

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



Evaluación de biomarcadores moleculares para ictiotoxicidad
en tejido branquial frente a la exposición de la microalga
tóxica *Karenia selliformis*.

Alexander Jeremías León Hidalgo
SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y
ACUICULTURA

Concepción-Chile
Abril, 2025



**UNIVERSIDAD DE
CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y
OCEANOGRÁFICAS**



**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y
ACUICULTURA**

Evaluación de biomarcadores moleculares para ictiotoxicidad
en tejido branquial frente a la exposición de la microalga
tóxica *Karenia selliformis*.

Por

Alexander Jeremias León Hidalgo

Profesores Guías:

FERNANDO ANTONIO CRUZAT CRUZAT

ALLISSON PATSY ASTUYA VILLALÓN

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

CONCEPCIÓN - CHILE

Marzo, 2025

**Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales
y Oceanográficas**

Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesores Guías:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía,
Facultad de Cs Naturales y
Oceanográficas.
Universidad de Concepción.

Dra. Allisson Astuya Villalón
Departamento de Oceanografía,
Facultad de Cs Naturales y
Oceanográficas.
Universidad de Concepción.

Comisión Evaluadora:

Dr. Ariel Valenzuela Saldías
Departamento de Oceanografía,
Facultad de Cs Naturales y
Oceanográficas.
Universidad de Concepción.

Ingeniera IBMA
Alejandra Rivera Latorre
Centro de Investigación
Oceanográfica en el Pacífico Sur-
oriental (COPAS), Universidad de
Concepción.

Dedicatoria

A mis padres, Jennifer Hidalgo B. y Miguel León M., que me enseñaron que solo debo retroceder para darme un impulso.

Agradecimientos

Primeramente, agradecer a mi familia que me dieron todo su apoyo para perseguir mis metas, a mi madre que me lleno de amor y consejos impulsándome a siempre ser mejor sin dejar de lado el ser buena persona, mi padre que me enseñó el tipo de hombre, esposo y padre que me gustaría ser, a mi abuela, que con sus consejos, enseñanzas y apoyo me fue guiando y mi hermana que desde que llego a mi vida quiero que el mundo sea mejor. Agradecer a Yanet M. y Rodrigo V. que por azares del destino terminaron siendo mi segunda familia y que siempre estuvieron para mí. Y agradecer a mi Tata Luis H. que de pequeño me enseñó lo valioso que es aprender y que me motivo a estudiar lo que me gustará, sé que siempre me ha acompañado.

Agradecer a todos los amigos que hice, tanto dentro como fuera de este proceso que fue la Universidad, agradecer a Gonzalo D. que me abrió las puertas de su hogar y que a pesar de que estamos lejos la amistad se ha conservado con los años. Agradecer a Ruth S., Guido. H., Rafael M., Paula S. Hugo D., Antonia C., Ilda T. Miguel C., Alexander C., Por su amistad, cariño y paciencia. Agradecer a Bianca R. que, gracias a ella, su amor y apoyo me ayudaron a terminar este proceso y ansiar el futuro.

Agradecer a mis profesores guías Dra. Allisson Astuya y Dr. Fernando Cruzat, por su paciencia y cada una de sus enseñanzas. Agradecer al laboratorio de biotoxinas UDEC (LBTx) y a sus integrantes. Agradecer a Alexandra V., Catalina P., Victoria A. y Alejandra R. por toda su ayuda. Agradecer por todo a COPAS Coastal ANID FB210021.

Índice de contenidos

Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Índice de contenidos	5
Índice de tablas	7
Índice de figuras	8
Resumen	9
Abstract	10
I. Introducción	11
1.1. Salmonicultura en Chile	11
1.2. Floraciones Algales Nocivas (FANs)	12
1.3. <i>Karenia selliformis</i>	14
1.4. Problemática por abordar.	15
1.5. Importancia de incluir la respuesta de los peces frente a la exposición FAN.	17
1.6. Modelo <i>in vitro</i>	18
1.7. Detección de ictiotóxicidad <i>in vivo</i> usando peces	19
1.8. Modelos invasivos	19
1.9. Modelos no invasivos: heces, orina, agua y mucosidad	20
1.10. Bioindicadores	20
1.10.1. Bioindicadores proteicos y enzimáticos en moco	21
1.10.2. Bioindicadores expresión génica en moco	21
1.11. Bioindicadores de ictiotóxicidad candidatos para la evaluación del efecto en el tejido de branquia expuesta a concentración de <i>Karenia selliformis</i>	21
II. Hipótesis	23
III. Objetivos	24
3.1. Objetivo general	24
3.2. Objetivos específicos	24
IV. Materiales y métodos	25
4.1. Condiciones del cultivo de <i>Karenia selliformis</i>	25
4.2. Estanques y peces utilizados.	25
4.3.1 Toma de muestra mucus branquial	25
4.3.2 Toma de muestras tejido branquial	27

4.4.	Extracción de ARN.....	27
4.5.	Lectura concentraciones de ARN (absorbancia).....	27
4.6.	Integridad del ARN obtenido.....	27
4.7.	Selección y descarte de muestras.....	28
4.8.	Tratamiento con DNasa.....	28
4.9.	Síntesis cDNA y Transcripción reversa.....	28
4.10.	RT-qPCR.....	28
4.11.	Genes utilizados.....	29
4.11.)	Verificación de los partidores.....	30
4.11.1)	Temperatura de annealing.....	30
4.11.2)	Rango Dinámico.....	30
4.12)	Análisis estadístico.....	30
5.	Resultados.....	31
5.1.1	Elección de método de toma de muestras.....	31
5.1.2	Extracción de ARN en moco branquial.....	31
5.2.1	Extracción de ARN del tejido branquial.....	32
5.2.1.	Integridad del ARN.....	33
5.3.	Tratamiento con DNasa.....	33
5.4	Estandarización de genes.....	35
6.	Discusión.....	39
7.	Conclusión.....	44
8.	Referencias.....	45
	Anexos.....	51

Índice de tablas

Tabla 1 Microalgas potenciales productoras de FAN ictiotóxicas y sus niveles de riesgo.	15
Tabla 2: comparación de diferentes condiciones para el traslado de la muestra (mucus branquial)	26
Tabla 3: Secuencias de los partidores diseñados (bioindicadores moleculares).	29
Tabla 4: Cuantificación de ácidos nucleicos de las muestras de mucus obtenida	31
Tabla 5: Cuantificación de ácidos nucleicos de las muestras de tejido obtenidas	32
Tabla 6: Cuantificación de ácidos nucleicos de las muestras de tejido obtenidas post tratamiento con DNasa	33
Tabla 7: Nombre del gen con su ubicación en carril de gel de electroforesis correspondiente	35
Tabla 8: Partidores estandarizados por qpcr	37
Tabla 9: comparación técnicas recolección de muestra	39
Tabla 10: Valores indicativos de pureza en ácidos nucleicos (Banco Nacional de ADN, 2024)	39
Tabla 11: genes estandarizados por PCR convencional y tiempo real	42

Índice de figuras

figura 1. Micrografías de luz (A-C) de <i>Karenia selliformis</i> de Chile (CREAN_KS02)	14
figura 2. Efecto ictiotóxico sobre las branquias	17
figura 3: Observaciones in situ, montajes completos y tejidos teñidos con H&E (hematoxilina y eosina) (arcos branquiales) del salmón del Atlántico moribundo (<i>Salmo salar</i>) durante el evento de <i>P. verruculosa</i> de 2016	19
figura 4: diseño experimental	25
figura 5: ejemplos gráficos de la metodología para la toma de muestra (moco branquial)	26
figura 6. Esquema representativo de la metodología en la toma de las muestras (tejido-arco branquia)	27
figura 7: gel de electroforesis. agarosa al 1% con buffer TAE 1x, 100V por 1 hora	32
figura 8: Visualización de la integridad de ARN en muestras de tejido branquial obtenidas, en gel de agarosa-formaldehído 1,2 con MOPs 1x.	33
figura 9: Visualización de la integridad de ARN en muestras de tejido branquial obtenidas post tratamiento con DNasa, en gel de agarosa-formaldehído 1,2 con MOPs 1x	34
figura 10: Electroforesis en gel de agarosa para producto PCR, usando línea celular CHSE-214	35
figura 11: A: curva de melting NKA. B: curva de eficiencia Nka	36
figura 12: Expresión relativa normalizada de genes seleccionados mediante PCR cuantitativa en tiempo real	38
figura 13: Esquema representativo de las proteínas de unión y adhesión	41
figura 14: Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de genes seleccionados en RTgill-W1	43

Resumen

La salmonicultura en Chile comenzó en la década de 1980, expandiéndose rápidamente con las reformas neoliberales, transformando regiones del sur del país en centros de producción global. Desde los años 90, la producción de salmón en Chile ha crecido exponencialmente, posicionándose a Chile como el segundo productor mundial después de Noruega. Sin embargo, la industria de la salmonicultura enfrenta diversos desafíos, entre ellos las floraciones algales nocivas (FANs). Las FANs son proliferaciones de microalgas que pueden ser perjudiciales para la salud humana, el medio ambiente y la acuicultura, generando pérdidas económicas significativas que afectan la producción acuícola, consumo e incluso turismo. En Chile, se han registrado eventos de FANs desde 1972, destacando especies como *Alexandrium catenella* y *Pseudochattonella cf. verruculosa*. Existen tres tipos de FANs: no productoras de toxinas, pero igual nocivas, tóxicas (que afectan mariscos y la salud humana) e ictiotóxicas (que causan la muerte de peces). Pese al conocimiento disponible, la respuesta preventiva ante estos eventos sigue siendo limitada, lo que resalta la necesidad de desarrollar sistemas de alerta temprana. El objetivo del presente estudio fue establecer un protocolo de toma de muestras que fuera lo menos invasivo posible, sugiriendo el mucus como un modelo de interés no invasivo, ya que, el moco secretado contiene elementos del sistema inmunológico, el cual, puede cambiar en respuesta a estímulos externos y estrés, además, como objetivo se tuvo el validar el uso de biomarcadores moleculares candidatos de respuesta al estrés ictiotóxico en tejido branquial, esperando, una respuesta similar y contrastable en comparación con los resultados obtenidos usando el modelo *in vitro*. Nuestros resultados confirman una respuesta de expresión diferencial significativa en los biomarcadores moleculares E-cadherin y caspasa 3, asociados a ictiotóxicidad frente a la exposición de *Karenia selliformis* en muestras de tejido branquial y descartando al menos en estas condiciones el uso de Nka y Hsp70. Estos resultados permiten inicialmente aceptar la hipótesis de la existencia de una respuesta desde el pez hacia eventos de ictiotoxicidad que podría ser incorporadas a los sistemas de alerta temprana. Siendo estos resultados preliminares, sugerencias para un nuevo desafío que debe ser abordado en futuros enfoques de estudio

Abstract

Salmon farming in Chile began around the 1980s, rapidly expanding with neoliberal reforms, transforming southern regions into global production centers. Since the 1990s, salmon production in Chile has grown exponentially, positioning itself as the second-largest producer worldwide after Norway. However, the salmon farming industry presents various challenges, among them harmful algal blooms (HABs). HABs are proliferations of microalgae that can be harmful to human health, the environment, and aquaculture. HABs can generate significant economic losses, affecting aquaculture production, consumption, and even tourism. HAB events have been recorded since 1972, with notable cases of *Alexandrium catenella* and *Pseudochattonella cf. verruculosa*. There are three types of HABs: non-toxic, toxic (affecting shellfish and human health), and ichthyotoxic (causing fish death). Despite the economic impact and existing knowledge about these phenomena, there is a limited response to prevent effects associated with these events, thus requiring an early warning or preventive system capable of detecting these negative effects. The aim of the present study was to establish a sampling protocol that was as non-invasive as possible, suggesting mucus as a non-invasive model of interest, since the secreted mucus contains elements of the immune system, which can change in response to external stimuli and stress. Additionally, the study aimed to validate the use of candidate molecular biomarkers of response to ichthyotoxic stress in gill tissue, expecting a similar and comparable response to results obtained using the *in vitro* model. Our results confirm a significant differential expression response in the molecular biomarkers E-cadherin and caspase 3, associated with ichthyotoxicity in response to *Karenia selliformis* exposure in gill tissue samples, and rule out, at least under these conditions, the use of Nka and Hsp70. These results initially support the hypothesis of a response from the fish to ichthyotoxicity events, which could be incorporated into early warning systems. As these are preliminary results, they suggest a new challenge that should be addressed in future study approaches.

I. Introducción

1.1. Salmonicultura en Chile

En 1976 y 1978 respectivamente, Chile creó la Subsecretaría de Pesca y acuicultura (SUBPESCA) y el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) para tratar los temas de pesca y acuicultura, además de su correspondiente gestión, incluidos los aspectos sanitarios atribuidos a los peces. El cultivo de salmónidos en Chile comenzó en la década de 1980, donde la expansión de esta industria a partir de las reformas neoliberales de la década de 1970, trajo consigo la formación de polos de crecimiento en el sur del país, reorientando el patrón de producción, modificando la estructura de los mercados laborales y transformando áreas costeras y rurales remotas en centros de producción a escala global (Carrasco-Bahamonde & Casellas, 2024). La acuicultura chilena ha experimentado un crecimiento exponencial desde fines de la década de 1980, debido principalmente al aumento de la producción de salmónidos, en particular de salmón (Quiñones et al., 2019). Durante la década de 1990, la industria atravesó un período de expansión acelerada, pasando de 20.000 a 200.000 toneladas producidas anualmente a fines de la década (Figueroa et al., 2019). Se ha reportado que Chile ocupa el segundo lugar, después de Noruega, en lo que respecta a la producción de salmón a nivel mundial, con 985.958 toneladas de pescado cosechado durante el año 2021 (Avendaño-Herrera, 2018; Avendaño-Herrera et al., 2022). Los centros de salmonicultura chilenos están ubicados principalmente en las regiones de Los Lagos y Aysén, siendo este ecosistema (Patagonia norte y central) uno de los sistemas más extensos del mundo, además, de ser caracterizado por una morfología compleja que incluye canales, golfos, estuarios y bahías (Montes et al., 2018; Pantoja et al., 2011). Chile es uno de los países a nivel pesquero más importantes en el mundo, siendo la actividad pesquera un pilar fundamental de la economía chilena, la cual en el año 2021 estimó una producción total de unos 3,4 millones de toneladas, además, en el año 2022 se produjeron un total de 8.500 millones de dólares en lo que respecta a la exportación de productos marítimos, también 2022 el valor de las importaciones de producto pesquero alcanzó una cifra de 650 millones de dólares. Se debe mencionar que el sector acuícola en el año 2021 contribuyó a la creación de empleos siendo desglosado con 32.600 personas en puestos de trabajo en el sector pesquero y 109.500 personas en el sector de la acuicultura (FAO, 2024). A pesar del éxito y la consolidación que ha tenido la industria de la acuicultura esta no se encuentra exenta de desafíos, como lo son el proceso de engorda, patologías, como la enfermedad renal bacteriana (BKD; *Renibacterium salmoninarum*), la caligidosis y la *Piscirickettsia salmonis*. (Figueroa et al., 2019), y en los cuales las floraciones algales nocivas se han convertido en un desafío importante, dada la baja comprensión de los eventos asociados que las provocan y la inexistente capacidad de predicción o prevención de estos.

1.2. Floraciones Algales Nocivas (FANs)

Las FANs son proliferaciones de microalgas que a pesar de ser fenómenos naturales son capaces de ser percibidos como nocivos para el humano. Estos eventos naturales ocurren cuando aumenta excesivamente y en corto tiempo la densidad de ciertas especies de microalgas nocivas en ambientes acuáticos, su aparición se sugiere está dada por factores ambientales favorables (IFOP, 2024; LABTOX, 2024). Por estas razones, las floraciones algales nocivas (FAN) se han convertido en una preocupación de salud y ambiental a nivel mundial (Rodríguez-Benito et al., 2020; Roselli et al., 2020; Zhang et al., 2020). Puntualmente, esta preocupación está centrada para regiones con actividades acuícolas, donde existe un impacto directo tanto para la economía del país/zona, como los habitantes de estas, este es el caso de Chile, ya que el país ocupa el segundo lugar en la producción mundial de varias especies de salmones (Rodríguez-Benito et al., 2020). Los factores desencadenantes de las condiciones de floración no se entienden completamente, pero el enriquecimiento de nutrientes de las aguas, especialmente con nitrógeno y/o fosfatos, se reconocen como posibles causantes de estas (Klemas, 2012; León-Muñoz et al., 2018). Las floraciones algales nocivas son un problema multifocal debido a los efectos que generan, por ejemplo, se han registrado floraciones del dinoflagelado *Alexandrium catenella* en Chile desde 1972 (Montes et al., 2018) cuyos efectos desencadenan preocupación respecto a potenciales intoxicaciones por consumo de mariscos contaminados como pérdidas económicas asociados al sector productivo de mariscos. En el año 2004 se detectó el primer Bloom de *Pseudochattonella cf. verruculosa*, con eventos reiterados de *Pseudochattonella cf. verruculosa* en los años 2005, 2009 y 2011 (Mardones et al., 2012; Montes et al., 2018). En ocasiones las intensas proliferaciones de microalgas productoras de FANs son capaces de cambiar el color del agua, además de producir impactos negativos, pérdidas por mortalidad en centros de cultivos acuícolas y daño a la salud humana por consumo (intoxicaciones) (Barría et al., 2022). Dentro de las zonas costeras, las floraciones de algas nocivas (FAN) se han expandido geográficamente y se han vuelto cada vez más comunes (Griffith & Gobler, 2020; Hallegraeff, 2010), siendo esta condición de principal preocupación. Las FANs se han clasificado en tres tipos distintos según los organismos causantes y sus efectos: las FANs no productoras de toxinas, las cuales como su nombre lo indica son microalgas que, aunque no producen toxinas, pueden afectar negativamente el turismo y provocar deficiencia de oxígeno, resultando en la mortalidad de organismos marinos. En segundo lugar, las FAN tóxicas, que son microalgas capaces de transferir toxinas a través de la cadena alimentaria, estas son reguladas por afectar los mariscos de consumo, entre las cuales podemos clasificar a las productoras de veneno paralizante, (VPM), veneno amnésico (VAM) y venenos diarreicos (VDM). Finalmente, el grupo de microalgas ictiotóxicas que como su nombre lo indica son microalgas capaces de matar peces, de vida libre pero especialmente asociados a la acuicultura, como salmones en Chile. Este grupo de FANs ictiotóxicas, son microalgas que pueden matar peces por diferentes mecanismos, desde causar daño mecánico a las branquias de los peces o baja de oxígeno, hasta inducir otras reacciones toxigénicas en ellos como aumento de estrés oxidativo por ROS y PUFAS, y la producción de compuestos bioactivos denominados ictiotóxicas poco conocidas (Barría et al., 2022). Para Chile la acuicultura es una gran actividad económica como se mencionó previamente, por tanto, el impacto que puedan tener las FANs a los centros de cultivos puede ser significativos económicamente para la industria acuícola y para la economía de nuestro país. Existe un consenso científico general en el sentido de que los tipos de recursos afectados por las floraciones de algas nocivas y las pérdidas económicas asociadas también están aumentando (Anderson et

al., 2012; Montes et al., 2018). Un buen ejemplo del impacto de este tipo de eventos queda demostrado durante el evento registrado durante el año 2016 causado por *Alexandrium catenella*, y en el cual se estimaron pérdidas en la producción de moluscos de aproximadamente 30 a 40 millones de USD (Barría et al., 2022). Ese mismo año, se registró un evento asociado a la microalga ictiotóxica *Pseudochattonella cf. Verruculosa*, el que afectó entre el 18 y el 20% de la producción de salmón en Chile, equivalente a 800 millones de USD (Barría et al., 2022). En Chile, los principales eventos que han impactado a la acuicultura se han asociado principalmente a floraciones de la rafidofícea *Heterosigma akashiwo* y a los dinoflagelados *Karenia selliformis* y *Alexandrium catenella*. A pesar, de las grandes pérdidas económicas ocasionadas en la industria de la salmonicultura durante décadas, el conocimiento acerca de estos fenómenos sigue siendo casi nulo y los sistemas de monitoreo se basan principalmente en una relación empírica entre la abundancia de fitoplancton tóxico y la mortalidad de peces (Mardones & Hallegraeff, 2016). Al existir causas tan diversas en los eventos FAN, la prevención de estas es difícil, por lo tanto, se necesita mayor desarrollo de técnicas para abordar esta amenaza a través de un sistema de alerta temprana o preventivo (Klemas, 2012; Rodríguez-Benito et al., 2020; Sandoval et al., 2018).

1.3. *Karenia selliformis*

Karenia selliformis es un dinoflagelado, el cual se registró por primera vez en Nueva Zelanda y desde entonces se ha detectado progresivamente en Túnez, Kuwait, Florida en el Golfo de México y Chile (Elleuch et al., 2021; Mardones et al., 2020). En la costa occidental patagónica, en el verano-otoño en 1999, se registró una proliferación masiva de Gymnodiniales. La primera detección, conocida coloquialmente como "marea marrón", ocurrió entre marzo y abril del año 1999 alrededor del Archipiélago de Chiloé con densidades celulares de $4-8 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$. Durante esta "marea marrón", se registró un gran aumento en la mortalidad en los centros de cultivo acuícola de la zona (Clement et al., 2001). Existen cepas caracterizadas (*Karenia selliformis*) en diferentes partes del mundo, en las cuales se ha identificado la posibilidad de producir toxinas del tipo Gymnodiminas (GYM), las cuales son capaces de alterar los receptores nicóticos de acetilcolina en los músculos esqueléticos de los moluscos y también actúan como agentes bloqueadores neuromusculares, lo que resulta en una muerte generalizada tanto de invertebrados como de vertebrados (Mardones et al., 2020; Molgó et al., 2007; Mountfort et al., 2006). La cepa de *K. selliformis* aislada de la región de Aysén CREAM KS02, es altamente tóxica en condiciones *in vitro*, evaluada sobre el modelo de branquias de salmonideos (RTgill-W1)(Mardones et al., 2020). Las células de la *K. selliformis* chilena (cepa CREAM_KS02) miden 25-30 μm de longitud, 20-25 μm de diámetro y 18-22 μm de espesor(Mardones et al., 2020), Sin embargo, en específico en esta cepa, no se ha identificado este tipo de toxinas del tipo GYM. A pesar de esto, dado que es altamente tóxica.

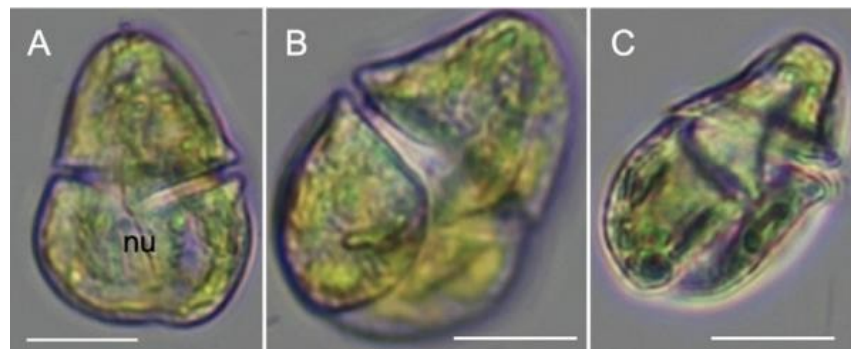


figura 1. Micrografías de luz (A-C) de *Karenia selliformis* de Chile (CREAM_KS02) (modificado de (Mardones et al., 2020)).

1.4. Problemática por abordar.

Comúnmente cuando se encuentra una sospecha de alguna FAN, se busca verificar de una manera eficiente y congruente, para poder realizar alguna solución oportuna. Los procedimientos bibliográficos, sugieren en primer lugar establecer un área de estudio, la cual se necesitarán datos como: latitud, superficie, profundidad, caudal, salinidad e interacciones con columnas de aguas adyacentes (Mardones et al., 2021). Como paso siguiente se debe realizar un muestreo e identificación del fitoplancton, el cual consiste en recolectar periódicamente muestras de aguas en diferentes sitios cada semana por un tiempo establecido (varios meses), para luego pasar las muestras tomadas a métodos para extraer el fitoplancton y así clasificarlo (normalmente con microscopia). Luego se buscan obtener datos oceanográficos y atmosféricos, estos datos son sumamente necesarios para conocer y contrastar las condiciones que se presentaron en el medio para el inicio de la FAN. Posteriormente, se recopilan datos en los centros de acuicultura, dando prioridad a la búsqueda de alteraciones físicas de los peces. En general, con el fin de evaluar las pérdidas por mortalidad y la eficacia de las estrategias a convenir para la mitigación del evento de FAN. Además, se realizará en estos puntos, la toma de los especímenes muertos para la realización de necropsias y también se utilizarán organismos vivos para biopsias (métodos invasivos). Ambos tipos de análisis convergen en los análisis histológicos en órganos blanco como el corazón, hígado, intestino, musculo, bazo y branquias. Finalmente, se realiza un cultivo de la microalga de interés, con el fin de encontrar el estado del ciclo de vida de esta, también en conjunto y a modo de paso final se busca realizar una filogenia, donde se identifica la cepa, región o localidad, fecha y la magnitud de la mortalidad de peces o fauna asociada(Mardones et al., 2021). A pesar de los esfuerzos por controlar, monitorear y mitigar estos eventos, aún no se pueden predecir ni evitar en su totalidad (Gallardo-Rodríguez et al., 2019). En la tabla 1, se presenta las potenciales microalgas ictiotóxicas y potenciales niveles sugeridos de riesgo.

Tabla 1 Microalgas potenciales productoras de FAN ictiotóxicas y sus niveles de riesgo. (modificado de (INTESAL, 2024))

Microalga	Grupo	Mecanismo de acción	Nivel nocivo (Cel/mL)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Raphidophyceae	Ictiotóxico	300
<i>Pseudochattonella cf. verruculosa</i>	Dictyochophyceae	Ictiotóxico	10
<i>Alexandrium catenella</i>	Dinophyceae	Desconocido	20
<i>Karenia mikimotoi</i>	Dinophyceae	Ictiotóxico	40

La metodología descrita para estudiar y verificar la presencia de FAN de riesgo para la acuicultura presenta múltiples pasos complejos y que requieren mucho tiempo de estudio, considerando desde, la recopilación de datos sobre el área de estudio, la obtención de datos oceanográficos y atmosféricos, el muestreo e identificación del

fitoplancton y la evaluación de los datos de centros de acuicultura y las alteraciones físicas de los peces (Mardones et al., 2021). Este proceso detallado, aunque exhaustivo, permite avanzar en comprender este tipo de fenómeno nocivo natural, pero está muy lejos aún de permitir la toma de decisiones efectiva o eficiente. Por otra parte, los enfoques actuales se centran en las microalgas de riesgo y su mitigación. Al respecto las previas estrategias utilizadas para mitigar los efectos tóxicos de floraciones algales nocivas (FANs) se habían centrado en la eliminación de células por floculación o la eliminación de la especie causante mediante lisis celular usando tratamientos químicos, ultravioleta y/o ultrasonido (Mardones & Hallegraeff, 2016). Hoy en día, se sugiere que estos enfoques ponen en riesgo la integridad de la membrana plasmática de la microalga, lo que puede potenciar la ictiotóxicidad de estas especies debido a la liberación de las toxinas intracelulares al medio acuático (Dorantes-Aranda et al., 2015; Mardones et al., 2015). Es así, como hemos identificado, que los enfoques actuales, no se incluye como se ve afectada la salud de los peces previo al evento letal, por lo tanto, consideramos importante, incorporar en las acciones preventivas, la salud de los peces. Esta implementación de nuevas estrategias, diseñadas para proporcionar soluciones más rápidas y efectivas en la identificación y mitigación de eventos de FAN, permitirían mejorar la capacidad de respuesta junto con la gestión de los recursos acuáticos.

1.5. Importancia de incluir la respuesta de los peces frente a la exposición FAN.

A la fecha, los análisis de prevención de FAN ictiotóxicas, no incluyen la salud de los peces, porque normalmente no se han establecido parámetros o bioindicadores que permitan asociar el nivel de toxicidad de las microalgas ictiotóxicas con el efecto en los peces. A pesar de esto, la branquia es el blanco predilecto y principal de los compuestos bioactivos. Las branquias de los peces son herramientas de biomonitoreo eficientes debido a su gran superficie, que tiene contacto directo y permanente con potenciales irritantes, además, son los primeros órganos que responden a cambios ambientales desfavorables (Benli et al., 2008; Bernet et al., 1999; Carvalho et al., 2020). Las alteraciones físicas y fisiológicas observadas en los peces después de su exposición a un evento de FAN puede incluir alteración en el equilibrio iónico y daño severo de las branquias con anomalías morfológicas de hipertrofia celular y lisis de células epiteliales, necrosis epitelial y pérdida de lamelas secundarias (Mardones et al., 2018), lo que afecta directamente a las funciones branquiales como la secreción de mucosidad y la vasodilatación, además de, desequilibrio osmótico, disminución o inducción de actividades enzimáticas, y la probable muerte de los peces. Por lo tanto proponemos incluir en este proyecto un modelo de estudio en el organismo al que le realizaremos observaciones correspondientes del estudio, los desafíos asociados a la exposición de microalgas ictiotóxicas, se refiere como "modelo de estudio", ya que, reunirá las condiciones necesarias para tener una representación simplificada y conceptual de un sistema biológico, donde, se podrán tener en consideración todos los parámetros necesarios junto con las condiciones que fueron determinantes

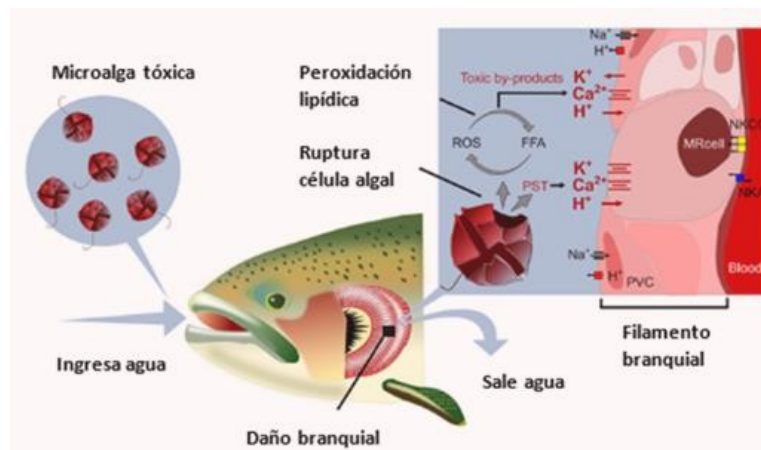


figura 2. Efecto ictiotóxico sobre las branquias. La ictiotóxina exudada por la microalga tóxica hace ingresar mediante el agua que entra por la boca del pez, la cual pasa a través de las branquias y es expulsada hacia afuera. La ictiotóxina es capaz de interactuar con la membrana celular generando un daño branquial. En el esquema se muestran las alteraciones de la osmorregulación en el pez afectado (modificado de (Mardones et al., 2018))

1.6. Modelo *in vitro*

Es de interés científico la búsqueda de nuevas alternativas las cuales no generen algún tipo de daño o estrés en los organismos que se desean tratar o analizar, y que mejoren el bienestar animal (Scott & Minghetti, 2023). Una de estas alternativas, es el uso de bioensayos celulares usando líneas celulares o cultivos primarios (Dorantes-Aranda et al., 2011). Estos sistemas experimentales permiten el acceso directo y la evaluación de funciones específicas con un mayor control de las condiciones de los ensayos, reduciendo la variabilidad de las respuestas debido a respuestas de estrés inevitables (Lee et al., 2009). El uso de líneas celulares ofrece ventajas significativas en comparación con el trabajo con organismos completos, esto se refleja en que las líneas celulares son fáciles de manipular, crecen rápidamente y los experimentos son mucho más reproducibles que en el caso de organismos completos, cabe mencionar que el uso de la muestra *in vitro* satisface la ética de la reducción de mortalidad en el número de animales sacrificados (Dorantes-Aranda et al., 2011). El cultivo primario de esta línea celular (RTgill-W1) se inició a partir de los filamentos branquiales de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Bols et al., 1994; Dorantes-Aranda et al., 2011; Lee et al., 2009). Un blanco celular predilecto para FAN son las branquias de los peces (figura 2) , por lo que, el uso de la línea celular específicamente de la RTgill-W1 ha demostrado ser un buen modelo de estudio de efectos en la branquia (Dorantes-Aranda et al., 2011; Lee et al., 2009; Scott et al., 2021; Scott & Minghetti, 2023) dado sus características similares a la branquia *in vivo* y su capacidad de soportar salinidades asociadas a muestras marinas (Dorantes-Aranda et al., 2011; Emam et al., 2022; Scott et al., 2021).

Además, entre los beneficios que plantea el utilizar esta línea celular (RTgill-W1) son los efectos nocivos observados en las pruebas *in vitro*, ya que, permiten comprender las diferentes vías tóxicas que contribuyen a la muerte del organismo. Por lo que, el uso de líneas celulares tiene la ventaja de permitir un mejor control de las condiciones en el marco experimental al reducir las respuestas hacia algún tipo de estrés. Por lo tanto, las branquias representan órganos diana ideales para evaluar el efecto de tóxicos o patógenos en estudios de toxicología acuática (Evans et al., 2005; Mardones et al., 2021). Resultados no publicados del proyecto Fondecyt regular 1200845 ANID, permitieron identificar un set de bioindicadores candidatos (selección *in vitro*) que específicamente responden a ictiotóxicidad frente a microalgas ictiotóxicas bajo condiciones controladas, Estos candidatos moleculares deberán ser validados en el modelo *in vivo*. Si bien, el análisis *in vitro* posee innumerables ventajas, la principal dificultad sugerida es el tipo de análisis, dado que se requiere procesar las muestras en el laboratorio, lo que puede significar largos tiempos de procesamiento complejos cuando se deben tomar decisiones rápidas. Por lo tanto, es necesario **desarrollar un modelo el cual que permita el análisis *in situ* en tiempo real de manera no invasiva el seguimiento en la respuesta de los peces a la exposición subletal a una FAN de tal manera de poder tomar decisiones oportunas.**

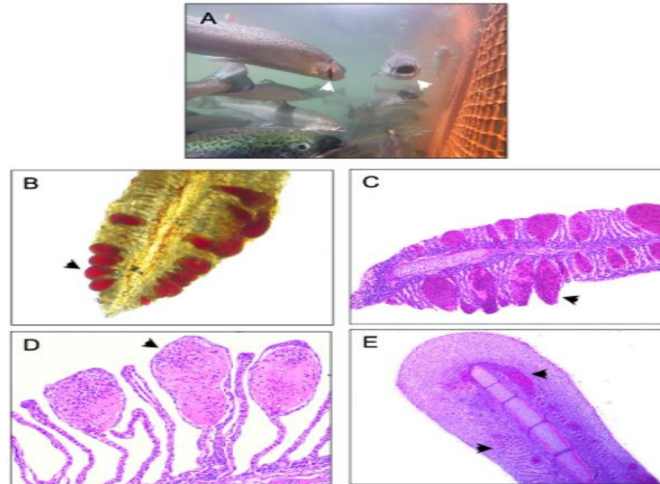


figura 3:Observaciones in situ, montajes completos y tejidos teñidos con H&E (hematoxilina y eosina) (arcos branquiales) del salmón del Atlántico moribundo (*Salmo salar*) durante el evento de *P. verruculosa* de 2016. A) Fotografía submarina tomada en una jaula de salmones que muestra peces afectados con opérculo branquial semiabierto (flecha izquierda) y boca abierta (flecha derecha) que evidencia dificultad respiratoria; La histopatología mostró B) Telangiectasia laminar multifocal (montaje completo); C) telangiectasia lamelar multifocal severa; y D) Trombosis lamelar multifocal que muestra material eosinofílico y eritrocitos dentro de las cavidades lamelares (200 ×)(modificado de (Mardones et al., 2021))

1.7. Detección de ictiotóxicidad *in vivo* usando peces

Regularmente cuando se busca realizar diagnóstico *in vivo* en animales, el procedimiento de toma de muestra en los modelos biológicos se proponen diferentes metodologías, proponiendo definir la existencia de métodos invasivos o no invasivos desde el punto de vista que afecten o no, el bienestar animal.

1.8. Modelos invasivos

Entre los tipos de muestreo invasivos se encuentran: 1.- **El muestreo de sangre**, se realiza una toma de muestra de sangre, debiendo sacar el pez del agua, donde, la exposición al aire no sólo causa hipoxia, pero también provoca una marcada respuesta de estrés fisiológico y conductual (Fernández-Alacid et al., 2018). Para disminuir efectos colaterales, el pez debe ser sedado (anestesia general) para permitir el muestreo de sangre y se realiza una punción con una jeringa en la vena caudal(Fernández-Alacid et al., 2018). 2.- **Muestreo de tejidos para biopsias** se debe anestesiarse al pez (para evitarles algún tipo de dolor o estrés) antes de realizar la biopsia, donde se extraen lesiones cutáneas, aletas y branquias. En el caso de necropsia el pez (ya encontrado muerto) no debe tener más de 6 horas de haber fallecido, donde se debe evaluar la superficie externa y observar las condiciones generales del cuerpo, identificar y observar las lesiones de la piel, las aletas, los ojos, la cavidad oral y el ano junto con tomar muestras de las lesiones deseadas(Sierra et al., 2003)

1.9. Modelos no invasivos: heces, orina, agua y mucosidad.

Los **modelos no invasivos** consideran el menor efecto perjudicial en el bienestar animal. 1.- **Muestreo de fecal**, consiste en recolectar las heces de los peces y realizarle el análisis correspondiente pero este tipo de muestreo tiene ciertas condiciones, es adecuado sólo para aquellas especies que tienen consistencia fecal y frecuencia de defecación susceptible de recolección. 2.- **Muestreo de orina**, no invasivo puede ser tanto un análisis de la orina del agua circundante o analizar directamente la orina desde el organismo, siendo este último invasivo). El muestro del agua consiste en tomar muestras del agua en que se encuentran los peces y llevarla a análisis, sin embargo, en muchos casos los indicadores de interés se diluyen en las muestras de agua y la manipulación junto por la propia extracción del agua puede generar estrés en los peces(Ellis et al., 2013).3.- El **muestreo de mucosidad, ha sido sugerido como el método menos invasivo** (Cunha et al., 2023; Fiordelmondo et al., 2023), pero también el menos estudiado. Este procedimiento de muestreo consiste en un raspado alguna zona del pez, la cual se debe realizar con bastante cuidado para no contaminar la muestra con sangre o algún tipo de tejido. Para el raspado usualmente se utilizan espátulas, cucharas, bisturí, entre otros(Fernández-Alacid et al., 2018; Guardiola et al., 2014). El muestreo de mucus resulta ser un modelo de interés, ya que, el moco secretado contiene elementos del sistema inmunológico (inmunoglobulinas específicas) y puede cambiar en respuesta a estímulos externos y estrés (Fiordelmondo et al., 2023). Además, la comprensión de los mecanismos de defensa inmune del moco de peces puede ser un desafío para la mejora en el desarrollo de estrategias efectivas *in situ* para dar seguimiento y control de alteraciones físicas frente a un desafío (Ren et al., 2015)

Dada la evidencia recopilada y el interés de monitoreo de los efectos de ictiotóxicas en salmonideos, se proponer establecer un protocolo estandarizado para la determinación de ARNm en tejido branquial de salmonideos, mediante una metodología la cual sea lo menos dolorosa para el organismo ya que, se está planteando en un contexto donde el organismo ya se encuentra estresado, puesto que los organismos los cuales están en contacto con ictiotóxicas presentaran alteraciones en la branquia con síntomas evidentes como la producción de mucus, hiperventilación y nado errático, este último se considera un punto sin retorno, puesto que los peces tienden a morir en cuestión de horas, no asociado a una densidad baja o alta de una especie de microalga ictiotóxica, se ha observado en ambos casos terminan con una muerte por asfixia, y ha sido asociada por la obstrucción de las branquias y producción exagerada de mucosidad (Oh et al., 2023).

1.10. Bioindicadores

Se define como bioindicador a una molécula biológica que se encuentra en la sangre, tejidos y secreciones del cuerpo, y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal, y por tanto podría ser utilizado para determinar la respuesta del cuerpo a una alteración (NIH, 2024). además, para que un bioindicador sea adecuado a la hora de desarrollar un monitoreo biológico, se debe seleccionar un bioindicador que se ajuste a casi todos los criterios de confiabilidad, que sea apto términos de la sensibilidad y también la especificidad del bioindicador (Poblete-Naredo & Albores, 2016).

1.10.1. Bioindicadores proteicos y enzimáticos en moco

En literatura existe evidencia de la presencia de factores inmunes innatos como las glicoproteínas, inmunoglobulinas, lisozimas, proteasas, lectinas, factores del complemento y péptidos antimicrobianos en el moco de los peces (Ren et al., 2015). Zheng et al. (2022), evidenció un aumento considerable en la expresión de bioindicadores enzimáticos como superóxido dismutasa (SOD) en peces sometidos a estrés por transporte respecto a un grupo control no estresado en muestras de moco. Estos resultados sugieren la posibilidad de evaluar bioindicadores proteicos en este tipo de muestras no invasivas.

1.10.2. Bioindicadores expresión génica en moco

Existe evidencia que el estrés se puede reflejar en un organismo vivo a diferentes niveles, incluidos cambios en la expresión de genes. Tal como se evidencia en los estudios de Fiordelmondo et al. (2023), en este trabajo se analizaron muestras de mucosidad extraída de la piel de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), las cuales se observaban de textura homogénea, uniforme y bien distribuidas en dos grupos estudiados, un grupo sometido a estrés y otro grupo no estresado. En este estudio se utilizaron y compararon niveles de expresión de genes de respuesta inmune tales como CD8, IL-6, IL-10a, IL-8, CD4, IgT, IgD, IgM, e IFN- γ . De los resultados, podemos señalar que se evidencia el aumento significativo de IL-6 (Interleucina-6) e IgD (Inmunoglobulina D) en el grupo estresado en comparación del grupo control (no estresado), sugiriendo que existe una correlación en el aumento de esta expresión genética del sistema inmunológico con el estado fisiológico de estrés.

En Ren et al. (2015) se observó que los genes seleccionados relacionados al sistema inmunológico (Lyg1, lyc, lyg, LEG, MBL, PGLYRP-5, PGLYRP-6, IL17A, CTSD y Óxido nítrico sintasa 2b1, inducible) presentes en el mucus del bagre (*Ictalurus punctatus*) obtenido de la zona branquial tuvieron una respuesta comparable en condiciones de estrés por bacterias (*Flavobacterium columnare*) al de las zonas comunes (hígado, bazo y riñón). También en Parida et al. (2018) se menciona, una diferencia en la expresión de genes en la comparación de un grupo control y un grupo sometido a estrés provocado por un parásito.

1.11. Bioindicadores de ictiotóxicidad candidatos para la evaluación del efecto en el tejido de branquia expuesta a concentración de *Karenia selliformis*.

Existen antecedentes que sugieren varios genes candidatos que responderían de manera específica en la branquia frente a un evento ictiotóxico de FAN. Es así que, Jiang et al. (2017) sugiere que es relevante incluir la vía de las caspasas. Es así como las principales candidatas, son la caspasa-3, siendo esta la principal ejecutora de la vía de apoptosis, junto a la caspasa-8, que es la principal iniciadora o reguladoras de esta vía. También se ha sugerido importante incluir a la caspasa-14, cuya función se ha asociado con activación de citoquinas, y la cual es activada por la caspasa-8. Mahmood et al. (2014) sugiere relevante la inclusión de proteínas de shock térmico (HSP), las que han sido relacionadas a la respuesta a toxinas y específicamente HSP70 y HSP60 han sido propuestos como buenos bioindicadores para niveles de toxicidad y exposición. Astuya et al. (2018) sugiere que la expresión del bioindicador HSP70 es capaz de detectar ictiotóxicidad mediada por especies reactivas de oxígeno y otros

compuestos exudados por la microalga *H. akashiwo*, evaluados mediante el modelo transwell con línea celular de salmonideos CHSE214. Adicionalmente, en este estudio se observó que los bioindicadores moleculares catalasa (CAT) y superóxido dimutasa (SOD) responden a la ictiotóxicidad de esta rafidoficea, mediada por ROS.

Lazado et al. (2020) ha sugerido que las enzimas antioxidantes de la vía de glutatión, Glutatión S Transferasa (GST), Glutatión peroxidasa (GPX) y Glutatión Reductasa (GR), serían claves como bioindicadores en relación con el estrés oxidativo generado por microalgas ictiotóxicas, puesto que GST funciona como un reponedor tardío (fase de recuperación celular), mientras que el GPX se ha sugerido modifica su expresión en los peces en respuesta a tóxicos ambientales. La GR es un antioxidante responsable de la regeneración del glutatión reducido durante un proceso desintoxicante peróxido y radicales libre, manteniendo el potencial redox de la célula, por lo que se sugiere podría ser un buen bioindicador frente a microalgas ictiotóxicas productoras de ROS.

Tang et al. (2007), evidencia cambios en la expresión de las proteínas Na⁺, K⁺-ATPasa (NKA) y el regulador transmembrana conductancia fibrosis quística (CFTR) ambas enzimas son reguladoras de la función de osmorregulación de la branquia. Estas proteínas pueden cambiar su patrón de expresión y localización en la branquia de peces en respuesta a la exposición con *Chatonella marina* (microalga ictiotóxica) por lo que se sugieren como potenciales bioindicadores para la respuesta a la ictiotoxicidad. Chasiotis and Kelly (2011) han caracterizado variaciones en la expresión de las proteínas de zona ocluyente (ZO-1) y ocludina ortóloga como proteínas de unión estrecha (TJ) las cuales participan como proteínas estructurales y formadores de barrera de epitelios como la branquia y tienden a tener un aumento con la presencia de estímulos de estrés como el aumento de cortisol, razón por la cual son atractivos bioindicadores y permitirían evidenciar un daño estructural en la branquia frente a una injuria ictiotóxica. Dados los antecedentes previamente mostrados, se seleccionarán los bioindicadores moleculares caspasa-3a, caspasa-3b, caspasa-8, SOD (superóxido dimutasa), CAT (catalasa), ECDH, HSP70, ZO-1, claudina12, claudina 4a, claudina 4b, NKA y CFTR, los que además evidenciaron variaciones en la expresión génica en el modelo *in vitro* en células RTgill-W1 en los tiempos de exposición (antes de 24h) frente a una densidad subletal de *K. selliformis*.

Por tanto, este seminario de título abordará dos desafíos, el primero obtener muestras de tejido branquial de RNAm que permita analizar la expresión de genes candidatos de respuesta a Ictiotoxicidad y segundo, en base a los candidatos seleccionados mediante el modelo *in vitro*, validaremos el uso de estos en un desafío *in vivo* con el objetivo de confirmar su uso como bioindicadores de ictiotoxicidad

II. Hipótesis

Existe una expresión diferencial significativa aumentada en los biomarcadores moleculares asociados a ictiotóxicidad frente a la exposición de *Karenia selliformis* en muestras de tejido branquial.

III. Objetivos

3.1. Objetivo general

Validar biomarcadores moleculares relacionados a estrés ictiotóxico en tejido branquial.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Estandarizar la obtención de moco y tejido branquial para la obtención de ARN.
- 2) Analizar la expresión diferencial de genes (bioindicadores) en muestras de tejido branquial de salmonideos frente a un desafío frente a *Karenia selliformis*.

IV. Materiales y métodos

4.1. Condiciones del cultivo de *Karenia selliformis*.

Para el cultivo de *K. selliformis* (cepa CREAN-KS02), aislada por el Dr. Mardones (Mardones et al., 2020) en la región chilena de Aysén, la cepa fue obtenida de la Colección de Algas Nocivas alojada en el Centro de Estudios de Algas Nocivas del Instituto de Fomento Pesquero de Chile (CREAN/IFOP; Puerto Montt, Chile) y posteriormente se mantuvo en el Laboratorio de Biotoxinas Marinas de la Universidad de Concepción (LBTx-UdeC; Concepción, Chile). La cepa fue cultivada en medio L1, preparado en agua de mar de la zona costera de Chile central (36°31' S, 73°08' O), filtrada a 0,2 μm , además de ser esterilizada en autoclave, con salinidad previamente ajustada a 32 PSU. Los cultivos se mantuvieron en medio L1 a 17 °C, bajo irradiancia de 140 $\mu\text{mol} \cdot \text{fotón} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de luz: oscuridad de 16h:8h. (Alfaro-Ahumada et al., 2024).

4.2. Estanques y peces utilizados.

Se utilizaron 6 estanques (peceras), los cuales tuvieron un volumen de 29-30 Litros. Los peces utilizados fueron de la especie *Salmo Salar*, los cuales abarcaron una longitud total entre los 28.5cm a los 33cm, además, tuvieron un peso que vario desde los 210 grs. hasta los 282 grs. Se establecieron dos condiciones, condición control 1 y concentración 1 respectivamente. Para ambos se estableció la salinidad de 30 PSU.

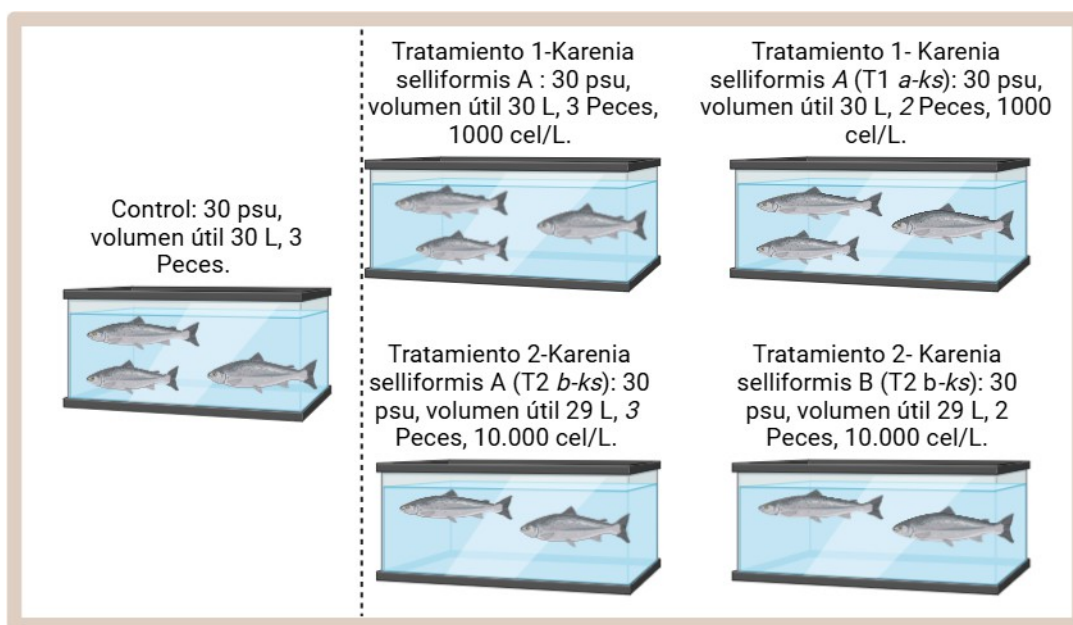


figura 4: Diseño experimental. Desafío de estrés con diferentes concentraciones de *Karenia selliformis* vs control, utilizando *Salmo salar*.

4.3.1 Toma de muestra mucus branquial

Prioritariamente se intentó establecer como matriz principal de estudio el mucus perteneciente a la zona branquial, esto debido a las oportunidades que esta presentaba como el establecer un tipo de muestra eficaz en la respuesta al estrés ictiotóxico y que además sea **no invasivo** para el organismo. Para ello se trabajó en establecer una

metodología y transporte óptimo para mantener la integridad de la muestra. Con respecto a la metodología, se compararán dos formas de obtención de mucus branquial, por raspado y por absorción. Se debe mencionar que las metodologías de toma de muestra (absorción y raspado) no se encuentran estandarizados en salmonideos en estudios previos, por lo que las siguientes metodologías son adaptaciones propias.

Método de absorción, se tomaron trozos pequeños y doblados de papel de la marca KIMTECH, los cuales, puestos entre los arcos branquiales para la absorción del mucus de la zona, luego se recolectará con la precaución necesaria para evitar daño a los arcos branquiales o alguna contaminación por sangre. Luego los trozos de papel se pusieron en un tubo falcón de 15ml, el cual tenía puesto una malla de plancton de 50 micras (con el fin de filtrar cualquier contaminante) se cerraron y fueron llevados a centrifugación a 7500 RPM por 10 minutos.

Método de raspado, se usó trozos del papel de la marca KIMTECH, los cuales fueron puestos con pinzas quirúrgicas (esterilizadas) y con un movimiento ascendente y descendente por la zona branquial, procurando realizarse con precaución para evitar el daño a los arcos branquiales o la contaminación por sangre. Los trozos de papel fueron puestos en un tubo falcón de 15ml, el cual tenía puesto una malla de plancton de 50 micras (con el fin de filtrar cualquier contaminante), se cerraron y fueron llevados a centrifugación a 7500 RPM por 10 minutos.

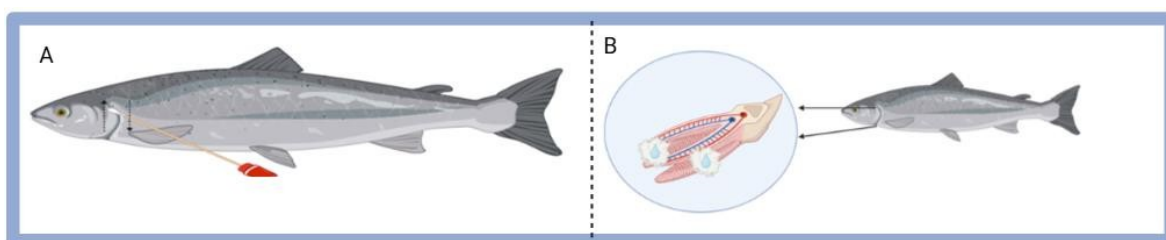


figura 5: ejemplos gráficos de la metodología para la toma de muestra (moco branquial)

Tabla 2: comparación de diferentes condiciones para el traslado de la muestra (mucus branquial)

Condición 1	Mantenimiento de cadena de frío, centrifugación inmediata y congelación del mucus obtenido
Condición 2	Mantenimiento de cadena de frío, centrifugación inmediata, al mucus se le agregará 500ul de reactivo trizol, una vez agregado se congelará el mucus con TRIZOL
Condición 3	La muestra no tendrá cadena de frío en ningún momento, sin embargo, esta será centrifugada y procesada de inmediato una vez llegados al laboratorio (proceso de extracción ARN).
Condición 4	La muestra no tendrá cadena de frío en ningún momento, sin embargo, esta será centrifugada de inmediato, una vez centrifugado el mucus, se le agregará 500ul de reactivo TRIZOL y se dejará incubar a T° ambiente (tiempo aproximado 1 hora).

4.3.2 Toma de muestras tejido branquial

Este procedimiento se realizó al inicio (pocos controles) y al final del desafío dado lo invasivo del procedimiento. Para la toma de muestra del tejido branquial, el pez se anestesia mediante inmersión en un balde con agua del estanque de cultivo (10 litros), al cual previamente se le agregó benzocaína en exceso para asegurar que el pez no tenga ningún tipo de dolor o estrés. Una vez sedado el pez, se levantó con cuidado el opérculo de los peces y se realizó un corte de los arcos branquiales (primer y segundo), dejando los arcos branquiales en tubos eppendorf 1.5ml y se le agregó TRIZOL.

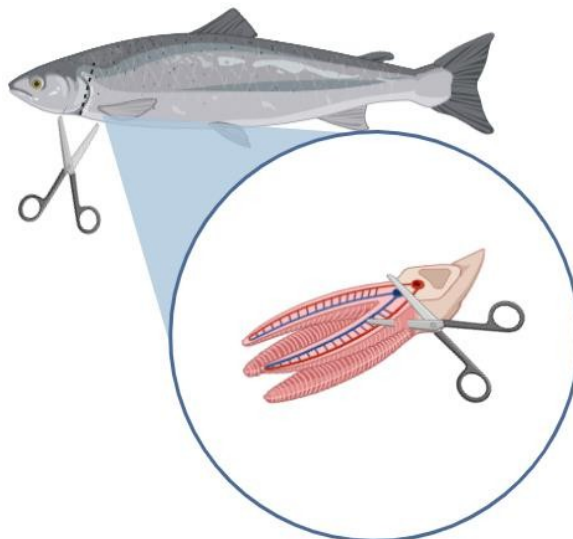


figura 6. Esquema representativo de la metodología en la toma de las muestras (tejido-arco branquial).

Para la estandarización de los genes candidatos se realiza tanto para mucus como para tejido extracción de ARN, los resultados de integridad y cantidad de este material genético es vital para la decisión de continuar con la síntesis de cDNA y qPCR para determinar las condiciones de PCR para seleccionar los genes candidatos que permitirán el análisis de expresión en animales desafiados a la microalga ictiotóxica *Karenia selliformis*.

4.4. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN de las muestras, se realizó en base al protocolo de "TRIzol Reagent User Guide" (ThermoFisher scientific), según las indicaciones del fabricante.

4.5. Lectura concentraciones de ARN (absorbancia)

Una vez realizada la extracción de ARN, se realizará con la lectura de su absorbancia para obtener la cuantificación de las muestras mediante el lector de microplacas Synergy H1 mediante la razón de pureza entre A260/A280 y A260/A230

4.6. Integridad del ARN obtenido

Para verificar la integridad del ARN obtenido, se realizó un gel de electroforesis con MOPS 1% con formaldehído al 1,2%, el cual se correrá a 70 V por 60 minutos y se visualizarán mediante el transiluminador UV myECL imager (Thermo scientific).

4.7. Selección y descarte de muestras.

Tanto para las muestras de mucus como del tejido, se realizara un proceso de selección y descarte, para esto las muestras deberán pasar dos filtros, previamente mencionados en los puntos “4.5 y 4.6”, es decir, para el uso de las muestras estas deben ser cuantificadas mediante su razón de pureza (A260/A280 y A260/A230), y a pesar de no tener un valor de pureza optimo, se debe realizar una verificación de integridad del ARN obtenido mediante electroforesis, en la cual se deberá obtener bandas definidas correspondiente a la presencia de ARN ribosómico (28s y 18s).

4.8. Tratamiento con DNasa

Se realizo el tratamiento con DNasa a las muestras de ARN obtenido, con el fin de limpiar el ARN resultante de cualquier ADN contaminante.

4.9. Síntesis cDNA y Transcripción reversa

Para la síntesis de cDNA se utilizó kit ReverAid H Minus First Strand cDNA Syntesis (Thermos) según las instrucciones del fabricante. Para la transcripción reversa (RT) se utilizará el termociclador Veriti 96 Well Thermal Cyclers (Applied Biosystem) utilizando Taq polimerasa (Thermos) según instrucciones del fabricante. El programa para la transcripción consistirá en un ciclo de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 15 segundos a tres temperaturas 2°C de la T_m del fabricante, 30 segundos a 72°C y finalmente 72°C por 7 minutos. Para verificar la integridad del cDNA, se realizará un PCR tiempo final con tres gens candidatos a housekeeping, en este caso β actina y EF-1 α utilizando el kit SYBRGreen con ROX (Thermos), 2 μ L correspondiente a la muestra de cDNA, 5 μ L de Master Mix del kit Maxima®, 0.5 μ L Forward, 0.5 μ L Reverse, 2 μ L agua libre de nucleasas. La integridad de los productos de PCR se verificará por electroforesis en gel de agarosa 1.7% con buffer TBE 1x y se correrá a 70 V por 60 minutos. Se utilizará un control negativo para cada muestra, la cual no contendrá ADNc. El tamaño de las bandas será comparado con el marcador de peso molecular GeneRuler ADN Ladder 100 pb. Los productos se visualizarán mediante el transiluminador UV myECL imager (Thermo scientific).

4.10. RT-qPCR

El PCR se programará con 35 ciclos en el Termociclador Veriti (Applied Biosystems), cada ciclo consistirá en un ciclo de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 15 segundos a tres temperaturas $\pm$ 2°C de la T_m del fabricante, 30 segundos a 72°C y finalmente 72°C por 7 minutos. Se realizará una estandarización de partidores para los genes de interés. Se realizará una PCR para cada gen de acuerdo con sus respectivas temperaturas de melting (T_m) más un control negativo de cada gen. La reacción se llevará a cabo en el termociclador Veriti 96 Well Thermal Cyclers (Applied Biosystem) utilizando Taq polimerasa (Thermos) según instrucciones del fabricante, los resultados de esta actividad permitirán la selección de los genes que serán analizados en el tejido branquial obtenidos desde el ensayo in vivo.

4.11. Genes utilizados

Tabla 3: Secuencias de los partidores diseñados (bioindicadores moleculares).

Los partidores se seleccionaron desde bibliografías y se verificaron con la herramienta bioinformática de la Base de Datos Nacional de Biología (NCBI), NCBI Primer-BLAST. Se presentan datos teóricos de tamaño del amplicón y su Tm

Marcador	Especie	Sentido (5'-3')	Amplicón (pb)	Tm (°C)
β -actina	<i>Salmo salar</i>	F: CTGGACTTTGAGCAGGAGAT R: GGAGTTGTAGGTCTCGT	131	57
EF-1a	<i>Salmo salar</i>	F: GTGGAGACTGGAACCCTGAA R: CTTGACGGACACGTTCTTGA	150	57
GAPDH	<i>Salmo salar</i>	F: ACACCGCCACCCAAAAGACG R: GGATGACGGACACGTTCTTGA	123	59
CASP3a	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: CATCCAATCGCTGTGTGAGATGA R: TATCATGGTAAATACATCTC	192	53
CASP3b	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: CAACGTGAAAGTTGCCAATG R: AAGAGTCCGGTGAGCTTCTG	180	53
CASP8	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: AGCAACCAGGAACAGCAACT R: ATAGGATTGCGTCGGTGAAG	174	57
CFTR	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: ACTTACCTAGCTCCTGGGTCTCTG R: CTGACCATGTGCTGATCTTAGTCCAA	176	57
Cldn 12	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: ACGACCGCATCTTCTCAGAC R: TAGGGAGTGTGGGTAGAGGC	150	57
CLDN4a	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: AACTCCTGCCCATAAGAGAAGT R: TAGGGTTATGGGAATGGCTTCAA	110	53
CLDN4b	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: TATGCTGCCTGTAGGGATCATC R: TGGTACAGTGTCTTATACAGCA	109	57
ECDH	<i>Salmo salar</i>	F: CAAAGGAGCGGATGTCCAGT R: TCCTTCTTCTCGCCACCTCT	150	57
Hsp70b	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: AGGCCCAACCATTGAAGAGA R: GCAATGTCCAGCAATGCAATA	167	57
Nka	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: CTGCTACATCTCAACCAACAACATT R: CACCATCACAGTGTTCAATTGGAT	81	53
Ocln	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: GACAGTGAGTTCCCCACCAT R: ATCTCTCCCTGAAGGTCCTT	101	57
SOD	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: CCGTATTCTTTGAGCAGGAG R: AGCCGTTGGTGTGTCTC	120	57
ZO-1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F: CAAAGCCAGTGTATGCCCAG R: CAGCTTCATACTCGGCCTGA	119	60

4.11.) Verificación de los partidores.

4.11.1) Temperatura de annealing.

La determinación de la temperatura de annealing de cada par de partidores, se realizará mediante PCR en tiempo final. El PCR se programará con 35 ciclos en el Termociclador Veriti (Applied Biosystems), cada ciclo consistirá en un ciclo de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 15 segundos a tres temperaturas $\pm 2^\circ\text{C}$ de la T_m del fabricante, 30 segundos a 72°C y finalmente 72°C por 7 minutos. Se realizará una estandarización de partidores para los genes de interés. Se realizará una PCR para cada gen de acuerdo con sus respectivas temperaturas de melting (T_m) más un control negativo de cada gen. La reacción se llevará a cabo en el termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem) utilizando Taq polimerasa (Thermos) según instrucciones del fabricante.

4.11.2) Rango Dinámico.

Para determinar la eficiencia de la amplificación de los partidores, se realizará un rango dinámico mediante un PCR de tiempo real en el equipo Eco™ Real-Time PCR System (Illumina) y el kit SYBRGreen con ROX (Thermos), 2 μL de muestra de cDNA (a partir de 100 ng de mRNA) y 8 μL de Máster Mix del kit Maxima®. La programación del equipo consistirá en una primera etapa de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 30 segundos a la temperatura annealing de cada partidador y 30 segundos a 72°C. Luego se realizará una curva de melting de 95°C a 60°C donde finalmente la temperatura suba gradualmente cada 0,3°C hasta los 95°C. De esta manera se determinó la eficiencia de la reacción; la concentración de muestra necesaria para evaluar la expresión de cada marcador y descartar productos inespecíficos, como también dímeros de partidores que pudieran formarse durante la reacción. Se realizará una curva de calibración con 5 diluciones seriadas de ADNc 1:5, partiendo de una concentración inicial de 1000 ng/ μL , de las cuales 2 μL de cada dilución fueron depositadas por triplicado más un control negativo sin ADNc. La selección de los partidores que se utilizarán se llevará a cabo mediante la calidad de los productos de PCR: se evaluó la eficiencia de la amplificación (90-110%), C_q acorde con las diluciones realizadas y la curva de melting con el fin de excluir la formación de dímeros de partidores y productos inespecíficos.

4.12) Análisis estadístico.

Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA two way con el software gradphad Prism. Para el presente análisis se utilizó "Tratamiento vs Expresión génica". En conjunto se realizó un test de comparación multiple Tukey's con un valor ajustado de $P < 0.0001$ para considerarse un valor significativo.

5. Resultados

5.1.1 Elección de método de toma de muestras

Los resultados de los dos protocolos de toma de muestra desde el mucus branquial fueron comparados mediante los parámetros propuestos en la **Tabla 9**. La comparación de los parámetros de eficiencia como volumen del mucus obtenida, contaminación del mucus y presencia de desprendimiento lamelar fueron significativamente superior por la técnica de absorción (más eficiente) en la obtención de mucus en comparación con la técnica de raspado de mucus.

5.1.2 Extracción de ARN en moco branquial

Los resultados de la extracción de moco desde especímenes son presentados en la

Tabla 4, podemos observar una elevada variabilidad entre condiciones, siendo la condición 4 la que presenta mayor cantidad de ácidos nucleicos pero la relación 260/280 y 260/230, no fueron significativamente diferentes en comparación con las demás condiciones. A pesar de los resultados, se evaluó la calidad de los mensajeros mediante observación en gel de agarosa (**figura 7**), en la cual no se pudo observar ninguna banda definida, específicamente las bandas 28s y 18s).

Tabla 4: Cuantificación de ácidos nucleicos de las muestras de mucus obtenida

Tipo de condición	Volumen Muestra	Ácidos Nucleicos	Unidad	260/280	260/230
Condición 1	500ul	62.9	ng/ μ l	1.994	0.55
Condición 2	500ul	39.539	ng/ μ l	1.883	0.381
Condición 3	500ul	159.9	ng/ μ l	1.954	0.342
Condición 4	500ul	288.8	ng/ μ l	1.936	0.491

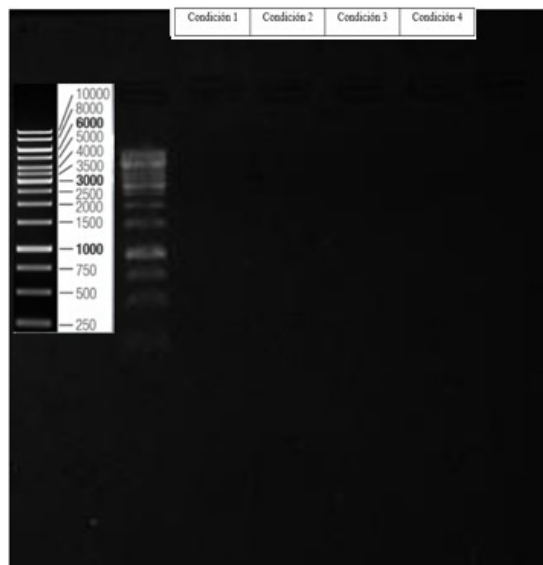


figura 7: gel de electroforesis. agarosa al 1% con buffer TAE 1x, 100V por 1 hora

5.2.1 Extracción de ARN del tejido branquial

Los resultados de la extracción de ARN desde tejido branquial correspondiente a salmonideos, los cuales abarcaron una longitud total entre los 28.5cm a los 33cm, además, tuvieron un peso que vario desde los 210 g. hasta los 282 g. Estos son presentados en la

Tabla 5, donde se observó que, las muestras tejido branquial obtuvieron diversos valores en las relaciones A260/280 y A260/230, a pesar de que algunos de estos fueron menor al valor optimo de muestra se decidió trabajar igualmente con ellas, a pesar de no ser lo recomendado. Además, se analizó la pureza e integridad del ARN resultante mediante gel de agarosa (**figura 8**), en el cual, podemos observar bandas definidas, exceptuando las muestras de los carriles 3, 5 y 11.

Tabla 5: Cuantificación de ácidos nucleicos de las muestras de tejido obtenidas.

Control: 30 psu, volumen útil 30 L, 3 Peces. Tratamiento 1- Karenia selliformis A (T1 a-ks): 30 psu, volumen útil 30 L, 3 Peces, 1000 Cel/ml. Tratamiento 2-Karenia selliformis A (T2 b-ks): 30 psu, volumen útil 29 L, 3 Peces, 10.000 Cel/ml. Tratamiento 1- Karenia selliformis A (T1 a-ks): 30 psu, volumen útil 30 L, 2 Peces, 1000 Cel/ml. Tratamiento 2- Karenia selliformis B (T2 b-ks): 30 psu, volumen útil 29 L, 2 Peces, 10.000Cel/ml.

Nombre de la muestra	260/280	260/230	ng/ul
Control (1)	1.443	1.357	1857
T1 a-ks.1 (2)	1.968	0.874	777.2
T1 a-ks.2 (3)	1.927	0.282	375.4
T1 a-ks.3 (4)	1.031	1.110	704.4
T1 b-ks.1 (5)	1.783	0.689	521.6
T1 b-ks.2 (6)	1.881	0.834	447.7
T2 a-ks.1 (7)	0.978	1.285	1944.9
T2 a-ks.2 (8)	1.260	1.010	2368.6
T2 a-ks.3 (G)	0.989	0.995	2058.4
T2 a-ks.4 (10)	0.967	1.348	2000.5
T2 b-ks.1 (11)	1.254	1.534	1959.4

5.2.1. Integridad del ARN

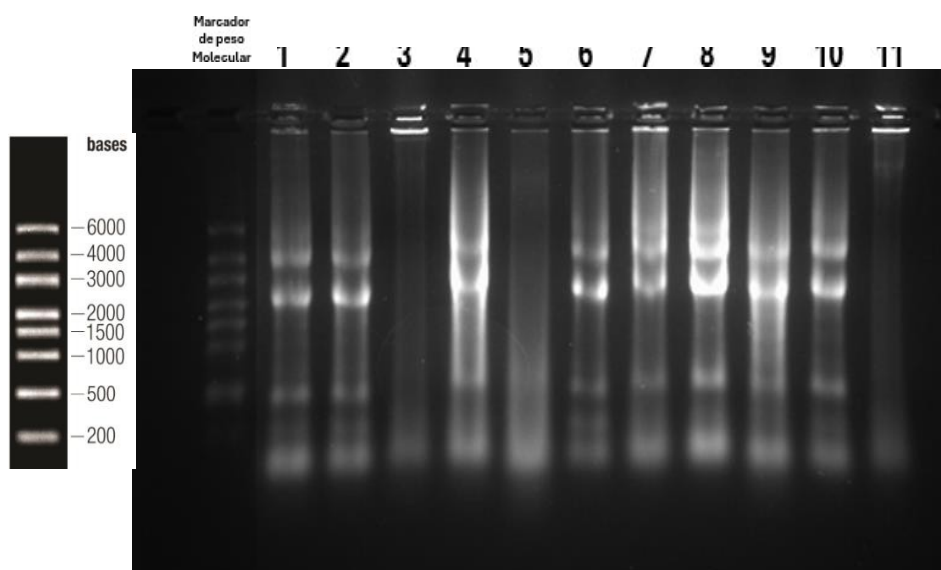


figura 8: Visualización de la integridad de ARN en muestras de tejido branquial obtenidas, en gel de agarosa-formaldehído 1,2 con MOPs 1x.

Objetivo 2) Analizar la expresión diferencial de genes (bioindicadores) en muestras de tejido branquial frente a *Karenia selliformis*

5.3. Tratamiento con DNasa

Las muestras obtenidas (**Tabla 5**) post visualización mediante electroforesis (**figura 8**) las cuales se les observó bandas definidas (28s y 18s), fueron llevadas a tratamiento con DNasa, con la finalidad de eliminar contaminación con ADN. Como se observa en la **Tabla 6**, los valores obtenidos bajo A260/280, están en el rango óptimo de trabajo (**Tabla 10**). A su vez, el análisis de ARN, mediante gel agarosa, muestra dos bandas definidas las cuales con coincidentes de las bandas 28s y 18s (**figura 9**), mencionar que las muestras pertenecientes al carril 1 y 8 tuvieron bandas, pero estas fueron tenues.

Tabla 6: Cuantificación de ácidos nucleicos de las muestras de tejido obtenidas post tratamiento con DNasa. Control: 30 psu, volumen útil 30 L, 3 Peces. Tratamiento 1- *Karenia selliformis* A (T1 a-ks): 30 psu, volumen útil 30 L, 3 Peces, 1000 cel/L. Tratamiento 2-*Karenia selliformis* A (T2 b-ks): 30 psu, volumen útil 29 L, 2 Peces, 10.000 cel/L. Tratamiento 1- *Karenia selliformis* A (T1 a-ks): 30 psu, volumen útil 30 L, 3 Peces, 1000 cel/L. Tratamiento 2- *Karenia selliformis* B (T2 b-ks): 30 psu, volumen útil 29 L, 2 Peces, 10.000cel/L.

Nombre de la muestra	260/280	260/230	ng/ul
Control (1)	2.000	2.026	774.60
T1 a-ks.1 (2)	1.692	1.421	675.4
T1 a-ks.3 (3)	2.099	1.831	1648.4
T1 b-ks.2 (4)	2.048	1.507	521.8
T2 a-ks.1 (5)	2.152	1.564	643.3
T2 a-ks.2 (6)	1.658	1.183	643.3
T2 a-ks.3 (7)	1.669	1.647	902.9
T2 a-ks.4 (8)	2.215	1.889	173.2

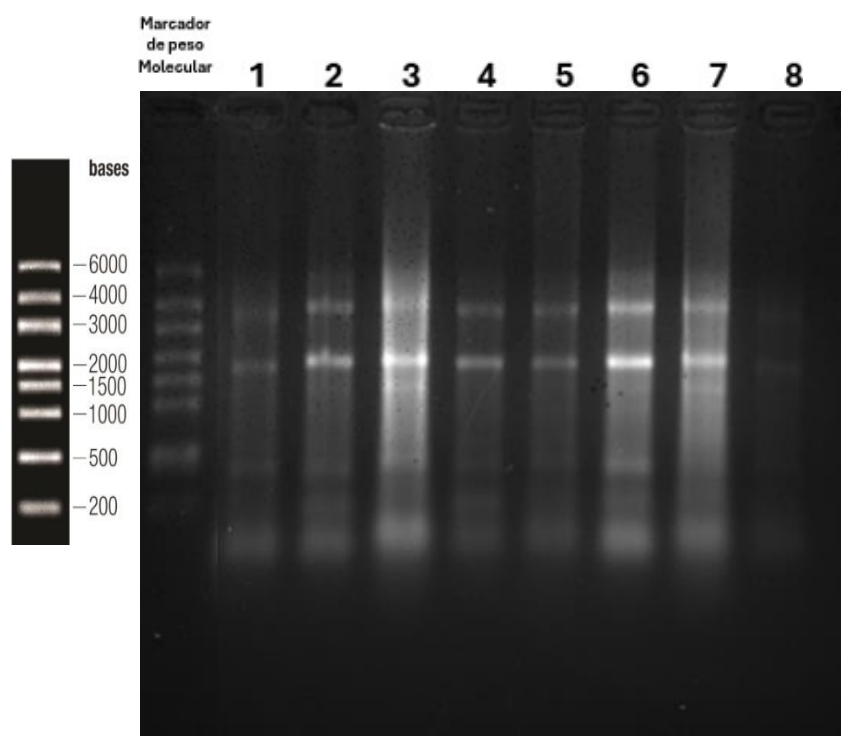


figura 9: Visualización de la integridad de ARN en muestras de tejido branquial obtenidas post tratamiento con DNasa, en gel de agarosa-formaldehído 1,2 con MOPs 1x.

5.4 Estandarización de genes.

Para la estandarización de los genes, se realizó PCR tiempo final para verificar la obtención de tamaño de producto esperado (amplicon). En la **figura 10**, se observan bandas definidas correspondientes a los productos esperados de los genes β -actina, Ef-1a, caspasa 3b, claudina 4a, claudina 4b, E-cadherin, zo-1, ocln, CFTR y Nka. En la **Tabla 7**, se podrán ver el gen correspondiente a cada carril del gel de electroforesis, para la PCR tiempo final se usó ADNc (ver **Anexos**) de la línea celular CHSE-214 (Astuya et al., 2018).

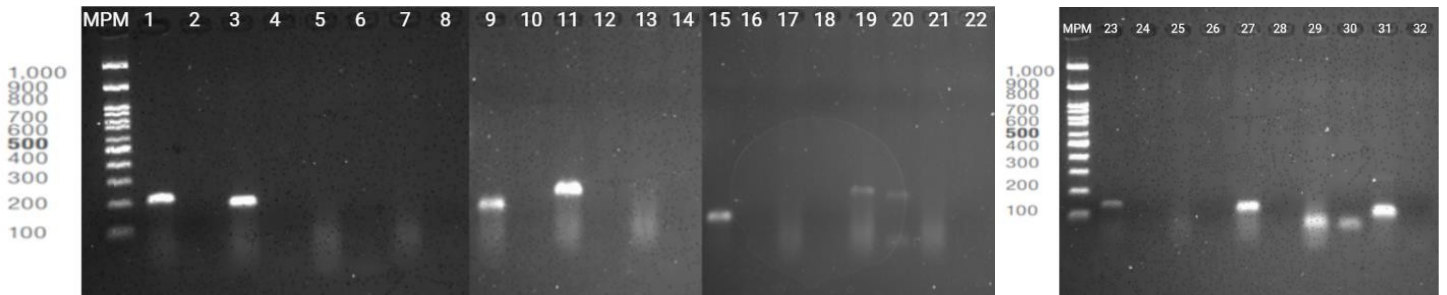


figura 10: Electroforesis en gel de agarosa para producto PCR, usando línea celular CHSE-214.

Tabla 7: Nombre del gen con su ubicación en carril de gel de electroforesis correspondiente.

Nombre del gen	Numero carril correspondiente	Nombre del gen	Numero carril correspondiente	Nombre del gen	Numero carril correspondiente
Marcador de peso molecular	MPM	ECDH	11	SOD	22
β -actina	1	ECDH negativo	12	Zo-1	23
β -actina	2	Cldn12	13	Zo-1 negativo	24
Ef-1	3	Cldn12 negativo	14	Caspasa-8	25
Ef- 1 negativo	4	CLDN4a	15	Caspasa-8 negativo	26
GAPDH	5	CLDN4a negativo	16	Ocln	27
GAPDH negativo	6	Caspasa-3a	17	Ocln negativo	28
Hsp70	7	Caspasa-3a negativo	18	CFTR	29
Hsp70 negativo	8	Caspasa-3b	19	CFTR negativo	30
Cldn 4b	9	Caspasa-3b negativo	20	NKA	31
Cldn 4b negativo	10	SOD	21	NKA negativo	32

Se estandarizo el gen Nka mediante qPCR (**figura 11**), en el cual se determinó un único plot de amplificación correspondiente al partidador, además, la curva de eficiencia la cual se realizó en una dilución seriada 1:5 desde los 1000ng/ul de ADNc, mostro una eficiencia del 108% y un R de 0.86. En la **Tabla 8**, se presentaron los partidos estandarizados por qPCR en conjunto con su T_M correspondiente y eficiencia, los cuales pertenecen al Laboratorio de biotoxinas UDEC (LBTx) y San Martín (2024).

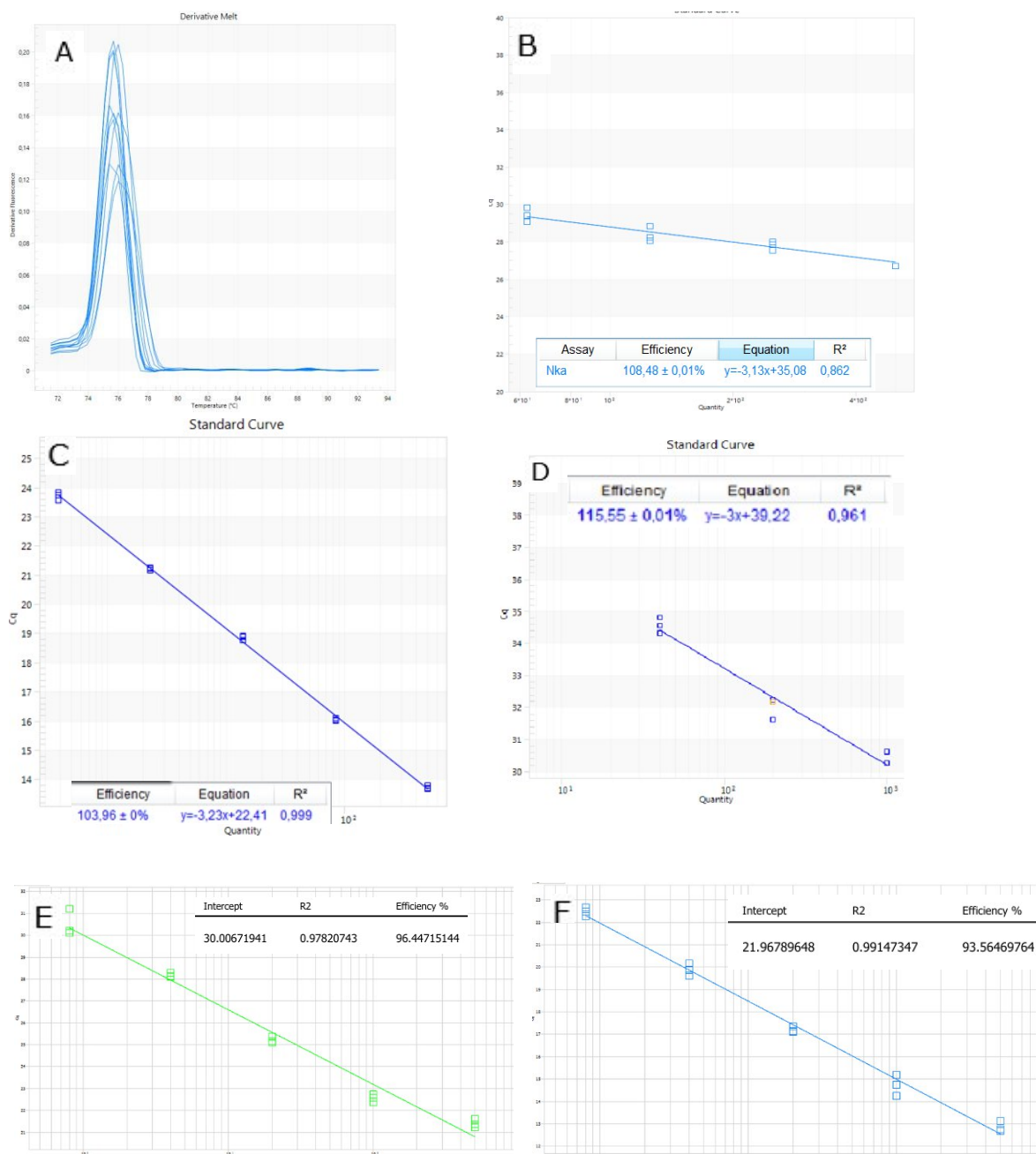


figura 11: A: curva de melting NKA. B: curva de eficiencia Nka. C: Curva de eficiencia de β-actina. D: Curva de eficiencia Casp3b. E: Curva de eficiencia de ECDH. F: Curva de eficiencia de EF-1a (San Martín, 2024)

Tabla 8: Partidores estandarizados por qPCR.

Gen	Tm (°C)	Eficiencia (%)	Referencia
θ-Actina	57	103	(San Martín, 2024)
ef-1º	57	93,6	(San Martín, 2024)
Cadherina epitelial (ecdh)	57	96,45	(San Martín, 2024)
Caspasa 3b (casp3b)	57	115	(San Martín, 2024)
Nka	53	108	

En la **figura 12: Expresión relativa normalizada de genes seleccionados mediante PCR cuantitativa en tiempo real**. las barras indican la comparación entre la expresión relativa normalizada y el tratamiento (cel/L) con *Karenia selliformis*, **** muy significativo y ns no significativo. **figura 12**, se observa la expresión relativa normalizada de los genes de interés versus a un desafío con *Karenia selliformis* mediante dos concentraciones/tratamientos diferentes, además, para normalizar la qPCR, se utilizó el gen EF-1a. En la que se en los cuatros genes que se evaluaron, El gen NKA, obtuvo valores de fold change (concentración de 1000cel/L) de 0.2. Mientras que en la segunda concentración obtuvo un valor 0.47 en la expresión de fold change. El gen Hsp70 obtuvo valores de 1.47 y 2.27 en las concentraciones de 1.000 cel/L y 10.000 cel/L respectivamente, sin embargo, ninguno de estos resultó fueros significativos (ns). En el gen ECDH, obtuvo un valor de fold change de 20, donde únicamente se tuvo este aumento en la expresión en la concentración de 10.000 cel/L, ya que, en la concentración de 1.000 cel/L, tuvo un valor de 0.49. El gen caspasa3b, tuvo incremento en los valores de fold change en la concentración de 1.000 cel/L y 10.000 cel/L, siendo estos valores 3.52 y 35 respectivamente. Tanto para el gen ECDH y Casp3b fueron significativos (****).

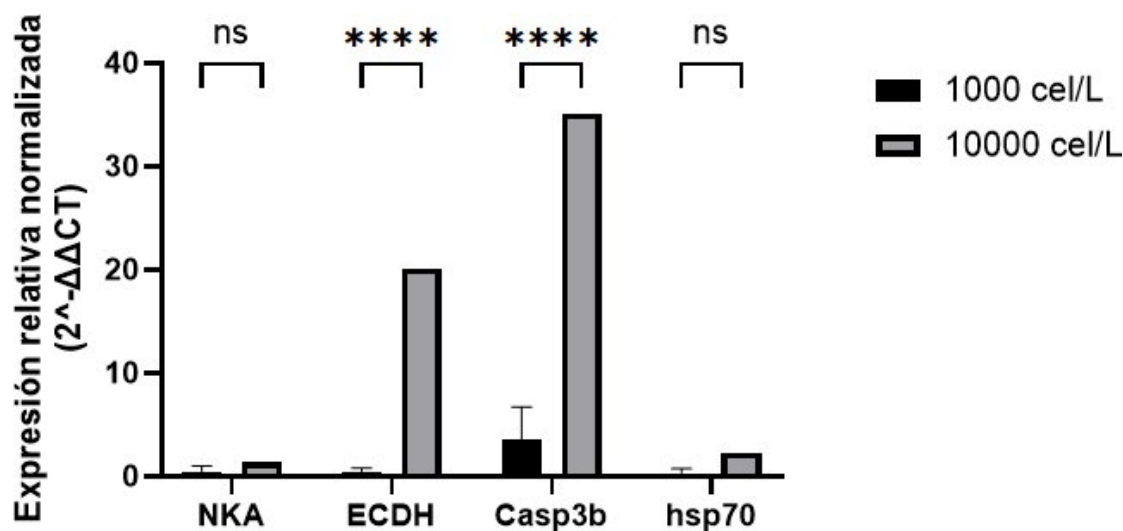


figura 12: Expresión relativa normalizada de genes seleccionados mediante PCR cuantitativa en tiempo real. las barras indican la comparación entre la expresión relativa normalizada y el tratamiento (cel/L) con *Karenia selliformis*, **** muy significativo y ns no significativo.

6. Discusión

El uso de animales en Ciencia es fundamental para escalar en conocimiento desde modelos *in vitro* como líneas celulares, sin embargo, estos estudios *in vivo* deben ser abordados con respeto y siguiendo el principio de las 3 R de bioética (reemplazo, reducción y refinamiento). El respeto por el uso animal en la ciencia es abordado como concepto de bienestar animal centrándose en la preocupación por minimizar el sufrimiento animal (Muñoz, 2014; Rault et al., 2025). En este estudio, se intentó establecer un protocolo de toma de muestras que fuera lo menos invasivo posible, Fiordelmondo et al. (2023) sugiere el mucus como un modelo de interés no invasivo, ya que, el moco secretado contiene elementos del sistema inmunológico (inmunoglobulinas específicas) y puede cambiar en respuesta a estímulos externos y estrés. Además, la comprensión de los mecanismos de defensa inmune del moco de peces puede ser un desafío en la optimización de estrategias efectivas *in situ* para dar seguimiento y control de alteraciones físicas frente a un estímulo estresante (Ren et al., 2015). Por ello se propuso trabajar con el mucus como matriz inicial de estudio sensor para evaluar algunos biomarcadores moleculares de estrés frente a ictiotóxicidad. Sin embargo, el uso del mucus como matriz de estudio, presenta varias complejidades en el proceso, una de ellas fue la estandarización en la toma de muestras. En literatura se mencionan varias formas en las que se puede recolectar este tipo de muestras (mucosidad) (Ellis et al., 2013; Fernández-Alacid et al., 2018; Guardiola et al., 2014), entre las que se destaca la absorción y el raspado, por lo que se pusieron varios puntos de comparación entre ellos para determinar el óptimo para la recolección de mucus branquial.

Tabla 9: comparación técnicas recolección de muestra

Técnica de recolección de muestra	Parámetro comparativo	Observaciones
absorción	Desprendimiento de tejido lamelar	No tuvo desprendimiento de tejido
	Contaminación del mucus (presencia de sangre)	Nula presencia de sangre en el mucus obtenido
	Cantidad/volumen mucus	>500 ul de mucus
Raspado	Desprendimiento de tejido lamelar	Tuvo desprendimiento de tejido
	Contaminación del mucus (presencia de sangre)	Presencia de sangre en el mucus obtenido
	Cantidad/volumen mucus	<500 ul de mucus

Tabla 10: Valores indicativos de pureza en ácidos nucleicos (Banco Nacional de ADN, 2024)

ADN/ARN	Calidad optima	CALIDAD ACEPTABLE	Contaminado sí:
	$260/280 \geq 1,8$	$260/280 \geq 1,6$	$260/280 < 1,6$
	$260/230 \geq 1,8$	$260/230 \geq 1,6$	$260/230 < 1,6$

Además, del tipo de técnica de recolección de muestra, otra las de las variables presente fue el transporte de la muestra, en donde se compararon cuatro diferentes condiciones para las muestras, con el fin de determinar la óptima, para la obtención del ARN óptimo mediante técnicas cualitativas (gel de electroforesis) y cuantitativas (cuantificación por lector de microplacas Synergy H1. Como se observó en la **Tabla 4**, la "condición 4" tuvo la concentración de ácidos nucleicos más alta respecto a las demás condiciones de traslado, sin embargo, respecto a indicado en la **Tabla 9**, En el caso del ARN la relación de absorbancias A260/280 con un valor entre 2.0-2.2 se considera indicativa de un ARN de pureza óptima, mientras que valores A260/280 > 1.7 se corresponden a una muestra de ARN con una pureza aceptable. A260/280 < 1.7 es un indicativo de contaminación por la presencia de compuestos aromáticos. Al igual que en muestras de ADN la relación A260/230 en muestras de ARN se corresponde a un valor de 2 o ligeramente superior. Sin embargo, no existe una opinión consensuada sobre el valor mínimo en la relación A260/230 que una muestra debe tener para ser considerada funcional. En general se considera que el ARN es aceptable si A260/230 es > 1.5 (Banco Nacional de ADN, 2024). Por lo que la "condición 4" a pesar de poseer la mayor concentración de ARN y tener un valor de A260/280 óptima, está presenta una A260/230 dentro de lo catalogada como contaminada por compuestos aromáticos/fenoles, lo cual se infiere que fue provocado por el reactivo TRIzol, el cual fue utilizado para la extracción de ARN. Posterior a la cuantificación, se realizó un gel de electroforesis (**figura 5**), para todas las condiciones, sin embargo, ninguna presento las bandas 28s y 18s, las cuales son indicadores de la presencia de material ribosomal.

Debido a la complejidad que se tuvo al trabajar con el mucus branquial (razón de pureza del mucus obtenido, integridad de la muestra, etc.), fue que se decidió trabajar con el tejido branquial. Al realizarles el proceso extractivo de ARN de las muestras de tejido branquial, se les realizó una cuantificación por lector de microplacas (Synergy H1), con el fin de cuantificar su concentración de ARN, además, de realizar gel de electroforesis con la finalidad de observar la integridad del ARN, en las muestras de tejido branquial. En la **figura 6**, se pudo observar que las muestras **Control, T1 a-ks.1, T1 a-ks.3, T1 b-ks.2, T2 a-ks.1, T2 a-ks.2, T2 a-ks.3 y T2 a-ks.4**, presentaron las bandas 28s y 18s (presencia ribosomal) bien definidas, lo que nos muestra una buena integridad de ARN. Por lo que las muestras previamente mencionadas, se les realizó tratamiento con DNasa, con la finalidad de purificar las muestras de cualquier tipo de ADN contaminante. En la **figura 7**, todas las muestras están o superaron el parámetro de calidad aceptable en la relación A260/280, mientras que en la relación A260/230, las muestras T1 a-ks.1, T1 b-ks.2, T2 a-ks.1, T2 y a.ks.2 tuvieron una relación A260/230 < 1.6. Con respecto al respecto gel de electroforesis, todas las muestras tuvieron bandas 28s y 18s definidas, solamente la muestra T2 a-ks.4 a pesar de tener las bandas ribosomales definidas, estas fueron tenues en comparación con las demás muestras.

Dentro de los objetivos de la presente tesis está el validar biomarcadores moleculares relacionados a estrés ichtiotóxico en tejido branquial, inicialmente se habían considerado un set de 16 genes (**Tabla 3**) de los cuales 3 son genes housekeeping (β -actina, EF-1 y GAPDH), mientras que los 13 restante resultaban ser de gran interés al poseer relación con el estrés ichtiotóxico. El gen Nka (ATPasa Na⁺/ K⁺), el cual es ligado a la función fisiológica e la branquial, osmorregulación), la cual en literatura se ha visto que es reguladora de la función de osmorregulación de la branquia, además, de poder cambiar su patrón de expresión y localización en la branquia de peces en respuesta a la exposición con *Chatonella marina* (microalga ichtiotóxica)(Tang et al., 2007).

El gen ECDH (e-cadherin) este asociado a la proteína de unión la cual se encarga del mantenimiento de las uniones, y la plasticidad de tejidos epiteliales, se ha encontrado información de tener una posible implicación más amplia en el funcionamiento del sistema inmunológico de los teleósteos. Otro ejemplo de estas proteínas de unión estrecha se encuentra zo-1(Proteína 1 de unión estrecha), ocldn (Ocludina), y cldn (claudina)(Chasiotis & Kelly, 2011; Proietti et al., 2019).

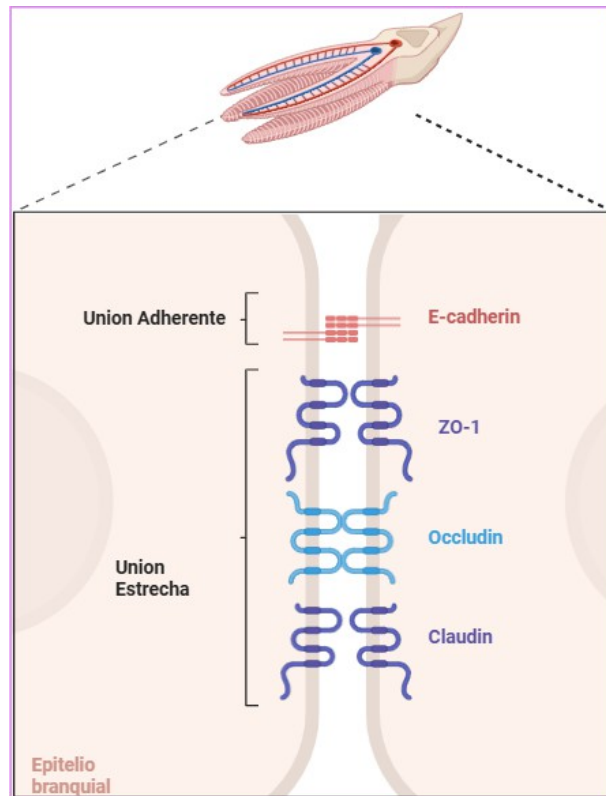


figura 13: Esquema representativo de las proteínas de unión y adhesión.

El gen casp3b (caspasa 3b), la cual tiene su funcionalidad con la vía apoptótica, siendo esta la principal ejecutora de la vía de apoptosis(Jiang et al., 2017). Los genes de proteínas de shock térmico (HSP) han sido relacionadas a la respuesta a toxinas y específicamente HSP70, han sido propuestos como buenos bioindicadores para niveles de toxicidad y exposición(Mahmood et al., 2014), además, han sido propuestos como buenos bioindicadores para niveles de toxicidad y exposición. Mientras, Astuya et al. (2018) sugiere que la expresión del bioindicador HSP70 es capaz de detectar ictiotóxicidad mediada por especies reactivas de oxígeno y otros compuestos exudados por la microalga *H. akashiwo*, evaluados mediante el modelo transwell con línea celular de salmonideos CHSE214.

Tabla 11: genes estandarizados por PCR convencional y tiempo real

Gen	especie	Gen estandarizado por PCR
β -actina	<i>Salmo salar</i>	Convencional /tiempo real
EF-1 α	<i>Salmo salar</i>	Convencional/tiempo real
GAPDH	<i>Salmo salar</i>	
CASP3a	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Convencional
CASP3b	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Convencional /tiempo real
CASP8	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	
CFTR	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	
Cldn 12	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	
CLDN4a	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Convencional
CLDN4b	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Convencional
ECDH	<i>Salmo salar</i>	Convencional/tiempo real
Hsp70b	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Convencional /tiempo real
Nka	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Convencional/tiempo real
Ocln	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Convencional
SOD	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Convencional/tiempo real
ZO-1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Convencional

Como se observó en la **figura 10** los genes β -actina, Ef-1alfa. Casp3a, casp3b, cldn4a, cldn4b, ecdh, hsp70b, nka, sod y zo-1, fueron estandarizados mediante PCR tiempo final y obteniendo el tamaño del producto esperado. En la **figura 11**, se observó un único pick, el cual es perteneciente a la TM (temperatura de melting) del gen de interés NKA, además, ha dicho gen se pudo realizar su curva de eficiencia correspondiente, la cual tuvo una eficiencia del 108%, lo cual se encuentra dentro de los parámetros aceptado (90%-110%).

Con respecto a la **figura 12**, se observa que entre el tratamiento 1, perteneciente a 1.000 cel/L de *Karenia selliformis*, y el tratamiento 2, perteneciente a 10.000 cel*L⁻¹ de *Karenia selliformis*, El gen de interés ECDH, el cual pertenece a la regulación de proteínas de adhesión celular, tuvo un alza significativa en comparación entre el tratamiento 1 y tratamiento 2, esto hace inferir que al haber mayor cantidad de células de la microalga *Karenia selliformis*, aumente el estrés a nivel celular, generando un desequilibrio en las células, lo que hace que aumente la expresión del gen ECDH para poder mantener el equilibrio y estructura de la célula. En la comparación del tratamiento 1 y 2 respecto a

la expresión del gen Casp3b, este gen está relacionado a la regulación genética, específicamente a la iniciación y control de la vía apoptótica(Jiang et al., 2017), se observó un aumento significativo en la expresión de dicho gen, este aumento en la expresión a pesar de ser en ambos tratamientos, fue mayor en el tratamiento perteneciente a las concentración de $10.000 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$ de *Karenia selliformis*, por lo que se infiere que al estar en presencia del estrés provocado por la microalga, este gen comienza aumentar su expresión con la finalidad de eliminar las células que estén dañadas por el estrés ictiotóxico. Respectivamente los genes Nka ($\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$) y Hsp70 (Proteína de choque térmico) no se observaron cambios significativos, lo quiere decir que los datos obtenidos no se evidencio diferencias entre los grupos. Sin embargo, en ambos genes el tratamiento 2 ($10.000 \text{ cel/L Karenia selliformis}$) tuvieron una expresión relativa normalizada mayor que en el tratamiento 1. Sobre el aumento en la expresión de Hsp70 en el tratamiento 2, esto sugiere que se provoca debido al estrés provocado por la mayor concentración de células de *Karenia selliformis*, por lo que este gen aumenta su expresión con el fin de proteger la célula, promoviendo el correcto plegamiento de proteínas y evitar la desnaturalización de proteínas. La diferencia en la expresión génica normaliza entre el tratamiento 1 y 2 con respecto al gen Nka, siendo el tratamiento 2 levemente mayor al tratamiento 1, se infiere es ocasionado debido al rol que tiene este con la osmorregulación y equilibrio iónico, por lo que el estrés que genera la microalga afecta directamente a este equilibrio por lo que, el gen se expresa con la finalidad de regularizar el balance iónico de la célula. A pesar de que los genes Hsp70 y Nka no fueron significativos, esto no los descarta como un biomarcador, pero si se necesitara de mayores estudios futuros para comprobar o no su uso como biomarcador ictiotoxico. En comparación con los resultados obtenidos en la tesis de San Martín (2024) (**figura 14**), en el cual el modelo de estudio para estrés ictiotóxico fue la línea celular RTGill-W1, tuvo similitudes en la respuesta mediante el aumento en la expresión génica de los genes ECDH y casp3b, donde existe un aumento en la respuesta de ambos genes, esto se relaciona con la funcionalidad de dichos genes para mantener la estructura de la célula y eliminar a las células ya dañadas por el estrés ictiotóxico.

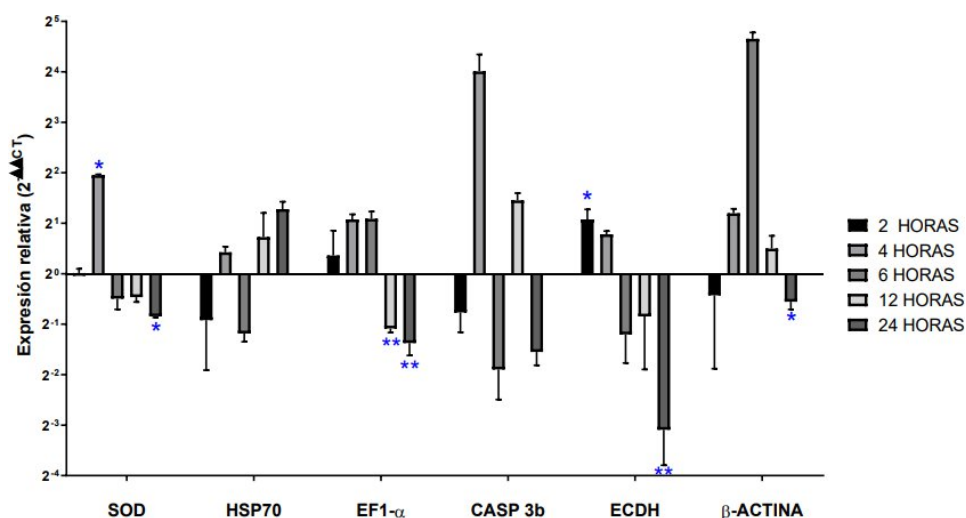


figura 14: Expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de genes seleccionados en RTgill-W1 (San Martín, 2024)

7. Conclusión

Inicialmente el enfoque del presente trabajo se enfocó en el uso del mucus branquial, sin embargo, la complejidad que abarcaba este tipo de muestra no permitió que se siguiera trabajando en ello, pero se espera que pueda haber este paso en el uso de metodologías de análisis de estrés ictiotóxico las cuales no sean invasivas. Relacionado al tejido branquial, se logró evidenciar la existencia diferencial significativa en dos biomarcadores moleculares asociados a ictiotóxicidad, donde a su vez, se pudo comparar y contrastar en dos la expresión génica diferencial significativa en dos concentraciones del dinoflagelado *Karenia selliformis*, específicamente $1.000 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$ y $10.000 \text{ cel} \cdot \text{L}^{-1}$, dándonos información importante del daño a nivel celular provocado por el estrés ictiotóxico, el cual en algunos casos pasa desapercibido o es detectado cuando ya hay presencia de mortalidad en peces. Además, se logró estandarizar un gen de interés, Nka (ATPasa Na^+/K^+), el cual, a pesar de no tener una expresión diferencial significativa, puede llegar a ser de interés la inclusión de dicho gen en futuros trabajos relacionado al estrés ictiotóxico. Finalmente se pudo contrastar la expresión diferencial del modelo *in vitro* e *in vivo*, dando similitudes en los resultados de la expresión del gen ECDH (e-cadherin) y Casp3b (caspasa 3b), los cuales podrán ser utilizados como claros indicativos de daño por estrés ictiotóxico, sin embargo, aún se requiere de más análisis y estudios para definir concretamente la especificidad de estos frente a estrés ictiotóxicos (*Karenia selliformis*). Por lo que en el presente estudio se confirma la existencia de un aumento en la expresión diferencial significativa biomarcadores moleculares asociados a ictiotóxicidad (E-cadherin y caspasa 3b) frente a la exposición de *Karenia selliformis* en muestras de tejido branquial.

8. Referencias

- Alfaro-Ahumada, V., Jara-Toro, S., Alves-de-Souza, C., Rivera-Latorre, A., Mardones, J. I., Gallardo-Rodriguez, J. J., C Astuya-Villalón, A. (2024). Allelopathic Effect of a Chilean Strain of *Karenia selliformis* (Gymnodiniales, Dinoflagellata) on Phytoplankton Species. *Microorganisms*, 12(9).
- Anderson, D. M., Cembella, A. D., C Hallegraeff, G. M. (2012). Progress in Understanding Harmful Algal Blooms: Paradigm Shifts and New Technologies for Research, Monitoring, and Management. In C. A. Carlson C S. J. Giovannoni (Eds.), *Annual Review of Marine Science*, Vol 4 (Vol. 4, pp. 143-176). <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081121>
- Astuya, A., Rivera, A., Vega-Drake, K., , A., C., Cruzat, F., Ulloa, V., Caprile, T., C , G.-R., J. J. (2018). Study of the ichthyotoxic microalga *Heterosigma akashiwo* by transcriptional activation of sublethal marker Hsp70b in Transwell co-culture assays. *Plos One*, 13(8). <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201438>
- Avendaño-Herrera, R. (2018). Proper antibiotics use in the Chilean salmon industry: Policy and technology bottlenecks. *Aquaculture*, 455, 803-805. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.072>
- Avendaño-Herrera, R., Mancilla, M., C Miranda, C. D. (2022). Use of antimicrobials in Chilean Salmon farming: Facts, myths and perspectives. *Reviews in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1111/raq.12702>
- Banco Nacional de ADN, u. d. s. (2024). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN
- Carlos III (Universidad de Salamanca).
- Barría, C., Vásquez-Calderón, P., Lizama, C., Herrera, P., Canto, A., Conejeros, P., Beltrami, O., Suárez-Isla, B. A., Carrasco, D., Rubilar, I., Guzmán, L., Durán, L. R., C Oliva, D. (2022). Spatial Temporal Expansion of Harmful Algal Blooms in Chile: A Review of 65 Years Records. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(12), Article 1868. <https://doi.org/10.3390/jmse10121868>
- Benli, A., Köksal, G., C Özkul, A. (2008). Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere*, 72(9), 1355-1358. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.037>
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., C Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22(1), 25-34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- Bols, N. C., Barlian, A., Chirinotrojo, M., Caldwell, S. J., Goegan, P., C Lee, L. E. J. (1994). DEVELOPMENT OF A CELL-LINE FROM PRIMARY CULTURES OF RAINBOW-TROUT, ONCORHYZCHUS MYKISS (WALBAUM), GILLS. *Journal of Fish Diseases*, 17(6), 601-611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00258.x>
- Carrasco-Bahamonde, D., C Casellas, A. (2024). Evolving blue development discourses and policies: Salmon farming industry and regional making in Chile. *Marine Policy*, 1c3, Article 106111. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2024.106111>
- Carvalho, T., do Nascimento, A. A., Gonçalves, C. F. D., dos Santos, M. A. J., C Sales, A. (2020). Assessing the histological changes in fish gills as environmental bioindicators in Paraty and Sepetiba bays in Rio de Janeiro, Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 48(4), 590-601. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue4-fulltext-2351>

- Chasiotis, H., C Kelly, S. P. (2011). Effect of cortisol on permeability and tight junction protein transcript abundance in primary cultured gill epithelia from stenohaline goldfish and euryhaline trout. *General and Comparative Endocrinology*, 172(3), 494-504. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.04.023>
- Clement, A., Seguel, M., Arzul, G., Guzman, L., C Alarcón, C. (2001). Widespread outbreak of a haemolytic, ichthyotoxic *Gymnodinium* sp. in Chile. *Harmful Algal Blooms 2000*, 66-69.
- Cunha, M. F., Coscueta, E. R., Brassesco, M. E., Almada, F., Gonçalves, D., C Pintado, M. (2023). Methods for the Collection of Fish Mucus: A Systematic Review. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. <https://doi.org/10.1080/23308249.2023.2289012>
- Dorantes-Aranda, J. J., Seger, A., Mardones, J. I., Nichols, P. D., C Hallegraef, G. M. (2015). Progress in Understanding Algal Bloom-Mediated Fish Kills: The Role of Superoxide Radicals, Phycotoxins and Fatty Acids. *Plos One*, 10(7), Article e0133549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133549>
- Dorantes-Aranda, J. J., Waite, T. D., Godrant, A., Rose, A. L., Tovar, C. D., Woods, G. M., C Hallegraef, G. M. (2011). Novel application of a fish gill cell line assay to assess ichthyotoxicity of harmful marine microalgae. *Harmful Algae*, 10(4), 366-373.
- Elleuch, J., Ben Amor, F., Barkallah, M., Salah, J. H., Smith, K. F., Aleya, L., Fendri, I., C Abdelkafi, S. (2021). q-PCR-based assay for the toxic dinoflagellate *Karenia selliformis* monitoring along the Tunisian coasts. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(41), 57486-57498. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14597-9>
- Ellis, T., Sanders, M. B., C Scott, A. P. (2013). Non-invasive monitoring of steroids in fishes. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 100(9-10), 255-269. <Go to ISI>://WOS:000324451500006
- Emam, M., Caballero-Solares, A., Xue, X., Umasuthan, N., Milligan, B., Taylor, R. G., Balder, R., C Rise, M. L. (2022). Gill and Liver Transcript Expression Changes Associated With Gill Damage in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Immunology*, 13, Article 806484. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.806484>
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., C Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, 85(1), 97-177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>
- FAO. (2024). *Fishery and Aquaculture Country Profiles. Chile, 2020. Country Profile Fact Sheets. In: Fisheries and Aquaculture*. <https://www.fao.org/fishery/en/facp/chl>
- Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ordóñez-Grande, B., Sánchez-Nuno, S., Viscor, G., Gisbert, E., Herrera, M., C Ibarz, A. (2018). Skin mucus metabolites in response to physiological challenges: A valuable non-invasive method to study teleost marine species. *Science of the Total Environment*, 644, 1323-1335. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.083>
- Figuerola, J., Cárcamo, J., Yañez, A., Olavarria, V., Ruiz, P., Manríquez, R., Muñoz, C., Romero, A., C Avendaño-Herrera, R. (2019). Addressing viral and bacterial threats to salmon farming in Chile: historical contexts and perspectives for management and control. *Reviews in Aquaculture*, 11(2), 299-324. <https://doi.org/10.1111/raq.12333>
- Fiordelmondo, E., Magi, G. E., Friedl, A., El-Matbouli, M., Roncarati, A., C Saleh, M. (2023). Effects of stress conditions on plasma parameters and gene expression in the skin mucus of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in Veterinary Science*, 10, Article 1183246. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1183246>

- Gallardo-Rodríguez, J. J., Astuya-Villalón, A., Llanos-Rivera, A., Avello-Fontalba, V., C Ulloa- Jofré, V. (2019). A critical review on control methods for harmful algal blooms. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 661-684. <https://doi.org/10.1111/raq.12251>
- Griffith, A. W., C Gobler, C. J. (2020). Harmful algal blooms: A climate change co-stressor in marine and freshwater ecosystems. *Harmful Algae*, 51, Article 101590. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.008>
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Arizcun, M., Meseguer, J., C Esteban, M. A. (2014). Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 3c(2), 545-551. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.01.001>
- Hallegraeff, G. M. (2010). OCEAN CLIMATE CHANGE, PHYTOPLANKTON COMMUNITY RESPONSES, AND HARMFUL ALGAL BLOOMS: A FORMIDABLE PREDICTIVE CHALLENGE. *Journal of Phycology*, 4c(2), 220-235. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00815.x>
- IFOP. (2024). Floraciones de algas nocivas (FAN) o marea roja. <https://www.ifop.cl/floraciones-de-algas-nocivas-fan-o-marea-roja/>
- Jiang, W. D., Tang, R. J., Liu, Y., Wu, P., Kuang, S. Y., Jiang, J., Tang, L., Tang, W. N., Zhang, Y. A., Zhou, X. Q., C Feng, L. (2017). Impairment of gill structural integrity by manganese deficiency or excess related to induction of oxidative damage, apoptosis and dysfunction of the physical barrier as regulated by NF-κB, caspase and Nrf2 signaling in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 70, 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.022>
- Klemas, V. (2012). Remote Sensing of Algal Blooms: An Overview with Case Studies. *Journal of Coastal Research*, 28(1A), 34-43. <https://doi.org/10.2112/jcoastres-d-11-00051.1>
- LABTOX. (2024). Floraciones Algas Nocivas (FAN), un Fenómeno Natural Presente en Nuestras Costas. <https://labtox.cl/?p=984>
- Lazado, C. C., Voldvik, V., Breiland, M. W., Osório, J., Hansen, M. H. S., C Krasnov, A. (2020). Oxidative Chemical Stressors Alter the Physiological State of the Nasal Olfactory Mucosa of Atlantic Salmon. *Antioxidants*, 5(11), Article 1144. <https://doi.org/10.3390/antiox9111144>
- Lee, L. E. J., Dayeh, V. R., Schirmer, K., C Bols, N. C. (2009). Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Animal*, 45(3-4), 127-134. <https://doi.org/10.1007/s11626-008-9173-2>
- León-Muñoz, J., Urbina, M. A., Garreaud, R., C Iriarte, J. L. (2018). Hydroclimatic conditions trigger record harmful algal bloom in western Patagonia (summer 2016). *Scientific Reports*, 8, Article 1330. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19461-4>
- Mahmood, K., Jadoon, S., Mahmood, Q., Irshad, M., C Hussain, J. (2014). Synergistic Effects of Toxic Elements on Heat Shock Proteins. *Biomed Research International*, 2014, Article 564136. <https://doi.org/10.1155/2014/564136>
- Mardones, J., Clement, A., C Rojas, X. (2012). Monitoring potentially ichthyotoxic phytolagellates in southern fjords of Chile [Article]. *Harmful Algae News*, 45, 6-7. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84969965674CpartnerID=40Cmd5=c75947a5622edf0a036a9070ba158bbb>
- Mardones, J., C Hallegraeff, G. (2016). Avances en el estudio de ictiotoxinas asociadas con floraciones algales nocivas (FANs). *Salmonexpert*, c, 38-44.
- Mardones, J. I., Dorantes-Aranda, J. J., Nichols, P. D., C Hallegraeff, G. M. (2015). Fish gill damage by the dinoflagellate *Alexandrium catenella* from Chilean fjords:

- Synergistic action of ROS and PUFA. *Harmful Algae*, 45, 40-49.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.001>
- Mardones, J. I., Norambuena, L., Paredes, J., Fuenzalida, G., Dorantes-Aranda, J. J., Chang, K. J. L., Guzmán, L., Krock, B., C Hallegraeff, G. (2020). Unraveling the *Karenia selliformis* complex with the description of a non-gymnodimine producing Patagonian phylotype. *Harmful Algae*, 58, Article 101892.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101892>
- Mardones, J. I., Paredes, J., Godoy, M., Suarez, R., Norambuena, L., Vargas, V., Fuenzalida, G., Pinilla, E., Artal, O., Rojas, X., Dorantes-Aranda, J. J., Chang, K. J. L., Anderson, D. M., C Hallegraeff, G. M. (2021). Disentangling the environmental processes responsible for the world's largest farmed fish-killing harmful algal bloom: Chile, 2016. *Science of the Total Environment*, 7cc, Article 144383.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144383>
- Mardones, J. I., Shabala, L., Shabala, S., Dorantes-Aranda, J. J., Seger, A., C Hallegraeff, G. M. (2018). Fish gill damage by harmful microalgae newly explored by microelectrode ion flux estimation techniques. *Harmful Algae*, 80, 55-63.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.09.004>
- Molgó, J., Girard, E., C Benoit, E. (2007). Cyclic Imines: An Insight into this Emerging Group of Bioactive Marine Toxins. In *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry* (pp. 319-335).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470277874.ch18>
- Montes, R. M., Rojas, X., Artacho, P., Tello, A., C Quiñones, R. A. (2018). Quantifying harmful algal bloom thresholds for farmed salmon in southern Chile. *Harmful Algae*, 77, 55-65.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.05.004>
- Mountfort, D., Beuzenberg, V., MacKenzie, L., C Rhodes, L. (2006). Enhancement of growth and gymnodimine production by the marine dinoflagellate, *Karenia selliformis*. *Harmful Algae*, 5(6), 658-664. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.02.001>
- Muñoz, R. (2014). Bienestar animal: un reto en la producción pecuaria. *Spei Domus*, 10(20), 31-40. <https://doi.org/10.16925/sp.v10i20.884>
- NIH. (2024). <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/biomarcador>
- Oh, J. W., Pushparaj, S. S. C., Muthu, M., C Gopal, J. (2023). Review of Harmful Algal Blooms (HABs) Causing Marine Fish Kills: Toxicity and Mitigation. *Plants-Basel*, 12(23), Article 3936.
<https://doi.org/10.3390/plants12233936>
- Pantoja, S., Iriarte, J. L., C Daneri, G. (2011). Oceanography of the Chilean Patagonia. *Continental Shelf Research*, 31(3-4), 149-153.
<https://doi.org/10.1016/j.csr.2010.10.013>
- Parida, S., Mohapatra, A., Kar, B., Mohanty, J., C Sahoo, P. K. (2018). Transcriptional analysis of immune-relevant genes in the mucus of *Labeo rohita*, experimentally infected with *Argulus siamensis*. *Acta Parasitologica*, c3(1), 125-133.
<https://doi.org/10.1515/ap-2018-0014>
- Poblete-Naredo, I., C Albores, A. (2016). Molecular biomarkers to assess health risks due to environmental contaminants exposure. *Biomedica*, 3c(2), 309-335.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2998>
- Proietti, S., Cucina, A., Pensotti, A., Biava, P. M., Minini, M., Monti, N., Catizone, A., Ricci, G., Leonetti, E., Harrath, A. H., Alwasel, S. H., C Bizzarri, M. (2019). Active Fraction from Embryo Fish Extracts Induces Reversion of the Malignant Invasive Phenotype in Breast Cancer through Down-Regulation of TCTP and Modulation of E-cadherin/β-catenin

- Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), Article 2151. <https://doi.org/10.3390/ijms20092151>
- Quiñones, R. A., Fuentes, M., Montes, R. M., Soto, D., C León-Muñoz, J. (2019). Environmental issues in Chilean salmon farming: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(2), 375-402. <https://doi.org/10.1111/raq.12337>
- Rault, J. L., Bateson, M., Boissy, A., Forkman, B., Grinde, B., Gygax, L., Harfeld, J. L., Hintze, S., Keeling, L. J., Kostal, L., Lawrence, A. B., Mendl, M. T., Miele, M., Newberry, R. C., Sandoe, P., Spinka, M., Taylor, A. H., Webb, L. E., Whalin, L., C Jensen, M. B. (2025). A consensus on the definition of positive animal welfare. *Biology Letters*, 21(1), Article 20240382. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2024.0382>
- Ren, Y. C., Zhao, H. G., Su, B. F., Peatman, E., C Li, C. (2015). Expression profiling analysis of immune-related genes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin mucus following *Flavobacterium columnare* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 4c(2), 537-542. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.021>
- Rodríguez-Benito, C. V., Navarro, G., C Caballero, I. (2020). Using Copernicus Sentinel-2 and Sentinel-3 data to monitor harmful algal blooms in Southern Chile during the COVID-19 lockdown. *Marine Pollution Bulletin*, 1c1, Article 111722. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111722>
- Roselli, L., Vadrucci, M. R., Belmonte, M., Ciciriello, P., Rubino, F., Ungaro, N., C Caroppo, C. (2020). Two - stages bloom of *Margalefidinium* cf. *polykrikoides* in a Mediterranean shallow bay (Ionian Sea, Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 151, Article 110825. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110825>
- San Martín, A. (2024). EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS AL ESTRÉS PROVOCADO POR CONCENTRACIONES SUBLETALES DE COMPUESTOS TÓXICOS LIBERADOS POR *KARENIA SELLIFORMIS* Universidad de Concepción].
- Sandoval, M., Parada, C., C Torres, R. (2018). Proposal of an integrated system for forecasting Harmful Algal Blooms (HAB) in Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 4c(2), 424-451. <https://doi.org/10.3856/vol46-issue2-fulltext-18>
- Scott, J., Belden, J. B., C Minghetti, M. (2021). Applications of the RTgill-W1 Cell Line for Acute Whole-Effluent Toxicity Testing: In Vitro-In Vivo Correlation and Optimization of Exposure Conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(4), 1050-1061. <https://doi.org/10.1002/etc.4947>
- Scott, J., C Minghetti, M. (2023). Characterization of RTgill-W1 cells epithelial development on transwell inserts: Evaluation of osmotic and toxic challenges. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 270, Article 109638. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109638>
- Sierra, E. M., Espinosa de los Monteros, A., , R. V., F., Herráez Thomas, P., Castro, P., C C Fernández Rodríguez, A. J. (2003). Histología y patología de los peces. *Revista canaria de las ciencias veterinarias*.
- Tang, J. Y. M., Wong, C. K. C., C Au, D. W. T. (2007). The ichthyotoxic alga *Chattonella marina* induces Na⁺, K⁺-ATPase, and CFTR proteins expression in fish gill chloride cells *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(1), 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.126>

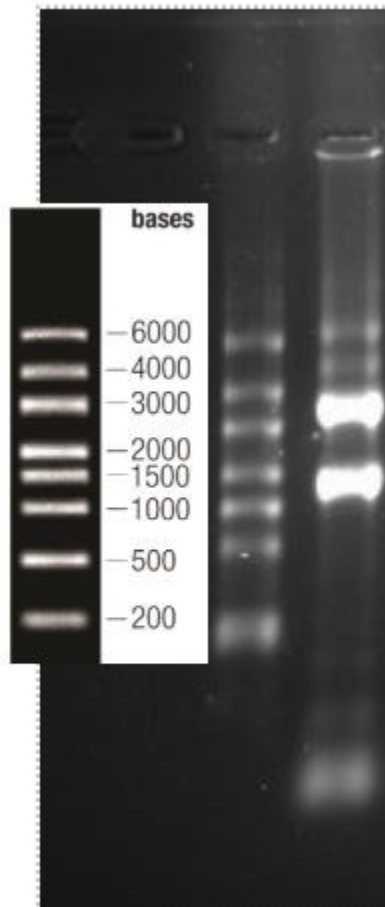
- Zhang, Y., Chen, C. S., Xue, P. F., Beardsley, R. C., C Franks, P. J. S. (2020). A view of physical mechanisms for transporting harmful algal blooms to Massachusetts Bay. *Marine Pollution Bulletin*, 154, Article 111048. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111048>
- Zheng, T., Song, Z., Tao, Y. F., Qiang, J., Ma, J. L., Lu, S. Q., C Xu, P. (2022). Transport stress induces innate immunity responses through TLR and NLR signaling pathways and increases mucus cell number in gills of hybrid yellow catfish (<i>Tachysurus fulvidraco</i> ♀ x <i>Pseudobagrus vachellu</i> ♂). *Fish & Shellfish Immunology*, 127, 166-175. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.06.015>

Anexos

1) Preparación de Muestra positiva para productos de PCR tiempo final.

Nombre muestra	ng/ul	260/230	260/280
CHSE p. Chatt	656	1.729	1.620

Luego de la cuantificación, se realizó el gel de electroforesis. Para el gel se realizó al 1.2% de agarosa-formaldehido con buffer MOPS 1x, además, se corrió por 1 hora a 70 V. Para la carga del gel se utilizó el marcador de peso molecular riboruler HR Themom y 2x RNA LD (loading Dye), la proporción de estos fue de 1:1 (volumen), es decir, se agregaron 2 ul de cada uno, obteniendo un volumen total de 4ul. Para las muestras se utilizó 2ul de muestra y 2ul de 2x RNA LD (loading Dye).



- I. Para el tratamiento con DNasa, se tomó la muestra se buscó obtener la cantidad de 3000ng de ARN, para ello se realizó el siguiente calculo:

3000ng/656 ng/ul: 4.57ul (para obtener 3000ng necesitamos 4.57ul de nuestra muestra de arn).

- 1 ul de buffer DNasa
- 3 ul de DNasa I
- 4.57ul de Muestra
- 1.43ul de agua
- Volumen total: 10ul

Tratamiento post DNasa			
Nombre muestra	ng/ul	260/230	260/280
CHSE p. Chatt	391	2.151	2.174

II. Síntesis ADNc

- 3ug de ARN a (7.67ul)
- 1ul de oligo primer
- 3.33 ul de agua DEPC
- Volumen total: 12ul
- Centrifugación breve (spin) e incubación a 65°C por 5 min.
- Luego se agregó a cada una de las muestras:
- 4ul de 5x buffer reaction
- 1ul de ribolock
- 2ul de dntps 10mM
- 1ul enzima de reverse H minus
- Volumen total: 20ul

-Se llevo a incubar a 25°C por 5 minutos, luego 1 hora a 42°C y finalmente 70°C por 5 min.