticide-susceptible and resistant strains of *Bactrocera dorsalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103: 189-193. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.002>
- Liu, N., Zhu, F., Xu, Q., Pridgeon, J.W. & Gao, X. (2006). Behavioral change, physiological modification, and metabolic detoxification: mechanisms of insecticide resistance. *Kun Chong Xue Bao*, 49: 671-679.
- Liu, S., Niu, H., Xiao, T., Xue, C., Liu, Z. & Luo, W. (2009). Does Phenoloxidase Contributed to the Resistance? Selection with Butane-Fipronil Enhanced its Activities from Diamondback Moths. *The Open Biochemistry Journal*, 3: 9-13. DOI 10.2174/1874091X00903010009
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25: 402-408. DOI <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, A., Zhang, Q., Zhang, J., Yang, B., Wu, K., Xie, W., Luan, Y.-X. & Ling, E. (2014). Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Frontiers in Physiology*, 5: 252. DOI 10.3389/fphys.2014.00252
- M., C. & N., P. (2009). The ascidian prophenoloxidase activating system. *Invert Surviv J* 6: 67-76.
- Mao, Y., Tan, F., Yan, S.-G., Wu, G.-X., Qiao, C.-L., Zhang, W.-X. & Cui, F. (2013). High-throughput genotyping of single-nucleotide polymorphisms in *ace-1* gene of mosquitoes using MALDI-TOF mass spectrometry. *Insect Science*, 20: 167-174. DOI 10.1111/j.1744-7917.2012.01520.x
- Marín, J., Encabo, A., Briones, A., García-Cohen, E.-C. & Alonso, M.J. (1998). Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: Calcium pumps. *Life Sciences*, 64: 279-303. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00393-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00393-2)
- Marín, S.L., Martin, R. & Lewis, R. (2015). Effects of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo 2000) chalimus stage condition (dead, moribund, live) on the estimates of Cypermethrin BETAMAX® efficacy. *Aquaculture Research*, 46: 30-36. DOI 10.1111/are.12460
- Marmaras, V.J., Charalambidis, N.D. & Zervas, C.G. (1996). Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 31: 119-33. DOI 10.1002/(sici)1520-6327(1996)31:2<119::aid-arch1>3.0.co;2-v
- Massey, P.R., Fojo, T. & Bates, S.E. (2014). ABC Transporters: Involvement in Multidrug Resistance and Drug Disposition. IN Rudek, M.A., Chau, C.H., Figg, W.D. & Mcleod, H.L. (Eds.) *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. New York, NY: Springer New York.
- Nappi, A.J. & Christensen, B.M. (2005). Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 443-459. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.014>

- Narahashi, T. (2000). Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 294: 1-26.
- Oliveira, C., Almeida, J., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M. & Gravato, C. (2012). Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn *Palaemon serratus*. *Aquatic Toxicology*, 124–125: 209-216. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.010>
- Parvez, S. & Raisuddin, S. (2006). Copper modulates non-enzymatic antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to deltamethrin. *Chemosphere*, 62: 1324-1332. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.025>
- Paskewitz, S.M., Brown, M.R., Collins, F.H. & Lea, A.O. (1989). Ultrastructural localization of phenoloxidase in the midgut of refractory *Anopheles gambiae* and association of the enzyme with encapsulated *Plasmodium cynomolgi*. *The Journal of parasitology*, 75: 594-600.
- Paskewitz, S.M., Brown, M.R., Lea, A.O. & Collins, F.H. (1988). Ultrastructure of the encapsulation of *Plasmodium cynomolgi* (B strain) on the midgut of a refractory strain of *Anopheles gambiae*. *The Journal of parasitology*, 74: 432-9.
- Pedrini, N., Mijailovsky, S.J., Girotti, J.R., Stariolo, R., Cardozo, R.M., Gentile, A. & Juárez, M.P. (2009). Control of Pyrethroid-Resistant Chagas Disease Vectors with Entomopathogenic Fungi. *PLoS neglected tropical diseases*, 3: e434. DOI 10.1371/journal.pntd.0000434
- Pohl, P.C., Klafke, G.M., Junior, J.R., Martins, J.R., Da Silva Vaz, I., Jr. & Masuda, A. (2012). ABC transporters as a multidrug detoxification mechanism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitology research*, 111: 2345-51. DOI 10.1007/s00436-012-3089-1
- Racay, P., Kaplan, P. & Lehotsky, J. (1996). Control of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in neuronal cells. *General physiology and biophysics*, 15: 193-210.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 132: 365-86.
- Seeb, J.E., Carvalho, G., Hauser, L., Naish, K., Roberts, S. & Seeb, L.W. (2011). Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Molecular Ecology Resources*, 11: 1-8. DOI 10.1111/j.1755-0998.2010.02979.x
- Shashikumar, S. & Rajini, P.S. (2010). Cypermethrin-induced alterations in vital physiological parameters and oxidative balance in *Caenorhabditis elegans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97: 235-242. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.03.002>
- Skern-Mauritzen, R., Frost, P., Hamre, L.A., Kongshaug, H. & Nilsen, F. (2007). Molecular characterization and classification of a clip domain containing peptidase from the ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda, Crustacea). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146: 289-298. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.11.014>

- Smulders, C.J., Bueters, T.J., Vailati, S., Van Kleef, R.G. & Vijverberg, H.P. (2004). Block of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by organophosphate insecticides. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 82: 545-54. DOI 10.1093/toxsci/kfh269
- Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T. & Weiner, M.L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171: 3-59. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00569-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00569-8)
- Sogorb, M.A. & Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128: 215-228. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00543-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00543-4)
- Sutherland, B.J., Koczka, K.W., Yasuike, M., Jantzen, S.G., Yazawa, R., Koop, B.F. & Jones, S.R. (2014). Comparative transcriptomics of Atlantic Salmo salar, chum Oncorhynchus keta and pink salmon O. gorbuscha during infections with salmon lice Lepeophtheirus salmonis. *BMC Genomics*, 15: 200. DOI 10.1186/1471-2164-15-200
- Tadiso, T.M., Krasnov, A., Skugor, S., Afanasyev, S., Hordvik, I. & Nilsen, F. (2011). Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition. *BMC genomics*, 12: 141-141. DOI 10.1186/1471-2164-12-141
- Tribble, N.D., Burka, J.F. & Kibenge, F.S.B. (2007). Evidence for changes in the transcription levels of two putative P-glycoprotein genes in sea lice (Lepeophtheirus salmonis) in response to emamectin benzoate exposure. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 153: 59-65. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.02.002>
- True, J.R., Edwards, K.A., Yamamoto, D. & Carroll, S.B. (1999). Drosophila wing melanin patterns form by vein-dependent elaboration of enzymatic prepatterns. *Current biology : CB*, 9: 1382-91.
- Valenzuela-Muñoz, V., Chavez-Mardones, J. & Gallardo-Escárate, C. (2015a). RNA-seq analysis evidences multiple gene responses in Caligus rogercresseyi exposed to the anti-salmon lice drug azamethiphos. *Aquaculture*, 446: 156-166. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.011>
- Valenzuela-Muñoz, V. & Gallardo-Escárate, C. (2014). TLR and IMD signaling pathways from Caligus rogercresseyi (Crustacea: Copepoda): In silico gene expression and SNPs discovery. *Fish & Shellfish Immunology*, 36: 428-434. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.019>
- Valenzuela-Muñoz, V., Sturm, A. & Gallardo-Escárate, C. (2015b). Transcriptomic insights on the ABC transporter gene family in the salmon louse Caligus rogercresseyi. *Parasites & Vectors*, 8: 1-14. DOI 10.1186/s13071-015-0801-x.
- V. Valenzuela-Muñoz, J. Chavez-Mardones, C. Gallardo-Escárate (2015c). RNA-seq analysis evidences multiple gene responses in Caligus rogercresseyi exposed to the anti-salmon lice drug azamethiphos, *Aquaculture* 446 156-166.

- Vannini, L., Reed, T.W. & Willis, J.H. (2014). Temporal and spatial expression of cuticular proteins of *Anopheles gambiae* implicated in insecticide resistance or differentiation of M/S incipient species. *Parasites & Vectors*, 7: 24. DOI 10.1186/1756-3305-7-24
- Velíšek, J., Jurčíková, J., Dobšíková, R., Svobodová, Z., Piačková, V., Máchová, J. & Novotný, L. (2007). Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 297-301. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.eta.2006.11.006>
- Vera-Bizama, F., Valenzuela-Muñoz, V., Gonçalves, A.T., Marambio, J.P., Hawes, C., Wadsworth, S. & Gallardo-Escárate, C. (2015). Transcription expression of immune-related genes from *Caligus rogercresseyi* evidences host-dependent patterns on Atlantic and coho salmon. *Fish & Shellfish Immunology*, 47: 725-731. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.022>
- Von Wirén-Lehr, S., Del Pilar Castillo, M., Torstensson, L. & Scheunert, I. (2001). Degradation of isoproturon in biobeds. *Biology and Fertility of Soils*, 33: 535-540. DOI 10.1007/s003740100368
- Vontas, J., David, J.P., Nikou, D., Hemingway, J., Christophides, G.K., Louis, C. & Ranson, H. (2007). Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology*, 16: 315-324. DOI 10.1111/j.1365-2583.2007.00728.x
- Wagner, G.P., Kin, K. & Lynch, V.J. (2012). Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory in Biosciences*, 131: 281-285. DOI 10.1007/s12064-012-0162-3
- 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: 26-30. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.08.008>
- Wang, Y., Aisen, P. & Casadevall, A. (1995). *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infection and Immunity*, 63: 3131-3136.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., Von Samson-Himmelstjerna, G. & Sangster, N.C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, 20: 469-476. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010>
- Wyk, R.D.J.V., Baron, S. & Maritz-Olivier, C. (2016). An integrative approach to understanding pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus* and *R. decoloratus* ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7: 586-594. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.007>

