



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Evaluación de la modulación transcripcional de la ruta de apoptosis en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) durante la esmoltificación

Ana Consuelo García Opazo

Seminario de Título presentado al Departamento de Oceanografía de la
Universidad de Concepción para optar al Título de Bióloga Marina

Profesor Patrocinante: Dr. Cristian Gallardo Escárate
Directora de Tesis: Dra. Valentina Valenzuela Muñoz

2023, Concepción

Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Laboratorio Biotecnología y Genómica Acuícola, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción. Presentado a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción, para optar al título profesional de Biología Marina.

Profesora Guía:

Dr. Valentina Valenzuela-Muñoz
Investigadora Adjunta
Centro INCAR

Profesor Patrocinante:

Dr. Cristian Gallardo-Escárate
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

Dr. Juan Antonio Valdés
Facultad de Ciencias de la Vida
Universidad Andrés Bello

Coordinador Seminario de Título:

Dr. Ariel Valenzuela Saldías
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

DEDICATORIA

Agradecimiento especial a mis abuelos Manuel y Marina que hicieron todo para que mis hermanos y yo tengamos un buen vivir inculcándonos el sentido de responsabilidad y valores que perdurarán en nuestras vidas, a mis padres Edith y Jorge, mi tía Marina por el apoyo y alientos para seguir adelante. También un enorme agradecimiento a mis gatos Motor y Pantufla, a mis perros Sisi y Galgi por ser el apoyo emocional a lo largo de mi vida y en esta última etapa de mi carrera. A mis compañeros de laboratorio, por sus consejos y momentos de risas.

Finalmente mencionar al Centro INCAR del Departamento de Oceanografía UdeC por la oportunidad que me brindó junto al apoyo financiero para la realización de esta tesis de pregrado, sobre todo al equipo del Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuática (LBGA) Bárbara Benavente que junto a mi directora de tesis Valentina Valenzuela me han entregado bastos conocimientos y disciplina de las herramientas genómicas moleculares.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuática (LBGA) perteneciente al Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción (UdeC).

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN	9
<i>Adaptación de los peces a cambios en el ambiente.</i>	9
<i>Apoptosis</i>	10
<i>Rol de los miARNs en la modulación de la expresión génica.</i>	13
<i>Influencia de la ruta de apoptosis sobre la respuesta inmune innata.</i>	14
<i>Esmoltificación del Salmón del Atlántico y su asociación con la ruta de apoptosis.</i>	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS.....	17
General:.....	17
Específicos:.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Diseño de experimento	18
<i>Expresión diferencial CLC para apoptosis y predicción de miARNs.</i>	19
<i>Expresión diferencial CLC vía TLR</i>	20
<i>Extracción de ARN</i>	20
<i>Síntesis de ADNc</i>	21
<i>Diseño y estandarización partidores</i>	21
<i>Expresión relativa ($\Delta\Delta Ct$)</i>	24
<i>RT q-PCR miARN</i>	24
<i>Análisis estadístico</i>	25
RESULTADOS.....	26
Análisis transcriptómico de la ruta de apoptosis en peces esmolts	26
<i>Análisis de RNA-seq</i>	26
<i>Expresión diferencial</i>	28
<i>Estandarización partidores y validación por RT-qPCR</i>	29

Evaluación expresión relativa de genes apoptóticos en las branquias del salmón Atlántico.....	31
<i>Predicción genes blancos para microARNs y análisis de expresión</i>	37
Evaluación expresión relativa de microARNs en las branquias del salmón Atlántico	41
RT-qPCR miARNs	41
<i>Análisis de componentes principales (PCA) ARNms y miARNs branquiales en la ruta de la apoptosis</i>	43
<i>Análisis transcriptómico de la vía inmunidad TLR en peces esmolts</i>	44
RNA-seq vía TLR.....	44
<i>Expresión diferencial ARNms vía TLR</i>	48
<i>PCA vía TLR vs. PCA apoptosis</i>	50
DISCUSIÓN	52
Vía TLR	56
CONCLUSIÓN.....	59
ANEXO.....	60
BIBLIOGRAFÍA	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la ruta de la apoptosis.	13
Figura 2. Diseño de experimento.	18
Figura 3. Heatmap ARNms apoptóticos en branquias de salmón Atlántico a distintas condiciones de salinidad.....	27
Figura 4. Diagrama de Venn de los ARNms apoptóticos en branquias de salmón Atlántico.....	29
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de para evaluación de la estandarización de los partidores diseñados.	31
Figura 6. Gráficos expresión relativa de ARNms apoptóticos sin diferencias significativas.	33
Figura 7. Gráficos expresión relativa ARNms significativos.	35

Figura 8. Heatmap ARNms producto RT-qPCR.....	36
Figura 9. Ruta de la apoptosis en salmón del Atlántico. T	37
Figura 10. Heatmap miARNs branquiales de salmón Atlántico.	39
Figura 11. Diagrama de Venn miARNs asociados a genes apoptóticos en branquias de salmón del Atlántico.....	40
Figura 12. Gráficos expresión relativa miARNs.....	43
Figura 13. PCA ARNms y miARNs branquiales en la ruta de la apoptosis.....	44
Figura 14. Heatmap ARNms vía TLR en branquias.....	46
Figura 15. Diagrama de Venn vía TLR en branquias.....	49
Figura 16. Vía TLR de inmunidad del salmón del Atlántico.....	49
Figura 17. PCA de ARNms branquiales en la vía TLR y apoptosis.....	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño de partidores para posterior RT-qPCR.....	21
Tabla 2. Clúster de genes de la ruta de la apoptosis identificados en el heatmap (fig. 3).	28
Tabla 3. Estandarización de partidores.....	31
Tabla 4. miARNs seleccionados.	40
Tabla 5. Clúster de genes de la vía TLR identificados en el heatmap (fig. 14).	47
Tabla 6 Predicción miARNs.....	60

RESUMEN

El ciclo de vida de *Salmo salar* (salmón del Atlántico) se ve expuesto a cambios ambientales que ocasionan estrés, por ejemplo, su migración desde los ríos al mar. Previo a este cambio, se genera una serie de cambios fisiológicos en los peces para afrontar los cambios osmóticos. Una inadecuada transferencia puede gatillar daño a nivel celular. El objetivo del estudio fue caracterizar los cambios transcripcionales de la ruta de la apoptosis en salmón del Atlántico durante su transferencia al mar. Salmones esmolts fueron transferidos a mar utilizando dos estrategias, un cambio gradual de salinidad (GSC) y un shock salino (SS). Previo a la transferencia, y luego de ésta, se tomaron muestras de branquias para análisis transcriptómico de la ruta de señalización de apoptosis. Adicionalmente, se realizó una búsqueda y validación de miARN involucrados en la regulación de genes claves de la ruta, además de una comparación *in silico* de la apoptosis con la vía de inmunidad TLR. Los grupos experimentales presentaron diferencias en los niveles de expresión de los genes para la ruta de la apoptosis. Por ejemplo, el grupo GSC presentó altos niveles de expresión génica de TNF α , IAP/XIAP, Diablo y C-Jun, frente al grupo control (FW). Por el contrario, el gen P53, se observó altamente expresado en el grupo SS, con respecto a FW y GSC. Los miARNs identificados como regulador de la ruta, también muestran diferencias de expresión entre los grupos, especialmente miARN 301-3p el cual está inactivo cuando su gen blanco IAP/XIAP se sobre expresa diferencialmente durante GSC. Respecto a las estrategias salinas con genes de la vía de inmunidad TLR, estos presentaron diferencias de expresión, mayormente en la estrategia SS. Este estudio, aporta nueva información asociada a la biología de *S. salar*. Además, se sugiere que los peces al ser sometidos a cambio gradual de salinidad presentan mayor activación de la ruta de apoptosis que los peces sometidos a un shock de salinidad.

ABSTRACT

Salmo salar (Atlantic salmon) life cycle is subjected to environmental changes that cause it stress, e.g., their migration from rivers to sea. Prior this change, the fish experience a series of physiological adjustments to cope the osmotic changes. An inappropriate transfer can cause damage at cellular level. The objective of this study was to characterize the transcriptional changes of the apoptosis pathway in Atlantic salmon during their transfer to the sea. Smolt salmon were transferred to sea using two strategies, a gradual change in salinity (GSC) and a saline shock (SS). Before and after the transfer, gill samples were taken for transcriptomic analysis of the apoptosis signaling pathway. Additionally, a search and validation of miRNA involved in the regulation of key genes of the pathway was carried out, as well as an *in silico* comparison of apoptosis with the TLR immunity pathway. The experimental groups presented differences in the expression levels of the genes for the apoptosis pathway. For example, the GSC group presented high levels of gene expression of TNF α , IAP/XIAP, Diablo and C-Jun, compared to the control group (FW). On the contrary, the P53 gene was highly reduced in the SS group, with respect to FW and GSC. The miRNAs identified as pathway regulator also show differences in its expression between the groups, especially miRNA 301-3p which is inactive when its target gene IAP/XIAP is differentially overexpressed during GSC. Regarding the saline strategies with genes of the TLR immunity pathway, expression differences were observed, mostly in the SS strategy. This study provides new information associated with the biology of *S. salar*. In addition, it is suggested that fish, when subjected to a gradual change in salinity, present greater activation of the apoptosis pathway than fish subjected to salinity shock.

INTRODUCCIÓN

Adaptación de los peces a cambios en el ambiente.

El crecimiento y desarrollo de peces dependen de factores endógenos (sistema endocrino, nervioso y neuroendocrino) y exógenos (cambios ambientales), los cuales controlan o sincronizan varias actividades y funciones del ciclo de vida (McCormick, 2012). Los factores endógenos se dividen en factores limitantes como: el nivel de amonio, tolerancia a un rango de pH y el umbral de oxígeno, y los factores exógenos determinantes son: temperatura, salinidad y fotoperiodo, los cuales tienen directa relación con receptores para regular positiva o negativamente la capacidad de crecimiento (Bœuf and Payan, 2001). El salmón del Atlántico es un pez anádromo, es decir, nace y crece en agua dulce (FW) y luego migran hacia el agua de mar donde pasa la mayor parte de su vida para seguir creciendo y madurar sexualmente (Liu et al., 2011). Para tolerar fluctuaciones de salinidad, poseen un mecanismo adaptativo asociado a la osmorregulación, la cual se efectúa a través de diferentes órganos, principalmente en el riñón, intestino y branquias (Zolotareno and Shitova, 2022). Las branquias son órganos ampliamente estudiados, ya que, tienen como función mantener el equilibrio iónico en el medio interno y excretar el exceso al medio externo. Para tolerar fluctuaciones salinas durante la esmoltificación, en las branquias se produce aumento de las células clorhídricas y de actividad de la bomba sodio potasio ($\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$) (McCormick et al., 1995). Además, una serie de hormonas están implicadas en la regulación de estos aumentos de actividad branquial. Las hormonas de crecimiento (GH) y cortisol aumentan durante la esmoltificación, regulando la actividad bomba sodio potasio y el aumento de las células clorhídricas. La hormona GH estimula la capacidad de hipo-osmosis, induciendo la expresión de la hormona factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) en las branquias y los demás órganos osmorreguladores (Sakamoto et al., 1995).

La regulación hiper-osmótica ocurre cuando el ejemplar habita en agua dulce donde la concentración de iones del medio es baja en comparación con los iones que concentra en su medio interno, esto es regulado por las células clorhídricas ubicadas en las branquias por acción la bomba Na^+/K^+ ATPase y canales de Cl^- para retener iones (Savill and Fadok, 2000), produciendo altos volúmenes de orina diluida para la eliminación del exceso de agua y de esta manera equilibrar la osmosis (Marshall, 2002; McCormick et al., 1995; Savill and Fadok, 2000). Por otra parte, el mecanismo de hipo-osmosis en agua de mar, el pez toma más agua para balancear la pérdida de agua debido a la deshidratación que están expuestos los tejidos (Haure et al., 1998) y excreta el exceso de iones Na^+ y Cl^- a través de las células clorhídricas branquiales (McCormick et al., 1995; Savill and Fadok, 2000).

Estos mecanismos altamente conservados evolutivamente, actúan para la adaptación del salmón de Atlántico a este estrés salino debido al proceso de esmoltificación, el cual causa un daño de los órganos implicados en la osmosis a nivel macromolecular, interrumpiendo la estructura y función de proteínas, lípidos y ADN (Evans and Kültz, 2020). A causa del daño macromolecular por exposición a severos cambios de salinidad, se activan distintos mecanismos para evitar la muerte del organismo, entre ellos; protección y reparación de macromoléculas, detención del ciclo celular, reasignación de energía metabólica y muerte celular programada o apoptosis, si se superan los límites de tolerancia celular (Evans and Kültz, 2020).

Apoptosis

Es un mecanismo adaptativo de muerte celular dependiente de energía, consiste en la autoeliminación de una célula afectada o con daño terminal con el fin de mantener la homeostasis celular de los tejidos en todos los organismos multicelulares (Takle and Andersen, 2007). Ocurre activamente en el desarrollo, envejecimiento y en condiciones normales del ciclo celular (AnvariFar, Hossein et al., 2017; Norbury and Hickson, 2001). También es activada como una

respuesta de mantenimiento y desarrollo del sistema inmune o cuando la célula es afectada por un patógeno (Elmore, S., 2007). No todas las células mueren necesariamente por el mismo estímulo, ya que este proceso está genéticamente controlado y genera una respuesta fisiológica inducida por una cascada de señales génicas específicas, o es el resultado de una falta de señales manteniendo la supervivencia de la célula afectada.

La apoptosis tiene dos vías de señalización principales (Fig. 1): 1) La ruta extrínseca que es estimulada por factores ambientales, organismos infecciosos o sustancias tóxicas, que es inducida por receptores de muerte celular ubicadas en la superficie (Wendelaar Bonga and Van der Meij, 1989); 2) La ruta intrínseca que es gatillada por acción de hormonas o sustancias tisulares modulada por la mitocondria y la cual se activa por daño ADN, radiación UV y flujo alterado de calcio (García-Castro et al., 2011). El proceso en las células activa enzimas para degradar su propio ADN. Morfológicamente la primera etapa de la apoptosis sucede con una contracción celular, donde se condensa la cromatina (picnosis), hay fragmentación nuclear lo que ocasiona pérdida del volumen celular, organelos compactos debido al movimiento de iones a través de la membrana plasmática (Panayiotidis et al., 2006). La formación de cuerpos apoptóticos excretan un fosfolípido para ser reconocidos por macrófagos que lo eliminarán rápidamente mediante fagocitosis, y al contrario de la muerte celular por necrosis, como resultado no hay presencia de reacción inflamatoria, lo que se debe a la rápida fagocitosis (Elmore, Susan, 2007). Por otra parte, la membrana plasmática que envuelve el cuerpo apoptótico no se rompe liberando sus constituyentes al citoplasma, evitando la necrosis (Kurosaka et al., 2003; Savill and Fadok, 2000).

Unos de los genes más relevantes en el proceso de apoptosis es el supresor de tumores p53, con un rol adaptativo que es característico dentro de vía de señalización, ya que coordina una respuesta celular regenerativa frente a una variedad de estímulos estresores continuos a nivel transcripcional (Riley et al., 2008; Vazquez et al., 2008), activando o inhibiendo la transcripción de genes pro apoptóticos y anti apoptóticos según sea el estímulo (Riley et al., 2008).

Otros genes relevantes de la apoptosis, se encuentran en la ruta dependiente de caspasas (AnvariFar, Hossein et al., 2017), proteínas determinantes de la apoptosis que son activadas a través de los receptores de la señal suicida ubicados en la superficie celular como es el factor de necrosis tumoral (TNF α) (Hu et al., 1998; Li et al., 1998). En este punto la apoptosis puede tomar dos vías dentro de la ruta: (1) la vía extrínseca que implica la activación de la caspasa 8 y (2) la vía intrínseca que está regulado por la familia de Bcl-2 como Bcl-xL y bid (Norbury and Zhivotovsky, 2004; Roos and Kaina, 2006), liberando citocromo C, activando caspasa 9 (Alberts, 2008) y esta a su vez activa las caspasas efectoras restantes que finalmente crean el cuerpo apoptótico que es fagocitado rápidamente por macrófagos (Yu et al., 2001). (Fig. 1).

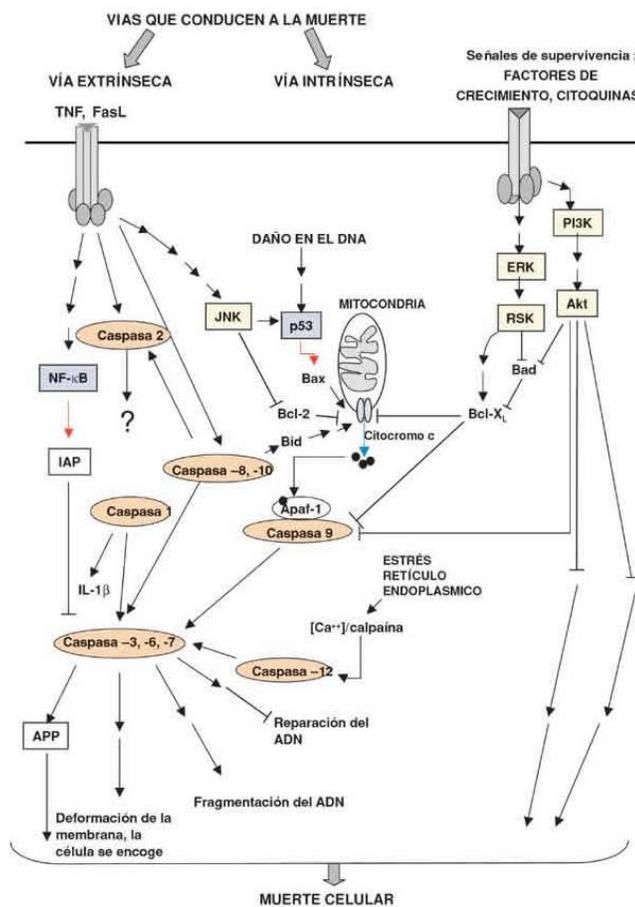


Figura 1. Esquema de la ruta de la apoptosis. Se detallan las principales vías de señalización, la vía extrínseca que se lleva a cabo en la zona extracelular y la vía intrínseca que ocurre principalmente en la mitocondria (intracelular) y además la ruta independiente de caspasas mediante el gen p53, Las rutas desencadenan en muerte celular programada por apoptosis según sea el tipo y nivel de estímulo activando o silenciado los genes involucrados en las rutas. (García and Vecino, 2003).

Rol de los miARNs en la modulación de la expresión génica.

Los microARNs (miARN) son moléculas de ARN pequeñas, monocatenarias, endógenas y pertenecientes al grupo ncARN (ARN no codificante) de aproximadamente de 22 nucleótidos de longitud (Leiva et al., 2020). Regulan posttranscripcionalmente la expresión de genes blanco de varios organismos uniéndose a la región 3' no traducida (3' UTR) de los ARN mensajeros (ARNm) objetivo y de esta manera reducen su expresión mediante la supresión de la traducción o la inducción de la degradación de los ARNm, impactando distintos procesos biológicos como el desarrollo, diferenciación, proliferación de células, respuesta a un estrés y apoptosis (Adlakha and Saini, 2011).

Se ha demostrado que genes relacionados con la apoptosis pueden ser regulados para inducir la muerte celular programada, por la activación o inhibición en la expresión de miARNs específicos (Ren et al., 2022). El proceso biosintético comienza con un microARN primario (Pri-miARN) que se transcribe desde el intrón por el gen huésped en el núcleo por la ARN polimerasa II (del huésped). El Pri-miARN es dividido por la proteína Drosha para formar el precursor miARN de ~70 nucleótidos. Luego, el pre-miARN entra al citoplasma desde el núcleo bajo la acción del transportador de proteínas CPO5 y este es acoplado por el complejo Dicer para formar un miARN maduro de aproximadamente 22 nucleótidos. El miARN maduro es llevado a la proteína Argonauta formando un complejo silencioso inducido por ARN (RISC), que reconoce los ARN objetivo (ARNm) a

través del principio de emparejamiento de bases complementarias (Zhang et al., 2021).

Influencia de la ruta de apoptosis sobre la respuesta inmune innata.

En humanos, la vía TLR se ha reconocido como el mayor responsable de la respuesta de inmunidad innata y se ha reportado un link de la vía de TLR con la ruta de la apoptosis en la biología de las plantas donde se utiliza la apoptosis para eliminar patógenos en la zona de la infección (Salaun et al., 2007). Los receptores tipo Toll (TLRs, por su sigla en inglés) son proteínas de transmembrana que tienen por función ser receptores y mediadores de una respuesta del sistema inmune innata. Pueden detectar la invasión de un patógeno en particular, gracias a la especificidad de unión del macrófago a la zona TLR mediante el plegamiento en específico de la leucina pertenecientes a la proteína TLR, de esta manera activa la respuesta de inmunidad y adaptación frente al patógeno (Arnemo et al., 2014).

La vía de inmunidad TLR supone una respuesta inflamatoria, para que el salmón del Atlántico se adapte a las fluctuaciones salinas y sobreviva, y se activa la ruta de la apoptosis como una manera de resolución de la inflamación producida por la vía TLR de inmunidad (Aliprantis et al., 1999). Por otro lado, el cuerpo apoptótico producido, en este caso, como respuesta a daño celular en las branquias gatillado por estrés salino, es fagocitado por macrófagos del sistema inmune innato, donde los macrófagos son capaces de discriminar la señalización mediante receptores reconocedores de patrones (PRRs). Estos receptores activan la vía de inmunidad a través del reconocimiento de moléculas asociadas a patógenos (PAMPs) y también por el reconocimiento de productos generados por la muerte celular (cuerpo apoptótico) conocido como receptor asociado a daño (DAMPs) (Campisi et al., 2014). Los macrófagos codifican varios tipos de TLRs (sub familia de los receptores PRRs) activando varias rutas que orquestan la apropiada y adaptativa respuesta inmune innata según sea el tipo de estímulo o señalización (Zhang and Bliska, 2003). Para la activación de la ruta de la

apoptosis en la vía TLR es necesario la acción del TLR2. Este a su vez, puede desencadenar en la sobrevivencia de la célula e inflamación (Zhang and Bliska, 2003).

Durante la esmoltificación donde las branquias funcionan como una barrera inmunológica a través de su mucosa rica en macrófagos, deben responder a los nuevos patógenos al que está expuesto el individuo durante la transformación parr-esmolt, pero el salmón del Atlántico al estar expuesto a estrés severo por salinidad está susceptible a patógenos debido al daño celular branquial que conlleva a un debilitamiento del sistema de inmunidad, produciéndose cantidades de cortisol, una supresión del sistema inmune y una reducción a la resistencia de enfermedades (Gu et al., 2018; Li et al., 2020; Magnadóttir, 2006).

Esmoltificación del Salmón del Atlántico y su asociación con la ruta de apoptosis.

La esmoltificación, es decir, la transformación de parr a smolt es una pre-adaptación que ocurre en medio hipotónico agua dulce (FW), para posteriormente migrar al medio hipertónico en agua de mar (McCormick, 2012), produciéndose cambios morfológicos (adquieren una pigmentación platinada en la piel y una forma corporal aerodinámica), fisiológicos (aumento en la tasa metabólica y aumento en la tolerancia a agua salada), comportamiento (perdida de comportamiento territorial), y bioquímicos, con el fin de mantener el equilibrio iónico dentro de su cuerpo, principalmente con el aumento de la actividad branquial (bomba sodio potasio) (McCormick, 2012).

En la industria salmonera existen varias estrategias para inducir el proceso de esmoltificación en menor tiempo posible, siendo el más común la exposición a fotoperiodos con días de mayor luz solar imitando el sol primaveral, aumentar la temperatura en el estanque y cambiar la dieta por una rica en proteínas. Esta etapa es de vital importancia, ya que la mayor causa de mortalidad en la salmonicultura durante el traspaso a mar es una incorrecta evaluación de la

ventana de esmoltificación. En esta, se evalúan factores que cambian durante el proceso permitiendo una exitosa vida en agua de mar. Por ejemplo, se miden los niveles de la hormona del crecimiento (GH, por sus siglas en inglés), cortisol, hormonas tiroideas y medición de la actividad de ATPase en algunos individuos, tomando muestras branquiales, ya que estos factores afectan órganos osmorreguladores. Una deficiente predicción del tiempo de esmoltificación, además de provocar la muerte del individuo en agua de mar, también puede producir un atrofiado crecimiento en agua de mar y/o una mayor probabilidad de infección por patógenos.

El estrés que causa las fluctuaciones salinas en el salmón se ve reflejado en un daño molecular de los órganos implicados en las osmosis y una de las respuestas es la muerte celular programada por apoptosis. La importancia de la acción de los miARN radica en el silenciamiento de genes blanco, por lo tanto, los genes dentro de la ruta de la apoptosis pueden estar siendo modulados positiva o negativamente por ciertos miARN, por lo cual los miARNs podrían ser indicadores complementarios para, determinar el tiempo de esmoltificación en salmón del Atlántico.

En este estudio se evaluó la expresión de genes apoptóticos en branquias (Bcl-2, Bid, Diablo, C-jun, Caspasa 9, IAP/XIAP, P53 y TNF α), y como estos pueden ser modulados por miARNs sometidos a dos estrategias de transferencia a mar, cambio gradual de salinidad (GSC) y shock salino (SS), en relación con el grupo control de agua dulce (FW).

HIPÓTESIS

Durante el proceso de esmoltificación en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) existe alta regulación en genes de la ruta de la apoptosis asociados a la estrategia de transferencia desde agua dulce a agua de mar mediante shock salino.

OBJETIVOS

General:

Caracterizar los cambios transcripcionales de la ruta de la apoptosis de salmón Atlántico (*S. salar*) durante la transferencia a mar utilizando dos estrategias.

Específicos:

- I) Evaluar mediante análisis *in silico* cambios en la expresión en genes de la vía de apoptosis en salmón Atlántico transferido a agua de mar mediante shock salino (SS) y cambio gradual de salinidad (CGS).
- II) Predecir mediante análisis *in silico*, potenciales miARN reguladores de los genes de la vía de apoptosis en salmón del Atlántico y determinación de su expresión por RNA-Seq.
- III) Validar los cambios de expresión genes y sus miARNs asociados a la vía de apoptosis en tejido de peces expuestos a shock salino (SS) y cambio gradual de salinidad (CGS) mediante qPCR.
- IV) Evaluar mediante análisis *in silico* los cambios en la expresión en genes de la vía de TLR salmón Atlántico transferido a agua de mar mediante shock salino (SS) y cambio gradual de salinidad (CGS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de experimento

Para esta investigación se llevó a cabo dos estrategias de esmoltificación en salmón Atlántico. En el grupo cambio gradual de salinidad (GSC), los salmones fueron transferidos a agua de mar 32 PSU desde agua dulce 0 PSU (FW) en 28 días con intervalos de 10 PSU por semana. Las muestras de tejido branquial fueron colectadas luego de una semana de aclimatación de los peces a 32 PSU. En el grupo de choque salino (SS) los salmones fueron sometidos a un abrupto cambio salinidad desde FW a SW, tomando muestras de branquias en los peces luego de una semana a aclimatación a 32 PSU. El grupo de salmones en constante FW se utilizó como grupo control, para comparar los resultados obtenidos en GSC y SS (Valenzuela-Munoz et al., 2021).

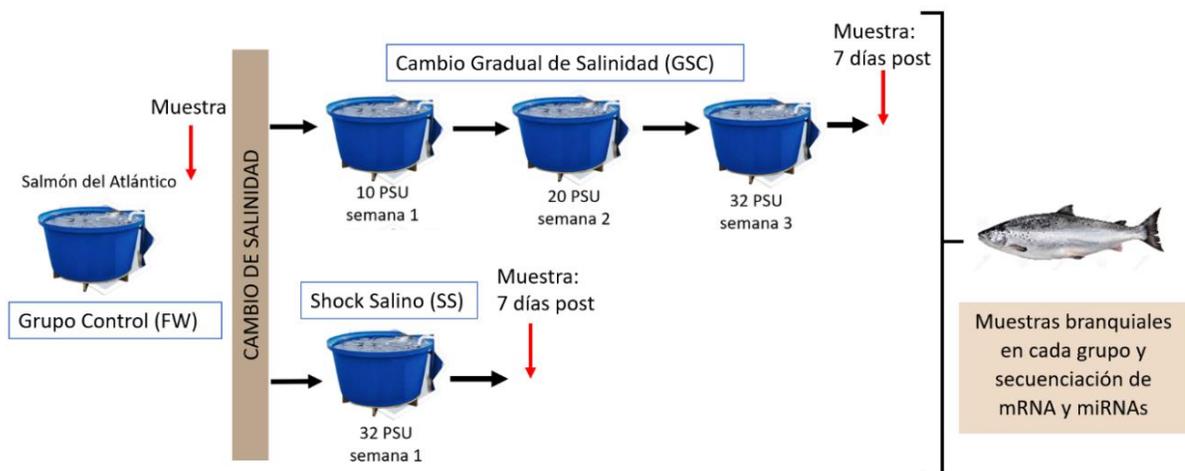


Figura 2. Diseño de experimento. En los grupos GSC y SS se tomaron muestras branquiales al principio y a los siete días de finalizado el experimento, también se tomaron muestras branquiales de FW, para posterior secuenciación Illumina de ARNm y miARN.

Expresión diferencial CLC para apoptosis y predicción de miARNs.

Desde la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI), se obtuvieron 74 secuencias ARNm de genes asociados a la ruta de apoptosis (intrínseca y extrínseca) de salmón Atlántico, de acuerdo con la base de datos Kegg Pathway. Estas secuencias fueron utilizadas como referencia para un análisis *in silico* de expresión (RNA-Seq), utilizando datos de secuenciación Illumina de ARNm branquial en salmón del atlántico previamente obtenidos en los grupos FW, GSC y SS (Valenzuela-Munoz et al., 2021). Mediante el software CLC Genomic Workbench 20 (QIAGEN, Aarhus, Denmark), se construyó un Heat Map comparativo entre la expresión de genes asociados a apoptosis y los grupos de interés. Para los grupos se realizó una comparación estadística entre FW y ambas estrategias de transferencia a mar, mediante la herramienta de expresión diferencial para RNA-Seq, y se construyeron diagramas de Venn con los siguientes parámetros: P-value= 0.05 & Fold change= 1.

Para la predicción de genes blanco de miARNs, se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes involucrados en el intercambio de iones relacionados con la esmoltificación, aquellos genes que son determinantes en la ruta apoptótica, y además, se consideraron los genes que presentaron mayor diferenciación de expresión entre las estrategias de transferencia a mar en comparación con el grupo control de agua dulce, seleccionando 8 genes: Bcl-2, C-Jun, Diablo, Caspasa 9, Bid, IAP/XIAP, P53 y TNF α . En ellos se aplicó la predicción Open Reading Frame Finder para encontrar la porción que puede traducirse en una proteína e identificar la región 3'UTR. Con la zona 3'UTR se hizo una predicción de blanco de los miARNs branquiales previamente obtenidos (Valenzuela-Munoz et al., 2021), para ello se utilizó el programa RNA22V2. Se seleccionaron aquellos miARNs que necesitaron menor energía de unión zona 3'UTR del gen blanco con probabilidad de unión $\Delta G < -12$, para ser evaluados posteriormente por RT-qPCR.

Expresión diferencial CLC vía TLR

Con las secuencias de genes de la vía TLR, se hizo un análisis de expresión diferencial mediante RNA-Seq con las secuencias de ARNm branquial de las estrategias de transferencia a mar. A partir de esto se procedió a construir un heatmap y diagrama de Veen siguiendo el flujo de trabajo previamente descrito para los genes de la ruta de apoptosis.

Extracción de ARN

Se extrajo tejido branquial de ejemplares esmolts de salmón Atlántico a diferentes regímenes de salinidad; FW, GSC y SS. La extracción de ARN total se realizó para tres pools de muestra, cada uno compuesto por tres individuos esmolt de salmón del Atlántico. Se cortó con bisturí el tejido branquial en una placa Petri y se agregó aproximadamente 50 a 100 mg de tejido a tubos preparados con esfera cerámica y 1mL de Trizol. Las muestras fueron homogenizadas en TissueLyser con una frecuencia de 24/s por 10 min. Posteriormente se descarta la esfera y se centrifuga a 12.000g por 5 min a 4°C. Se agregó 200 ul de cloroformo, mezclando manualmente y se incubó en hielo por 3 min. Luego se centrifugaron a 12.000g por 15 min a 4°C, para recuperar la fase acuosa la cual contiene los ácidos nucleicos traspasándolo a tubos eppendorf de 1.5 mL. Luego se agregó 500 ul de isopropanol para que precipiten todos los ácidos nucleicos y se incubó por 20 min a -20°C, para posteriormente centrifugar a 12.000g por 10 min a 4°C observándose un pellet el cual contiene los ácidos nucleicos y se eliminó el sobrenadante. El pellet fue lavado con 1 mL de etanol al 75%, centrifugando a 7.500g por 5 min a 4°C, repitiendo este paso dos veces. Se descartó el sobrenadante eliminando el excedente con spin y micropipeta sin mover o alterar el pellet que corresponde al ARN extraído, luego se resuspendió el pellet con 40 µl de agua para biología molecular (libre de nucleasas). Para cuantificar la pureza y concentración del ARN branquial extraído, se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher

Scientific, Waltham, MA, USA), y su integridad fue determinada mediante electroforesis en gel MOPS de agarosa al 1.2%.

Síntesis de ADNc

Las muestras que cumplieron con los criterios integridad y pureza, fueron utilizadas para formar pools de ARN de los tres individuos por grupo a una concentración de 200 ng/μl de ARN cada uno. Luego se realizó síntesis de ADNc mediante el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (ThermoScientific®). Para una reacción al 4x (10μl), se agregó 9 μl del Master mix y 1 μl de ARN de muestra en tubos eppendorf de 2 μl. Finalizada la síntesis en el termociclador (retrotranscriptasa reversa), el cDNA fue diluido con agua biomolecular llevándolo a una concentración 0.5 μl. Para verificar la correcta síntesis de ADNc se realizó PCR tiempo final para cada muestra con un set de partidores de control endógeno factor de elongación ELF1a-F2/R2 de salmón del Atlántico previamente estandarizados a Tm 58 °C y su integridad fue determinada mediante electroforesis en gel TBE de agarosa al 1,5%.

Diseño y estandarización partidores

Se diseñaron dos pares de partidores para los genes de la ruta de la apoptosis; Bcl-2, C-Jun, Diablo, Caspasa 9, Bid, IAP/XIAP, p53 y TNFα. Utilizando el software Geneious Prime ® 2022.1.1, estableciendo como parámetro un tamaño de producto de entre 100-150 pb.

Tabla 1. Diseño de partidores para posterior RT-qPCR. Listado de partidores (F/R) por duplicado de los genes seleccionados, para posterior análisis de amplificación RT-qPCR.

Oligo Name	5` - Oligo Seq - 3`
Ss_P53_F1	AGTTGAGCTTCCCCATGAGC
Ss_P53_R2	GAGCGAGACATCCAGGTCAG

Ss_P53_F2	TCAGTACCTGGAGGATGGCA
Ss_P53_R2	TCGGTTCATACCACCCATGC
Ss_BCL-2_F1	ACTTTGCAGAGATGTCTGGGG
Ss_BCL-2_R1	ACGCACATTGTCCCTCCAAA
Ss_BCL-2_F2	GGAGAATGGTGACTGGGACG
Ss_BCL-2_R2	ACAACGCTCCAATGGTGACT
Ss_BID_F1	CCGATAACCCTGCCGATGAA
Ss_BID_R1	CCACCGCCCAA TGGAA TACT
Ss_BID_F2	GTGGAGTGGGTGAAGAAGCA
Ss_BID_R2	GCTGCGCTGAACAGATTACG
Ss_TNF α _F1	ACAACCTGGCGACATGGAGAG
Ss_TNF α _R1	GCCGCACATAAAGCTGCTAC
Ss_TNF α _F2	CCGTGCAGTGGAGAAAGGAT
Ss_TNF α _R2	ACGAAGAAGAGCCCAGTGTG
Ss_CASP_9_F1	GCCAGACAGTTGGTTGAGAGA
Ss_CASP_9_R1	GGAGATCTGGTAGGCTGTGC
Ss_CASP_9_F2	AGTCACAATCGCTTCCCTGG
Ss_CASP_9_R2	CCCCACAGGCCTGGATAAAG
Ss_IAP/XIAP_F1	GGTACACCAGACCATGTGGG
Ss_IAP/XIAP_R1	CCCAGGATAGTGTTTGGCGT
Ss_IAP/XIAP_F2	GGAAACTCTGCTGCAGGACT
Ss_IAP/XIAP_R2	ACTGTTTCTCCCTCTGCAGC
Ss_APAF-1_F1	GAGACAGAAGCCTAGCCGAC
Ss_APAF-1_R1	TACAGGGCGAGGATCTCCAA
Ss_APAF-1_F2	TTCTCCCAGATGACCGTCT
Ss_APAF-1_R2	TTGACCTGCTCCTCGTGTTT
Ss_BAX_F1	GAAAACCGGCGAAGATGAGC
Ss_BAX_R1	ACGCCTCTCTGGGTTTTCTG
Ss_BAX_F2	CCCAACGAACAAGAGGACCA
Ss_BAX_R2	AGAACACATCCTGGGCACAG

Ss_DIABLO_F1	ACCCTCATAGCCCTCCAGAG
Ss_DIABLO_R1	AACCTCAACACGCTGACCAA
Ss_DIABLO_F2	ACCTGTGTGAAATGGCAGCT
Ss_DIABLO_R2	ACCTCCTCCACCTGAACCTT
Ss_C-JUN_F1	CCAGCATGAGAAACCGGACT
Ss_C-JUN_R1	GAGAGGTGAGGATGTCGCTG
Ss_C-JUN_F2	GTAACCGATGAGCAGGAGGG
Ss_C-JUN_R2	GGGGGTATTGTCGGGTTGTT

Se hicieron alícuotas de los partidores llevándolos a una concentración de 10 ng/μl, para estandarizar la temperatura de alineamiento de cada partidor mediante la técnica de PCR convencional (tiempo final) evaluando su amplificación a Tm: 54, 56, 58, 60 y 62°C, para definir la temperatura a la cual los partidores tienen una mejor amplificación y descartar aquellos que se dimerizan o no amplifican. Estos partidores fueron analizados por duplicado con el ADNc obtenido desde pool de muestras branquiales de salmón del Atlántico en FW, utilizando como control negativo agua para biología molecular (B.M. H₂O). Los Tm óptimos para los partidores fueron determinados mediante la visualización en gel TBE de agarosa al 1,5% del producto de PCR obtenido en las distintas temperaturas.

La concentración de los partidores fue estandarizada mediante RT-qPCR con el kit PowerUp™ SYBR® Green master mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), en un volumen final de reacción del 10uL. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 50°C por 2 min, 1 ciclo de 95°C por 5 min, 40 ciclos 95°C por 15 seg., 40 ciclos a Tm de alineamiento (de acuerdo con cada gen), 40 ciclos a 72°C por 1 min y curva de melting con valores por defecto. Se realizó un rango dinámico con tres diluciones seriadas de de salmón Atlántico en FW y se llevó a concentraciones de 40 ng/μl (1:5), 20 ng/μl (1:10) y 10 ng/μl (1:20) respectivamente.

Expresión relativa ($\Delta\Delta C_t$)

Los datos obtenidos de los genes evaluados por RT-qPCR por rango dinámico, se interpretó que todos los genes amplificaron a concentración de ADNc de 40 ng/ μ l, a partir de aquello se realizó expresión relativa para cada gen por cada grupo (FW, GSC y SS, ADNc 1:5). Con los datos de los números de ciclos en que amplificó cada gen, se cuantificó la expresión diferencial de cada gen por grupo mediante el cálculo $\Delta\Delta C_t$, utilizando el control endógeno (Om_ELF_F1_R2), para la normalización de los datos de expresión. Posteriormente, los resultados fueron graficados con el software GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) aplicando la herramienta de Kruskal-Wallis con comparación múltiple y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el programa RStudio.

RT q-PCR miARN

Con los datos obtenidos de la predicción de miARNs se seleccionaron aquellos miARNs que tienen probabilidad de unión ($-\Delta G > 12$) a los genes blanco.

Mediante el kit miScript II RT (Qiagen) se hizo síntesis de ADNc con un volumen final de concentración de 10 μ L de las muestras de ARN anteriormente utilizados para ARNm, en los grupos FW, GSC y SS, verificados nuevamente con medición en el espectrofotómetro (ND-1000, Nanodrop Technologies). La cuantificación de miARN fue realizada mediante el kit miScript SYBR Green PCR (Qiagen) con partidores de salmón del Atlántico por duplicado en un volumen final de reacción de 10 μ L. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo StepOnePlus™ (Applied Biosystems®, Life Technologies™, Carlsbad, CA, EE. UU.). Las condiciones de amplificación utilizadas fueron 40 ciclos a; 95°C por 15 min, 94°C por 15 seg, 55°C por 30 seg, 60°C por 45 seg. Se cuantificó la expresión diferencial de cada miARN con el control endógeno (ssa_mir_455e5p)

para la normalización de los datos y luego fueron graficados con método anteriormente utilizado para los gráficos de ARNms.

Análisis estadístico

Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para evaluar la significancia del nivel de expresión en los ARNms asociados a apoptosis y microARNs. Comparación múltiple para probar la significancia entre todos los grupos mediante el post test Dunns. Probabilidad de significancia P-value < 0.05.

RESULTADOS

Análisis transcriptómico de la ruta de apoptosis en peces esmolts

Análisis de RNA-seq

Los 74 ARNm apoptóticos obtenidos de la base de datos NCBI fueron utilizados para comparar el nivel de expresión de los ARNm branquiales a través de ambas estrategias de transferencia a mar en salmón Atlántico, mediante la construcción de un heatmap (Fig. 3). Para ambas estrategias, se compararon los patrones de expresión de ARNMs con respecto FW, donde se observa un contraste entre los clústeres. Los genes pertenecientes al clúster 1 y 3, están sobre expresados en la condición SS, los genes del clúster 2 están sobre expresados en GSC, genes del clúster 4 están medianamente expresados entre cambio GSC y FW, y los genes del clúster 5 están sobre expresados en FW (Tabla 2). Estas diferencias significantes de TPM entre los grupos de interés nos indica un buen comienzo para llevar a cabo los demás objetivos de la investigación.

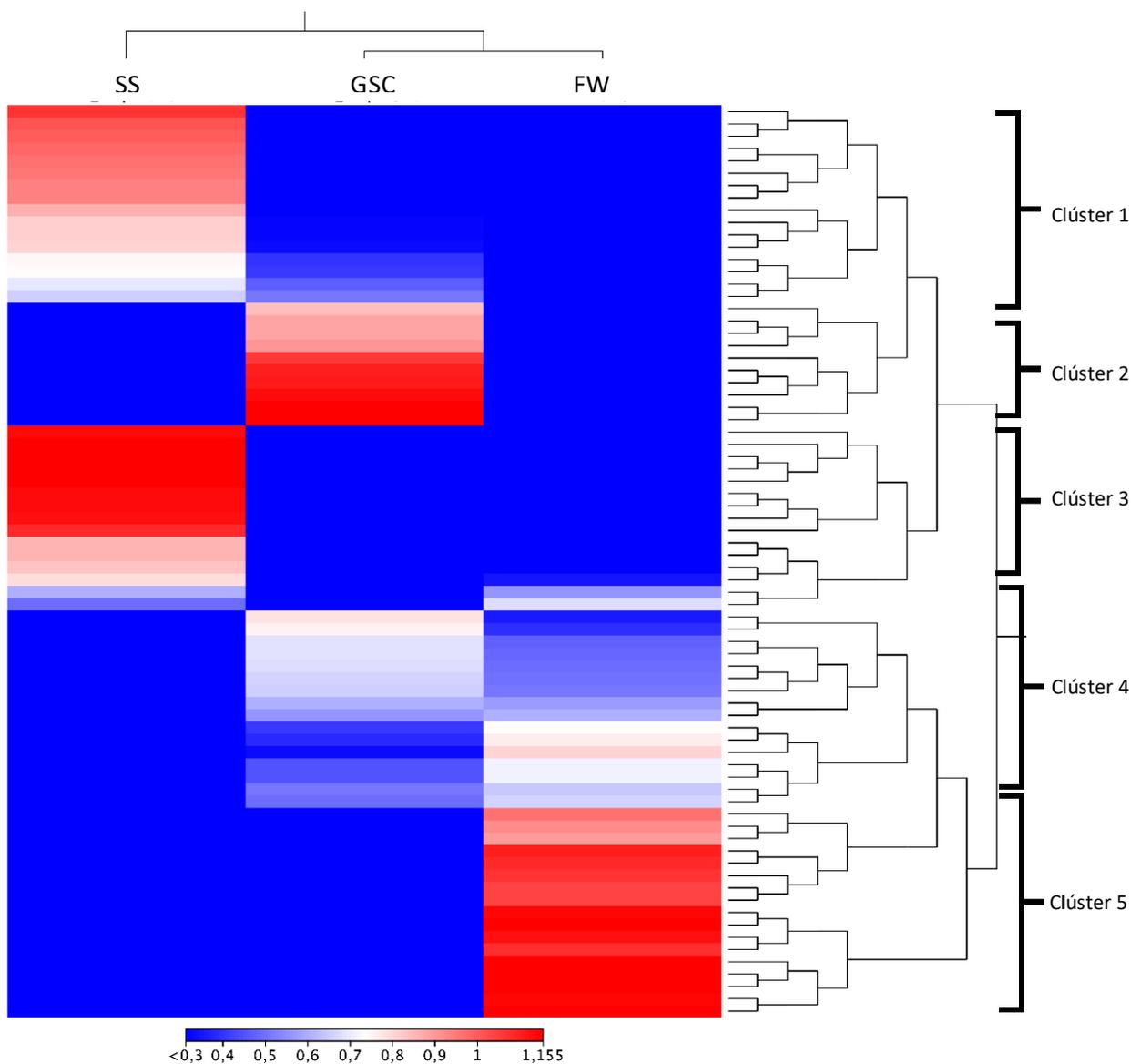


Figura 3. Heatmap ARNms apoptóticos en branquias de salmón Atlántico a distintas condiciones de salinidad. Perfil de expresión de los 74 genes de la ruta de la apoptosis en relación SS, GSC y FW. Color azul indica bajo o nula expresión génica y color rojo representa una sobre expresión génica frente a las estrategias de transferencia a mar. Fold change=1 & P-value=0.05.

Tabla 2. Clúster de genes de la ruta de la apoptosis identificados en el heatmap (fig. 3). Los ARNm apoptóticos branquiales se agrupan según es su nivel de expresión en GSC y SS en comparación a FW.

Clúster 1 (SS)	Clúster 2 (GSC)	Clúster 3 (SS)	Clúster 4 (GSC y FW)	Clúster 5 (FW)
AIF	Caspasa 10	Actin	NIK	Bcl-2
EiF2	PIDD	FADD	CAD-2	TRAF2
TRADD-1	FAP1	P53	Mcl-1	ASK1
ENDO-G	Caspasa 8	ikB	Bad	Bcl-xL
NF-kB	IAP/XIAP	HTRA2	Caspasa 6	Caspasa 7
Fas-1	Fas	Tubulin	AP1-1	CAD-1
Apaf-1	ICAD	TRAIL	Caspasa 3	AP1-2
AIF	Bax	FLIP	IKK	Caspasa 2
EiF2	Perforin	Gadd45	Bim	TRAIL-R2
TRADD-1		Bid	AIP	Cathepsin
ENDO-G		ATF4	Arts	ATM
NF-kB		Calpain-2	TNF-R1	Calpain 1
C-jun		IP3R	GZMB	CHOP
TRADD-2		Lamin	Caspasa 9	Apo 1
DAXX		Frodin	JNK	
TNF				
CytC				
DIABLO				
Ire-1				

Expresión diferencial

Se identificaron genes de la ruta de apoptosis diferencialmente regulados en ambos grupos de peces expuestos a las dos estrategias de transferencia a mar al ser comparados con FW. Los resultados son representados mediante la realización de diagrama de Venn. En el diagrama se observa la cantidad de genes que se expresan con un valor de fold change sobre 1 y están regulados exclusivamente según sea la estrategia de transferencia a mar (Fig. 4). Círculo amarillo contiene 7 ARNm expresados solo en GSC en comparación al grupo FW (TRAIL2, ATM, Frodin, Bax, Caspasa 7, Caspasa 10 y Calpain-2). Círculo celeste contiene 27 ARNm expresados exclusivamente en SS frente al grupo

FW (DAXX, TNF-R1, TRAF2, NF-kB, IκB, IKK, P53, PARP, Actin, tubulin, ENDOG, CASP9, GZMB, Ire1, eiF2, Bcl-2, Bcl-XL, Bim, JNK, AIP, TRADD-2, AP1-2, Apaf-1, Arts, CAD-2, DIABLO). Entre las circunferencias contiene los ARNms que ambos grupos comparten, 8 ARNms se sobre expresan tanto en SS como en GSC frente a FW.

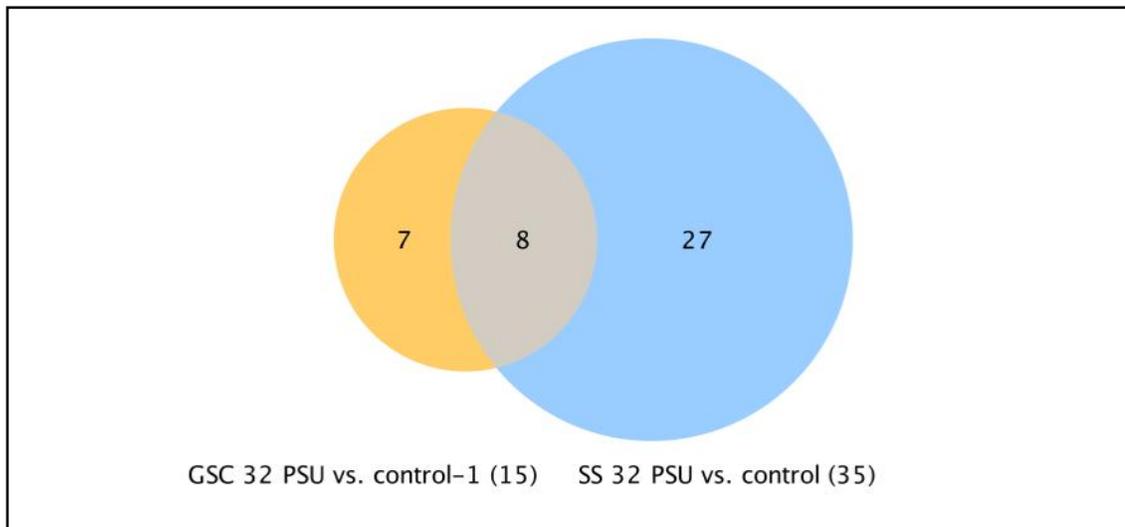


Figura 4. Diagrama de Venn de los ARNms apoptóticos en branquias de salmón Atlántico. Expresión diferencial con valores de fold change=1 & P-value = 0.05.

Estandarización partidores y validación por RT-qPCR

Los partidores diseñados para ARNms de la ruta de la apoptosis en salmón Atlántico: caspasa 9, TNF α , p53, Bid, C-jun, Bcl-2, IAP/XIAP, Diablo, Fadd, Bax y Apaf-1 fueron analizados mediante PCR convencional para determinar su Tm °C (54, 56, 58, 60 o 62°C) para una amplificación óptima con las muestras a investigar (ADNc FW, GSC y SS), lo que se verificó mediante geles de agarosa (Fig. 5). Ambos pares de partidores para los ARNm de Fadd, Bax y Apaf-1 no amplificaron a ningún Tm. Con los resultados obtenidos de amplificación de los partidores (Tabla 3), sabemos que los genes apoptóticos se están expresando

en FW, GSC y SS a cierto T_m cada uno y para saber cuánto se procedió a hacer análisis de RT-qPCR.

La determinación de expresión relativa de los genes ante las estrategias salinas, fue mediante un análisis de RT-qPCR, considerando la cantidad de ciclos (Sardella et al.) que se necesita para amplificar cada gen, una baja expresión del gen significa Ct más altos. También se verificó la contaminación o dímeros de partidor mediante la curva de melt y la eficiencia del RT-qPCR que debe oscilar entre 80 y 100.

Una vez obtenidos los Ct de cada gen, estos comparados con los valores Ct del control endógeno mediante el cálculo del RT-qPCR $\Delta\Delta$ Ct. Se obtuvo **(1)** Bid (F1/R1) a una concentración de $0.5 \mu\text{M}$ con sus respectivos controles negativos por cada T_m . **(2)** En las casillas de arriba corresponde al partidor de Caspasa 9 (F1/R1) y en las casillas de abajo se analizó el partidor de C-jun (F1/R1), ambas a una concentración de $0.5 \mu\text{M}$. **(3)** La casilla de arriba se observa el partidor de Diablo (F1/R1) a una concentración de $0.4 \mu\text{M}$ y abajo se encuentra P53 (F1/R1) a una concentración de $0.5 \mu\text{M}$.

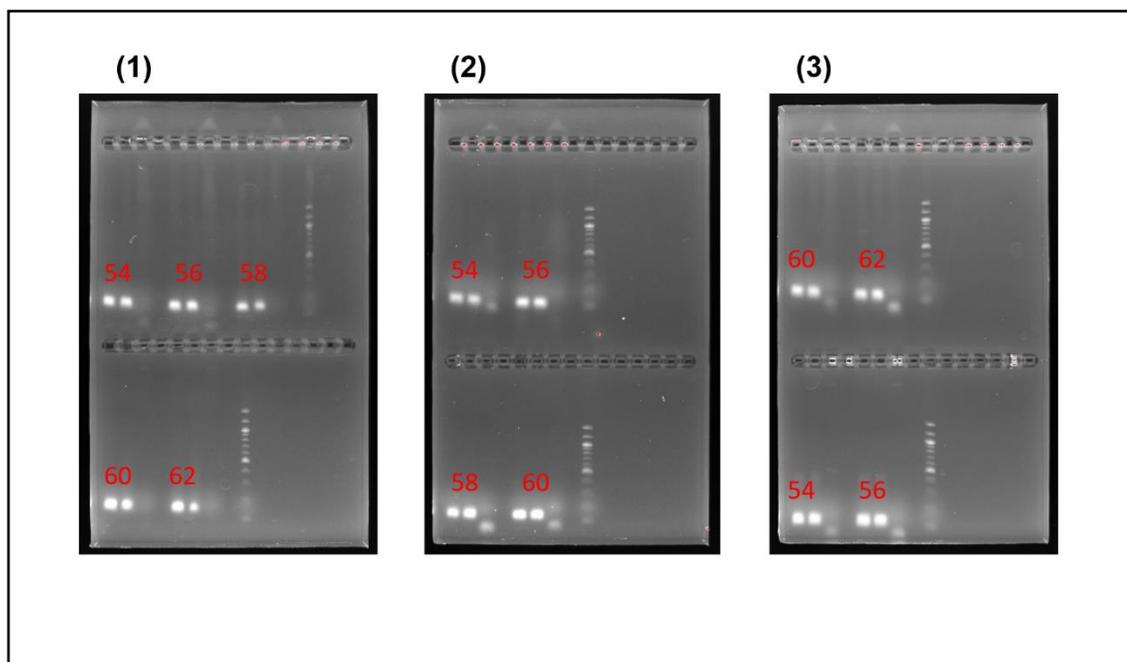


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de para evaluación de la estandarización de los partidores diseñados. El Tm de alineamiento a la que amplifican los partidores se identificó visualizando una franja densa a la altura de 1Kb en comparación al Ladder para ARNm y de tamaño similares con su réplica. Los Tm no óptimos se visualizaron como una franja borrosa/tenue y distinto grosor con su réplica, indicando dimerización e inespecificidad, además de la presencia de la amplificación del control negativo.

Tabla 3. Estandarización de partidores. Indica la temperatura y concentración a la que cada partidador amplifica de mejor manera mediante PCR convencional y visualizados por gel de agarosa.

Partidor (F1/R1)	Tm (°C)	Concentración (µM)
Caspasa 9	56	0.5
TNFα	56	0.5
P53	56	0.5
Bid	56	0.5
C-jun	58	0.5
Bcl-2	58	0.5
IAP/XIAP	60	0.5
Diablo	60	0.4

Evaluación expresión relativa de genes apoptóticos en las branquias del salmón Atlántico.

Se graficaron los valores obtenidos de $\Delta\Delta$ Ct de cada gen en relación a FW, GSC y SS, y se construyeron aplicando la herramienta de Kruskal- Wallis con comparación múltiple. De los ocho ARNms apoptóticos evaluados: Bid, Caspasa 9 y Bcl-2 no presentan diferencias significativas (P-value > 0.05) en la expresión relativa entre las estrategias de transferencia a mar (Fig. 6). Los otros genes: p53, C-jun, IAP/XIAP, TNFα y Diablo presentaron diferencias significativas

(P-value < 0.05) de los grupos de interés en comparación al grupo control FW (Fig. 7), evidenciando que la mayoría presenta una sobre expresión de genes apoptóticos en la estrategia GSC, al contrario del gen p53 que se expresa altamente en FW. Los genes C-jun, Diablo e IAP/XIAP presentan diferencias significativas relativa en el grupo GSC. Diablo y IAP/XIAP se expresan en los tres grupos en un nivel parecido, siendo que IAP/XIAP tiene por función inhibir la ruta de la apoptosis interfiriendo especialmente en el gen Caspasa 9 y Diablo es un gen pro-apoptótico que activa la Caspasa 9 y regula negativamente al inhibidor de apoptosis IAP/XIAP, con lo anterior se esperaría que ambos genes Diablo y IAP/XIAP se expresen diferencialmente por la acción de una sobre la otra. Se observa que el gen P53 y TNF α tienen diferencias significativas de expresión en el grupo SS, en p53 su diferencia es significativa con respecto al grupo control FW y en TNF α con respecto al grupo GSC.

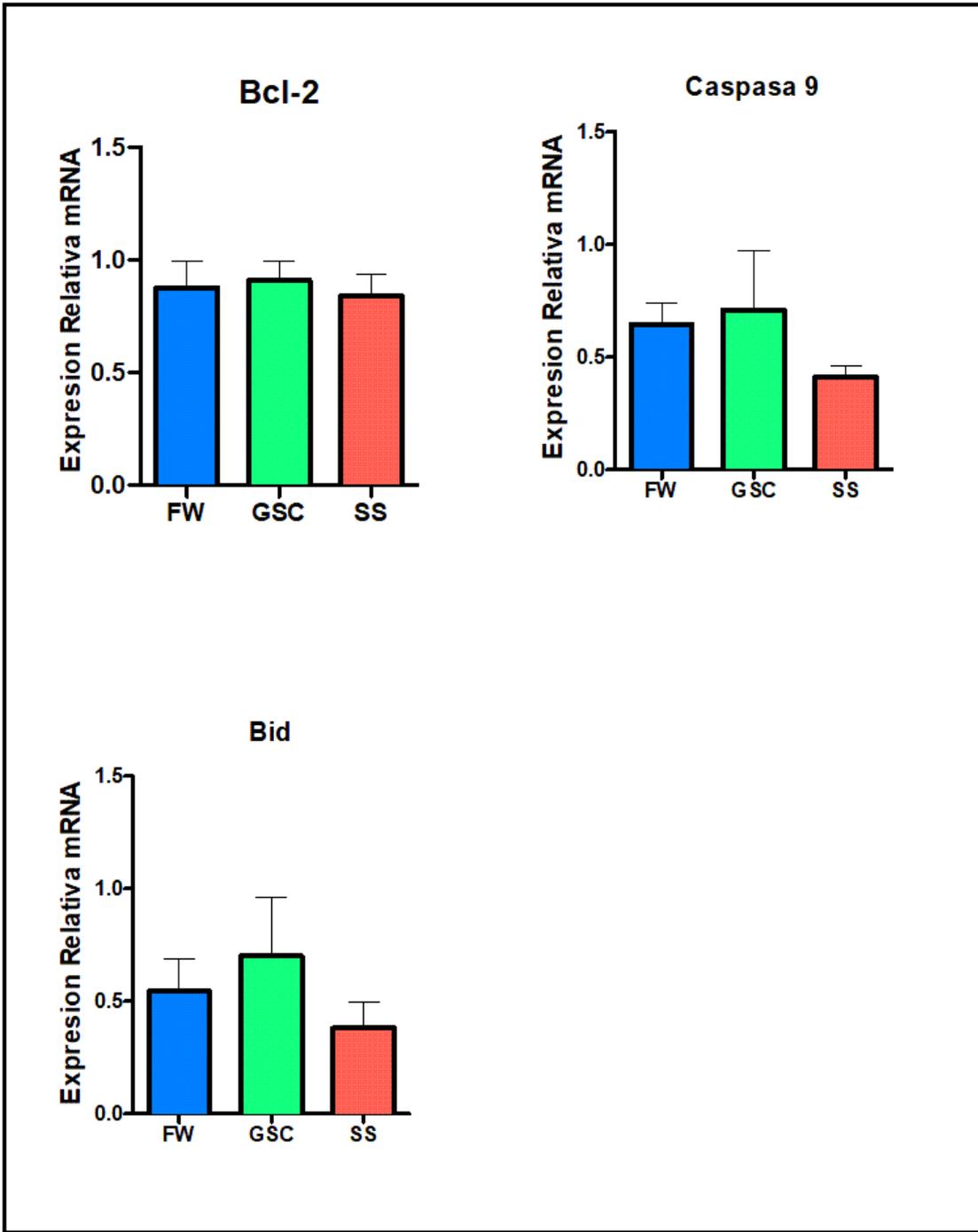


Figura 6. Gráficos expresión relativa de ARNs apoptóticos sin diferencias significativas. En el gen Bcl-2 los grupos de interés FW, GSC y SS están relativamente expresados prácticamente al mismo nivel. P-value Bid = 0.161, Caspasa 9 = 0.192, Bcl-2 = 0.105.

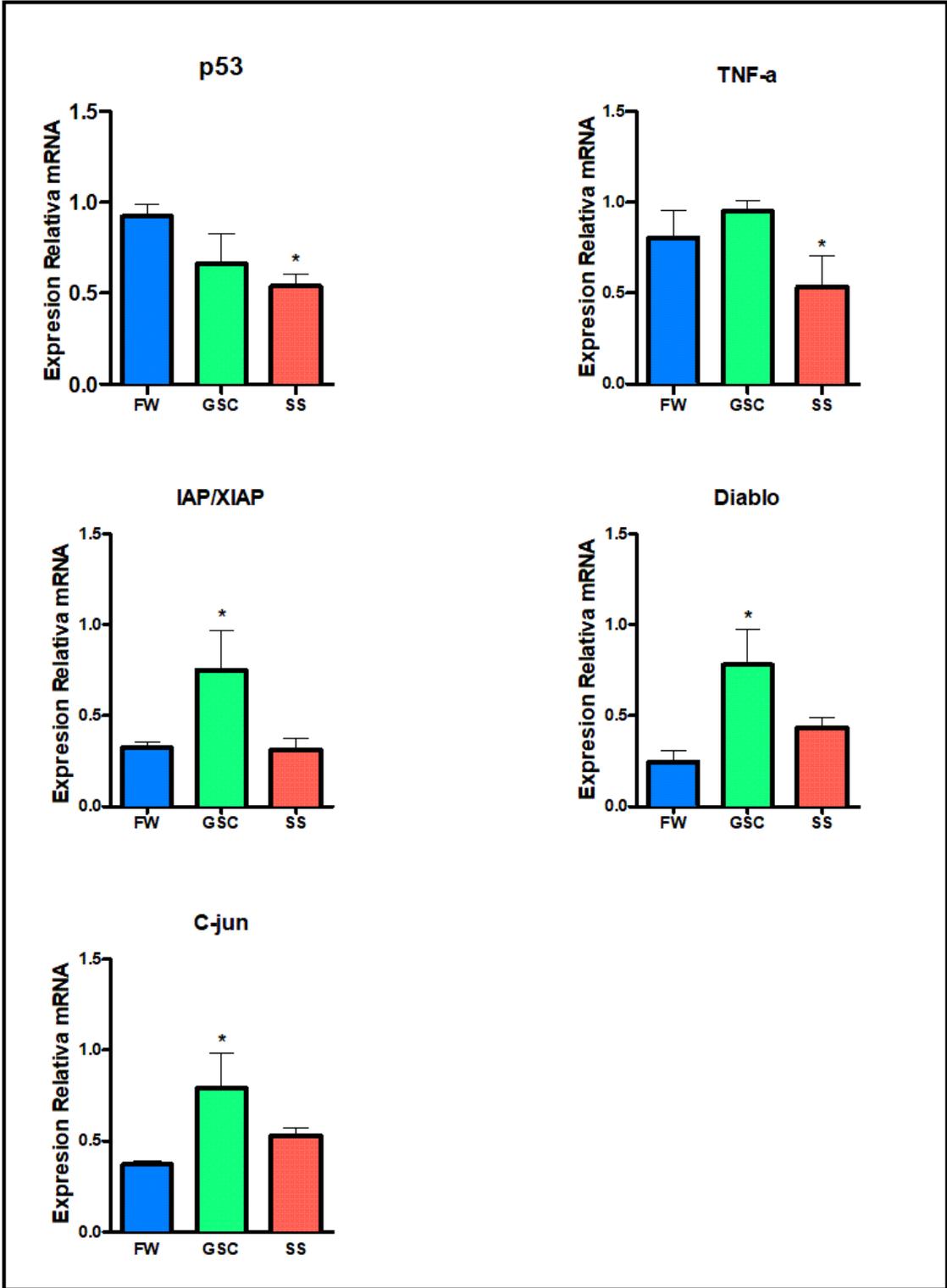


Figura 7. Gráficos expresión relativa ARNms significativos. Expresión relativa de genes apoptóticos con diferencia significativa (P-value < 0.05) respecto al FW. P-value: C-Jun= 0,003, Diablo=0,014, IAP/XIAP= 0,014, P53= 0,034, TNF α =0,050. Expresión relativa. * indica P-value < 0.05 en comparación con FW.

Con los resultados obtenidos anteriormente se construyó un perfil de expresión de los 8 genes apoptóticos analizados (Fig. 8). Se observan que la mayoría de los ARNms apoptóticos con patrón marcado de expresión génica entre los grupos de interés, están sobre expresados en el grupo GSC y levemente expresados en FW y SS, y otros genes están sobre expresados en FW y GSC, pero en SS se observan con una baja expresión génica. Los genes con marcadas diferencias son justamente los que presentan diferencias significativas entre los grupos: Bid, IAP/XIAP, Diablo, C-jun y TNF α .

Todos los genes tienen en común presentar sobre expresión génica en el grupo GSC. Los genes TNF α y p53 tienen una baja expresión en SS en comparación a FW. El gen Bcl-2 en particular se diferencia de los demás genes apoptóticos por expresarse altamente en los tres grupos de interés siendo un inhibidor de la apoptosis regulando la salida y entrada de iones. Al contrario, los genes: C-jun, Diablo, IAP/XIAP y Bid que se sobre expresan en GSC como los demás genes apoptóticos analizados, pero la diferencia radica que ellos tienen una marcada diferencia de expresión, es decir, mientras se activan en el grupo GSC, en FW y SS están desactivados de manera que son candidatos para indicador de estrés salino.

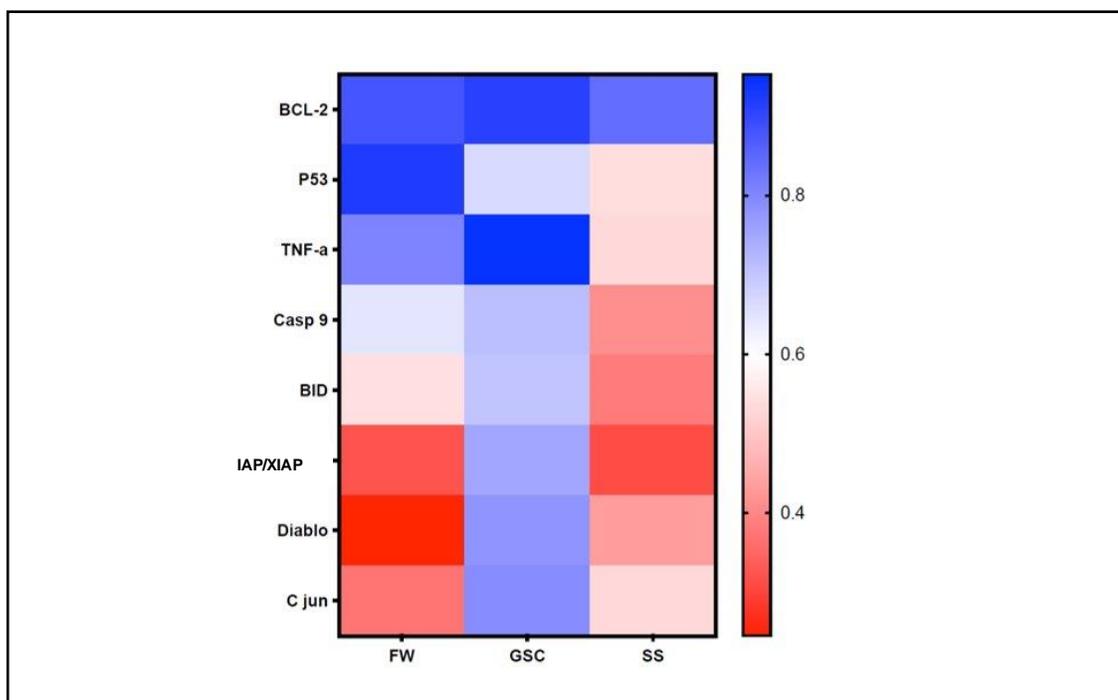


Figura 8. Heatmap ARNms producto RT-qPCR. Perfil de expresión de ARNms dentro de la ruta de la apoptosis en referencia a las estrategias de transferencia a mar. Tonos azulados marcados indican una alta expresión del gen apoptótico y tonos rojizos fuertes representan baja expresión génica en comparación al control endógeno en los grupos FW, GSC y SS. Construido con valores RT-qPCR $\Delta\Delta Ct$.

En la figura 9 se muestra el perfil de expresión de los ARNms analizados por RT-qPCR para cada grupo experimental dentro de la ruta de la apoptosis, según como los genes se activan o inhiben a diferentes regímenes de salinidad. Se visualiza un dominio de la ruta intrínseca durante GSC para generar el cuerpo apoptótico por medio de la activación de caspasas 3 y 7.

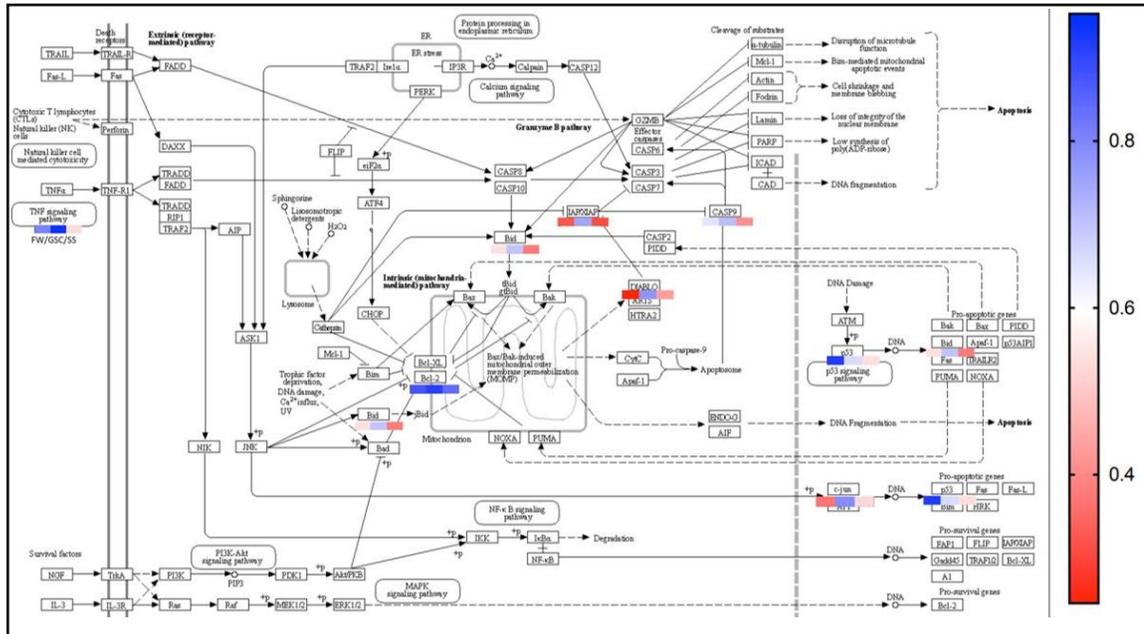


Figura 9. Ruta de la apoptosis en salmón del Atlántico. Tonos azulados indican una alta expresión del gen en comparación a FW y colores rojos nos señala una baja o nula expresión del gen en comparación a FW.

Predicción genes blancos para microARNs y análisis de expresión

Se realizó una búsqueda *in silico* de los genes blanco de miARNs branquiales, previamente secuenciados (Valenzuela-Munoz et al., 2021). Para ello se utilizó la zona 3'UTR de los 18 ARNms apoptóticos seleccionados bibliográficamente. Mediante RNA-seq se construyó un heatmap donde se compararon los patrones de expresión de los miARNs que presentan putativamente un rol regulatorio sobre genes branquiales de la ruta de la apoptosis en salmón del atlántico (Fig. 10). Además, se realizó diagrama de Venn de las secuencias de miARNs expresados diferencialmente entre ambas estrategias con respecto al grupo FW (Fig. 11). Posteriormente, se realizó una predicción de los ARNms apoptóticos branquiales blancos de miARNs branquiales, para luego filtrar los microARNs que estarían modulando los ARNms con diferencias de expresión relativa significativas en la ruta de la apoptosis entre los grupos FW, GSC y SS. Los candidatos para posterior análisis por RT-qPCR

fueron aquellos miARNs que mostraron mayor probabilidad de unión a la zona 3'UTR del gen blanco y aquellos que tenían partidores disponibles en el laboratorio (Tabla 4), los genes blancos fueron: IAP/XIAP, C-jun, P53, Diablo y TNF α .

Se observa contraste en el nivel expresión de los miARNs entre los clústeres, en el clúster 1 tiene una sobre expresión de miARNs en SS, el clúster 2 los miARNs se sobre expresan en GSC y el clúster 3 hay una sobre expresión en FW. Esto nos indica que los miARNs branquiales si pueden estar ejerciendo un silenciamiento en los genes de la ruta de la apoptosis dependiendo a la salinidad en que se exponga el salmón del Atlántico (Fig. 10).

Se construyó un diagrama de Venn con los miARNs asociados que se expresan exclusivamente según sea el régimen de salinidad en comparación al grupo control de agua dulce (FW). El círculo amarillo indica que en el grupo de shock salino (SS) hay 32 miARNs que se expresan sobre 1 de fold change en comparación a FW. El círculo celeste representa el régimen de cambio gradual de salinidad (GSC) donde hay 15 miARNs expresados exclusivamente en este grupo en comparación a FW. La intersección entre los círculos indica los miARNs que se expresan en ambas estrategias. Durante GSC los miARNs branquiales están reducidos en cantidad comprado con SS, esto sugiere que los miARNs durante SS pueden estar inhibiendo la apoptosis durante la esmoltificación del salmón del Atlántico.

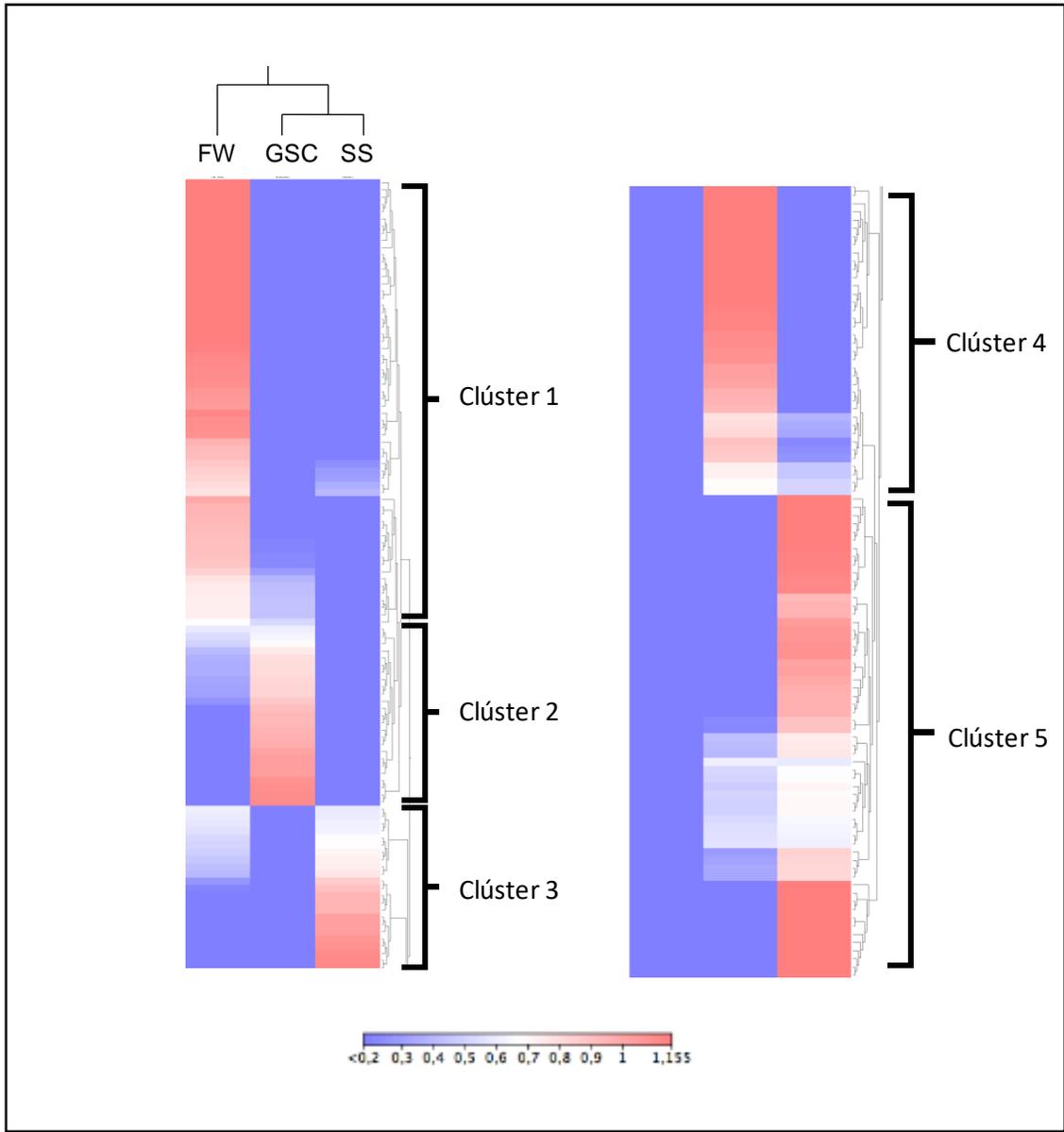


Figura 10. Heatmap miARNs branquiales de salmón Atlántico. Perfil de expresión de los miARNs branquiales y la secuencia de la zona 3' UTR de los ARNms apoptóticos con relación a SS, GSC y el grupo FW. En azul se indican una baja expresión de los miARNs y en rojo se indican una sobre expresión de los miARN en relación con las estrategias de transferencia a mar.

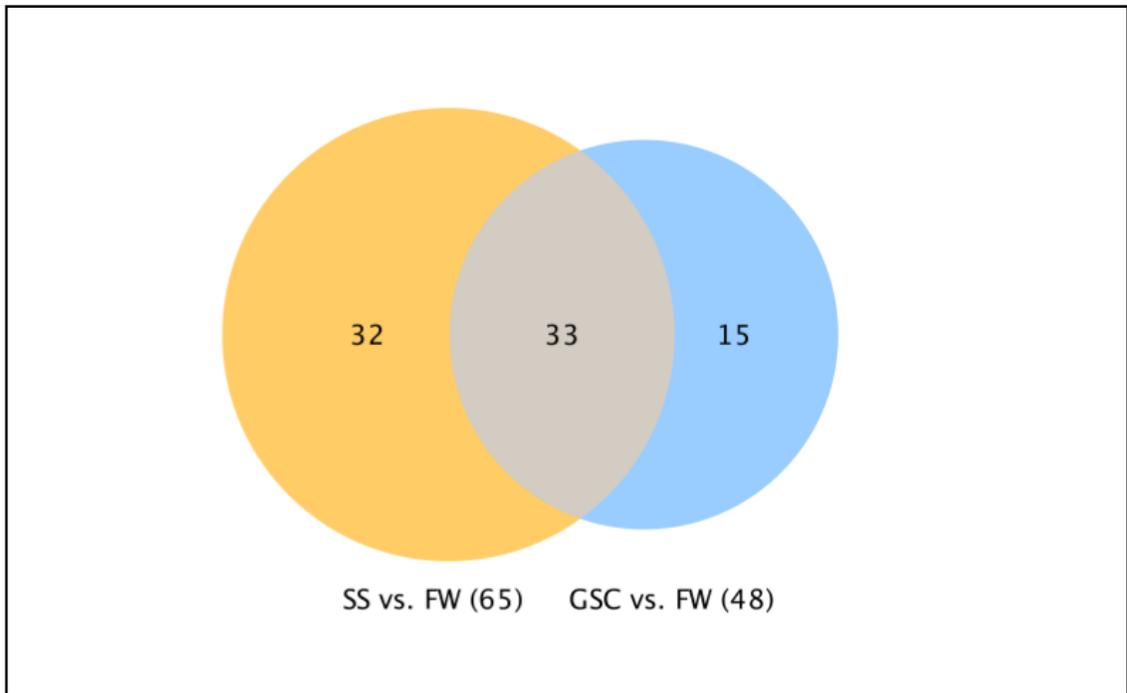


Figura 11. Diagrama de Venn miARNs asociados a genes apoptóticos en branquias de salmón del Atlántico. Expresión diferencial con valores fold change= 1 & P-value= 0,05

Tabla 4. miARNs seleccionados. Tabla de microARNs branquiales que modulan a su gen blanco con probabilidad de unión $\Delta G > -12.00$ que se utilizarán para análisis RT-qPCR y compararlo con los resultados de RT-qPCR de los mARNs blanco.

ARNm	miARN	$-\Delta G$
P53	18a-5p	12.50
IAP/XIAP	301-3p	14.80
C-Jun	129-3-3p	16.70
TNF α	26a-5p	12.30
	33b-3p	14.40

Evaluación expresión relativa de microARNs en las branquias del salmón Atlántico

RT-qPCR miARNs

Con el software Graphad Prism 5 se realizó el mismo procedimiento utilizado para graficar los ARNms apoptóticos por medio de los valores $\Delta\Delta Ct$ (Fig. 6 & 7), con los miARNs seleccionados: 129-3-3p, 18a-5p, 26a-5Ref, 33b-3p y 301b-3p, los que no mostraron diferencias significativas (P-value > 0.05) en la expresión relativa de los grupos FW, GSC y SS. Ningún miARN presentó diferencias significativas, se observa que hay una notable diferencia de expresión de los miARNs frente a los tres grupos de interés a excepción del miARN 129-3-3p. Estas diferencias de expresión relativa de miARNs aunque no significativas entre los grupos de interés podrían indicar una relación en la modulación del gen blanco correspondiente, imitando su patrón de expresión relativa a diferente estrés salino para modular así la expresión del gen blanco.

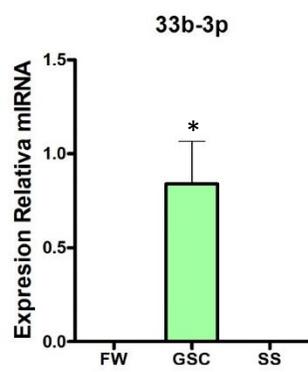
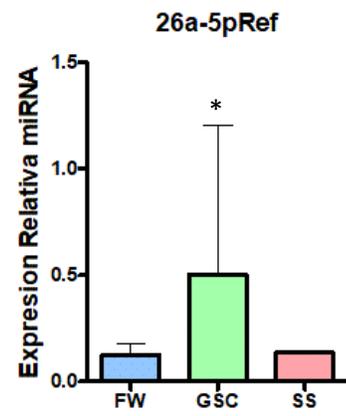
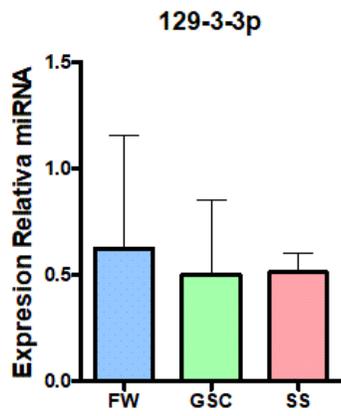
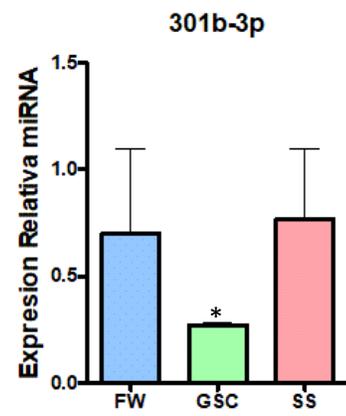
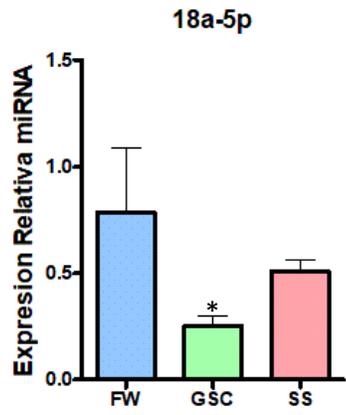


Figura 12. Gráficos expresión relativa miARNs. Expresión relativa de miARNs respecto al FW. Ninguno presentó diferencias significativas en su expresión relativa (P-value > 0.05). Expresión relativa P-value < 0.05 en comparación con FW. Valores P-value 18a-5p=0.101, 129-3-3p=1.000, 26a-5Ref=1.000, 33b-3p=0.101, 301b-3p=0.156.

Análisis de componentes principales (PCA) ARNms y miARNs branquiales en la ruta de la apoptosis

Mediante el programa Rstudio se construyó un análisis de componentes principales (por sus siglas en inglés, PCA) de los miARNs y ARNms blanco de la ruta de la apoptosis con valores RT-qPCR $\Delta\Delta$ Ct (Fig. 13). Se observa en la figura que los grupos FW, GSC y SS están distante en el plano, esto quiere decir, que hay evidentes diferencias en la expresión de los genes de la ruta de la apoptosis y de los microARNs branquiales entre los regímenes de salinidad para el salmón del Atlántico. Destaca el gen p53 que se sobre expresa en FW, debido a que manifiesta dentro de la elipse azul al igual que el miARN ssa_miR.18a.5p que tiene probabilidad de unión a la zona 3'UTR de p53, este comportamiento del miARN imita un patrón de expresión relativa parecido al de p53 para putativamente inhibir su expresión en FW. También destaca el inhibidor de apoptosis IAP/XIAP que se encuentra altamente expresado en GSC, pero su miARN ssa_miR.301b-3p presenta una expresión inversa a IAP/XIAP, está cerca del grupo SS. Se infiere que no hay acción directa del miARN ssa_miR.301b-3p en la modulación del gen IAP/XIAP durante GSC, pero si en el grupo FW y SS donde habría mayor daño celular por apoptosis en las branquias de salmón Atlántico. Esta evidencia nos plantea que el miARN ssa_miR.301b-3p puede ser marcador de estrés salino por su acción inversa de su expresión relativa en el gen inhibidor de apoptosis IAP/XIAP. El mismo caso sucede con el gen C-jun y si miARN 129-3-3p en GSC, sus diferencias de expresión son marcadas, pero en menor nivel que IAP/XIAP. El caso del gen TNF α se manifiesta cercano a la elipse del grupo GSC, pero también de a la de FW, es decir, su expresión relativa no está bien definida dentro del plano y su miARN 26a-5Ref muestra una alta

expresión en GSC, nos indica que puede estar regulando la expresión relativa de TNF α en GSC, en el clúster 2 los genes se expresan en FW y en el clúster 3 los genes se expresan en SS.

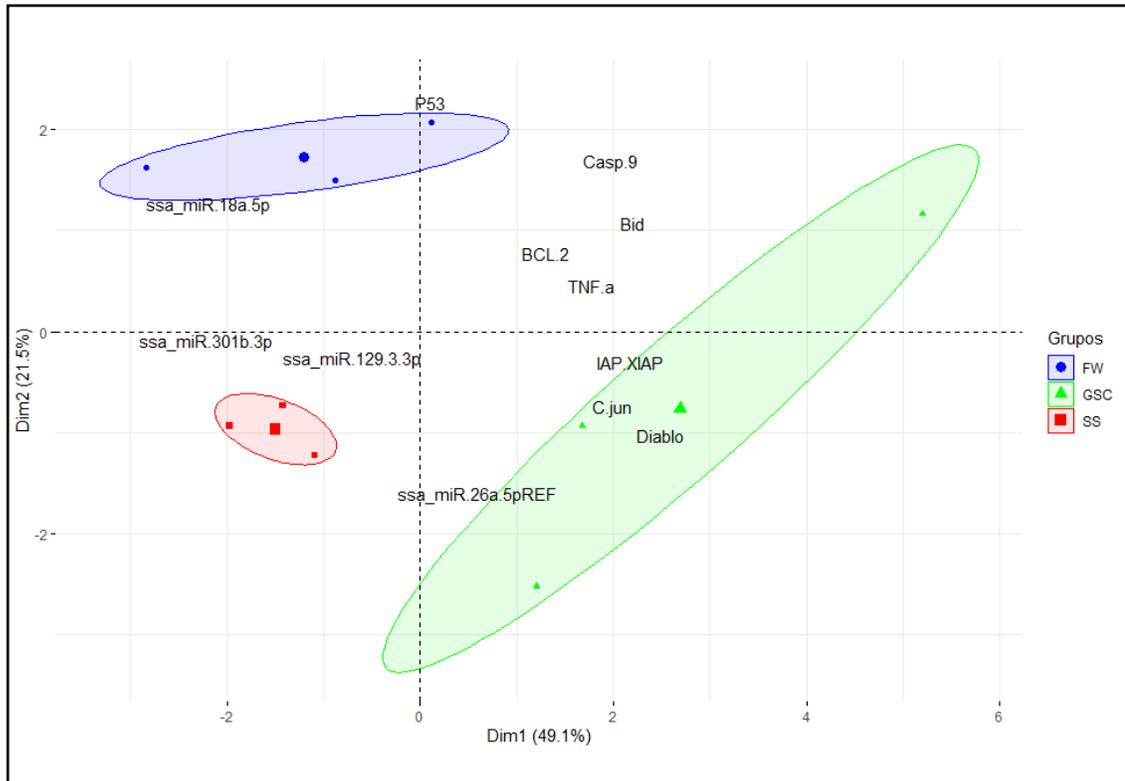


Figura 13. PCA ARNMs y miARNs branquiales en la ruta de la apoptosis. Los grupos se representan en distintos ejes como una elipse que abarcan tanto los miARN con probabilidad de unión y los ARNMs apoptóticos blancos, el grupo FW se representa como la elipse azul, GSC elipse verde y SS elipse roja.

Análisis transcriptómico de la vía inmunidad TLR en peces esmolts

RNA-seq vía TLR

Se realizó el mismo procedimiento de análisis *in silico* para el RNA-seq de la vía de la apoptosis. Las secuencias de ARNMs pertenecientes a la vía TLR fueron comparados con las secuencias de ARNMs branquiales en las condiciones de salinidad FW, GSC y SS en salmón Atlántico. Las diferencias de

expresión de ARNms vía TLR y los grupos de interés son visualizados mediante la construcción de Heat Map (Fig. 14). Para ambas estrategias de SS y GSC, se compararon los patrones de expresión de ARNms TLR con respecto el grupo control FW, donde se observa un contraste de expresión por TPM entre los clústeres. El dominio de los genes TLR pertenecientes al clúster 1 se sobre expresan en el grupo SS, los genes del clúster 2 se expresan en mayormente en GSC, el clúster 3 los genes se expresan durante FW, en el clúster 4 los genes se sobre expresan en GSC, pero no con una diferencia marcada con los demás grupos y, finalmente, los genes pertenecientes al clúster 5 se sobre expresan notablemente en FW.

Los genes que conducen a la apoptosis por medio de la ruta de inmunidad TLR se agrupan mayormente en el clúster 1 (FADD, TOLLIP, caspasa 8, TLR2 y TLR6) y en el clúster 2 (MyD88 y TIRAP). Esto indica que durante la estrategia SS hay mayor actividad para generar una respuesta inmunitaria y adaptativa por medio de la activación de genes que desencadenan en apoptosis (Tab. 5).

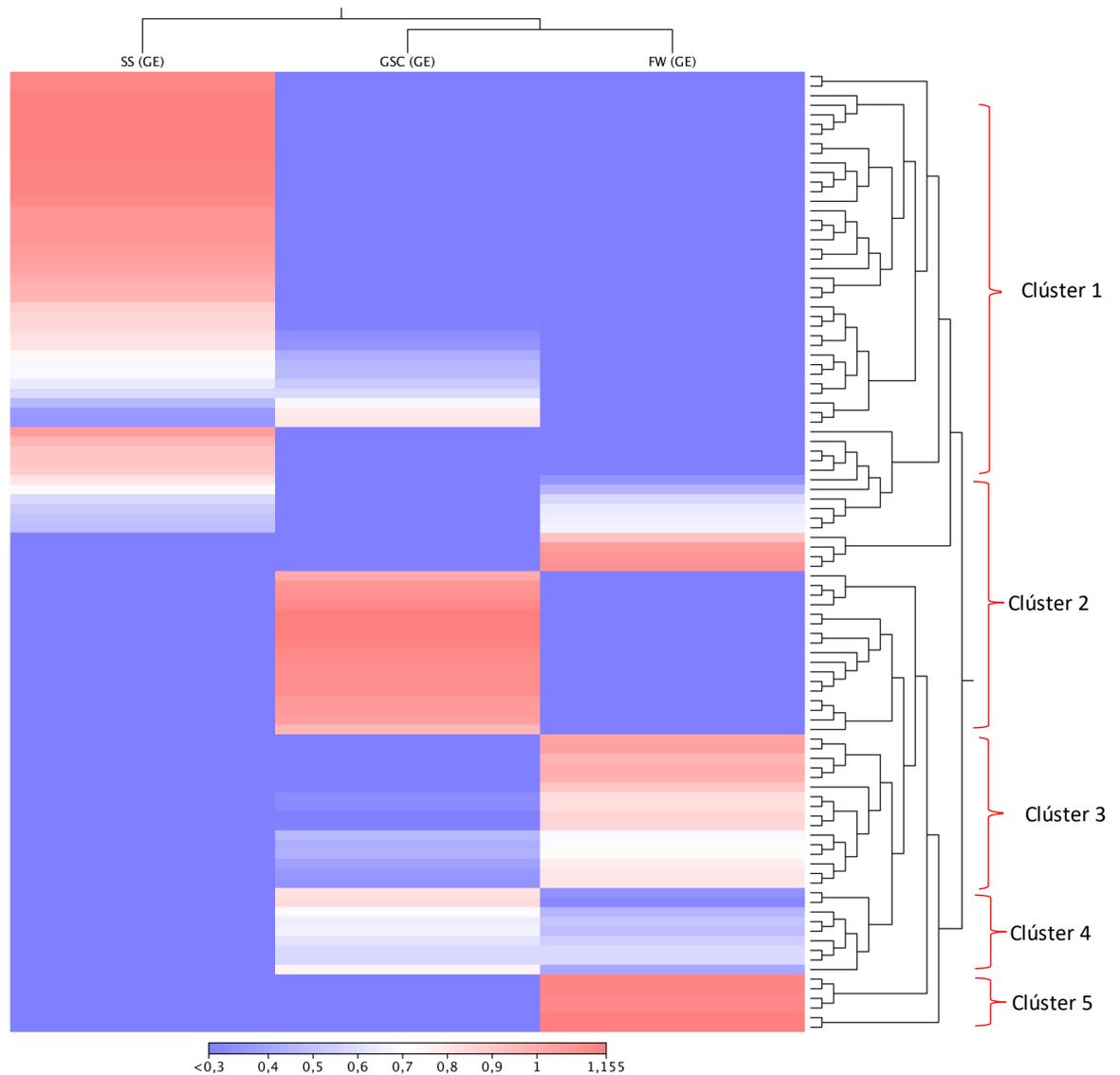


Figura 14. Heatmap ARNs vía TLR en branquias. Perfil de expresión de ARNs de la vía TLR durante los regímenes de salinidad en FW, GSC y SS en branquias. Tonos rojizos representan una sobre expresión de las secuencias ARNs TLR y tonos azulados indican una baja o nula expresión TPM en los genes de la vía TLR en comparación al grupo control FW. Fold change =1 & P-value= 0.05.

Tabla 5. Clúster de genes de la vía TLR identificados en el heatmap (fig. 14).

Los ARNm de inmunidad TLR se agrupan según es su nivel de expresión en GSC y SS en comparación a FW.

Clúster 1	Clúster 2	Clúster 3	Clúster 4	Clúster 5
NF-Kappa-B	TBK1	C-FOS	MAPK7	MAPK10
Ctk	CCL8	TRAF3	P38	MAP2K1
TNFa-1	MAPK-1	MKK6B	NF-B-P105	Interlukin-1 kinase-1
IL12B	CXL10	MAPK-7	Mkk6c	MAPK7
IRAK4	MYD88	Interferon-5	MAPK11	Mp2k2
TRL3	IRF7	TNFa-6	TGF-B MAP3K7	C-C chemokine 8
TLR13	SCYB7	TNFa-5	MAPK10	
IKBA	MK03	INF-a	TLR9	
MAPK2	TLR13X1	Interlukin-12		
FADD	TIRAP	RIS-1		
TOLLIP	Interferón	TGF		
Cathepsin K	TRL22	RIPK-1		
TNFa-2	MK12	P4		
Mip2a	RAC	Homologo P64		
Phosphatidylinositol 3	CCL4	C-X-C-11		
INF-KAPPA-B	TNFa-3			
JUN	TLR7			
Permeability factor-2	TLR8			
AP-1	Interlukin-6			
IRF5	I20Ra			
NF-KAPPA-B p105	mapk-8			
M4K8	Tnr5			
TNFa	MAP3K7			
Ras-related C3				
C-X-C-9				
TLR5				
AKT2				
MK13				
STAT1				
Inteferon-a-3				
TLR13				
TIR				
Interlukin-1				
IL8				
P65				
TLR8				
LBP				
MAPK8				
IKKB				
MAPK1				
STAT1				
IFNA-1				
TLR2				
Inteferon-a3				
Capasasa 8				
TLR6				

Expresión diferencial ARNms vía TLR

Se identificaron genes de la vía inmunidad TLR diferencialmente regulados en ambos grupos de peces expuestos a las dos estrategias de transferencia a mar al ser comparados con FW. Los resultados son representados mediante la realización de diagrama de Venn. En el diagrama se observa la cantidad de genes que se expresan con un valor de fold change sobre 1 y están regulados exclusivamente según sea la estrategia de transferencia a mar (Fig. 15). Más detalle. El grupo SS contiene 24 ARNms expresados exclusivamente en SS frente al grupo FW (Bpi, Toll- 5, Tlr9, catk, phosphatidylinositol 4, phosphatidylinositol 3, FADD, TNF 6, MAP3K7, NF-k-B, INFK α , IKBA, MPAK2, mkk6b, mkk6c, MAPK7, MAPK11, mk13, JUN, TNF α , IL12B, RIC-serine/threonine 1, TNF-5 y LOC106581370). Entre las circunferencias contiene los ARNms que ambos grupos comparten, 11 ARNms se sobre expresan tanto en SS como en GSC frente a FW.

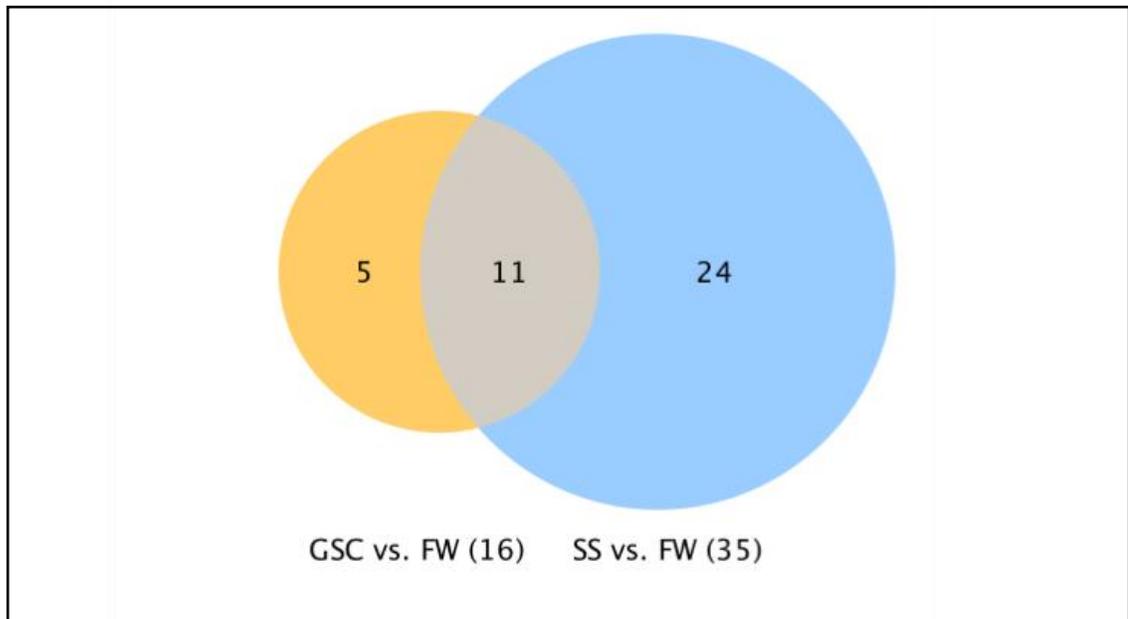


Figura 15. Diagrama de Venn vía TLR en branquias. Círculo amarillo contiene 5 ARNs expresados solo en GSC (TIRAP, Interleukin-6, CCL8 y Interferon, TLR13) en comparación al grupo FW. Fold change=1 & P-value= 0.05.

En la vía de inmunidad innata TLR en salmón del Atlántico, la respuesta que se genera por la transferencia de agua dulce a agua salada, puede activar genes que desencadenan en apoptosis. Se analizaron los genes que están relacionados a la ruta de la apoptosis dentro de la vía de inmunidad; TLR2, TLR6, TOLLIP, MyD88, FADD, TIRAP y Caspasa 8.

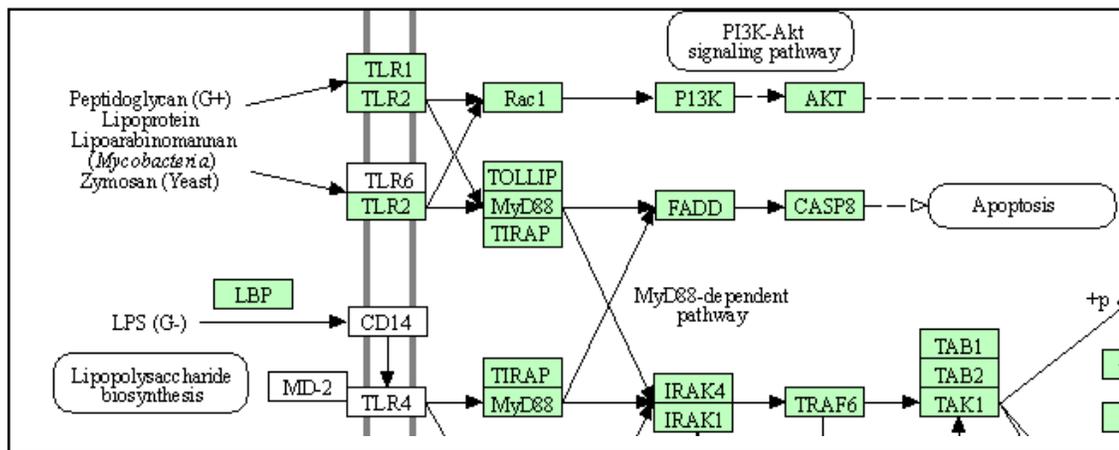


Figura 16. Vía TLR de inmunidad del salmón del Atlántico. Representación de los genes involucrados en una respuesta de apoptosis dentro de la ruta de inmunidad TLR.

PCA vía TLR vs. PCA apoptosis

Se construyeron análisis de PCA con valores de TPM en ambas rutas (Fig. 17). Los grupos FW, GSC y SS se separan entre sí en el plano, evidenciando que hay diferencias de expresión de sus respectivos genes según sea el régimen de salinidad.

Para ambas vías los grupos de interés se separan entre sí en el plano, indicando que hay marcadas diferencias de expresión entre los grupos de interés (Fig. 17). Se observa en general, que en el plano los genes TLR y apoptóticos están agrupados en lados distintos. Los genes TLR se aproximan mayormente al grupo SS, se infiere que hay una mayor actividad de la vía TLR para generar una respuesta inmune rápida frente a los diversos patógenos que habitan en agua de mar. Los genes apoptóticos se encuentran cercanos a los grupos FW y GSC. Sin embargo, destaca para el grupo GSC similar comportamiento de expresión para los genes Diablo y C-jun de la vía de apoptosis y de los genes TOLLIP y TIRAP de la vía TLR, sugiriendo una conexión por proximidad de estas rutas, aquello nos demuestra que hay una relación entre ambas rutas metabólicas durante GSC, debido a que los genes de inmunidad TLR reconocen además de patógenos, células.

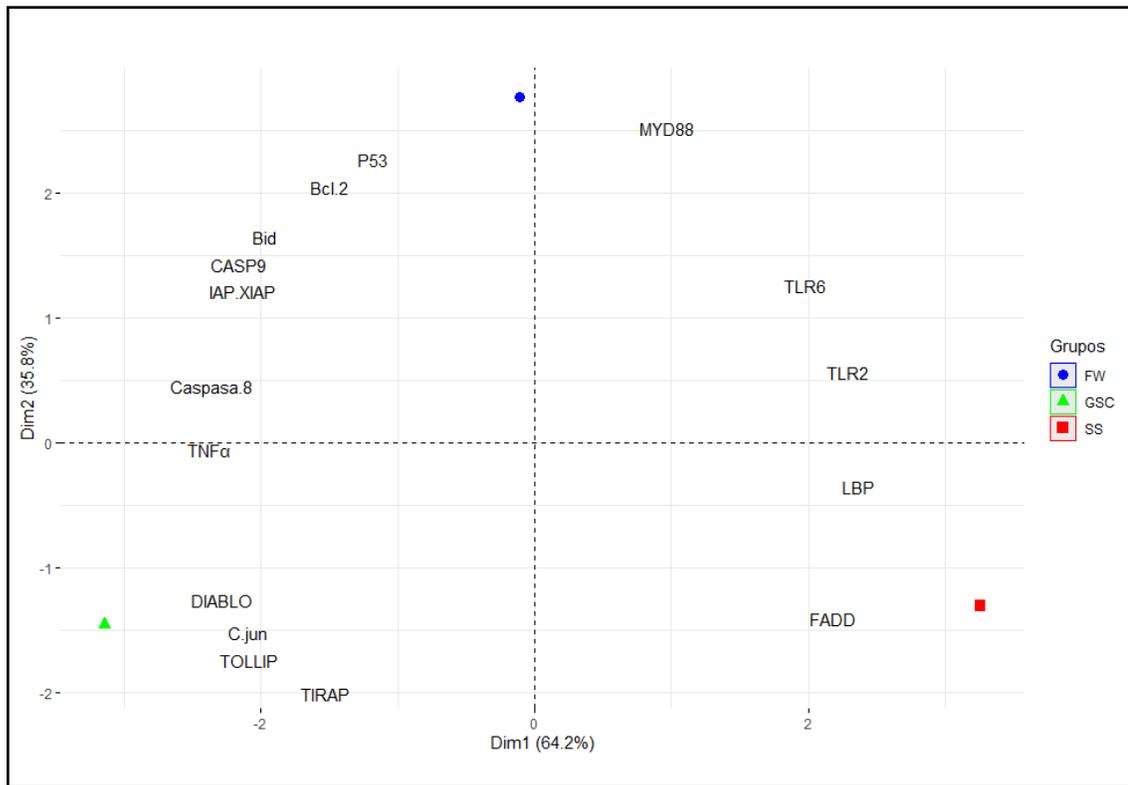


Figura 17. PCA de ARNms branquiales en la vía TLR y apoptosis. Construido con valores de TPM (RNA-seq) de genes de inmunidad de la vía TLR y apoptosis en relación con las estrategias de transferencia a mar FW, GSC y SS. Punto azul representa FW, triángulo verde es el grupo GSC y cuadrado rojo SS.

DISCUSIÓN

Durante varios sucesos del ciclo de vida del salmón se lleva a cabo la apoptosis, la cual es gatillada por estímulos externos como temperatura, salinidad, patógenos, sustancias tóxicas, y estímulos internos como los cambios hormonales. La apoptosis ocurre durante el desarrollo, crecimiento y ciclo normal de la célula, ayudando a la homeostasis celular de tejidos con alto nivel de proliferación celular como las branquias, esófago e intestino (AnvariFar, H. et al., 2017). Este mecanismo adaptativo está genéticamente controlado y la activación dependerá del tipo y nivel de estímulo que esté afectando la célula llevando a cabo la eliminación de células dañadas evitando la inflamación del tejido o bien puede desencadenar en una falta de estímulos para la sobrevivencia de la célula.

El salmón del Atlántico experimenta un evento crucial en su ciclo de vida que es la esmoltificación. Esta etapa consiste en el paso de agua dulce (parr) a agua de mar (esmolt). Durante la transformación suceden cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que lo preparan para la vida en agua de mar, donde crece y madura sexualmente, para luego desovar río arriba completando su ciclo de vida. Para aquello el individuo debe adaptarse a diversos estresores, principalmente al estrés por fluctuaciones salinas. El estrés causado por cambios de salinidad severos que se expone el salmón para esmoltificar, genera un daño principalmente en las macromoléculas de células branquiales, ya que es el órgano que conecta el medio externo al medio interno por medio de la osmosis. Durante el proceso de adaptación se generan una respuesta al estrés celular, como la protección y reparación de macromoléculas, detención del ciclo celular, y si se exceden los límites de tolerancia celular causado por estrés severo de salinidad se activa el mecanismo de apoptosis o muerte celular programada, la que se genera mediante la activación o inhibición de los genes pertenecientes a esta ruta metabólica, que a su vez es modulada por mecanismos post-transcripcionales por acción de microARNs. En este estudio, se evaluaron los cambios de expresión génica en la ruta de la apoptosis y su regulación medida

por miARNs durante el proceso de transferencia a agua de mar, en salmones transferidos mediante dos estrategias: una imita la vida silvestre de un salmón mediante un aumento progresivo de salinidad hasta llegar a la salinidad de agua de mar; y condiciones que normalmente se utilizan en salmonicultura para someter la esmoltificación mediante exposición desde agua dulce a agua de mar sin adaptación progresiva.

En la investigación de Ching et al. (2013) reportaron en células branquiales de perca trepadora (*Anabas testudineus*) expuestos a salinidad progresiva desde agua dulce a agua de mar, un alto nivel de expresión de caspasas en la ruta apoptótica, destacando la ruta intrínseca a través de la expresión de caspasa 9 por sobre la caspasa 8 de la ruta extrínseca, por lo tanto, los autores sugieren que hay mayor actividad apoptótica durante la salinidad progresiva, de esta manera al llegar al agua de mar concretar adaptativamente los cambios apoptóticos en el mecanismo osmótico de las branquias (Ching et al., 2013). De igual manera en este estudio, obtuvimos a través de valores TPM que caspasa 8 se expresa en GSC. Por otro lado, a través del análisis de expresión relativa de caspasa 9 se demostró una mayor expresión en GSC en comparación a SS. Los resultados nos indican que durante el cambio gradual de salinidad se expresan las caspasas para llevar a cabo la muerte celular por apoptosis en las células branquiales del salmón del Atlántico.

La sobre-expresión de la caspasa 9 durante GSC sugiere que la expresión de las caspasas efectoras 3 y 7, las cuales reciben la señal apoptótica intrínsecamente por parte de la caspasa 9, deben estar expresadas para llevar a cabo la apoptosis. A su vez, ambas caspasas efectoras están directamente relacionadas con el inhibidor de la apoptosis IAP/XIAP, gen que está sobre-expresado en GSC lo que puede estar contrarrestando la actividad apoptótica de las caspasas efectoras 3 y 7 que son gatilladas por la sobre expresión de caspasa 9. Por valores TPM, la expresión de caspasa 3 no destaca en las estrategias salinas de esmoltificación y la caspasa 7 tiene expresión en el grupo control de agua dulce pero no hay grandes diferencias, al igual que en los resultados de

Ching et al. (2013) donde las caspasas 3 y 7 presentaron baja expresión durante el cambio progresivo de salinidad. Por otro lado, la expresión de caspasa 6, al igual que las caspasas 3 y 7, tampoco presenta grandes diferencias de expresión por TPM entre las estrategias salinas, pero se diferencia en que la caspasa 6 no es modulada por el inhibidor de apoptosis IAP/XIAP. Con estos resultados se infiere que la señalización por parte de caspasa 9 está “deficiente” para lograr estimular la expresión de las caspasas 6, 7 y 3, además que estas dos últimas están siendo moduladas negativamente por parte de IAP/XIAP, para finalmente no concretar la señalización de apoptosis en células branquiales durante GSC.

El gen Diablo regula negativamente a IAP/XIAP como se ha reportado en humanos (Liu et al., 2000), nuestros resultados indican una sobre expresión relativa de este gen durante GSC, lo que podría indicar que el gen Diablo se está expresando de igual manera que IAP/XIAP para contrarrestar su expresión y desencadenar la señalización en apoptosis.

P53 es un gen pro apoptótico que tiene una ruta extrínseca y una dependiente de caspasas (Ziegler et al., 1994) . P53 responde al daño del ADN protegiendo el genoma mediante la activación de la apoptosis, por lo tanto, células sanas presentan bajos niveles de p53 (Amaral, Xavier et al. 2010). En el mismo estudio de Ching, 2013 reportaron que el gen p53 aumenta su actividad durante la aclimatación progresiva al agua de mar y baja su actividad durante la aclimatación en el periodo de máxima salinidad igualando la expresión a la del grupo control de agua dulce (Ching et al., 2013). En este estudio se obtuvo por medio de expresión relativa que la expresión de p53 tiene una baja expresión en choque salino con respecto al grupo control de agua dulce. Puede que al esmoltificar mediante un choque salino se produce otro tipo de daño celular que desencadena en apoptosis y no un daño en el ADN. Otra posibilidad puede que durante FW las células branquiales sintetizan mayores cantidades de p53 a modo de preparación al daño en el ADN que le afectará por las fluctuaciones salinas al que se expondrá el salmón para el proceso de esmoltificación y baja el porcentaje

de p53 al llegar a la máxima salinidad como un posible término en el proceso de apoptosis.

Los miARNs son determinantes dentro de la ruta de la apoptosis y van a orquestar la expresión de los genes apoptóticos, que a su vez estos genes estarán ejerciendo una función como inhibidor o pro apoptótico. De los resultados obtenidos en este estudio, se propone un modelo complementario para la identificación del tiempo de esmoltificación en el salmón del atlántico, a través del análisis de microARNs claves durante el proceso de apoptosis. Por ejemplo, en este estudio el microARN miR-18a-5p se expresa de igual manera que su gen blanco p53 durante FW, es decir, tanto ARNm y miARN se “apagan” o se inhiben en ambas condiciones salinas de esmoltificación. Lo que comenta en el estudio de Amaral et al. (2010) es que en humanos las células sanas presentan bajos niveles de p53 y altos niveles de p53 en la célula desencadenan en apoptosis. En los resultados obtenidos en este estudio indican un alto nivel de expresión de p53 en condiciones de 0 salinidad de FW en donde no hay un factor externo severo que provoque un daño en las células branquiales del salmón del Atlántico. Además, p53 está relacionado con el proceso de autofagia que actúa en la respuesta inmunitaria innata, cuando la respuesta inmune no se concreta, se activa la ruta de la apoptosis, es decir, p53 a bajos niveles lleva a cabo la autofagia para proteger la diferenciación celular en condiciones normales de FW y a altos niveles desencadena en apoptosis para la respuesta de inmunidad innata adaptativa (Amaral et al., 2010). El resultado obtenido puede ser debido a que el salmón del Atlántico se está “preparando” para esmoltificar, por lo tanto, al estrés severo de fluctuaciones salinas para una posterior respuesta rápida por parte del gen p53 para concretar la apoptosis provocada por cambios salinos tanto en GSC como en SS.

Por otra parte, el microARN 301-3p tiene alta probabilidad de unión al inhibidor de apoptosis IAP/XIAP y se expresa diferencialmente de su gen blanco durante la estrategia GSC, debido a que en el PCA de apoptosis (Fig. 8) el miARN 301-3p se sobre expresa en los grupos SS y FW al contrario que su gen blanco IAP/XIAP. Esto indica que el miARN 301-3p podría ejercer una acción directa sobre la expresión del gen IAP/XIAP en ambas condiciones salinas, es por ello, que se propone el miARN 301-3p como un indicador complementario de estrés salino por esmoltificación en salmón del Atlántico. El gen IAP/XIAP en humanos durante la ruta de la apoptosis, tiene por función inhibir la expresión de las caspasas, genes clave dentro de la ruta de la apoptosis (Eckelman et al., 2006). Este gen se sobre expresa en GSC, es decir, inhibe en un alto nivel la apoptosis durante el cambio gradual de salinidad, indicando que la esmoltificación a través de la estrategia de transferencia a mar por GSC es menos dañina para las células branquiales del salmón del Atlántico.

Vía TLR

Los receptores de membrana (TLRs) pertenecen al sistema inmune innato de los mamíferos, los cuales reconocen PRR (receptores de reconocimiento de patrones) y a su vez reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y patrones asociados a daño de un tejido, iniciando una cascada de señalización frente el agente infeccioso o el daño del tejido (León-Pedroza et al., 2015). Esta señalización tomará distintas rutas dentro de la vía TLR según sea el estímulo recibido. Una de ellas es por medio de una respuesta inflamatoria, en la cual el tejido exhibe niveles altos de factores inflamatorios, y agiliza la infiltración de células inmunes como macrófagos para combatir este patógeno sin inducir una lesión en el tejido o pérdida de sus funciones primarias. Por otro lado, la apoptosis también es una posible respuesta dentro de la vía TLR, la activación elimina las células infectadas para que no se propague la descendencia del virus en el

organismo, además de eliminar células dañadas o evitar la proliferación excesivas de células (Kaiser and Offermann, 2005).

Los cambios ambientales, como aumento de salinidad, no solo afectan los procesos fisiológicos, principalmente para mantener un equilibrio osmótico mediante el aumento de células clorhídricas en el epitelio branquial, ricas en actividad Na⁺/K⁺-ATPase y posterior eliminación de células epiteliales branquial por medio de la apoptosis (Sardella et al., 2004; Wendelaar Bonga and Van der Meij, 1989). También el aumento en la salinidad cambia el nivel de expresión de genes de inmunidad, por medio de la vía TLR, que genera una respuesta inmune innata (Gu et al., 2018). Se han reportado 16 TLRs en peces teleósteos entre ellos; TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR7, TLR8 y TLR9. TLR 22 se ha descrito solo en anfibios y teleósteos (Panda et al., 2014). En Li et al. (2020) evaluaron en las branquias de la anguila japónica (*Anguilla japonica*) varias rutas de respuesta inmune a distintas salinidades, proponen que a bajas salinidades se induce a una expresión marcada en genes de inmunidad en la anguila, pero muestran que la expresión de TLR2 en branquias aumenta excesivamente por medio de un choque salino en el día 1 y luego a medida que se aclimata, TLR2 disminuye drásticamente su expresión en el día 3 (Li et al., 2020). Por otro lado, en el estudio de Gu et al. (2018), indican altos niveles de expresión de TLR2 branquial, el que disminuye en condiciones salinas altas en la anguila japónica (Gu et al. 2018). En nuestro estudio por medio de análisis *in silico* obtuvimos que el ARNm branquial TLR2 se expresa en choque salino (Fig. 14).

Los genes analizados, que participan en la vía de inmunidad innata TLR en el salmón del Atlántico durante la transferencia a agua de mar, mostraron que la mayoría de estos genes se expresan altamente en la estrategia salina SS. Al pasar de FW a SS con 1 semana de aclimatación, se infiere que aumenta la proliferación celular del tejido epitelial branquial para copar la necesidad de osmorregulación, y este aumento, conlleva a muerte celular de las células branquiales. Este daño es reconocido por los TLRs de la membrana los cuales dan la señalización dentro de la vía de inmunidad TLR para generar una

respuesta adaptativa mediante la apoptosis. La relación con la vía TLR y la ruta de la apoptosis se ve reflejado en el PCA (Fig.17), en el cual se observa expresión de dos genes apoptóticos (C-jun y Diablo) y dos de la vía TLR (TOLLIP y TIRAP) en la estrategia GSC. Esto evidencia una relación entre ambas vías durante el cambio gradual de salinidad, pero no está claro si se sobre expresa en SS o se inhibe en SS, se requiere análisis RT-qPCR.

Para complementar esta investigación, se requiere analizar la validación funcional de miARNs sobre los genes blanco, se necesita realizar un ensayo de luciferasa mediante luminiscencia, que a nivel transcripcional la luciferasa se regula por la interacción con el miARN, si hay modulación del miARN sobre la zona del gen blanco, no hay señal de luciferasa, por lo tanto, no hay luminiscencia (Naipil and Dayan, 2019). Además, someter a evaluación RT-qPCR los genes branquiales de la vía de inmunidad TLR para conocer su sobre expresión o inhibición durante las estrategias salinas para esmoltificación y si conducen a una respuesta adaptativa por apoptosis o inflamatoria.

CONCLUSIÓN

Debido a los cambios transcripcionales de la ruta de la apoptosis que se evidencian en este estudio, se propone una estrategia para la transferencia al mar en salmonicultura, donde en cambio gradual de salinidad (GSC) habría menor tasa de mortalidad durante la transferencia a mar, debido a que el Salmón del Atlántico se va adaptando progresivamente a las fluctuaciones salinas y no habría un daño celular branquial severo por salinidad que active la ruta de la apoptosis. La alta expresión de genes apoptóticos en GSC son mayormente genes anti-apoptóticos en la ruta de la apoptosis, a diferencia de la expresión de genes de la vía TLR se comportan distinto con una expresión en la estrategia SS. Los resultados demuestran que variaciones en la salinidad regula la capacidad de respuesta inmunitaria y adaptativa mediante apoptosis.

La estrategia SS es la que se lleva a cabo en las salmoniculturas con un alto porcentaje de mortalidad también debido la generalización o errónea evaluación en la ventana fisiológica de esmoltificación, integrar de manera complementaria la evaluación de microARNs en la ruta de la apoptosis puede apuntar mayor precisión en la evaluación, por lo tanto, menor mortalidad en la transferencia a mar. Como el miARN 301-3p que modula la expresión del gen inhibidor de apoptosis (IAP/XIAP), ya que IAP/XIAP presenta marcadas diferencias de expresión, se sobre expresa en el grupo de cambio gradual de salinidad indicando que esta estrategia es menos dañina para las branquias del salmón del atlántico. La medición del miARN 301-3p podría ser un nuevo indicador de estrés salino en la industria del Salmón del Atlántico.

ANEXO

Tabla 6 Predicción miARNs. Se observan los miARNs branquiales con probabilidad de unión positiva $-\Delta G > 12.00$ a la zona 3'UTR de los genes branquiales de la ruta de la apoptosis. Se seleccionaron los genes: IAP/XIAP, Diablo, Bid y p53 para analizar su correlación con los miARNs que estaría modulando su expresión en FW, GSC y SS.

IAP_XIAP_3UTR	ΔG	C-jun_3UTR	$\Delta G2$	P53_3UTR	$\Delta G3$	TNF α _3UTR-1	$\Delta G4$
ssa-miR-27d-3p	-12.40	ssa-miR-30 ^a -5p	-14.90	ssa-let-7 ^a -5p	-20.20	ssa-miR-143-3p	-12.10
ssa-miR-92 ^a -3p	-14.80	ssa-miR-92 ^a -3p	-14.40	ssa-let-7g-5p	-17.00	ssa-miR-21b-5p	-14.70
ssa-miR-10 ^a -5p	-14.20	ssa-miR-25-3p	-18.50	ssa-let-7i-5p	-14.50	ssa-let-7i-5p	-13.50
ssa-miR-375-3p	-13.10	ssa-let-7 ^a -5p	-13.40	ssa-miR-200b-3p	-14.00	ssa-miR-30c-3p	-14.50
ssa-miR-199 ^a -3p	-12.00	ssa-miR-99-5p	-15.20	ssa-miR-725-3p	-12.60	ssa-miR-26 ^a -5p	-12.30
ssa-miR-145-5p	-14.10	ssa-let-7d-5p	-18.80	ssa-miR-181 ^a -4-3p	-14.10	ssa-let-7 ^a -5p	-16.20
ssa-let-7h-5p	-13.90	ssa-let-7d-5p	-17.50	ssa-miR-222 ^a -3p	-15.30	ssa-let-7e-5p	-12.20
ssa-miR-23 ^a -3p	-12.00	ssa-let-7h-5p	-13.80	ssa-miR-221-5p	-12.90	ssa-miR-182-5p	-14.40
ssa-miR-222 ^a -3p	-13.20	ssa-let-7b-5p	-15.60	ssa-miR-17-5p	-19.30	ssa-let-7g-5p	-13.60
ssa-miR-214-3p	-15.60	ssa-let-7b-5p	-15.10	ssa-let-7d-5p	-19.90	ssa-let-7i-5p	-13.50
ssa-miR-130 ^a -2-3p	-15.00	ssa-let-7c-5p	-16.50	ssa-let-7h-5p	-18.90	ssa-miR-27d-3p	-14.80
ssa-miR-130 ^a -2-3p	-12.50	ssa-let-7c-5p	-14.20	ssa-let-7b-5p	-23.50	ssa-miR-21b-5p	-14.90
ssa-miR-222 ^a -5p	-15.40	ssa-miR-133 ^a -3p	-28.20	ssa-let-7c-5p	-19.90	ssa-miR-21 ^a -5p	-12.30
ssa-miR-140-5p	-14.20	ssa-miR-200b-5p	-15.80	ssa-miR-722-3p	-14.20	ssa-miR-725-3p	-14.40
ssa-miR-218-5p	-14.00	ssa-let-7h-5p	-12.10	ssa-miR-142 ^a -3p	-12.70	ssa-miR-142b-3p	-16.90
ssa-miR-2188-3p	-12.70	ssa-let-7b-5p	-14.80	ssa-miR-142b-3p	-13.70	ssa-miR-30d-2-3p	-16.10
ssa-miR-2188-3p	-14.30	ssa-let-7c-5p	-12.10	ssa-miR-24 ^a -3-5p	-15.00	ssa-miR-30b-3p	-14.20
ssa-miR-130 ^a -5p	-12.30	ssa-miR-458-3p	-12.10	ssa-miR-2188-3p	-13.80	ssa-let-7d-5p	-15.30
ssa-miR-301b-3p	-14.80	ssa-miR-24 ^a -3-5p	-12.20	ssa-miR-214-5p	-13.20	ssa-miR-183-5p	-14.60
ssa-miR-130 ^a -3p	-15.10	ssa-miR-7132b-3p	-17.10	ssa-miR-456-3p	-21.20	ssa-let-7f-5p	-15.20
ssa-miR-460-3p	-16.10	ssa-let-7j-5p	-12.20	ssa-let-7h-3p	-12.04	ssa-let-7c-5p	-15.70
ssa-let-7j-5p	-12.40	ssa-miR-1788-3p	-15.90	ssa-let-7 ^a -4-3p	-13.84	ssa-miR-27c-3p	-12.30
ssa-miR-24 ^a -5p	-13.84	ssa-miR-125 ^a -2-3p	-14.90	ssa-miR-20 ^a -5p	-19.30	ssa-miR-17-5p	-12.30
ssa-miR-22 ^a -5p	-12.90	ssa-miR-7132b-5p	-12.40	ssa-let-7j-5p	-12.10	ssa-miR-16 ^a -5p	-12.10

ssa-miR-9^a-5p	-15.30	ssa-miR-130 ^a -5p	-14.40	ssa-miR-106 ^a -5p	-20.50	ssa-let-7j-5p	-15.00
ssa-miR-212^a-5p	-14.00	ssa-let-7j-5p	-16.20	ssa-miR-93 ^a -5p	-23.90	ssa-miR-456-3p	-17.20
ssa-miR-301c-3p	-16.50	ssa-miR-93 ^a 5p	-12.70	ssa-miR-15c-5p	-15.00	ssa-miR-456-3p	-14.50
ssa-miR-26b-3p	-12.70	ssa-miR-24 ^a 5p	-15.00	ssa-miR-1788-3p	-14.50	ssa-miR-218-5p	-12.10
ssa-miR-150-3p	-13.50	ssa-miR-130b-5p	-16.50	ssa-miR-125 ^a -2-3p	-13.00	ssa-miR-2188-3p	-15.40
ssa-miR-92b-3p	-14.80	ssa-miR-9 ^a -5p	-13.70	ssa-let-7j-5p	-19.50	ssa-miR-24 ^a -5p	-13.50
ssa-miR-26^a-3p	-13.00	ssa-miR-24 ^a 5p	-13.30	ssa-miR-27b-5p	-12.30	ssa-miR-15 ^a -5p	-12.80
ssa-let-7c-3p	-17.70	ssa-miR-200 ^a -2-5p	-12.70	ssa-miR-222b-3p	-15.30	ssa-miR-24 ^a -5p	-13.20
ssa-let-7^a-3p	-16.50	ssa-miR-8157-3p	-13.30	ssa-miR-24 ^a -5p	-12.40	ssa-miR-33b-3p	-14.40
ssa-miR-122-5p	-12.30	ssa-miR-18b-5p	-13.20	ssa-miR-462 ^a -3p	-12.20	ssa-miR-460-5p	-13.62
ssa-miR-33^a-5p	-14.00	ssa-miR-194 ^a -5p	-12.90	ssa-miR-181 ^a -3-3p	-12.20	ssa-miR-138-5p	-13.50
ssa-miR-26^a-3-3p	-15.70	ssa-miR-551-3p	-23.10	ssa-miR-138-5p	-13.10	ssa-miR-8159-5p	-17.80
ssa-miR-30^a-4-3p	-14.40	ssa-miR-133b-3p	-28.70	ssa-miR-106b-5p	-19.20	ssa-miR-205b-2-3p	-16.20
ssa-miR-30^a-3-3p	-14.40	ssa-miR-133b-3p	-16.10	ssa-miR-18b-5p	-14.50	ssa-miR-122-5p	-12.40
ssa-miR-129-5p	-14.80	ssa-miR-8156-5p	-21.20	ssa-miR-20b-5p	-21.00	ssa-miR-133b-3p	-12.60
ssa-miR-192b-5p	-16.80	ssa-miR-129-3p	-18.10	ssa-miR-194 ^a -5p	-13.60	ssa-miR-205b-2-3p	-12.60
ssa-let-7j-3p	-13.20	ssa-miR-92b-3p	-12.10	ssa-miR-150-3p	-18.20	ssa-miR-24 ^a 4-5p	-13.00
ssa-miR-22b-5p	-13.00	ssa-miR-96-5p	-13.00	ssa-miR-150-3p	-15.20	ssa-miR-30 ^a 4-3p	-12.90
ssa-miR-17-3p	-15.40	ssa-miR-33 ^a 5p	-12.60	ssa-miR-96-5p	-12.70	ssa-miR-30 ^a 3-3p	-12.90
ssa-miR-20^a-3-3p	-12.10	ssa-miR-130d-1-5p	-13.00	ssa-miR-130d-1-5p	-14.00	ssa-miR-10b-2-3p	-13.60
ssa-miR-301b-5p	-12.60	ssa-miR-107-5p	-12.50	ssa-miR-18 ^a -5p	-12.50	ssa-miR-92 ^a -5p	-14.80
ssa-miR-301c-5p	-14.40	ssa-miR-727-5p	-22.70	ssa-miR-100 ^a -2-3p	-16.30	ssa-let-7c-2-3p	-12.30
ssa-miR-459-3p	-14.20	ssa-miR-155-3p	-16.20	ssa-miR-206-3p	-19.00	ssa-miR-19c-5p	-15.10
ssa-miR-29^a-5p	-16.80	ssa-miR-449b-5p	-12.20	ssa-miR-122-5p	-12.10	ssa-miR-1788-5p	-16.40
ssa-miR-29^a-5p	-13.90	ssa-miR-22b-5p	-15.00	ssa-miR-150-3p	-14.70	ssa-miR-92 ^a -5p	-17.60
ssa-miR-192^a-3p	-14.90	ssa-miR-129-5p	-14.30	ssa-miR-194b-5p	-12.00	ssa-miR-129-5p	-15.10
ssa-miR-19c-3-5p	-12.00	ssa-miR-196b-5p	-14.70	ssa-miR-92 ^a -5p	-13.60	ssa-miR-19d-5p	-15.77
ssa-miR-93^a-3p	-13.04	ssa-miR-196 ^a -5p	-12.20	ssa-miR-462b-3p	-12.30	ssa-miR-205b-1-3p	-16.80
ssa-miR-17-3-3p	-18.00	ssa-miR-130d-2-5p	-12.50	ssa-miR-25-3-5p	-16.50	ssa-miR-25-5p	-21.30
ssa-miR-20^a-1-3p	-15.40	ssa-miR-125b-3-3p	-13.00	ssa-let-7f-3p	-12.74	ssa-miR-15d-3p	-14.40
ssa-miR-19c-3-5p	-12.80	ssa-miR-23 ^a 4-5p	-12.50	ssa-miR-19 ^a -5p	-13.00	ssa-miR-338 ^a -3-5p	-12.70
ssa-miR-92^a-4-5p	-13.60	ssa-miR-23b-5p	-16.10	ssa-miR-19c-5p	-12.90	ssa-miR-23b-5p	-13.00
ssa-miR-92^a-3-5p	-14.90	ssa-miR-17-3-3p	-13.56	ssa-miR-25-3-5p	-15.00	ssa-miR-194 ^a -3p	-15.60

ssa-miR-430c-3p	-17.20	ssa-miR-454-5p	-14.20	ssa-miR-449 ^a -5p	-17.10	ssa-miR-205b-3-3p	-13.10
ssa-miR-212b-5p	-15.40	ssa-miR-194c-5p	-12.90	ssa-miR-449b-5p	-14.70	ssa-miR-139-5p	-14.80
ssa-miR-19c-4-5p	-12.00	ssa-miR-182-3p	-17.60	ssa-miR-92 ^a -5p	-14.80	ssa-miR-92 ^a -3-5p	-14.90
ssa-miR-92^a-3-5p	-12.80	ssa-miR-9b-5p	-13.70	ssa-miR-19c-5p	-12.30	ssa-miR-92 ^a -3-5p	-19.50
ssa-miR-375-2-5p	-12.60	ssa-miR-365-5p	-22.90	ssa-miR-30 ^a -3-3p	-16.10	ssa-miR-92 ^a -4-5p	-13.40
ssa-miR-26^a-5-3p	-16.10	ssa-miR-430b-3p	-14.80	ssa-miR-25-5p	-16.50	ssa-miR-92 ^a -4-5p	-18.00
ssa-miR-489-5p	-16.20	ssa-miR-92 ^a -4-5p	-12.00	ssa-miR-15e-3p	-16.60	ssa-miR-218-3p	-12.20
ssa-miR-20b-3p	-14.40	ssa-miR-139-3p	-13.70	ssa-miR-29 ^a -5p	-13.40	ssa-miR-218-3p	-14.40
ssa-miR-153^a-2-5p	-13.10	ssa-miR-129-3-3p	-16.70	ssa-miR-125b-1-3p	-12.40	ssa-miR-456-5p	-20.00
ssa-miR-92b-5p	-14.10	ssa-miR-103-5p	-17.04	ssa-miR-27c-2-5p	-12.43	ssa-miR-139-2-3p	-16.80
ssa-miR-219c-2-3p	-15.80	ssa-miR-7 ^a -2-3p	-26.10	ssa-miR-25-5p	-15.00	ssa-miR-19c-4-5p	-12.10
ssa-miR-135b-1-3p	-12.10	ssa-miR-202-5p	-18.00	ssa-miR-27c-2-5p	-14.90	ssa-miR-338 ^a -4-5p	-14.40
ssa-miR-204-3-3p	-20.10	ssa-miR-7 ^a -4-3p	-17.50	ssa-miR-194c-5p	-13.90	ssa-miR-92 ^a -3-5p	-18.20
		ssa-miR-8160-3p	-16.30	ssa-miR-19d-5p	-16.10	ssa-miR-92 ^a -4-5p	-15.60
		ssa-miR-20b-3p	-12.90	ssa-miR-92 ^a -4-5p	-23.00	ssa-miR-216b-5p	-12.20
		ssa-miR-18 ^a -3p	-13.30	ssa-miR-139-3p	-12.60	ssa-miR-30e-3-3p	-12.90
		ssa-miR-723-5p	-12.40	ssa-miR-92 ^a -4-5p	-16.00	ssa-miR-182-3p	-13.60
		ssa-miR-138-4-3p	-18.10	ssa-miR-27c-5p	-12.43	ssa-miR-204-3p	-14.70
		ssa-miR-365-2-5p	-19.90	ssa-miR-133b-5p	-12.20	ssa-miR-204-3p	-17.50
		ssa-miR-7 ^a -5-3p	-17.40	ssa-miR-456-5p	-15.60	ssa-miR-137-5p	-19.90
		ssa-miR-7 ^a -1-3p	-21.90	ssa-miR-30e-3-3p	-16.40	ssa-miR-202-5p	-15.40
		ssa-miR-8160-2-3p	-18.40	ssa-miR-27c-5p	-14.90	ssa-miR-449 ^a -3p	-14.20
		ssa-miR-153 ^a -5p	-17.20	ssa-miR-449 ^a -3p	-12.75	ssa-miR-8163-3p	-12.00
				ssa-miR-20b-3p	-12.10	ssa-miR-29b-2-5p	-12.80
				ssa-miR-723-5p	-12.39	ssa-miR-29b-3-5p	-12.70
				ssa-miR-92b-5p	-13.80	ssa-miR-730 ^a -2-3p	-12.20
				ssa-miR-1-5p	-14.50	ssa-miR-736-5p	-12.80
				ssa-miR-219b-3p	-13.50	ssa-miR-153 ^a -5p	-12.30
				ssa-miR-204-3-3p	-15.10	ssa-miR-204-3-3p	-12.50
				ssa-miR-219 ^a -3p	-15.40	ssa-miR-219c-3p	-15.50
				ssa-miR-92b-5p	-12.60	ssa-miR-92b-5p	-17.70
						ssa-miR-92b-5p	-15.30
						ssa-miR-219c-2-3p	-13.90

BIBLIOGRAFÍA

Adlakha, Y.K., Saini, N., 2011. MicroRNA-128 downregulates Bax and induces apoptosis in human embryonic kidney cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(8), 1415-1428.

Alberts, B., 2008. *Molecular Biology of the Cell* 5E. Garland Science, 906-911.

Aliprantis, A.O., Yang, R.-B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., Zychlinsky, A., 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285(5428), 736-739.

Amaral, J.D., Xavier, J.M., Steer, C.J., Rodrigues, C.M., 2010. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med* 9(45), 145-152.

AnvariFar, H., Amirkolaie, A.K., Miandare, H.K., Ouraji, H., Jalali, M.A., Ucuncu, S.I., 2017. Apoptosis in fish: environmental factors and programmed cell death. *Cell Tissue Res* 368(3), 425-439. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2548-x>

AnvariFar, H., Amirkolaie, A.K., Miandare, H.K., Ouraji, H., Jalali, M.A., Üçüncü, S.İ., 2017. Apoptosis in fish: environmental factors and programmed cell death. *Cell and tissue research* 368(3), 425-439.

Arnemo, M., Kavaliauskis, A., Gjøen, T., 2014. Effects of TLR agonists and viral infection on cytokine and TLR expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental & Comparative Immunology* 46(2), 139-145.

Bœuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130(4), 411-423.

Campisi, L., Cummings, R., Blander, J.M., 2014. Death-defining immune responses after apoptosis. *American Journal of Transplantation* 14(7), 1488-1498.

Ching, B., Chen, X.L., Yong, J.H., Wilson, J.M., Hiong, K.C., Sim, E.W., Wong, W.P., Lam, S.H., Chew, S.F., Ip, Y.K., 2013. Increases in apoptosis, caspase activity and expression of p53 and bax, and the transition between two types of mitochondrion-rich cells, in the gills of the climbing perch, *Anabas testudineus*, during a progressive acclimation from freshwater to seawater. *Frontiers in physiology* 4, 135.

Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., Scott, F.L., 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports* 7(10), 988-994.

Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35(4), 495-516.

Evans, T.G., Kültz, D., 2020. The cellular stress response in fish exposed to salinity fluctuations. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* 333(6), 421-435.

García-Castro, B., Olimón-Andalón, V., Aguilar-Lemarroy, A., 2011. Papel de la apoptosis en la respuesta inmune antitumoral. *Revista Médica MD* 2(4), 206-210.

García, M., Vecino, E., 2003. Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 78(7), 351-364.

Gu, J., Dai, S., Liu, H., Cao, Q., Yin, S., Lai, K.P., Tse, W.K.F., Wong, C.K.C., Shi, H., 2018. Identification of immune-related genes in gill cells of Japanese eels (*Anguilla japonica*) in adaptation to water salinity changes. *Fish & shellfish immunology* 73, 288-296.

Haure, J., Penisson, C., Bougrier, S., Baud, J., 1998. Influence of temperature on clearance and oxygen consumption rates of the flat oyster *Ostrea edulis*: determination of allometric coefficients. *Aquaculture* 169(3-4), 211-224.

Hu, S., Snipas, S.J., Vincenz, C., Salvesen, G., Dixit, V.M., 1998. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *Journal of Biological Chemistry* 273(45), 29648-29653.

Kaiser, W.J., Offermann, M.K., 2005. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *The Journal of Immunology* 174(8), 4942-4952.

Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., Kobayashi, Y., 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *The Journal of Immunology* 171(9), 4672-4679.

Leiva, F., Rojas-Herrera, M., Reyes, D., Bravo, S., Garcia, K.K., Moya, J., Vidal, R., 2020. Identification and characterization of miRNAs and lncRNAs of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in normal immune organs. *Genomics* 112(1), 45-54.

León-Pedroza, J.I., González-Tapia, L.A., del Olmo-Gil, E., Castellanos-Rodríguez, D., Escobedo, G., González-Chávez, A., 2015. Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cirugía y Cirujanos* 83(6), 543-551.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.-j., Yuan, J., 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4), 491-501.

Li, J., Xue, L., Cao, M., Zhang, Y., Wang, Y., Xu, S., Zheng, B., Lou, Z., 2020. Gill transcriptomes reveal expression changes of genes related with immune and ion transport under salinity stress in silvery pomfret (*Pampus argenteus*). *Fish physiology and biochemistry* 46, 1255-1277.

Liu, Y., Olaussen, J.O., Skonhøft, A., 2011. Wild and farmed salmon in Norway—A review. *Marine Policy* 35(3), 413-418.

Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Betz, S.F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J.C., Fesik, S.W., 2000. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 408(6815), 1004-1008.

Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology* 20(2), 137-151.

Marshall, W.S., 2002. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology* 293(3), 264-283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jez.10127>

McCormick, S., Björnsson, B.T., Sheridan, M., Eilerlson, C., Carey, J., O'dea, M., 1995. Increased daylength stimulates plasma growth hormone and gill Na⁺, K⁺-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Comparative Physiology B* 165, 245-254.

McCormick, S.D., 2012. Smolt physiology and endocrinology, in: Fish physiology. Elsevier, pp. 199-251.

Naipil, C., Dayan, C., 2019. Evaluación funcional de miRNA implicados en el proceso infectivo y reproductivo de *Caligus rogercresseyi*.

Norbury, C.J., Hickson, I.D., 2001. Cellular responses to DNA damage. Annual review of pharmacology and toxicology 41(1), 367-401.

Norbury, C.J., Zhivotovsky, B., 2004. DNA damage-induced apoptosis. Oncogene 23(16), 2797-2808.

Panayiotidis, M.I., Bortner, C.D., Cidlowski, J.A., 2006. On the mechanism of ionic regulation of apoptosis: would the Na⁺/K⁺-ATPase please stand up? Acta Physiologica 187(1-2), 205-215. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2006.01562.x>

Panda, R.P., Chakrapani, V., Patra, S.K., Saha, J.N., Jayasankar, P., Kar, B., Sahoo, P.K., Barman, H.K., 2014. First evidence of comparative responses of Toll-like receptor 22 (TLR22) to relatively resistant and susceptible Indian farmed carps to *Argulus siamensis* infection. Developmental & Comparative Immunology 47(1), 25-35.

Ren, M., Chen, Z., Ge, C., Hu, W., Xu, J., Yang, L., Luan, M., Wang, N., 2022. Visualizing MiRNA Regulation of Apoptosis for Investigating the Feasibility of MiRNA-Targeted Therapy Using a Fluorescent Nanoprobe. *Pharmaceutics* 14(7), 1349.

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., Levine, A., 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews Molecular cell biology* 9(5), 402-412.

Roos, W.P., Kaina, B., 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine* 12(9), 440-450.

Sakamoto, T., Hirano, T., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Bern, H.A., 1995. Insulin-like growth factor I gene expression during parr-smolt transformation of coho salmon. *Zoological science* 12(2), 249-252.

Salaun, B., Romero, P., Lebecque, S., 2007. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *European journal of immunology* 37(12), 3311-3318.

Sardella, B.A., Matey, V., Cooper, J., Gonzalez, R.J., Brauner, C.J., 2004. Physiological, biochemical and morphological indicators of osmoregulatory stress in California Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. urolepis hornorum*) exposed to hypersaline water. *Journal of Experimental Biology* 207(8), 1399-1413.

Savill, J., Fadok, V., 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407(6805), 784-788.

Takle, H., Andersen, Ø., 2007. Caspases and apoptosis in fish. *Journal of Fish Biology* 71(sc), 326-349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01665.x>

Valenzuela-Munoz, V., Gallardo-Escarate, C., Benavente, B.P., Valenzuela-Miranda, D., Nunez-Acuna, G., Escobar-Sepulveda, H., Valdes, J.A., 2021. Whole-Genome Transcript Expression Profiling Reveals Novel Insights into Transposon Genes and Non-Coding RNAs during Atlantic Salmon Seawater Adaptation. *Biology (Basel)* 11(1). <https://doi.org/10.3390/biology11010001>

Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J., Bond, G.L., 2008. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature reviews Drug discovery* 7(12), 979-987.

Wendelaar Bonga, S., Van der Meij, C., 1989. Degeneration and death, by apoptosis and necrosis, of the pavement and chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*.

Yu, S.P., Canzoniero, L.M., Choi, D.W., 2001. Ion homeostasis and apoptosis. *Current opinion in cell biology* 13(4), 405-411.

Zhang, C., Tu, J., Zhang, Y.A., 2021. MicroRNA regulation of viral replication in teleost fish: a review. *Reviews in Aquaculture* 13(3), 1367-1378. <https://doi.org/10.1111/raq.12526>

Zhang, Y., Bliska, J.B., 2003. Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to *Yersinia* infection. *Infection and Immunity* 71(3), 1513-1519.

Ziegler, A., Jonason, A.S., Leffell, D.J., Simon, J.A., Sharma, H.W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T., Brash, D.E., 1994. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372(6508), 773-776.

Zolotareno, A., Shitova, M., 2022. Transcriptome Studies of Salmonid Fishes of the Genus *Oncorhynchus*. *Russian Journal of Genetics* 58(7), 757-772.