



UCSC



**Magíster en
Ecología Marina UCSC**
Universidad Católica de la Santísima Concepción

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DE ALÉRGENOS DE *ANISAKIS PEGREFFII*
PROVENIENTES DE HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS MARINOS DE
INTERÉS COMERCIAL EN CHILE (*TRACHURUS MURPHYI* Y *DOSIDICUS*
GIGAS)**

Por

KELLY STEFANNY GONNELLI AGUILERA

**TESIS PARA OPTAR AL
GRADO DE MAGÍSTER EN ECOLOGÍA MARINA**

Director de Tesis: MARIBET GAMBOA MÉNDEZ

Codirector de Tesis: MATÍAS HEPP CASTRO

Concepción, Chile

2026

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DE ALÉRGENOS DE *ANISAKIS PEGREFFII* PROVENIENTES DE HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS MARINOS DE INTERÉS COMERCIAL EN CHILE (*TRACHURUS MURPHYI* Y *DOSIDICUS* *GIGAS*)

Por

KELLY STEFANNY GONNELLI AGUILERA

Tesis para optar al grado de Magíster en Ecología Marina

XX

Concepción, Chile

2026

ACTA DE EXAMEN

Para mis guardianes de sueños, mi familia y para mí.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este camino fueron muchas las personas que, de una u otra manera, me brindaron apoyo, palabras de aliento y compañía. Aunque hoy no mencione nombres, cada gesto quedará guardado para siempre en mi memoria y en mi corazón. Quiero agradecer especialmente a quienes me dieron fuerzas para seguir adelante en medio de todos los cambios emocionales que implica una experiencia tan exigente como esta. No todos están preparados para enfrentar procesos así, pero tuve la fortuna de rodearme de personas que creyeron en mí incluso más de lo que yo misma lo hacía.

Durante este desafío no solo descubrí que era capaz de superar barreras personales, laborales y experimentales una y otra vez; también descubrí cuál es mi propósito y hacia dónde quiero dirigir mi vida. Comprendí que ya no se trata únicamente de existir, sino de vivir con propósito: tomar decisiones y realizar acciones que me acerquen a aquello que sueño construir.

En el proceso aprendí que muchas veces mis mayores límites nacían de la falta de confianza en mí misma y de mi necesidad de querer mantener el control de todo. Sin embargo, también entendí que puedo crecer, adaptarme y cumplir metas sin dejar de ser quien soy. Reconocí además la fuerza que existe en mi perseverancia, aunque también entendí la importancia de ordenar mis prioridades para no perderme en el caos. Gracias a la ayuda física y emocional que recibí en momentos donde mi propio cuerpo comenzaba a hablar a través de mis emociones, comprendí que pedir apoyo también es un acto de valentía. Aprendí a escucharme, a entender mis límites y a reencontrarme con quien fui de niña, con esa esencia soñadora que nunca desapareció del todo.

Cuando era pequeña me gustaba ver documentales de animales, historias de aventuras, investigación, y viajes; y hoy entiendo que aún vive en mí una parte de esa niña curiosa y soñadora. Ahora solo queda fortalecer la confianza necesaria para alcanzar aquellos sueños que por mucho tiempo permanecieron guardados.

También descubrí algo que jamás imaginé: que soy capaz de guiar a otros. Durante este proceso tuve la oportunidad de ser profesora, una experiencia que en algún momento me pareció una locura, pero que terminó enseñándome cuánto puedo aportar desde mis conocimientos, mi paciencia y mi forma de conectar con las personas. Comprendí que enseñar no solo implica transmitir información, sino también inspirar, acompañar y dejar una huella en quienes confían en uno.

Viví muchos años intentando cumplir expectativas ajenas, no porque alguien me obligara, sino porque siempre quise hacer felices a los demás. Pero hoy entiendo que también merezco vivir mi propia vida, sin culpa, siendo auténtica y abrazando aquello que realmente deseo para mí. Hace un tiempo me prometí comenzar a trabajar por mis propios sueños, y no pienso detenerme.

Agradezco profundamente a mi familia por estar siempre presente y apoyarme en cada desafío que me propongo; a mis profesores guías al profesor Matias por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias; y de manera muy especial, a mi profesora Maribet Gamboa, quien no solo fue mi guía académica, sino también una mujer que inspira profundamente la persona que sueño llegar a ser.

Agradecer de manera especial a Javier Zuñiga gerente de la empresa Blumar, quien sin pensarlo facilitó las muestras de *Dosidicus gigas*, para nuestro trabajo de investigación, considerando que podemos trabajar en equipo para el bien de las personas de nuestra comunidad y también para consumir de forma responsable los productos del mar.

Por otro lado, agradecer la amabilidad y la generosidad de compartir su conocimiento al Dr. Yukihiro Kobayashi, quien desde su experiencia me guío para poder cumplir con uno de mis objetivos, a través de sus consejos.

Agradecer a WWF por otorgarme la beca Russell E. Train para la conservación de la Naturaleza que permitió financiar nuestro trabajo de investigación y en especial a Flor Gómez por ser un gran apoyo en este proceso, esta beca genero tranquilidad, confianza y sustento en este proceso y por sobre todo motivación para continuar con la investigación.

También agradecer a la sociedad japonesa para la promoción de la Ciencia (JSPS) por financiar proyecto que permitió facilitar la obtención de herramientas para que se realizará mi trabajo.

Finalmente, quiero agradecerme a mí misma: por no rendirme, por seguir adelante incluso en los momentos más difíciles y por descubrir que, a pesar de todo, todavía existe magia dentro de mí.

TABLA DE CONTENIDOS

Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras	x
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Introducción	1
- Anisakis	2
- Registro de Anisakiasis	3
- Anisakiasis y la salud pública	4
Pregunta de Investigación	6
Hipótesis	7
Objetivos	8
- Objetivo general.....	8
- Objetivos específicos	8
Métodos	9
- Sitio de muestreo y procesamiento de muestras	9
- Identificación morfológica de Anisakis.....	9
- Identificación molecular taxonómica de Anisakis pegreffii.....	10
- Extracción de alérgenos.....	10
- Purificación de alérgenos	11
- Análisis morfológicos celular	12
- Análisis estadístico	13
Resultados	14
- Morfología de Anisakis	14
- Identificación taxonómica de A. pegreffii.....	14
- Diversidad genética.....	15
- Extracción y purificación de proteínas de A. pegreffii.....	18
- Respuesta proteica en células humanas mediante exploración morfológica en CytoSmart	23
- Ensayo de viabilidad celular: Cristal Violeta	38
- Ensayo de actividad metabólica: XTT	48
Discusión	55
Conclusión	58
Referencias bibliográficas	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación taxonómica de larvas de nemátodos provenientes de <i>T. murphyi</i> y <i>D. gigas</i> mediante NCBI	15
Tabla 2. Índices genéticos en <i>A. pegreffii</i> provenientes de <i>T. murphyi</i> y <i>D. gigas</i> . S, Número de haplotipos. h, número de haplotipos. Hd, diversidad haplotípica. $\bar{x}$ Dif, promedio de las diferencias de nucleótidos.	15
Tabla 3. Índices genéticos en <i>A. pegreffii</i> provenientes de <i>T. murphyi</i> y <i>D. gigas</i> de secuencias obtenidas de Lugo et. al (2024) y en este estudio. S, Número de haplotipos. h, número de haplotipos. Hd, diversidad haplotípica. $\bar{x}$ Dif, promedio de las diferencias de nucleótidos.	16
Tabla 4. Concentración de alérgenos de <i>A. pegreffii</i> en ambos hospedadores obtenidos en HPLC con la columna TSK gel ODS-120T.....	18
Tabla 5. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir del promedio de todos los tratamientos en función de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna TSKgel en el A) pico 1 y B) pico 2 entre la especie <i>D. gigas</i> y <i>T. murphyi</i> mediante la prueba de T Student.	38
Tabla 6. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna TSKgel en el A) pico 1 y B) pico 2 entre los tratamientos de la especie <i>D. gigas</i> y <i>T. murphyi</i> mediante la prueba de T Student.....	39
Tabla 7. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir del promedio de la viabilidad celular para todos los tratamientos en función de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la Columna CHT XT hidroxipatita entre la especie <i>D. gigas</i> y <i>T. murphyi</i> mediante la prueba de T Student.	42
Tabla 8. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir del promedio de la viabilidad celular para todos los tratamientos en función de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna CHT XT hidroxipatita entre los tratamientos de la especie <i>D. gigas</i> y <i>T. murphyi</i> mediante la prueba de T Student.	43

Tabla 9. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir del promedio de la viabilidad celular para todos los tratamientos de la línea celular CCD 841 CoN con alérgenos de la Columna TSKgel entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.....44

Tabla 10. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir del promedio de los tratamientos en función de la viabilidad celular de la línea celular CCD 841 CoN con alérgenos de la Columna CHT XT hidroxiapatita entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.
.....46

Tabla 11. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir de la viabilidad celular de la línea celular CCD 841 CoN con alérgenos de la columna CHT XT hidroxiapatita entre los tratamientos (2 µl y 4 µl) de la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.46

Tabla 12. Análisis comparativo del ensayo XTT a partir de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la Columna TSKgel en el A) pico 1 y B) pico 2entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.....48

Tabla 13. Análisis comparativo del ensayo XTT a partir de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna TSKgel en el A) pico 1 y B) pico 2 entre los tratamientos de la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.....49

Tabla 14. Análisis comparativo del ensayo XTT a partir de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna CHT XT hidroxiapatita entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student...51

Tabla 15. Análisis comparativo del ensayo XTT a partir de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna CHT XT hidroxiapatita entre los tratamientos de la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.....51

Tabla 16. Análisis comparativo del ensayo XTT a partir de la viabilidad celular de la línea celular CCD 841 CoN con alérgenos de la Columna CHT XT hidroxiapatita entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.....53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de las especies del género <i>Anisakis</i> presentes en hospedadores de importancia comercial.	1
Figura 2. Representación del ciclo de vida de <i>Anisakis</i> (Martínez et al., 2009)	2
Figura 3. Estructuras características del género <i>Anisakis</i> a) cola con mucrón, b) ventrículo y c) diente cuticular. Figura modificada de Kanarek & Rolbiecki (2006).	3
Figura 4. Características del género <i>Anisakis</i> identificadas en microscopio estereoscópico en la a) cola con mucrón, b) el ventrículo y c) diente cuticular	9
Figura 5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud para parásitos de <i>A. pegreffii</i> obtenidas en Lugo et. al (2024) y en esta investigación (J1-5 y DG1-4).	16
Figura 6. Red de haplotipos de larvas de <i>A. pegreffii</i> basada en el marcador molecular COX2...17	17
Figura 7. Perfiles proteicos obtenidos en HPLC con la columna TSKgel ODS-120T para las larvas de <i>A. pegreffii</i> provenientes de A) <i>D. gigas</i> y B) <i>T. murphyi</i>	19
Figura 8. Perfiles proteicos obtenidos en HPLC con la columna de CHT XT hidroxipatita para las larvas de <i>A. pegreffii</i> provenientes de a) <i>D. gigas</i> y b) <i>T. murphyi</i>	20
Figura 9. Área cromatográfica correspondiente a los picos 1 y 2 obtenido mediante la columna TSKgel en larvas provenientes de hospedadores <i>T. murphyi</i> y <i>D. gigas</i>	21
Figura 10. Área cromatográfica en HPLC correspondiente al Pico 1 obtenido mediante la columna CHT XT en larvas de hospedadores <i>T. murphyi</i> y <i>D. gigas</i>	22
Figura 11. Imágenes obtenidas de las líneas celulares HEK293 y CCD 841 CoN sin aplicación de tratamiento alérgico (0 µl) a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs y 24 hrs.)	23
Figura 12. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno J1-1 de <i>A. pegreffii</i> en <i>T. murphyi</i> aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).	24
Figura 13. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno J2-2 de <i>A. pegreffii</i> en <i>T. murphyi</i> aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs)	25
Figura 14. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno DG1 de <i>A. pegreffii</i> en <i>D. gigas</i> aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs)	27

Figura 15. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno DG2-2 de <i>A. pegreffii</i> en <i>D. gigas</i> aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs)	28
Figura 16. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno DG2 de <i>A. pegreffii</i> en <i>D. gigas</i> aislados en Columna CHTXT a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs)	29
Figura 17. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno J2 de <i>A. pegreffii</i> en <i>T. murphyi</i> aislados en Columna CHTXT a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs)	31
Figura 18. Línea celular CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno J6-1 de <i>A. pegreffii</i> en <i>T. murphyi</i> aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).....	32
Figura 19. Línea celular CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno DG6-1 de <i>A. pegreffii</i> en <i>D. gigas</i> aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).....	34
Figura 20. Línea celular CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno DG8 de <i>A. pegreffii</i> en <i>D. gigas</i> aislados en Columna DHT XT a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs)	35
Figura 21. Línea celular CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno J6 de <i>A. pegreffii</i> en <i>T. murphyi</i> aislados en Columna DHT XT a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs)	36
Figura 22. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo cristal violeta en células HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico <i>A. pegreffii</i> . Se obtuvieron 2 fracciones de purificación en los perfiles cromatográficos: A) pico 1 y B) pico 2.....	40
Figura 23. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo cristal violeta en células HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico <i>A. pegreffii</i> purificados con Columna CHT XT hidroxipatita.....	43
Figura 24. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo cristal violeta en células CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico <i>A. pegreffii</i> purificados con columna TSKgel.....	45
Figura 25. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo cristal violeta en células CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico <i>A. pegreffii</i> purificados con columna CHT XT hidroxipatita.....	47

Figura 26. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo XTT en células HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico *A. pegreffii* purificados con columna TSKgel. Se obtuvieron 2 fracciones de purificación en los perfiles cromatográficos: A) pico 1 y B) pico 2..50

Figura 27. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo XTT en células HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico *A. pegreffii* purificados con columna CHT XT hidroxipatita..... 52

Figura 28. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo XTT en células CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico *A. pegreffii* purificados con columna CHT XT hidroxipatita. El control fue considerado como el 100% de viabilidad celular, correspondiente al valor máximo de referencia.....53

RESUMEN

Los *Anisakis* spp. son nemátodos presentes en hospedadores intermediarios marinos de interés comercial a nivel mundial y están asociados con una zoonosis conocida como Anisakiasis, posiblemente como consecuencia de la producción de alérgenos. A pesar de que existen numerosos estudios sobre la especie *Anisakis simplex*, son limitadas las investigaciones centradas en otras especies, como *Anisakis pegreffii*, especie con alta abundancia en Chile. El objetivo de esta investigación es determinar la actividad alérgica de *Anisakis pegreffii* en células humanas embrionarias de riñón y epiteliales de colon provenientes de hospedadores intermediarios marinos (*Trachurus murphyi* y *Dosidicus gigas*) de interés comercial en Chile. Para ello, se llevó a cabo la identificación taxonómica de los parásitos con el gen COX2, el aislamiento de los alérgenos a través de HPLC, y exposición en células humanas a distintos tratamientos del alérgeno (0 µl, 1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl). Se identificó como única especie *A. pegreffii* con porcentajes de similitud superiores a 97% comparado con estudios anteriores y sin divergencia genética. La extracción de alérgenos para *A. pegreffii* se realizó mediante HPLC a través de la columna TSK gel y CHT XT hidroxipatita donde se estableció cambios en las cantidades de reactivos y tiempos de corrida. Se obtuvieron dos picos de elusión para ambas especies con la columna TSKgel y un pico de elusión con CHT XT, esto evidencia diferencias en cuanto a la cantidad de extracto proteico siendo mayor el extracto obtenido para la especie *D. gigas*, pero no significativamente mayor que *T. murphyi*, sin embargo, podría existir una posible variación en la expresión alérgica entre hospedadores. La evaluación de viabilidad celular y los análisis morfológicos mostraron variaciones en la actividad metabólica, proliferación celular, cantidad de células vivas y muertas y ciertos caracteres morfológicos. Esto implicaría que el efecto del consumo de diferentes hospedadores que están infectados por el parásito podría generar respuestas celulares diferentes en seres humanos y que al parecer existen ciertos mecanismos de respuestas celulares frente a una posible amenaza. Es por esto por lo que este estudio contribuye a establecer medidas de detección específicas de alérgenos de *A. pegreffii*, lo que permitirá abordar medidas frente a una posible futura crisis sanitaria.

Palabras claves: Anisakiasis, actividad alérgica, células humanas

ABSTRACT

Anisakis spp. are nematodes found in commercially important marine intermediate hosts worldwide and are associated with a zoonosis known as anisakiasis, possibly as a consequence of allergen production. Although numerous studies have been conducted on the species *Anisakis simplex*, research focused on other species, such as *Anisakis pegreffii*, which is highly abundant in Chile, remains limited. The objective of this study was to determine the allergenic activity of *Anisakis pegreffii* in human embryonic kidney and colonic epithelial cells exposed to allergens obtained from commercially important marine intermediate hosts (*Trachurus murphyi* and *Dosidicus gigas*) in Chile. For this purpose, taxonomic identification of the parasites was performed using the COX2 gene, allergens were isolated by high-performance liquid chromatography (HPLC), and human cells were exposed to different allergen treatments (0, 1, 2, 4, and 8 μ L). *A. pegreffii* was identified as the only species, with similarity percentages greater than 97% compared with previous studies and no genetic divergence. Allergen extraction from *A. pegreffii* was performed by HPLC using a TSKgel column and a CHT XT hydroxyapatite column, with modifications established in reagent quantities and run times. Two elution peaks were obtained for both host species using the TSKgel column, while one elution peak was obtained using the CHT XT column. These results evidenced differences in the amount of protein extract obtained, with a greater extract obtained from *D. gigas*, although this difference was not statistically significant compared with *T. murphyi*. However, a possible variation in allergen expression between hosts may exist. The assessment of cell viability and morphological analyses revealed variations in metabolic activity, cell proliferation, the number of viable and dead cells, and certain morphological characteristics. These findings suggest that the consumption of different hosts infected with the parasite may induce different cellular responses in humans and that certain cellular response mechanisms may be activated in response to a potential threat. Therefore, this study contributes to establishing specific detection measures for *A. pegreffii* allergens, which may support the development of strategies to address a potential future public health crisis.

Keywords: Anisakiasis, Ani s 2, Ani s 3, allergenic activity, human cells

INTRODUCCIÓN

Anisakis

Los nemátodos del género *Anisakis* son parásitos que miden entre 20 y 30 mm (Moreira & López San Román, 2010) y comprende nueve especies con una amplia distribución geográfica a nivel mundial (Mattiucci et al., 2018; **Figura 1**).

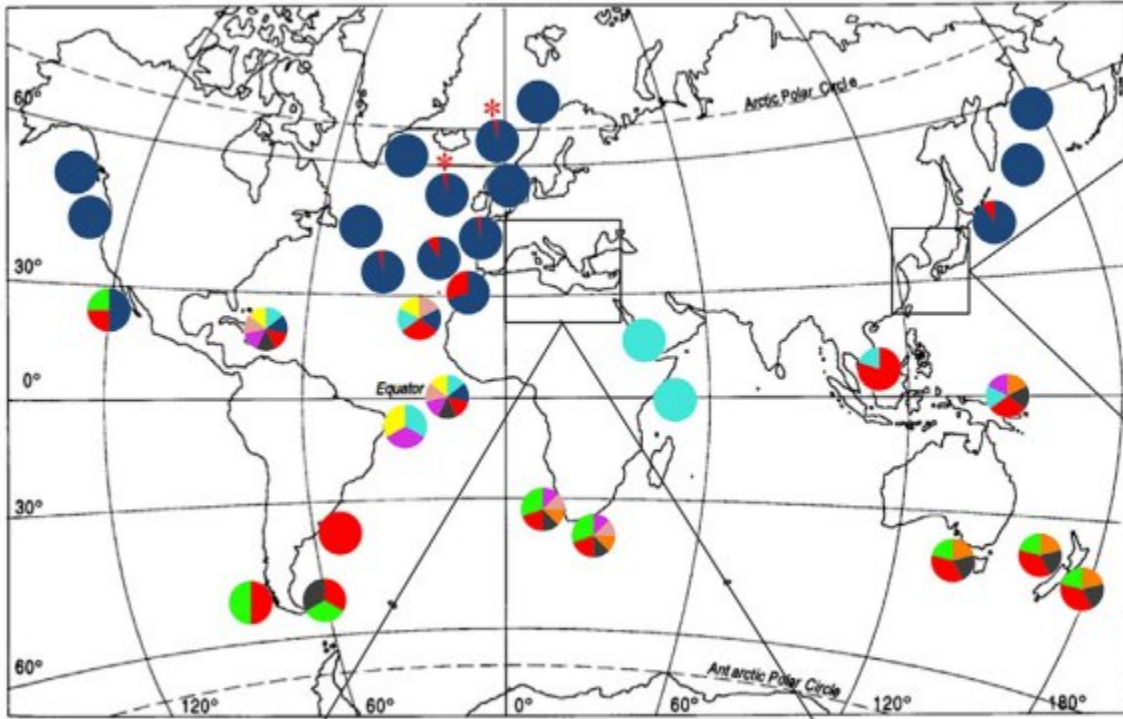


Figura 1. Distribución geográfica de las especies del género *Anisakis* presentes en hospedadores de importancia comercial. Los colores representan las especies del género: ● *A. simplex*, ● *A. pegreffii*, ● *A. berlandi*, ● *A. ziphidarum*, ● *A. nascettii*, ● *A. physeteris*, ● *A. brevispiculata*, ● *A. paggiae*, ● *A. typica*. Figura modificada de Mattiucci et. al (2018).

La amplia distribución del género *Anisakis* se debe a la complejidad en su ciclo de vida, producto del número de hospedadores en su desarrollo larval (Ubeira, 2015). En el estadio adulto parasita a hospedadores definitivos, específicamente mamíferos marinos de gran tamaño como focas, ballenas u otros (Martínez et. al, 2009). Luego, al fecundar y expulsar sus huevos a través de las heces de los mamíferos, los nemátodos integran su primera fase larvaria (L1) a la deriva dentro del océano, para posteriormente ser ingeridos por un hospedador primario zooplanctónico en su estadía larval secundario (L2) y terciario (L3) (Fernández et. al, 2022), donde se pueden encontrar en el hemocele (Roberts et al., 2013). Posteriormente, ingresa a un hospedador depredador, ya sea peces

o cefalópodos (Martínez et al., 2009). Estos parásitos se desarrollan en una amplia variedad de hospedadores intermediarios, como por ejemplo jurel, merluza, atún y otros, por lo que ocupan un amplio nicho ecológico (Mattiucci et al., 2018; Fiorenza et al., 2020). Las larvas, se adhieren enquistados al sistema digestivo, en forma de espiral y en la musculatura, para finalmente volver a su hospedador definitivo y comenzar nuevamente con su ciclo. No obstante, el ser humano forma parte de este ciclo de vida de manera accidental al consumir hospedadores intermediarios crudos, marinados, ahumados o poco cocidos principalmente especies de interés comercial, como bacalao, jurel y merluza (Martínez et al., 2009; **Figura 2**).

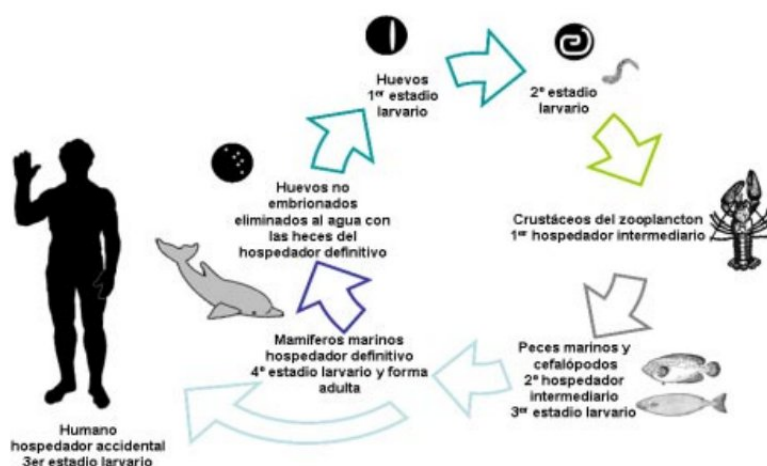


Figura 2. Representación del ciclo de vida de *Anisakis* (Martínez et al., 2009).

Las larvas al encontrarse adheridas en el interior de sus hospedadores intermediarios causan daños fisiológicos, morfológicos, disminuyendo su nivel de supervivencia (Bush et al., 2001). En el caso del pez dorado (*Carassius auratus*), se ha observado que estos nemátodos provocan hemorragias debido a su asentamiento en el tracto digestivo y en la cavidad celomática, lo que degrada e imposibilita el sistema de transporte de nutrientes y sobrecarga el sistema de almacenamiento de desechos (López-Verdejo et al., 2022; Marino et al., 2013). De igual forma, en el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), se ha visto afectado su sistema respiratorio producto del daño branquial y además el deterioro de su musculatura, disminuyendo su valor comercial de exportación (Nadolna-Allyn et al., 2022).

En general, *Anisakis* se pueden distinguir en dos tipos de larvas con estadio larval L3, dependientes de la especie, ya sea de tipo I (T1) y II (T2) mediante caracteres de cola, diente cuticular y ventrículo (Ubeira, 2025; **Figura 3**), mientras que en su etapa adulta hay una clara expresión en cuanto a sus caracteres sexuales (Mattiucci et al., 2018). Las características de la cola de *Anisakis* de la larva de T1, presenta una cola corta y redondeada adherida a una estructura terminal llamada mucrón, mientras que en la larva de T2, tiene una cola alargada y puntiaguda, ausente de mucrón (**Figura 3**) (Castellano-Garzon et al., 2020; Berland, 1961). Por otro lado, en uno de sus

extremos presenta un diente cuticular triangular, y su función principal es romper los tejidos de sus hospederos, para poder adherirse a ellos (Grabda, 1976). Finalmente, el ventrículo esofágico intestinal, suele ser alargado unido al mucrón terminal en la larva T1, mientras que en la larva T2 se acorta esta estructura y se une horizontalmente al intestino (Berland, 1961). A pesar de los esfuerzos por realizar la identificación a través de sus caracteres morfológicos, ha habido problemas en la separación de especies de *Anisakis*, debido a la morfología similar entre ellas (Buchmann & Mehrdana, 2016; Nadler & Pérez-Ponce de León, 2011).

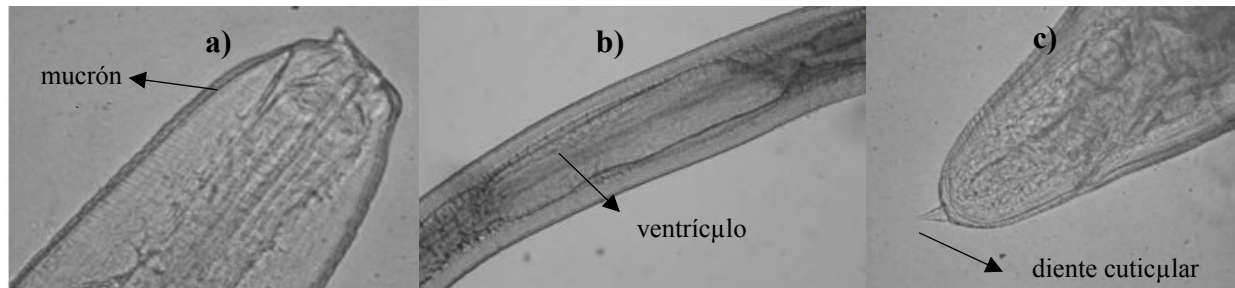


Figura 3. Estructuras características del género *Anisakis* a) cola con mucrón, b) ventrículo y c) diente cuticular. Figura modificada de Kanarek & Rolbiecki (2006).

Actualmente, la identificación taxonómica molecular ha demostrado ser más precisa, fiable y efectiva en cuanto a la diferenciación de las especies (Fernández et al., 2023, Lugo et al., 2024), que la taxonómica tradicional por caracteres morfológicos (Torres et al., 2007, George-Nascimento & Llanos, 1995). Estas herramientas requieren el uso de marcadores moleculares/genéticos, los cuales permiten el reconocimiento de ciertas regiones, como el gen mitocondrial de la subunidad 2 del citocromo oxidasa (COX2). Este marcador mitocondrial tiene una alta precisión para la identificación de *Anisakis* (Muñoz & Olmos, 2008; Mattiucci et al., 2018), debido a que es altamente conservado, pero a la vez presenta variabilidad entre diferentes especies parásitas que comparten similitudes morfológicas (Mattiucci et al., 2018).

Registro de Anisakiasis

Los casos de Anisakiasis han aumentado entre 1965 y 2022 registrándose 34 países potencialmente activos como Japón, España y Corea del Sur (Shamsi & Barton, 2023), principalmente debido al aumento del consumo de pescados crudos.

Un estudio realizado en Corea del Sur analizó las características clínicas y sintomáticas de 10 pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. Los resultados indican que esta enfermedad no presenta dependencia en cuanto al sexo del paciente; sino al tipo de preparación de los productos (crudo o semi crudo). Donde las personas que tienen un mayor riesgo de Anisakiasis es la población entre 20 y 74 años (Choi et al., 2009). El consumo de congrio, calamar, platijas,

atún y caracoles marinos infestados con *Anisakis* sp. conlleva a síntomas como urticaria, dolor abdominal y anafilaxia, así como picazón nasal, rinitis alérgica y urticaria crónica (Choi et al., 2009).

Debido al aumento en la demanda alimentaria a nivel mundial, se ha incrementado el consumo de especies marinas hospedadoras intermediarias de *Anisakis* spp. (FAO, 2022). El continuo uso de sus hospedadores en preparaciones gastronómicas eleva la alerta de un posible aumento de Anisakiasis en seres humanos en el futuro. Estas predicciones se basan en el reporte alérgico en Europa (Palomba et al., 2019) y el registro mundial entre 1965 y 2022 con un total de 762 casos registrados de infección parasitaria en distintos países, incluyendo casos clínicos en Chile (Shami & Barton, 2023; Von-Muhlenbrock et al., 2021).

Chile es considerado un “hot spot” de la Anisakiasis debido a la alta prevalencia de larvas de *Anisakis* sp. en diferentes especies marinas de interés comercial (Rahmati et al., 2020). Los casos de Anisakiasis reportados en el país han ido en aumento (Torres et al., 2014), por lo que estudios en especies de *Anisakis* sp. reportadas en el país son necesarios.

Los anisakis se han encontrado en 40 especies de hospedadores de interés comercial en Chile, como *Trachurus murphyi* (Jurel), *Merluccius gayi* (Merluza común), *Dosidicus gigas* (Jibia), *Brama australis* (Reineta), entre otros (Muñoz & Olmos, 2008; Lugo et al., 2024). Recientemente, se ha reportado la dominancia de *A. pegreffii* en distintos hospedadores a lo largo del país (Lugo et al., 2024) con una alta incidencia. Incluso se han observado haplotipos únicos de *A. pegreffii* en *Dosidicus gigas* a diferencia de los peces examinados (Lugo et al., 2024), lo que indica una posible diferenciación entre las poblaciones de *A. pegreffii*. A pesar de esto, estudios anteriores encontraron que los alérgenos son expresados sin importar la especie de hospedador o cambios de temperatura o acidez (Lugo et al., 2026), lo que indica su alta resiliencia a cambios ambientales, esto puede ser debido a regiones moleculares conservadas específicas del sistema inmune de peces (Silva et al., 2024), corroborando una coevolución entre el parásito y su hospedador. Hasta la fecha, no se encuentran registros coevolutivos de la jibia y el parásito e igualmente, no se dispone de información sobre la relación entre la actividad alérgica de *A. pegreffii* y sus hospedadores accidentales humanos.

Anisakiasis y la salud pública

De las nueve especies que conforman el género *Anisakis*, *A. simplex* y *A. pegreffii* han sido reportadas como causantes de problemas de salud pública en seres humanos (Mattiucci & D’Amedio, 2014; Bao et al., 2017), provocando la enfermedad zoonótica emergente, conocida como Anisakiasis. Esta enfermedad es una zoonosis de parásitos que producen alérgenos, los cuales son proteínas o glicoproteínas que provocan reacciones alérgicas a individuos más susceptibles (Reyes et al., 2020). Además, son producidos durante todo el ciclo de vida del parásito y se liberan a través de sus glándulas, ventrículo y cutícula (Guerra, 2015; Audicana & Kennedy, 2008).

Se han reportado 14 alérgenos asociados a *A. simplex*, según el subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) (Palomba et al., 2019; Audicana & Kennedy, 2008). Existen diferentes tipos de acuerdo con cómo son producidos, por ejemplo, los alérgenos *Ani s 1*, *Ani s 7* y *Ani s 13* se producen a través del sistema excretor/secretor (Kobayashi et al. 1972). Mientras que el alérgeno *Ani s 2* y *Ani s 3*, son alérgenos somáticos principales, liberados por las células del cuerpo, produciendo los efectos alérgicos a través de la presencia directa del parásito con el ser humano, y que además puede llegar a ser transmitido por larvas muertas que se encuentran en los alimentos (Ubeira, 2015; Wan Hamid et. al, 2023).

La metodología de extracción y purificación de estos alérgenos solo ha sido establecida para *A. simplex*, en donde se realizó el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Kobayashi et al., 2007). Mientras que para los alérgenos de *A. pegreffii* sólo se ha logrado reconocer su prevalencia (Shimakura et al., 2004). Actualmente, sólo se conoce el riesgo de Anisakiasis provocado por la ingesta y contacto directo con el parásito *A. simplex*, donde el riesgo provocado por otras especies como *A. pegreffii* es aún escaso. Pero debido al alto grado de similitud entre estas especies hermanas (*A. simplex* y *A. pegreffii*), es probable que puedan existir riesgos similares asociados a estos alérgenos en cuanto su comportamiento en seres humanos (Quiazon et al., 2013).

Como medida de protección, en el cuerpo del ser humano existen células especializadas en el sistema inmune, que reaccionan a través de diferentes mecanismos de defensa frente a estos patógenos (Murphy & Weaver, 2016). Entre éstas, las inmunoglobulinas (Ig) las cuales desempeñan un papel crucial, ya que son producidas por células plasmáticas especializadas con la funcionalidad de señalar la presencia de patógenos que ingresan al organismo (Burton, 1990). A pesar de que los anticuerpos actúan como una señal de advertencia, algunas personas con un sistema inmune sensible a los alérgenos, los reconocen como una amenaza y desencadenan una respuesta inmunológica anormal (Pardo, 2016). Las manifestaciones de estas reacciones incluyen hipersensibilidad y urticaria crónica, así como síntomas gástricos, intestinales y ectópicos (Audicana & Kennedy, 2008; Choi et al., 2009; Mattiucci et al., 2017). Si se registran altas concentraciones de alérgenos, se provoca un daño celular debido a las reacciones inflamatorias y al estrés oxidativo, lo que puede ser observado a través de alteraciones morfológicas y funcionales como en el caso de las membranas celulares y el ADN (Esposito et. al, 2012). Actualmente, hay escasos estudios del efecto de los alérgenos en las células humanas, así como también el daño funcional en las células involucradas en dichas reacciones (Pardo, 2016; Wan et al., 2023).

Los métodos convencionales actuales para diagnosticar la alergenidad de estas toxinas en seres humanos incluyen la visualización de la larva mediante gastro endoscopia y colonoscopia, y, en algunos casos, la posibilidad de realizar intervenciones quirúrgicas (Moreira & López, 2010). Por otro lado, se utilizan pruebas de detección de IgE específicas a alergias en general y pruebas cutáneas relacionadas con el consumo de pescados,

(Gómez et al., 2003). Para ello es necesario desarrollar métodos específicos para la obtención de alérgenos de *A. pegreffii*, y determinar su efecto en células humanas, que permitan avanzar en el conocimiento de anisakiasis en Chile.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cómo influye el hospedador en la actividad alérgica de *A. pegreffii* en células humanas?

HIPÓTESIS

- Los alérgenos de *Anisakis pegreffii* inducen respuestas diferenciales en líneas celulares humanas, dependiendo del hospedador de origen del parásito.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la actividad alergénica de *Anisakis pegreffii* en células humanas, provenientes de hospedadores intermediarios marinos (*Trachurus murphyi* y *Dosidicus gigas*) de interés comercial en Chile.

Objetivos Específicos

1. Identificar molecularmente larvas de *Anisakis pegreffii* proveniente de *Trachurus murphyi* y *Dosidicus gigas* mediante el marcador COX2
2. Caracterizar alérgenos de *Anisakis pegreffii* provenientes de hospedadores intermediarios marinos.
3. Comparar la respuesta alergénica de *Anisakis pegreffii* entre *Trachurus murphyi* y *Dosidicus gigas* en células humanas.

MÉTODOS

1. Sitio de muestreo y procesamiento de muestras

El muestreo se llevó a cabo en la Región del Biobío, en donde se recolectaron 5 ejemplares de *Trachurus murphyi* (jurel) y 4 ejemplares *Dosidicus gigas* (jibia) en el terminal pesquero de la Caleta Lo Rojas (37° 1'29.77"S, 73° 9'24.57"O) y Talcahuano (36°51'38.96"S, 73° 7'20.40"O) de la Región del Biobío.

Los ejemplares no fueron seleccionados por diferenciación de sexo. Luego en el Laboratorio de Ecología de la Facultad de Ciencias en la Universidad Católica de la Santísima Concepción se realizó una disección de la cavidad estomacal de todos los hospedadores, para extraer larvas de *Anisakis* sp. presentes en la masa visceral y otros órganos. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando un negatoscopio artesanal con luz blanca.

2. Identificación morfológica de *Anisakis*

Para la identificación de *Anisakis*, se realizó una observación en microscopio estereoscópico con aumentos de 10/40X adaptado a una cámara digital Leica con pantalla de TV. Esto permitió identificar la presencia o ausencia de los caracteres morfológicos típicos del género *Anisakis* siguiendo la clasificación de Berland (1961, **Figura 4**).

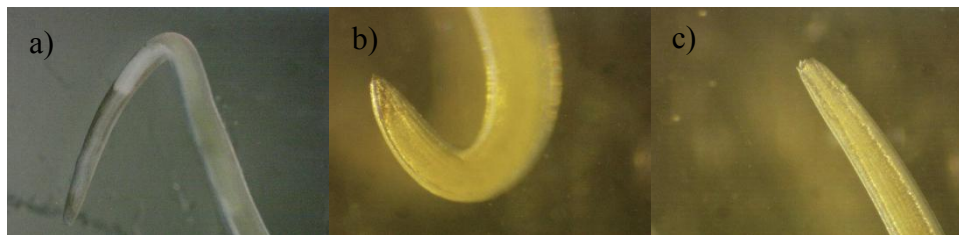


Figura 4. Características del género *Anisakis* identificadas en microscopio estereoscópico en la a) cola con mucrón, b) el ventrículo y c) diente cuticular.

Posteriormente, se seleccionaron aleatoriamente 10 individuos de *Anisakis* por hospedador. Luego se realizó un corte transversal en el parásito entre el anillo nervioso y el poro excretor con la finalidad de obtener un trozo de cada individuo, para llevar a cabo el análisis de identificación molecular. El trozo se almacenó en alcohol al 95%. Mientras que el resto del individuo fue mantenido y congelado para la extracción y purificación de los alérgenos.

3. Identificación molecular taxonómica de *Anisakis pegreffii*

La extracción del ADN genómico de cada larva se realizó con el kit de extracción de ADN E.Z.N.A Tissue DNA OMEGA Bio-Tek, siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego se amplificó el gen mitocondrial COX2 específico para *Anisakis*, utilizando los partidores 211 (5' TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT 3') y 210 (5' CACCAACTCTTAAAATTATC 3') (Nadler et al. 2000). La amplificación se realizó en un equipo de PCR Veriti Thermal Cycler en las siguientes condiciones: 8 min a 95°C, 40 ciclos de 40 s a 96°C, 40 S a 45°C y 40 s a 72°C. Posteriormente se realizó la extensión final del ADN durante 10 min a 72°C. Finalmente para visualizar los resultados de la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 10% teñido con Safeview durante 30 min a voltaje 80, para posteriormente ser observados en un transluminador UV (Lugo et al, 2024). Las muestras fueron enviadas a secuenciación a la Compañía Macrogen Inc, Chile.

Para el análisis y edición de las secuencias se utilizó el programa BIOEDIT 7.0. Posteriormente, se empleó una búsqueda de secuencias disponibles en la base de datos de National Institutes of Health (NCBI por su sigla en inglés) aplicando BLAST como herramienta comparativa en Genbank (Altschul et al., 1990), para la identificación molecular de las larvas. Se tomaron en cuenta el porcentaje de similitud y el e-value.

Junto con muestras obtenidas de Lugo et al. (2024), se realizaron análisis de diversidad genética a través de DnaSP 6 (Rozas et al, 2017), para comparar la variabilidad genética entre larvas provenientes de diferentes hospedadores, y un árbol filogenético de Máxima Verosimilitud para observar si hay cambios evolutivos en la especie usando el software MEGA 7 (Kannan & Wheeler, 2012). Para enraizar el árbol se utilizaron dos especies como grupo externo: *A. nascetii* (JQ912692.1) y *A. brevispiculata* (JQ912694.1) Se realizó una red de haplotipos en el software Popart (Leigh & Bryant, 2015) para visualizar las relaciones evolutivas de los genotipos entre las secuencias de ADN obtenidos por Lugo et al. (2024) y este estudio.

4. Extracción de los alérgenos

Se utilizó como base la metodología de *A. simplex* por Kobayashi et. al, 2007. La extracción inició con la liofilización, y trituración de las larvas, luego se aplicó 8 ml tampón de fosfato 10 mM (pH 6,8) con 0,07 g de NaCl 150 mM, 80 µl de cóctel de inhibición de proteasa y 0,0484 g de cisteína a 500 mM. Posteriormente, la muestra fue homogeneizada para continuar con la centrifugación a 20.000 x g durante un periodo de 20 min a 4°C.

Luego de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante de las muestras, para luego realizar un lavado continuo del precipitado con 6 o 9 repeticiones con los 30 ml del tampón de fosfato. Posterior a ello se suspendió y precipitó añadiendo 7 ml de acetona fría al 85%, para así filtrar y secar a presión reducida en la estufa.

Luego del lavado, se agregaron 20 ml de solución salina tamponada con fosfato 10 mM con NaCl 900 mM y 220 μ l de cóctel inhibidor de proteasa, el cual se agitó durante un periodo de 14 horas por 4°C. Luego de las 14 horas se agregaron 0,095 g de MgCl₂, 0,77g DTT y 400 μ l ATP hasta obtener concentraciones de 1mM, 5mM y 1 mM. Nuevamente se prosiguió a realizar la agitación del precipitado durante 1 h a 4°C.

Posteriormente, se centrifugó a 117.000 x g durante 1 h a 4°C. Luego se agregó 0,02 g de timerosal al 10% para obtener la fracción de proteína.

Finalmente, se les añadió sulfato de amonio al 15%-20% de saturación y se recogió el precipitado mediante centrifugación a 20.000 g durante 20 min a 4°C. El precipitado se disolvió en 4 ml de tampón de fosfato 0,01 M (pH 6,8) el cual contiene 900 mM NaCl, 5 mM de TDT y 0,02 g de timerosal, y se agito durante 4 días a 4°C.

5. Purificación de los alérgenos

Para realizar la purificación de los alérgenos, se utilizó la técnica de HPLC con una columna TSKgel ODS-120T, de 4.6 mm y 25 cm de largo y una columna de CHT XT hidroxapatita. La elución a partir de la columna TSKgel ODS-120T se realizó a través de un gradiente lineal de 60 min de tampón fosfato 10-100 mM (pH 6,8) con 900 mM de NaCl a un caudal de 1 ml /min. La proteína se inmovilizó con un tampón de 900 mM de NaCl. Durante este procedimiento las proteínas fueron monitoreadas a 280 nm con un detector UV. Mientras que la elución de la columna CHT XT hidroxapatita se realizó a un gradiente lineal de 60 minutos en un tampón de fosfato de 10-600 mM (pH 6.8) con 900 Mm de NaCl a un caudal de 1ml/min. La proteína se inmovilizó con un tampón de fosfato a 10 mM con 900 mM de NaCl y luego con una fase móvil de tampón de fosfato a 600 mM (pH 6.8) con NaCl 900 mM para inmovilizar, debido a que Ani s 2 es insoluble en soluciones que tengan baja fuerza de iones. Posterior a ello, los eluidos fueron liofilizados y resuspendidos en 50 μ l de PBS 1X.

Finalmente se utilizó un equipo Nanodrop para la cuantificación de las muestras. Se obtuvieron las concentraciones de las proteínas aisladas con la columna TSKgel ODS-120T, sin embargo, las muestras obtenidas con la columna CHT XT no se cuantificaron debido a la presencia de un compuesto salino.

Las diferencias estadísticas entre los picos cromatográficos encontrados en larvas de *A. pegreffii* presentes en ambos hospedadores, fueron obtenidas mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), considerando como factor al hospedador, complementado con la evaluación de los supuestos de Shapiro-Wilk y Levene, mientras que post hoc se utilizó una prueba de Tukey.

6. Respuesta alérgica

6.1 Cultivo de células humanas

Se utilizaron las células de riñón HEK-293 (ATCC® CRL-1573TM) y células de colon CCD 841 CoN humanos inmortalizadas. Un total de 1 ml de contenido celular fue colocado en placas de 60 mm y 100 mm con un medio de DMEM para ambas líneas celulares en separado, el cual se complementó con suero fetal bovino al 10% (5 ml), L-glutamina al 4 Mm (500 µl), bicarbonato de sodio a 1.5 mg/mL y glucosa 4.5 mg/mL. Por cada medio de Cultivo, se adicionó penicilina-estreptomicina 500 µl, luego se aplicaron 4 ml para la placa celular de 60 mm y 7 ml para la placa de 100 mm. La incubación de las placas celulares se realizó a 37°C en un ambiente de 5% CO₂, en el caso de las células HEK-293 se aplicó un tiempo de división celular de 2 a 4 días para obtener la confluencia cerca del 80% de la placa, mientras que en el caso de las células CCD 841 Con hasta 2 semanas. Posterior a ello, las células fueron tripsinizadas para desprender las células de la placa madre. Se contabilizó el número total de células para colocar en las placas de Cultivo, con el equipo automatizado Invitrogen Countess 3. Para ello, se utilizaron placas de 12 pocillos con 20.000 células y placas de 96 pocillos con 8.000 células de cada línea celular, las cuales tuvieron tiempo de adhesión de 24 horas para las células de riñón y 48 horas para las células de colon con la finalidad de que su adherencia fuera optima y de morfología natural.

6.2 Exposición de las células a los alérgenos

Se aplicaron los extractos de *A. pegreffii* provenientes de *Trachurus murphyi* y *Dosidicus gigas* a ambas líneas celulares (HEK-293 y CCD 841 CoN) por separado, por un periodo de 24 horas de incubación con distintas concentraciones del alérgeno, 0 µl, 1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl. Un tratamiento control fue igualmente realizado en las mismas condiciones de los tratamientos, a excepción de la aplicación de los alérgenos, con la finalidad de poder comparar el estado celular antes y después de la exposición.

7. Análisis morfológico celular

7.1 Visualización exploratoria

Para observar los cambios morfológicos, se utilizó el equipo CytoSMART, que permite obtener imágenes detalladas de cambios de las células en respuesta a las distintas concentraciones de alérgenos y tratamiento control.

7.2 Cristal violeta

Se aplicó el método de cristal violeta en 20.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos, para evaluar la integridad de la membrana celular. Este procedimiento cuantifica la cantidad de pigmento adherido en las membranas celulares, lo que refleja la viabilidad de las células expuestas a agentes tóxicos, como los alérgenos.

El tinte se aplicó en el Cultivo celular para ser absorbido por las células que son viables. Posteriormente, el pigmento se combinó con metanol, generando la solución pigmentada de color violeta que tendrá una absorbancia de 570 nm. La viabilidad celular (% abundancia relativa) fue finalmente cuantificada utilizando el lector de multiplicación Cytation-5.

7.3 Ensayo de citotoxicidad

Para evaluar la viabilidad celular, se utilizó el método XTT en 8000 células en placas de 96 pocillos. Este es un ensayo colorimétrico que cuantifica la viabilidad como la citotoxicidad celular, con el objetivo de evaluar el nivel de toxicidad de los alérgenos. Este ensayo es una modificación del método MTT (García-Contreras et al., 2019), el cual mide la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, resultando en la formación de cristales insolubles. En el caso del XTT, el objetivo es reducir la sal de sodio 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) mediante las deshidrogenasas mitocondriales hasta obtener cristales solubles de formazán. Este proceso se acelera mediante la adición de Fenasina Metosulfato (PMS), que actúa como un acoplador de electrones. Las células se cultivan en placas de 96 pocillos y se incuban con reactivos indicados en el cóctel del fabricante a 37°C, durante 5 horas, hasta que se observe la coloración anaranjada debido a la reducción del formazán, que se mide a 490 nm en un espectrofotómetro.

8. Análisis estadístico

La comparación entre las diferentes concentraciones de alérgenos provenientes de *A. pegreffii* en *T. murphyi* y *D. gigas* en células HEK-293, se obtuvo mediante un análisis estadístico inferencial en el software RStudio. Igualmente, se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad residual del modelo mediante la prueba de Shapiro-Wilk y de homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Por otro lado, se utilizó la prueba de T Student para realizar las comparaciones entre las especies y entre los tratamientos por especie con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Posteriormente, se realizó un análisis de varianza bifactorial (ANOVA de dos vías) para hacer la comparación entre los tratamientos aplicados (0,1,2,4,8 μ l). Finalmente se realizó una prueba post hoc de Dunnett, para comparar los tratamientos con el control (0 μ l) por cada línea celular con un nivel de significancia de $p < 0.05$. En ello los valores obtenidos, fueron representados como porcentaje de viabilidad celular en relación con el control sin tratamiento, considerado como referencia máxima de viabilidad en un 100%.

Mientras que, para comparar la sección de purificación en HPLC, se utilizó la prueba post hoc de Tukey para comparar la diferencia que existe entre ambos grupos.

En el caso de la línea celular CCD 841 CoN, debido a las limitaciones asociadas al lento crecimiento celular, el número de observaciones y número de replicas no fueron suficientes para cumplir con una prueba estadística paramétrica. Por tanto, los resultados obtenidos fueron analizados sólo de forma exploratoria y descriptiva.

RESULTADOS

O1: Identificar molecularmente larvas de *Anisakis pegreffii* proveniente de *Trachurus murphyi* y *Dosidicus gigas* mediante el marcador COX2

Morfología de *Anisakis pegreffii*

Se obtuvieron en promedio 38 larvas de nemátodos para la especie *T. murphyi* y 30 para la *D. gigas* por cada hospedador. Los parásitos fueron encontrados asentados en la cavidad estomacal y dentro de las capas de recubrimiento estomacal para ambos hospedadores. Mediante la observación microscópica se encontraron caracteres taxonómicos principales del género *Anisakis*. Entre ellas, el cuerpo del individuo era alargado y cilíndrico, con presencia de zona ventricular alargada, diente cuticular y mucron terminal característico de las larvas en el tercer estadio.

Identificación taxonómica molecular

Se identificaron larvas correspondientes a la especie *Anisakis pegreffii* para ambos hospedadores. Las larvas provenientes de *T. murphyi* presentaron valores de 97,60-99,66% de similitud y un e-value de 0. Resultados similares fueron obtenidos para larvas presentes en *D. gigas*, 97,28-100% de similitud y un e-value de cero (**Tabla 1**).

La distancia genética entre las larvas de ambos hospedadores es cercana a cero, lo que indica que se encuentra la misma especie en ambos hospedadores.

Tabla 1. Identificación taxonómica de larvas de nemátodos provenientes de *T. murphyi* y *D. gigas* mediante NCBI.

Gen	Muestra	Hospedador	Nombre científico	Total Score	Query cover	E-value	Longitud secuencia	% Similitud
COX2	J1	T. murphyi	A. pegreffii	1,070.000	99.000	0.0	627.000	99.660
COX2	J2	T. murphyi	A. pegreffii	994.000	96.000	0.0	607.000	97.600
COX2	J3	T. murphyi	A. pegreffii	1,062.000	95.000	0.0	606.000	99.490
COX2	J4	T. murphyi	A. pegreffii	1,055.000	97.000	0.0	582.000	99.480
COX2	J5	T. murphyi	A. pegreffii	1,061.000	98.000	0.0	581.000	99.660
COX2	DG1	D. gigas	A. pegreffii	931.000	89.000	0.0	627.000	97.280
COX2	DG2	D. gigas	A. pegreffii	1,075.000	100.000	0.0	629.000	100.000
COX2	DG3	D. gigas	A. pegreffii	1,068.000	100.000	0.0	607.000	99.660
COX2	DG4	D. gigas	A. pegreffii	1,072.000	100.000	0.0	629.000	99.330

Diversidad genética

Las larvas de ambos hospedadores presentaron una diversidad nucleotídica baja y con solo un haplotipo, indicando la alta similitud entre los nemátodos. A pesar de ello las larvas en *D. gigas* presentaron una diversidad nucleotídica mayor que las larvas en *T. murphyi* (Tabla 2).

Tabla 2. Índices genéticos en *A. pegreffii* provenientes de *T. murphyi* y *D. gigas*. S, Número de haplotipos. h, número de haplotipos. Hd, diversidad haplotípica. $\bar{x}$ Dif, promedio de las diferencias de nucleótidos.

Hospedador	Nº secuencias	Longitud	S	h	Mutaciones	Hd	Diversidad nucleotídica	$\bar{x}$ Dif. nucleotídica
T. murphyi	5.000	583.000	29.000	5.000	31.000	1.000	0.019	11.600
D. gigas	4.000	583.000	45.000	4.000	46.000	1.000	0.039	22.800
Total	9.000	583.000	45.000	9.000	62.000	1.000	0.020	12.100

Junto con las secuencias obtenidas previamente y las de este estudio (17 secuencias: 9 correspondiente al estudio y 8 secuencias de Lugo et. al (2024), se obtuvieron 53 sitios de polimorfismos, con un total de 1 haplotipo, y

diversidad nucleotídica baja (0.01), indicando una baja variabilidad genética entre las secuencias, sugiriendo una alta similitud entre las secuencias analizadas (Tabla 3).

Tabla 3. Índices genéticos en *A. pegreffii* provenientes de *T. murphyi* y *D. gigas* de secuencias obtenidas de Lugo et. al (2024) y en este estudio. S, Número de haplotipos. h, número de haplotipos. Hd, diversidad haplotípica. $\bar{x}$ Dif, promedio de las diferencias de nucleótidos.

Nº Secuencias	Longitud	S	H	Mutaciones	Hd	Diversidad nucleotídica	$\bar{x}$ Dif. nucleotídica
17.000	583.000	53.000	17.000	55.000	1.000	0.010	9.500

Los resultados obtenidos en el árbol filogenético indican solapamiento y no diferenciación genética. Sólo se puede observar que la muestra DG1 (larvas en *D. gigas* de este estudio) presentó diferencias con el resto de las secuencias (**Figura 5**)

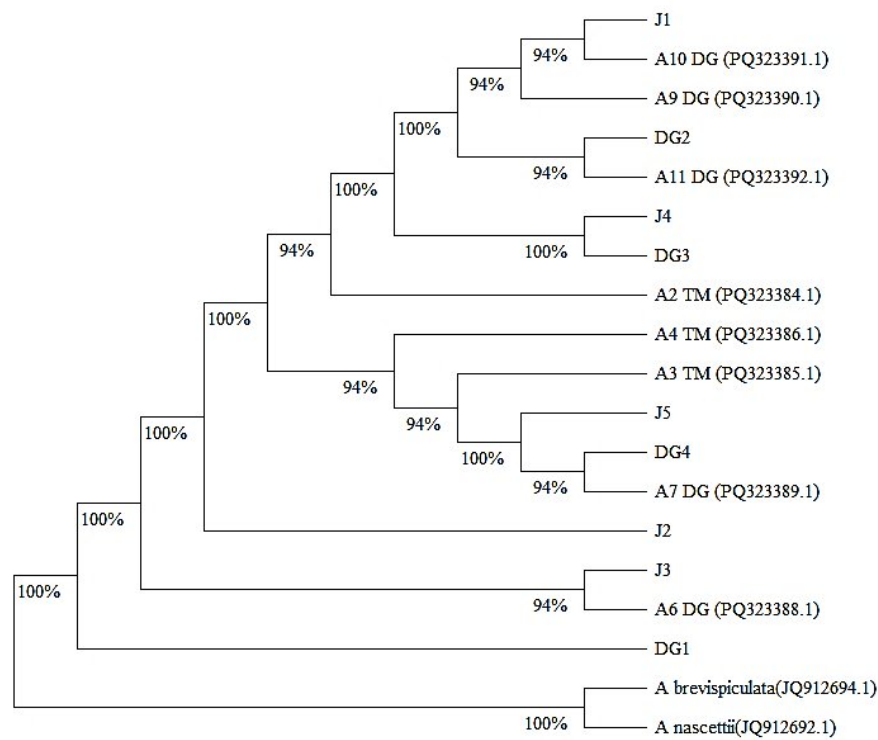


Figura 5. Árbol filogenético de máxima verosimilitud para parásitos de *A. pegreffii* obtenidas en Lugo et. al (2024) y en esta investigación (J1-5 y DG1-4).

La red de haplotipos presentó una forma estrellada con haplotipos únicos de larvas presentes *D. gigas* (**Figura 6**), en donde además se presentan haplotipos con pocos pasos mutacionales y se observa un haplotipo central. Estos resultados coinciden con Los resultados obtenidos anteriormente reforzando la baja divergencia genética.

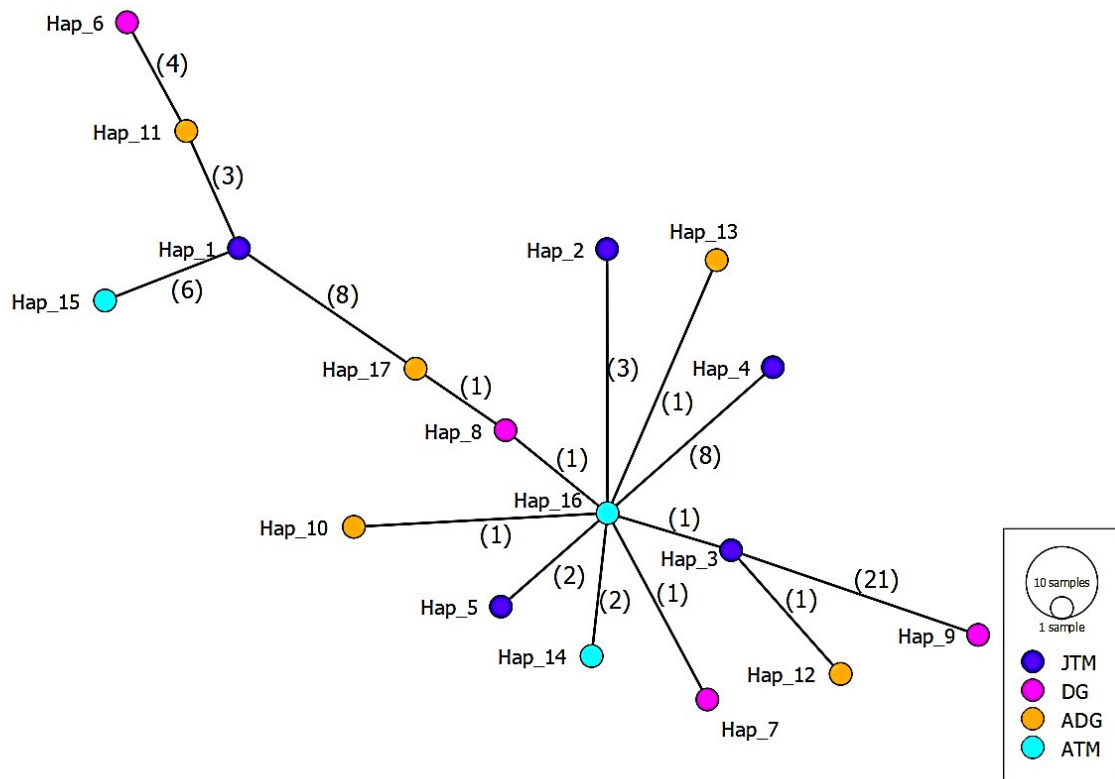


Figura 6. Red de haplotipos de larvas de *A. pegreffii* basada en el marcador molecular COX2. Los colores indican la representación de las secuencias obtenidas en este estudio JTM (Jurel) señalado en color azul y DG (Jibia) en color rosa. Mientras que ATM (Jurel) en celeste y ADG (Jibia) en naranja corresponden a las secuencias obtenidas en el estudio de Lugo et. al (2024).

Los análisis genéticos indicaron que hay una baja diferenciación genética entre las larvas de *A. pegreffii* provenientes de *T. murphyi* y *D. gigas*, Por otro lado, en el caso del árbol filogenético y red de haplotipos se observó escasos cambios mutacionales, a pesar de que *D. gigas* presentara haplotipos únicos, no fueron suficientes para presenciar heterogeneidad genética entre las muestras que fueron analizadas.

O2: Caracterizar alérgenos de *Anisakis pegreffii* provenientes de hospedadores intermediarios marinos.

Extractos y purificación de proteínas de *A. pegreffii*

Los alérgenos obtenidos con ambas columnas indican que el método utilizado de extracción y purificación de los alérgenos resultó óptimo para las muestras de *A. pegreffii* presentes en ambos hospedadores a partir de las modificaciones realizadas en estudios previos con la especie *A. simplex*.

En el caso de los perfiles obtenidos con la columna TSK gel ODS-120T, se obtuvieron dos picos de elusión en tiempos de retención diferentes. Uno cercano a los 5,5 minutos y el segundo a los 21 minutos para todas las muestras (**Figura 7**), por ende, se obtuvieron dos extractos por cada grupo larval de cada hospedador. Uno de estos picos es compatible preliminarmente con el perfil esperado para Ani s 2, mientras que el segundo corresponde a una proteína no identificada.

La cuantificación de la concentración realizada en el equipo Nanodrop, indica que hay mayor concentración de las proteínas aisladas totales en los extractos provenientes de las larvas de *D. gigas* (**Tabla 4**).

Tabla 4. Concentración de alérgenos de *A. pegreffii* en ambos hospedadores obtenidos en HPLC con la columna TSK gel ODS-120T.

Muestra	Hospedador	Tiempo de Retención (min)	Concentración (mg/ml)
J1-1	T. murphyi	5.560	0.054
J1-2	T. murphyi	22.100	0.154
J2-1	T. murphyi	5.800	0.032
J2-2	T. murphyi	22.500	0.199
J3-1	T. murphyi	5.800	6.575
J3-2	T. murphyi	22.100	2.102
J4-1	T. murphyi	5.800	0.005
J4-2	T. murphyi	22.400	0.018
J5-1	T. murphyi	5.700	2.028
J5-2	T. murphyi	22.000	0.175
DG1-1	D. gigas	5.600	0.040
DG1-2	D. gigas	21.800	0.020
DG2-1	D. gigas	5.800	1.438
DG2-2	D. gigas	21.900	6.465
DG3-1	D. gigas	5.800	5.422
DG3-2	D. gigas	21.900	5.763
DG4-1	D. gigas	5.700	0.082
DG4-2	D. gigas	22.100	0.059
DG5-1	D. gigas	5.700	0.082
DG5-2	D. gigas	22.100	0.059
DG6-1	D. gigas	5.700	0.025
DG6-2	D. gigas	21.900	0.038
DG7-1	D. gigas	5.700	0.005
DG7-2	D. gigas	22.000	0.032

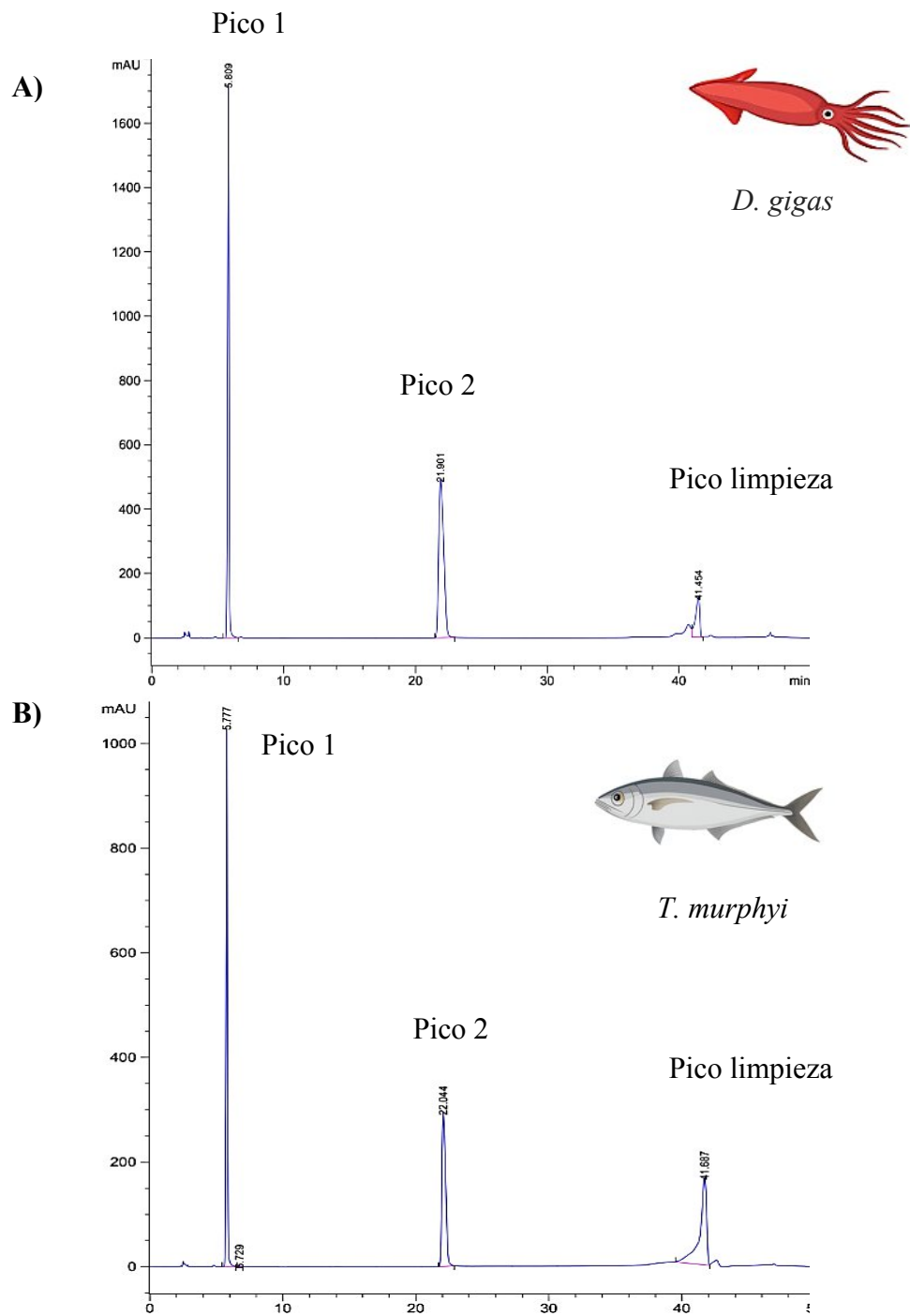


Figura 7. Perfiles proteicos obtenidos en HPLC con la columna TSKgel ODS-120T para las larvas de *A. pegreffii* provenientes de A) *D. gigas* y B) *T. murphyi*. El pico 1 y pico 2 corresponderían a extractos proteicos y el pico final corresponde a la limpieza.

Los perfiles obtenidos con la columna CHT XT hidroxiapatita produjo una sola elución, cercano a los 11 minutos para todas las muestras (**Figura 8**), sin embargo, debido a la composición salina no purificada, no fue posible cuantificar la proteína obtenida. A pesar de las limitaciones, la fracción proteica fue utilizada en los ensayos exploratorios de morfología y viabilidad celular con el objetivo de evaluar si existe efectos biológicos asociados.

Para ambas columnas, el contenido de la muestra fue similar para ambos hospedadores, indicando que la producción de este tipo de proteínas no depende del hospedador.

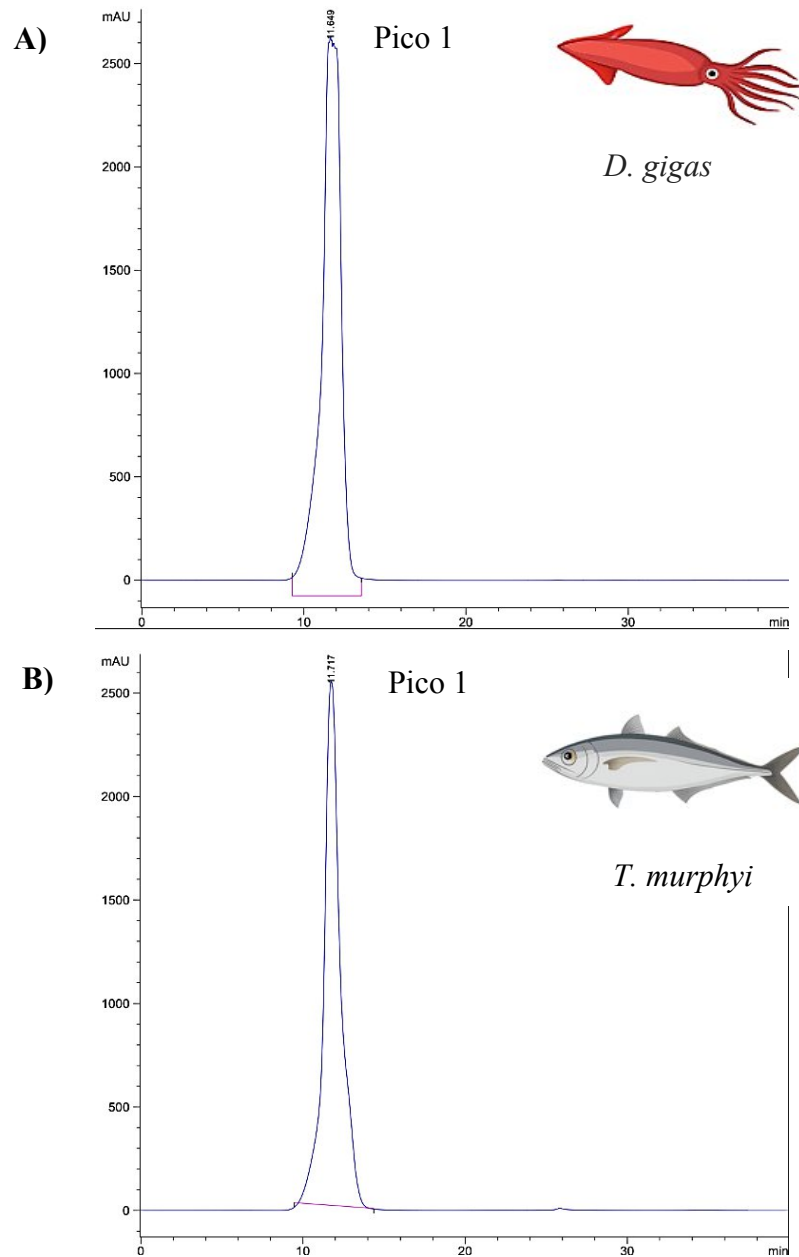


Figura 8. Perfiles proteicos obtenidos en HPLC con la columna de CHT XT hidroxipatita para las larvas de *A. pegreffii* provenientes de a) *D. gigas* y b) *T. murphyi*. El pico 1 correspondería a un extracto proteico.

Se comparó el área de los picos de cromatografía para ambas columnas, obtenidos en larvas provenientes de dos hospedadores en la **Figura 9**. Mediante la prueba Shapiro-Wilk para el Pico 1 de la columna TSKgel sugiere normalidad para larvas provenientes de *T. murphyi* ($W=0,921$; $p=0,516$) y *D. gigas* ($W=0,816$; $P=0,059$). Sin

embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($F= 2,323$; $p= 0,156$). En el caso del Pico 2 de la columna TSKgel también cumplen los supuestos de normalidad para larvas provenientes de *T. murphyi* ($W= 0,905$; $p= 0,407$) y *D. gigas* ($W= 0,866$; $p= 0,171$), sin diferencias significativas entre hospedadores ($F= 2,372$; $p= 0,152$).

El análisis de varianza del Pico 1, no muestra diferencias significativas en cuanto al área cromatográfica del Pico 1 entre hospedadores ($F= 0,066$; $p= 0,802$), y la prueba de post hoc de Tukey confirma los resultados anteriores ($p=0,802$), esto quiere decir que no hay diferenciación en la cantidad de compuesto obtenido en el Pico 1. En caso contrario, en el Pico 2 el ANOVA nos muestra que si hay diferencias significativas en cuanto al área cromatográfica entre hospedadores ($F= 5,028$, $p= 0,047$), mientras que la prueba de Tukey indica que el área correspondiente a la cantidad de extracto de larvas provenientes de *T. murphyi* es menor que las larvas provenientes de *D. gigas*.

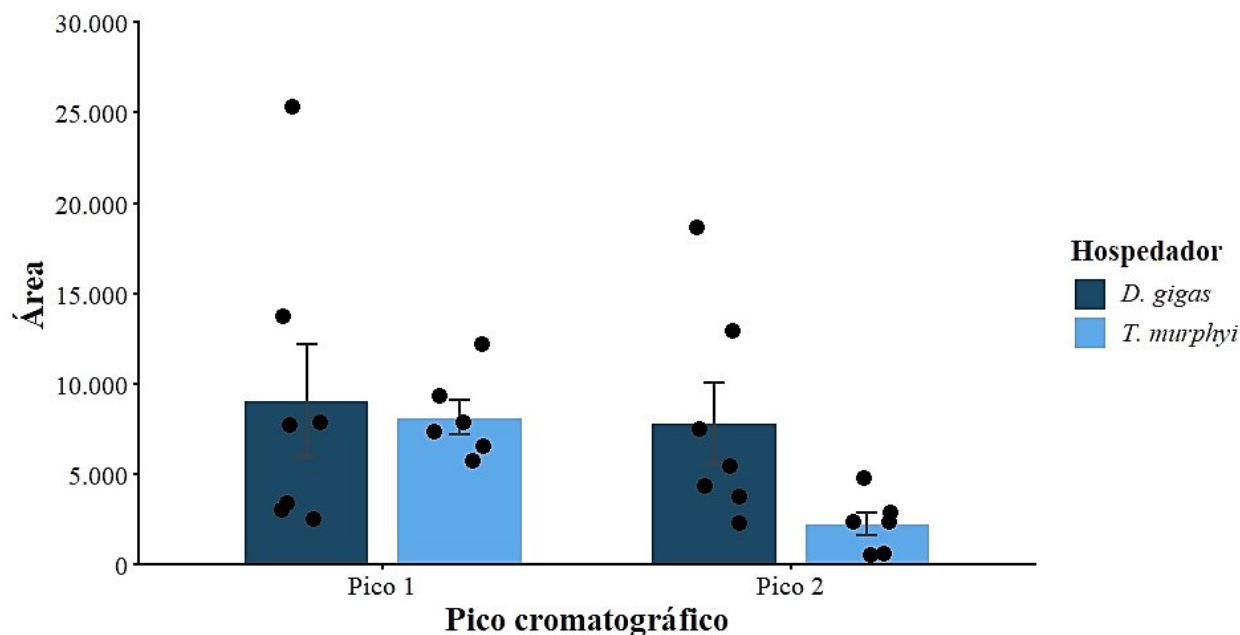


Figura 9. Área cromatográfica correspondiente a los picos 1 y 2 obtenido mediante la columna TSKgel en larvas provenientes de hospedadores *T. murphyi* y *D. gigas*.

Mientras que en el caso del único pico observado en la columna CHT XT para ambas especies en la **Figura 10**, se obtuvo normalidad de Shapiro-Wilk para larvas en *D. gigas* ($W = 0,972$; $p=0,913$), contrario a larvas en *T. murphyi*. La prueba de Levene no evidencio diferencias significativas entre las varianzas de ambos grupos ($F=2,742$; $p=0,126$). El ANOVA de una vía, indica diferencias significativas ($F= 6,703$; $p= 0,025$). El análisis post hoc de Tukey confirma los resultados, señalando que las larvas en *T. murphyi* presenta menores valores en

comparación con larvas en *D. gigas* ($p= 0,025$). Por ende, se evidencia que hay variaciones cuantitativas entre ambas especies, sin embargo, debido a que no se sabe qué tipo de proteína es, no sabemos si la variación corresponde a la cantidad de proteína o a la composición de cada extracto.

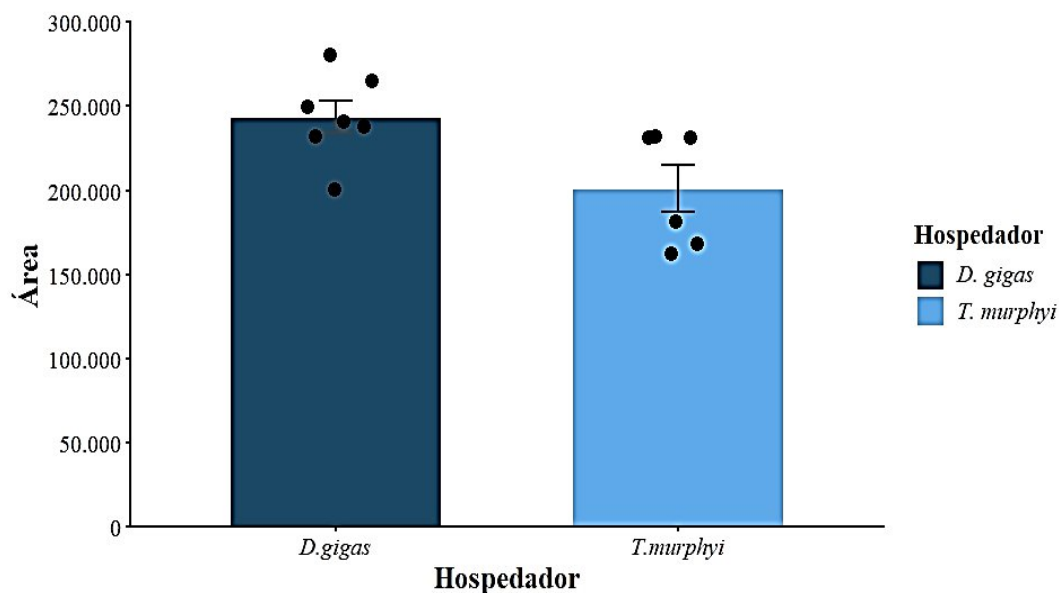


Figura 10. Área cromatográfica en HPLC correspondiente al Pico 1 obtenido mediante la columna CHT XT en larvas de hospedadores *T. murphyi* y *D. gigas*.

Los perfiles cromatográficos pudieron indicar que la extracción y purificación de los alérgenos de *A. pegreffii* presentaron dos fracciones con la columna TSKgel y una fracción con la columna con CHT XT hidroxipatita para ambas especies hospedadoras, esto indicaría que para ambos hospedadores se encontrarían los mismos alérgenos. Sin embargo, presentaron diferencias asociadas a la cantidad de contenido proteico obtenido, siendo mayor para la especie *D. gigas*, lo cual podría generar variaciones en cuanto al efecto que tienen en las células debido a que aún no se identifican las proteínas y no se conoce la abundancia de cada componente.

O3: Comparar la respuesta alérgica de *Anisakis pegreffii* entre *Trachurus murphyi* y *Dosidicus gigas* en células humanas.

Respuesta celular mediante exploración morfológica

En la **Figura 11** se pueden ver las células sin aplicación de tratamiento (condición de control). En las dos líneas celulares se puede observar la morfología de las células, estiradas y adheridas en las placas de cultivo, en condiciones óptimas y favorables, lo que permite ver células alargadas propias de su crecimiento normal. Evidenciando el adecuado estado de las líneas celulares para realizar los ensayos posteriores.

Líneas celulares sin aplicación de tratamiento

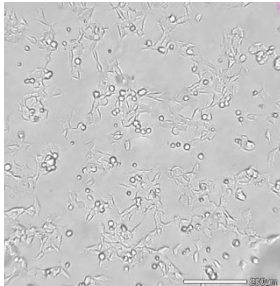
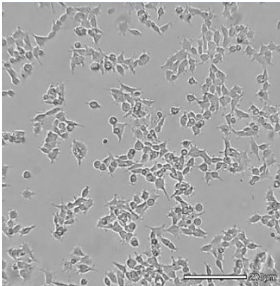
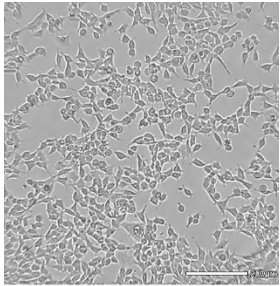
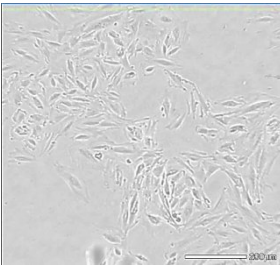
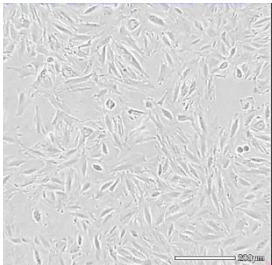
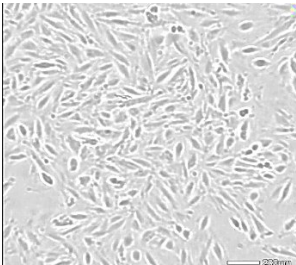
Línea celular	2 hrs	8 hrs	24 hrs
HEK 293			
CCD 841 CoN			

Figura 11. Imágenes obtenidas de las líneas celulares HEK293 y CCD 841 CoN sin aplicación de tratamiento alérgico (0 µl) a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs y 24 hrs.)

Línea celular HEK-293 con alérgenos de la Columna TSKgel

En las **Figuras 12 y 13** se puede observar la respuesta de las células HEK-293 frente a la exposición de dos extractos proteicos diferentes provenientes de *T. murphyi*. Se observaron alteraciones celulares a 4 µl y los 8 µl del extracto obtenido en el pico 2. Estas alteraciones son cambios de la morfología a un patrón amorfo, aumento del desprendimiento y muerte celular.

Tratamiento con alérgeno J1-1 (Pico 1)

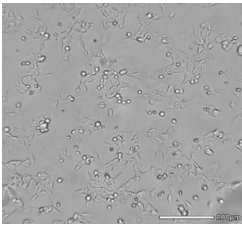
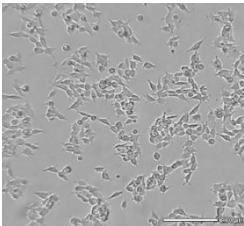
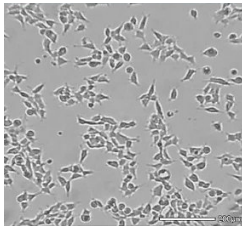
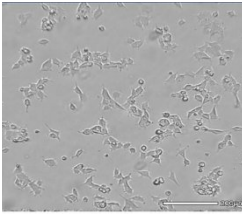
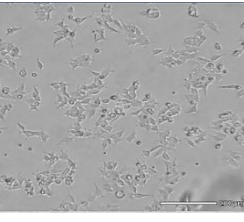
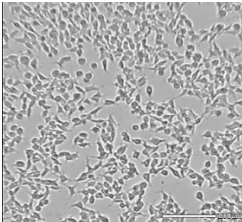
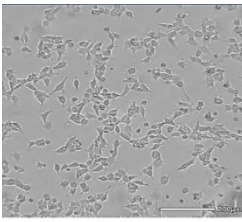
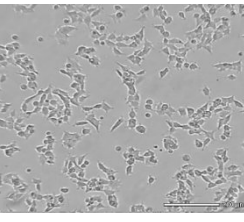
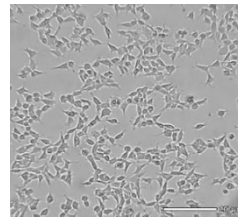
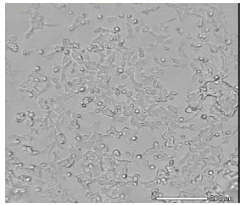
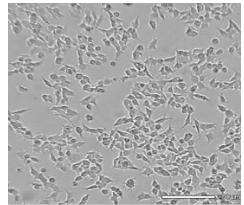
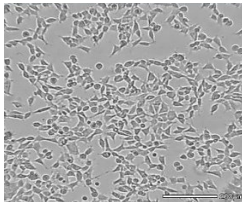
<i>TR/Hrs</i>	<i>2 hrs</i>	<i>8 hrs</i>	<i>24 hrs</i>
<i>1 µl</i>			
<i>2 µl</i>			
<i>4 µl</i>			
<i>8 µl</i>			

Figura 12. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 μ l, 2 μ l, 4 μ l y 8 μ l) con el alérgeno J1-1 de *A. pegreffii* en *T. murphyi* aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).

Tratamiento con alérgeno J2-2 (Pico 2)

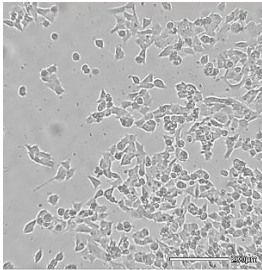
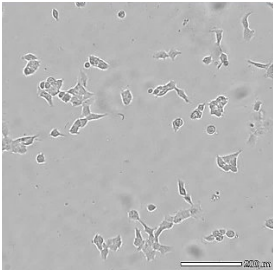
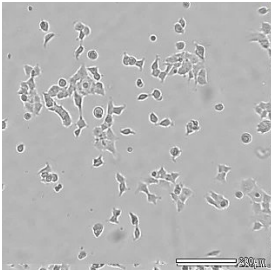
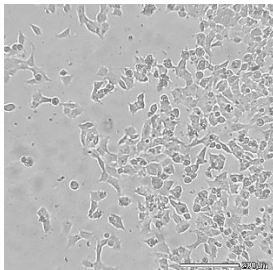
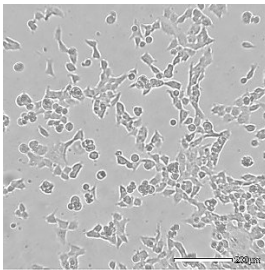
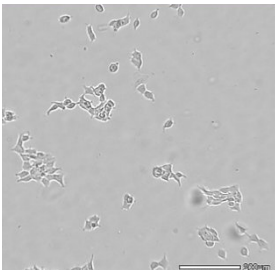
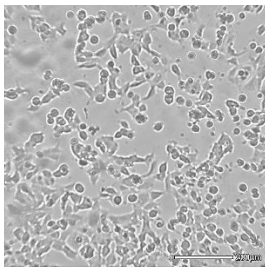
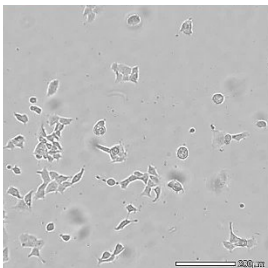
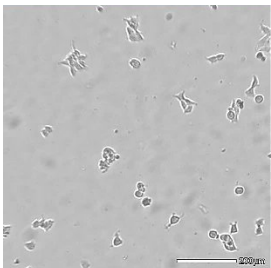
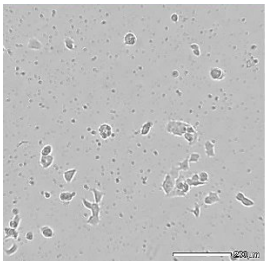
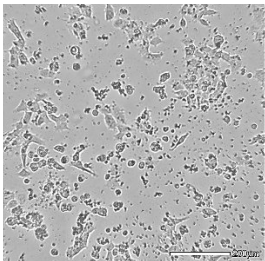
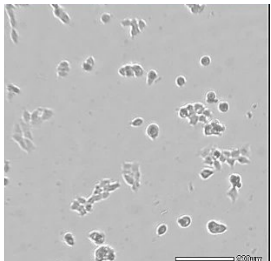
TR/Hrs	2 hrs	8 hrs	24 hrs
1 μ l			
2 μ l			
4 μ l			
8 μ l			

Figura 13. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 μ l, 2 μ l, 4 μ l y 8 μ l) con el alérgeno J2-2. de *A. pegreffii* en *T. murphyi* aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).

Mientras que en las **Figuras 14 y 15**, se puede observar la respuesta de las células HEK-293 frente a la exposición de dos extractos proteicos diferentes provenientes de *D. gigas*. Se observaron alteraciones celulares a 4 μ l y los 8 μ l del extracto obtenido en el pico 1. Estas alteraciones son observadas en células que se desprendieron observando que a medida que aumenta el tratamiento hay mayor proliferación celular, y en el caso del pico 2, se pudo observar células amorfas al aumentar la cantidad del extracto y además de tener más células desprendidas, y por ende menor número de células adheridas a la placa.

Estos resultados podrían indicar que los extractos podrían ser diferentes en cuanto a su composición o funcionalidad ya que provocan respuestas morfológicas diferentes en esta línea celular, por otro lado, en el caso del Jurel se observa que el efecto independiente del extracto obtenido genera el mismo efecto en las células, mientras que en el caso de la Jibia a pesar tener el mismo método de extracción su respuesta morfológica se ve afectada por el origen del extracto, lo que podría indicar que se podría tratar de distintas proteínas con distinta función.

Tratamiento con alérgeno DG1-1 (Pico 1)

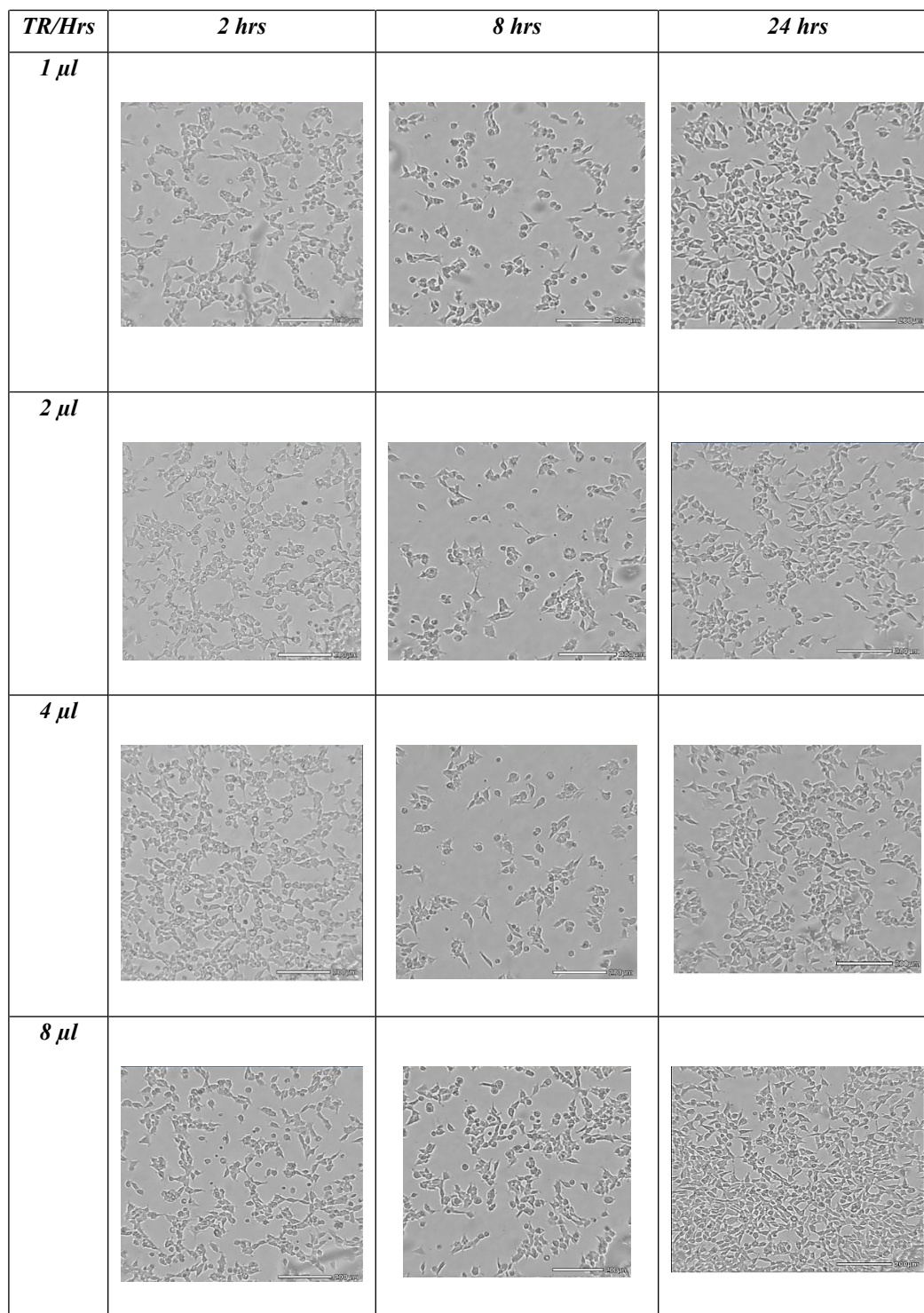


Figura 14. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno DG1 de *A. pegreffii* en *D. gigas* aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).

Tratamiento con alérgeno DG2-2 (Pico 2)

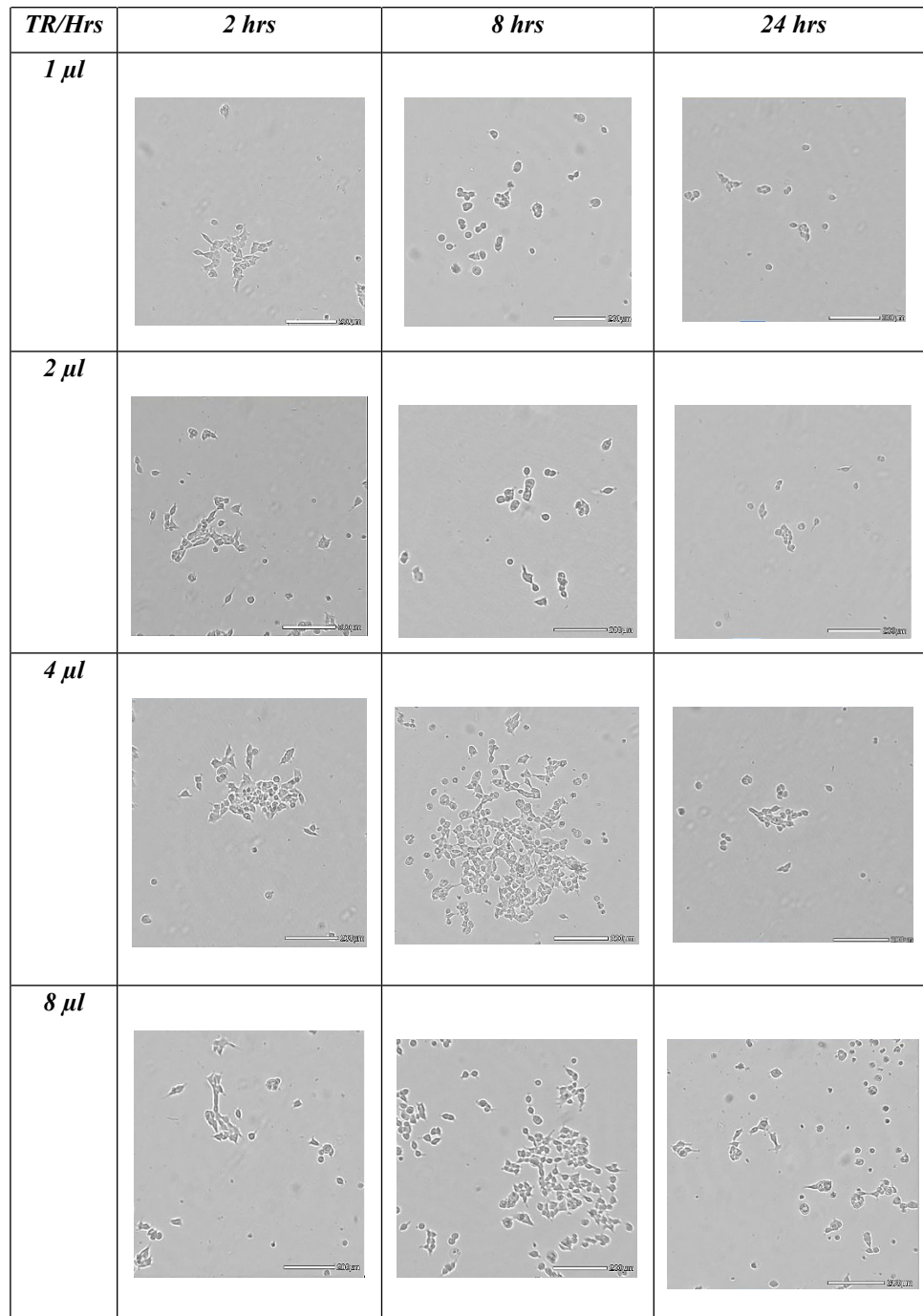
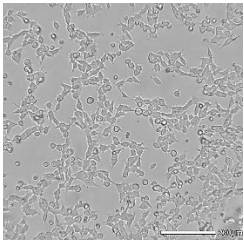
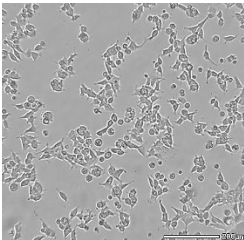
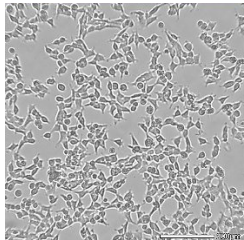
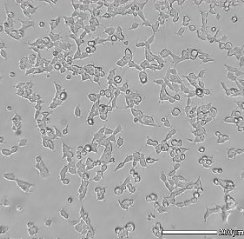
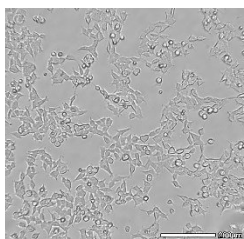
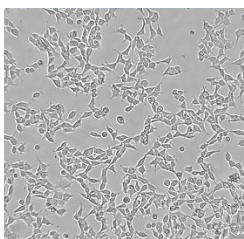
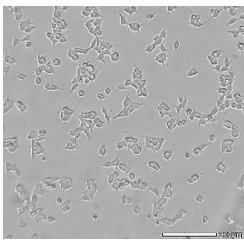
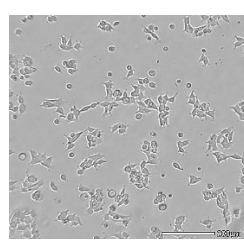
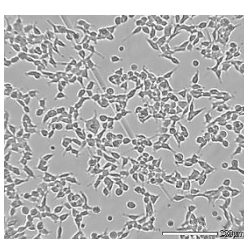


Figura 15. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno DG2-2 de *A. pegreffii* en *D. gigas* aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).

Línea celular HEK-293 con alérgenos de la Columna CHTX

En las **Figuras 16 y 17**, se puede observar que la respuesta de las células HEK-293 expuestas a los extractos obtenidos para ambos hospedadores, pero con otro método de purificación de las proteínas con la columna CHTXT, indica para Jibia y Jurel, no se observaron cambios morfológicos, un leve incremento del desprendimiento células, pero no considerable en su totalidad debido que a medida en que avanza el tiempo, no se ve afectado su crecimiento celular y aumenta aún más proliferación. Esto indicaría que se mantuvieron similares a su estado control independiente de su origen.

Tratamiento con alérgeno DG2

<i>TR/Hrs</i>	<i>2 hrs</i>	<i>8 hrs</i>	<i>24 hrs</i>
<i>1 µl</i>			
<i>2 µl</i>			
<i>4 µl</i>			

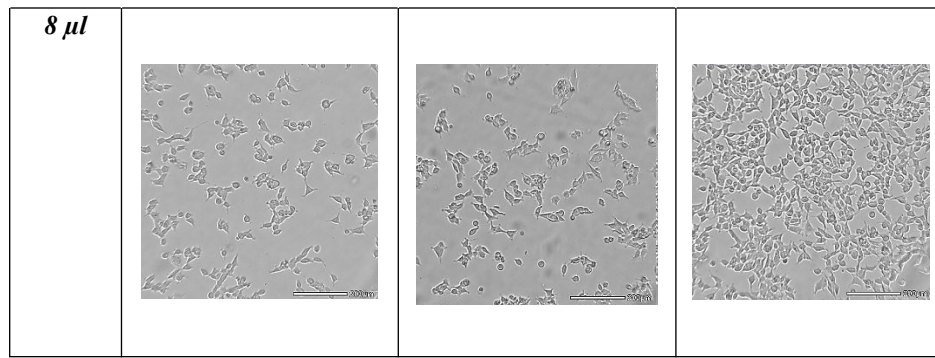


Figura 16. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 μ l, 2 μ l, 4 μ l y 8 μ l) con el alérgeno DG2 de *A. pegreffii* en *D. gigas* aislados en Columna CHTXT a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).

Tratamiento con alérgeno J2

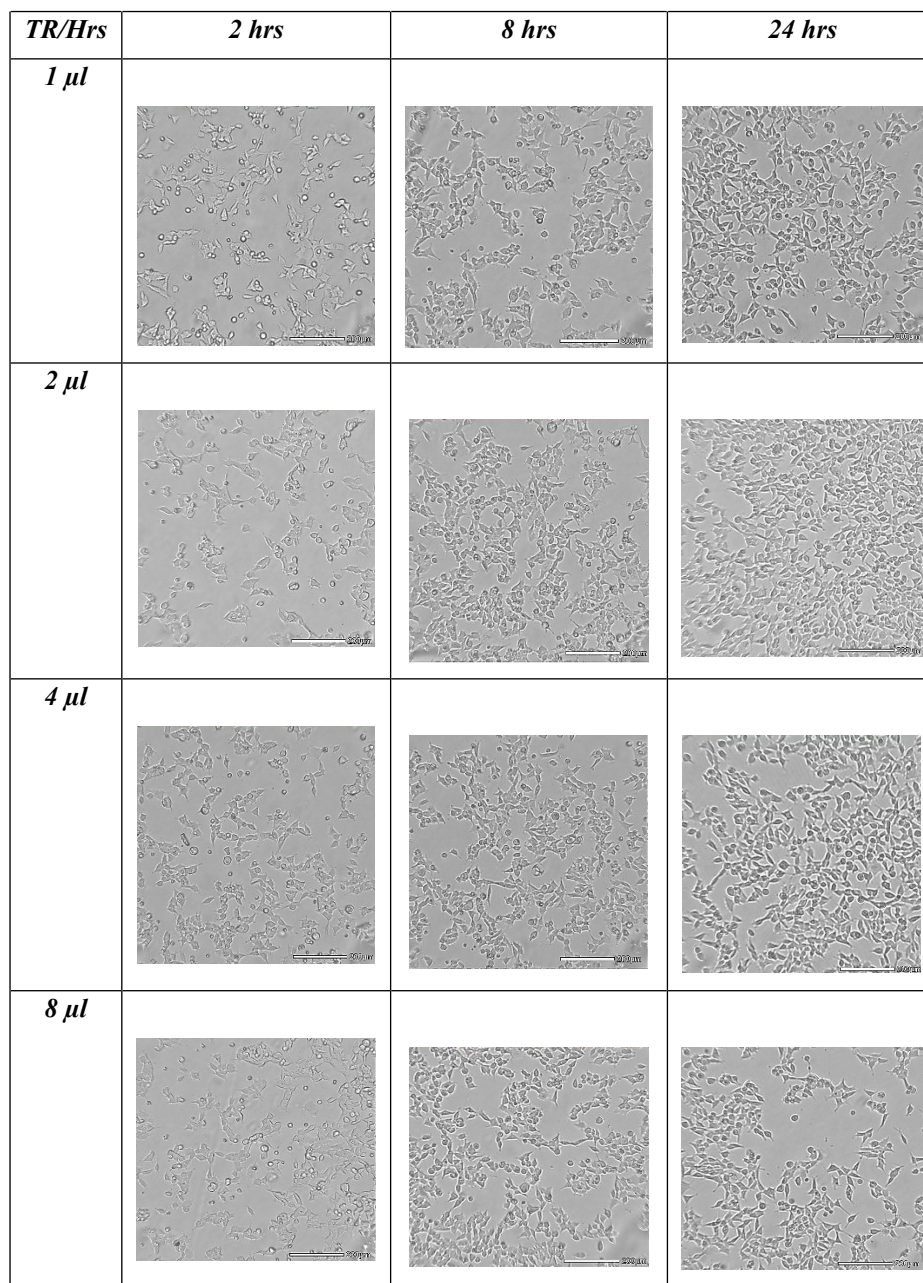
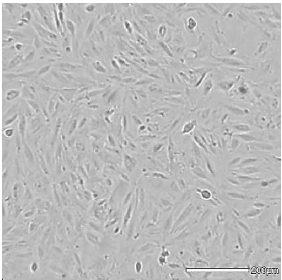
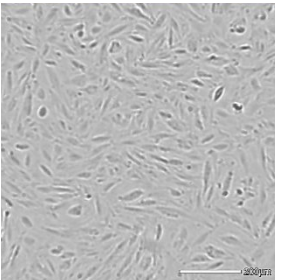
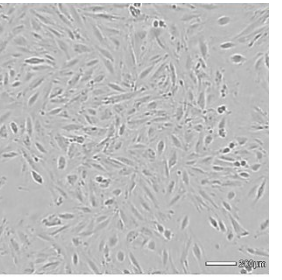
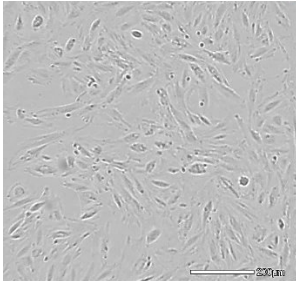
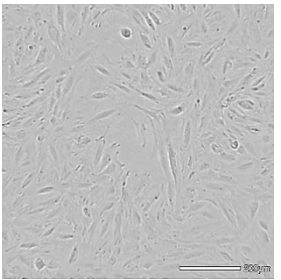
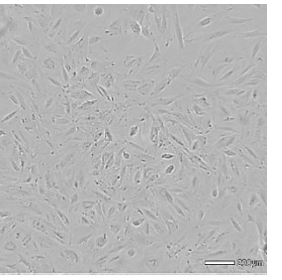
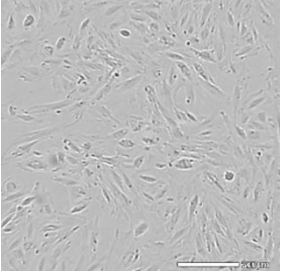
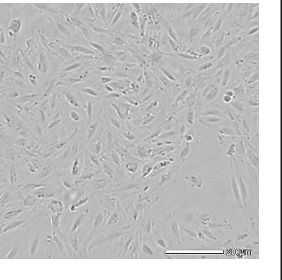
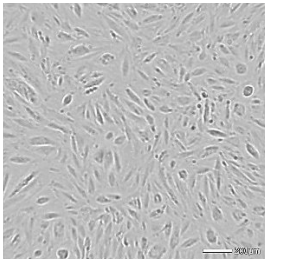


Figura 17. Línea celular HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno J2 de *A. pegreffii* en *T. murphyi* aislados en Columna CHTXT a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).

Línea celular CCD 841 CoN con alérgenos de la Columna TSKgel

En cuanto a las células CCD 841 CoN, se puede observar que independiente del origen del extracto proteico (**Figuras 18 y 19**) aplicado además del proceso de purificación de proteína con diferentes columnas, su crecimiento no se ve afectado. Se observaron células con morfología normal, con adherencia, y aumento en la confluencia celular en la placa de Cultivo para esta línea celular en ambos hospedadores.

Tratamiento con alérgeno J6-1 (pico 1)

<i>TR/Hrs</i>	<i>2 hrs</i>	<i>8 hrs</i>	<i>24 hrs</i>
<i>1 µl</i>			
<i>2 µl</i>			
<i>4 µl</i>			

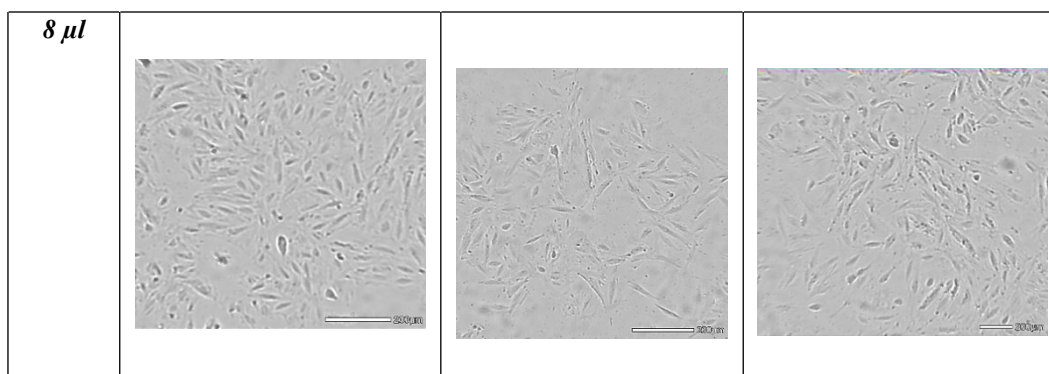


Figura 18. Línea celular CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (1 μ l, 2 μ l, 4 μ l y 8 μ l) con el alérgeno J6-1 de *A. pegreffii* en *T. murphyi* aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).

Tratamiento con alérgeno DG6-1(Pico 1)

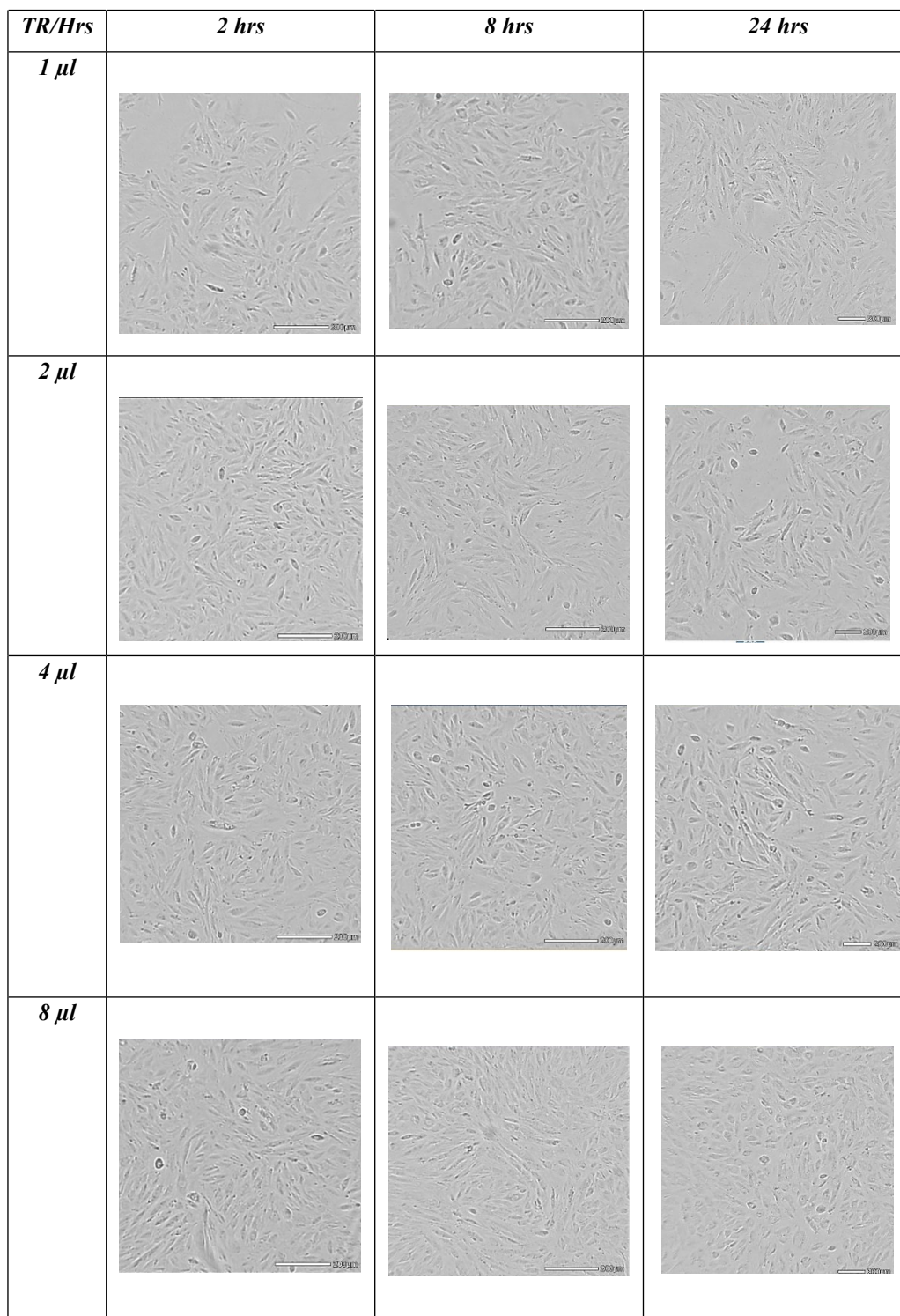


Figura 19. Línea celular CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno DG6-1 de *A. pegreffii* en *D. gigas* aislados en Columna TSKgel a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).

Línea celular CCD 841 CoN con alérgenos de la Columna CHT XT hidroxipatita

En cuanto a las células CCD 841 CoN, se realizaron tratamientos con 1 µl, 2 µl, 4 µl y 8µl, a excepción de la muestra DG8 la cual presentó problema en el proceso de plaqueado celular y sólo se consideró los tratamientos con 2 µl y 4 µl. Por otro lado, se puede observar que independiente del hospedador de origen (**Figuras 20 y 21**) aplicado además del proceso de purificación de proteína con diferentes columnas, su crecimiento no se ve afectado. Se observaron células con morfología normal, con adherencia, y aumento en la confluencia celular en la placa de Cultivo para esta línea celular en ambos hospedadores.

Tratamiento con alérgeno DG8

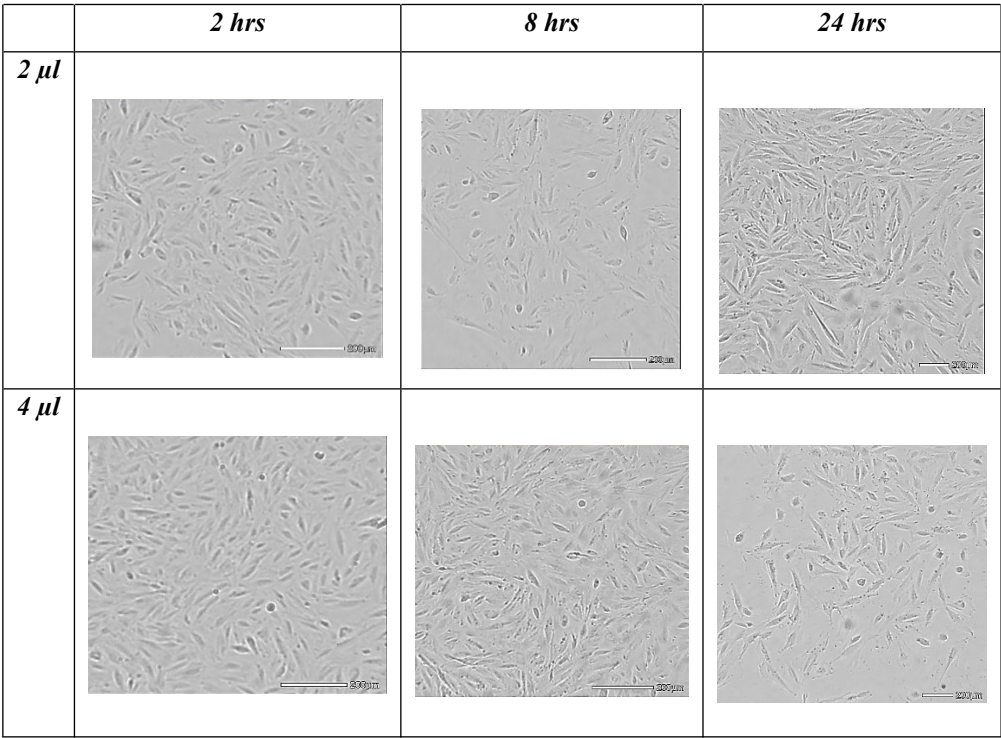


Figura 20. Línea celular CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (2 µl, 4 µl) con el alérgeno DG8 de *A. pegreffii* en *D. gigas* aislados en Columna DHT XT a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).

Tratamiento con alérgeno J6

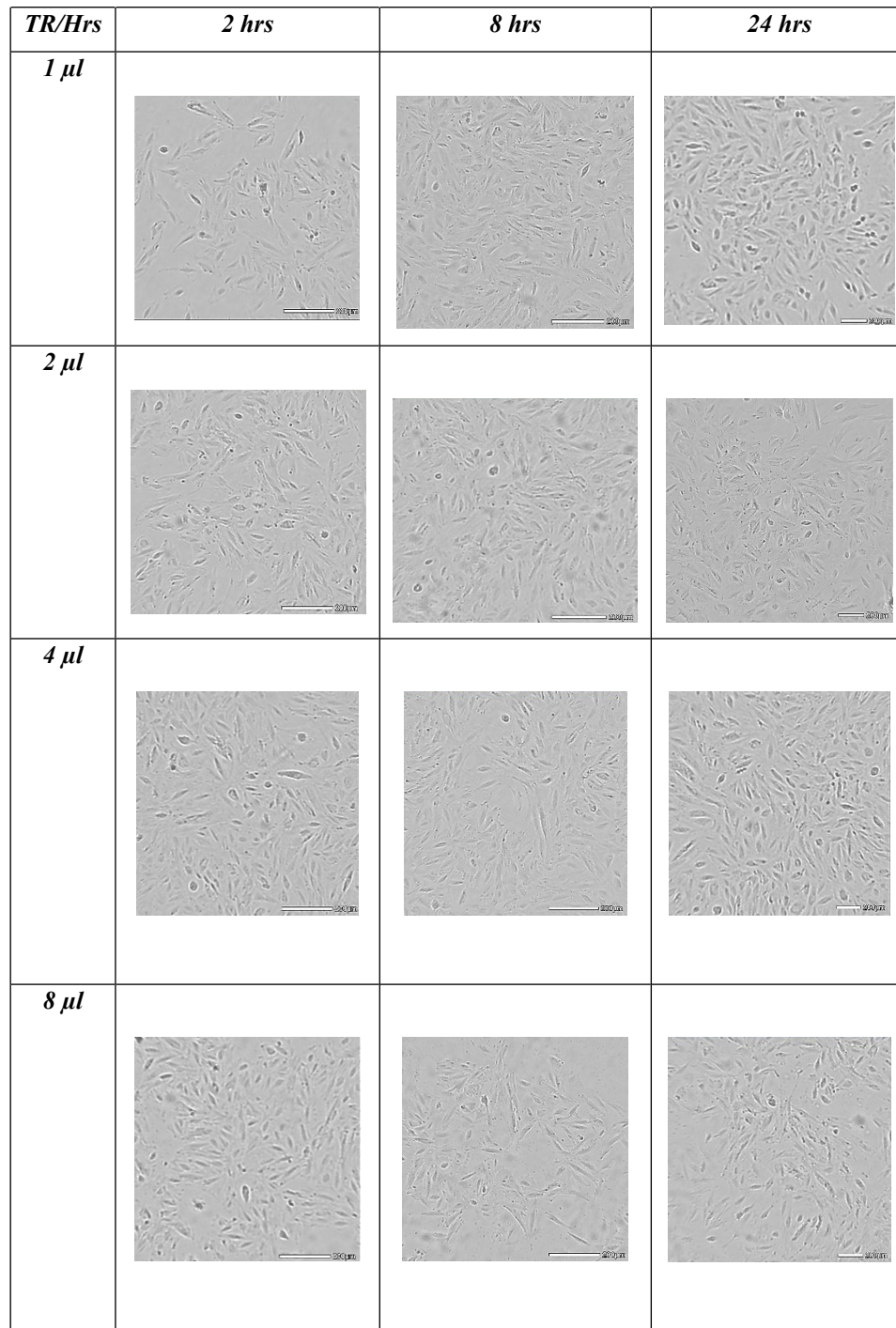


Figura 21. Línea celular CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (1 µl, 2 µl, 4 µl y 8 µl) con el alérgeno J6 de *A. pegreffii* en *T. murphyi* aislados en Columna DHT XT a diferentes períodos de incubación (2 hrs, 8 hrs, 24 hrs).

Las células con tratamientos de 1 μ l y 2 μ l no provocaron daños visibles en ninguna línea celular, independiente del tipo de alérgeno, pero sobre los 4 μ l y 8 μ l fueron evidenciados los cambios a través de las imágenes en células HEK-293 y CCD 841 CoN, observándose una tendencia a medida que aumentan las horas de exposición.

El resultado que presentó mayores efectos en la línea celular fueron los extractos obtenidos provenientes de *D. gigas* y con la elusión cromatográfica 2, lo cual no sólo se podría ver su diferenciación en cuanto a la cantidad del alérgeno producido por esta especie, sino que también se podría considerar como un compuesto citotóxico más alto, sin dependencia de la cantidad que sea aplicada.

Estos resultados podrían indicar que los extractos podrían ser diferentes en cuanto a su composición o funcionalidad, y no se observan diferencias relacionadas al tipo de columna de purificación utilizada, sino más bien revelan que la línea celular CCD 841 CoN en comparación con HEK-293 es menos susceptible a los extractos aplicados como tratamientos. Por otro lado, se puede observar que el efecto también se ve evidenciado en el extracto aplicado, esto quiere decir que no todos los extractos obtenidos podrían corresponder el mismo tipo de alérgeno, sino que podrían contener contenido proteico distinto, lo que también podría estar generando distinto efecto biológico en las líneas celulares.

Ensayo de viabilidad celular: Cristal Violeta

Línea Celular HEK-293 con alérgenos de la Columna TSK gel

La **Figura 22 A**, para verificar que los datos cumplieran con los supuestos estadísticos, se evaluó normalidad mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la de homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Los resultados indicaron que los datos presentaron una distribución normal ($W = 0,945$; $p = 0,124$) y homogeneidad de varianzas entre los grupos ($F = 0,378$; $p = 0,932$).

La comparación entre especies a través de la prueba estadística T Student indico que para el pico 1 (**Tabla 5**) no hay diferencias significativas ($p = 0,191$), sin embargo, en cuanto al promedio de la viabilidad celular, se observa que fue mayor para la especie *D. gigas*. Mientras que, en este mismo análisis, pero para el pico 2 los resultados indican que tampoco hay diferencias entre especies ($p = 0,274$), sin embargo, en esta oportunidad la viabilidad celular fue mayor para la especie *T. murphyi*.

Tabla 5. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir del promedio de todos los tratamientos en función de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna TSKgel en el A) pico 1 y B) pico 2 entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.

A)

Comparación	t	gl	p-valor	$\bar{x}$ <i>D. gigas</i>	$\bar{x}$ <i>T. murphyi</i>
<i>D. gigas</i> vs <i>T. murphyi</i>	1.341	27.609	0.191	106.107	86.316

B)

Comparación	t	gl	p-valor	$\bar{x}$ <i>D. gigas</i>	$\bar{x}$ <i>T. murphyi</i>
<i>D. gigas</i> vs <i>T. murphyi</i>	-1.117	26.635	0.274	113.895	125.983

El ANOVA bifactorial no evidenció diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($F = 0.218$; $p = 0.925$). Tampoco se observó interacción significativa entre la especie y tratamiento ($F = 0.329$; $p = 0.855$).

Al realizar la comparación entre los tratamientos por especies podemos observar que para ambos picos no se observan diferencias significativas, esto señala que el efecto del tratamiento independiente de la cantidad del

alérgeno que se aplica y de la especie de la cual provenga no genera cambios a nivel celular, en donde todos los valores fueron $p > 0,05$. (Tabla 6)

Tabla 6. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna TSKgel en el A) pico 1 y B) pico 2 entre los tratamientos de la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.

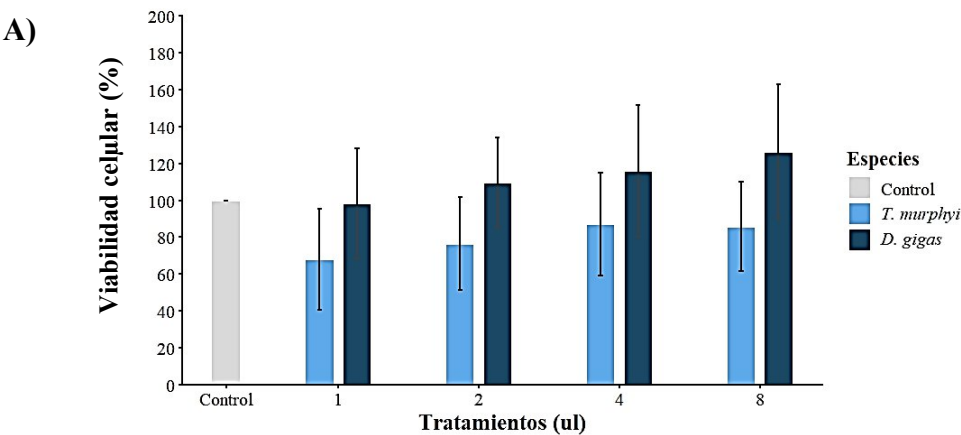
A)

Tratamiento (μL)	t	gl	p-valor
1	0.666	3.969	0.542
2	1.390	3.998	0.237
4	-0.053	3.790	0.960
8	0.582	3.460	0.596

B)

Tratamiento (μL)	t	gl	p-valor
1	-0.827	3.255	0.464
2	0.467	2.091	0.685
4	-0.966	3.983	0.389
8	-0.645	3.305	0.561

Finalmente se realizó la prueba post hoc de Dunnett para comparar los grupos con el tratamiento control (0 μl), lo que resultó mostrando que no hay diferencias significativas entre las cantidades de alérgenos aplicados en relación con el tratamiento control ($p > 0,05$), esto indica que el extracto alérgénico purificado con la columna TSKgel correspondiente al pico 1 no generó cambios significativos en la viabilidad celular que corresponde a la viabilidad celular de la línea celular HEK-293.



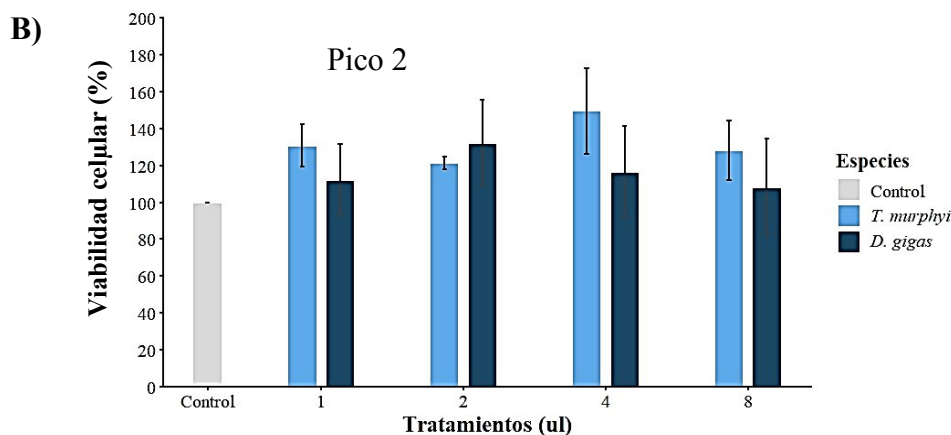


Figura 22. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo cristal violeta en células HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico *A. pegreffii*. Se obtuvieron 2 fracciones de purificación en los perfiles cromatográficos. El control fue considerado como el 100% de viabilidad celular, correspondiente al valor máximo de referencia.

A pesar de que los resultados estadísticos nos indiquen la falta de significancia, se puede observar en la **Figura 22A**, que la viabilidad celular es mayor en individuos pertenecientes a la especie *D. gigas* en todos los tratamientos, además de un aumento progresivo desde 1 hasta 8 µl. En el caso de individuos pertenecientes a *T. murphyi* se logra observar un pequeño aumento entre 1 µl y 4 µl del extracto, sin embargo, luego la abundancia celular se mantiene casi igual.

En el caso del **Figura 22B**, la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk indicó que los datos tienen una distribución normal ($W = 0,965$; $p = 0,417$), mientras que la prueba de Leven no muestra diferencias entre las varianzas de los grupos ($F = 0,608$; $p = 0,776$). Al aplicar el ANOVA bifactorial, se observó que no hay diferencias asociadas al hospedador de origen ($F = 1,153$; $p = 0,296$), tampoco afectó en el tratamiento aplicado ($F = 0,984$; $p = 0,439$), y tampoco hay significancia en la interacción entre la especie y el tratamiento ($F = 0,480$; $p = 0,750$).

Finalmente se realizó la prueba post hoc de Dunnett para el pico 2 para comparar los grupos con el tratamiento control (0 µl), lo que resultó que no hay diferencias significativas entre las cantidades de alérgenos aplicados en relación con el tratamiento control ($p > 0,05$), esto indica que el extracto alérgénico purificado con la columna TSKgel correspondiente al pico 2, no generó cambios significativos en la viabilidad celular que corresponde a la viabilidad celular de la línea celular HEK-293.

A diferencia de la descripción de la del pico 1, la **Figura 22B** correspondiente al pico 2 nos muestra que individuos pertenecientes a *T. murphyi* tiene una mayor viabilidad celular que individuos pertenecientes a *D. gigas* considerando que el extracto genera un menos efecto en las células, sin embargo, indica que a medida que aumenta la cantidad del alérgeno para a los 4 μ l y 8 μ l comienza a disminuir el número de células vivas en ambos hospedadores.

A pesar de que visualmente en el gráfico se observen diferencias en los valores de la viabilidad celular entre algunos de los tratamientos aplicados y en consideración de los hospedadores, las diferencias no fueron estadísticamente significativas según los Análisis inferenciales.

Línea Celular HEK-293 con alérgenos de la Columna CHT XT hidroxiapatita

En **Figura 23** sólo se obtuvo 1 pico de elusión. Estos resultados indicaron que los datos presentaron una distribución normal ($W= 0,931$; $p=0,052$) y que también había homogeneidad de varianzas entre los grupos ($F= 0,533$; $p= 0,833$).

A partir de la prueba estadística T Student (**Tabla 7**), quedó demostrado que hay diferencias significativas entre ambas especies (**p= 0,015***). En donde la viabilidad celular promedio fue mayor para la especie *D. gigas* en comparación con *T. murphyi*.

Tabla 7. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir del promedio de la viabilidad celular para todos los tratamientos en función de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la Columna CHT XT hidroxiapatita entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.

Comparación	t	gl	p-valor	$\bar{x}$ <i>D. gigas</i>	$\bar{x}$ <i>T. murphyi</i>
<i>D. gigas</i> vs <i>T. murphyi</i>	2.585	27.443	0.015	141.320	107.987

El análisis de la varianza bifactorial mostró que no hay diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($F= 1.173$; $p = 0.352$), mientras que, en el caso de la interacción entre la especie y el tratamiento, tampoco se observó significancia ($F = 1,665$; $p = 0.197$). En el caso de la comparación de los tratamientos por especie, podemos observar que no hay diferencias significativas, tal vez el valor vas cercano a generar esta diferenciación se encuentra en los 8 µl de alérgeno, sin embargo, no es suficiente para considerar la diferencia entre hospedadores. (**Tabla 8**).

Tabla 8. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir del promedio de la viabilidad celular para todos los tratamientos en función de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna CHT XT hidroxiapatita entre los tratamientos de la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.

Tratamiento (μL)	t	gl	p-valor
1	0.137	2.542	0.901
2	0.687	3.428	0.536
4	2.617	2.354	0.102
8	2.246	3.614	0.095

Finalmente, la prueba post hoc de Dunnett para comparar los grupos con el tratamiento control (0 μl), indicó que no hay diferencias significativas entre las cantidades de alérgenos aplicados en relación con el tratamiento control ($p > 0,05$), sin embargo, en las concentraciones 4 μl y 8 μl para individuos pertenecientes a la especie *D. gigas* se mostró una tendencia a aumentar a medida que se aplica una mayor cantidad del extracto.

A pesar de que no se hubo interacción entre especie y tratamiento en la **Figura 23**, se observó que individuos pertenecientes a *T. murphyi* muestran una tendencia descendente a medida que aumenta la concentración, obteniendo resultados opuestos ambas especies a medida que aumenta la cantidad del extracto, lo cual se podría tener un efecto en la actividad metabólica que será posteriormente evaluada en el ensayo XTT.

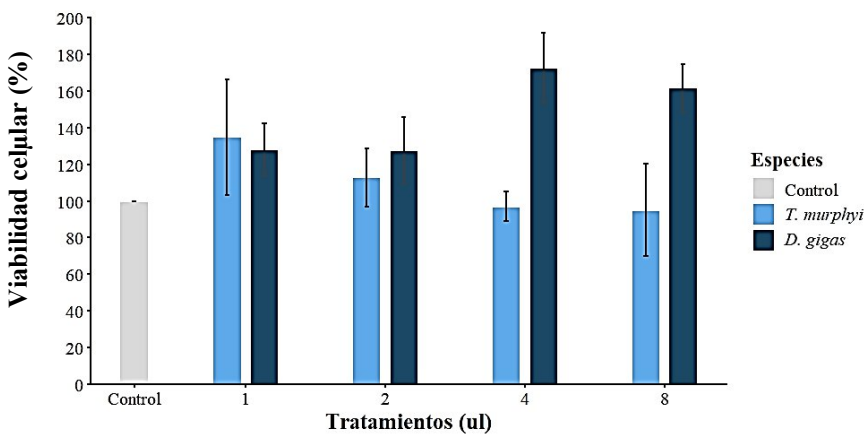


Figura 23. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo cristal violeta en células HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico *A. pegreffii* purificados con Columna CHT XT hidroxipatita. El control fue considerado como el 100% de viabilidad celular, correspondiente al valor máximo de referencia.

Línea Celular CCD 841 CoN con alérgenos de la Columna TSKgel

La prueba comparativa entre especies mediante T Student indicó que no hay diferencias significativas entre las especies (p = 0,524). En cuanto a la abundancia promedio fue similar entre ambos hospedadores (**Tabla 9**). En el caso de la comparación estadística entre los tratamientos por especie, no fue posible hacer por la falta de réplicas por tratamientos.

Tabla 9. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir del promedio de la viabilidad celular para todos los tratamientos de la línea celular CCD 841 CoN con alérgenos de la Columna TSKgel entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi*. *murphyi* la prueba de T Student.

Comparación	t	gl	p-valor	$\bar{x}$ <i>D. gigas</i>	$\bar{x}$ <i>T. murphyi</i>
<i>D. gigas</i> vs <i>T. murphyi</i>	0.685	4.935	0.524	124.275	114.198

La **Figura 24**, muestra viabilidad celular de esta línea celular expuestas a los alérgenos de individuos pertenecientes a *D. gigas* indican que fueron mayores en las concentraciones 1 µl y 2 µl, mientras que en el caso de los 4 µl y 8 µl tienden disminuir. Por otro lado, las células que fueron expuesta a extractos de individuos pertenecientes a *T. murphyi*, tuvieron porcentajes menores en todos los tratamientos y percibiendo un pequeño celular desde los 2 µl hasta 8 µl. En ambos casos el patrón fue diferentes a pesar del aumento inicial en individuos pertenecientes a *D. gigas*, sin embargo, en individuos pertenecientes a *T. murphyi* se observó una respuesta a la exposición del alérgeno más estable manteniéndose cerca de la viabilidad celular del control.

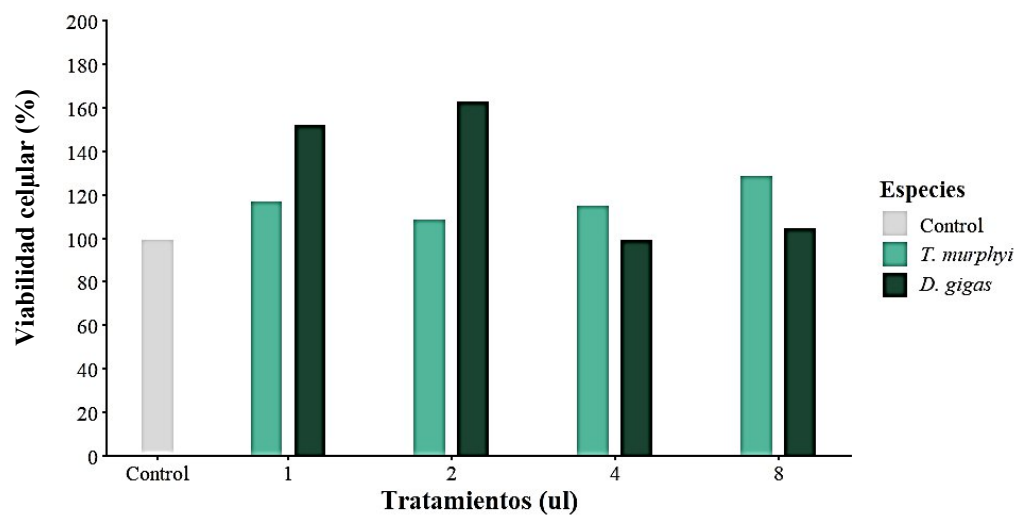


Figura 24. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo cristal violeta en células CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico *A. pegreffii* purificados con columna TSKgel. El control fue considerado como el 100% de viabilidad celular, correspondiente al valor máximo de referencia.

Línea Celular CCD 841 CoN con alérgenos de la Columna CHT XT hidroxiapatita

La prueba comparativa entre especies mediante T Student indicó que no hay diferencias significativas ($p = 0,246$), sin embargo, en cuanto al promedio de la viabilidad celular fue mayor en la especie *D. gigas* que *T. murphyi* (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir del promedio de los tratamientos en función de la viabilidad celular de la línea celular CCD 841 CoN con alérgenos de la Columna CHT XT hidroxiapatita entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.

Comparación	t	gl	p-valor	$\bar{x}$ <i>D. gigas</i>	$\bar{x}$ <i>T. murphyi</i>
<i>D. gigas</i> vs <i>T. murphyi</i>	1.234	9.763	0.246	96.501	81.832

Tabla 11. Análisis comparativo del ensayo cristal violeta a partir viabilidad celular de la línea celular CCD 841 CoN con alérgenos de la columna CHT XT hidroxiapatita entre los tratamientos (2 μ l y 4 μ l) de la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.

Tratamiento (μ L)	t	gl	p-valor
2	0.585	0.585	0.585
4	1.174	1.174	1.174

La **Tabla 11**, nos indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos 2 μ l y 4 μ l por especie obteniendo valores de significancia $p > 0,05$. En el caso de los tratamientos 1 μ l y 8 μ l no fue posible realizar comparaciones estadísticas debido a la ausencia de réplicas en los tratamientos.

La **Figura 25**, muestra que la viabilidad celular de esta línea celular expuestas a los alérgenos de individuos pertenecientes a *D. gigas*, indican que fueron mayores en las concentraciones 1 μ l y 2 μ l, mientras que en el caso de los 4 μ l y 8 μ l, hay una disminución de las células expuestas. Por otro lado, las células que fueron expuesta a extractos de individuos pertenecientes a *T. murphyi* presentaron una tendencia a disminuir a medida que se

incrementa un aumento en la cantidad del alérgeno. En ambos casos, el patrón fue similar a pesar del aumento inicial en individuos pertenecientes a *D. gigas*, sin embargo, en individuos pertenecientes a *T. murphyi* se mostraron un mayor efecto negativo en el crecimiento celular.

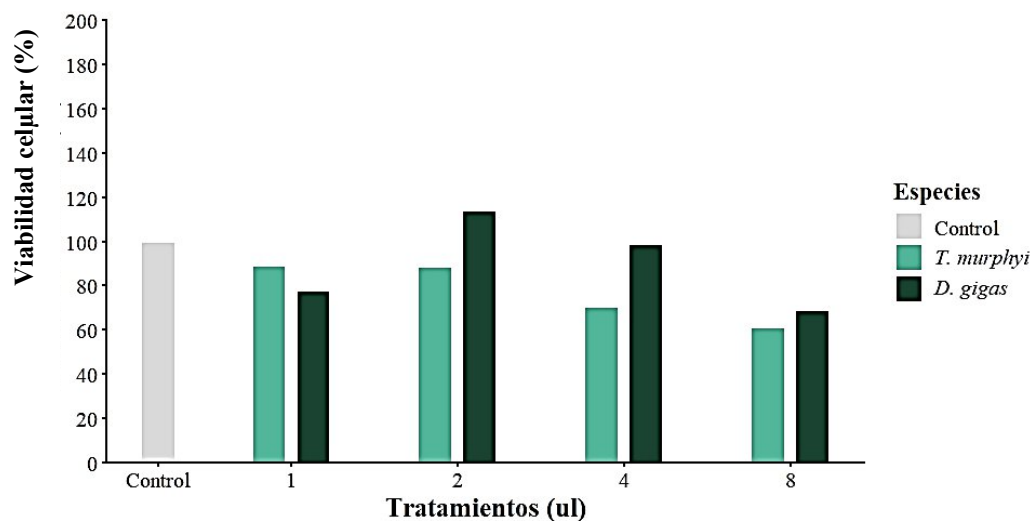


Figura 25. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo cristal violeta en células *CCD 841 CoN* expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico *A. pegreffii* purificados con columna CHT XT hidroxiapatita. El control fue considerado como el 100% de viabilidad celular, correspondiente al valor máximo de referencia.

Ensayo viabilidad celular y citotoxicidad: Método XTT

Línea Celular HEK-293 con alérgenos de la Columna TSKgel

En la **Figura 26A** correspondiente al pico 1, la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk indicó que no hay una distribución normal en todos los grupos ($W = 0,925$; $P = 0,037$), mientras que la prueba de Levene no mostró diferencias significativas entre grupos ($F = 0.586$; $p = 0.794$).

El análisis comparativo entre especies a través de T Student para el pico 1 indica que no se detectaron diferencias significativas ($p = 0,108$), sin embargo, en cuanto a la viabilidad celular *T. murphyi* presento un promedio más alto que *D. gigas* (**Tabla 12A**). En el caso del pico 2, los resultados fueron similares, en donde no se observaron diferencias entre especies ($p = 0,212$), mientras que el promedio de la viabilidad celular indicó que no hay diferencias en cuanto al factor especie, indicando valores muy similares. (**Tabla 12B**).

Tabla 12. Análisis comparativo del ensayo XTT a partir de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la Columna TSKgel en el A) pico 1 y B) pico 2 entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.

A)

Comparación	t	gl	p-valor	$\bar{x}$ <i>D. gigas</i>	$\bar{x}$ <i>T. murphyi</i>
<i>D. gigas</i> vs <i>T. murphyi</i>	-2.090	3.848	0.108	85.611	95.500

B)

Comparación	t	gl	p-valor	$\bar{x}$ <i>D. gigas</i>	$\bar{x}$ <i>T. murphyi</i>
<i>D. gigas</i> vs <i>T. murphyi</i>	1.278	27.942	0.212	93.222	89.133

El ANOVA bifactorial indicó que no hay diferencias en la interacción entre la especie y el tratamiento ($F = 0.559$; $p = 0.695$). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en los tratamientos aplicados ($F = 4.167$; $p = 0.013^*$), lo que indicaría que la cantidad de alérgeno si generaría cambios en la viabilidad celular.

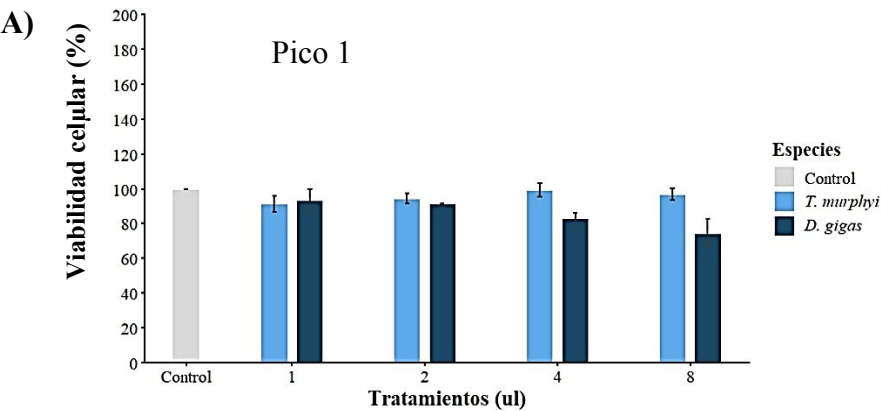
A partir de la comparación específica de los tratamientos por especie para cada pico se pudo observar que si hay diferencias significativas en el pico 1 **Tabla13A** en el tratamiento 4 μ l para ambas especies con un valor $p < 0,036^*$, esto quiere decir que el efecto de una de ellas puede estar generando más actividad metabólica, mientras

que **Tabla 13B** correspondiente al pico 2, no se evidencia significancia en este factor, en donde todos los tratamientos comparados tuvieron un $p > 0,05$.

Tabla 13. Análisis comparativo del ensayo XTT a partir de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna TSKgel en el A) pico 1 y B) pico 2 entre los tratamientos de la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.

A)				B)			
Tratamiento (μL)	t	gl	p-valor	Tratamiento (μL)	t	gl	p-valor
1	0.282	3.647	0.793	1	1.319	2.906	0.281
2	-1.098	2.007	0.387	2	2.504	2.479	0.105
4	-3.167	3.838	0.036	4	0.043	3.722	0.968
8	-2.473	2.648	0.101	8	0.780	2.598	0.500

En cuanto a la prueba post hoc de Dunnett, los resultados indicaron disminución significativa de la viabilidad celular en el tratamiento 4 μl ($p= 0,029^*$) en ambos hospedadores con respecto al control, mientras que en el caso de los otros tratamientos a pesar de mostrar cierta tendencia a disminuir no fue significativo. En general se pudo observar que hubo efecto de disminución en todos los tratamientos. En cuanto a la descripción de la **Figura 26A**, no muestra diferenciación en cuanto a los porcentajes de viabilidad celular entre ambas especies, los valores son bastantes similares, sólo a simple vista se logra observar que *T. murphyi* pareciera que comenzaría a disminuir a medida que sobrepasa los 4 μl y más aun en 8 μl, pero tampoco es un patrón tan marcado.



B)

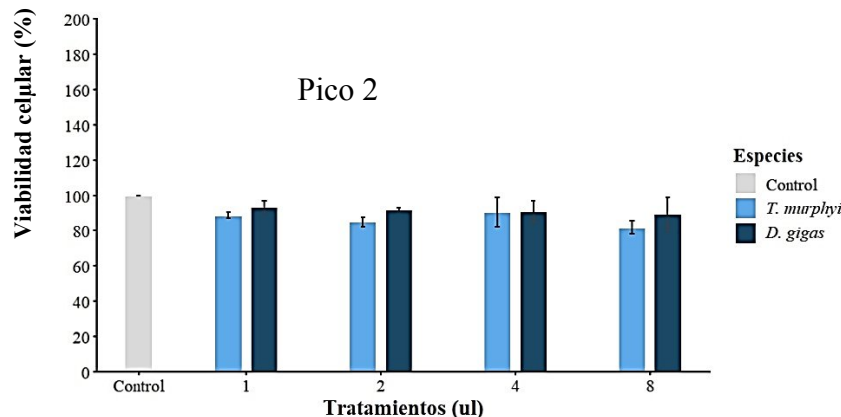


Figura 26. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo XTT en células HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico *A. pegreffii* purificados con columna TSKgel. Se obtuvieron 2 fracciones de purificación en los perfiles cromatográficos. El control fue considerado como el 100% de viabilidad celular, correspondiente al valor máximo de referencia.

En la **Figura 26 B** correspondiente al pico 2, la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk indicó que no hay una distribución normal en todos los grupos ($W = 0,922$; $P = 0,030$), mientras que la prueba de Levene no mostró diferencias significativas entre grupos ($F = 0.783$; $p = 0.635$). El análisis de ANOVA bifactorial indicó que no hay diferencias significativas entre especies ($F = 1.824$; $p = 0.192$), ni tampoco efecto el tratamiento aplicado ($F = 2.526$; $p = 0.073$). Finalmente, en la interacción entre ambos factores no se observó diferencias significativas ($F = 0.296$; $p = 0.877$). Al comparar los tratamientos con el control a través de la prueba de Dunnet, se observó que ninguna presentó diferencia significativa ($p > 0.05$).

Línea Celular HEK-293 con alérgenos de la Columna CHT XT hidroxiapatita

La **Figura 27**, nos indica que los resultados no presentaron una distribución normal ($W= 0,025$; $p= 0,037$), en cuanto a Levene hay homogeneidad de las varianzas ($F= 0,586$; $p= 0,794$)

La comparación entre *D. gigas* y *T. murphyi* a partir de la prueba estadística T Student, se observa que no hay diferencias en cuanto al factor especie ($p= 0,0,279$), mientras que, en el caso del promedio de la viabilidad celular, corroboran Los resultados obtenidos debido a que se obtuvieron valores similares entre especies (**Tabla 14**).

Tabla 14. Análisis comparativo del ensayo XTT a partir de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna CHT XT hidroxiapatita entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.

Comparación	t	gl	p- valor	$\bar{x}$ <i>D.</i> <i>gigas</i>	$\bar{x}$ <i>T.</i> <i>murphyi</i>
<i>D. gigas</i> vs <i>T.</i> <i>murphyi</i>	-1.104	26.906	0.279	69.395	78.108

El ANOVA bifactorial evidenció que hay diferencias significativas en el tratamiento aplicado ($F=4.167$; $p = 0.013^*$), pero no hubo diferencias significativas ni en la especie hospedadora ($F= 1.693$; $p = 0.208$), ni en evaluación de la interacción especie y tratamiento ($F = 0.559$; $p = 0.695$).

El análisis de comparación entre tratamientos por especie **Tabla 15**, indican que no hay diferencias en cuanto al efecto metabólica que generan ambas especies.

Tabla 15. Análisis comparativo del ensayo XTT a partir de la viabilidad celular de la línea celular HEK-293 con alérgenos de la columna CHT XT hidroxiapatita entre los tratamientos de la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.

Tratamiento (μL)	t	gl	p-valor
1	1.199	3.960	0.297
2	−0.734	2.906	0.517
4	−1.194	3.458	0.308
8	−0.953	3.243	0.406

Finalmente, en la prueba de Dunnet, se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular del tratamiento de 4 μl (**p= 0,029***), en comparación con el tratamiento control, a diferencia de los otros tratamientos aplicados.

En el caso de la visualización de los resultados en la **Figura 27**, se observa que hay un leve aumento en el porcentaje relativo en todos los tratamientos de individuos pertenecientes a la especie *T. murphyi* en comparación con individuos pertenecientes a *D. gigas*, sin embargo, todos los porcentajes son inferiores al tratamiento control.

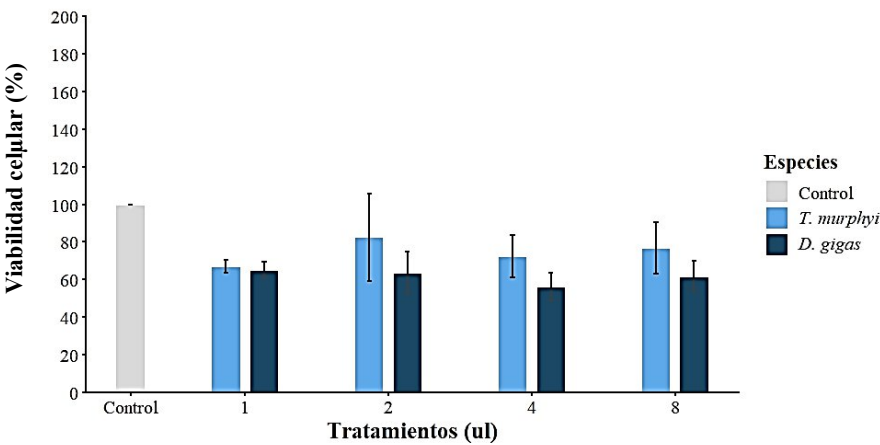


Figura 27. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo XTT en células HEK-293 expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 μl) con extracto proteico *A. pegreffii* purificados con columna CHT XT hidroxiapatita. El control fue considerado como el 100% de viabilidad celular, correspondiente al valor máximo de referencia.

Línea Celular CCD 841 CoN con alérgenos de la Columna CHT XT hidroxiapatita

En la **Figura 28**, se observa que la viabilidad celular en ambos hospedadores fue superior al control en todos los tratamientos aplicados y aún más diferencia por la especie *D.gigas* que eleva su abundancia en los primeros tratamientos 1 µl y 2 µl, mientras que el efecto celular en los tratamientos 4 µl y 8 µl, fue similar en ambas especies. No se observa una relación entre cantidad de alérgeno aplicada y la viabilidad celular.

La comparación entre especies a partir de la prueba T Student se observa que no hay diferencias significativas entre especies ($p = 0,447$), en donde además no se observan diferenciación en cuanto a los promedios de la viabilidad celular entre ambos hospedadores (**Tabla 16**). Sin embargo, estos análisis se limitaron sólo a factor especie, debido a la falta de observaciones entre tratamientos por especies.

Tabla 16. Análisis comparativo del ensayo XTT a partir de la viabilidad celular de la línea celular CCD 841 CoN con alérgenos de la Columna CHT XT hidroxiapatita entre la especie *D. gigas* y *T. murphyi* mediante la prueba de T Student.

Comparación	t	gl	p-valor	$\bar{x}$ <i>D. gigas</i>	$\bar{x}$ <i>T. murphyi</i>
<i>D. gigas</i> vs <i>T. murphyi</i>	-0.794	9.051	0.447	73.155	77.290

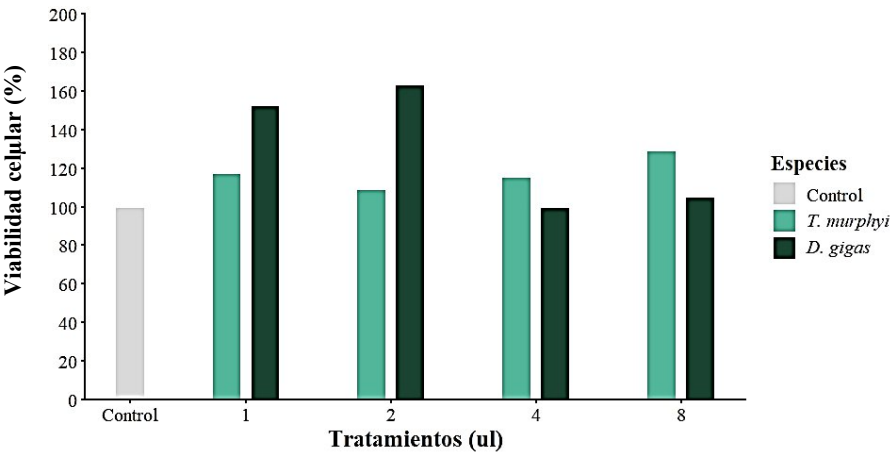


Figura 28. Porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el ensayo XTT en células CCD 841 CoN expuestas a cuatro tratamientos (0,1,2,4 y 8 µl) con extracto proteico *A. pegreffii* purificados con columna CHT XT

hidroxiapatita. El control fue considerado como el 100% de viabilidad celular, correspondiente al valor máximo de referencia.

En resumen, en el caso de las células HEK-293 hubo mayor sensibilidad y alteraciones en cuanto a la adhesión de las células en la placa, y además cambios morfológicos; mientras que las células CCD 841 CoN, fueron más resistentes al efecto generado por los tratamientos.

Por otro lado, con respecto a los extractos proteicos, se pudo observar que de acuerdo con la respuesta que provocaron en las células, se podría tratar de diferentes compuestos, por lo que son dependientes de la línea celular y también de las características que tendrían los alérgenos.

DISCUSIÓN

Identificación genética de *A. pegreffii*

La identificación molecular confirmó que todas las larvas analizadas correspondieron a *A. pegreffii*, al igual que estudios anteriores realizados en Chile (Lugo et al. 2024). Estos resultados aseguran la evidencia de la prevalencia de *A. pegreffii* como parásito predominante en hospedadores marinos de interés comercial de la zona, como fue mencionado por Rahmati et al. (2021) y Muñoz & Olmos (2008). La identificación molecular fue posible a partir del gen mitocondrial de la subunidad 2 del citocromo oxidasa (*COX2*), este marcador confirmó ser nuevamente una herramienta de identificación molecular precisa para el género *Anisakis*, en donde a pesar de tener las características morfológicas muy similares entre las especies, ha quedado demostrada su utilidad en la identificación específica de los parásitos provenientes de diferentes hospedadores, lo cual concuerda con otros autores (Lugo et al. 2024; Mattiucci et al., 2018).

Igualmente se observó una baja diversidad genética entre los individuos pertenecientes a *D. gigas* y *T. murphyi*. Estos resultados concuerdan con Mladineo & Poljak (2014) en su estudio filogenético en nemátodos en el mar Adriático en peces de interés comercial en donde identificaron una alta prevalencia de *A. pegreffii* y baja estructuración genética. Esto fue principalmente observado en los peces de origen pelágico, los cuales compartían gran cantidad de haplotipos. Ambos hospedadores *D. gigas* y *T. murphyi* son de origen pelágico y comparten áreas de distribución y recursos dentro la columna de agua (Rosa et al. 2013; Cubillos & Alarcón, 2010), lo que podría favorecer la transmisión de las larvas a través de las diferentes especies hospedadoras.

Sin embargo, a pesar de que la diversidad genética fue baja, individuos de *A. pegreffii* pertenecientes a la especie *D. gigas* presentaron haplotipos únicos asociados a cambios mutacionales, tal como observado por Lugo et al. (2024). Según Cole & Viney (2018) los cambios genéticos de los parásitos, principalmente nemátodos en diferentes especies, están asociados a las características biológicas y ecológicas del huésped, y también al comportamiento de dispersión y ciclo de vida del parásito, conllevando a diferencias genéticas por colonizar un nuevo hábitat (Audesirk et al, 2003).

Alérgenos de *A. pegreffii*

Alérgenos de *A. pegreffii* fueron obtenidos exitosamente a partir del método utilizado para su especie hermana *A. simplex*. A pesar de eso, se observaron dos picos de elusión purificado con TSKgel y un pico de elusión con la columna CHTXT, caso contrario para *A. simplex* (Kobayashi et al 2007) con sólo un pico de elusión, y en diferentes tiempos de retención. Nuestros resultados podrían indicar alérgenos propios de la especie, lo cual puede ser corroborado con lo mencionado por Arcos et al. (2014) quienes demostraron que *A. simplex* tiene más proteínas inmunorreactivas que *A. pegreffii*, señalando que existen diferencias entre especies asociado a su potencial alergénico y capacidad de estimular las respuestas del sistema inmune. Igualmente *A. pegreffii* es capaz de regular su expresión de proteínas alergénicas en función de la temperatura a diferencia de *A. simplex* que posee mecanismos adaptativos mediante la síntesis de moléculas involucradas en mecanismos de supervivencia (Lopienka et al., 2019; Palomba et al., 2019; Lopienka et al., 2015; Lugo et al., 2026). Estos antecedentes indican que existen diferencias antigénicas entre las especies.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) señalan que se han reportados 14 alérgenos asociados a *A. simplex*. Sin embargo, Quiazon et al. (2013) encontraron tres alérgenos de *A. simplex* reportados también en la especie *A. pegreffii* Ani s 1, Ani s 7 y Ani s 13 los cuales han sido identificados en pacientes sensibilizados por Inmunoglobulinas E.

En este estudio tuvimos como resultados una mayor cantidad de alérgeno en individuos pertenecientes a *D. gigas*. Esto puede deberse a condiciones dentro del hospedador, por ejemplo *D. gigas* suele encontrarse en aguas cálidas a diferencia de *T. murphyi*, especie que suele encontrarse en temperaturas unas frías inferiores a los 20° (Rosa et al, 2013; Cubillos & Alarcón, 2010), lo que posiblemente puede alterar el hábitat de *A. pegreffii*. Igualmente, puede deberse a condiciones de protección de las larvas de *A. pegreffii* a hospedadores. Estudios anteriores en expresión de genes de sobrevivencia conocidos como *trialosa*, sugieren que *T. murphyi* expresa la menor cantidad con respecto a otros peces (Lugo et al 2026). Esto sugiere que *A. pegreffii* tiene poca sobrevivencia en *T. murphyi*. Por tanto, es posible que la baja cantidad de alérgeno encontrada para individuos provenientes de *T. murphyi*, sea para contrarrestar las condiciones que presenta de su hospedador. No existen estudios para *D. gigas*.

Con respecto a la cantidad de alérgeno expresada, las diferencias asociadas al tipo de hospedador, puede ser contrastado con estudios anteriores como el de Silva et al. (2024), quienes encontraron que la expresión de alérgenos encontrados en *A. pegreffii* responden según el sistema inmune de cada hospedador. Este patrón fue observado principalmente en peces teniendo una relación coevolutiva entre ellos. No se realizaron análisis en *D.*

gigas. Nuestros resultados de igual manera mostraron diferencias asociadas a la producción de alérgenos en hospedadores diferentes.

A pesar de esto, estudios anteriores encontraron que los alérgenos son expresados sin importar la especie de hospedador o cambios de temperatura o acidez (Lugo et al., 2026), lo que indica su alta resiliencia a cambios ambientales. Esto puede ser debido a regiones moleculares conservadas específicas del sistema inmune de peces (Silva et al., 2024), corroborando una coevolución entre el parásito y su hospedador

Respuesta celular de alérgenos provenientes de *A. pegreffii*

En este estudio se observó cambios morfológicos de las células en la línea celular HEK-293 como consecuencia de la presencia del extracto de alérgeno extraído de individuos pertenecientes en dos hospedadores. Murphy & Weaver (2016), mencionan que las células que provienen de diferentes tejidos celulares presentan características fisiológicas y funcionales que determinan las respuestas de ellas frente a la exposición de algún patógeno externo, respondiendo a través de cambios morfológicos, mediadores de secreciones y cambios supervivencia celular. A partir de ello, los alérgenos generaron cambios morfológicos, viabilidad celular y actividad metabólica en la línea celular HEK-293. Las células que provienen de epitelio intestinal humano (CCD 841 CoN) tienen una barrera de defensa frente a agentes externos, además de poseer mecanismo especializados de respuesta para reconocer y responder a las moléculas que son dañinas como por ejemplo las inmunoglobulinas E (Choi et al. 2017; Elewaut et al. 1999). A diferencia de las células de riñón (HEK-293), las cuales han sido utilizadas en la observación de respuestas celulares tienen la facilidad de responder frente al contacto con un compuesto alergénico (Auslander et al. 2014).

Messina et al. (2016), observaron que alérgenos de *A. pegreffii* pueden modificar la viabilidad celular de HS-68 (similares a HEK-293) mediante la inducción de estrés oxidativo y aumento de las moléculas ROS las cuales contienen oxígeno y reaccionan fácilmente ante la presencia de un alérgeno, y también la capacidad de activar las vías inflamatorias y apoptóticas, proceso de muerte celular programada para eliminar células dañadas. Por tanto, es posible que la línea celular HEK-293 sea sensible a la respuesta de los alergénicos. Por el contrario, Speciale et al. (2017) observaron que alérgenos de *Anisakis* en células CCD 841 CoN son capaces de activar procesos inflamatorios, provocando alteraciones de las vías apoptóticas y también de crecimiento celular, pero sin muerte celular. Estas diferencias observadas anteriormente concuerdan con nuestros resultados en donde hubo mayor proliferación celular de CCD 841 CoN ante la aplicación de los alérgenos y exposición, sugiriendo una mayor capacidad para poder mantener o aumentar su viabilidad ante la exposición. Caso contrario de las células HEK-

293. Finalmente, nuestros resultados demuestran que los picos de alérgenos de *A. pegreffii*, aunque no ocasionen muerte celular, son capaces de alterar, provocar estrés y generar inflamación en las células.

Esto concuerda con lo mencionado por Pardo (2016), quien señala que la activación de los componentes antígenos liberados por *Anisakis* son independientes si el parásito se encuentra vivo o muerto, en donde ha sido demostrado que estos alérgenos son capaces de interactuar con el tejido humano solo al entrar en contacto superficial. Esto se vio demostrado en este estudio en la aplicación de los alérgenos en las líneas celulares humanas, en donde se pudo obtener el extracto alérgénico puro sin la presencia directa de la larva.

CONCLUSIONES

- *A. pegreffii*, fue la única especie encontrada en ambos hospedadores con una baja diversidad genética y con haplotipos compartidos.
- A partir de las modificaciones que se realizaron al protocolo establecido para la especie hermana *A. simplex*, se elaboró una metodología de extracción y purificación de proteínas mediante HPLC para *A. pegreffii*. Sin embargo, los perfiles cromatográficos fueron diferentes a los reportados en la especie *A. simplex*, por lo que se podría tratar de alérgenos únicos de la especie *A. pegreffii*.
- Se observaron variaciones en la cantidad del alérgeno entre hospedadores, esto podría ser asociado a los factores ecológicos y ambientales, que favorecen la sobrevivencia de los parásitos.
- Los ensayos de citotoxicidad mostraron diferencias en la capacidad de responder de ambas líneas celulares, en donde las células de colon tuvieron mayor resistencia para mantener su viabilidad frente a la aplicación de los extractos; y en caso contrario las células de riñón disminuyeron su viabilidad celular. Esto señala que los alérgenos provocan un efecto diferente dependiendo del tipo de células.
- Se observan tendencias asociadas en tipo de hospedador de origen, a la línea celular, al método de purificación y finalmente a la cantidad del extracto aplicada. Esto fue observado principalmente en los alérgenos de individuos provenientes de *D. gigas*.
- Estos resultados evidencian como influyen las características asociadas al hospedador en la producción de alérgenos del parásito y además en su efecto en los seres humanos. Este estudio entrega las primeras evidencias del efecto de los alérgenos, aportando como investigación pionera relacionada a la anisakiasis y las reacciones alérgicas provocadas por *A. pegreffii*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Audicana, M. T., & Kennedy, M. W. (2008).** *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical microbiology reviews*, 21(2).
- **Audesirk, T., Audesirk, G., Byers, B. E., Escalona García, H. J., Escalona García, R. L. (2003).** *Biología: la vida en la tierra*. Puerto Rico: Pearson Educación.
- **Ausländer D. Eggerschwiler, Kemmer C., Geering B., Ausländer S. & Fussenegger M. (2014).** A designer cell-based histamine – specific human allergy prolifer. *Nature Communications*.
- **Bao, M., Pierce, G. J., Pascual, S., González-Muñoz, M., Mattiucci, S., Mladineo, I & Strachan, N. J. (2017).** Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: anisakiasis. *Scientific reports*, 7(1).
- **Berland, B. (1961).** Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*, 2 (1), 1–50.
- **Buchmann K & F Mehrdana. (2016).** Effects of anisakid nematodes *Anisakis simplex* (s.l.), *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) and *Contracaecum osculatum* (s.l.) on fish and consumer health. *Food and Waterborne Parasitology*, 4, 13-22.
- **Bush A., Fernández J., Esch G. & Seed J. (2001)** *Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge University Press.
- **Burton, D. R. (1990).** Antibody: The flexible adaptor molecule. *Trends in biochemical sciences*, 15(2).
- **Castellano-Garzón J., Falla L., Salazar L. & Pustovrh M. (2020).** Anisakidos y anisakidosis: generalidades y su actualidad en Colombia. *Revisión bibliográfica*, 33, 2.
- **Choi S., Lee J., Kim M., Young G. (2009)** The clinical characteristics of *Anisakis* Allergy in Korea. *PubMed*, 24.
- **Choi W., Yeruva S., Turner J. (2017)** Contributions of intestinal epithelial barriers to health and disease. *Experimental Cell Research*.
- **Cole R. & Viney M. (2018)** The population genetics of parasitic nematodes of wild animals. *Parasites Vectors* , 11, 590.
- **Cubillos L & Alarcon C. (2010)** Estimacion de la talla media de madurez sexual en *Trachurus murphyi* mediante parámetros del consumo relativo de oxígeno. *Lat. Am. J. Aquat Res*, 38, 2.
- **Elewaut D., DiDonato J., Mogg J., Truoin F., Eckmann L. & Kagnoff M. (1999)** NF-kb Is a central Regulator of the Intestinal Epithelial Cell Innate Immune Response Induced by Infection with Enteroinvasive Bacteria. *J. Immunology*. 163, 1457-1466.

- **Esposito V., Lucariello A., Savarese L., Cinelli M., Ferraraccio F., Bianco A., De Luca A. & Mazzarella G. (2012)** Morphology changes in human lung epithelial cells after exposure to diésel exhaust micro sub particles (PM 1.0) and pollen allergens. Elsevier, 171, 162-167.
- **Fernandez I., Suarez P., Madrid V., Valenzuela A., Opazo A., Campos V. (2022)** Anisakidosis en peces frescos comercializados en tres ciudades de la Región del Bío Bío, Chile. Scielo.Revista Chilena de infectología, 39.
- **Fiorenza E., Wendt C., Dobkowski K., King T., Pappaionou M., Rabinowitz P., Samhour J.& Wood C. (2020)** It wormy world: Meta - analysis reveals several decades of change in the global abundance of the parasitic nematodes *Anisakis* spp. and *Pseudoterranova* spp. in marine fishes and invertebrates.Pubmed, 26.
- **Grabda, J. (1976).** Studies on the life cycle and morphogenesis of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) (Nematoda: Anisakidae) cultured in vitro. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 6(1), 119-141.
- **George-Nascimento M & Llanos A. (1995)** Micro - evolutionary implications of allozymic and morphometric variations in sealworms *Pseudoterranova* sp. (Ascaridoidea: Anisakidae) among sympatric hosts from the Southeastern Pacific Ocean. International Journal for Parasitology. 25, 1163-1171.
- **Gomez B., Lasa E., Arroabarren E., Garrido S., Anda M.& Tabar A.**(Alergia a *Anisakis simplex*. Scielo. España, 26.
- **Guerra M. (2015)** Diagnóstico de la alergia en atención primaria, ¿para qué? Scielo. Madrid, 17
- **Kanarek G. & Rolbiecki L. (2006)** Third- stage larvae of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) in the Great Cormorant *Phalacrocorax carbo sinensis* (Blumenbach, 1978) from the Vistula Lagoon, Poland. Oceanological and Hydrobiological studies.35,1.
- **Kobayashi, A., Kumada, M., & Ishizaki, T. (1972).** Evaluation of somatic and “ES antigens causing immunological injury of mast cells in mice infected with *Anisakis* larvae. Japanese Journal of Medical Science and Biology, 25 (5), 335-344.
- **Kobayashi Y., Shimakura K., Ishizaki S., Nagashima Y. & Shiomi K (2007)** Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. Elsevier. Molecular & Biochemical Parasitology, 155,138-145.
- **López-Verdejo A., Born-Torrijos A., Montero-Cortijo E., Raga J.,Valmaseda M., Montero F.(2022).**Infection process, viability and establishment of *Anisakis simplex*.s1.L3 in farmed fish; A histopathological study in gilthead seabream. Veterinary Parasitol, 311
- **Lopienska-Biernat.,Stryinski R., Dmitryjuk M. & Wasilewska B.(2019) (T)** Infective larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda) accumulate trehalose and glycogen in response to starvation and temperature stress. Biology Open.

- **Lopienska-Biernat.,Zaobidna E., Dmitryjuk M.(2015)** Expression of Genes Encoding the Enzymes for Glycogen and Trehalose Metabolism in L3 and L4 Larvae of *Anisakis simplex*.Journal of Parasitology Research.
- **Lugo L. (2024).** Caracterización taxonómica, genética y de patogeneidad de *Anisakis* presentes en Chile [Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias mención Biodiversidad y Biorecursos]. Universidad Católica de la Santísima Concepción.
- **Lugo L., Hepp M., Gamboa M. (2026)** Assessing viability and genetic expression of Trehalose associated genes in *Anisakis pegreffii* (Nematoda) in Response to thermal stress and acidity food preservation. Journal of food Microbiology. Vol 453.111730.
- **Lugo L.,Vera I.,George.Nascimento M., Brante A., Gamboa M. (2024)** Morfometría y diagnóstico molecular de larvas de *Anisakis* (Nematoda: Ascaridida) en *Merluccius gayi* (Chordata:Gadiformes) y *Dosidicus gigas* (Mollusca: Teuthida) en la región del Biobío, Chile. Revista de biología marina y oceanografía, 59.
- **Leigh J. & Bryant D. (2015)** Popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution.Vol.6, 1110-1116.
- **Mattiucci, S., Cipriani, P., Levsen, A., Paoletti, M., Nascetti, G. (2018).** Molecular epidemiology of *Anisakis* and anisakiasis: An ecological and evolutionary road map. Advances in Parasitology, 99.
- **Mattiucci, S. & D’Amelio, S. In Helminth (2014)** Infections and their Impact on Global Public Health (ed. Bruschi, F.) Springer Vienna, 325–365.
- **Mattiucci S., Paoletti M., Colantoni A.,Carbone A., Gaeta R., Frattaroli S., Fazii P.,Bruschi F. Nascetti G. (2017)** Invasive anisakiasis by parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda:Anisakidae):diagnosis by real-time PCR hydrolysis probe system and immunoblotting assay. Pubmed.
- **Martinez E., Loaiza L., Bastidas G. (2009)** Anisakidosis. Scielo. Comunidad y Salud. Maracay, .7.
- **Martinez-Rojas R., Mondragon-Martinez A., Rojas de los Santos E., Cruz-Neyra L., Garcia-Candela E., Delgado-Escalante A. & Sanchez-Venegas R (2021)** Molecular identification and epidemiological data of *Anisakis spp.*(Nematoda:Anisakidae) larvae from Southeastern Pacific Ocean off Perú.Parasites and Wildlife. 16.138-144.
- **Marino F., Lanteri G., Passantino A., Stefano C.,Costa A., Gaglio G., Macri F.(2013).**Experimental susceptibility of gilthead sea bream. *Sparus aurata*, via challenge with *Anisakis pegreffii* larvae.PubMed.
- **Messina C., Lanteri G., Pizzo F., Santulli A., Buselic I., Mate B., Stjepan O. & Mladineo I. (2016).***Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) products modulate oxidative stress and apoptosis-related biomarkers in human cell lines. Parasites & Vectors. 9,607.
- **Mladineo I.& Poljak V.(2014).**Ecology and genetic structure of zoonotic *Anisakis spp.* From Adriatic Commercial Fish Species. Applied and environmental microbiology,80.

- **Moreira V. López San Román A (2010)** Información al Paciente. Scielo.Revista Española de enfermedades digestivas.Madrid, 102.
- **Muñoz G. & Olmos V. (2008)** Revisión bibliográfica de especies endoparásitos hospedadoras de sistemas acuáticos de Chile.Scielo.Revista de Biología Marina y Oceanografía, 43.
- **Murphy K. & Weaver C. (2016)** Inmunología Médica. Elsevier. España. 9ª edición
- **Nadolna-Allyn K., Podolska M., Pawlak J. & Szostakowska B. (2022)** Distribution of anisakid nematodes in the muscle tissue of cod (*Gadus morhua*) from the Norwegian Sea.Elsevier. Oceanology, 64.
- **Nadler S. & Pérez-Ponce G. (2011)** Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. Parasitology.138.
- **Palomba, M., Paoletti, M., Colantoni, A., Rughetti, A., Nascetti, G., & Mattiucci, S.(2019).** Gene expression profiles of antigenic proteins of third stage larvae of the zoonotic nematode *Anisakis pegreffii* in response to temperature conditions. Parasite, 26.
- **Pardo (2016)** El Anisakis y sus enfermedades como enfermedad profesional. Scielo.Comunidad y Salud.Madrid, 62.
- **Pardo-Gandarillas M., Lohrmann K.,Valdivia A.&Ibañez C. (2009)**First record of parasites of *Dosidicus gigas* (d'Orbigny,1835) (Cephalopoda:Ommastrephidae from the Humbolt Current system off Chile.Revista de Biología Marina y Oceanografía.44(2).397-408.
- **Rahmati, A. R., Kiani, B., Afshari, A., Moghaddas, E., Williams, M., & Shamsi, S. (2020).** World-wide prevalence of *Anisakis* larvae in fish and its relationship to human allergic anisakiasis: a systematic review. Parasitology Research, 119.
- **Reyes D., Jiménez M. & Salinas E (2020)** Fisiopatología de la alergia alimentaria. Scielo,67.
- **Roberts, L. S., Janovy, J., Nadler, S., & Roberts, L. S. (2013).** Foundations of parasitology (9. a ed.). McGraw Hill.
- **Rozas J., Ferrer-Mata A., Sanchez Juan Carlos & Guirao-Rico S. (2017).** DnaSP 6: DNA Sequence polymorphism Analysis of large data sets. Molecular biology and Evolution. Vol.34.12.
- **Rosa R., Yamashiro C., Marjaida U. Rodhouse P. (2013)** *Dosidicus gigas*, Humbolt squid. Advances in Squid Biology, Ecology and Fisheries. 169-206.
- **Speciale A., Trombetta D, Saija A. Panebianco A.,Giarratana F.,Ziino G.,Minciullo P.,Cimino F.& Gamgemi S. (2017)** Exposure to *Anisakis* extracts can induce inflammation on in vitro cultured human colonic cells. Resp. Parasitologia,116,2471-2477.
- **Silva, D. (2024).** Análisis evolutivo de la región molecular de los alérgenos de *Anisakis pegreffii* en especies hospedadoras [Tesis presentada para obtener el Título de Biólogo Marino]. Universidad Católica de la Santísima Concepción.

- **Shamsi S. & Basrton D. (2023)** A critical review of anisakidosis cases occurring globally. *Parasitol. Research*, 122.
- **Shimakura K., Miura H., Ikeda K., Ishizaki S., Nagashima Y., Shirai T. & Shiomi K. (2004)** Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Molecular Biochemical Parasitology*. 135, 69-75.
- **Torres P., Jercic M., Weitz J., Dobrew E., Mercado R. (2007)** Human pseudoterranovosis, an emerging infection in Chile. *J Parasitol.* 93, 440-443.
- **Torres-Frenzel P. & Torres P. (2014)** Anisakid parasites in comercial hake ceviche in Southern Chile. *Journal of food protection*. 77, 1237-1240.
- **Ubeira F. (2015).** Aspectos básicos que deberíamos saber sobre *Anisakis*. ResearchGate.
- **Quiazon K., Zenke K. Yoshinaga T (2013)** Molecular characterization and comparison of four *Anisakis* allergens between *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* from Japan. Elsevier. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 190.
- **Von-Mühlenbrock C., Jimenez A., Heinrichsen K., Pérez X. & Gil L. (2021)** Anisakidosis diagnosticada tras la expulsión de vermes en deposiciones: forma poco frecuente en diagnóstico en humanos. *Revista chilena de infectología*. 38, 5.
- **Wan Hamid W., Ahmad H. & Omaina N. (2023)** A review of *Anisakis spp.* and its various allergens profiling and characterisation. *University Malaysia Terengganu Journal of Undergraduate research*, 5, 65-77
- **Wang J. Zhou Y., Zhang H., Hu L., Liu J., Wang L., Wang T., Zhang H., Cong L. & Wang Q. (2023)** Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. *Natura. Review*, 8, 38.