



**Servicio Nacional de Pesca  
y Acuicultura**

**Proyecto “Diagnostico y propuesta de evaluación de factores epidemiológicos y resistencia farmacológica en *Caligus rogercresseyi*”**

**Diciembre 2015**

## **ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**

Dentro de la economía chilena, la acuicultura se alza como uno de los sectores con mayor crecimiento, el año 2014 la acuicultura representó el 77% de las exportaciones del sector pesquero chileno, situándose como la principal industria a nivel nacional, después de la minería. La salmonicultura en nuestro país, tiene una gran importancia económica y social al generar numerosos empleos directos e indirectos.

Sin embargo, al ser esta una actividad de producción intensiva inserta en el medio marino que actúa como vehículo diseminador de patógenos, no está exenta de enfermedades. La estrategia de nuestro país ha sido mantener la sustentabilidad de la industria y mejorar su competitividad. Para mejorar la gestión pública en la prevención y control de enfermedades es necesario generar investigación estratégica que permita mejorar la gestión sanitaria y a sí mejorar la competitividad de la acuicultura chilena.

SERNAPESCA se adjudicó el proyecto FIE V014, denominado "Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura" materializado en un centro de enfermedades en la acuicultura que busca impulsar y mejorar la investigación, innovación y desarrollo de conocimientos estratégicos a través de un enfoque multidisciplinario. Sus objetivos son identificar y caracterizar las brechas de investigación estratégica, diseñar un modelo de gestión para ejecutar las diferentes necesidades de investigación propuestas, ejecutar las líneas de investigación priorizadas con énfasis en el control de calidad científica y enfoque multisistémico y crear capital humano especializado en Chile para dichos propósitos. Lo anterior permitirá obtener información para la toma de decisiones, lo que a su vez permitirá mejorar la gestión sanitaria pública y privada en la acuicultura.

Conforme las disposiciones del D.S. N° 319 de 2001, del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, mediante la resolución N° 10.728 de 2015, el Servicio designó entre otros, a la Universidad de Concepción, Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola (LBGA) como laboratorio de referencia nacional para el diagnóstico de enfermedades de especies hidrobiológicas. Entre las funciones que debe

llevar a cabo esta entidad se encuentran desarrollar, optimizar y validar métodos diagnósticos que serán utilizados por los laboratorios autorizados por el Servicio, en la vigilancia y monitoreo de enfermedades de alto riesgo, realizar caracterización de agentes patógenos, mantener colección de cepas de estos agentes, así como asesorar el Servicio en aspectos técnicos en el ámbito de su especialidad.

El LBGA forma parte del Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR), el cual es un centro de excelencia en áreas prioritarias financiado por FONDAP-CONICYT. Dentro de los principales objetivos del INCAR esta el estudio de los principales mecanismos que inciden en la propagación e prevalencia de *Caligus rogercresseyi*. De esta forma, se ha desarrollado un enfoque interdisciplinario de alto nivel, integrando el estudio y evaluación de los principales factores epidemiológicos/oceanográficos, genómicos y económicos que impactan en el control de la caligidosis en Chile. Uno de los hitos más relevantes del LBGA-INCAR es el proyecto de secuenciación transcriptómica de todos los estados de desarrollo de *C. rogercresseyi*. La información genómica generada es clave para la comprensión de los principales procesos biológicos involucrados en el crecimiento, reproducción, respuesta inmune, entre otros en esta especie de copépodo ectoparásito. Adicionalmente, el LBGA-INCAR ha generado bases de datos genómicas desde *Caligus* expuestos a los antiparasitarios de tipo organofosforados, piretroides y peróxido de hidrogeno. De esta forma, el laboratorio cuenta con herramientas de última generación para la evaluación de sensibilidad a fármacos antiparasitarios a nivel molecular.

***El presente informe presenta los siguientes resultados esperados:***

1. Estado del arte y propuesta de factores de riesgo o de protección
2. Propuesta de diseño experimental y protocolo de evaluación de respuesta a fármacos antiparasitarios basado en biomarcadores moleculares.
3. Propuesta de conformación de cepario y banco genético de caligidos con prevalencia en Chile.

# 1. Estado del arte y propuesta de factores de riesgo o de protección: Epidemiología de Caligus

## Equipo de trabajo:

- Dr. Rodrigo Montes (UDEEC)
- Dr. Renato Quiñones (UDEEC)
- Dr. Jorge Dresdner (UDEEC)
- Dr. Fernando Mardones (UNAB)

**Actividad 1. Realizar una revisión crítica de literatura nacional e internacional sobre los principales factores (epidemiológicos, oceanográficos, productivos, sanitarios u otros) capaces de influenciar la abundancia, prevalencia, dinámica temporal, tasa de infestación, a diversas escalas espaciales, de *C. rogercresseyi* y de otras especies de piojos de mar a nivel mundial.**

## *Resultados esperados*

La revisión crítica de la literatura científica permitirá identificar variables, procesos y nodos críticos capaces de influenciar la dinámica epidemiológica de *C. rogercresseyi*, incluyendo los procesos de dispersión/transmisión entre centros y otras unidades espaciales de administración. Además, esta revisión en profundidad permitirá un ejercicio por parte del equipo de trabajo para priorizar las hipótesis a contrastar en los modelos y en los análisis matemático/estadísticos que se desarrollaran en los actividades 2 y 3, así como seleccionar variables claves a incluir en la base de datos del actividades 4.

Una vez concluida la revisión se realizarán gestiones para tener acceso a la información epidemiológica y oceanográfica relevante recolectada bajo el marco del Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Caligidosis de SERNAPESCA y de proyectos FONDECYT, FIP, INNOVA, FIC y de otros realizados en la zona sur-austral (ej. INCAR, COPAS Sur-Austral, CIEP, etc.).

En relación al objetivo 1, se ha ya revisado la siguiente literatura científica, la cual incluye además de aquellas referidas a piojos de mar y aproximaciones metodológicas utilizadas en el combate de enfermedades transmitidas y/o generadas por otros taxa.

### **Resultados: búsqueda bibliográfica**

- Aaen, S.M., Helgesen, K.O., Bakke, M.J., Kaur, K. & T.E. Horsberg. 2015. Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends in Parasitology* 31: 72-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>.
- Alvial, A., Kibenge, F., Forster, J., Burgos, J.M., Ibarra, R. & S. St-Hilaire. 2012. The recovery of the Chilean salmon industry. The ISA crisis and its consequences and lessons. Global Aquaculture Alliance ISA Report, 83 pp. [http://www.gaalliance.org/cmsAdmin/uploads/GAA\\_ISA-Report.pdf](http://www.gaalliance.org/cmsAdmin/uploads/GAA_ISA-Report.pdf) (Published on February 23, 2012).
- Bauch, Ch. T. 2008. The role of mathematical models in explaining recurrent outbreaks of infectious childhood diseases. En Brauer, F., van den Driessche, P & J. Wu (eds.) *Mathematical Epidemiology, Mathematical Biosciences Subseries*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 297-319.
- Bravo, S., Nuñez, M. & M.T. Silva. 2013. Efficacy of the treatments used for the control of *Caligus rogercresseyi* infecting Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in a new fish-farming location in Region XI, Chile. *Journal of Fish Diseases* 36: 221-228. doi:10.1111/jfd.12023.
- Bravo, S., Silva, M.T. & J. Treasurer. 2014. Factors affecting the abundance of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo) on farmed salmonids in Chile in the period 2006-2007. *Aquaculture* 434: 456-461.
- Boxshall, G.A. & S. Bravo. 2000. On the identity of the common *Caligus* (Copepoda: Siphonostomatoidea: Caligidae) from salmonid netpen system in southern Chile. *Contributions to Zoology* 69: 137-146.
- Cazelles, B., Chavez, M., de Magny, G.C., Guégan, J.-F., & S. Hales. 2007. Time-dependent spectral analysis of epidemiological time-series with wavelets. *Journal of the Royal Society Interface* 4: 625-636.
- Cazelles, B., Chavez, M., Berteaux, D., Menard, F., Vik, J.O., Jenouvrier, S & N.C. Stenseth. 2008. Wavelet analysis of ecological time series. *Oecologia* 156: 287-304.
- Cazelles, B., Cazelles, K. & M. Chavez. 2014. Wavelet analysis in ecology and epidemiology: Impact of statistical tests. *Journal of the Royal Society Interface* 11: 20130585.
- Costello, M.J. 2009. The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of Fish Diseases* 32: 115-118. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.01011.x.
- Chowell, G., Cazelles, B., Broutin, H. & C.V. Munayco. 2011. The influence of geographic and climate factors on the timing of dengue epidemics in Perú, 1994-2008. *BMC Infectious Diseases* 11: 164.
- Hamilton-West, Ch., Arriagada, G., Yatabe, T., Valdés, P., Hervé-Claude, L.P. & S. Urcelay. 2012. Epidemiological description of the sea lice (*Caligus rogercresseyi*) situation in southern Chile in August 2007. *Preventive Veterinary Medicine* 104: 341-345. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.12.002.
- Heuch, P.A., Olsen, R.S., Malkenes, R., Revie, C.W., Gettinby, G., Baillie, M., Lees, F. & B. Finstad. 2009. Temporal and spatial variation in lice numbers on salmon farms in the Hardanger fjord 2004-06. *Journal of Fish Diseases* 32: 89-100. doi 10.1111/j.1365-2761.2008.01002.x.
- Jansen, P.A., Kristoffersen, A.B., Viljugrein, H., Jimenez, D., Aldrin, M. & A. Stien. 2012. Sea lice as a density-dependent constraint to salmonid farming. *Proceedings of the Royal Society B*. doi: 10.1098/rspb.2012.0084.
- Johansson, M.A., Cummings, D.A.T. & G.E. Glass. 2009. Multiyear Climate Variability and Dengue-El Niño Southern Oscillation, Weather, and Dengue Incidence in Puerto Rico, Mexico, and Thailand: A Longitudinal Data Analysis. *PLOS Medicine* 6(11): e1000168. doi:10.1371/journal.pmed.1000168
- Johnson, S.C., Treasurer, J.W., Bravo, S., Nagasawa, K. & Z. Kabata. 2004. A review of the impacts of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zoological Studies* 43: 8-19.
- Kristoffersen, A.B., Jimenez, D., Viljugrein, H., Grøntvedt, R.N., Stien, A. & P.A. Jansen. 2014. Large scale modeling of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infection pressure based on lice monitoring data from Norwegian salmonid farms. *Epidemics* 9: 31-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.epidem.2014.09.007>.

- Kristoffersen, A.B., Rees, E.E., Stryhn, H., Ibarra, R., Campisto, J.-L., Revie, C.W. & S. St.-Hilaire. 2013. Understanding sources of sea lice for salmon farms in Chile. *Preventive Veterinary Medicine* 111: 165-175.
- Llorente, J.P., Gallardo, J.A., Villanueva, B., Carabaño, M.J. & R. Neira. 2014. Disease resistance in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): coinfection of the intracellular bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis* and the sea louse *Caligus rogercresseyi*. *PLoS ONE* 9 e95397. doi: 10.1371/journal.pone.0095397.
- McKenzie, E., Gettinby, G., McCart, K. & C.W. Revie. 2004. Time-series models of sea lice *Caligus elongatus* (Nordmann) abundance on Atlantic salmon *Salmo salar* L. in Loch Sunart, Scotland. *Aquaculture Research* 35: 764-772. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01099.x.
- Molinet, C., Cáceres, M., Gonzalez, M.T., Carvajal, J., Asencio, G., Díaz, M., Díaz, P., Castro, M.T. & J. Codjambassis. 2011. Population dynamic of early stages of *Caligus rogercresseyi* in an embayment used for intensive salmon farms in Chilean inland seas. *Aquaculture* 312: 62-71. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.12.010.
- Oelckers, K., Vike, S., Duesund, H., Gonzalez, J., Wadsworth, S. & A. Nylund. 2014. *Caligus rogercresseyi* as a potential vector for transmission of Infectious Salmon Anemia (ISA) virus in Chile. *Aquaculture* 420-421: 126-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.016>.
- Percival, D.B & D. Mondal. 2012. A Wavelet Variance Primer. In: *Handbook of Statistics, Vol. 30. Time Series Analysis: Methods and Applications*, Elsevier, pp. 623-657.
- Percival, D. & A.T. Walden. 2000. *Wavelet Methods for Time Series Analysis*. Cambridge Series in Statistical and Probabilistic Mathematics, Cambridge University Press, 594 pp.
- Pino-Marambio, J., Mordue, A.J., Birkett, M., Carvajal, J., Asencio, G., Mellado, A. & A. Quiroz. 2007. Behavioural studies of host, non-host, and mate location by the Sea Louse, *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda Caligidae). *Aquaculture* 271: 70-76. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.05.025.
- Revie, C.W., Gettinby, G., Treasurer, J.W., Rae, G.H. & N. Clark. 2002. Temporal, environmental and management factors influencing the epidemiological patterns of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestations on farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Scotland. *Pest Management Science* 58: 576-584. doi:10.1002/ps.476.
- Revie, C.W., Gettinby, G., Treasurer, J.W. & C. Wallace. 2003. Identifying epidemiological factors affecting sea lice *Lepeophtheirus salmonis* abundance on Scottish salmon farms using general linear models. *Diseases of Aquatic Organisms* 57: 85-95.
- Rozas M. & G. Ascencio. 2007. Evaluación de la situación epidemiológica de Caligiasis en Chile: hacia una estrategia de control efectiva. *Salmociencia* 2: 43-59.
- SERNAPESCA, 2007. Resolución N° 1789. Establece Programa Sanitario Específico de Vigilancia de Caligidosis. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Servicio Nacional de Pesca (Publicado el 26 de Octubre del 2007).
- SUBPESCA, 2012. R.EX. N° 1548. Establece Macro-Zonas Región de Los Lagos. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, Subsecretaría de Pesca, 04 pp. (Publicado el 7 de Junio del 2012; Disponible en <http://www.subpesca.cl>).
- Shinn, A.P., Pratoomyot, J., Bron, J.E., Paladini, G., Brooker, E.E. & A.J. Brooker. 2014. Economic cost of protistan and metazoan parasites to global mariculture. *Parasitology* 1-75. doi: 10.1017/S0031182014001437.
- Soniat, T.M., Hofman, E.E., Klinck, J.M. & E.N. Powell. 2008. Differential modulation of Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) disease parasites by the El-Niño-Southern Oscillation and the North Atlantic Oscillation. *International Journal of Earth Sciences (Geologische Rundschau)*. DOI 10.1007/s00531-008-0364-6.
- Torrissen, O., Jones, S., Asche, F., Guttormsen, A., Skilbrei, O.T., Nilsen, F., Horsberg, T.E. & D. Jackson. 2013. Salmon lice - impact on wild salmonids and salmon aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 36: 171-194. doi:10.1111/jfd.12061.
- Yatabe, T., Arriagada, G., Hamilton-West, C. & S. Urcelay. 2011. Risk factor analysis for sea lice, *Caligus rogercresseyi*, levels in farmed salmonids in southern Chile. *Journal of Fish Diseases* 34: 345-354.

**Actividad 2. Desarrollar modelos que identifiquen y cuantifiquen los principales factores de riesgo asociados a la carga parasitaria de *Caligus rogercresseyi* a escalas de barrio y macrozona, basados en modelos lineales generalizados (MLG) y mixtos (MLGM)**

***Resultados esperados***

Los principales factores de riesgo asociados a la carga parasitaria de *Caligus rogercresseyi* se identificarán con modelos lineales generalizados y mixtos, y con aquellos modelos especialmente diseñados para observaciones que provienen del conteo de datos (*Count Data*, ej. Hilbe, 2014). Con la aplicación de estos modelos se pretende obtener una jerarquización del riesgo a escala espacial de diversos barrios y macrozonas (mapa de riesgo) de acuerdo a la magnitud de los factores de riesgo estimados para cada uno de ellos. Estos resultados son de especial relevancia para la generación de políticas públicas y para la coordinación de medidas de manejo (aplicación de baños antiparasitarios, diseño de periodos de descanso de barrios) que contribuyan al mejoramiento del modelo productivo de la industria. La determinación de factores de riesgo relacionados a la Caligidosis en Chile comenzó el año 2011 con el trabajo de Yatabe et al. (2011), pero se requiere profundizar en este tipo de estudios.

**Actividad 3. Utilizar herramientas matemáticas/estadísticas capaces de capturar la dinámica temporal de diferentes estadios de desarrollo (ej. juveniles, hembras ovígeras) de *C. rogercresseyi* basadas en el análisis de series de tiempo para la detección temprana de aumentos en la carga parasitaria a escala de barrios y macrozonas.**

***Resultados esperados***

Se aplicaran herramientas matemáticas y estadísticas utilizadas en la modelación de diversas patologías causadas por insectos y parásitos a nivel mundial. En este contexto, adquieren especial relevancia los análisis de ondículas (*waveletes*, Daubechies 1992, Lau & Weng 1995, Torrence and Compo 1998, Percival & Mondal 2012) que han demostrado su gran utilidad en la modelación epidemiológica de diversas patologías (ej. Cazelles et al.,

2007; Chowell et al., 2011, Johansson et al., 2009, Cazelles et al., 2014), incluyendo enfermedades de origen parasitario que afectan recursos marinos de importancia comercial (Soniati et al., 2008). Dentro de este objetivo, se dará especial énfasis a la detección temprana de aumentos en la carga parasitaria a escala de barrios y macrozonas con el fin de contribuir a mejorar el manejo sanitario y la adopción oportuna de medidas de prevención en la industria del salmón. La meta final de este objetivo es generar un indicador de detección temprana de cambio en la dinámica temporal de la abundancia/prevalencia de *Caligus*, que sea una herramienta para optimizar la coordinación en la aplicación de tratamientos antiparasitarios, y que contribuya a la elaboración de un modelo de vigilancia epidemiológica de acuerdo a los patrones que emerjan de los análisis realizados en los diferentes barrios y macrozonas.

### Resultados

En el texto cuando se plantea que "Se ha avanzado en la aplicación de análisis de ondículas en la serie de tiempo de carga parasitaria de *Caligus* en Macrozona. La Figura 1 muestra cambios en la dinámica temporal de estadios juveniles de caligus durante el periodo de estudio.

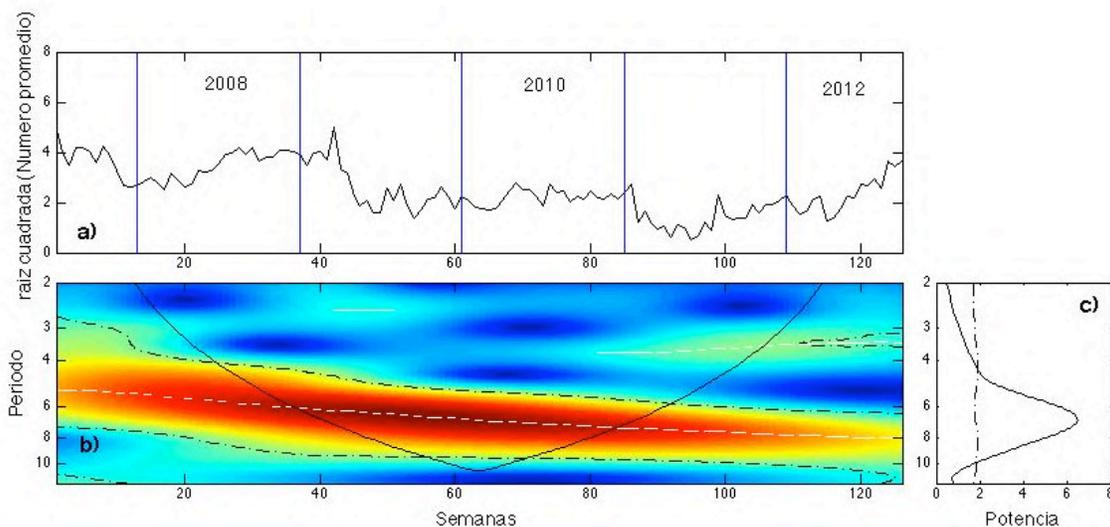


Figura 1. a) Serie de tiempo del número de estadios juveniles de *Caligus rogercresseyi* para la Macrozona 1 (excluyendo la división 4) entre el 15 de Julio del 2007 y el 30 de Septiembre del 2012. b) Espectro potencia local y c) espectro potencia global de la serie de tiempo observada en a), obtenidos mediante la transformada continua de ondículas.

## Cronograma de trabajo

	MES					
	1	2	3	4	5	6
Objetivo 1						
Objetivo 2						
Objetivo 3						
Escritura de Manuscrito 1						
Envío de Manuscrito a revista ISI internacional *						

\* Manuscrito sobre patrones emergentes obtenidos al analizar la carga parasitaria de *C. rogercresseyi* mediante modelos de series de tiempo.

## Referencias

- Cazelles, B., Chavez, M., de Magny, G.C., Guégan, J.-F., & S. Hales. 2007. Time-dependent spectral analysis of epidemiological time-series with wavelets. *Journal of the Royal Society Interface* 4: 625-636.
- Cazelles, B., Cazelles, K. & M. Chavez. 2014. Wavelet analysis in ecology and epidemiology: Impact of statistical tests. *Journal of the Royal Society Interface* 11: 20130585.
- Chowell, G., Cazelles, B., Broutin, H. & C.V. Munayco. 2011. The influence of geographic and climate factors on the timing of dengue epidemics in Perú, 1994-2008. *BMC Infectious Diseases* 11: 164.
- Daubechies, I. 1992. Ten Lectures on Wavelets. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics. CBMS-NSF Lecture Notes N° 61: 350 pp.
- Hilbe, J.M. 2014. Modeling count data. Cambridge University Press, New York, 283 pp.
- Johansson, M.A., Cummings, D.A.T. & G.E. Glass. 2009. Multiyear Climate Variability and Dengue-El Niño Southern Oscillation, Weather, and Dengue Incidence in Puerto Rico, Mexico, and Thailand: A Longitudinal Data Analysis. *PLOS Medicine* 6(11): e1000168. doi:10.1371/journal.pmed.1000168
- Lau, K-M & Weng, H. 1995. Climate signal detection using wavelet transform: How to make a time series sing. *Bull. Amer. Meteorol. Soc.*, 12: 2391-2402.
- Percival, D.B & D. Mondal. 2012. A Wavelet Variance Primer. In: *Handbook of Statistics, Vol. 30. Time Series Analysis: Methods and Applications*, Elsevier, pp. 623-657.
- Soniat, T.M., Hofman, E.E., Klinck, J.M. & E.N. Powell. 2008. Differential modulation of Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) disease parasites by the El-Niño-Southern Oscillation and the North Atlantic Oscillation. *International Journal of Earth Sciences (Geologische Rundschau)*. DOI 10.1007/s00531-008-0364-6.
- Torrence, C., Compo, G.P. 1998. A Practical Guide to Wavelet Analysis. *Bull. Amer. Meteor. Soc.*, 79: 61-78.
- Yatabe, T., Arriagada, G., Hamilton-West, C. & S. Urcelay. 2011. Risk factor analysis for sea lice, *Caligus rogercresseyi*, levels in farmed salmonids in southern Chile. *Journal of Fish Diseases* 34: 345-354.

## **2. Propuesta de diseño experimental y protocolo de evaluación de respuesta a fármacos antiparasitarios basado en biomarcadores moleculares: Monitoreo de la Resistencia de Caligus**

### **Equipo de trabajo:**

- Dr. Cristian Gallardo (UDEEC)
- Dr. Sebastián Boltaña (UDEEC)
- Dr. Jorge Dresdner (UDEEC)

### **Actividad 4. Biomarcadores moleculares de respuesta farmacológica en *C. rogercresseyi***

Los piojos de mar (Copepoda, Caligidae) representan actualmente uno de los mayores problemas a nivel mundial en la producción de salmones. En Chile, *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo 2000) genera importantes pérdidas económicas, así como *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer), en los centros de cultivo en el Hemisferio Norte (Johnson et al., 2004b). *C. rogercresseyi* es un ectoparásito endémico de diversas especies nativas de Chile como: el róbalo (*Eleginops maclovinus*) y pejerrey (*Odonthestes regia*), desde las cuales se adaptó progresivamente infestando los centro de cultivos de salmónidos en el sur de Chile, principalmente salmón Atlántico y trucha arcoíris (Costello, 2006, Bravo, 2003).

La infestación por caligus se manifiesta en los peces a través de lesiones en la piel, esto se debe a que el parásito se alimenta fundamentalmente de mucus, células epiteliales y sangre del hospedero (Fast, 2014). De esta forma, el ectoparásito genera cambios en la composición del mucus y piel del huésped, lo cual se traduce en la pérdida de su función protectora y antimicrobiana, así como de alteraciones osmorreguladoras e infecciones secundarias (Johnson et al., 2004a). Adicionalmente, la generación de estrés, pérdida de condición corporal, alteraciones fisiológicas y debilitamiento, generan una inmunosupresión y aumento de mortalidad (Wagner et al., 2008, Costello, 2006). Ligado a

esta inmunosupresión, se ha sugerido que *C. rogercresseyi* podría participar en la diseminación del virus de la anemia infecciosa de salmónes (ISAV) (Oelckers et al., 2014), así como reducir significativamente la resistencia del salmón del Atlántico contra el patógeno *Piscirickettsia salmonis* (Lhorente et al., 2014). Para los centros de cultivo, el piojo de mar representan una importante carga económica, debido a que además de invertir en tratamientos para eliminar los piojos desde los centro de cultivos, se deben sacrificar los peces infectados (Costello, 2009, Torrissen et al., 2013), lo que para la industria salmonicultora a nivel mundial genera un costo estimado de US\$423 millones (Liu and Bjelland, 2014).

En Chile, así como otros países productores de salmón, el control del piojo de mar se realiza utilizando fármacos, entre ellos: avermectinas, piretroides, organofosfatos, y químicos como peróxido de hidrogeno (Torrissen et al., 2013). Estos fármacos se caracterizan en general por afectar el sistema nervioso de los parásitos en sus distintas etapas de desarrollo (Cárcamo et al., 2011a, Bravo et al., 2010, Grant, 2002, Torrissen et al., 2013, Jones et al., 1992). La primera vez que se detectó *C. rogercresseyi* en Chile fue en el año 1997, a partir de ese año hasta 2007 el método de control utilizado en la industria salmonicultora fue benzoato de emamectina. Luego de este periodo, y debido a la baja en la eficiencia de este fármaco, el gobierno de Chile autorizó el uso de otras alternativas como deltametrina y azametifos (Bravo et al., 2013). Según los informes de SERNAPESCA, la industria salmonicultora en el año 2013, sólo por concepto de compra de fármacos gastó cerca de US\$ 80 millones, a lo que se le debe sumar los gastos de la administración de estos, lo que hace de la Caligidosis un gran problema económico para esta industria.

#### *Tratamientos antiparasitarios en Chile*

Actualmente en Chile existe un plan de manejo contra la Caligidosis implementado por la autoridad pública, SERNAPESCA, que ha permitido la disminución de la carga parasitaria de 37 peces por pez en el 2007 a un promedio de tres piojos por pez en la actualidad (SAG, 2014). Las estrategias para la mitigación de la Caligidosis se basan principalmente en la utilización de antiparasitarios. En nuestro país existe un “Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Caligidosis (PSEVC-Caligidosis)” en el cual se establecen los

objetivos del programa, descripción de la enfermedad, clasificación de centros, vigilancia y control de la Caligidosis. Dentro de las estrategias de control establecidas en este programa se considera vigilancia intensiva de los centros, tratamientos coordinados entre ellos, rotación de los distintos fármacos utilizados, y la limitación de utilizar estos por no más de 3 veces consecutivas.

Dentro de los fármacos de uso autorizado en Chile se encuentra benzoato de emamectina (EMB), que es una avermectina, producido por la bacteria *Streptomyces avermitilis*. Actúa sobre el sistema nervioso periférico de artrópodos, específicamente sobre los receptores de GABA (ácido gamma-aminobutírico) manteniendo su apertura, lo que se traduce en el aumento de la concentración de cloruro, hiperpolarización del músculo y el nervio, y la inhibición de la transmisión neural (Grant, 2002). EMB es administrada como aditivo alimenticio para el tratamiento contra piojos de mar de peces salmónidos y es altamente efectivo para la eliminación de todos los estados parasíticos (SAG, 2014).

Los piretroides corresponden a análogos sintéticos de las piretrinas, químicos de origen vegetal (Velíšek et al., 2007). Estos pesticidas modifican la dinámica de los canales de sodio dependientes de voltaje presentes en la membrana de células nerviosas, de tal manera que aumentan el tiempo de apertura de las canales, provocando la prolongación de la corriente de sodio a través de la membrana de la célula nerviosa, lo que termina en una parálisis y finalmente en el muerte de los organismos (Narahashi, 2000). El más utilizado de este tipo de fármaco es Deltametrina, debido a su acción selectiva, limitada persistencia ambiental, y baja toxicidad para los organismos no objetivos (Milam et al., 2000, Parvez and Raisuddin, 2006).

Los organofosforados son neurotóxicos y actúan como un inhibidor de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), lo que genera una sobre estimulación del sistema nervioso y muscular, generando parálisis seguido de la muerte del organismo (Haya et al., 2005, Walsh et al., 2007). Se ha observado que este fármaco afecta directamente a los estados juveniles (chalmus) y adultos (Walsh et al., 2007). En Chile el organofosforado azametifos se comenzó a utilizar en 2011, bajo el nombre de Salmosan el que es

suministrado a través de baños a los salmones, mostrando hasta la fecha una gran efectividad (Haya et al., 2005).

Un antiparasitario no farmacológico utilizado en la industria es el peróxido de hidrogeno, el que es un potente agente oxidante, su mecanismo de acción se basa en parálisis mecánica, peroxidación por radicales hidroxilo de los lípidos y membranas de orgánulos celulares, y la inactivación de las enzimas y la replicación del ADN (Burridge et al., 2010). Mayoría de la evidencia apoya la inducción de parálisis mecánica cuando se forman burbujas en el intestino y hemolinfa y hacen que el piojo de mar se libere y flote a la superficie (Bruno and Raynard, 1994), los estadios blancos de este producto son pre-adultos y adultos.

Además, se han generado los inhibidores de la síntesis de quitina, como diflubenzuron (Lepsidon™) y teflubenzuron (Calicidae™), insecticidas de administración oral que actúan sobre los estadios de desarrollo que realizan mudas (chalmus y preadultos), inhibiendo la síntesis de quitina necesaria para la formación de la cutícula de los copépodos, limitando el éxito del proceso de muda en el piojo mar, lo que se traduce en la incapacidad de pasar a estado adulto (Burridge et al., 2010, Langford et al., 2014).

#### *Efectividad de antiparasitarios*

La resistencia a drogas está basado en diversos mecanismos moleculares, los que incluyen cambios estructurales en los target moleculares de las fármacos; el aumento en la regulación de la vía detoxificación de fármacos, y la alteración en la flujo de los fármacos (ffrench-Constant et al., 2004, Wolstenholme et al., 2004). Dentro de los mecanismos de resistencia, encontramos: i) mecanismos cinéticos, asociados con la disminución en la acumulación de la sustancia activa causado por el incremento en la actividad de transportadores de membrana tipo ABC; ii) mecanismos metabólicos como el incremento en la actividad inespecífica de esterases, oxidasas, u otras enzimas metabólicas asociadas con la vía de detoxificación; iii) presencia de mutaciones que resultan en la alteración de los blancos farmacológicos (ffrench-Constant et al., 2004, Wolstenholme et al., 2004).

Los estudios moleculares relacionados con la resistencia o susceptibilidad de invertebrados a antiparasitarios son escasa. En *Anopheles gambiae* (Vontas et al., 2007) y *Lepeophtheirus*

*salmonis* (Carmichael et al., 2013), análisis de microarreglos han sido utilizados para evaluar los cambios de expresión de genes blancos de los fármacos para evaluar cepas resistentes y susceptibles a piretroides y benzoato de emamectina, respectivamente. En ambos organismos se observa una expresión diferencial del receptor GABA y genes involucrados en procesos de detoxificación como citocromo P450. En relación a los organofosforados, existe un estudio en *L. salmonis* realizado por Walsh *et al.* (2007) en donde se identifican 33 secuencias ETS (Expresion Tag Sequence) que presentaban cambios de expresión al exponer los piojos de mar a un organofosforado.

En cuanto a la eficacia de los fármacos utilizados en Chile para el control de *C. rogercresseyi*, existen estudios que reportan una baja en la eficiencia de los tratamientos. Ejemplo de ello es la evaluación que se realizó de un monitoreo durante el año 2007 en centros de cultivo de la X región donde se aprecia una reducción en la eficacia de los tratamientos con benzoato de emamectina y deltametrina (Bravo et al., 2013). En particular para benzoato de emamectina un estudio realizado en por Bravo *et al.* 2008 muestra una reducción en la sensibilidad de *C. rogercresseyi* luego de un análisis en 18 centros de cultivo del sur de Chile, el análisis muestra un incremento del EC50 para el tratamiento de caligus que llega hasta los 203ppb en comparación con el EC50 de la especie control *Lepeophtheirus mugiloidisi* que fue de 34ppb (Bravo et al., 2008). Un reciente estudio realizado por Helgesen *et al.* 2014, demuestra a través de comparación de bioensayos la generación de resistencia de *C. rogercresseyi* a deltametrina. Para ello se compararon bioensayos realizados previo a la introducción de deltametrina en la industria salmonícola Chilena en el año 2007, con bioensayos realizados en 2008, 2012, 2013, los resultados de estas comparaciones muestran que entre 2008 y 2012 los caligus presentan mayor resistencia a deltametrina, además del estudio se observa que entre 2012-2013 existe una diferencia de susceptibilidad entre machos y hembras de caligus (Helgesen et al., 2014). Con respecto al fármaco cipermetrina, otro piretroide que se utiliza desde 2010 en Chile, un estudio realizado en 2014 demuestra que este fármaco aun presenta alta eficacia en el tratamiento de caligus disminuyendo significativamente la cantidad de caligus vivos en peces tratados con este fármaco, en relación a lo observado en peces no tratados (Marín et al., 2015).

### *Sistema Antioxidante*

La estructura de los piretroides es muy diversa, pero la arquitectura común compromete un grupo ácido ciclopropano acoplado a una molécula de alcohol. Tradicionalmente se encuentran divididos en dos tipos de acuerdo al radical libre en dentro del anillo de ciclopropano (Sogorb and Vilanova, 2002b). La biodegradación biológica del piretroide tipo II, deltametrina, se genera a través de dos vías: (1) primero la hidrólisis del éster central mediada por carboxylesterasas (Sogorb and Vilanova, 2002a), y (2) la oxidación de los grupos metilo de la estructura ciclopropil en la posición 2', 4' y 5' de deltametrina (Ray and Fry, 2006) lo que es mediado por la enzima citocromo P450 (CYP) (Soderlund et al., 2002). La biodegradación del piretroide a través de la oxidación genera un incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Shashikumar and Rajini, 2010), que incluye al anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), y radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ). Junto con esto, aumentan los niveles de expresión del sistema antioxidante con el objetivo de contrarrestar los efectos de la oxidación en el sistema (Shashikumar and Rajini, 2010).

### *Transportadores ABC*

La familia de transportadores ABC se encuentra constituida por subfamilias que son diferenciadas de acuerdo a la estructura de sus dominios y secuencia (Dermauw and Van Leeuwen, 2014), en mamíferos se identifican siete subfamilias (A-G), mientras que en artrópodos y pez cebra se han identificado ocho subfamilias (A-H) (Dermauw and Van Leeuwen, 2014, Sturm et al., 2009). Dentro de estas ocho subfamilias, las subfamilias E y F son las únicas que no presentan función transportadora. Los ABCE son inhibidores de RNAase L y participa en el ensamble del complejo preiniciador, mientras la subfamilia F actúa en el ensamble de ribosomas y traducción de proteínas (Sturm et al., 2009). Actualmente, solo se ha caracterizado las familias de transportadores ABC para ocho especies de artrópodos entre ellos *D. melanogaster* (Dean et al., 2001), *Anopheles gambiae* (Roth et al., 2003), *Apis mellifera* (Liu et al., 2011), *Bombix mori* (Xie et al., 2012), *Tribolium castaneum* (Broehan et al., 2013), *Tetranychus urticae* (Dermauw et al., 2013), *Daphnia pulex* (Sturm et al., 2009) y recientemente *T. japonicus* (Jeong et al., 2014). La subfamilia ABCB, es especialmente estudiada, debido a que presenta la habilidad de

transportar drogas actuando (Szakács et al., 2004, Massey et al., 2014). P-glycoprotein (P-gp), proteína miembro de estas subfamilia, fue el primer transportador identificado (Juranka et al., 1989). Por otra parte, igual función se ha observado en las familias ABCC y ABCG (Dermauw and Van Leeuwen, 2014, Luckenbach and Epel, 2008). Debido al rol detoxificador de estas proteínas es que son denominadas como multidrug resistance protein (MRP). Las MRPs en invertebrados han demostrado tener relación con la generación de resistencia a insecticidas, en *C. elegans*, *Trichoplusia ni* (Simmons et al., 2013), *Aedes aegypti* (Bariami et al., 2012), entre otros. En los ectoparásito *Lepeophtherius salmonis* (Tribble et al., 2007) y *Caligus rogercresseyi* (Cárcamo et al., 2011b) se ha observado una estrecha relación en la generación de la resistencia a emamectin benzoate (EMB) con la respuesta transcritómica de P-gp. Para *Daphnia pulex*, por ejemplo, se han descrito las diferentes subfamilias de transportadores ABC, con el fin de comprender los mecanismos de adaptación de este crustáceo en presencia de tóxicos (Sturm et al., 2009). Para *L. salmonis*, se han caracterizado otros cuatro MRPs, sin embargo, estos no presentaron diferencias de en los niveles de transcritos entre cepas resistentes y susceptibles a EMB (Heumann et al., 2014).

### *Síntesis Cutícula*

Como se ha mencionado la resistencia a drogas está basada en diversos mecanismos moleculares, los que incluyen cambios estructurales en los target moleculares de las fármacos; el aumento en la regulación de la vía detoxificación de fármacos, y la alteración en la flujo de los fármacos (French-Constant et al., 2004, Wolstenholme et al., 2004). Sin embargo los cambios en la expresión fenotípica de la resistencia farmacológica han sido pobremente estudiados. Dentro de los efectos fenotípicos que podría generar, está un efecto directo o indirecto de la resistencia a fármacos, el cual podría ser el engrosamiento de la cutícula, puesto que se ha encontrado que las mediciones de las tasas de penetración de insecticidas puede ser afectada por las cutículas engrosadas, así como por otros componentes estructurales de las cutículas (CalderÓN-Fernández et al., 2012, Yadav et al., 2010), lo que sugiere que la disminución de las tasas de penetración del insecticida a través de la cutícula, facilita los procesos de desintoxicación metabólica por parte del organismo (Ahmad et al., 2006, Joußen et al., 2012). El engrosamiento de la cutícula ha sido asociado

con la resistencia a piretroides en el vector de la enfermedad Chagas, *Triatoma infestans* (Pedrini et al., 2009). De igual forma en *Bactrocera dorsalis*, se identificó que la penetración de  $\beta$ -cipermetrina es menor en las cepas resistentes a diferencia de la cepa susceptible, relacionado directamente con grosor de la cutícula (Lin et al., 2012). En cuanto a la función de la cutícula en la pérdida de susceptibilidad a fármacos de caligus no se han realizado estudios. Sin embargo, una comparación entre cepas resistentes y susceptibles a EMB de *L. salmonis* mostraron un cambio en los niveles de transcritos de proteínas de cutícula y precursores de está, lo que es un antecedente de la participación de estas proteínas los cambios de susceptibilidad a EMB del ectoparásito (Carmichael et al., 2013).

Durante los últimos 3 años el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola (LBGA) de la Universidad de Concepción y parte del Centro FONDAP INCAR, ha trabajado en la generación de datos transcriptómicos desde los distintos estados de desarrollo de caligus (Gallardo-Escárate et al., 2014, Chávez-Mardones and Gallardo-Escárate, 2015), y caligus adultos expuestos a deltametrina (Chavez-Mardones and Gallardo-Escárate, 2014) y azametifos (Valenzuela-Muñoz et al., 2015a). En ambos trabajos se explora la respuesta transcriptómica global de caligus hembras y machos por separado ante la exposición a los dos fármacos. Estos análisis transcriptómicos demuestran que no solo existe un cambio en la expresión de los genes blancos de cada fármaco como efecto de estos, sino que además una serie de genes asociados a mecanismos detoxificantes cambian su expresión en los caligus expuestos a los fármacos. Por otra parte, en ambos estudios se reporta una respuesta diferencial entre sexo, sugiriendo que hembras y machos de caligus presentan diferentes mecanismos de resistencia. Adicionalmente, dentro de los estudios asociados a caligus expuestos a deltametrina y azametifos se realizó un estudio transcriptómico donde se evaluó el efecto de estos fármacos sobre la regulación de genes asociados a la formación de cutícula, mediante análisis de RNA-Seq y validaciones por qPCR se observó que tanto deltametrina como azametifos, generan cambios en la regulación de la expresión de estos genes de cutícula, indicando que además del efecto en el sistema nervioso, estos fármacos podrían generar cambios fenotípicos como el cambio en el grosor de la cutícula de los piojos de mar (Chávez-Mardones et al., 2016). Como ya se mencionó dentro de los mecanismos de resistencia encontramos los mecanismos cinéticos que son regulados por

proteínas transportadoras de membrana entre ellas los transportadores ABC. Dentro de estos transportadores encontramos varias subfamilias especializadas en el transporte de distintas sustancias, otro de los estudios publicados por el LBGA, identificó y caracterizó las diferentes familias de transportadores ABC, además en este estudio se evaluó de manera *in silico* (a partir de datos de secuenciación) los cambios de expresión de estas familias en caligus expuestos a deltametrina y azametifos (Valenzuela-Muñoz et al., 2015b). El estudio demostró que existía cambios en la regulación de la expresión de las subfamilias ABCB y ABCC como respuesta de caligus a la exposición a ambos fármacos (Valenzuela-Muñoz et al., 2015b, Valenzuela-Muñoz et al., 2014). Por otra parte, nuestro laboratorio generó un estudio donde se evaluaron genes asociados a estrés oxidativo sobre caligus expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este estudio mostró que los cambios de expresión de los genes evaluados era de tipo sexo-específica, similar a lo observado para deltametrina y azametifos (Chávez-Mardones et al., 2015).

## **Metodología**

### *Selección y estandarización de panel de genes asociados a resistencia a fármacos para Caligus rogercresseyi.*

A partir de la base de datos transcriptómica para los distintos estados de desarrollo de caligus del LBGA (Gallardo-Escárate et al., 2014), así como las generadas de manera específica para caligus adultos expuestos a deltametrina (Chávez-Mardones and Gallardo-Escárate, 2015) y azametifos (Valenzuela-Muñoz et al., 2015a) se seleccionaron transcritos con homología a genes ligados a resistencia y susceptibilidad a fármacos. Utilizando los transcritos identificados se diseñaron partidores para análisis por qPCR. La estandarización de estos partidores se realizó en muestras de caligus adultos expuestos a 3 concentraciones diferentes de deltametrina y azametifos. Dentro de los genes seleccionados se encuentran aquellos que son blanco de cada fármaco, transportadores ABC, de estrés oxidativo entre otros. Adicionalmente, se estandarizaron los genes de estrés oxidativo en muestras de caligus expuestas a peróxido.

a) *Selección de genes de resistencia para C. rogercresseyi*: a partir de una búsqueda bibliográfica se seleccionó un panel de genes que han demostrado respuesta diferencial en *L. salmonis*, resistentes y susceptibles a fármacos (Carmichael et al., 2013, Walsh et al., 2007). Estos genes fueron buscados por medio de un análisis de homología sobre la base de datos transcriptómicos del LBGA (Gallardo-Escárate et al., 2014). Adicionalmente, desde los datos transcriptómicos de caligus adultos expuestos a deltametrina (Chávez-Mardones and Gallardo-Escárate, 2015) y azametifos (Valenzuela-Muñoz et al., 2015a), se realizó una nueva búsqueda de genes candidatos para ser evaluados como indicadores de resistencia y/o susceptibilidad a estos dos fármacos. Utilizando los transcritos con alta homología se diseñaron partidores específicos para caligus. Paralelamente, utilizando todos los transcritos se realizó la búsqueda de variaciones SNPs que pudiesen estar asociados a genes de resistencia.

b) *Obtención de muestras*: las muestras de adultos hembras y machos fueron colectados desde centros de comercial localizado en la X Región en Chile (41°40'48.5"S; 73°02'31.34"O). El permiso para la colección de los piojos de mar fue autorizada por Marine Harvest S.A, Ruta 226, Km. 8, Camino El Tepual, Puerto Montt, Chile. Estas especies fueron usadas para generar una subsecuente librería cDNA MiSeq. Un pool de 15 individuos por cada sexo fueron fijados en RNAlater<sup>®</sup> RNA Stabilization Reagent (Ambion, USA) y almacenada a -80°C para la posterior extracción de RNA. Para la validación de los genes asociados a resistencia/susceptibilidad se realizaron bioensayos de acuerdo al Consorcio SEACH (2006). Para deltametrina (AlphaMax<sup>®</sup>) fue preparado por diluciones seriadas con agua de mar (0, 1, 2, 3ppb), para azametifos (Bayer<sup>®</sup>) en tres diluciones seriadas con agua de mar (0, 1, 3, 10 ppb) y para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se utilizaron tres diluciones seriadas (0, 1000, 1500, 2000 mg/L). Treinta piojos de mar adultos (15 machos y 15 hembras) fueron expuestos a cada concentración de deltametrina, azametifos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usando placas Petri con 50 ml de agua de mar. Cada experimento se realizó por triplicado. El tiempo de exposición para deltametrina y azametifos fue de 40, 30 y 20 minutos, respectivamente. Durante la exposición, los piojos de mar fueron mantenidos a 12°C. Después de 24hr, los organismos fueron fijados en RNAlater<sup>®</sup> RNA Stabilization Reagent (Ambion, USA) y almacenados a -80° para la extracción de RNA.

c) *Diseño de partidores y estandarización de qPCR*: el diseño de partidores se realizó sobre los transcritos seleccionados desde las bases de datos transcriptómicas del LBGA. Para el diseño se tomó en consideración que las  $T_m$  de los partidores fuera cercana a 60°C y no existiera más de 2°C de diferencia entre el forward y reverse, se estableció un tamaño de amplificación entre 100-150 pb. Todos los partidores diseñados fueron estandarizados mediante PCR en tiempo final evaluando 3 temperaturas de anealing distintas. Luego de esta estandarización se realizó un rango dinámico con 5 diluciones seriadas de cDNA para determinar la eficiencia de los partidores las que fueron entre 90-110%.

d) *Evaluación de expresión por qPCR en muestras de caligus expuestas a fármacos*: el análisis se realizó mediante PCR cuantitativa a través del método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen, 2001) en el termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Se diseñaron partidores específicos para cada gen en estudio (Tabla 1). Para normalizar los datos se utilizó el gen  $\beta$ -Tubulin como gen housekeeping (HKG), previamente validado por Gallardo- Escárte (Zouros and Mallet, 1989). La reacción de qPCR se llevó a cabo en un volumen total de 10 $\mu$ L usando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix (2X) Kit (Thermo Scientific, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C por 10min (etapa de calentamiento), 40 ciclos a 9°C por 30seg (denaturación), 60°C ( $T^\circ$  annealing) por 30seg, y 72°C por 30seg (extensión). Los análisis de estadísticos se realizaron en el software JMP (versión 9).

## **Resultados**

### *a) Panel de genes asociados a resistencia y susceptibilidad a fármacos*

Desde la base de datos transcriptómica del LBGA, se identificaron 870 transcritos con homología a genes asociados a respuesta a fármacos. De ellos se seleccionaron algunos genes para la validación por qPCR (Tabla 1). Con muestras de caligus expuestos a deltametrina y azametifos se realizó la validación de este panel de 14 genes mediante qPCR. Los resultados muestran una sobre expresión de genes sobre expresados en los caligus expuestos y que sobrevivieron a deltametrina fueron: *cytochrome P450*, *Carboxylesterase*,

and *JH*, mientras que los caligus expuestos y que sobrevivieron a azametifos se vio sobre expresión de los genes *myosin*, *CRABP*, *Na<sup>+</sup>*, *K<sup>+</sup> ATPase alpha*, and *sarco/endoplasmatic reticular type Ca<sup>+2</sup> ATPase* (Fig. 2). Además, los resultados muestran que existe una respuesta diferencial a la exposición a fármacos entre sexo, donde en las hembras se vio sobre expresión de *Prohibitin* and *Cellular Reticulum Acid Binding (CRABP)*, *P-glycoprotein (Pgp)* y los machos muestran de los genes *tropomodulin* and *Juvenile Hormone (JH)* (Fig. 3 y 4).

Además se evaluó por separado el cambio de expresión del gen blanco de azametifos que es acetilcolinesterasa (AChE) en caligus vivos y moribundos luego de ser expuestos a deltametrina y azametifos. Al evaluar la expresión de Cr\_AChE1 en los individuos desafiados con azametifos se evidencia un aumento significativo de la expresión de este gen en machos pertenecientes al grupo de sobrevivientes en comparación con el grupo control y el grupo de moribundos (Fig. 5). Con respecto al análisis del grupo desafiado con deltametrina se observa que Cr\_AChE1, tanto en individuos sobrevivientes y moribundos presentan una menor expresión al ser comparadas con el grupo control y menor a la registrada en los individuos expuestos a azametifos. Estos resultados hacen de Cr\_AChE1 un marcador específico de resistencia a azametifos.

Tabla 1. Genes asociados a respuesta a fármacos seleccionados para validación por qPCR

N° Contig	Gen	Partidor	Secuencia	Tm
Contig 23495	B tubulin (HKG)	Cr_b-tubulin_2F	TTTGTGTGTGAGCTCTGGG	60
		Cr_b-tubulin_2R	GCTGATCTCCGAAAACCTGC	
Genes asociados a resistencia				
Contig 123	Cytochrome P450	Cr_CyTP450_F	CACCAGGATTTTCAGCTCCA	60
		Cr_CyTP450_R	TACTTCCCGGAACCCAATGA	
Contig 3241	Beta Cristalín 1A	Cr_ELP_3241_2F	TTTATCCTGGGGACGAGGAA	60
		Cr_ELP_3241_2R	AGTAGCATCCAATTCGACCG	
Contig 9429	GABA Receptor	Cr_GABA_9429_F	TGATGACGTTGTGGATGACC	58
		Cr_GABA_9469_R	CTGTTGGGGGTGATGATGTT	
Contig 371	Myosin2	Cr_CB371_F	AAGGTCTCAAAGGTCACACG	60
		Cr_CB371_R	TCTTCGACACCAAGGGAGAT	
Contig 672	Carboxylesterase	Cr_cabox672_F	GATGAGGGCATCTACGCATT	60
		Cr_cabox672_R	AAGCTGACTGCCGTGTTTAT	
Contig 1316	Juvenil Hormone	Cr_JH_F	TAGAGGCTCTGAGGCATTCA	60
		Cr_JH_R	GGGAACCTCTTGATGCATGT	
Contig 2157	Na+,K+ ATPase alpha Neuronal	Cr_Trans2157_F	TTGTTATGAAAGGGGCTCCG	60
		Cr_Trans2157_R	TGTTGAAAGCATCCCTCCAG	
		Cr_NAR9683_2F	CACATCCGTCGTTTCAGAGT	
Contig 9683	acetylcholine receptor	Cr_NAR9683_2R	CACATCCGTCGTTTCAGAGT	60
Contig 6949	Paxilin	Cr_Paxilin_F	GTGGAAAAGAAGAAGCAGCG	60
		Cr_Paxilin_R	TTCCCGTTTTCAATCACGGA	
Contig 9023	Tropomodulin	Cr_CytP9023_F	CACTGCAAGAAAGATGCCAC	60
		Cr_CytP9023_R	CCCTTTTCGTATTTGACGGC	
Contig489	Putative cuticle protein	Cr_CT489_F	CCAATACGACGACAAATGGC	60
		Cr_CT489_R	TTGAAGTCAAGCCCAGCATT	
Contig 2464	P-glycoprotein	Cr_P-gp_2F	GCATTGGATCTCGTCAGACA	60
		Cr_P-gp_2R	ACACCCCACCAGAATGTAGA	
Contig1444	Cellular retinoic acid-binding protein 2	Cr_1444_F	ACAGTGGAGGTCTTGAAGGA	60
		Cr_1444_R	AGGAACTCGGAGTGAACGTA	
Contig2841	Prohibitin-2	Cr_2841_F	AATGGTCAACATCAGCCTCC	60
		Cr_2841_R	TTGAGGACCTCGTTGCAAAT	
Contig 19394	Acetylcholinester	Cr_Ace1 F2	GCATGATCCACCTTTGCAGC	59°

	ase	Cr_Ace1 R2	CTTGAGGGTCTTCGAGTGAACA	
Respuesta estrés oxidativo				
Contig 707	Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase-1	qCr_PHGP_F1	TGGAGCCGATGCCATTCTCTTTTCA	66°
		qCr_PHGP_R1	TTTTTGCTGGGCGCCAGGCGTGA	
Contig 3245	Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase-2	qCr_PHGP_F2	GCTGTATTCATCCGTTCCAAGGGGGA	68°
		qCr_PHGP_R2	ATCCCGTGGCCCGCTTTGCACCC	
N° Contig	Gene	Primer name	Sequence	Tm
Contig 1115	Peroxiredoxin-2	qCr_PRX2_F	AGGAGACGCCGTCTTGTGGGC	68°
		qCr_PRX2_R	CTCCAGTGGGTCGCTGCGTGGA	
Contig 1115	Peroxiredoxin-4	qCr_PRX4_F	TGCGGGGGCGGGCTTGAAATCA	66°
		qCr_PRX4_R	TCCGCCGTCTCGGGCAATCCTG	
Contig 4041	Peroxiredoxin-6	qCr_PRX6_F	TGGCCATTCCCTCCTAGGCCGT	66°
		qCr_PRX6_R	GGGACGCCTCCTTTCTTAACAGTAGGG	
Contig 3189	Catalase	qCr_CAT_F	GGCACCCAGACGATAGCGATGAGCA	64°
		qCr_CAT_R	TCGCTTTCAGTCCCGAAATCTGGT	
Contig 4973	Superoxide dismutase	qCr_SOD_F	TCCACATGCAACACGCGCTCCAG	60°
		qCr_SOD_R	GCGTGCCCTGGTCGTACATGCCG	
Contig 11696	Glutathione S-transferase-kappa 1	qCr_GST-kappa1_F	GTTGGGGATGAGGCTCACGCACT	65°
		qCr_GST-kappa1_R	GCTGGGTCGCCACCTACAGCACC	
Contig 1332	Glutathione S-transferase1	qCr_GST_F	GTTGGGGATGAGGCTCACGCACT	66°
		qCr_GST_R	GCTGGGTCGCCACCTACAGCACC	
Contig 1264	Glutathione S-transferase-like	qCr_GST-like_F	CAAGTCATTGCGGAGAGGAT	55°
		qCr_GST-like_R	GATCGAATGCTCCGTTCTCA	
Contig 3058	Selenium-dependent glutathione peroxidase	qCr_Se-GPX_F	ACAACGTCCGTCCAGGGAACCAT	65°
		qCr_Se-GPX_R	TTCACTGTCGTCCGCGGGGGTGG	
Contig 2567	Ferritin	qCr_Fer_F	GGAGTGACGGCCTAGAGGCACTCCG	65°
		qCr_Fer_R	TCCAGCCAAGTGCCGGTGAGCCA	

Genes síntesis de cutícula

Contig 37065	cuticular protein 62Bb	CrCut1_F CrCut1_R	TGCCTACAAGGAGGCACCCGCCG GAATGCGACCGTCGGGGAGGGCA	66
Contig 37803	cuticular protein 62Bb, isoform B	CrCut2_F CrCut2_R	GCCTACAAGGAGGCACCCGCCGT TTGAATGCGGCCGTCGGGGAGGG	62
Contig 37554	cuticulin	CrCut3_F CrCut3_R	AGGCTTGTATGGGGCAGGGGCGG ACCGTTGCCCTTCCCGACGGACG	66
Contig 10193	chitinase	CrCHIT_F CrCHIT_R	GCTGCCTTTGTGGAAAGCGTTGT GCCACGTGAAGCTCCTGGATGAG	67
	prolyl 4- hydroxylase	CrP4H_F	AGAATGCTCCACCACGACCTCAG	
Contig 3783	subunit alpha-2 isoform 2 precursor	CrP4H_R	GGCGTTGAAGTCTGGACTCTTCCT	63
Contig 974	collagen alpha 1(IV) chain	CrCOLL_F CrCOLL_R	TATCACCGAGGCGACCCATCTGA ACGATGGAAAAGACGGCTTCCCC	63
Contig 6971	collagen alpha 1(VII)	CrPDI_F CrPDI_R	TCCCCTCGGGTGTCAAGAAAGGA CCAAGGATCTGCAGCACCTCTGG	67

---

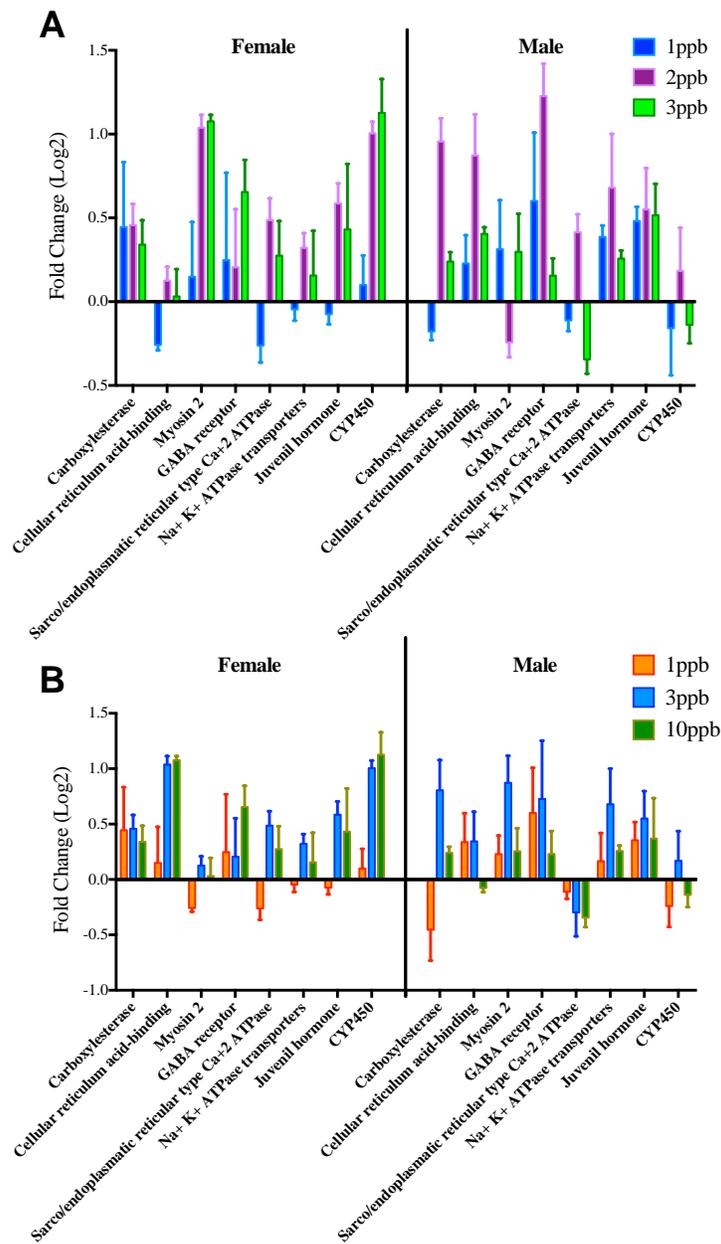


Figure 2. Estandarización y evaluación por qPCR de genes vinculados con respuesta a fármacos en caligues expuestos a deltametrina y azametifos. A) cambios de expresión en caligues expuestos a deltametrina; B) cambios de expresión en caligues expuestos a azametifos. ( $P < 0.005$ ).

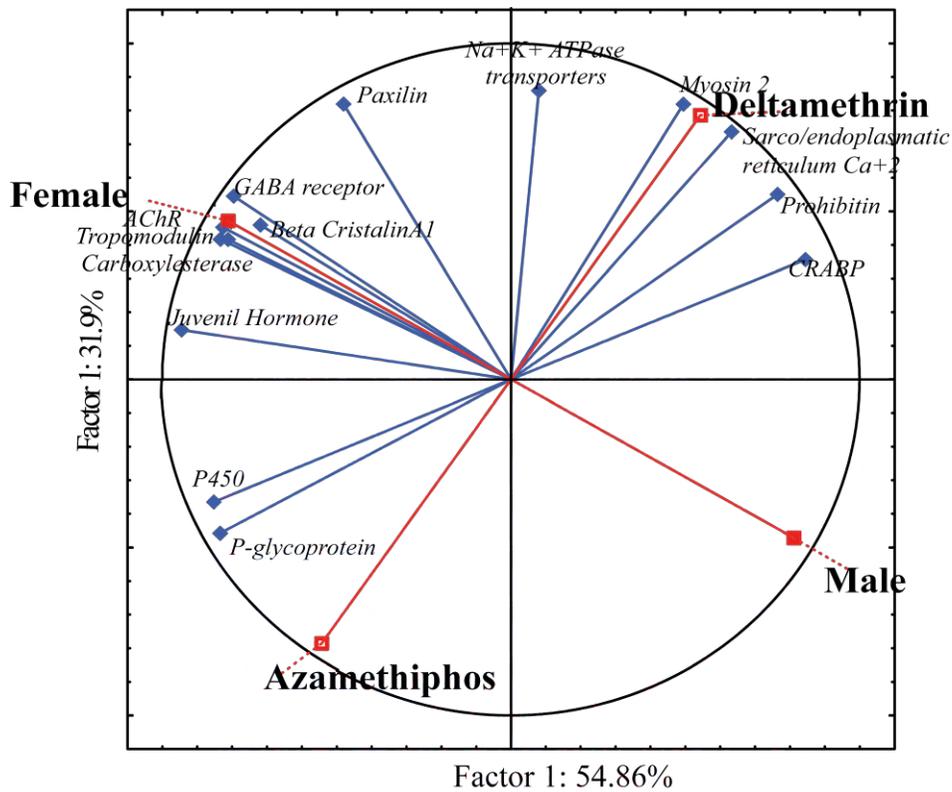


Figure 3. Análisis de PCA, muestra los genes más expresados por sexo y por fármaco.

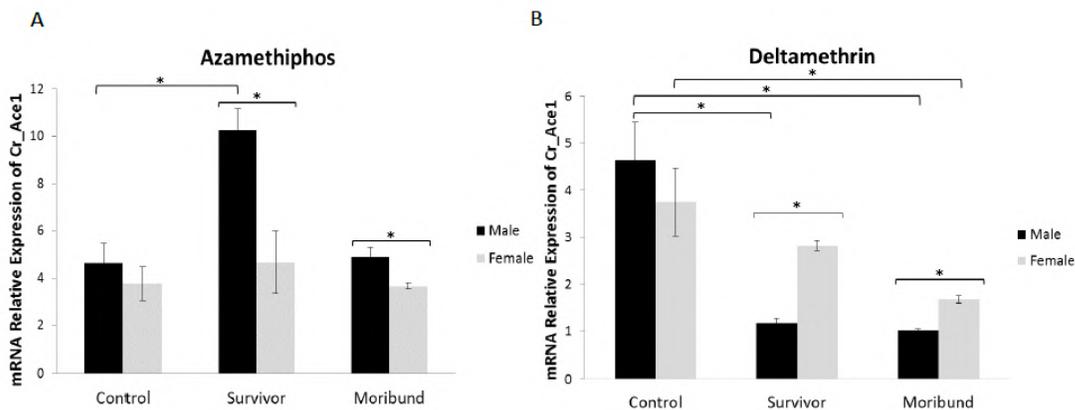


Figure 4. Expresión transcripcional de Cr\_AChE1. A) Expresión de Cr\_AChE1 en machos (negro) y hembras (gris), moribundos y resistentes desafiados con azametifos. B) Expresión de Cr\_AChE1 en machos (negro) y hembras (gris), moribundos y resistentes desafiados con deltametrina. Los datos se presentan como la expresión media  $\pm$  error estándar. La línea con un asterisco en la parte superior de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

b) Panel de genes para evaluar resistencia a peróxido de hidrogeno

Para determinar marcadores moleculares asociados a resistencia y/o susceptibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se estableció un panel de 12 genes asociados a estrés oxidativo (Tabla 1). En general machos y hembras mostraron regulación diferencial de la mayoría de los genes. En las hembras expuestas a 15000 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó un incremento en la expresión de los genes *CrPRX2*, *CrGST1*, *CrGST-like* and *CrGST-kappa 1*. Mientras que los machos las concentraciones 1000 and 2000 mg/L modulan de manera positiva la expresión de *CrPHGPI*, *CrCAT*, *CrSOD*, *CrSe-GPX* and *CrFERR* (Fig. 5).

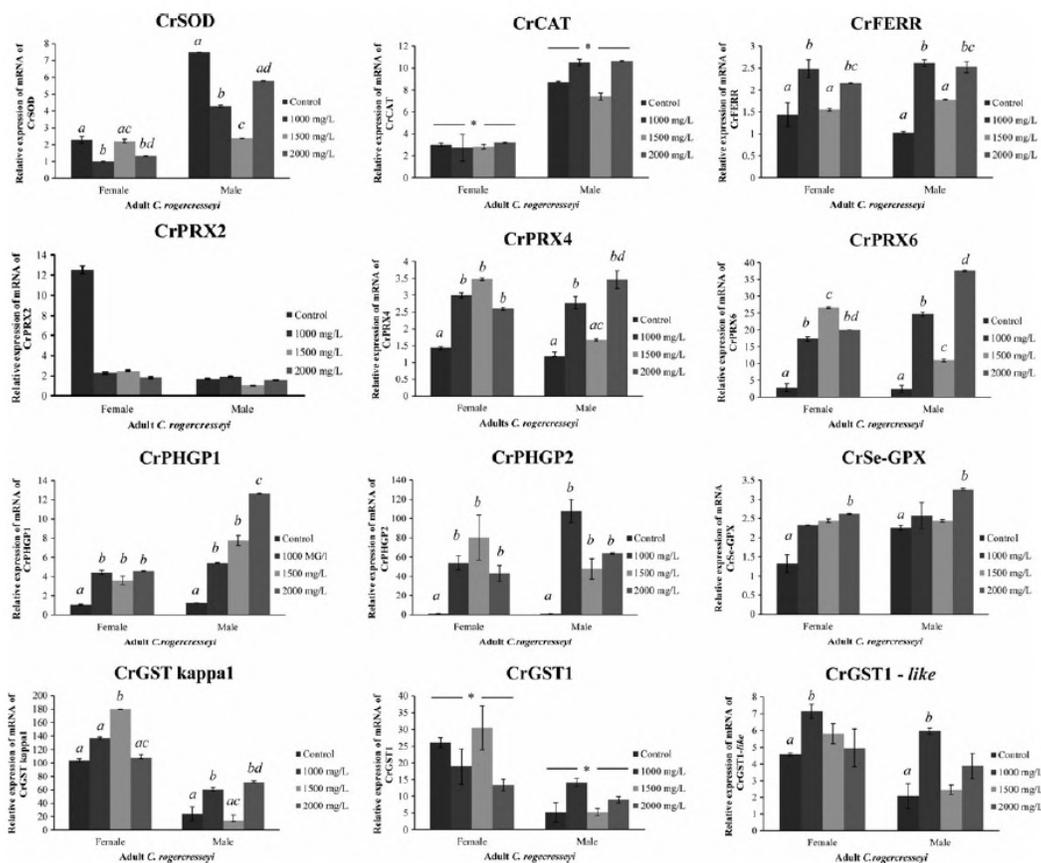


Figura 5. Análisis de qPCR para de 12 genes del sistema antioxidante de *C. rogerresseyi* hembras y machos, expuestos a tres concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las letras indican diferencias significativas en la expresión entre las concentraciones para cada sexo. La línea horizontal con un asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (P<0.005).

c) Panel de genes asociados a estrés oxidativo en caligus expuestos a deltametrina

Utilizando el mismo panel de genes asociados a estrés oxidativo evaluados en los caligus expuestos a muestras con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabla 1), se realizó la evaluación de estos genes sobre caligus adultos expuestos a deltametrina, la que genera radicales libres generando estrés oxidativo en los individuos. La evaluación por qPCR mostró que la exposición de los caligus a deltametrina generaba una expresión diferencial entre hembras y machos similares a lo observado para otros genes. Los genes más sobre-expresados en respuesta a deltametrina en hembras independiente de la concentración del fármaco fueron: *GST*, *PRX2*, *PRX4*, *GST kappa1* (Fig. 5). En el caso de los machos los genes que mostraron una regulación positiva a la exposición al fármaco fueron: *CAT*, *SOD*, *Ferritin*, *PHGP1*, *PRX6* (Fig. 6)

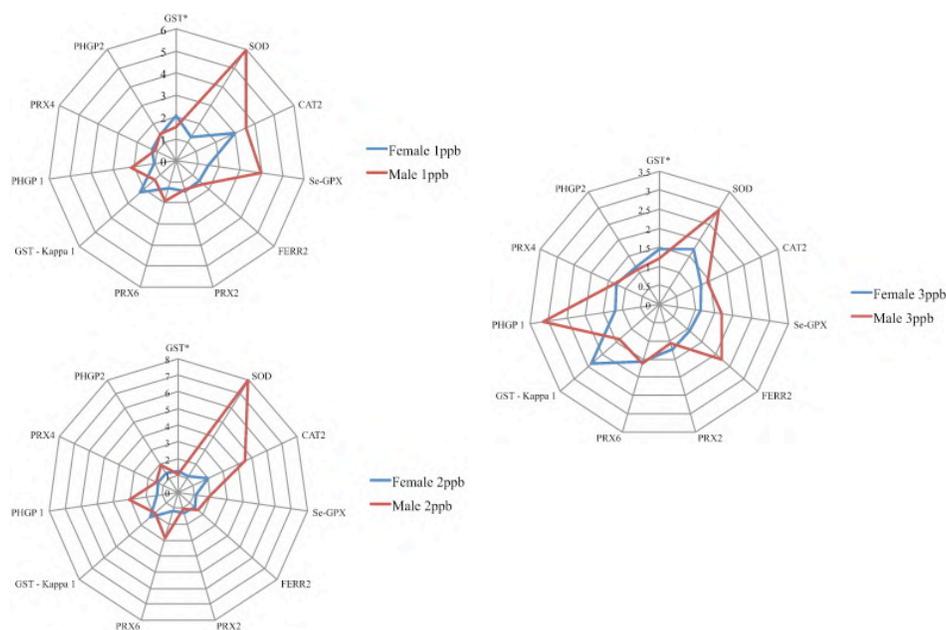


Figura 6. Expresión relativa de genes asociados a estrés oxidativo en caligus adultos expuestos a 3 concentraciones de deltametrina.

*d) Panel de genes asociado a formación de cutícula*

Desde la búsqueda de genes asociados a resistencia a fármaco se identificaron transcritos asociados a formación de cutícula. Desde estos transcritos se diseñó un panel de partidores para 7 genes involucrados en la formación de cutícula (Tabla 1), los que fueron evaluados en muestras de caligus expuestos a 2 y 3 ppm de deltametrina y azametifos, respectivamente. El análisis de expresión se realizó en muestras de caligus definidos como

vivos, moribundos, hembras y machos (Fig. 7). El análisis mostró que existía un incremento en la expresión de todos los genes evaluados en relación al control.

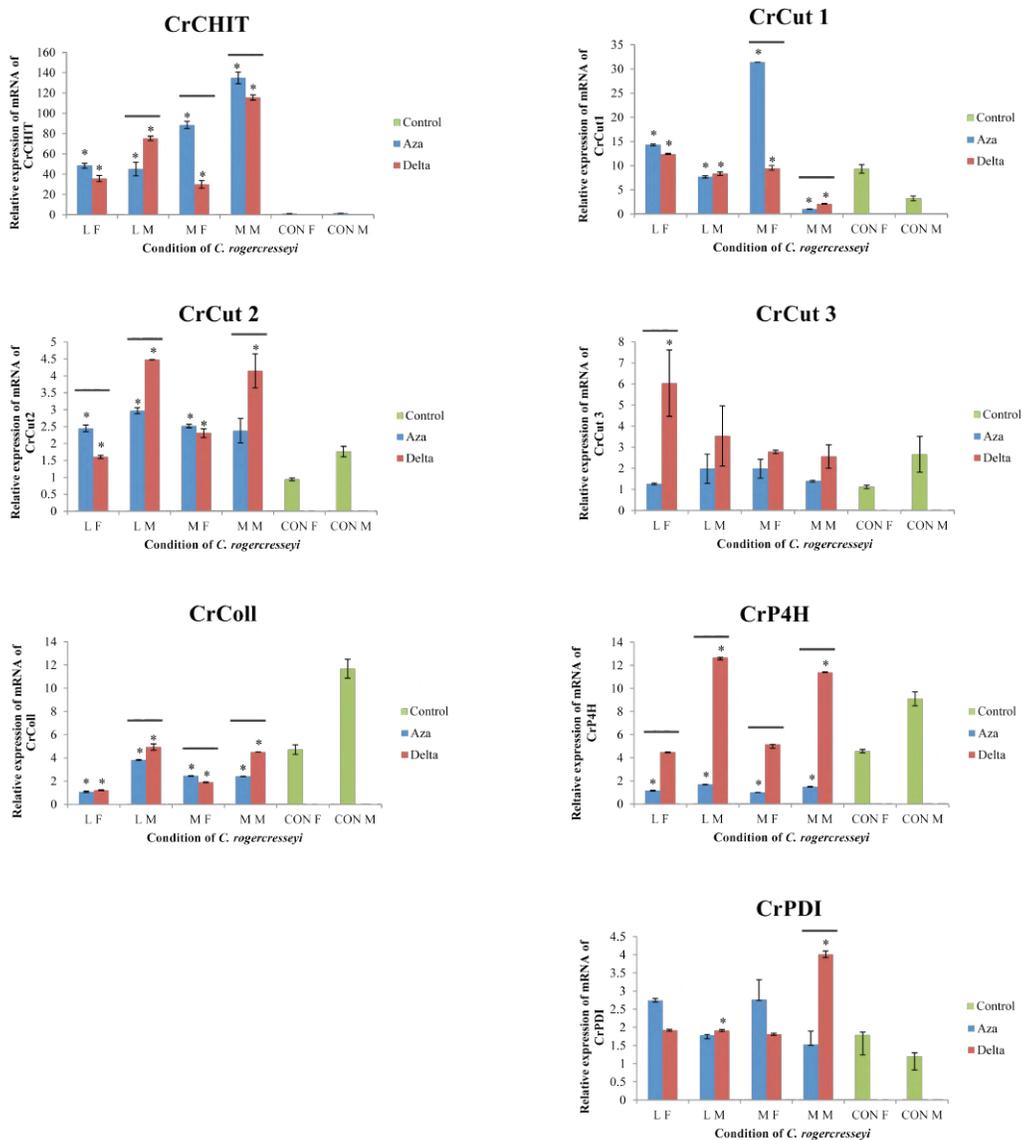


Figura 7. Análisis de qPCR para 7 genes asociados a la formación de cutícula de *C. rogersesseyi* hembras y machos. LF: hembras vivas, LM: machos vivos, MF: hembras muertas, MM: machos muertos, CON F: control hembras, CON M: control machos. La línea horizontal indica diferencia significativa entre fármacos. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p < 0.005$ ).

## Conclusiones

Actualmente se cuenta con un panel de 34 genes con relación al proceso de resistencia y susceptibilidad de caligus a fármacos. Dentro de estos 34 genes existen 15 genes previamente ligados a resistencia a fármacos en *L. salmonis*, los que muestran respuesta diferencial entre machos y hembras expuestos a deltametrina y azametifos, además de un cambio en su regulación ligada a la exposición de uno de los fármacos en específico. En particular el gen AChE, parece ser un candidato para la evaluación de resistencia específica a azametifos. También se cuenta con 12 genes asociados a estrés oxidativo, indicadores de una posible resistencia a piretroides (deltametrina) y peróxido de hidrógeno y, siete genes asociados a la formación de cutícula que muestran incremento en su expresión en individuos que han sobrevivido a un bioensayo con deltametrina y azametifos.

## Referencias

- Ahmad, M., Denholm, I. & Bromilow, R.H. (2006). Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Management Science*, 62: 805-810. DOI 10.1002/ps.1225
- Bariami, V., Jones, C.M., Poupardin, R., Vontas, J. & Ranson, H. (2012). Gene Amplification, ABC Transporters and Cytochrome P450s: Unraveling the Molecular Basis of Pyrethroid Resistance in the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 6: DOI: 10.1371/journal.pntd.0001692. DOI 10.1371/journal.pntd.0001692
- Bravo, S. (2003). Sea lice in Chilean salmon farms. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23: 197-200.
- Bravo, S., Nuñez, M. & Silva, M. (2013). Efficacy of the treatments used for the control of *Caligus rogercresseyi* infecting Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, in a new fish farming location in Region XI, Chile. *Journal of Fish Diseases*, 36: 221-228.
- Bravo, S., Sevattal, S. & Horsberg, T.E. (2008). Sensitivity assessment of *Caligus rogercresseyi* to emamectin benzoate in Chile. *Aquaculture*, 282: 7-12. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.011>
- Bravo, S., Treasurer, J., Sepulveda, M. & Lagos, C. (2010). Effectiveness of hydrogen peroxide in the control of *Caligus rogercresseyi* in Chile and implications for sea louse management. *Aquaculture*, 303: 22-27. DOI 10.1016/j.aquaculture.2010.03.007
- Broehan, G., Kroeger, T., Lorenzen, M. & Merzendorfer, H. (2013). Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. *BMC genomics*, 14: 6.
- Bruno, D.W. & Raynard, R.S. (1994). Studies on the use of hydrogen peroxide as a method for the control of sea lice on Atlantic salmon. *Aquaculture International*, 2: 10-18. DOI 10.1007/bf00118529
- Burridge, L., Weis, J.S., Cabello, F., Pizarro, J. & Bostick, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306: 7-23. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.020>
- Calderón-Fernández, G.M., Girotti, J.R. & Juárez, M.P. (2012). Cuticular hydrocarbon pattern as a chemotaxonomy marker to assess intraspecific variability in *Triatoma infestans*, a major vector of Chagas' disease. *Medical and Veterinary Entomology*, 26: 201-209. DOI 10.1111/j.1365-2915.2011.00978.x
- Cárcamo, J.G., Aguilar, M.N., Barrientos, C.A., Carreño, C.F., Quezada, C.A., Bustos, C., Manríquez, R.A., Avendaño-Herrera, R. & Yañez, A.J. (2011a). Effect of emamectin benzoate on transcriptional expression of cytochromes P450 and the multidrug transporters (Pgp and MRP1) in rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) and the sea lice *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, 321: 207-215. DOI 10.1016/j.aquaculture.2011.09.012
- Cárcamo, J.G., Aguilar, M.N., Barrientos, C.A., Carreño, C.F., Quezada, C.A., Bustos, C., Manríquez, R.A., Avendaño-Herrera, R. & Yañez, A.J. (2011b). Effect of emamectin benzoate on transcriptional expression of cytochromes P450 and the multidrug transporters (Pgp and MRP1) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and the sea lice *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, 321: 207-215.
- Carmichael, S.N., Bron, J.E., Taggart, J.B., Ireland, J.H., Bekaert, M.L., Burgess, S.T., Skuce, P.J., Nisbet, A.J., Gharbi, K. & Sturm, A. (2013). Salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) showing varying emamectin benzoate susceptibilities differ in neuronal acetylcholine receptor and GABA-gated chloride channel mRNA expression. *BMC Genomics*, 14: 408.
- Chavez-Mardones, J. & Gallardo-Escárate, C. (2014). Deltamethrin (AlphaMax™) reveals modulation of genes related to oxidative stress in the ectoparasite *Caligus rogercresseyi*: Implications on delousing drug effectiveness. *Aquaculture*, 433: 421-429.
- Chávez-Mardones, J. & Gallardo-Escárate, C. (2015). Next-Generation Transcriptome Profiling of the Salmon Louse *Caligus rogercresseyi* Exposed to Deltamethrin (AlphaMax™): Discovery of Relevant Genes and Sex-Related Differences. *Marine Biotechnology*, 17: 793-810.
- Chávez-Mardones, J., Valenzuela-Muñoz, V. & Gallardo-Escárate, C. (2016). In silico transcriptome analysis of cuticle-related genes associated with delousing drug responses in the sea louse *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, 450: 123-135.
- Chávez-Mardones, J., Asencio, G., Latuz, S. & Gallardo-Escárate, C. (2015). Hydrogen peroxide modulates antioxidant system transcription, evidencing sex-dependent responses in *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture Research*.
- Costello, M.J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in parasitology*, 22: 475-83. DOI 10.1016/j.pt.2006.08.006
- Costello, M.J. (2009). The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of fish diseases*, 32: 115-8. DOI 10.1111/j.1365-2761.2008.01011.x
- Dean, M., Hamon, Y. & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42: 1007-1017.
- Dermauw, W., Osborne, E.J., Clark, R.M., Grbić, M., Tirry, L. & Van Leeuwen, T. (2013). A burst of ABC genes in the genome of the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *BMC genomics*, 14: 317.
- Dermauw, W. & Van Leeuwen, T. (2014). The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem Molec*, 45: 89-110. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.001>
- Fast, M.D. (2014). Fish immune responses to parasitic copepod (namely sea lice) infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 43: 300-312. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.019>
- Ffrench-Constant, R.H., Daborn, P.J. & Goff, G.L. (2004). The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet*, 20.
- Gallardo-Escárate, C., Valenzuela-Muñoz, V. & Núñez-Acuña, G. (2014). RNA-Seq analysis using *de novo* transcriptome assembly as a reference for the salmon louse *Caligus rogercresseyi*. *Plos One*, 9: e92239.
- Grant, A.N. (2002). Medicines for sea lice. *Pest Management Science*, 58: 521-527. DOI 10.1002/ps.481
- Haya, K., Burrige, L.E., Davies, I.M. & Ervik, A. (2005). A Review and Assessment of Environmental Risk of Chemicals Used for the Treatment of Sea Lice Infestations of Cultured Salmon. IN Hargrave, B. (Ed.) *Environmental Effects of Marine Finfish Aquaculture*. Springer Berlin Heidelberg.
- Helgesen, K.O., Bravo, S., Sevatdal, S., Mendoza, J. & Horsberg, T.E. (2014). Deltamethrin resistance in the sea louse *Caligus rogercresseyi* (Boxhall and Bravo) in Chile: bioassay results and usage data for antiparasitic agents with references to Norwegian conditions. *Journal of Fish Diseases*, 37: 877-890. DOI 10.1111/jfd.12223
- Heumann, J., Carmichael, S.N., Bron, J.E. & Sturm, A. (2014). Isolation and characterisation of four partial cDNA sequences encoding multidrug resistance-associated proteins (MRPs) in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837). *Aquaculture*, 424-425: 207-214. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.015>
- Jeong, C.-B., Kim, B.-M., Lee, J.-S. & Rhee, J.-S. (2014). Genome-wide identification of whole ATP-binding cassette (ABC) transporters in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *BMC genomics*, 15: 651.
- Johnson, S.C., Fast, M.D., Wiegertjes, G. & Flik, G. (2004a). Interactions between sea lice and their hosts. *Host– parasite interactions*: 131-159.

- Johnson, S.C., Treasurer, J.W., Bravo, S., Nagasawa, K. & Kabata, Z. (2004b). A Review of the Impact of Parasitic Copepods on Marine Aquaculture. *Zoological Studies* 43: 229 - 243.
- Jones, M., Sommerville, C. & Wootten, R. (1992). Reduced sensitivity of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*, to the organophosphate dichlorvos. *Journal of Fish Diseases*, 15: 197-202.
- Joußena, N., Agnoletb, S., Lorenzc, S., Schönea, S.E., Ellingerb, R., Schneiderb, B. & Heckela, D.G. (2012). Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. *PNAS*, 109.
- Juranka, P.F., Zastawny, R.L. & Ling, V. (1989). P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *The FASEB Journal*, 3: 2583-2592.
- Langford, K.H., Øxnevad, S., Schøyen, M. & Thomas, K.V. (2014). Do Antiparasitic Medicines Used in Aquaculture Pose a Risk to the Norwegian Aquatic Environment? *Environmental Science & Technology*, 48: 7774-7780. DOI 10.1021/es5005329
- Lhorente, J.P., Gallardo, J.A., Villanueva, B., Carabaño, M.J. & Neira, R. (2014). Disease Resistance in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Coinfection of the Intracellular Bacterial Pathogen *Piscirickettsia salmonis* and the Sea Louse *Caligus rogercresseyi*. *PLoS ONE*, 9: e95397. DOI 10.1371/journal.pone.0095397
- Lin, Y., Jin, T., Zeng, L. & Lu, Y. (2012). Cuticular penetration of  $\beta$ -cypermethrin in insecticide-susceptible and resistant strains of *Bactrocera dorsalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103: 189-193. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.002>
- Liu, S., Zhou, S., Tian, L., Guo, E., Luan, Y., Zhang, J. & Li, S. (2011). Genome-wide identification and characterization of ATP-binding cassette transporters in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC genomics*, 12: 491.
- Liu, Y. & Bjelland, H.V. (2014). Estimating costs of sea lice control strategy in Norway. *Preventive veterinary medicine*, 117: 469-477. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.08.018>
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the CT Method. *Methods*, 25.
- Luckenbach, T. & Epel, D. (2008). ABCB-and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294: R1919-R1929.
- Marín, S.L., Martín, R. & Lewis, R. (2015). Effects of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo 2000) chalimus stage condition (dead, moribund, live) on the estimates of Cypermethrin BETAMAX® efficacy. *Aquaculture Research*, 46: 30-36.
- Massey, P., Fojo, T. & Bates, S. (2014). ABC Transporters: Involvement in Multidrug Resistance and Drug Disposition. IN Rudek, M.A., Chau, C.H., Figg, W.D. & Mcleod, H.L. (Eds.) *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Springer New York.
- Milam, C.D., Farris, J.L. & Wilhide, J.D. (2000). Evaluating Mosquito Control Pesticides for Effect on Target and Nontarget Organisms. *Environmental Contamination and Toxicology* 39: 324 - 328.
- Narahashi, T. (2000). Neuroreceptors and Ion Channels as the Basis for Drug Action: Past, Present, and Future. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294.
- Oelckers, K., Vike, S., Duesund, H., Gonzalez, J., Wadsworth, S. & Nylund, A. (2014). *Caligus rogercresseyi* as a potential vector for transmission of Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus in Chile. *Aquaculture*, 420-421: 126-132. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.016>
- Parvez, S. & Raisuddin, S. (2006). Copper modulates non-enzymatic antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to deltamethrin. *Chemosphere*, 62: 1324-1332. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.025>
- Pedrini, N., Mijailovsky, S.J., Girotti, J.R., Stariolo, R., Cardozo, R.M., Gentile, A. & Juárez, M.P. (2009). Control of Pyrethroid-Resistant Chagas Disease Vectors with Entomopathogenic Fungi. *PLoS Negl Trop Dis*, 3: e434. DOI 10.1371/journal.pntd.0000434
- Ray, D.E. & Fry, J.R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & Therapeutics*, 111: 174-193. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.10.003>
- Roth, C.W., Holm, I., Graille, M., Dehoux, P., Rzhetsky, A., Wincker, P., Weissenbach, J. & Brey, P.T. (2003). Identification of the *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter superfamily genes. *Molecules and cells*, 15: 150-158.
- Sag (2014). Registro de productos farmaceuticos de uso veterinario. *Gobierno de Chile, Ministerios de Agricultura, Servicio agricola y Ganadero*

- Shashikumar, S. & Rajini, P. (2010). Cypermethrin-induced alterations in vital physiological parameters and oxidative balance in *Caenorhabditis elegans*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 97: 235-242.
- Simmons, J., D'souza, O., Rheault, M. & Donly, C. (2013). Multidrug resistance protein gene expression in *Trichoplusia ni* caterpillars. *Insect Mol Biol*, 22: 62-71. DOI 10.1111/imb.12003
- Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T. & Weiner, M.L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171: 3 - 59.
- Sogorb, M.A. & Vilanova, E. (2002a). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128.
- Sogorb, M.A. & Vilanova, E. (2002b). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128: 215-228. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00543-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00543-4)
- Sturm, A., Cunningham, P. & Dean, M. (2009). The ABC transporter gene family of *Daphnia pulex*. *BMC Genomics*, 10: 170.
- Szakács, G., Annereau, J.-P., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K.J., Reinhold, W., Guo, Y., Kruh, G.D. & Reimers, M. (2004). Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer cell*, 6: 129-137.
- Torrissen, O., Jones, S., Asche, F., Guttormsen, A., Skilbrei, O.T., Nilsen, F., Horsberg, T.E. & Jackson, D. (2013). Salmon lice – impact on wild salmonids and salmon aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 36: 171-194. DOI 10.1111/jfd.12061
- Tribble, N.D., Burka, J.F. & Kibenge, F.S.B. (2007). Evidence for changes in the transcription levels of two putative P-glycoprotein genes in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) in response to emamectin benzoate exposure. *Mol Biochem Parasit*, 153: 59-65. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.02.002>
- Valenzuela-Muñoz, V., Chavez-Mardones, J. & Gallardo-Escárate, C. (2015a). RNA-seq analysis evidences multiple gene responses in *Caligus rogercresseyi* exposed to the anti-salmon lice drug azamethiphos. *Aquaculture*, 446: 156-166.
- Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G. & Gallardo-Escárate, C. (2014). Molecular characterization and transcription analysis of P-glycoprotein gene from the salmon louse *Caligus rogercresseyi*. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5: doi:10.4172/2155-9546.1000236.
- Valenzuela-Muñoz, V., Sturm, A. & Gallardo-Escárate, C. (2015b). Transcriptomic insights on the ABC transporter gene family in the salmon louse *Caligus rogercresseyi*. *Parasites & vectors*, 8: 1-14.
- Velíšek, J., Jurčíková, J., Dobsíková, R., Svobodová, Z., Piacková, V., Máchová, J. & Novotný, L. (2007). Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 297 - 301.
- Vontas, J., David, J., Nikou, D., Hemingway, J., Christophides, G., Louis, C. & Ranson, H. (2007). Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect molecular biology*, 16: 315-324.
- Wagner, G.N., Fast, M.D. & Johnson, S.C. (2008). Physiology and immunology of *Lepeophtheirus salmonis* infections of salmonids. *Trends in parasitology*, 24: 176-83. DOI 10.1016/j.pt.2007.12.010
- Walsh, T.K., Lyndon, A.R. & Jamieson, D.J. (2007). Identification of cDNAs induced by the organophosphate trichlorphon in the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis* Copepoda; Caligidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88: 26-30.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., Samson-Himmelstjerna, G.V. & Sangster, N.C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol*, 20: 469 - 476.
- Xie, X., Cheng, T., Wang, G., Duan, J., Niu, W. & Xia, Q. (2012). Genome-wide analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family in the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular biology reports*, 39: 7281-7291.
- Yadav, A.S., Singh, P.K. & Shrivastava, V.K. (2010). Pyrethroid resistance in Chagas disease vectors: The case of *Triatoma infestans* cuticle. Review. *Resistant Pest Management Newsletter*, 19: 59 - 61.
- Zouros, E. & Mallet, A.L. (1989). Genetic explanations of the growth /heterozygosity correlation in marine molluscs. IN Ryland, J. & Tyler, P.A. (Eds.) *Reproduction, Genetics and Distributions of Marine Organisms*. Denmark: Olsen & Olsen.

## **Actividad 5. Propuesta diseño para la evaluación de efectividad de antiparasitarios en macrozonas piloto**

### ***Descripción del diseño***

El siguiente diseño plantea una propuesta metodológica para evaluar la efectividad de los fármacos utilizados como antiparasitarios en la industria del salmón en Chile contra *Caligus rogercresseyi*. Los químicos evaluados serán Azametifos, Deltametrina, Cipermetrina y Peróxido de hidrógeno.

La propuesta metodológica se compone de tres niveles para la evaluación de la efectividad de antiparasitarios: (i) utilizando datos de campo, (ii) utilizando bioensayos y (iii) evaluación molecular. Los datos de campo corresponden al porcentaje de efectividad de cada tratamiento que está basado en la abundancia de *Caligus* presente en cada centro de cultivo. Utilizando datos proporcionados por INTESAL de SalmonChile, se identificará aquellas zonas geográficas (ACS y macrozonas) que están relacionadas a los mejores y peores rendimientos de cada químico, lo que permite identificar zonas con potencial presencia de resistencia, o pérdida de sensibilidad de cada tratamiento. Una segunda etapa contempla la realización de bioensayos letales y subletales aplicando cada químico sobre parásitos colectados de cada zona identificada. Con esto se podrá medir diferencias en el efecto de cada fármaco con unidades cuantificables basadas en la estimación de la mortalidad, inhibición del movimiento, o capacidad de adhesión de los parásitos. Finalmente, para aumentar la resolución de la evaluación, se aplicará marcadores moleculares para relacionar los efectos señalados con funciones moleculares que están siendo afectadas por la acción de químicos. Estos marcadores corresponden a genes con sensibilidad comprobada a los químicos, y a marcadores del tipo SNPs (polimorfismos de único nucleótido) en genes con función relacionada a la respuesta a fármacos.

Utilizando esta metodología con distintos niveles se espera obtener una estimación certera que permita evaluar la efectividad de cada uno de los antiparasitarios, pero también la presencia de resistencia/sensibilidad en los parásitos estudiados.

### **Objetivos**

1. Identificar agrupaciones de concesiones (ACS) y macrozonas piloto para evaluación de efectividad de antiparasitarios
2. Evaluar efectos fisiológicos de antiparasitarios mediante bioensayos letales y subletales
3. Evaluar a nivel molecular efecto de antiparasitarios mediante expresión génica y análisis de SNPs

## Metodología

### Objetivo 1. Identificación de macrozonas para evaluación

De acuerdo a los Informes Técnicos de medición de éxito de tratamientos proporcionados por INTESAL, se seleccionará aquellas agrupaciones de concesiones (ACS) que tienen los niveles más altos y bajos de efectividad de antiparasitarios para las sucesivas evaluaciones. Estas ACS se identificarán para los antiparasitarios azametifos, deltametrina, cipermetrina y peróxido de hidrógeno. Para cada tratamiento se identificará la ACS con mayor porcentaje de efectividad y la con el menor. La selección corresponderá a centros de cultivos de salmón del Atlántico y trucha arcoíris, estimando la efectividad de cada tratamiento mediante el cálculo del diferencial entre la abundancia de hembras ovígeras una semana antes del tratamiento y una semana después de su aplicación. Los datos obtenidos se promediarán para cada ACS (considerando ambas especies de peces) para ser georreferenciadas. A modo de ejemplo se presenta un mapa con datos georreferenciados para Azametifos en el periodo que comprende Enero a Agosto del año 2015 (Fig. 8). En concordancia con lo anterior, tomando en consideración los datos de INTESAL entre Enero y Agosto del 2015, las ACS seleccionadas para la evaluación de la efectividad de Azametifos serían 28B (mayor efectividad, cercana al 100%) y 9B (menor efectividad, cercana al 77%). En el caso de cipermetrina las ACS corresponderían a 18C (mayor efectividad, cercana al 90%) y 8 (menor efectividad, menos del 20%). Para deltametrina, las ACS seleccionadas serían la 21D (mayor efectividad, cercana al 100%) y la 20 (menor efectividad, cercana al 5%). Para el caso de peróxido de hidrógeno se debe calcular la efectividad de los tratamientos utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{abundancia pre-tratamiento} - \text{abundancia post-tratamiento})}{\text{abundancia pre-tratamiento}} \times 100$$

Donde la abundancia es calculada en función de la cantidad de hembras ovígeras, y los tiempos pre y post tratamiento corresponden a 7 semanas antes y después de la aplicación del antiparasitario respectivamente. Luego los datos deberán ser geo-referenciados para obtener las macrozonas seleccionadas, las cuales serían (Tabla 2).

Tabla 2. Macrozonas seleccionadas por efectividad de tratamientos para cada antiparasitarios según ACS con mayor y menor éxito.

Antiparasitario	ACS	Macrozona	Número de tratamientos	Efectividad
Azametifos	28 B	7	2	≈ 100%
	9 B	3	7	≈ 77%
Cipermetrina	18C	6	1	≈ 90%
	8	3	1	> 20%
Deltametrina	21 D	6	1	≈ 100%
	20	6	1	≈ 5%

\* En este ejemplo faltan los datos de peróxido de hidrógeno

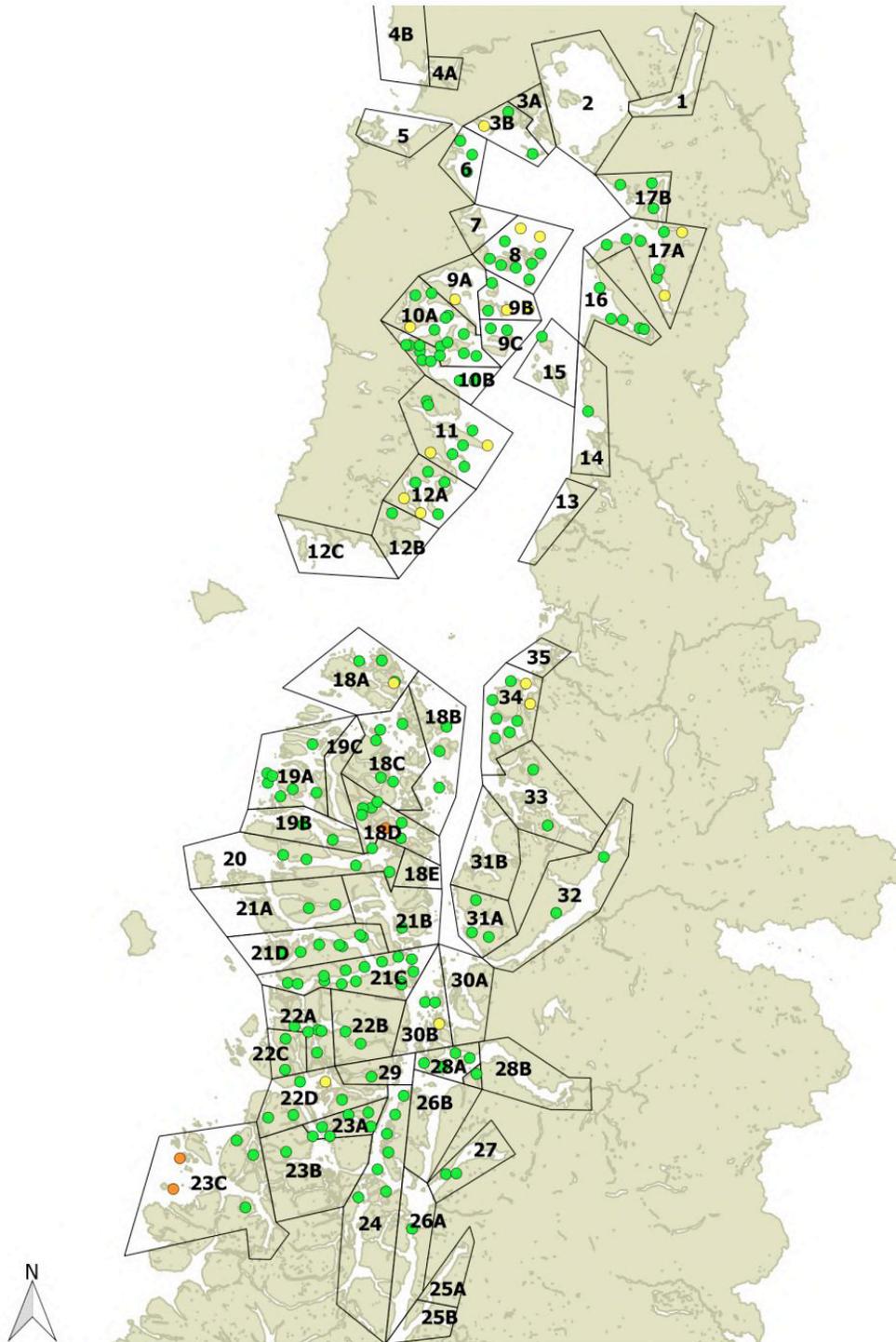


Figura 8. Distribución espacial de los éxitos de tratamiento de baños realizados con Azametifos. (extraído de Informe de Éxito de Tratamientos Antiparasitarios Enero – Agosto 2015, © INTESAL)

Objetivo 2. Evaluación de efectos fisiológicos por bioensayos

a) Bioensayo con concentraciones letales

Se debe coleccionar piojos adultos de cada macrozona seleccionada según la mayor/menor efectividad para cada tratamiento. Los parásitos deben ser transportados inmediatamente a laboratorio (en hielo) donde deben ser mantenidos en agua de mar con flujo constante de aireación a 12° C. Luego, los bioensayos serán realizados de acuerdo al handbook para evaluar resistencia a químicos en piojo de mar (SEARCH Consortium, 2006). Los piojos adultos deben ser colocados en grupos experimentales separados en botellas de bioensayo de vidrio en un litro de agua con aireación constante. Luego se le aplicará una concentración de cada antiparasitario según protocolos establecidos (Tabla 2).

Tabla 3. Concentraciones de cada antiparasitario para bioensayos

Antiparasitario	Concentración	Referencia
Azametifos	0 (control)	(Valenzuela-Muñoz et al., 2015)
	1 ppb	
	3 ppb	
	10 ppb	
	30 ppb	
Cipermetrina	0 (control)	(Sevatdal et al., 2005)
	0,05 ppb	
	0,15 ppb	
	0,5 ppb	
	1,5 ppb	
Deltametrina	0 (control)	(Chávez-Mardones et al., 2015a)
	1 ppb	
	2 ppb	
	3 ppb	
Peróxido de hidrógeno	0 (control)	(Chávez-Mardones et al., 2015b)
	1 ppb	
	1,5 ppb	
	2 ppb	

Los tiempos de exposición al antiparasitario será de 30 min para Azametifos y Deltametrina, 60 min para Cipermetrina y 20 min para Peróxido de hidrógeno.

Después de ser expuestos al respectivo fármaco, los parásitos de cada grupo experimental serán filtrados y dejados en agua de mar a 12°C con salinidad entre 30 – 33 PSU. Después de 24 horas se evaluará la abundancia de *Caligus* en tres estados:

*Muerto*: Organismo que no tiene ningún tipo de movimiento (extremidades, estómago u otros órganos).

*Moribundo*: Organismo que tiene movimiento pero que no es capaz de adherirse a alguna superficie (paredes de la botella, piel de salmón).

*Vivo*: Organismo que tiene cualquier tipo de movimiento y que es capaz de adherirse a superficies.

En el caso del bioensayo de peróxido de hidrógeno el tiempo de evaluación será de 12 horas.

Después de obtenidos los datos de abundancia de piojos en distintos estados se debe calcular los índices  $EC_{50}$  y  $LC_{50}$ . El primero de ellos corresponde al cálculo de la concentración del químico que logra inmovilizar al 50% de parásitos (moribundos + muertos), mientras que el segundo a la concentración de fármaco que logra matar al 50% de organismos. Ambos índices serán georreferenciados según las ACS y macrozonas a las que pertenece el grupo experimental.

#### b) Bioensayo con concentraciones no letales

Como la aplicación de fármacos antiparasitarios en centros de cultivo se realiza en grandes volúmenes de agua de mar, es muy probable que los químicos utilizados se dispersen, distribuyéndose de manera heterogénea, y por ende con parásitos que reciben menores concentraciones de las deseadas para algún compuesto. A su vez como las concentraciones subletales no son capaces de matar a un parásito, puede existir riesgo de generación de resistencia al tratamiento si esta condición de dispersión del fármaco persiste.

Por esta razón, adicionalmente a los bioensayos con concentraciones letales de químicos, se realizarán bioensayos subletales. Estos ensayos corresponde a aquellos en los que se miden efectos que no llevan al organismo a la mortalidad, pero que si generan un efecto cuantificable. En general estos bioensayos están descritos en manuales de toxicología, correspondiendo en la mayoría de los casos a bioensayos no agudos (Little & Maciorowski, 1979). Para los efectos de las evaluaciones de los fármacos descritos, se realizarán ensayos subletales crónicos, ya que sobrepasan la evaluación será superior en duración al 10% de lo que dura el ciclo de vida de la especie. La exposición al químico será repetida (no continua), correspondiendo a dos veces en el ciclo de vida de la especie (cada dos semanas, considerando que el ciclo de la especie es de alrededor de 4 semanas).

Como el ciclo de vida de la especie es corto, se realizarán ensayos crónicos incluyendo re-infestación de individuos en peces (salmón del Atlántico y trucha arcoíris) incluyendo hasta una tercera generación de peces expuestos al fármaco. Para ello se colectará piojos adultos de las mismas macrozonas descritas en el punto anterior para cada antiparasitario, y se expondrán a los químicos. Los organismos serán trasladados al laboratorio y serán mantenidos en agua de mar con aireación constante a 12°C y 30 - 33 PSU de salinidad hasta la realización de los ensayos. Los individuos serán separados en 5 grupos experimentales que serán expuestos a distintas concentraciones de los fármacos (en botellas de vidrio de 1 litro), los cuales corresponderán a diluciones 1:1, 1:5, 1:10 y 1:100 de la concentración menor de los bioensayos letales descritos en el punto anterior (más un grupo control sin fármaco), obteniendo las siguientes concentraciones (Tabla III):

Tabla 4. Concentración de antiparasitarios para bioensayos subletales crónicos

Antiparasitario	Concentración
Azametifos	0 (control)
	1 ppb
	0,2 ppb
	0,1 ppb
	0,01 ppb
Cipermetrina	0 (control)
	0,05 ppb
	0,01 ppb
	0,005 ppb
	0,0005 ppb
Deltametrina	0 (control)
	1 ppb
	0,2 ppb
	0,1 ppb
	0,01 ppb
Peróxido de hidrógeno	0 (control)
	1 ppb
	0,2 ppb
	0,1 ppb
	0,01

Los tiempos de exposición a cada fármaco serán los mismos para los bioensayos con concentraciones letales. Los efectos a medir en cada grupo experimental son: inhibición de movimiento, inhibición del nado, inhibición de la capacidad de adherirse al borde de la botella, inhibición de la capacidad de adherirse a piel de salmón. De cada uno de estos efectos se medirá la CI50 (concentración inhibitoria del efecto en 50% de los organismos), la concentración más alta de efecto no observable (NOEC) y la concentración más baja de efecto observable (LOEC). A la vez se realizará un seguimiento de la mortalidad de los individuos durante todo el ensayo, incluyendo la segunda y tercera generación.

### Objetivo 3. Evaluación de efectos por marcadores moleculares

#### a) Expresión génica de marcadores (bioensayos)

Se medirá la expresión de genes relacionados con distintos procesos biológicos, pero que tengan relación con la resistencia/sensibilidad a antiparasitarios en piojo de mar. Para ello, todas los individuos obtenidos en los bioensayos letales y subletales descritos en el punto anterior serán almacenados en solución de fijación RNA Later (Ambion®, Thermo Fisher Scientific, USA) a -80°C para preservar el RNA para purificación. Las extracciones de RNA serán realizadas utilizando el protocolo del reactivo Trizol® (Thermo Fisher Scientific), separando fases con cloroformo y precipitando el RNA con Isopropanol frío.

Utilizando el RNA purificado como templado, se sintetizara cDNA utilizando el kit Revert Aid H Minus cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific), obteniendo el las copias de ADN que sobre las que se realizarán las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR).

Los análisis de qPCR se realizarán para medir la expresión de los 34 genes descritos en el ítem anterior, los cuales incluyen 15 genes ligados a resistencia en piojo de mar, 12 con función sobre el estrés oxidativo y 9 en la formación de la cutícula en el parásito. Todos ellos con expresión diferencial en respuesta a la exposición a las drogas utilizadas en la salmonicultura nacional. Las reacciones de qPCR se realizarán en termocicladores en tiempo real StepOnePlus™ (Life Technologies®, USA), utilizando un kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) para realizar las amplificaciones en un volumen de reacción de 25 µL, siguiendo las condiciones del fabricante.

Después de las corridas de qPCR, se obtendrá los valores de  $C_T$ , los cuales permiten calcular los valores de expresión mediante el método  $\Delta\Delta C_T$  comparativo. Una vez obtenidos los datos de expresión para cada gen, se evaluará su distribución aplicando un test de Shapiro Wilk. Se identificará si existen diferencias significativas en aquellos genes con distribución normal utilizando un test de ANOVA de una vía, o bien un test de Kruskal Wallis en aquellos genes que muestren un patrón de expresión con distribución no paramétrica de los datos.

#### b) Evaluación de marcadores genómicos (SNPs)

Los marcadores del tipo SNPs permiten identificar diferencias genéticas entre individuos de la misma especie con alta resolución, logrando descubrir la presencia de mutaciones incluso al nivel de poblaciones de la misma especie (Seeb et al., 2011). Para piojo de mar, un estudio reportó un set de datos de miles de este tipo de marcadores en *Caligus rogercresseyi* utilizando datos transcriptómicos obtenidos por secuenciación de alto rendimiento (Núñez-Acuña et al., 2014). En total, en ese estudio se reportó 71.116 SNPs, de los cuáles 30.605 se encontraron en genes anotados correctamente anotados contra bases de datos genómicas conocidas (Fig. 9). La mayoría de polimorfismos correspondió a sustituciones entre T/C, C/T, A/G y G/A, los cuales son los más comunes en diversas especies de animales. Estos polimorfismos entran en la categoría de Clase 1, los cuáles en total correspondieron al 64% del total de variantes encontradas en el transcriptoma de la especie.

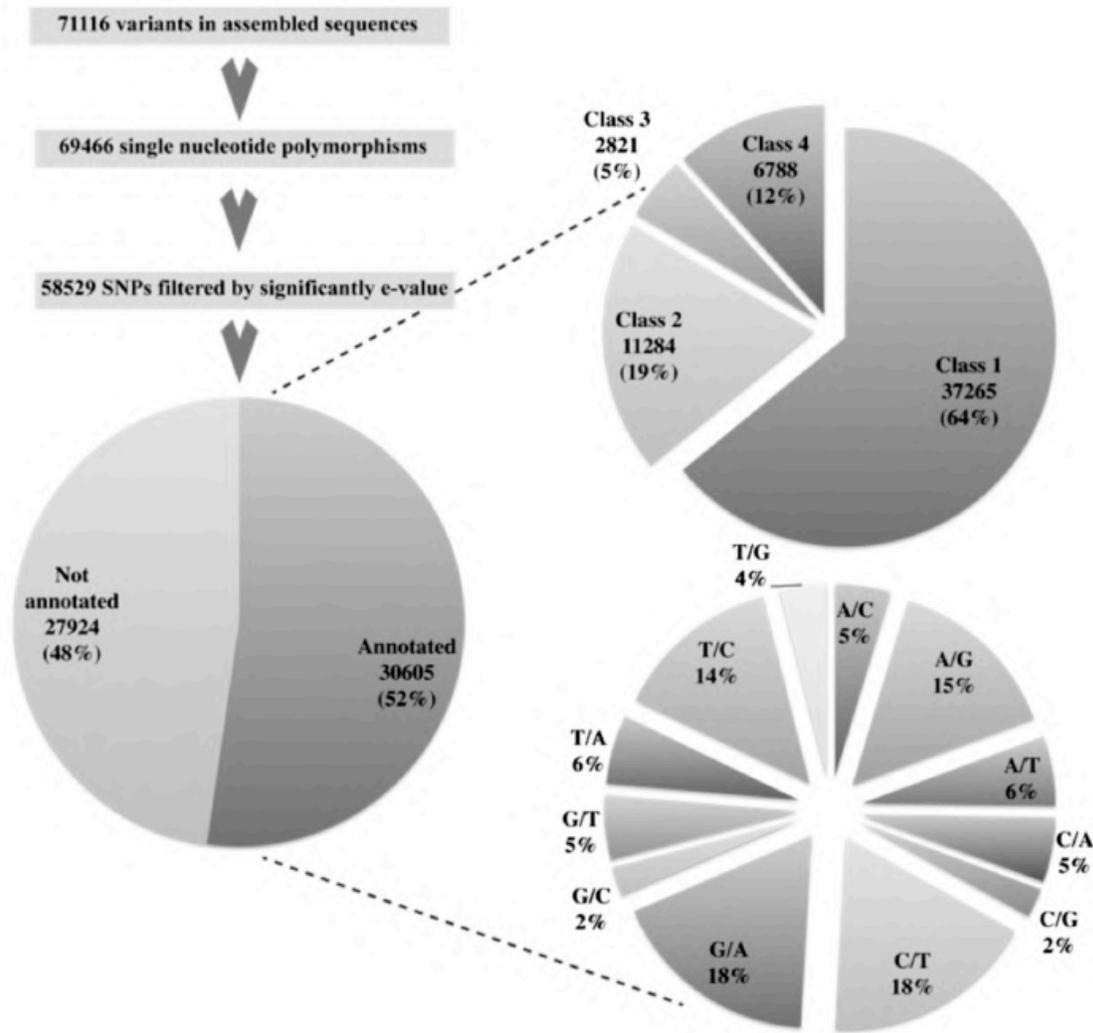


Figura 9. Descripción general de SNPs identificados en el transcriptoma de *Caligus rogercresseyi*. (Extraído de Núñez-Acuña et al., 2014).

De todos los polimorfismos, varios se encontraron en genes involucrados en la transducción de señales químicas en el sistema nervioso de la especie (Fig. 9). Por ende, estos SNPs son buenos candidatos para identificar mutaciones puntuales relacionadas con resistencia/susceptibilidad a los antiparasitarios previamente mencionados. Dentro de estas rutas, se encuentran algunas rutas excitatorias de la señal sináptica y otras represoras, encontrándose genes como canales de iones o receptores neuronales con función en la respuesta a las drogas antiparasitarias.

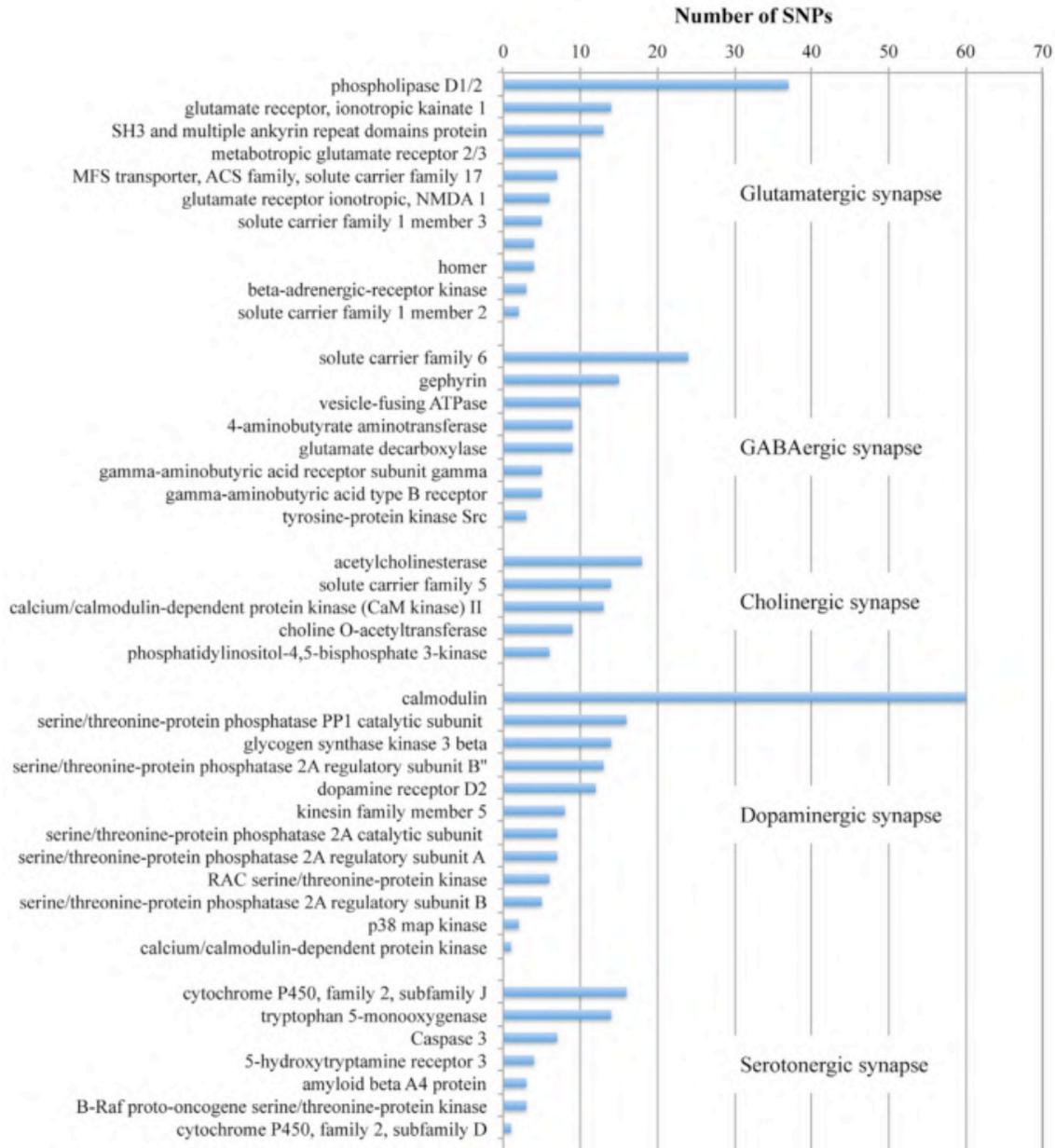


Figura 10. Distribución de SNPs en rutas de genes con función sináptica en *C. rogercresseyi*. (Extraído de Núñez-Acuña., 2014).

Se evaluará la presencia de SNPs relacionados con estas ruta en las macrozonas identificadas en el punto anterior desde ADN de las poblaciones muestreadas. Para ello, se colectará muestras de adultos de *C. rogercresseyi* en cada ACS descrita anteriormente y serán fijadas en etanol absoluto (100%, grado biología molecular), y se almacenarán en -80°C hasta las extracciones de ADN. El método de extracción de ADN será el descrito en el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®, USA), el cual está basado en la purificación mediante la utilización de columnas que retienen el ADN genómico.

El ADN extraído será utilizado como templado para amplificación de PCR que permitirán la genotipificación de estos marcadores mediante el uso de la técnica High-resolution melting (HRM). Esta técnica consiste en la amplificación por PCR en tiempo real de un amplicón y una posterior curva de fusión con alta resolución, la cual permite observar pequeñas diferencias entre la disociación diferentes amplicones con la suficiente resolución para observar pequeños cambios en la temperatura de fusión dada por un polimorfismo del tipo SNP (Smith et al., 2010).

Las amplificaciones de qPCR con HRM serán realizadas en un equipo Eco Real-Time PCR System (Illumina®, USA), utilizando un kit Kapa HRM Fast PCR (Kapa Biosystems, USA). La asignación de cada alelo a cada individuo se realizará utilizando el software Eco Real Time System (Illumina®). Posteriormente, la heterocigocidad esperada y observada se calculará en el software FSTAT (versión 2.9, Bio-soft Net), mientras que el índice de estructuración poblacional  $F_{st}$  será calculado utilizando el software Arlequin versión 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

Adicionalmente, los marcadores SNPs relacionados con resistencia/susceptibilidad a antiparasitarios serán utilizados para evaluar a nivel genómico cepas mantenidas en laboratorio en un cepario construido con animales de distintas localidades para estudiar mecanismos asociados a la resistencia de los parásitos. Para ello se utilizará la misma tecnología aquí descrita en cada una de las generaciones obtenidas de cada cepa, permitiendo así generar un programa asistido por marcadores moleculares para obtener individuos resistentes y sensibles a cada tratamiento.

### Carta Gantt

Objetivo	Actividad	TRIMESTRE											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Identificación de macrozonas	Obtención de datos INTESAL	■	■										
	Cálculo de efectividad de tratamientos		■	■									
	Geo-referenciación			■									
	Muestreo en zonas pilotos			■	■								
Bioensayos	Bioensayos letales				■	■							
	Estimación EC50 y LC50				■								
	Bioensayos no letales				■	■	■	■					
	Estimación CI50, NOEC y LOEC							■	■				
Evaluación por marcadores	Extracción de RNA y síntesis cDNA						■	■	■	■			
	Expresión génica bioensayos (qPCR)								■	■	■		
	Muestreo para extracción DNA			■	■								
	Extracciones DNA genómico					■	■						
	Amplificación HRM					■	■	■	■	■	■	■	■
	Genotipificación					■	■	■	■	■	■	■	■

## Referencias

- Chávez-Mardones, J., & Gallardo-Escárate, C. (2015a). Next-Generation Transcriptome Profiling of the Salmon Louse *Caligus rogercresseyi* Exposed to Deltamethrin (AlphaMax™): Discovery of Relevant Genes and Sex-Related Differences. *Marine Biotechnology*, *17*(6), 793-810.
- Chávez-Mardones, J., Asencio, G., Latuz, S., & Gallardo-Escárate, C. (2015b). Hydrogen peroxide modulates antioxidant system transcription, evidencing sex-dependent responses in *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture Research*.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, *10*(3), 564-567.
- Little, L. W., & Maciorowski, A. F. (1979). Bioassays: Procedures and Results. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 1573-1592.
- Núñez-Acuña, G., Valenzuela-Muñoz, V., & Gallardo-Escárate, C. (2014). High-throughput SNP discovery and transcriptome expression profiles from the salmon louse *Caligus rogercresseyi* (Copepoda: Caligidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, *10*, 9-21.
- SEARCH Consortium. (2006). Sea lice resistance to chemotherapeutants: A handbook in resistance management.
- Seeb, J. E., Carvalho, G., Hauser, L., Naish, K., Roberts, S., & Seeb, L. W. (2011). Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Molecular Ecology Resources*, *11*(s1), 1-8.
- Sevatdal, S., Copley, L., Wallace, C., Jackson, D., & Horsberg, T. E. (2005). Monitoring of the sensitivity of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) to pyrethroids in Norway, Ireland and Scotland using bioassays and probit modelling. *Aquaculture*, *244*(1), 19-27.
- Smith, B. L., LU, C. P., & Alvarado Bremer, J. R. (2010). High-resolution melting analysis (HRMA): a highly sensitive inexpensive genotyping alternative for population studies. *Molecular Ecology Resources*, *10*(1), 193-196.
- Valenzuela-Muñoz, V., Chavez-Mardones, J., & Gallardo-Escárate, C. (2015). RNA-seq analysis evidences multiple gene responses in *Caligus rogercresseyi* exposed to the anti-salmon lice drug azamethiphos. *Aquaculture*, *446*, 156-166.

### **3. Propuesta de conformación de cepario y banco genético de calígidos con prevalencia en Chile**

#### ***Resumen***

La comprensión global del efecto de los factores asociados a resistencia farmacológica en *Caligus rogercresseyi* requiere un entendimiento integral de la especie para garantizar el eficiente conocimiento de cepas genéticamente resistentes/susceptibles a fármacos usados comúnmente en la industria. Para esto la creación de un cepario es altamente necesario, sin embargo, el proceso de cría y mantenimiento de las diferentes cepas es un elemento clave y poco conocidos en Caligus. La reproducción en laboratorio es un proceso complejo influenciado por una serie de factores como señales olfativas, estímulos visuales, interacciones con el hospedador, ciclo de luz, etc. Diferentes estrategias de reproducción en base a solo un par apareamientos o cruces de grupo, son estrategias que pueden ser empleadas en el laboratorio para propagar líneas e identificar portadores de mutaciones y/o transgenes específicos de cepas resistentes/susceptibles. La propagación de líneas de *C. Rogercresseyi*, en particular las cepas derivadas de la de tipo salvaje, debe de ser seguido de cerca para asegurarse de que la diversidad genética y vigor de la especie sean mantenidos. Sin embargo, las cepas escogidas deben de llevar un número determinado y conocido de variaciones polimórficas específicas (SNP) que deben de certificar el tipo de cepa seleccionada (susceptible/resistente). En conjunto, los bancos genéticos consisten en bio-repositorios que permiten la preservación segura y por largos períodos de tiempo de material genético valioso. En el contexto de la problemática de la caligidosis en Chile, el presente proyecto busca también incorporar la utilización de bancos genéticos para la preservación de DNA de copépodos calígidos, provenientes de las diferentes macrozonas previamente seleccionadas, de manera de almacenar distintos individuos susceptibles/resistentes a fármacos comúnmente usados. El uso de muestras preservadas permitirá contar con material biológico de referencia para evaluar fluctuaciones espaciales y temporales del fenómeno de resistencia/susceptibilidad, así como para su uso en futuros estudios moleculares en temáticas de estructura genética dinámica de poblaciones, epidemiología molecular. La integración de ambas estrategias permitirá disponer de material de referencia para la normalización de los resultados facilitando la replicación e

interpretación, mejorando la toma de decisión en las políticas pertinentes al uso indiscriminado de fármacos a nivel productivo

### **Fundamento**

Los métodos actuales de control de la caligidosis se basan principalmente en el uso de químicos antiparasitarios. Estos fármacos pueden ser administrados a los peces de forma oral a través de la dieta, mediante baños o por vía parenteral. En Chile hasta el 2007 se utilizó principalmente benzoato de emamectina (EMB), luego en el 2007 se incorporó el uso deltametrina y durante 2013 se autorizó el uso de azametifos. Tratamientos basados en estos fármacos han mostrado ser efectivos para el control de *Caligus* en Chile, sin embargo, se ha observado en los últimos años una disminución creciente en su efectividad, atribuida al desarrollo de resistencia por parte de los parásitos. La detección temprana de cambios en la sensibilidad del piojo de mar hacia ciertos fármacos constituye un componente clave dentro de planes exitosos de manejo de resistencia de parásitos. De esta forma, el uso de herramientas moleculares ha permitido el desarrollo de nuevas aproximaciones para evaluar la sensibilidad de parásitos frente a fármacos. En el caso de *Lepeophtheirus salmonis*, el análisis de genes relacionados con procesos de detoxificación en individuos expuestos a drogas antiparasitarias ha permitido obtener un panel de secuencias con expresión diferencial [1], susceptibles de ser utilizadas en la búsqueda de marcadores de la respuesta del parásito al tratamiento con el fármaco. Dentro de las tareas asignadas para la propuesta laboratorio de referencia para *Caligus* denominado “Diagnostico y propuesta de evaluación de factores epidemiológicos y resistencia farmacológica en *Caligus rogercresseyi*” el laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola (LBGA) perteneciente al Centro FONDAP-INCAR ha concentrado sus esfuerzos en generar información genómica relevante para este parásito, lo que ha hecho posible contar tanto con el genoma de *C. rogercresseyi* en diferentes estados de desarrollo (nauplius I, nauplius II, copepodito y chalimus) para machos y hembras adultos, utilizando una tecnología de secuenciación masiva [1-7]. Así como también un largo panel de genes (ANEXO I) y variantes polimórficas de nucleótidos únicos (SNPs) relación con la susceptibilidad/resistencia a fármacos antiparasitarios en *Caligus* [8-13]. Lo que permite contar con un largo panel de marcadores de sensibilidad del parásito frente a los tratamientos farmacológicos. Una vez

implementada la tecnología de cultivo cerrado para *C. rogercresseyi*, la cuantificación de transcritos en genes asociados a respuesta a fármacos y el análisis genético de los batches mediante marcadores SNPs, posibilitará la caracterización de líneas de laboratorio estandarizadas presentando susceptibilidad/resistencia frente a los tratamientos con drogas antiparasitarias. El uso de estas líneas estandarizadas con un background genético conocido, permitirá SERNAPESACA en conjunto con el laboratorio de referencia de *C. rogercresseyi* disponer de material de referencia para la normalización de los resultados obtenidos mediante bioensayos, los que además podrán ser contrastados con análisis de expresión de genes ligados a respuesta a fármacos, facilitando la replicación e interpretación de resultados en ensayos de laboratorio, mejorando la toma de decisión en las políticas pertinentes al uso de fármacos a nivel productivo. Por otra parte, estas cepas estables (resistentes/susceptibles) permitirán en el futuro la evaluación de nuevos fármacos que pudiesen ser desarrollados para el control de la caligidosis.

En conjunto a la creación de un cepario es altamente relevante el establecimiento de un banco genético para las diferentes muestras de *C. rogercresseyi* recogidas de las diferentes macrozonas. Los bancos genéticos son bio-repositorios que permiten la preservación segura y por largos períodos de tiempo de material genético valioso. El objetivo de este tipo de colecciones es la conservación de la información contenida en el material genético de poblaciones que podrían no existir en el futuro. En animales, su utilización se ha centrado en la mantención de muestras de esperma, ovas, embriones y muestras de tejidos provenientes de especies en riesgo de conservación por reducción de su hábitat o sobreexplotación. Junto a lo anterior, se han realizado esfuerzos para la conservación de material biológico proveniente de especies o razas de alto valor comercial, por ejemplo, aquellas provenientes de programas de selección asistida por marcadores moleculares (de la sigla en Inglés MAS), con líneas de individuos seleccionados para rasgos genéticos de interés tales como resistencia o susceptibilidad a enfermedades, entre otros. Las muestras biológicas son generalmente congeladas en nitrógeno líquido a  $-193^{\circ}\text{C}$  o en ultrafreezers a  $-80^{\circ}\text{C}$  donde pueden ser mantenidas indefinidamente o por largos períodos de tiempo [14,15]. Recientemente, la incorporación de bancos genéticos se ha extendido a otras áreas de aplicación, en particular en el ámbito de los parásitos de peces. Es así como la

utilización de bio-repositorios de parásitos en conjunto con marcadores moleculares especie-específicos se encuentra actualmente en uso como herramienta en la identificación y discriminación de stocks de peces [16]. De esta forma, el presente proyecto busca incorporar la utilización de bancos genéticos para la preservación de DNA de copépodos calígidos, provenientes de las diferentes macrozonas (ANEXO II), mostrando distintas susceptibilidades a fármacos antiparasitarios. El uso de muestras preservadas permitirá contar con material biológico de referencia para evaluar fluctuaciones espaciales y temporales del fenómeno de resistencia/susceptibilidad a fármacos, así como para su uso en futuros estudios moleculares en temáticas de estructura genética dinámica de poblaciones, epidemiología molecular, entre otros. De similar forma permitirá al tándem SERNAPESACA-laboratorio de referencia definir las políticas en el uso de fármacos de manera espacial y la consecuente disminución de estos al establecer un sistema de información geográfica (SIG), de modo de determinar como estas temporalmente van siendo afectadas por los fármacos ( $\pm$  susceptibles/resistentes). Esta estrategia permitirá la monitorización y colección de datos a lo largo tiempo, de modo de establecer a un potencial modelo emperico del efecto de los fármacos sobre la susceptibilidad/resistencia en las zonas estudiadas. En comparación con muestreo puntuales, los especímenes almacenados en el banco genético permitirán la realización de análisis retrospectivos de la evolución de los procesos de resistencia/susceptibilidad en las diferentes zonas geográficas.

## **Objetivo general**

1. Generar líneas de *C. rogercresseyi* certificadas a nivel genético y caracterizadas en base a susceptibilidad/resistencia a fármacos antiparasitarios, para su uso como material de referencia en ensayos de laboratorio y toma de decisión.
2. Generar banco genético temporal y espacial de *C. rogercresseyi* de individuos resistentes/susceptibles.

## **Objetivos específicos**

1. Adaptar y perfeccionar las tecnologías de cultivo existentes para el cultivo de *C. rogercresseyi* en ciclo cerrado.
2. Establecer y certificar líneas de *C. rogercresseyi* caracterizadas a nivel genético y de respuesta a fármacos conocida.
3. Generar y actualizar banco genético de *C. rogercresseyi*
4. Desarrollar y validar un modelo empírico en base a susceptibilidad/resistencia a fármacos antiparasitarios (transcriptómica/polimorficos) con los cambios ambientales, productivos y estacionales durante eventos claves en la producción de peces. El objetivo es interpretar a través de un sistema de información geográfica (SIG) la variación susceptibilidad/resistencia a fármacos en las diferentes zonas y como estas varían en el tiempo.

### ***Resultados esperados***

El proyecto busca una aproximación cuantitativa basada análisis de expresión de genes y componente genéticos conocidos para la generación y mantención de líneas resistentes y susceptibles ligados a respuesta a fármacos de *C. rogercresseyi*. El proyecto además contempla el uso de las líneas susceptibles/resistentes como normalizador de bioensayos de respuesta a fármacos realizados en la industria y de gestión pública del uso de fármacos. Además, la industria salmonera contará con líneas de *Caligus* que permitan comparar los resultados obtenidos mediante bioensayo de las muestras de cada uno de los centros de cultivo con análisis de expresión génica. Así también, estas líneas de laboratorio permitirán la evaluación de nuevos fármacos para la industria. Para esto es altamente relevante establecer el mecanismo genético de respuesta a fármacos desarrollado por *Caligus* usando análisis de expresión de genes con características detoxificantes, para la comprensión del fenómeno de resistencia/susceptibilidad y sus implicancias en el monitoreo y manejo integrado de la caligidosis. Para otros invertebrados se han identificado mutaciones SNP que permiten identificar líneas resistentes/susceptibles a fármacos. Actualmente, no se cuenta con un panel de SNPs que permita relacionar este tipo de respuesta para *C. rogercresseyi*. Debido a esto, el presente proyecto plantea la búsqueda y validación de este tipo de marcadores para establecer líneas resistentes/susceptibles estables y complementar distintos monitoreos realizados en la industria para el control del parásito.

### ***Desafíos***

Aun no se cuenta con la tecnología de cultivo para la mantención de varias generaciones de *C. rogercresseyi* en ciclo cerrado con distinta sensibilidad a los fármacos y genéticamente caracterizadas. Los procedimientos necesarios para lograr la generación de las líneas estables de *C. rogercresseyi* exhibiendo susceptibilidad/resistencia a fármacos antiparasitarios son: la adaptación y perfeccionamiento de la tecnología de cultivo cerrado, para la producción estable de individuos con constitución genética uniformes, la identificación y validación de un panel de genes vinculados a procesos de detoxificación y el desarrollo de un panel de marcadores SNPs en estos genes. El panel de genes y sus SNPs serán utilizados para caracterizar las líneas fundadoras (F<sub>0</sub>) exhibiendo ya sea “sensibilidad” a los fármacos antiparasitarios, “insensibilidad o baja sensibilidad” a estos,

así como “líneas salvajes” (provenientes de localidades geográficas sin/con exposición previa a fármacos antiparasitarios MACROZONAS). El desafío para la generación de bancos genéticos para la preservación de DNA, provenientes de las diferentes lugares, radica en el acceso diferentes zonas, condiciones climáticas, implementación de laboratorio móvil (preservación y traslado de muestras).

### *Metodología*

**Generar líneas de *C. rogercresseyi* certificadas a nivel genético y caracterizadas en base a susceptibilidad/resistencia a fármacos antiparasitarios, para su uso como material de referencia en ensayos de laboratorio para la industria del salmón.**

#### *Adaptación y evaluación de infraestructura*

La infraestructura desarrollada para el establecimiento de líneas de *C. rogercresseyi* se basará en lo descrito previamente para la especie *L. salmonis* [5]. Así, se implementaran y evaluará el rendimiento de distintos formatos de recipientes de eclosión, y tanques para peces hospederos. Para estadios de desarrollo planctónico, 3 diseños de recipientes de incubación de diferente cantidad inicial de hebras de huevos (1, 25 y 50 pares de hebras/estanque) serán evaluados para el cultivo de copepoditos en volúmenes de 80, 1000 y 2000 ml a fin de mantener constante la densidad de hebras por ml de agua. Cada recipiente será suministrado con un flujo continuo del 10% del volumen total por minuto de agua de mar filtrada, a temperatura de 10°C y a una salinidad de 28‰. El rendimiento de cada formato será evaluado mediante la relación entre el promedio de copepoditos obtenidos por hebra de huevo incubada. Como la densidad de cultivo ha sido descrita como un factor determinante en la propagación y crecimiento de *C. rogercresseyi* [17], diferentes densidades de peces para el cultivo de estadios parásitos serán evaluadas. De este modo se dispondrán de tanques circulares de 500 l de una densidad variable. En ellos se mantendrán *S. salar* de un rango entre 500 y 1000 g en un sistema de recirculación con monitoreo y control de parámetros fisicoquímicos, alimentados con dietas comerciales y con un fotoperiodo de 12/12 h día/noche.

#### *Obtención y eclosión de larvas*

Salmones atlánticos (*Salmo salar*) infectados con *C. rogercresseyi* provenientes de las distintas poblaciones caracterizadas previamente por INTESAL, serán transportados bajo condiciones controladas de temperatura y oxígeno disuelto (OD) desde los respectivos centros de cultivo a las dependencias del Estación de Biología Marina del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción (Dichato, Concepción). Posteriormente, los individuos infectados serán mantenidos en estanques de 500 lts y anestesiados con benzocaína para la colección de parásitos. Luego, desde hembras parasitas grávidas se obtendrán las hebras de huevos (“egg strings”) que se incubaran en los tanques de eclosión hasta que el mayor porcentaje de individuos eclosionados alcance la etapa de copepodito.

#### *Mantenimiento de etapas parasíticas*

Una vez obtenidos los copepoditos, se procederá a determinar la capacidad de infección efectiva de los parásitos, considerando que porcentaje del total agregado a cada estanque es efectivamente capaz de adherirse al pez. Una vez obtenido este valor se estimara el numero total de copépodos que deban agregarse a cada uno de los estanques con diferentes densidades. El proceso infectivo se llevara a cabo mediante la detención del flujo de agua y la reducción del nivel de agua entre 2-5 veces la altura del pez durante un periodo de tiempo de 1 hora, transcurrido el tiempo se corroborará la infección. El estado de infección será analizado para los distintos tanques con diferentes densidades y se estimara la densidad optima a la cual se obtenga la mayor supervivencia e infestación de *C. rogercresseyi*. Una vez que los piojos alcancen los estados de desarrollo adultos, las hembras grávidas serán colectadas y las hebras de huevos fecundadas serán utilizadas para la conformación de la siguiente generación. Un esquema con las fases de producción en ciclo cerrado se presenta en la Figura 11.

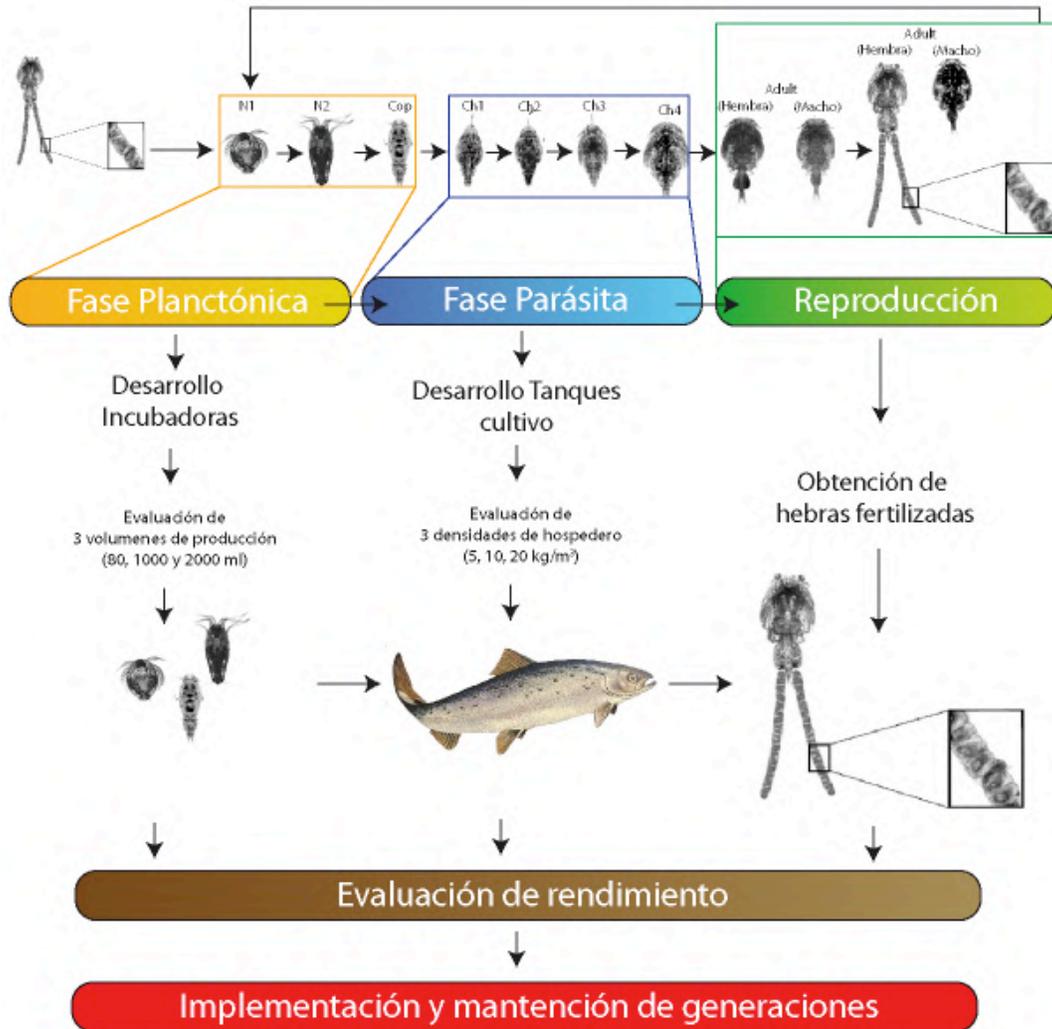


Figura 11. Fases de producción en ciclo cerrado de *C. rogercresseyi*.

*Identificar y validar genes de respuesta a fármacos en variedades de C. rogercresseyi asociadas a susceptibilidad/resistencia.*

Brevemente, a partir de los genes previamente identificados como genes con respuesta a fármacos, se diseñarán partidores específicos sustentables para ser utilizados en PCR cuantitativa (qPCR). Adicionalmente, se realizará diferentes análisis estadísticos de agrupación como análisis de componentes principales (PCA) para evaluar las causas de las diferencias significativas encontradas en las muestras, analizando las covarianzas de cada transcrito (variable dependiente) y los diferentes centros de origen de cada muestra como variable independiente. Con esto será posible agrupar genes que presenten un patrón de

expresión similar entre las distintas respuestas a los fármacos, sugiriendo según de esta forma si son marcadores de resistencia o susceptibilidad frente a los diferentes fármacos *C. rogercresseyi*.

*Caracterizar genéticamente (mutaciones SNPs) variedades de C. rogercresseyi asociadas a susceptibilidad/resistencia a fármacos.*

A partir de los genes con función detoxificante o asociados a respuesta a fármacos, identificados, se realizará una búsqueda de variaciones tipo SNPs utilizando los datos del transcriptoma de individuos en estado adulto de *Caligus rogercresseyi* expuestos a los fármacos. Estos SNPs, así como otros SNPs identificados en *C. rogercresseyi* en investigaciones previas [18-20] serán evaluados en individuos adultos distintas poblaciones de *Caligus* que han demostrado respuesta diferencial a los tratamientos con fármacos. Una vez identificadas las variaciones SNPs se diseñaran partidores específicos que flanqueen los SNPs utilizando el software Genenious 6.0. Desde muestras de ADN de *Caligus* de distintas poblaciones (muestras individuales) se realizará la amplificación de los SNPs, el producto de estas amplificaciones serán utilizados para la generación de librerías Nextera (Illumina) la que permite identificar hasta 96 individuos con distintos índices, lo que permitirá asociar cada variación SNPs a una población específica. Una vez generadas las librerías serán secuenciadas en la plataforma de secuenciación MiSeq (Illumina). Los datos obtenidos serán evaluados para generar la genotipificación de cada población y asociar la variación SNPs a cepas susceptibles o resistentes de *Caligus*.

*Caracterizar morfométricamente (análisis de imágenes) variedades de C. rogercresseyi asociadas a susceptibilidad/resistencia a fármacos.*

Las mediciones morfométricas de individuos y huevos de *C. rogercresseyi* serán realizadas utilizando el programa de análisis de imágenes ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>), de acuerdo a la metodología descrita por [5]. Se tomarán imágenes de los individuos completos usando una cámara digital con lente macro en condiciones estandarizadas de iluminación y posicionamiento. Para la medición del tamaño/volumen de los huevos, hembras ovígeras serán fotografiadas bajo la lupa estereoscópica, consignándose la relación de tamaño entre el segmento genital/ovocitos en desarrollo. Adicionalmente se medirá el

tamaño de los embriones en diferentes estadios de desarrollo temprano (días post fertilización) en individuos colectados desde los sistemas de incubación. Los datos de morfometría e infección serán analizados usando Prism 6.0 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) y Statistica 8.0 (<http://www.statsoft.com>), realizándose las comparaciones entre líneas de laboratorio por medio de ANOVA de una vía y test de Tukey, así como por medio de análisis multivariados MANOVA y tests multivariados (Pillai's Trace, Wilks' Lambda, Hotelling's Trace y Roy's Largest Root), previa evaluación de la normalidad de los datos.

*Establecer y certificar líneas de *C. rogercresseyi* caracterizadas a nivel genético y de respuesta a fármacos conocida*

Se generarán líneas de laboratorio a partir de poblaciones de Caligus que han demostrado respuesta diferencial a los tratamientos con fármacos utilizados en la salmonicultura chilena, muestreadas desde las diferentes macrozonas. Estas líneas serán caracterizadas genéticamente de acuerdo a las metodologías establecidas previamente. Se contará al menos con tres categorías basadas en la sensibilidad a los diferentes farmacos (niveles de expresión de genes involucrados en procesos de detoxificación y caracterización de sus marcadores SNPs identificados: *sensibles, insensibles o de baja sensibilidad y salvajes* (provenientes de las diferentes macrozonas). Con la finalidad de establecer líneas de laboratorio con backgrounds genéticos uniformes, grupos iniciales de individuos provenientes de cada una de estas categorías serán utilizados para producir sucesivas líneas endogámicas mediante cruzamientos entre familias directas (infección en un mismo tanque durante etapa parasítica del cultivo) y posterior recolección de hembras grávidas, eclosión y cultivo de estadios planctónicos (Figura 12). A modo de compensar por potencial depresión endogámica, las infecciones iniciales durante las primeras 5 o 6 generaciones se realizarán con un alto número de copepoditos por huésped/tanque, siendo este número reducido en infecciones posteriores, según lo descrito por Hamre et al. [5].

*Validación de cepas susceptibles/resistentes*

Con la finalidad de validar la susceptibilidad/resistencia a fármacos antiparasitarios en las líneas establecidas, transcurridas varias generaciones de cultivo cerrado (>8) al final del segundo año de proyecto, se realizarán bioensayos de acuerdo a lo descrito por el consorcio

SEARCH [21]. En esta etapa se realizará además un nuevo screening molecular de las líneas utilizando los marcadores SNPs desarrollados previamente.



Figura 12. Funcionamiento cepario para la producción de líneas certificadas de *C. rogercresseyi*

### *Generación de banco genético temporal y espacial de C. rogercresseyi*

#### Obtención y almacenamiento de las muestras

Las muestras de copépodos calígidos y su metadata asociada (incluyendo información de: especie, localización geográfica del lugar de muestreo, fecha de muestreo, ACS, Macrozona, especie hospedadora, estado de desarrollo ontogenético, sexo) serán obtenidas desde los centros de cultivo y desde el ambiente natural, de acuerdo a lo señalado en el programa de monitoreo de resistencia a fármacos antiparasitarios. Una vez colectados los pools de especímenes, estos serán introducidos en criotubos de 2-5 ml con códigos de barra

2D (Figura 13), siendo inmediatamente sumergidos en contenedores con nitrógeno líquido para su transporte al cepario, en las dependencias del laboratorio de referencia LBGA- INCAR. Una vez en el laboratorio, los tubos serán almacenados en ultrafreezers a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los registros y la metadata asociada a cada criotubo (incluyendo su ubicación física dentro de los ultrafreezers) serán gestionados a través de una interfase computacional LIMS (Laboratory Information Management System), con la posibilidad de realizar búsquedas avanzadas y con consulta remota a través de internet. El banco genético de copépodos parásitos mantendrá una colección de muestras y su data asociada durante la duración del proyecto, permitiendo una completa trazabilidad de cada muestra. El sistema de almacenamiento se encontrará asociado a la lectura mediante un scanner y decodificación mediante software, con la finalidad de identificar muestras específicas y exportar la información asociada a otras bases de datos. Todos los sistemas de ultracongelación incluirán backups y sistemas de alarma de seguridad. En comparación con muestreo puntuales, los especímenes almacenados en el banco genético permitirán la realización de análisis retrospectivos de la evolución de los procesos de resistencia/susceptibilidad en las diferentes zonas geográficas.

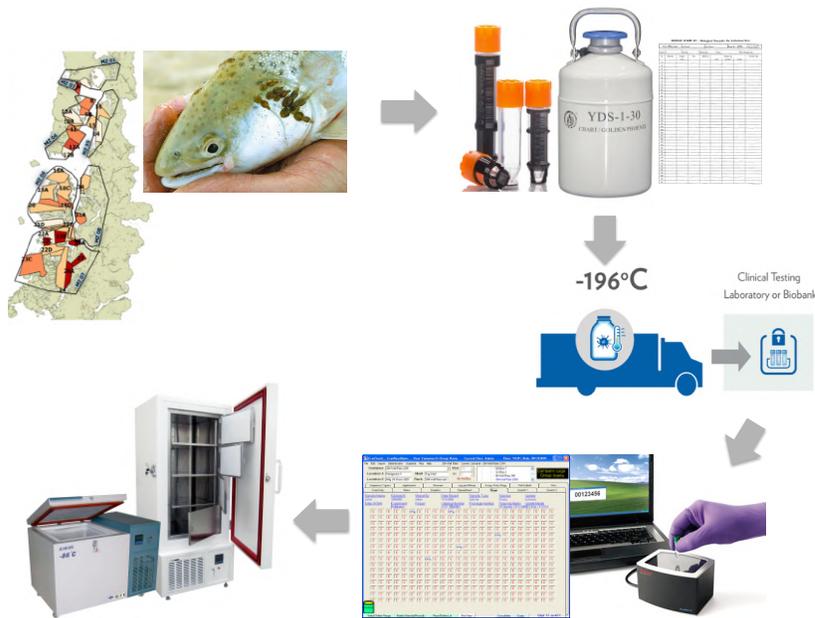


Figura 13. Criotubos con códigos de barra lineales y 2D incorporados, para la gestión de la metadata asociada a las muestras a ser almacenadas en bancos genéticos.

## **Resultados esperados**

### *Recolección de variedades (“cepas”) de Caligus con distinta sensibilidad a fármacos*

Para poder establecer líneas resistentes y susceptibles a fármacos, se hará una recolección desde distintos centros de cultivos de salmón que hayan mostrado diferencias en la respuesta a los tratamientos.

### *Identificación y validación de genes de resistencia*

*Determinación panel de genes que respondan de manera diferencial a los fármacos utilizados en la industria y validar su expresión en variedades que hayan demostrado resistencia y susceptibilidad.*

### *Identificación y validación de SNPs*

Caracterización de líneas estables de *Caligus* (resistentes/susceptibles) a través de la identificación de SNPs relacionados con ambos genotipos. Se obtendrá un panel de al menos 30 SNPs que permitan diferenciar entre poblaciones de *Caligus* resistentes y susceptibles.

### *Establecimiento de un protocolo de evaluación genética de la respuesta de Caligus a los fármacos.*

Se establecerá un protocolo que permita corroborar los resultados obtenidos mediante bioensayos (procedimiento estándar en la industria salmonera) con un análisis cuantitativo basado en la expresión de genes asociados a respuesta a fármacos y cualitativa mediante la determinación de mutaciones tipo SNPs.

### *Establecimiento de un sistema de mantención de líneas genéticamente caracterizadas de Caligus.*

Validación los resultados obtenidos por bioensayo en la industria, se mantendrán líneas estables de *Caligus* que presenten resistencia y susceptibilidad a los fármacos que permitan comparar los resultados de los bioensayos. El mantener estas líneas a su vez, permitirá evaluar nuevos fármacos que puedan ser desarrollados para el control de *Caligus*.

### *Establecimiento de banco genético*

Almacenamiento constante de *Caligus* recolectados de las diferentes macrozonas, para su ingreso en el banco genético y posterior ingreso al sistema integrado de información geográfica (SIG).

### *Creación modelo empírico en base a susceptibilidad/resistencia a fármacos antiparasitarios*

Interpretar a través de un sistema de información geográfica (SIG) la variación susceptibilidad/resistencia a fármacos en las diferentes zonas y como estas varían en el tiempo. Del mismo modo es altamente relevante validar y cuantificar las variaciones de susceptibilidad/resistencia a través del tiempo y contrastar la información con la obtenida de nuestras cepas susceptibles/resistentes con las muestras obtenidas de las diferentes macro-zonas

## CARTA GANTT

### Cronograma de actividades, tiempo, entregas (⌘) e hitos (▼)

Tareas	AÑO 1				AÑO 2				AÑO 3			
	3 m	6m	9m	12m	15m	18m	21m	24m	27m	30m	33m	36m
Coordinación												
Adquisición de materiales e equipamiento												
Obj a) Cepario <i>C. rogercresseyi</i>												
a.1. Adaptación y evaluación de infraestructura												
a.2. Obtención y eclosión de larvas				▼								
a.3. Mantenimiento de cepas/etapas parasíticas												
a.4. Identificar y validar genes	⌘											
a.5. Caracterizar genéticamente (mutaciones SNPs)				▼	⌘							
a.6. Caracterizar morfológicamente (análisis de imágenes)				▼	⌘							

a.7. Establecer y certificar líneas de <i>C. rogercresseyi</i>						▼	⌘					
a.8. Validación de cepas susceptibles/resistentes						▼	⌘			▼	⌘	
Obj b) Generar banco genético												
b.1. Obtención y almacenamiento de las muestras												
b.2. Creación modelo empírico en base a susceptibilidad/resistencia									▼	⌘		
Diseminación y comunicación												
Workshop 1										⌘		
Reportes disponibles y discusión en sitio web				⌘				⌘				⌘

## REFERENCIAS

- Glover KA, Aasmundstad T, Nilsen F, Storset A, Skaala O (2005) Variation of Atlantic salmon families (*Salmo salar* L.) in susceptibility to the sea lice *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus*. *Aquaculture* 245: 19-30.
- Gonzalez L, Carvajal J (2003) Life cycle of *Caligus rogercresseyi* (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture* 220: 101-117.
- Bravo S, Erranz F, Lagos C (2009) A comparison of sea lice, *Caligus rogercresseyi*, fecundity in four areas in southern Chile. *Journal of Fish Diseases* 32: 107-113.
- Bravo S (2010) The reproductive output of sea lice *Caligus rogercresseyi* under controlled conditions. *Experimental Parasitology* 125: 51-54.
- Hamre LA, Glover KA, Nilsen F (2009) Establishment and characterisation of salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer 1837)) laboratory strains. *Parasitology International* 58: 451-460.
- Trager W, Jensen JB (1997) Continuous culture of *Plasmodium falciparum*: its impact on malaria research. *International journal for parasitology* 27: 989-1006.
- Smyth JD (1990) *In vitro* cultivation of parasitic helminths: CRC press.
- Kvamme BO, Skern R, Frost P, Nilsen F (2004) Molecular characterisation of five trypsin-like peptidase transcripts from the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) intestine. *International Journal for Parasitology* 34: 823-832.
- Skugor S, Glover KA, Nilsen F, Krasnov A (2008) Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *Bmc Genomics* 9.
- Skilbrei OT, Glover KA, Samuelsen OB, Lunestad BT (2008) A laboratory study to evaluate the use of emamectin benzoate in the control of sea lice in sea-ranched Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 285: 2-7.
- Jansen PA, Kristoffersen AB, Viljugrein H, Jimenez D, Aldrin M, et al. (2012) Sea lice as a density-dependent constraint to salmonid farming. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 279: 2330-2338.
- Andersen CL, Jensen JL (2004) Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify

- Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research* 64: 5245-5250.
- Baker, M. (2012) Biorepositories: Building better biobanks, *Nature*, 486:141-146.
- Blow, N. (2009) Biobanking: freezer burn, *Nat Meth*, 6:173-178.
- Pascual, S., E. Abollo, A. González, (2016) Biobanking and genetic markers for parasites in fish stock studies, *Fisheries Research*, 173: 214-220.
- Jansen PA, Kristoffersen AB, Viljugrein H, Jimenez D, Aldrin M, et al. (2012) Sea lice as a density-dependent constraint to salmonid farming. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 279: 2330-2338.
- Valenzuela-Muñoz V, Gallardo-Escárate C (2014) TLR and IMD signaling pathways from *Caligus rogercresseyi* (Crustacea: Copepoda): In silico gene expression and SNPs discovery. *Fish & shellfish immunology* 36: 428-434.
- Núñez-Acuña G, Valenzuela-Muñoz V, Gallardo-Escárate C (2014) High-throughput SNP discovery and transcriptome expression profiles from the salmon louse *Caligus rogercresseyi* (Copepoda: Caligidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 10: 9-21.
- SEARCH (2006) Sea lice resistance to chemotherapeutants: A handbook in resistance management.