



Cambios reproductivos a nivel transcriptómico del bagrecito (*Trichomycterus areolatus*) expuestos a descargas de efluentes de aguas servidas del Gran Santiago en el río Mapocho

Tesis

Entregada a la
Universidad de Valparaíso
En cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas Mención Biodiversidad y Conservación
Instituto de Biología
Facultad de Ciencias

Por

David Alejandro Rodríguez Jaque

Abril, 2025

INSTITUTO DE BIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE VALPARAISO

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister
presentada por el candidato.

DAVID ALEJANDRO RODRÍGUEZ JAQUE

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas mención Biodiversidad y Conservación, en el examen de Defensa
de Tesis rendido el día 15 de abril de 2025.

Directores de Tesis:

Prof. Dra. Paulina Bahamonde C
Prof.

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Prof. Dr. Pablo Conejeros
Prof. Dr. Kelly Munkittrick
Prof.

Dedicatoria:

Dedicado a aquel niño que tuvo ese sueño

AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir agradeciendo a mi familia y mi compañera por todo su apoyo incondicional en cada idea, error y paso que he dado. Agradezco a mi directora Paulina por darme esta oportunidad de aprendizaje, a Elvira por el soporte brindado durante el desarrollo práctico y técnico. Al HUB ambiental de la Universidad de Playa Ancha por acogerme durante el tiempo de experimentación. A Gustavo Chiang y Caro, del Lab BEA por los terrenos y colectas de muestras y buena disposición.

Special thanks to Kelly Munkittrick, Patricija Marjan, Chris Cunada, and Kelly's Lab at the university of Calgary, Maricor and Troy at the University of Alberta, Edmonton, Ulises Quinteros and Lloyd Hanke for her hospilaty during my stay in Calgary.

INDICE DE CONTENIDOS

Índice

RESUMEN	9
I. INTRODUCCION.....	11
1. Contaminación por aguas servidas en ecosistemas acuáticos.....	11
2. Monitoreo ambiental basado en los efectos	12
3. Transcriptómica como biomarcadores de contaminación.....	13
4. Área de estudio	14
5. Hipótesis y objetivos.....	15
5.1 Hipótesis	15
5.2 Objetivo general.....	15
5.3 Objetivos específicos	15
II. METODOLOGIA.....	16
Sitios de muestreo	16
Colecta de muestras	17
Parámetros morfométricos	18
Extracción de RNAm	18
Diseño de primers	20
Cuantificación por PCR en tiempo real SYBR-green.....	21
Análisis estadístico.....	22
III. RESULTADOS.....	23
Colecta por sitio	23
Estadística parámetros morfométricos.....	25
Parámetros morfométricos en hembras.....	25
Parámetros morfométricos en machos	27
Diseño de primers	30
Cuantificación qPCR	32
Hembras	32
Machos.....	34
IV. DISCUSION	36

Transcriptómica	39
Receptor de andrógeno (<i>ar</i>)	39
Aromatasa (<i>cyp19a1</i>)	40
Receptor de estrógenos alfa (<i>era</i>)	42
V. CONCLUSIONES	44
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	41
VI. ANEXOS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mapa Área de estudio Región Metropolitana.....	16
Figura 2 Distribución de talla de <i>Trichomycterus areolatus</i> por sitio al momento de captura.....	24
Figura 3 Boxplot con factor de condición K hembras	25
Figura 4 Boxplot de índice hepatosomático (IHS) hembras	26
Figura 5 Boxplot de índice gonadosomático (IGS) hembras.....	27
Figura 6 Boxplot de factor condición K machos	28
Figura 7 Boxplot Índice hepatosmático (IHS) machos.....	29
Figura 8 Boxplot Índice gonadosomático (IGS) machos.....	29
Figura 9 Boxplot de fold change expresión receptor de andrógeno (<i>ar</i>) de hembras,.....	33
Figura 10 Boxplot de fold change expresión aromatasa (<i>cyp19a1</i>) hembras	33
Figura 11 Boxplot de Fold change expresión receptor estrógeno alfa (<i>era</i>) hembras,.....	34
Figura 12 Boxplot de Fold change expresión del receptor de andrógeno (<i>ar</i>) en machos	35
Figura 13 Boxplot de fold change expresión aromatasa (<i>cyp19a1</i>) machos	36
Figura 14 Boxplot de fold change expresión receptor de estrógeno alfa (<i>era</i>) de machos.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Nombre y característica asignada a los sitios de muestreo con sus respectivas coordenadas de referencia.....	17
Tabla 2 Lista de genes de interés y genes control a cuantificar, su abreviatura y su función biológica, junto al estado del primer.....	21
Tabla 3 Tabla de fecha captura, sitio y cantidad de individuos seleccionados para análisis en laboratorio (n) por sexo. Sexaje realizado en laboratorio por disección.....	24
Tabla 4 Curvas de calibración realizadas a los primers diseñados para los genes de elección	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A Permiso de recolección de peces emitido por Subpesca.....	48
Anexo B tablas de mediciones en terreno, con datos de sitio de captura, sexo (M: macho; H: hembra) largo en centímetros (+- 0.001), peso corporal, peso gónadas y peso hígado (gramos +- 0.001), IGS, IHS y factor de condición K.....	49
Anexo C Tabla con secuencias para el diseño de primers, temperatura de melting, r2 y eficiencias reportadas.....	52
Anexo C Tabla resumen de expresión génica para hembras de <i>Trichomycterus areolatus</i> , incluye sitio de muestreo, código asignado a la muestra, fold change para los tres genes de interés reproductivos.....	53
Anexo E Tabla resumen de expresión génica para machos de <i>Trichomycterus areolatus</i> , incluye sitio de muestreo, código asignado a la muestra, fold change para los tres genes de interés reproductivos.....	54

RESUMEN

Trichomycterus areolatus es un bagre nativo chileno de agua dulce ampliamente distribuido entre el centro y sur de Chile, zonas altamente urbanizadas. En la ciudad de Santiago (zona central de Chile), existen dos plantas secundarias de tratamiento de aguas servidas (PTAS) responsables del manejo de casi el 90% de los vertidos, las que desaguan en el río Mapocho. Mundialmente, se ha observado que los peces expuestos a descargas PTAS presentan cambios a diferentes niveles: cambios en la proporción de hembras y machos; cambios en el tamaño individual y presencia de intersexo. Además, se han observado modificaciones en la expresión génica. El objetivo de este estudio es cuantificar mediante RT-qPCR los cambios de expresión génica a nivel reproductivo que pueden verse afectados por los efluentes de PTAS, a su vez determinar diferencias en factor de condición K, índice gonadosomático e índice hepatosmático. Los sitios de muestreo se determinaron en función de su presión antrópica, dos de referencia, dos urbanos y dos aguas abajo de PTAS. Un total de 92 individuos (M= 52 y H = 40) fueron colectados en cinco de los seis sitios, durante la primavera chilena de 2022. Los análisis de qPCR fueron realizados para los genes aromatasa, receptor de andrógeno, receptor de estrógeno alfa y dos genes de control endógeno factor de elongación 1 alfa y proteína ribosomal S18. La distribución de tallas varía entre sitios cercanos a efluentes ($K_w p < 0.05$). se destaca Trapiche (7% juveniles), En hembras, K en Hualtatas es mayor. El IHS e IGS en hembras ($K_w p < 0,05$) El Clarillo presenta valores bajos. En machos, el Monte mostró un K menor (Wilcox $p < 0,05$). Para el IHS e IGS ($K_w p < 0,05$) El Clarillo presenta el valor bajo. La mayor expresión de *ar* se reporta en Arrayan (H) y en Monte (M). *cyp19a1* la mayor expresión es en el Monte (H) y en Hualtatas (M); *era* Arrayan (ambos sexos). Este trabajo es el primero en estudiar cambios en la expresión génica de *T. areolatus* expuesto a vertidos de aguas servidas.

ABSTRACT

Trichomycterus areolatus is a native Chilean freshwater catfish widely distributed in central and southern Chile, highly urbanised areas. In the city of Santiago (central Chile), there are two secondary wastewater treatment plants (WWTPs) responsible for the management of almost 90% of the discharges, which drain into the Mapocho River. Worldwide, it has been observed that fish exposed to WWTP discharges show changes at different levels: changes in the proportion of females and males; changes in individual size and presence of intersex. In addition, changes in gene expression have been observed. The aim of this study is to quantify by RT-qPCR gene expression changes at the reproductive level that may be affected by PTAS effluents, and to determine differences in condition factor K, gonadosomatic index and hepatosomatic index. Sampling sites were determined according to their anthropogenic pressure, two reference sites, two urban sites and two sites downstream of PTAS. A total of 92 individuals (M = 52 and H = 40) were collected at five of the six sites, during the Chilean spring of 2022. qPCR analyses were performed for the genes aromatase, androgen receptor, estrogen receptor alpha and two endogenous control genes elongation factor 1 alpha and ribosomal protein S18. The size distribution varied between sites close to effluents (Kw $p < 0.05$). Trapiche (7% juveniles), K in Hualtatas is higher in females. The IHS and IGS in females (Kw $p < 0.05$) El Clarillo shows low values. In males, El Monte showed a lower K (Wilcox $p < 0.05$). For IHS and IGS (Kw $p < 0.05$) El Clarillo has the lowest value. The highest expression of ar is reported in Arrayan (H) and Monte (M). *cyp19a1* expression is highest in Monte (H) and Hualtatas (M); at the *era* expression the highest values are from Arrayan (both sexes). This study would be the first to include changes in gene expression of *T. areolatus* exposed to sewage discharges.

I. INTRODUCCION

1. Contaminación por aguas servidas en ecosistemas acuáticos

Las aguas servidas son una mezcla de aguas residuales domiciliarias, institucionales, industriales, y aguas lluvias (Vidal & Araya, 2014). Estas aguas son llevadas por sistemas de alcantarillados hacia las plantas de tratamiento de aguas servidas, descargando los efluentes tratados en los cuerpos de agua cercanos (Aguas Andinas, 2017). Se ha reportado que estos efluentes contienen productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs por sus siglas en inglés) (Carballa et al., 2004; Souza & Féris, 2016a) como antibióticos (Spataro et al., 2019a) y hormonas sintéticas y naturales (Green et al., 2013; Racz & Goel, 2010), metales traza (Rashid & Liu, 2021a), cafeína (Vieira et al., 2022a), entre otros. Estas sustancias exógenas pueden afectar el correcto funcionamiento del sistema endocrino (disruptores endocrinos) de organismos acuáticos, ocasionando efectos en la salud a nivel reproductivo, metabolismo, desarrollo y sistema inmune (Bahamonde et al., 2015a; Monneret, 2017; Bertin et al., 2020)

Los efectos sobre el sistema endocrino asociados a efluentes de aguas servidas e industriales han sido ampliamente estudiados en peces (Munkittrick et al., 1991; Chiang et al., 2012b; Bahamonde et al., 2014, 2015a, 2015b). Estos efectos se han reportado tanto a nivel poblacional (e.g cambios en la proporción hembra/macho) en el que se ha observado una mayor proporción de hembras que machos (10:1) aguas abajo de la PTAS en comparación a los sitios de referencia (1:1) (Bahamonde et al., 2015); individual (e.g. cambios en el factor de condición) hallándose peces expuestos a descargas de plantas de celulosa más pequeños y con mayor factor de condición que los de sitio referencia (Munkittrick et al., 1991); a nivel de órganos: cambios macroscópicos en los testículos con aparición de huevos vitelogénicos en peces expuestos a aguas servidas (Bahamonde

et al., 2015a), aumentos en el peso de gónadas e hígado en hembras muestreadas en descargas de planta de celulosa (Chiang et al., 2011) (e.g. alteraciones hepáticas y gonadales e intersexo) (Bahamonde et al., 2015; Quiroz-Jara et al., 2021); como a nivel molecular (e.g. cambios en la expresión de genes) (Bahamonde et al., 2014; 2015b; Ali et al., 2020).

2. Monitoreo ambiental basado en los efectos

Los peces nativos han sido utilizados como bioindicadores para el monitoreo de ambientes acuáticos sometidos a diferentes actividades antrópicas y sus efectos: exposición efluentes de aguas servidas (Bahamonde et al., 2014, 2015b), exposición a descargas de plantas de celulosas (Chiang et al., 2011a, 2012b; Orrego et al., 2019), y exposición a contaminación por agroquímicos, metales (Ali et al., 2020) y mercurio (Ung et al., 2010; Zhang et al., 2022)

Trichomycterus areolatus (Valenciennes, 1846) es un pez nativo en Chile, clasificado en categoría de conservación vulnerable (Campos et al., 1998; Ministerio del Medio Ambiente, 2022) Presenta una amplia distribución desde Illapel (31°S) hasta Llanquihue (41°S), (Arratia et al., 1981). Habita zonas de ríos rápidos y poco profundos con fondos escabrosos, estando altamente asociado al sustrato del río (Arratia, 1983). Es de hábitos bentófagos, alimentándose preferentemente de macroinvertebrados (Habit et al., 2005). Presenta un ciclo reproductivo desde los meses de julio a noviembre, con un mayor desarrollo de oocitos vitelogénicos entre octubre y noviembre (Chiang, et al., 2012). La madurez sexual es alcanzada a partir de los 50mm de largo, momento en que las hembras presentan gónadas maduras (Manriquez et al., 1988; Chiang et al., 2011b, 2012b). *T. areolatus* ha presentado una disminución poblacional de un 48,7 % entre 1996 al 2006 (GESAM consultores, 2006). Las amenazas que contribuyen a este descenso son la predación por parte de especies invasoras, aumento de sólidos producto de la deforestación y extracción de áridos, fragmentación de hábitat por construcción de hidroeléctricas y canales de

regadío (GESAM consultores, 2006). Chiang, et al., 2011 a utilizado a *T. areolatus* como organismo bioindicador de efectos de los efluentes de plantas celulósicas en el río Itata, describiendo cambios temporales a través de la inducción de etoxiresorufina-O-detilasa (EROD) como biomarcador, asimismo reportó aumento del índice Gonadosomático (IGS), encontrando hembras con gónadas grandes y en ausencia de oocitos, siendo consideradas una gónada inmadura en presencia de aumento la actividad de EROD, cambios similares fueron asociados a efluentes de celulósicas en el río Biobío (Orrego et al., 2019) . El aumento de la actividad de EROD ha sido asociada a la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y policlorobifenilos (PCB) (Orrego et al., 2005) y a retardantes de fuego (Li et al., 2022).

3. Transcriptómica como biomarcadores de contaminación.

La transcriptómica es una rama de las omicas que estudia la expresión génica, precisamente el análisis del ARN mensajero (mARN) y de ARN no codificante de una célula o tejido (Gironella Cos, 2010). Estos estudios se han empleado como una herramienta para evaluar variaciones entre poblaciones silvestres y cómo éstas responden a los estímulos ambientales (Andrzejczyk et al., 2020). En peces, la transcriptómica ha sido utilizada para la determinación de expresión de genes asociados a la reproducción, expuestos a estrógenos y antiandrógenos ambientales (Schiller et al., 2013a), pesticidas organoclorados (Martyniuk et al., 2020), plantas de papel y celulosa (Costigan et al., 2012) y a efluentes de aguas servidas (Bahamonde et al., 2015b). Se han identificado biomarcadores moleculares sensibles como la aromatasa (*cyp19a1*, Kazeto et al., 2003a; Shanthanagouda et al., 2013), el receptor de estrógenos (*esr1/esr2*, Kidd et al., 2007a; Schiller et al., 2013b) y el receptor de andrógenos (*ar*, Garcia-Reyero et al., 2011a) que han permitido dilucidar los impactos de los contaminantes emergentes en el sistema endocrino de los organismos acuáticos, proporcionando evidencia sobre mecanismos de disrupción endocrina y su relación con

la calidad ambiental de los ecosistemas acuáticos receptores. Para el caso particular de *T. areolatus*, se ha estudiado sobre los efectos asociados a contaminación por agroquímicos y metales en el río Choapa (Ali et al., 2020). Sin embargo, no existen estudios que hagan referencia a la exposición de efluentes de aguas servidas.

4. Área de estudio

En Chile la provincia de Santiago está compuesta por 32 comunas, en las que habitan 5.250.565 de habitantes, siendo la provincia con la densidad poblacional más alta del país (Gobierno Regional Metropolitano de Santiago, 2022). Para 26 comunas de esta provincia con 3.380.507 habitantes (INE, 2017), existen dos plantas de tratamiento de aguas servidas, con tecnología de lodos activados y desinfección por gas clorado, estas son: La Farfana y Mapocho-Trebal, las que pertenecen a la empresa Aguas Andinas SA. Ambas plantas descargan sus aguas en el río Mapocho (Superintendencia de Servicios Sanitarios, 2019). En 2017, las dos plantas trataron 498,2 millones de m³ (83%), de un total de 595 millones de m³ de aguas tratadas en las plantas de aguas andinas (Aguas Andinas, 2017). Este sector tiene una extensión de 15.380 kilómetros cuadrados, nace desde el volcán Maipo, presenta un régimen pluvio-nival, con caudal medio anual de 92,3 m³/seg. Su principal afluente es el río Mapocho drenando la parte norte de la cuenca que atraviesa la ciudad de Santiago (Biblioteca del Congreso Nacional de Chile, n.d.). En su curso medio el río Maipo recibe a los ríos Clarillo y Angostura. La desembocadura del río Maipo se encuentra en Llolleo (Región de Valparaíso) a 250 km de su nacimiento (Biblioteca del Congreso Nacional de Chile, n.d.).

5. Hipótesis y objetivos

Estudios relacionados a la expresión genes en *Trichomycterus areolatus* han sido poco abordados en la provincia de Santiago, siendo una de las provincias con mayor densidad poblacional del país y que presenta dos PTAS secundarias para tratar alrededor de un 90% de las aguas residuales que desaguan en el río Mapocho

5.1 Hipótesis

Es por lo que se plantea la siguiente hipótesis: *Trichomycterus areolatus*, pez nativo que habita en la cuenca del río Mapocho, presenta alteraciones reproductivas a nivel molecular (ARNm) al estar en ambientes acuáticos sometidos a efluentes de aguas servidas del gran Santiago.

5.2 Objetivo general

Determinar los efectos reproductivos a nivel molecular en *Trichomycterus areolatus* (TA), asociados a la exposición de efluentes de plantas de tratamientos de aguas servidas en el gran Santiago.

5.3 Objetivos específicos

- Determinar diferencias morfométricas (K, IGS y IHS) en las poblaciones de TA expuestas a efluentes de aguas servidas.
- Diseñar partidores para genes relacionados con el sistema reproductivo en TA.
- Cuantificar cambios en la expresión de genes asociados con el sistema reproductivo en TA por qPCR.

II. METODOLOGIA

Sitios de muestreo

Los sitios de muestreos están ubicados en la hoya del río Maipo, en este sector se seleccionaron seis sitios basados en un gradiente de actividad antrópica. Los dos sitios de baja actividad antrópica fueron utilizados como puntos de referencia: estero el Arrayan y río Clarillo. Otros dos sitios que corresponden a sectores urbanos, estero las Hualtatas y sector del club de Golf, por último, los sitios expuestos, dos sitios bajo a las descargas de las plantas de tratamiento aguas servidas, el Trapiche y el Monte. (Fig. 1, Tabla 1)

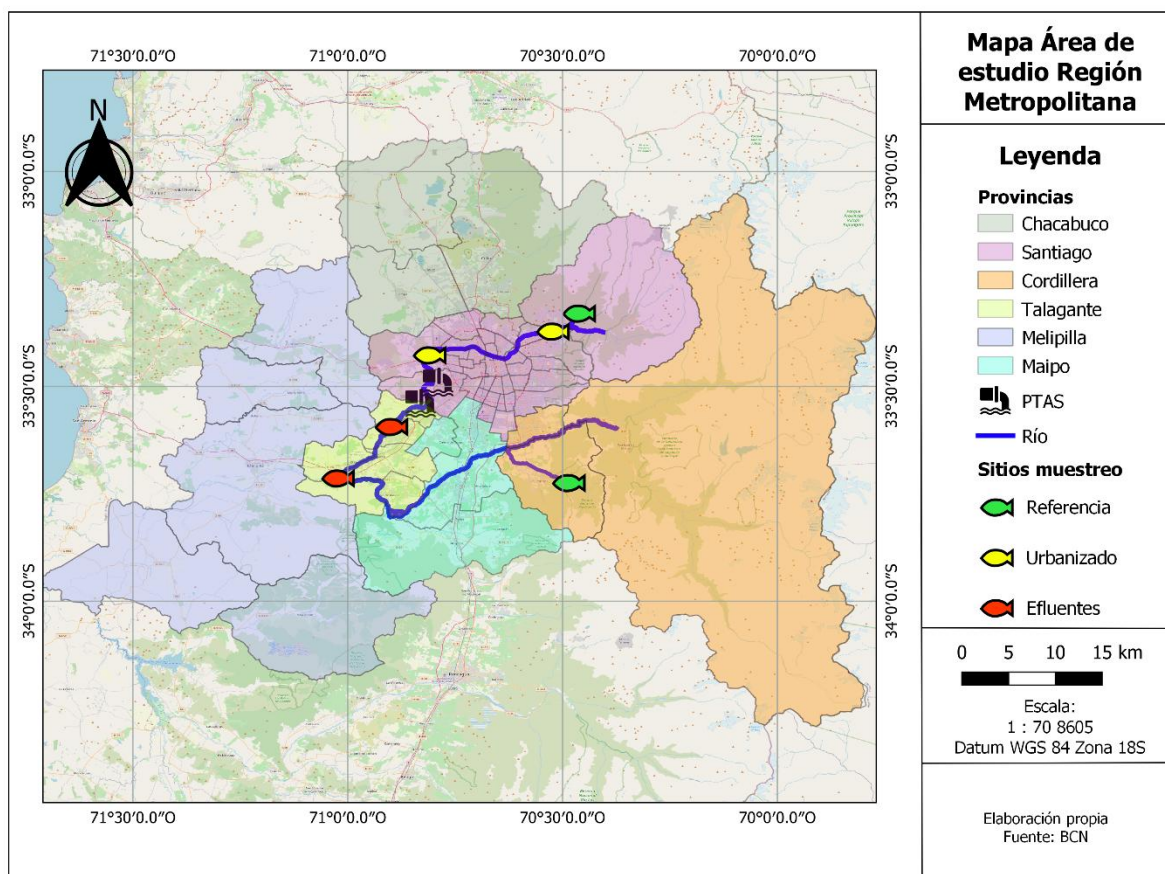


Figura 1 Mapa del área de estudio Región Metropolitana

Mapa Área de estudio Región Metropolitana, se muestran los sitios referencia (verde), sitios con influencia urbana (amarillo), los sitios impacto a descargas de efluentes (rojo) y la localización de las Plantas de tratamiento de aguas servidas (negro) (Elaboración propia)

Tabla 1 Nombre y característica asignada a los sitios de muestreo con sus respectivas coordenadas de referencia.

Nombre	Sitio	latitud	Longitud
Estero el Arrayan	Referencia 1	33°19'43.9"S	70°27'33.9"W
río Clarillo	Referencia 2	33°43'32.0"S	70°29'00.6"W
estero las Hualtatas	Urbano	33°22'14.9"S	70°31'13.2"W
Club de Golf	Urbano	33°25'32.66"S	70°48'26.07"W
Trapiche	Efluente 1	33°35'32.3"S	70°53'46.0"W
el Monte	Efluente 2	33°42'43.88"S	71°01'14,08"W

Colecta de muestras

Se colectaron ejemplares de *T. areolatus*, durante octubre del 2022, en seis sitios de la cuenca del río Maipo, región Metropolitana (Tabla 1). Para la captura de los ejemplares se utilizó la técnica de pesca eléctrica, con el equipo HT-2000MKV Backpack Electrofisher (Halltech Electrofisher, Canadá) y con redes de pesca (6 mm entre nudos). Esta técnica de captura es no letal permitiendo la captura de los peces con vida. Por sitio se colectaron para análisis, un máximo de 20 individuos por sitio, bajo el permiso de SUBPESCA (Resolución Exenta N° E-2023-154, Anexo 1).

Los peces se mantuvieron en un recipiente plástico con agua del río del que fueron extraídos, con apoyo de bombas de aireación. Los peces se transportaron hasta el laboratorio de Biogeoquímica de Contaminantes y Ecotoxicología Acuática, dependencias Universidad Andrés Bello, Santiago, acá se tomaron medidas de largo y peso del individuo. Los ejemplares fueron sometidos a eutanasia física mediante corte cervical, basado en las directrices AVMA 2020. Una vez que se confirmó la muerte, se procedió a la toma de muestras, en específico de hígado y gónadas, las que fueron manipuladas con guantes de nitrilo. Se identificó a cada individuo con su respectivo ID.

Parámetros morfométricos

Se utilizaron los parámetros de: Factor de condición (K), parámetro que indicaría el estado corporal de los peces basándose en la hipótesis de que los peces más pesados y de una longitud determinada se encuentran en mejores condiciones fisiológicas [$k = 100 * (\text{peso corporal}/\text{longitud}^3)$] (Bagenal & Tesch, 1978) Para esto se registraron los pesos totales (± 0.001 g), el largo total (± 1 mm), del total de individuos capturados por sitio. Otro índice utilizado es el gonadosomático (IGS) el cual indica la maduración y el desarrollo de las gónadas [$\text{IGS} = 100 * (\text{peso gónada}/\text{peso corporal})$] (Alhashemi et al., 2012) para esto se registró el peso de ambas gónadas (± 0.001 g); y por último el índice hepatosmático (IHS), este índice proporciona información sobre el impacto de los factores estresantes en los peces [$\text{IHS} = 100 * (\text{peso hígado}/\text{peso corporal})$] (Traven et al., 2013), para esto se registró el peso del hígado (± 0.001 g).

Extracción de RNAm

Una submuestra fue utilizada para la extracción de ARN con enfoque en gónadas para hembras y machos (tabla 3). Las muestras de gónadas, previamente individualizadas fueron almacenadas en tubos con 1 ml de RNAlater por separado, a 4°C durante 24 horas (permitiendo que el RNA later penetre las células), luego se drenó el RNAlater y se almacenaron a -80°C, hasta el momento en que realizó la extracción de RNA. La extracción de ARN se basó en el protocolo de Bahamonde et al., 2014, usando el reactivo TRIzol® (protocolo de aislamiento de ARN, Life Technologies, Burlington, ON, Canadá). En 1 mL de TRIzol® se homogeneizó entre 50 y 100 mg de tejido de gónada durante 20 a 30 segundos, con el homogeneizador manual Scilogex Modelo D160. Las fases fueron separadas añadiendo 200 ul de cloroformo por muestra, se agitó e incubó en hielo durante 3 minutos, luego se centrifugó a 1200 RCF a 4°C por 15 minutos (mikro22r, Hettich). Se transfirió el sobrenadante, evitando la zona de fenol cloroformo a un tubo Eppendorf

de 1.5ml, al que se le añaden 500 μ l de isopropanol, se incubó en hielo por 10 min y se centrifugó a 1200 RCF a 4°C por 10 min, permitiendo que el ARN se precipitara. El sobrenadante de isopropanol se desecha.

Posteriormente se lavó el pellet con 1000 μ l de etanol 75% grado análisis 3 veces para eliminar posibles impurezas. Se drena el etanol y el tubo se dejó secar durante 10 minutos boca abajo dentro de campana. Al mismo tubo se añadió entre 20 a 50 μ l de agua DEPC, se agitó en vortex hasta disolver el pellet. Las concentraciones ARN y la relación A260/A280 (entre 1,8 y 2,0) fueron medidas con el equipo BMG Labtech SPECTRO star Nano (espectrofotometría).

La evaluación de la calidad de los fragmentos de ARN se realizó mediante electroforesis de ácidos nucleicos, basado en el protocolo “Bleach gel” (Aranda et al 2012), 60 ml TAE, 0.6 gr de Agarosa y se añadió 1.2 ml de cloro al 5%, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego la mezcla se calentó en microondas hasta estar completamente líquida y transparente, sin flóculos. Se dejó enfriar por 10 minutos y se añadió 1.2 μ l de tinción SYBR safe (Thermofisher), luego se vierte el contenido total en el molde. Una vez solidificado el gel, se preparó una mezcla 5 μ L de cada muestra con 1 μ L de buffer carga azul 6X, esta mezcla fue cargada de manera individual en cada celda del gel. Se añadió 5 μ l de Ladder 50bp. El gel se corrió a 100v por 40 minutos. Los individuos que presentaron bandas notarias en 18S 28S fueron utilizados para el análisis de qPCR en los genes de interés.

Los extractos de ARN fueron almacenados a -80°C hasta realizar la transcripción inversa. La transcripción inversa para la síntesis de ADNc se realizó con AFFINITYSCRIPT QPCR CDNA SYNTHESIS KIT (Agilent). Para cada muestra se preparó una mezcla de 10 μ l de First Strand Master Mix, 3 μ l oligo dT y 1 μ l RNase block (incluidos en el kit), luego se adicionó 6 μ l de extracto RNA, logrando un volumen final de 20 μ l. Posterior a la preparación del master mix, las

muestras se incubaron a 25°C durante 5 min, para el anidamiento del primer. Luego la reacción se incubó a 42°C por 15 min, proceso de síntesis de ADNc, finalmente las reacciones fueron incubadas a 95°C por 5 minutos para terminar la síntesis de ADNc, una vez que la temperatura descendió a los 5°C, los productos de ADNc fueron almacenados a -20°C hasta su análisis en PCR tiempo real.

Diseño de primers

Para los genes receptor de andrógenos (*ar*), receptor de estrógeno subtipo 1 (*era*), vitelogenina (*vtg*), aromatasa (*cyp19a*) y factor de elongación 1 gamma (*ef1g*) se utilizaron los primers descritos por Ali et al. (2020), además se diseñó una copia adicional de primers para cada uno de estos genes, con el fin de realizar comparaciones. En cuanto a los genes receptor de estrógenos beta (*erβ*), proteína asociada a espermatogénesis 4 (*spata4*) y proteína ribosomal S18 (*rps18*), se diseñaron dos copias de cada primer.

El diseño de primers se llevó a cabo previo una selección de secuencias disponibles en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando como referencia a las especies de teleósteos *Danio rerio* y en el caso de ser posible a *Ictalurus punctatus* (siluridae).

Luego las secuencias fueron alineadas en Clustal W omega (Madeira et al., 2024), obteniendo así los sitios de secuencias más conservados para posteriormente diseñar los primers a través de la plataforma libre Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) (Rozen & Skaletsky, 2000). Los primers fueron sintetizados por IDT DNA de Fermelo.

Tabla 2 Lista de genes de interés y genes control a cuantificar, su abreviatura y su función biológica, junto al estado del primer (descrito o diseño propio).

Nombre gen	Abreviatura	Función biológica	Estado primer
Androgen receptor	<i>ar</i>	Receptor de andrógeno	Ali et al., 2020
Estrogen receptor subtype 1	<i>era</i>	Receptor de estrógeno	Ali et al., 2020
Vitellogenin	<i>vtg</i>	Desarrollo oocitos	Ali et al., 2020
Aromatase	<i>cyp19a</i>	Síntesis estrogénica	Ali et al., 2020
Estrogen receptor Beta	<i>esrb</i>	Receptor de estrógeno/17beta-estradiol	Diseño propio
Spermatogenesis Associated protein 4	<i>spata4</i>	Espermatogénesis	Diseño propio
Ribosomal protein S18	<i>rps18</i>	Gen control	Diseño propio
Elongation Factor 1 Gamma	<i>ef1g</i>	Gen control	Ali et al., 2020

Cuantificación por PCR en tiempo real SYBR-green

Se cuantificó la expresión de genes específicos reproductivos en gónada de hembras y machos en triplicado. El análisis de PCR en tiempo real se realizó en las dependencias de la Universidad de Alberta, Edmonton, Canadá. Para el análisis de PCR en tiempo real se utilizó Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher). La abundancia relativa de los niveles de ARNm se determinó utilizando el sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System (ThermoFisher), La configuración de PCR, fue activación 95°C un ciclo de dos minutos, seguida de 40 ciclos de 15 seg. a 95°C, temperatura primer a 1 minuto, y luego annealing a 72°C por 30 seg.

Análisis estadístico

Los datos de distribución de tallas, fisiológicos y los datos obtenidos del análisis qPCR obtenidos fueron sometidos a pruebas en R studio (R Core Team, 2023) con la función Shapiro wilk para evaluar normalidad y Levene test del paquete Rstatix (Kassambara, 2023), para homocedasticidad.

Se utilizó análisis no paramétrico, Kruskal-Wallis (R Core Team, 2023) para determinar diferencias en los datos provenientes de distribución de tallas en terreno, K, IGS, IHS y qPCR (hembras: *cyp19a1* y *era*; machos *cyp19a1*), los sitios fueron comparados para cada sexo de manera independiente. Para los datos paramétricos qPCR de machos *ar*, *era* y hembras *ar* se utilizó análisis de varianza (ANOVA) Se aplicó a todos los datos no parametricos la prueba de Wilcox Pairwise (holm) (R Core Team, 2023) y a los datos parametricos se aplicó la prueba de post-hoc Tukey, para corroborar las diferencias significativamente estadísticas entre sitios de un mismo sexo.

Los gráficos tipo boxplot fueron diseñados con el paquete ggplot2 (Wickham, 2016) y ridgeline plot con ggridges (Wilke, 2024), etiquetas y colores de los gráficos fueron añadidos con el paquete plotrix (Lemon, 2006)

III. RESULTADOS

Colecta por sitio

Se recolectó un total de 92 individuos de *Trichomycterus areolatus*, en 5 de los 6 sitios muestreados, en el sitio El Golf no hubo presencia de la especie, por lo que este sitio no fue utilizado para los análisis.

Se observa que la distribución de tallas por sitio varía entre los sitios de muestreo cercanos a los efluentes de aguas servidas: en el caso de Trapiche (n= 14), solo un juvenil (7%), para el caso de El Monte (n= 76) existe una menor proporción de juveniles (25%) que adultos (75%), esto al compararlo con el sitio referencia El Clarillo (n= 76) que presenta un 61% de juveniles contra 39% de adultos. Arrayan (n= 40) presenta un 28% de juveniles y 73% de adultos, Hualtatas (n= 53) 37% juveniles y 63% adultos, (Fig. 2). Los sitios presentan diferencias significativas entre si ($K_w p < 0,05$), se aplicó prueba post- hoc de Wilcox pairwise (Holm) ($p < 0,05$), corroborando las diferencias entre Arrayan - Clarillo; Arrayan - Hualtatas; Clarillo - Hualtatas; Clarillo – Trapiche; Clarillo – el Monte; Hualtatas – Trapiche; Hualtatas – el Monte.

Todos los individuos recolectados presentaban rango de largo corporal desde los 2,6 a 12,4 cm, y pesos entre 0,17 a 12,15 gramos (Anexo A). De este total se seleccionó un grupo de individuos basado en criterio de normalización de datos, utilizando lo descrito por (Chiang et al., 2012) que indica que la madurez sexual se alcanza desde los 5,4 cm de largo, al mismo tiempo que *Trichomycterus areolatus* no presenta un dimorfismo sexual marcado, a excepción de las hembras grávidas, lo que no fue posible determinar en terreno, se seleccionaron individuos con largos corporales entre 6,0 a 12,2 cm y con pesos desde los 1,31 a 10,08 gramos, los que fueron llevados a laboratorio, disectados y sexados de esta manera (Tabla 3).

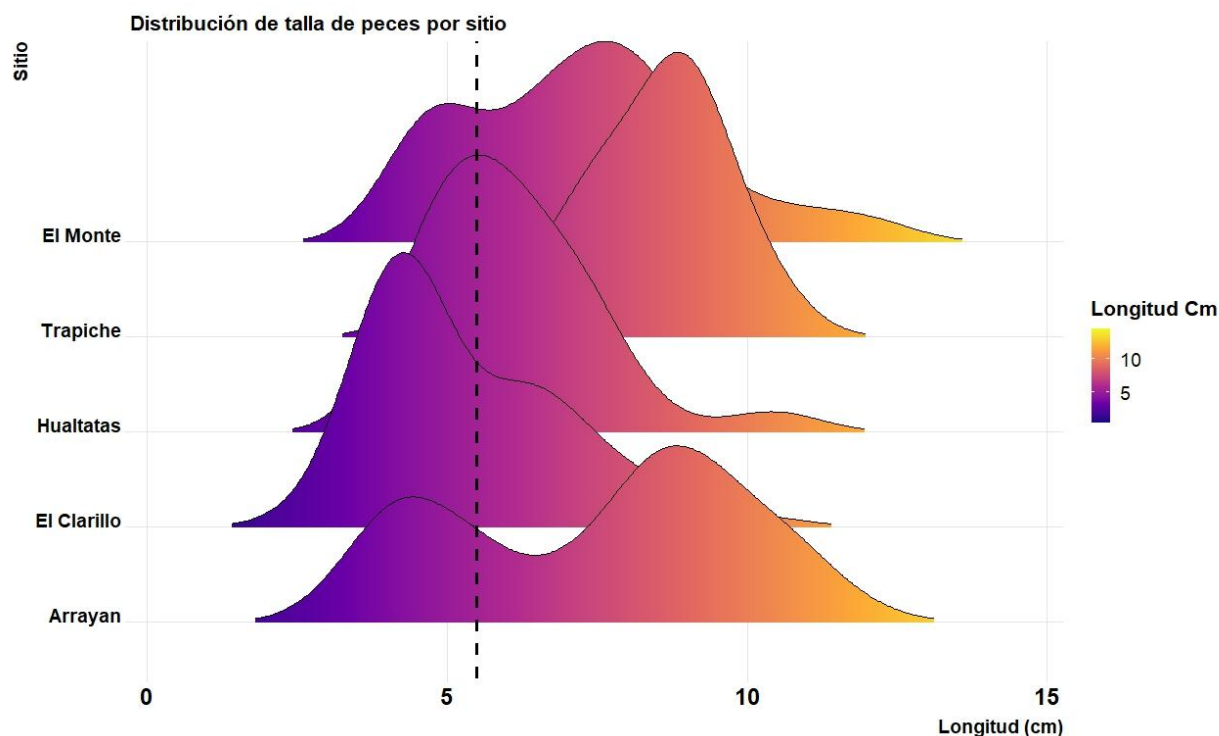


Figura 2 Distribución de talla de *Trichomycterus areolatus* por sitio al momento de captura. Sitios expuestos a efluentes de aguas servidas (El Monte n = 76; Trapiche n = 14); sitio urbano (Hualtatas n = 52); y sitios referencia (El Clarillo n = 76; Arrayan n = 40), previo a selección de muestras a analizar. Línea punteada perpendicular muestra el corte en 5,4 cm, criterio de segregación (Chiang et al. 2012)

Tabla 3 Tabla de fecha captura, sitio y cantidad de individuos seleccionados para análisis en laboratorio (n) por sexo. Sexaje realizado en laboratorio por disección.

Fecha	Nombre	Sitio	n por sexo	n total
11/10/2022	Arrayan	Referencia 1	7 hembras	20
			13 machos	
21/10/2022	Clarillo	Referencia 2	9 hembras	20
			11 machos	
12/10/2022	Hualtatas	Urbano	11 hembras	20
			9 machos	
13/10/2022	Golf	Urbano	0	0
14/10/2022	Trapiche	Efluente 1	9 hembras	12
			3 machos	
20/10/2022	Monte	Efluente 2	4 hembras	20
			16 machos	
n total			40 Hembras	92
			52 Machos	

Estadística parámetros morfométricos.

Parámetros morfométricos en hembras

En el factor de condición K para las hembras no presentan diferencias significativas entre sitios. El sitio Hualtatas presenta los valores más altos, mientras que los sitios de referencia presentan valores similares, los sitios expuestos presentan los valores más bajos (Fig. 3).

Para el índice hepatosomático (IHS) se observan diferencias significativas ($K_w p < 0,05$), los sitios con diferencias significativas entre si fueron Arrayan – Clarillo; Clarillo – Trapiche (Wilcox $p < 0,05$). El Clarillo (referencia) es el sitio con los valores más bajos, le sigue el Monte (expuesto), Arrayan, Hualtatas y Trapiche presentan los valores más altos de IHS (Fig. 4).

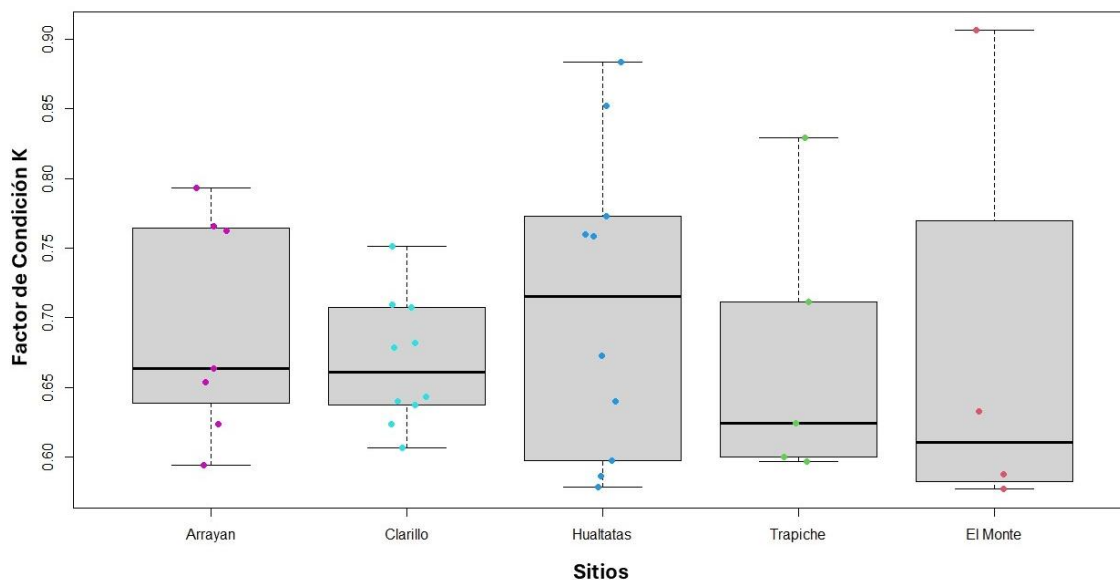


Figura 3 Boxplot con factor de condición K hembras colectadas en sitios referencia (Arrayan $0,69 \pm 0,03$ (7); Clarillo $0,67 \pm 0,01$ (10)), sitio urbano (Hualtatas $0,71 \pm 0,04$ (10)) y sitio expuesto a efluentes PTAS (Trapiche $0,67 \pm 0,04$ (5); El Monte $0,68 \pm 0,08$ (4)). *(media \pm SE (n), La línea horizontal en los box plots es la mediana, los limites representan los percentiles 25 y 75, los mínimos y máximos valores están en los bigotes.)

Los valores de índice gonadosomático (IGS) presentan diferencias significativas (Kw $p < 0,05$), siendo los sitios con diferencias Clarillo – Hualtatas; Clarillo – Trapiche (Wilcox $p < 0,05$). Los sitios de referencia presentaron valores bajos de IGS siendo El Clarillo más bajo que Arrayan, el sitio urbano Hualtatas presentó el valor más alto. Los sitios expuestos, Trapiche y el Monte presentan valores cercanos (Fig. 5).

Valores individuales por sitios, para talla, peso corporal, peso gónadas e hígados, IGS e IHS, son reportados en anexos (ver anexo B).

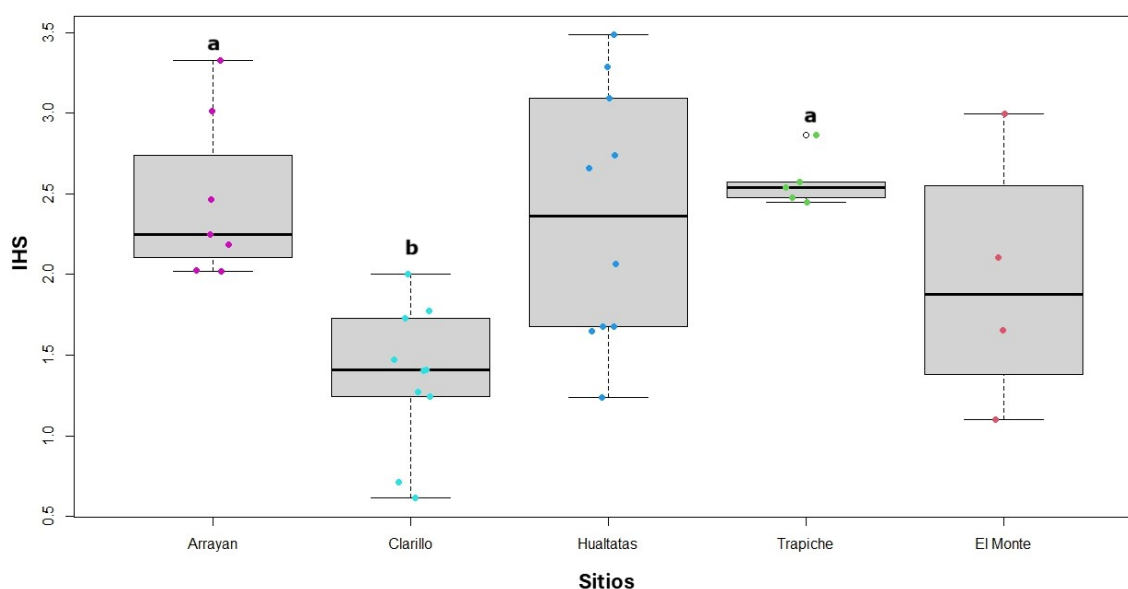


Figura 4 Boxplot de índice hepatosomático (IHS) hembras colectadas en sitios referencia (Arrayan $2,47 \pm 0,19$ (7); Clarillo $1,36 \pm 0,14$ (10)), sitio urbano (Hualtatas $2,36 \pm 0,25$ (10)) y sitio expuesto a efluentes PTAS (Trapiche $2,58 \pm 0,07$ (5); El Monte $1,96 \pm 0,40$ (4)). Superíndices a y b muestran diferencias estadísticamente significativas. *(media \pm SE (n), La línea horizontal en los box plots es la mediana, los límites representan los percentiles 25 y 75, los mínimos y máximos valores están en los bigotes.)

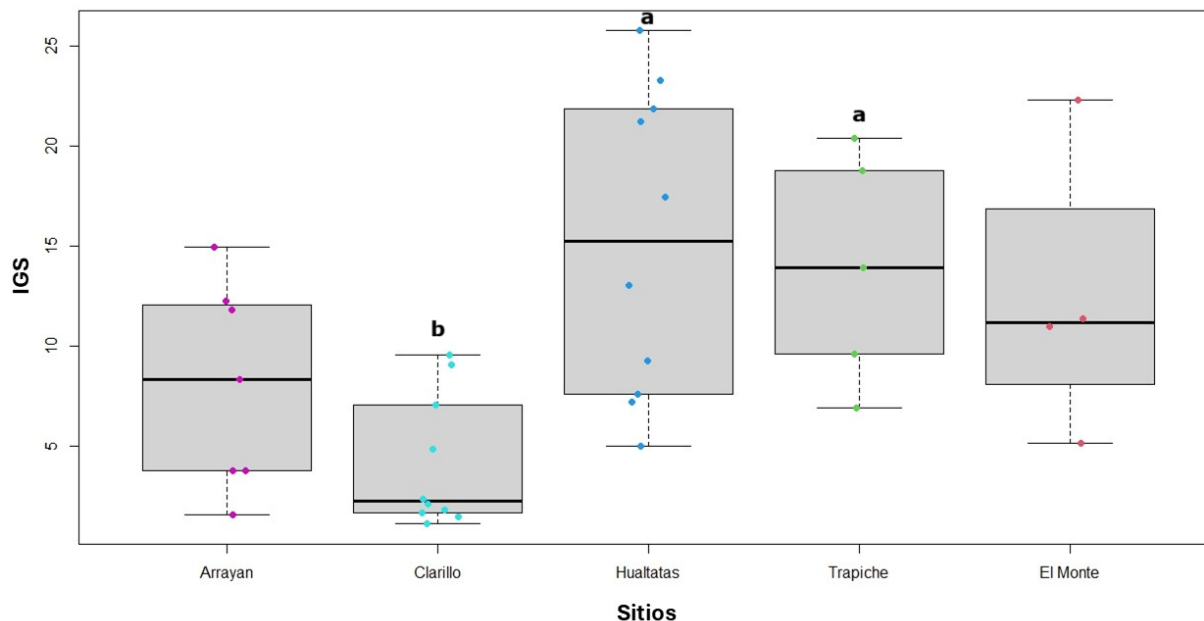


Figura 5 Boxplot de índice gonadosomático (IGS) hembras colectadas en sitios referencia (Arrayan $8,07 \pm 1,94$ (7); Clarillo $4,11 \pm 1,04$ (10)), sitio urbano (Hualtatas $15,17 \pm 2,42$ (10)) y sitio expuesto a efluentes PTAS (Trapiche $13,93 \pm 2,58$ (5); El Monte $12,45 \pm 3,58$ (4)). Superíndices a y b muestran diferencias estadísticamente significativas. *(media \pm SE (n), La línea horizontal en los box plots es la mediana, los límites representan los percentiles 25 y 75, los mínimos y máximos valores están en los bigotes)

Parámetros morfométricos en machos

Para el factor de condición K los machos presentan diferencias significativas entre sitios ($K_w p < 0,05$). El monte tiene un factor de condición significativamente menor comparado con Arrayan, Clarillo y Hualtatas ($Wilcox p < 0,05$). El Monte es el sitio expuesto que presenta los menores valores para K, los demás sitios presentan valores similares (Fig. 6).

El índice hepatosomático presenta diferencias significativas ($K_w p < 0,05$), estas diferencias son presentes entre Arrayan – Clarillo; Clarillo – Hualtatas; Arrayan – El monte y Hualtatas – El monte ($Wilcox p < 0,05$). El menor valor reportado es de El Clarillo (referencia), el Monte también

presenta valores bajos. El valor más alto es de Arrayan (referencia), Hualtatas y trapiche presentan valores similares entre sí (Fig. 7).

El índice gonadosomático presenta diferencias significativas (Kw $p < 0,05$), estas diferencias se observan entre los sitios Clarillo – El Monte (Wilcox $p < 0,05$). El Clarillo presenta el valor más bajo de IGS, luego Hualtatas y Arrayan. Los sitios expuestos Trapiche y el Monte son los que presentaron los valores más altos (Fig. 8).

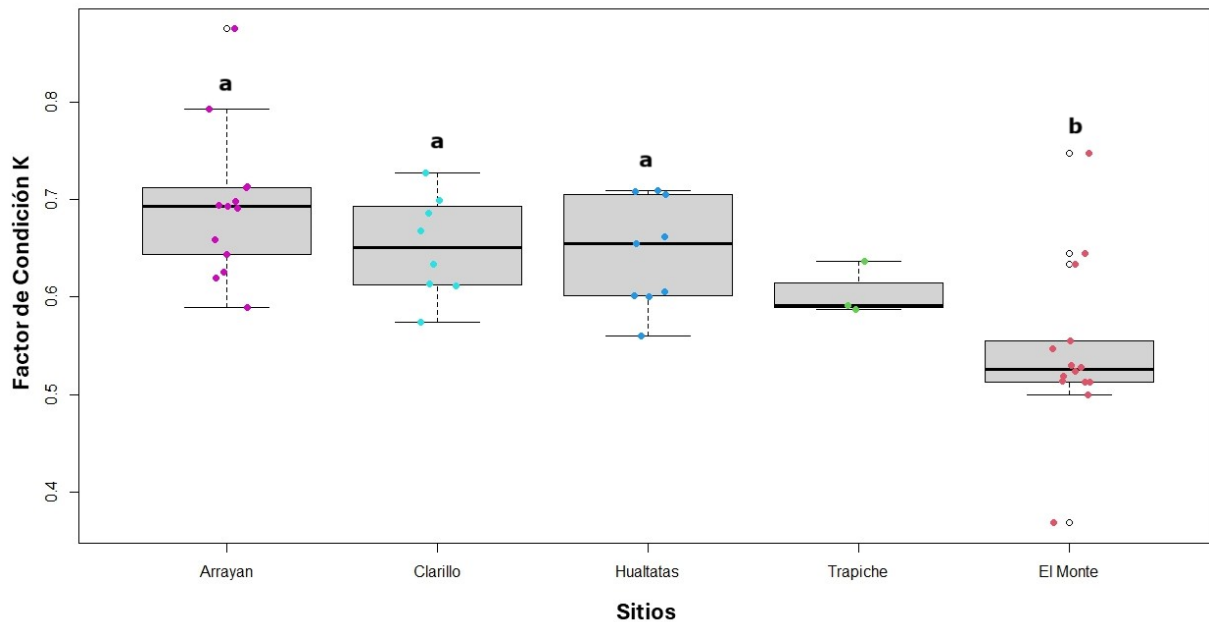


Figura 6 Boxplot de factor condición K machos colectados en sitios referencia (Arrayan $0,69 \pm 0,02$ (13); Clarillo $0,65 \pm 0,02$ (8)), sitio urbano (Hualtatas $0,65 \pm 0,02$ (9)) y sitio expuesto a efluentes PTAS (Trapiche $0,61 \pm 0,02$ (3); El Monte $0,55 \pm 0,02$ (14)). Superíndices a y b muestran diferencias estadísticamente significativas. *(media \pm SE (n), La línea horizontal en los box plots es la mediana, los limites representan los percentiles 25 y 75, los mínimos y máximos valores están en los bigotes.)

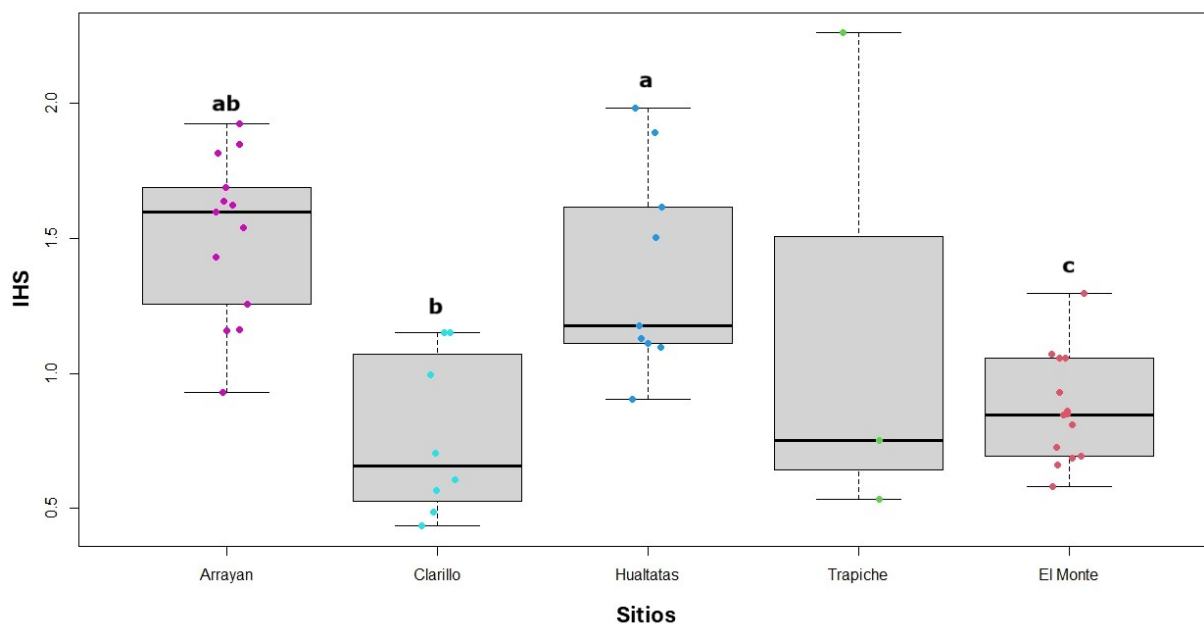


Figura 7 Boxplot Índice hepatosmático (IHS) machos colectados en sitios referencia (Arrayan $1,51 \pm 0,08$ (13); Clarillo $0,76 \pm 0,10$ (8)), sitio urbano (Hualtatas $1,38 \pm 0,13$ (9)) y sitio expuesto a efluentes PTAS (Trapiche $1,18 \pm 0,54$ (3); El Monte $0,87 \pm 0,05$ (14)). Superíndices ab, a, b y c muestran diferencias estadísticamente significativas. *(media \pm SE (n), La línea horizontal en los box plots es la mediana, los límites representan los percentiles 25 y 75, los mínimos y máximos valores están en los bigotes.)

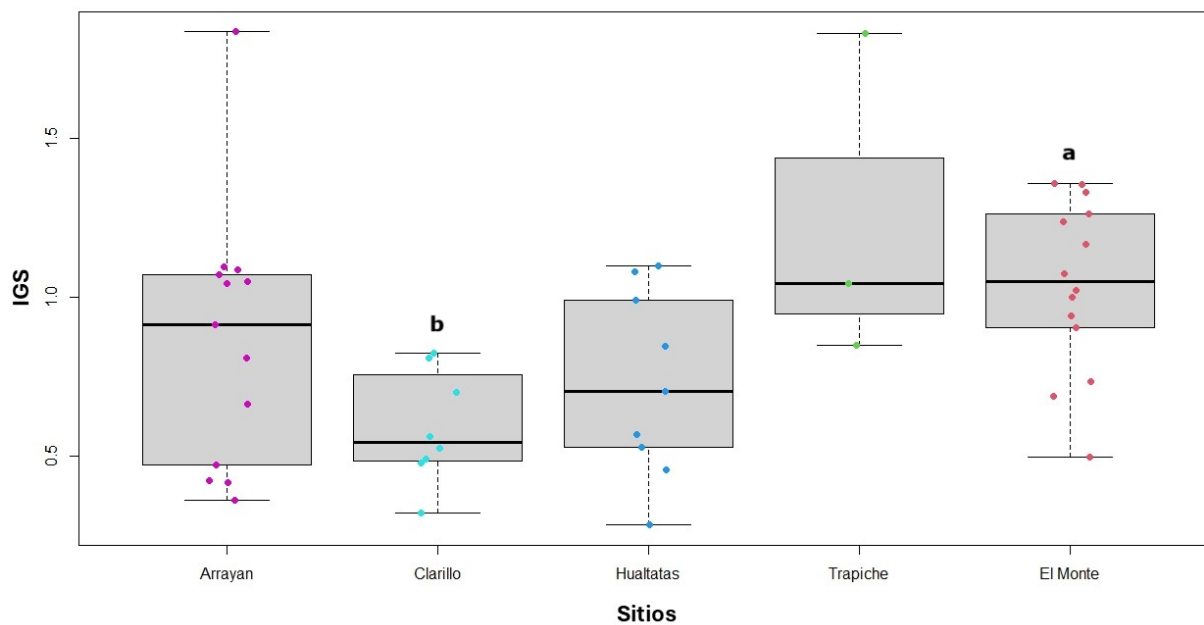


Figura 8 Boxplot Índice gonadosomático (IGS) machos colectados en sitios referencia (Arrayan $0,86 \pm 0,11$ (13); Clarillo $0,59 \pm 0,06$ (8)), sitio urbano (Hualtatas $0,73 \pm 0,10$ (9)) y sitio expuesto a efluentes PTAS (Trapiche $1,24 \pm 0,30$ (3); El Monte $1,04 \pm 0,07$ (14)).

Superíndices a y b muestran diferencias estadísticamente significativas. *(media \pm SE (n), La línea horizontal en los box plots es la mediana, los límites representan los percentiles 25 y 75, los mínimos y máximos valores están en los bigotes.)

Diseño de primers

Los primers diseñados fueron probados con un grupo de muestras del total de las extracciones de ARN. La curva de calibración fue realizada en diluciones con agua libre de RNAsas, en concentraciones de 1, 1:2, 1:4; 1:16, 1:32, 1: 64.

Los primers que se utilizaron para la cuantificación de expresión génica de interés reproductivo, fueron *ar*, *cyp 19* y *era*, los genes control endógenos fueron *ef1g* y *rps18*, estos seleccionados por criterios de valor $r^2 > 0,9$ y el porcentaje de eficiencia entre 90 a 110% (Tabla 4). Secuencia de primers utilizados son reportados en anexos (ver Anexo C).

Tabla 4 Curvas de calibración realizadas a los primers diseñados para los genes de elección, valor r², eficiencia (%), temperatura melting (°C) y a qué tipo de gen pertenece. Primers que no cuantificaron se incluyen.

Genes primers	Curva de calibración	r² (>0,9)	Eficiencia %	Temperatura melting °C	Tipo
<i>ar 1</i>	ok	0,991	105,793	62	Sexual
<i>cyp 19 1</i>	ok	0,974	102,17	62	Sexual
<i>era 1</i>	ok	0,986	96,596	62	Sexual
<i>ef1g 1</i>	ok	0,994	97,208	62	Gen control
<i>rps 18 2</i>	ok	0,936	113,135	60	Gen control
<i>vtg 2</i>	-	0	0	60	Sexual
<i>esrb1</i>	-	0,125	-95,716	60	Sexual
<i>esrb2</i>	-	0	0	60	Sexual
<i>spata4 2</i>	-	0,818	534,511	60	Sexual
<i>spata4 1</i>	-	0	0	59	Sexual
<i>rps 18 1</i>	-	0,818	534,511	60	Gen control

Cuantificación qPCR

Hembras

La cuantificación por qPCR del receptor andrógeno (*ar*) en hembras presenta diferencias significativas entre sitios (ANOVA $p= 0,01$), estas diferencias son corroboradas con el análisis post-hoc determinando diferencias entre los sitios Arrayan – Clarillo (Tukey $p= <0,05$).

El sitio Arrayan presenta una mayor expresión de *ar* que Clarillo, siendo ambos sitios de referencia y con el mismo número de muestras. El Monte tiene una expresión menor que Trapiche y Hualtatas. (Fig. 9).

Para la expresión de aromatasa (*cyp19a1*) no se detectan diferencias significativas. Clarillo es el sitio que presenta la menor expresión de *cyp19a1*, mientras que el Monte presenta los valores más elevados, Arrayan tiene una expresión mayor que Clarillo y Trapiche. (Fig. 10), para este análisis se excluyeron los resultados de Hualtatas por presentar valores de expresión atípicos (Anexo D). En cuanto a la expresión del receptor de estrógenos alfa (*era*) no se detectaron diferencias significativas entre los sitios, sin embargo, Arrayan presenta una expresión mayor comparada con Clarillo, mientras que Hualtatas presenta la expresión más baja de todos los sitios. En el caso de los sitios expuestos a PTAS el Monte presenta una expresión mayor que trapiche (Fig. 11). Tabla resumen con valores de expresión reportados en anexos (ver anexo D).

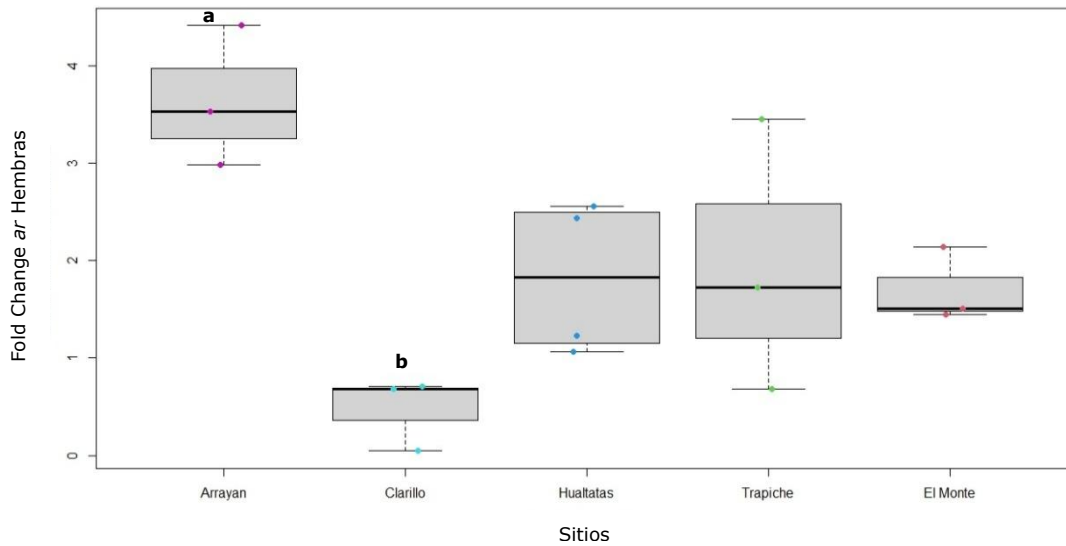


Figura 9 Boxplot de fold change expresión receptor de andrógeno (*ar*) de hembras, colectadas en sitios referencia (Arrayan $3,60 \pm SE 0,42$ (3) ; Clarillo $0,28 \pm SE 0,22$ (3)), sitio urbano (Hualtatas $1,69 \pm SE 0,39$ (4)) y sitio expuesto a efluentes de PTAS (Trapiche $1,59 \pm SE 0,81$ (3); El Monte $1,68 \pm SE 0,22$ (3)). Superíndices a y b muestran diferencias estadísticamente significativas. *(media \pm SE (n))

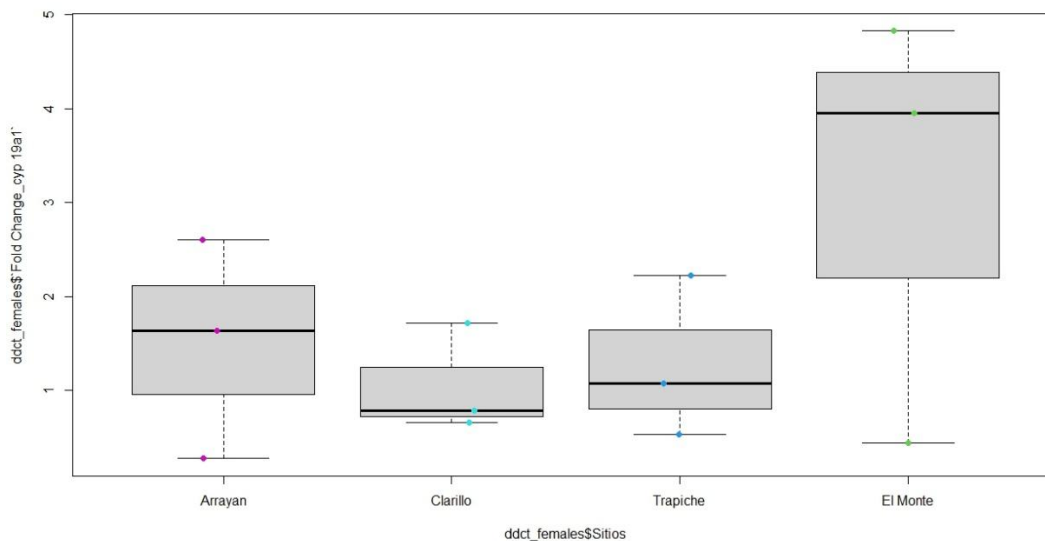


Figura 10 Boxplot de fold change expresión aromatasa (*cyp19a1*) hembras colectadas en sitios referencia (Arrayan $1,05 \pm SE 0,68$ (n3); Clarillo $0,95 \pm SE 0,33$ (3)) y sitio expuesto a efluentes PTAS (Trapiche $1,08 \pm SE 0,50$ (3); El Monte $2,32 \pm SE 1,34$ (3)). *(media \pm SE (n))

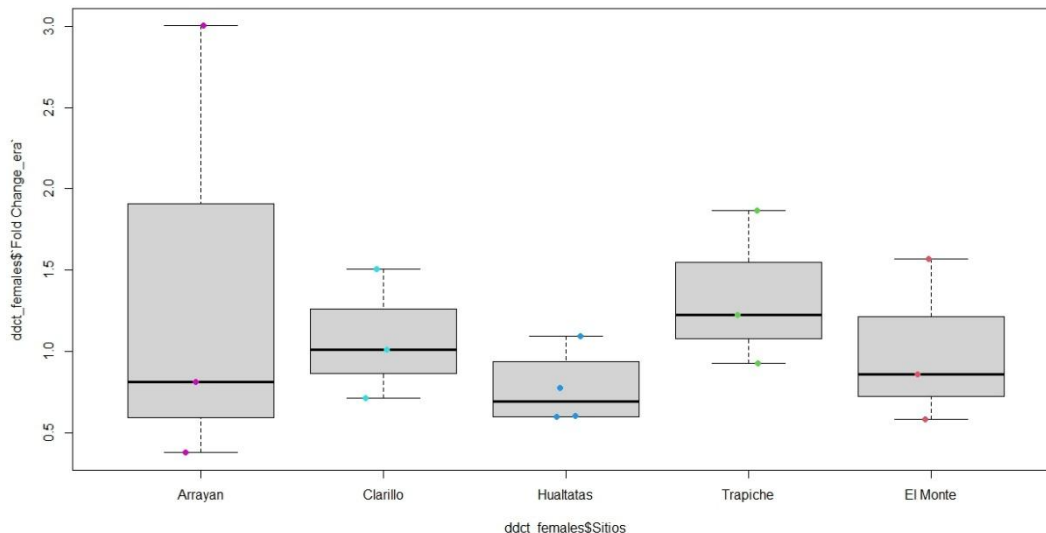


Figura 11 Boxplot de Fold change expresión receptor estrógeno alfa (*era*) hembras, colectadas en sitios referencia (Arrayan $0,97 \pm SE 0,81$ (3); Clarillo $1,03 \pm SE 0,23$ (3)), sitio urbano (Hualtatas $0,75 \pm SE 0,12$ (4)) y sitio expuesto a efluentes PTAS (Trapiche $1,29 \pm SE 0,28$ (3); El Monte $0,92 \pm SE 0,29$ (3)). *(media \pm SE (n))

Machos

Para las cuantificaciones por qPCR de receptor andrógeno (*ar*), el Monte presenta la mayor expresión, seguido por el Arrayan, mientras que Clarillo presenta los valores más bajos, luego Trapiche presenta mayor expresión que Hualtatas y Clarillo (Fig. 12). Para la cuantificación de aromatasa (*cyp19a1*) la expresión mayor se observa en Hualtatas, seguido por el Monte, Arrayan y Clarillo, el Trapiche es el sitio con la menor expresión (Fig. 13). En la expresión del receptor de estrógenos alfa (*era*) los sitios que presentan los valores más altos son Arrayan y Hualtatas, seguidos por el Monte y el Clarillo, el sitio con menor expresión es Trapiche. No se detectaron diferencias significativas para estos tres genes (Fig. 14).

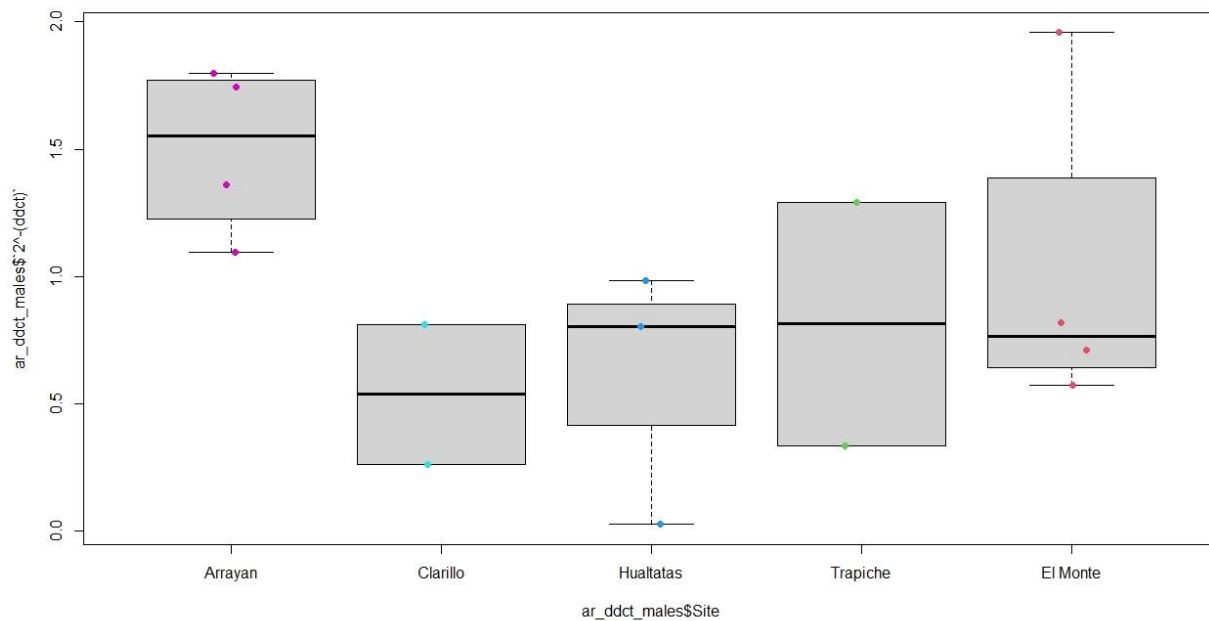


Figura 12 Boxplot de Fold change expresión del receptor de andrógeno (*ar*) en machos colectados en sitios referencia (Arrayan $1,47 \pm SE 0,17$ (4); Clarillo $0,46 \pm SE 0,27$ (2)), sitio urbano (Hualtatas $0,28 \pm SE 0,29$ (3)) y sitio expuesto a efluentes PTAS (Trapiche $0,66 \pm SE 0,48$ (2); El Monte $0,90 \pm SE 0,32$ (4)). *(media \pm SE (n))

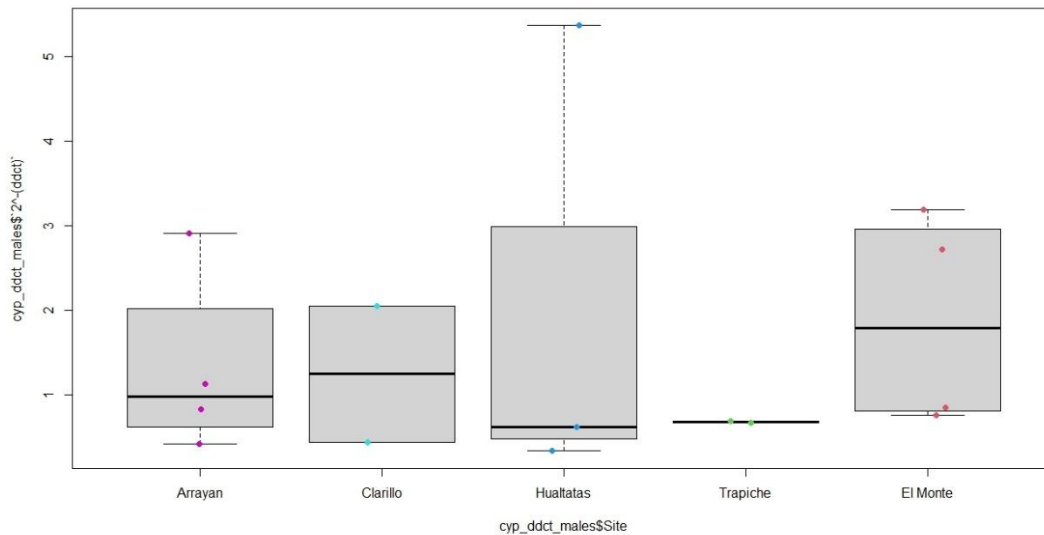


Figura 13 Boxplot de fold change expresión aromatasa (*cyp19a1*) machos colectados en sitios referencia (Arrayan $1,03 \pm SE 0,55$ (4); Clarillo $0,95 \pm SE 0,81$ (2)), sitio urbano (Huallatas $2,83 \pm SE 1,63$ (3)) y sitio expuesto a efluentes PTAS (Trapiche $0,68 \pm SE 0,01$ (2); El Monte $1,53 \pm SE 0,63$ (4)). *(media $\pm SE$ (n))

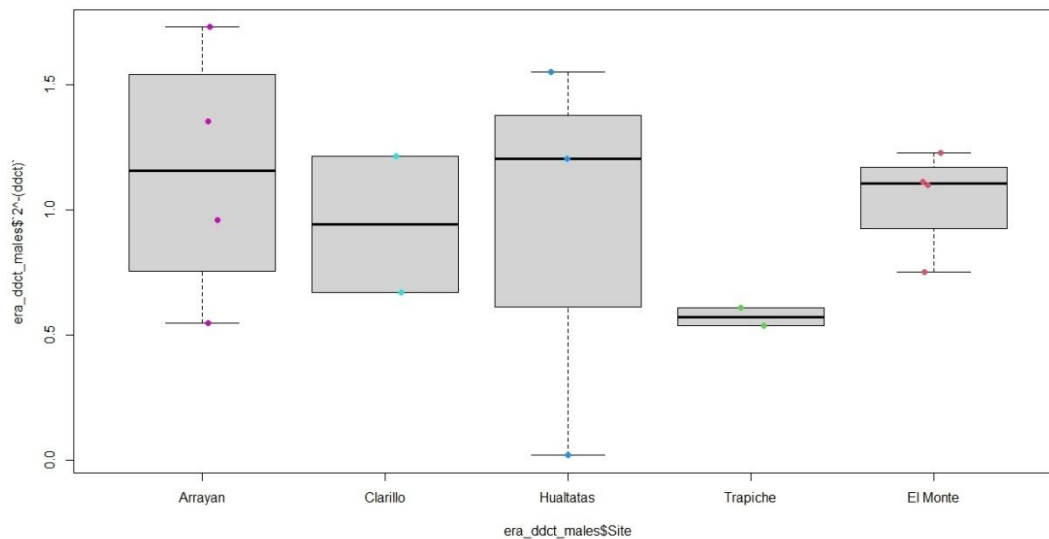


Figura 14 Boxplot de fold change expresión receptor de estrógeno alfa (*era*) de machos colectados en sitios referencia (Arrayan $1,05 \pm SE 0,25$ (4); Clarillo $0,90 \pm SE 0,27$ (2)), sitio urbano (Huallatas $0,33 \pm SE 0,46$ (3)) y sitio expuesto a efluentes PTAS (Trapiche $0,57 \pm SE 0,03$ (2); El Monte $1,03 \pm SE 0,10$ (4)). *(media $\pm SE$ (n))

IV. DISCUSION

Índices morfométricos

Las aguas servidas producen modificaciones a varios niveles de organización biológica (Bahamonde, Fuzzen, et al., 2015; Blanco et al., 2019; Racz & Goel, 2010; Tetreault et al., 2013; Whatley et al., 2010; Yeom et al., 2007) . A nivel poblacional, se han observado cambios de madurez poblacional asociado a exposición de aguas servidas (Tetreault et al., 2013) y un manejo ineficiente de las aguas servidas puede disminuir poblaciones y comunidades de peces (Galib et al., 2018)

El presente trabajo ha observado una mayor cantidad de individuos adultos en los sitios de efluentes de PTAS y urbano (Fig. 2). En el sitio del Trapiche (expuesto), siendo este el sector más próximo a las descargas de las plantas de tratamiento, se recolectaron gran cantidad de individuos adultos (93%), El Monte (expuesto) sitio alejado de la PTAS, presenta un 75% de adultos, Hualtatas (urbano) 63% adultos, Arrayan (referencia) 73% adultos y Clarillo (referencia) 39% adultos. En la submuestra para análisis de laboratorio se determinó el sexo de cada individuo, Trapiche presenta la mayor cantidad de hembras, junto con Clarillo y Hualtatas, Arrayan y el Monte presentan una mayor proporción de machos (Tabla 3).

El bajo porcentaje de juveniles en los sitios expuestos puede estar relacionado a la falta de la renovación de juveniles asociados a la mezcla compleja que presentan los efluentes de PTAS, en general debido a un trastorno a nivel reproductivo (i.e en hembras con bajos niveles de estradiol, oocitos inviables) (Adams et al., 1992) o exposiciones crónicas a estrógenos afectando a machos con aumentos de vitelogenina (feminización, intersexo) y en hembras afectando la oogénesis por aumentos de vitelogenina (Kidd et al., 2007) llevando así a una disminución en la postura de

huevos y menor cantidad de larvas (Munkittrick' & Dixon, 1989)por consiguiente, genera una reducción de tamaño poblacional (Porter & Janz, 2003; Kidd et al., 2007; Yeom et al., 2007),.

Para el factor de condición K en los machos y hembras se reportaron valores bajos en el Trapiche y el Monte (expuestos) comparados con los sitios de referencia y sitio urbano. Se destaca que el Monte presenta un factor de condición menor que Trapiche, es posible que esta variación sea debido a las actividades silvoagropecuarias asociadas a el Monte. El factor de condición K en hembras presentó los mayores niveles en el sitio Hualtatas.

Los valores del índice factor de condición K reportado en peces arcoíris (*Melanotaenia fluviatilis*) no presentaron cambios significativos a la exposición de 17 β -estradiol (E2) y 4-n-nonylphenol (NP) por 96 hrs (Shanthanagouda et al., 2013), aun así este índice se ha visto aumentado en los peces asociados a descargas de aguas servidas (Yeom et al., 2007) esto es posiblemente debido al aumento de nutrientes disponibles en el ambiente (Porter et al. 2003), esta aseveración no es concordante con los valores reportados para este estudio, probablemente ya que las PTAS, Farfana y Mapocho-Trebal, de tratamientos secundarios, tienen como objetivo disminuir la cantidad de nutrientes liberados al río. Para el caso de Hualtatas, que es un cuerpo de agua situado dentro de la ciudad, presenta descargas de otros afluentes y probablemente aguas residuales urbanas sin tratamiento, lo que puede influir en la calidad de nutrientes presentes en el ambiente.

Para el IHS, los valores en machos fueron mayor el reportado en los provenientes del Arrayan (referencia), comparado con el Clarillo (referencia), los sitios el Monte, Trapiche y Hualtatas presentaron valores bajos comparados con el Arrayan. Las hembras presentan valores altos en Trapiche, Arrayan y Hualtata, y los valores más bajos en comparación es el Clarillo y el Monte.

En general el índice hepatosomático (IHS) es un buen indicador de salud de peces expuestos a contaminantes acuáticos (Yeom et al., 2007; Dane & Sisman, 2020). El IHS es mayor en sitios post descarga, asociado al aumento del tamaño del hígado por dietas ricas en carbohidratos o actividad enzimática por desintoxicación de componentes (Whatley et al., 2010; Yeom et al., 2007). El IHS de machos expuestos a efluentes de aguas servidas presentaron incrementos significativos comparados con su sitio de referencia (agrícolas y de pastoreo). Estos valores están correlacionados con la producción de vitelogenina y la exposición a estrógenos, a su vez el incremento en el tamaño del hígado puede ser atribuido a la remoción de toxinas y a la inducción de vitelogenina (Porter & Janz, 2003) y presencia de metales como el Aluminio (Authman, 2011; Dane & Sisman, 2020). Las tilapias provenientes de efluentes de aguas servidas mostraron IHS significativamente mayor (28.8% $p < 0.01$) que las encontradas en el sitio de referencia proveniente de piscicultura (Al-Ghais, 2013). Por otra parte, se han descrito disminución en los valores de IHS a exposición crónica de Cadmio (Fiaz et al., 2024; Idrus et al., 2022), níquel y cromo (Nath Pandit & Lal Gupta, 2019) por lo que el valor bajo presente en el Clarillo es probablemente debido a explotaciones mineras cercanas.

IGS los valores de IGS en hembras son mayores para los sitios urbanos y expuestos, el valor más bajo reportado es en Clarillo y luego Arrayan. Para los machos los valores IGS son mayores en los sitios expuestos, y clarillo con el valor más bajo. El IGS puede verse disminuido a la exposición crónica a estrógenos sintéticos en el agua, (Kidd et al., 2007) y la exposición a metales pesados (Nath Pandit et al., 2019). Por otra parte, el aumento del IGS en hembras puede estar relacionado a cambios reproductivos estacionales entre los meses de octubre y noviembre (Chiang 2011a; 2012) coincidentes con las fechas de captura. También se describe aumento de

IGS en hembras expuestas a efluentes de plantas de celulosas (Chiang et al., 2011; Orrego et al., 2019).

Transcriptómica

Receptor de andrógeno (*ar*)

El gen del receptor de andrógenos codifica una proteína la que actúa como un factor de transcripción activado por hormonas esteroideas. Al unirse al ligando hormonal, el receptor se disocia de las proteínas accesorias, se transloca al núcleo, se dimeriza y, a continuación, estimula la transcripción de los genes que responden a los andrógenos (Weizmann Institute of Science, n.d.-a). La función de los andrógenos es fundamental en el desarrollo sexual de machos antes del nacimiento y durante la pubertad (National Library of Medicine, 2024). En teleósteos las características fenotípicas (dimorfismo sexual marcado, tamaño de aleta, órganos copulatorios), conductas reproductivas (cortejo, construcción de nidos, agresividad) y cambios fisiológicos (desarrollo gonadal) son mediados por el receptor de andrógenos (Ogino et al., 2023).

En hembras de *T. areolatus* el sitio Arrayan presenta una mayor expresión de *ar* que Clarillo (Tukey $p < 0.05$), siendo ambos sitios de referencia y con el mismo número de muestras. El Monte tiene una expresión menor que Trapiche y Hualtatas. (Fig. 9). En los machos el Monte presenta la mayor expresión de *ar* seguido por el Arrayan, mientras que Clarillo presenta los valores más bajos, luego Trapiche presenta mayor expresión que Hualtatas y Clarillo (Fig. 12). El aumento de expresión de *ar* en machos del monte es concordante con lo reportado en descargas de PTAS (Bahamonde et al., 2014).

Estudios controlados que compararon la expresión del gen *ar*, en testículos de carpita cabezona (*Pimephales promelas*) expuestos a aguas servidas y a hormonas sintéticas demostraron una expresión disminuida del gen *ar* ($-1 \log_2 \Delta \Delta Ct$) en los individuos expuestos a las aguas

servidas, mientras que a la exposición de estrógenos (EE2) presentaron una expresión positiva (+1 log₂ΔΔCt) (Garcia-Reyero et al., 2011). Las hembras presentaron mayor expresión de *ar* el Arrayan, similar a la situación descrita (Bahamonde et al., 2014) que reportó hembras con mayores niveles de *ar* que machos en época reproductiva de *Etheostoma caeruleum*. Siendo la época reproductiva durante la primavera para *T. areolatus*. En cambio, para el sitio referencia el Clarillo es incierta la fuente o variación que genera la diferencia entre este sitio y el Arrayan.

A su vez las expresiones reportadas como bajas en los sitios expuestos son concordantes con el efecto descrito por Garcia-Reyero et al. (2011). En cambio, para el sitio referencia el Clarillo es incierta la fuente o variación que genera la diferencia entre este sitio y el Arrayan.

Aromatasa (*cyp19a1*)

El *cyp19a1* es un gen codificante, miembro de la familia de los citocromos P450, que tiene como función la síntesis de esteroides, entre otros. Esta proteína está ubicada en el retículo endoplásmico y cataliza el último paso de la biosíntesis de estrógenos. Las mutaciones de este gen pueden resultar en incrementos o detrimentos en la actividad de la aromatasa. Se sugiere que este estrógeno tiene relación de hormona sexual y participación en el crecimiento o diferenciación sexual. (Weizmann Institute of Science, n.d.-b). La aromatasa es clave en la investigación de disruptores endocrinos, debido a su rol en la biosíntesis de hormonas sexuales (Shanthanagouda et al., 2013). En peces se han descrito dos isoformas, *cyp19a1* secuenciada en gónadas y *cyp19a2* secuenciadas en cerebro y pituitaria (Kazeto et al., 2003; Shanthanagouda et al., 2013). El gen *cyp19a1* ha sido estudiado por su rol en la diferenciación sexual y desarrollo gonadal en peces. Siendo la expresión de este gen usado como indicador de los efectos de disruptores endocrinos (Kazeto et al., 2003; Villeneuve et al., 2009).

En los resultados entregados en este trabajo encontramos que, en hembras del sitio el Clarillo se presenta la menor expresión de *cyp19a1*, a su vez el Monte presenta valores mayores de todos los sitios, en el caso de Arrayan, la expresión es mayor que Trapiche y Clarillo (Fig. 10). En cuanto a la expresión de *cyp19a1* en machos, Hualtatas presenta la mayor expresión de todos los sitios, le sigue el Monte. Arrayan presenta una expresión mayor que Clarillo y Trapiche, siendo este último la expresión más baja (Fig. 13). Se han reportado reducciones en la expresión de *cyp19a1* a exposiciones 1 µg/L E2 y 100 µg/L NP y una completa inhibición a las 96hrs de exposición en ambientes controlados (Shanthanagouda et al., 2013)

El Fadrozol (FAD) es un compuesto inhibidor no esterooidal de la aromatasa, usado como antineoplásico en cáncer de mamas (National Center for Biotechnology Information, 2025) que en peces ha mostrado una supresión de la producción de los estrógenos en los ovarios (Schroeder et al., 2017). A su vez se ha descrito un aumento en la expresión de *cyp19a1* a la exposición de 5 and 50 mg FAD/L a 1 hr de ambos tratamientos. Pero, esta expresión se vio reducida a las 2 hrs de exposición para ambos tratamientos y se mantuvo baja a las 6 hrs en los peces expuestos a 50mg FAD/L (Schroeder et al., 2017). En otro grupo de peces la expresión estuvo aumentada a exposiciones de 30-µg FAD/L en el día 2 y para el día 4 a 3-µg/L (Villeneuve et al., 2009a). Un aumento en la expresión de *cyp19a1* fue evidenciado en peces expuestos a andrógenos externos (11- ketotestosterone, 292 ng/L) durante 3 semanas, mientras que los expuestos a aguas servidas mostraron una disminución en la expresión, respecto al grupo expuesto a estrógenos (Garcia-Reyero et al., 2011).

La expresión de *cyp19a1* puede correlacionarse a la presencia de diferentes compuestos hormonales sintéticos, concentraciones y tiempos de exposición como los expuestos por diversos

autores (Garcia-Reyero et al., 2011; Schroeder et al., 2017; Shanthanagouda et al., 2013; Villeneuve et al., 2009).

Receptor de estrógenos alfa (*era*)

Este gen codifica a una proteína receptora de estrógenos, que regula la transcripción de genes inducibles por estrógenos (Weizmann Institute of Science, n.d.-c). Los estrógenos en peces tienen efecto sobre la ovogénesis, vitelogenesis, regulación de la gonadotropina, desarrollo testicular y aspectos reproductivos (Nelson & Habibi, 2013).

En cuanto a la expresión del gen *era* en hembras Arrayan es el sitio que presenta la mayor expresión comparada con Clarillo y los demás sitios, a su vez el Trapiche presenta mayor expresión que el Clarillo, el Monte y Hualtatas (Fig. 11). Para los machos en la expresión del gen *era* los sitios que presentan los valores más altos son Arrayan y Hualtatas, seguidos por el Monte y el Clarillo, el sitio con menor expresión es Trapiche (Fig. 14).

La expresión de *era* en machos expuestos a EE2 presenta una expresión positiva ($<1 \log_2 \Delta \Delta Ct$) y en cambio en las aguas servidas presenta disminución en la expresión ($-3 \log_2 \Delta \Delta Ct$ aprox) (Garcia-Reyero et al., 2011)., los niveles de expresión más bajos de *era* se reportaron para hembras y machos en sitios de efluentes de PTAS, siendo los machos del Trapiche quienes presentan una expresión baja ($0.5 \cdot 2^{-(\Delta \Delta Ct)}$). Aun así los valores de expresión en sitios expuestos son menor que el sitio control Clarillo, por lo que concuerda con lo descrito en reportes de exposición a PTAS (Garcia-Reyero et al., 2011).

Al ser las aguas servidas una mezcla compleja de diferentes productos (Green et al., 2013; Rashid & Liu, 2021; Souza & Féris, 2016; Spataro et al., 2019; Vidal & Araya, 2014; Vieira et al., 2022) las respuestas a los estímulos reportados en la literatura pueden variar debido a las interacciones de los distintos químicos (Hanson et al., 2021)

Los tipos de tratamiento de aguas servidas influyen en el potencial disruptor endocrino de los componentes presentes, estos se unirían a los receptores hormonales AhR, AR, GR, Era, sugiriendo que el uso de biorreactores puede ayudar a disminuir la disrupción sobre los organismos acuático, a excepción de los efectos de disrupción potencial sobre los receptores de estrógenos que no se vieron afectados (Gwak et al., 2022).

V. CONCLUSIONES

El presente estudio es la primera aproximación a la transcriptómica en *T. areolatus*, a la exposición de aguas servidas de la cuenca del río Maipo, en el cual la información de este tipo es escasa y la existente es relacionada a exposición de actividades silvoagropecuarias

Los tamaños muestrales típicamente reportados para estos casos varían entre 3 a 11 individuos por sitio por sexo, para realizar los análisis fisiológicos y transcriptómicos, sin embargo, un valor de muestras menor presentó bajo poder estadístico al momento de determinar los cambios expresión (sobrerregulación o subregulación), en este trabajo se reportaron para la expresión de genes número de muestras entre 2 y 4, esto debido a cantidad, calidad e integridad de las extracciones de ARN.

Por lo que para aumentar el poder estadístico y reportar las diferencias significativas son reales o no, se recomienda aumentar el número de muestras por sitio para obtener una muestra más representativa de lo que ocurre con relación a los peces como bioindicadores de ambientes sometidos a las descargas de aguas servidas, residuos industriales, actividades silvoagropecuarias y otros eventos antrópicos.

Los resultados reportados en este trabajo pueden variar con referencias previas de otras partes del mundo, debido a que las PTAS son de diferentes categorías y la complejidad de sus efluentes será determinada por, las aguas de descargas y diferentes actividades antrópicas adyacentes a los sitios de muestreo (i.e silvoagropecuarias, minerías, vertidos ilegales, aguas lluvias, entre otros). Agregar a esto que los resultados pueden variar de manera espacio temporal, debido a pulsos de liberación de las PTAS y asociado a exposición agudas, con efectos reportados, por lo que para complementar dichas correlaciones de efectos del tipo interrupción endocrina se

sugiere muestrear componentes de aguas y considerar variaciones espacio temporales, flujo y tiempo de exposición a dichas fuentes.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams, S. M., Crumby, W. D., Greeley, M., R Shugart, J. L., & Saylor, C. F. (1992). Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: A holistic assessment. In *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 24(3): 347-360. [https://doi.org/doi:10.1016/0147-6513\(92\)90011-q](https://doi.org/doi:10.1016/0147-6513(92)90011-q)
- Aguas Andinas. (2017). *Reporte de sustentabilidad 2017*. <https://www.aguasandinasinversionistas.cl/~media/Files/A/Aguas-IR-v2/sustainability-reports/es/aguas-andinas-reporte-sustentabilidad-2017.pdf>
- Al-Ghais, S. M. (2013). Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 74(1), 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.07.005>
- Alhashemi, A. H., Karbassi, A., Kiabi, B. H., Monavari, S. M., & Sekhavatjou, M. S. (2012). Bioaccumulation of trace elements in different tissues of three commonly available fish species regarding their gender, gonadosomatic index, and condition factor in a wetland ecosystem. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(4), 1865–1878. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2085-8>
- Ali, J. M., Montecinos, A., Schulze, T. T., Allmon, L. G., Kallenbach, A. T., Watson, G. F., Davis, P. H., Snow, D. D., Bertin, A., Gouin, N., & Kolok, A. S. (2020). Assessment of Gene Expression Biomarkers in the Chilean Pencil Catfish, *Trichomycterus areolatus*, from the Choapa River Basin, Coquimbo Chile. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 78(1), 137–148. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00678-x>
- Andrzejczyk, N., Hrenchuk, L., Palace, V., & Schlenk, D. (2020). Transcriptomics of epidermal mucus as a nonlethal method to compare gene expression variation among fish populations. *Authorea*. <https://doi.org/10.22541/au.160133506.60709564>
- Arratia, G. (1983). Preferencias de habitat de peces siluriformes de aguas continentales de Chile (Fam. Diplomystidae y Trichomycteridae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 18(4), 217–237. <https://doi.org/10.1080/01650528309360637>
- Arratia, G., Rojas, G., & Chang, A. (1981). Géneros de peces de aguas continentales de Chile. *Museo Nacional de Historia Natural* 34:3-108.
- Authman, M. M. N. (2011). Environmental and experimental studies of aluminium toxicity on the liver of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fish. In *Life Science Journal* (Vol. 8, Issue 4). <http://www.lifesciencesite.com><http://www.sciencepub.net/life><http://www.lifesciencesite.com>
- Bagenal, T. B., & Tesch, F. W. (1978). *Methods for Assessment of Fish Production in Fresh Waters* (T. B. Bagenal & W. E. Ricker, Eds.; 3rd ed.). Blackwell Scientific.
- Bahamonde, P. A., Fuzzen, M. L., Bennett, C. J., Tetreault, G. R., McMaster, M. E., Servos, M. R., Martyniuk, C. J., & Munkittrick, K. R. (2015). Whole organism responses and intersex severity in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) following exposures to municipal wastewater in the Grand River basin, ON, Canada. Part A. *Aquatic Toxicology*, 159, 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.023>
- Bahamonde, P. A., McMaster, M. E., Servos, M. R., Martyniuk, C. J., & Munkittrick, K. R. (2015). Molecular pathways associated with the intersex condition in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) following exposures to municipal wastewater in the Grand River basin, ON, Canada. Part B. *Aquatic Toxicology*, 159, 302–316. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.022>

- Bahamonde, P. A., Tetreault, G. R., McMaster, M. E., Servos, M. R., Martyniuk, C. J., & Munkittrick, K. R. (2014). Molecular signatures in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) inhabiting an urbanized river reach receiving wastewater effluents. *Aquatic Toxicology*, *148*, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.010>
- Bertin, A., Damiens, G., Castillo, D., Figueroa, R., Minier, C., & Gouin, N. (2020). Developmental instability is associated with estrogenic endocrine disruption in the Chilean native fish species, *Trichomycterus areolatus*. *Science of the Total Environment*, *714*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136638>
- Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. (n.d.). *Hidrografía Región Metropolitana de Santiago*. Retrieved December 7, 2022, from <https://www.bcn.cl/siit/nuestropais/region13/hidrografia.htm>
- Blanco, M., Rizzi, J., Fernandes, D., Colin, N., Maceda-Veiga, A., & Porte, C. (2019). Assessing the impact of waste water effluents on native fish species from a semi-arid region, NE Spain. *Science of the Total Environment*, *654*, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.115>
- Campos, H., Dazarola, G., Dyer, B., Fuentes, L., Gavilán, J., Huaquin, L., Martínez, G., Meléndez, R., Pequeño, G., Ponce, F., Ruiz, V., Sielfeld, W., Soto, D., Vega, R., & Vila, I. (1998). Categorías de Conservación de Peces Nativos de Aguas Continentales de Chile. *Boletín* *47*, 101–122.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., & Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, *38*(12), 2918–2926. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.029>
- Chiang, G., McMaster, M. E., Urrutia, R., Saavedra, M. F., Gavilán, J. F., Tucca, F., Barra, R., & Munkittrick, K. R. (2011). Health status of native fish (*Percilia gillissi* and *Trichomycterus areolatus*) downstream of the discharge of effluent from a tertiary-treated elemental chlorine-free pulp mill in Chile. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *30*(8), 1793–1809. <https://doi.org/10.1002/etc.573>
- Chiang, G., Munkittrick, K. R., McMaster, M. E., Tucca, F., Saavedra, M. F., Ancalaf, A., Gavilán, J. F., Unzueta, L., & Barra, R. (2012). Seasonal changes in oocyte development, growth and population size distribution of *Percilia gillissi* and *Trichomycterus areolatus* in the Itata basin, Chile. *Gayana*, *76*(2), 131–141.
- Chiang, G., Munkittrick, K. R., Saavedra, M. F., Tucca, F., McMaster, M. E., Urrutia, R., Tetreault, G., & Barra, R. (2011). Seasonal changes in reproductive endpoints in *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae) and *Percilia gillissi* (Perciformes, Perciliidae), and the consequences for environmental monitoring. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, *46*(3), 185–196.
- Chiang, G., Munkittrick, K. R., Urrutia, R., Concha, C., Rivas, M., Diaz-Jaramillo, M., & Barra, R. (2012). Liver ethoxyresorufin-O-deethylase and brain acetylcholinesterase in two freshwater fish species of South America; the effects of seasonal variability on study design for biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *86*, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.008>
- Costigan, S. L., Werner, J., Ouellet, J. D., Hill, L. G., & Law, R. D. (2012). Expression profiling and gene ontology analysis in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver following exposure to pulp and paper mill effluents. *Aquatic Toxicology*, *122–123*, 44–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.05.011>

- Dane, H., & Sisman, T. (2020). Effects of heavy metal pollution on hepatosomatic index and vital organ histology in *Alburnus mossulensis* from Karasu River. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 44, 607–617. <https://doi.org/10.3906/vet-1904-50>
- Fiaz, S., Naz, H., Ahmed, T., Zulfiqar, I., Mehmood, K., Jabbar, M., Shah, S. Q. A., & Usman, M. (2024). Toxicity, Histological, Hepato-Somatic Index and Growth Responses of Cadmium Stressed *Labeo rohita*. *Punjab University Journal of Zoology*, 39(1). <https://doi.org/10.17582/journal.pujz/2024/39.1.79.85>
- Galib, S. M., Mohsin, A. B. M., Parvez, M. T., Lucas, M. C., Chaki, N., Arnob, S. S., Hossain, M. I., & Islam, M. N. (2018). Municipal wastewater can result in a dramatic decline in freshwater fishes: A lesson from a developing country. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 419. <https://doi.org/10.1051/kmae/2018025>
- Garcia-Reyero, N., Lavelle, C. M., Escalon, B. L., Martinović, D., Kroll, K. J., Sorensen, P. W., & Denslow, N. D. (2011a). Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.08.014>
- Garcia-Reyero, N., Lavelle, C. M., Escalon, B. L., Martinović, D., Kroll, K. J., Sorensen, P. W., & Denslow, N. D. (2011b). Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.08.014>
- GESAM consultores. (2006). *Ficha técnica Trichomycterus aerolatus, ministerio del medio ambiente*. 1–9. https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2019/10/Trichomycterus_areolatus_P03R2_RCE_CORREGIDO.pdf
- Gironella Cos, M. (2010). *Nuevos métodos de diagnóstico molecular Transcriptómica (mARN y miR)*. <https://www.elsevier.es/index.php?p=revista&pRevista=pdf-simple&pii=S1578155010700358&r=8>
- Gobierno Regional Metropolitano de Santiago. (2022, October 20). *Datos Geográficos*. <https://www.gobiernosantiago.cl/Datos-Geograficos/>
<https://www.gobiernosantiago.cl/datos-geograficos/>
- Green, C., Williams, R., Kanda, R., Churchley, J., He, Y., Thomas, S., Goonan, P., Kumar, A., & Jobling, S. (2013a). Modeling of steroid estrogen contamination in UK and South Australian rivers predicts modest increases in concentrations in the future. *Environmental Science and Technology*, 47(13), 7224–7232. <https://doi.org/10.1021/es3051058>
- Green, C., Williams, R., Kanda, R., Churchley, J., He, Y., Thomas, S., Goonan, P., Kumar, A., & Jobling, S. (2013b). Modeling of steroid estrogen contamination in UK and South Australian rivers predicts modest increases in concentrations in the future. *Environmental Science and Technology*, 47(13), 7224–7232. <https://doi.org/10.1021/es3051058>
- Gwak, J., Lee, J., Cha, J., Kim, M., Hur, J., Cho, J., Kim, M. S., Jang, K. S., Giesy, J. P., Hong, S., & Khim, J. S. (2022). Molecular Characterization of Estrogen Receptor Agonists during Sewage Treatment Processes Using Effect-Directed Analysis Combined with High-Resolution Full-Scan Screening. *Environmental Science and Technology*, 56(18), 13085–13095. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03428>
- Habit, E., Victoriano, P., & Campos, H. (2005). *Ecología trófica y aspectos reproductivos de Trichomycterus areolatus (Pisces, Trichomycteridae) en ambientes lóticos artificiales*. https://www.researchgate.net/publication/237624315_Ecologia_trofica_y_aspectos_reproductivos_de_Trichomycterus_areolatus_Pisces_Trichomycteridae_en_ambientes_loticos_artificiales

- Hanson, S., Steeves, K., Bagatim, T., Hogan, N., Wiseman, S., Hontela, A., Giesy, J. P., Jones, P. D., & Hecker, M. (2021). Health status of fathead minnow (*Pimephales promelas*) populations in a municipal wastewater effluent-dominated stream in the Canadian prairies, Wascana Creek, Saskatchewan. *Aquatic Toxicology*, 238. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105933>
- Idrus, S. N. S., Abdullah, M. R., Mohd, F. H., & Othman, M. S. (2022). Hepatosomatic and Renosomatic Indices of *Anabas testudineus*; Exposed to Various Levels of Cadmium. *Journal of Environmental Protection*, 13(01), 161–170. <https://doi.org/10.4236/jep.2022.131010>
- INE. (2017). *Resultados Censo 2017*.
- Kassambara, A. (2023). *rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests* (R package version 0.7.2).
- Kazeto, Y., Goto-Kazeto, R., Place, A. R., & Trant, J. M. (2003a). Aromatase expression in zebrafish and channel catfish brains: changes in transcript abundance associated with the reproductive cycle and exposure to endocrine disrupting chemicals. In *Fish Physiology and Biochemistry* (Vol. 28, pp. 29–32).
- Kazeto, Y., Goto-Kazeto, R., Place, A. R., & Trant, J. M. (2003b). Aromatase expression in zebrafish and channel catfish brains: changes in transcript abundance associated with the reproductive cycle and exposure to endocrine disrupting chemicals. In *Fish Physiology and Biochemistry* (Vol. 28).
- Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., & Flick, R. W. (2007a). *Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen*. 8897–8901. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0609568104
- Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., & Flick, R. W. (2007b). *Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen*. 8897–8901. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0609568104
- Lemon, J. (2006). Plotrix: a package in the red light district of R. *R-News*, 6(4), 8–12.
- Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A. R. N., Lopez, R., & Butcher, S. (2024). The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W521–W525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae241>
- Manriquez, A., Huaquin, L., Arellano, M., & Arratia, G. (1988). Aspectos reproductivos de *Trichomycterus areolatus* Valenciennes, 1846 (Pisces: Teleostei: Siluriformes) en Rio Angostura, Chile. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 23(2), 89–102.
- Martyniuk, C. J., Mehinto, A. C., Colli-Dula, R. C., Kroll, K. J., Doperalski, N. J., Barber, D. S., & Denslow, N. D. (2020). Transcriptome and physiological effects of toxaphene on the liver-gonad reproductive axis in male and female largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 36, 100746. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbd.2020.100746>
- Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? In *Comptes Rendus - Biologies* (Vol. 340, Issues 9–10, pp. 403–405). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2017.07.004>
- Munkittrick, K. R., & Dixon, D. G. (1989). A holistic approach to ecosystem health assessment using fish population characteristics. In *Hydrobiologia* (Vol. 188). Kluwer Academic Publishers.
- Munkittrick, K. R., Port, C. B., Van Der Kraak, G. J., Smith, I. R., & Rokosh, D. A. (1991). Impact of Bleached Kraft Mill Effluent on Population Characteristics, Liver MFO Activity, and

- Serum Steroid Levels of a Lake Superior White Sucker (*Catostomus commersoni*) Population. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 1371–1380.
- Nath Pandit, D., & Lal Gupta, M. (2019). Hepato-Somatic Index, Gonado-Somatic Index and Condition Factor of *Anabas testudineus* as Bio-Monitoring Tools of Nickel and Chromium Toxicity. *International Journal of Innovations in Engineering and Technology*. <https://doi.org/10.21172/ijiet.123.05>
- National Center for Biotechnology Information. (2025, March 11). *COMPOUND SUMMARY*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fadrozole>
- Nelson, E. R., & Habibi, H. R. (2013). Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. In *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 192, pp. 15–24). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.032>
- of Medicine (US), M. [Internet]. B. (MD): N. L. (2024). Androgen Receptor. In <https://medlineplus.gov/genetics/gene/ar/#conditions>.
- Ogino, Y., Ansai, S., Watanabe, E., Yasugi, M., Katayama, Y., Sakamoto, H., Okamoto, K., Okubo, K., Yamamoto, Y., Hara, I., Yamazaki, T., Kato, A., Kamei, Y., Naruse, K., Ohta, K., Ogino, H., Sakamoto, T., Miyagawa, S., Sato, T., ... Iguchi, T. (2023). Evolutionary differentiation of androgen receptor is responsible for sexual characteristic development in a teleost fish. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37026-6>
- Orrego, R., Hewitt, L. M., McMaster, M., Chiang, G., Quiroz, M., Munkittrick, K., Gavilán, J. F., & Barra, R. (2019). Assessing wild fish exposure to ligands for sex steroid receptors from pulp and paper mill effluents in the Biobío River Basin, Central Chile. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.092>
- Porter, C. M., & Janz, D. M. (2003). Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 54).
- Quiroz-Jara, M., Casini, S., Fossi, M. C., Orrego, R., Gavilán, J. F., & Barra, R. (2021). Integrated Physiological Biomarkers Responses in Wild Fish Exposed to the Anthropogenic Gradient in the Biobío River, South-Central Chile. *Environmental Management*, 67(6), 1145–1157. <https://doi.org/10.1007/s00267-021-01465-y>
- R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Racz, L., & Goel, R. K. (2010). Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. In *Journal of Environmental Monitoring* (Vol. 12, Issue 1, pp. 58–70). <https://doi.org/10.1039/b917298j>
- Rashid, S. S., & Liu, Y. Q. (2021a). Comparison of life cycle toxicity assessment methods for municipal wastewater treatment with the inclusion of direct emissions of metals, PPCPs and EDCs. *Science of the Total Environment*, 756. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143849>
- Rashid, S. S., & Liu, Y. Q. (2021b). Comparison of life cycle toxicity assessment methods for municipal wastewater treatment with the inclusion of direct emissions of metals, PPCPs and EDCs. *Science of the Total Environment*, 756. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143849>
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). *Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers*. <http://www.dnastar.com/>
- Schiller, V., Wichmann, A., Kriehuber, R., Schäfers, C., Fischer, R., & Fenske, M. (2013a). Transcriptome alterations in zebrafish embryos after exposure to environmental estrogens and anti-androgens can reveal endocrine disruption. *Reproductive Toxicology*, 42, 210–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.09.003>

- Schiller, V., Wichmann, A., Kriehuber, R., Schäfers, C., Fischer, R., & Fenske, M. (2013b). Transcriptome alterations in zebrafish embryos after exposure to environmental estrogens and anti-androgens can reveal endocrine disruption. *Reproductive Toxicology*, *42*, 210–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.09.003>
- Schroeder, A. L., Ankley, G. T., Habib, T., Garcia-Reyero, N., Escalon, B. L., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Durhan, E. J., Makynen, E. A., Cavallin, J. E., Martinovic-Weigelt, D., Perkins, E. J., & Villeneuve, D. L. (2017). Rapid effects of the aromatase inhibitor fadrozole on steroid production and gene expression in the ovary of female fathead minnows (*Pimephales promelas*). *General and Comparative Endocrinology*, *252*, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.022>
- Shanthanagouda, A. H., Patil, J. G., & Nugegoda, D. (2013a). Effects of exposure to oestrogenic compounds on aromatase gene expression are gender dependent in the rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *157*(2), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.11.004>
- Shanthanagouda, A. H., Patil, J. G., & Nugegoda, D. (2013b). Effects of exposure to oestrogenic compounds on aromatase gene expression are gender dependent in the rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *157*(2), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.11.004>
- Souza, F. S., & Féris, L. A. (2016a). Hospital and Municipal Wastewater: Identification of Relevant Pharmaceutical Compounds. *Water Environment Research*, *88*(9), 871–877. <https://doi.org/10.2175/106143016x14609975747603>
- Souza, F. S., & Féris, L. A. (2016b). Hospital and Municipal Wastewater: Identification of Relevant Pharmaceutical Compounds. *Water Environment Research*, *88*(9), 871–877. <https://doi.org/10.2175/106143016x14609975747603>
- Spataro, F., Ademollo, N., Pescatore, T., Rausedo, J., & Patrolecco, L. (2019a). Antibiotic residues and endocrine disrupting compounds in municipal wastewater treatment plants in Rome, Italy. *Microchemical Journal*, *148*, 634–642. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.05.053>
- Spataro, F., Ademollo, N., Pescatore, T., Rausedo, J., & Patrolecco, L. (2019b). Antibiotic residues and endocrine disrupting compounds in municipal wastewater treatment plants in Rome, Italy. *Microchemical Journal*, *148*, 634–642. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.05.053>
- Superintendencia de Servicios Sanitarios. (2019, May 30). *Plantas de tratamiento de aguas servidas - Región Metropolitana*. Sistemas de Tratamiento de Aguas Servidas. <https://www.siss.gob.cl/586/w3-article-5059.html>
- Tetreault, G. R., Brown, C. J. M., Bennett, C. J., Oakes, K. D., McMaster, M. E., & Servos, M. R. (2013). Fish community responses to multiple municipal wastewater inputs in a watershed. *Integrated Environmental Assessment and Management*, *9*(3), 456–468. <https://doi.org/10.1002/ieam.1364>
- Ung, C. Y., Lam, S. H., Hlaing, M. M., Winata, C. L., Korzh, S., Mathavan, S., & Gong, Z. (2010). Mercury-induced hepatotoxicity in zebrafish: in vivo mechanistic insights from transcriptome analysis, phenotype anchoring and targeted gene expression validation. *BMC Genomics*, *11*(1), 212. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-212>
- Vidal, G., & Araya, F. (2014). *Las Aguas Servidas y su Depuración en Zonas Rurales: Situación Actual y Desafíos* (G. Vidal & F. Araya, Eds.; First). Universidad de Concepción. <https://www.eula.cl/giba/wp-content/uploads/2017/09/las-aguas-servidas-y-su-depuracion-en-zonas-rurales-situacion-actual-y-desafios.pdf>

- Vieira, L. R., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2022a). Caffeine as a contaminant of concern: A review on concentrations and impacts in marine coastal systems. *Chemosphere*, 286. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131675>
- Vieira, L. R., Soares, A. M. V. M., & Freitas, R. (2022b). Caffeine as a contaminant of concern: A review on concentrations and impacts in marine coastal systems. *Chemosphere*, 286. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131675>
- Villeneuve, D. L., Mueller, N. D., Martinović, D., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Durhan, E. J., Cavallin, J. E., Bencic, D., & Ankley, G. T. (2009a). Direct effects, compensation, and recovery in female fathead minnows exposed to a model aromatase inhibitor. *Environmental Health Perspectives*, 117(4), 624–631. <https://doi.org/10.1289/ehp.11891>
- Villeneuve, D. L., Mueller, N. D., Martinović, D., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Durhan, E. J., Cavallin, J. E., Bencic, D., & Ankley, G. T. (2009b). Direct effects, compensation, and recovery in female fathead minnows exposed to a model aromatase inhibitor. *Environmental Health Perspectives*, 117(4), 624–631. <https://doi.org/10.1289/ehp.11891>
- Weizmann Institute of Science. (n.d.-a). *AR Gene - Androgen Receptor*. Retrieved April 30, 2024, from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AR&keywords=androgen,receptor>
- Weizmann Institute of Science. (n.d.-b). *CYP19A1 Gene - Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1*. John Wiley and Sons Inc. Retrieved April 30, 2024, from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP19A1&keywords=aromatase>
- Weizmann Institute of Science. (n.d.-c). *ESR1 Gene - Estrogen Receptor 1*. Retrieved March 11, 2025, from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ESR1&keywords=estrogen,receptor,alfa>
- Whatley, A., Cho, I. K., Magrath, C., Stewart, P. M., & Li, R. W. (2010). Cytochrome P450 Induction and Gene Expression in Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*) Following Wastewater Treatment Plant Effluent Exposure in Field and Laboratory Settings. *Journal of Environmental Protection*, 01(04), 362–373. <https://doi.org/10.4236/jep.2010.14042>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2* (2nd ed.). Springer Cham.
- Wilke, C. O. (2024). *ggribes: Ridgeline Plots in “ggplot2”* (R package version 0.5.6).
- Yeom, D. H., Lee, S. A., Kang, G. S., Seo, J., & Lee, S. K. (2007). Stressor identification and health assessment of fish exposed to wastewater effluents in Miho Stream, South Korea. *Chemosphere*, 67(11), 2282–2292. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.071>
- Zhang, Y., Lu, Y., Zhang, P., Shang, X., & Li, Y. (2022). Brain Injury Induced by Mercury in Common Carp: Novel Insight from Transcriptome Analysis. *Biological Trace Element Research*. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03161-2>

VI. ANEXOS

Anexo A Permiso de recolección de peces emitido por Subpesca

Verificación del Documento:

- Id del Documento: 18018
- Código de verificación: 84633218536
- Verificar validez en <https://tramites.subpesca.cl/wf-tramites/public/documentos/validar>

REPÚBLICA DE CHILE
MINISTERIO DE ECONOMÍA, FOMENTO Y TURISMO
SUBSECRETARÍA DE PESCA Y ACUICULTURA
CASILLA 100 - V
VALPARAÍSO

AUTORIZA A GUSTAVO CHIANG ROJAS PARA REALIZAR PESCA DE INVESTIGACIÓN QUE INDICA.

(EXTRACTO)

Por Resolución Exenta N° E-2023-154 de fecha 09/03/2023 de esta Subsecretaría, autorizase a Gustavo Chiang Rojas para efectuar una pesca de investigación de conformidad Términos Técnicos de Referencia del proyecto **"PESCA DE INVESTIGACIÓN PARA EVALUAR LA SALUD AMBIENTAL DEL RÍO MAPOCHO Y CUENCAS ALEDAÑAS, REGIÓN METROPOLITANA"**.

El objetivo de la pesca de investigación, que por la presente resolución se autoriza, consiste en evaluar el estado de salud ambiental del río Mapocho a través de respuestas biológicas a los múltiples estresores ambientales, en distintos niveles de organización biológica (comunidad a respuestas moleculares) en peces y macroinvertebrados bentónicos.

La pesca de investigación se efectuará en un período de 24 meses contado desde la fecha de publicación de la presente resolución, de conformidad con lo establecido en el Artículo N° 174 de la Ley General de Pesca y Acuicultura, la que se desarrollará en el Río Mapocho, dentro de la macrozona de Santiago.

El solicitante será responsable de la presente pesca de investigación.

VALPARAÍSO,



JULIO SALAS GUTIERREZ
Subsecretario de Pesca y Acuicultura

Anexo B tablas de mediciones en terreno, con datos de sitio de captura, sexo (M: macho; H: hembra) largo en centímetros (+- 0.001), peso corporal, peso gónadas y peso hígado (gramos +- 0.001), IGS, IHS y factor de condición K.

Sitio	Sexo	Largo (cm)	Peso(g)	Peso gónada (g)	Peso Hígado (g)	IGS	IHS	K
Arrayan	M	8,200	3,930	0,032	0,076	0,807	1,924	0,713
Arrayan	M	9,200	4,590	0,048	0,085	1,050	1,847	0,589
Arrayan	M	9,400	5,770	0,062	0,054	1,069	0,931	0,695
Arrayan	M	9,700	5,880	0,061	0,084	1,043	1,432	0,644
Arrayan	M	10,300	7,800	0,052	0,127	0,662	1,622	0,714
Arrayan	M	10,000	7,930	0,033	0,092	0,421	1,163	0,793
Arrayan	M	10,900	8,100	0,089	0,102	1,094	1,256	0,625
Arrayan	M	9,900	6,730	0,028	0,110	0,416	1,636	0,694
Arrayan	M	9,400	7,270	0,026	0,116	0,360	1,597	0,875
Arrayan	M	11,700	9,930	0,047	0,180	0,471	1,814	0,620
Arrayan	M	11,300	10,080	0,185	0,170	1,835	1,688	0,699
Arrayan	M	10,800	8,710	0,095	0,134	1,086	1,540	0,691
Arrayan	M	10,800	8,300	0,076	0,096	0,913	1,159	0,659
El Clarillo	M	6,800	1,930	0,011	0,011	0,560	0,565	0,614
El Clarillo	M	7,000	1,970	0,006	0,020	0,320	0,995	0,574
El Clarillo	M	6,300	1,670	0,008	0,019	0,479	1,150	0,668
El Clarillo	M	7,600	2,780	0,023	0,017	0,824	0,608	0,633
El Clarillo	M	7,500	3,070	0,015	0,035	0,489	1,150	0,728
El Clarillo	M	8,900	4,310	0,030	0,019	0,701	0,434	0,611
El Clarillo	M	9,100	5,170	0,042	0,036	0,809	0,704	0,686
El Clarillo	M	10,600	8,330	0,044	0,041	0,523	0,487	0,699
Hualtata	M	6,100	1,610	0,018	0,032	1,099	1,981	0,709
Hualtata	M	6,600	1,730	0,019	0,019	1,081	1,110	0,602
Hualtata	M	6,300	1,770	0,018	0,029	0,989	1,616	0,708
Hualtata	M	6,700	1,990	0,017	0,022	0,844	1,095	0,662
Hualtata	M	7,000	2,060	0,006	0,039	0,282	1,893	0,601
Hualtata	M	6,900	2,150	0,012	0,032	0,567	1,502	0,654
Hualtata	M	7,600	2,460	0,013	0,028	0,528	1,130	0,560
Hualtata	M	10,800	7,630	0,054	0,090	0,704	1,176	0,606
Hualtata	M	10,500	8,160	0,037	0,074	0,456	0,903	0,705
Trapiche	M	7,300	2,300	0,024	0,052	1,043	2,261	0,591
Trapiche	M	8,100	3,120	0,027	0,017	0,849	0,535	0,587
Trapiche	M	10,200	6,760	0,124	0,051	1,831	0,750	0,637
El Monte	M	7,900	2,530	0,019	0,027	0,735	1,055	0,513
El Monte	M	7,500	2,720	0,036	0,016	1,331	0,581	0,645
El Monte	M	8,200	2,890	0,030	0,027	1,021	0,931	0,524
El Monte	M	7,300	2,910	0,014	0,019	0,495	0,660	0,748

Sitio	Sexo	Largo (cm)	Peso(g)	Peso gónada (g)	Peso Hígado (g)	IGS	IHS	K
El Monte	M	9,700	3,360	0,046	0,023	1,357	0,688	0,368
El Monte	M	9,000	3,990	0,027	0,034	0,687	0,860	0,547
El Monte	M	9,300	4,170	0,045	0,034	1,074	0,808	0,518
El Monte	M	9,500	4,400	0,051	0,047	1,166	1,073	0,513
El Monte	M	10,900	6,650	0,082	0,057	1,236	0,850	0,514
El Monte	M	9,700	5,070	0,048	0,066	0,941	1,296	0,556
El Monte	M	10,400	5,620	0,071	0,048	1,263	0,845	0,500
El Monte	M	10,600	7,550	0,068	0,052	0,905	0,693	0,634
El Monte	M	11,300	7,610	0,103	0,080	1,356	1,055	0,527
El Monte	M	12,200	9,630	0,096	0,070	0,999	0,726	0,530
Arrayan	H	8,600	3,780	0,059	0,083	1,556	2,185	0,594
Arrayan	H	9,600	7,020	0,266	0,142	3,789	2,027	0,793
Arrayan	H	8,800	4,520	0,535	0,111	11,827	2,462	0,663
Arrayan	H	8,400	4,540	0,556	0,137	12,251	3,015	0,766
Arrayan	H	9,900	6,050	0,230	0,122	3,793	2,018	0,624
Arrayan	H	9,200	5,090	0,424	0,114	8,322	2,246	0,654
Arrayan	H	9,000	5,560	0,830	0,185	14,921	3,327	0,763
El Clarillo	H	6,000	1,310	0,019	0,009	1,473	0,710	0,606
El Clarillo	H	6,100	1,460	0,103	0,021	7,041	1,411	0,643
El Clarillo	H	6,300	1,560	0,026	0,023	1,692	1,474	0,624
El Clarillo	H	6,300	1,600	0,018	0,010	1,113	0,613	0,640
El Clarillo	H	6,200	1,790	0,033	0,036	1,821	2,000	0,751
El Clarillo	H	6,400	1,860	0,091	0,024	4,866	1,274	0,710
El Clarillo	H	7,500	2,690	0,057	0,038	2,108	1,401	0,638
El Clarillo	H	6,900	2,230	0,053	0,028	2,377	1,242	0,679
El Clarillo	H	9,000	4,970	0,451	0,088	9,064	1,777	0,682
El Clarillo	H	8,700	4,660	0,444	0,081	9,536	1,727	0,708
Hualtata	H	6,300	1,900	0,404	0,051	21,237	2,658	0,760
Hualtata	H	7,100	2,070	0,192	0,068	9,285	3,290	0,578
Hualtata	H	8,000	3,000	0,228	0,037	7,607	1,240	0,586
Hualtata	H	7,000	3,030	0,705	0,083	23,274	2,739	0,883
Hualtata	H	7,200	3,180	0,819	0,053	25,752	1,651	0,852
Hualtata	H	7,200	2,230	0,161	0,046	7,220	2,067	0,597
Hualtata	H	7,500	3,200	0,558	0,054	17,431	1,678	0,759
Hualtata	H	8,300	4,420	0,965	0,137	21,833	3,093	0,773
Hualtata	H	8,100	3,400	0,444	0,119	13,044	3,485	0,640
Hualtata	H	7,200	2,510	0,126	0,042	5,028	1,677	0,672
Trapiche	H	9,000	4,550	0,634	0,111	13,934	2,446	0,624
Trapiche	H	9,200	4,670	0,450	0,134	9,630	2,863	0,600
Trapiche	H	9,400	5,910	1,109	0,152	18,768	2,572	0,712
Trapiche	H	9,200	6,460	1,317	0,164	20,393	2,540	0,830
Trapiche	H	7,300	2,320	0,160	0,057	6,905	2,474	0,596

Sitio	Sexo	Largo (cm)	Peso(g)	Peso gónada (g)	Peso Hígado (g)	IGS	IHS	K
El Monte	H	6,800	2,850	0,324	0,031	11,365	1,102	0,906
El Monte	H	6,400	1,540	0,169	0,026	10,981	1,656	0,587
El Monte	H	8,200	3,180	0,709	0,067	22,302	2,104	0,577
El Monte	H	8,000	3,240	0,167	0,097	5,151	2,997	0,633

Anexo C Tabla con secuencias para el diseño de primers, temperatura de melting, r2 y eficiencias reportadas.

<i>Gen</i>	Forward sequence 5'-3'	Reverse sequence 5'-3'	Temperatura melting °C	r2 (>0,9)	Eficiencia %
<i>ar</i>	CTCTCTCTCACAC TCACTCTCT	CCGCACATTTACCAC CATTTC	62	0,991	105,793
<i>cyp19a1</i>	CTGGACCAATGA GCCTTCTAAA	CAGCTGGTAGCTACT GACATTC	62	0,974	102,17
<i>era</i>	TCGTTTGTCTCT TGGCTATG	GATCGATCTGCCAGCT CTTAAT	62	0,986	96,596
<i>eflg</i>	GCACACAGCTCTC CAACTAT	TCTAACGGCACTTACC CAATC	62	0,994	97,208
<i>rps 18</i>	GTCTGGATAACA AGCTGA	GTGGTCTTAGTGTGCT GA	60	0,936	113,135

Anexo D Tabla resumen de expresión génica para hembras de *Trichomycterus areolatus*, incluye sitio de muestreo, código asignado a la muestra, fold change para los tres genes de interés reproductivos

Expresión de genes de <i>Trichomycterus areolatus</i> : Hembras				
Sitios	Código	Fold change ar	Fold change era	Fold change cyp19a
Arrayan	TA 001	2,98	0,38	0,27
Arrayan	TA 008	3,54	0,81	1,63
Arrayan	TA 010	4,42	3,00	2,60
Clarillo	TA 090	0,71	1,01	0,65
Clarillo	TA 093	0,68	0,71	0,78
Clarillo	TA 095	0,04	1,51	1,71
Hualtatas	TA 027	2,43	0,60	3694,14
Hualtatas	TA 031	2,56	1,10	3032,85
Hualtatas	TA 037	1,23	0,78	2709,66
Hualtatas	TA 040	1,06	0,60	3678,28
Trapiche	TA 059	0,68	1,87	2,22
Trapiche	TA 060	1,72	0,93	1,07
Trapiche	TA 064	3,45	1,23	0,53
El Monte	TA 076	2,14	0,58	0,44
El Monte	TA 078	1,45	0,86	3,95
El Monte	TA 080	1,51	1,57	4,83

Anexo E Tabla resumen de expresión génica para machos de *Trichomycterus areolatus*, incluye sitio de muestreo, código asignado a la muestra, fold change para los tres genes de interés reproductivos. Se destaca individuo excluido de análisis

Expresión de genes de <i>Trichomycterus areolatus</i> : Machos				
Site	Código	Fold change ar	Fold change era	Fold change cyp19a
Arrayan	TA 003	1,09	0,55	0,41
Arrayan	TA 009	1,36	0,96	0,82
Arrayan	TA 018	1,80	1,35	1,13
Arrayan	TA 020	1,74	1,73	2,91
Clarillo	TA 091	0,81	0,67	2,05
Clarillo	TA 094	0,26	1,21	0,44
Hualtatas	TA 021	0,98	1,55	0,61
Hualtatas	TA 035	0,80	1,20	5,37
Hualtatas	TA 023	0,03	0,02	0,33
Hualtatas	TA 025	118,28	100,24	2554,81
Trapiche	TA 065	1,29	0,61	0,67
Trapiche	TA 067	0,34	0,54	0,68
El Monte	TA 071	0,82	1,10	0,85
El Monte	TA 074	0,71	1,11	0,75
El Monte	TA 075	0,57	0,75	2,72
El Monte	TA 077	1,96	1,23	3,19