



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

Título de tesis:

**EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE *PICHIA PASTORIS*
EXPRESANDO PROTEÍNA QUIMÉRICA IPATH® Y CATEPSINA
COMO PROTOTIPO DE VACUNA ORAL EN SALMÓN DEL
ATLÁNTICO (*SALMO SALAR*) PARA EL CONTROL DE LA
CALIGIDOSIS**

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

Alumna: Javiera Constanza Briones Parra

Profesora Guía: Dra. Valentina Valenzuela Muñoz

Octubre 2025
Concepción, Chile

Dedicatoria

A la fuerza de voluntad que me impulso a llegar hasta aquí, y a la curiosidad que me motiva a seguir aprendiendo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi tutora, la profesora Dra. Valentina Valenzuela-Muñoz, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este experimento, por su guía experta y su constante apoyo a lo largo de todo el proceso de investigación. Su confianza en mis capacidades, así como su paciencia y dedicación, fueron fundamentales para la realización de esta tesis. Extiendo también mi gratitud al Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, por facilitar los recursos y el respaldo necesario para llevar a cabo esta investigación, tanto su infraestructura, como el enriquecedor ambiente académico, fueron clave para mi desarrollo profesional y personal. Agradezco especialmente al profesor Dr. Cristian Gallardo-Escárte, por su valioso apoyo en la toma de decisiones fundamentales del experimento. A Yeni Leal y Camila Barriga, por su constante acompañamiento en el laboratorio, enseñándome cada uno de los procedimientos esenciales para alcanzar resultados significativos. Mi sincero agradecimiento también a los compañeros y miembros de esta institución, Marcelo Muñoz, Constanza Sáez, Alberto Sandoval, Antonio Casuso, al profesor Diego Valenzuela y a Claudia Fuentealba, por su disposición para ayudarme, aclarar dudas y compartir sus conocimientos. Su amabilidad, carisma y espíritu de compañerismo hicieron del laboratorio un entorno grato y enriquecedor, algo que, sin duda, valoro profundamente.

Asimismo, extiendo mi agradecimiento a todo el equipo del laboratorio INCAR de la Estación de Biología Marina de Dichato, especialmente a Rosa Obando y Lucía Soto por su valiosa guía y enseñanzas en el manejo técnico de acuarios y estanques, aspecto clave para el desarrollo exitoso de esta investigación. Agradezco también a Álvaro Gallardo por su constante disposición para orientarme en el funcionamiento del laboratorio. Del mismo modo, quiero reconocer la contribución de los peces que formaron parte de este estudio cuya participación fue clave para el desarrollo del experimento. Su bienestar fue resguardado bajo principios éticos, valorando su rol en el avance científico. Finalmente, dedico un agradecimiento muy especial a mis padres, mis tías, abuelo y mi hermano, por su amor, apoyo incondicional y constante inspiración. A mis amigos, gracias por su compañía, ánimo y por compartir conmigo cada etapa de este camino.

Tabla de contenido

Dedicatoria.....	2
INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Salmonicultura Chilena	12
1.2. Caligidosis	13
1.3. Interacción Caligus-salmón	16
1.4. Tratamientos para el control de la Caligidosis	19
1.5. Vacunas contra Caligus	22
1.6. Levadura <i>Pichia pastoris</i> y su uso en biotecnología	26
HIPÓTESIS	28
La administración vía oral de <i>Pichia pastoris</i> recombinante que expresa la proteína quimérica IPath y catepsina en <i>Salmo salar</i> incrementa la respuesta inmune en el pez durante una infestación con <i>Caligus rogercresseyi</i>	28
OBJETIVOS	28
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1. Formulación de la vacuna.....	29
2.2. Diseño experimental	31
2.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA en tejidos de piel y riñón anterior de <i>Salmo salar</i> y Caligus de los peces vacunados.....	33

2.4. Análisis de expresión mediante RT-qPCR de <i>Salmo salar</i> y <i>Caligus</i>	33
2.5. Análisis de datos	34
RESULTADOS	35
3.1 Formular y evaluar la eficacia de una vacuna oral con IPath y catepsina expresadas en <i>P. pastoris</i> en el control de <i>Caligus</i> en salmón de Atlántico (<i>Salmo salar</i>).	35
3.2. Evaluación de genes de respuesta inmune y transporte de hierro en <i>S. salar</i> inmunizados con vacuna oral con <i>P. pastoris</i> expresando IPath y catepsina infestados con <i>C. rogercresseyi</i>	39
3.3. Evaluación de genes de estrés oxidativo en <i>C. rogercresseyi</i> extraídos de <i>S. salar</i> inmunizados con vacuna oral <i>P. pastoris</i> recombinante que expresa proteína IPath y catepsina.	45
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	55
PROYECCIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57
Anexos	63
Anexo 1.....	63
Extracción de ARN.....	63
Anexo 2.....	64
Síntesis de cDNA.....	64
Anexo 3.....	65
qPCR SYBR Green.....	65

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Vista ventral de un adulto macho de *Caligus rogercresseyi* (longitud: 4,8 mm) (2°A: segunda antena, CO: cono oral, MX: maxilípido). (B) Vista lateral de una hembra del calígido sobre el pez (González & Carvajal, 2003)..... 13
- Figura 2.** Estados de desarrollo n1: primer nauplius, n2: segundo nauplius, cop: copepodito, ch1: chalimus 1, ch2: chalimus 2, ch3: chalimus 3, ch4: chalimus 4, MA: macho adulto joven, HA: hembra adulta joven, HO: hembra ovígera, M: macho adulto. MX: maxilípido (González & Carvajal, 2003)..... 15
- Figura 3.** Modelo esquemático de las interacciones entre el salmón y el piojo de mar. Mecanismo inmunitario innato y adaptativo del huésped y modulación de la homeostasis del hierro en respuesta a la infestación por piojos de mar (Gallardo-Escarate et al., 2019). 18
- Figura 4.** Diseño experimental de infestación con *Caligus rogercresseyi* y vacunación oral en grupos experimentales de *Pichia pastoris* recombinante, expresando IPath y catepsina, junto con grupos control, en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). 32
- Figura 5.** Análisis mediante SDS-PAGE de *P. pastoris* activada recombinante expresando proteína catepsina (A) y ferritina (IPath) (B). Pocillo 1A: marcador de peso molecular (kDa); Pocillo 2A: control de proteína purificada de catepsina; Pocillo 3 y 4A: sobrenadante y pellet de *P. pastoris* sin inducir; Pocillo 5 y 6A: sobrenadante y pellet de catepsina. Pocillo 1B: marcador de peso molecular (kDa); Pocillo 2B: control de proteína purificada de ferritina; Pocillo 3 y 4B: sobrenadante y pellet de *P. pastoris* sin inducir; Pocillo 5 y 6B: sobrenadante y pellet de IPath. 35
- Figura 6.** Índice de condición de Fulton (K) en salmón del Atlántico (*S. salar*). El eje X muestra los diferentes grupos experimentales (Ctrl, *Pp*_Ctrl, *Pp*_IPath, *Pp*_Cath, *Pp*_IP+Cath), mientras que el eje Y representa los valores del índice de Fulton por pez en cada grupo..... 36
- Figura 7.** Conteo de Caligus por pez evaluado por grupo experimental luego de dos días de la inmunización. A) Conteo total de Caligus hembras + machos; B) Caligus hembras; C) Caligus Machos. La barras verticales indican la media aritmética y los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0,01$) mientras que “n” indica ausencia de significancia..... 38

Figura 8. Niveles de expresión relativa ARNm para Ferritina M, IL-1 β , COX-2 e IgT en piel de *S. salar*, después de una infestación con *C. rogercresseyi* y posterior vacunación simultánea con *P. pastoris* viva recombinante expresando IPath (*Pp_IPath*), catepsina (*Pp_Cath*) y un grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) junto con dos grupos controles; Ctrl (alimento sin antígeno) y *Pp_Ctrl* (alimento solo con levadura). El nivel de expresión se normalizó por el control endógeno del factor de elongación β -actina. Las barras verticales representan la media aritmética, (*) representa diferencias con $p < 0,05$ y (ns) representa no significativo, diferencias con $p > 0,05$; ANOVA 2 vías; Tukey-HSD..... 40

Figura 9. Niveles de expresión relativa ARNm para Ferritina M, IL-1 β , COX-2 e IgT en riñón anterior de *S. salar*, después de una infestación con *C. rogercresseyi* y posterior vacunación simultánea con *P. pastoris* viva recombinante expresando IPath (*Pp_IPath*), catepsina (*Pp_Cath*) y un grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) junto con dos grupos controles; Ctrl (alimento sin antígeno) y *Pp_Ctrl* (alimento solo con levadura). El nivel de expresión se normalizó por el control endógeno del factor de elongación β -actina. Las barras verticales representan la media aritmética, (*) representa diferencias con $p < 0,05$ y (ns) representa no significativo, diferencias con $p > 0,05$; ANOVA 2 vías; Tukey-HSD..... 42

Figura 10. Análisis de componentes principales (PCA) para cuatro genes relacionados con la respuesta inmune (IL-1b, COX-2, IgT) y transporte de hierro, (Ferritina M), expresados en piel (A) y en riñón anterior (B) en peces (*S. salar*) vacunados vía oral con *P. pastoris* viva recombinante expresando IPath y catepsina (*Pp_IPath*, *Pp_Cath*) y un grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) junto a dos grupos control (Ctrl, *Pp_Ctrl*). Los valores de expresión relativa se utilizaron como variable dependiente, mientras que la variable independiente correspondió a los diferentes tiempos. 44

Figura 11. Niveles de expresión relativa ARNm en 31 dpi (A, B y C) y 61 dpi (D, E y F) para ferritina, catalasa y SOD en *C. rogercresseyi* de peces (*S. salar*) inmunizados con *P. pastoris* viva recombinante expresando IPath (*Pp_IPath*), catepsina (*Pp_Cath*) y un grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) junto con dos grupos control: Ctrl (Alimento sin antígeno) y *Pp_Ctrl* (alimento solo con levadura). El nivel de expresión se normalizó por el control endógeno del factor de elongación (β -actina). Las barras verticales representan la media aritmética y los asteriscos indican diferencias significativas y “ns” indican no significativo de expresión de un gen entre cada condición ($p < 0,05$) (Anova-2 vías). 46

Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) para tres genes relacionados con el estrés oxidativo (Ferritina, catalasa y SOD) expresados en *C. rogercresseyi* de peces (*S. salar*) vacunados vía oral con *P. pastoris* viva recombinante expresando IPath y catepsina (*Pp_IPath*, *Pp_Cath*) y un grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) junto a dos grupos control (*Ctrl*, *Pp_Ctrl*). Realizado en dos tiempos de muestreo 31 dpi (A) y 61 dpi (B). Los valores de expresión relativa se utilizaron como variable dependiente, mientras que la variable independiente correspondió a los diferentes tiempos.47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Información de fármacos disponibles para el control de Caligus en Chile y reportes de baja sensibilidad (Subpesca, 2017)	21
Tabla 2: Listado de los partidores usados para el análisis RT-qPCR (Valenzuela-Muñoz et al., 2021; Vera-Bizama et al., 2015)	34

RESUMEN

Chile es el segundo mayor productor mundial de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), contribuyendo al crecimiento económico del sur del país. No obstante, la salmonicultura enfrenta múltiples desafíos que afectan la salud y productividad de los peces, entre ellos la Caligidosis, una enfermedad causada por *Caligus rogercresseyi*, comúnmente llamado “piojo de mar”. Esta infestación deteriora la salud del pez, causando lesiones en la piel, alteraciones enzimáticas y debilitamiento del sistema inmunológico, lo que favorece la entrada de otros patógenos y genera considerables pérdidas económicas. Actualmente, el control del parásito se basa principalmente en tratamientos farmacológicos cuyo uso excesivo ha generado resistencia, lo que resalta la necesidad de desarrollar nuevas alternativas no farmacológicas. En este contexto, nuestro equipo de investigación del LBGA-INCAR ha evaluado antígenos como catepsina e IPath, en vacunas inyectables experimentales, logrando reducir entre un 57% y un 97% la carga parasitaria en estadios adultos, respectivamente. Si bien han demostrado eficacia, su aplicación en acuicultura enfrenta limitaciones asociadas al estrés por manipulación individual, dificultad de vacunar peces de gran tamaño y problemas de escalabilidad de proteínas recombinantes. Es por esto, que el objetivo de este estudio fue evaluar el uso de una formulación oral de los antígenos (IPath y catepsina) expresados en la levadura *P. pastoris* (*Pp*) en salmón del Atlántico frente a una infestación con piojos de mar. Se establecieron tres grupos experimentales con los antígenos IPath (*Pp*_IPath), catepsina (*Pp*_Cath) y una combinación (*Pp*_IP+Cath), junto a dos controles, alimento normal (Ctrl) y levadura no recombinante (*Pp*_Ctrl). Los peces fueron desafiados con 35 copépodos por individuo, iniciando el tratamiento al día siguiente. Los resultados mostraron una menor proporción de machos en los peces vacunados. El grupo *Pp*_Ctrl evidenció una reducción de *Caligus* significativa de adultos totales y hembras en comparación con el grupo control (Ctrl), mientras que en los demás tratamientos no se observaron diferencias significativas. Los peces vacunados con IPath indujeron una modulación de genes asociados al transporte de hierro y a la respuesta inmune adaptativa, mientras que en piojos recuperados se evidenciaron alteraciones en genes vinculados al estrés oxidativo. Estos hallazgos sugieren que la inmunización oral con levaduras recombinantes estimula la respuesta inmune del hospedador e impacta indirectamente en el metabolismo del ectoparásito, respaldando el potencial de IPath y *P. pastoris* como candidatos para vacunas orales en salmonicultura.

ABSTRACT

Chile ranks as the second-largest global producer of Atlantic salmon (*Salmo salar*), contributing to the economic growth of the southern part of the country. However, salmon farming faces numerous challenges that impact the health and productivity of the fish, including caligidosis, a disease caused by *Caligus rogercresseyi*, commonly known as 'sea lice.' This infestation damages the fish's health, leading to skin lesions, enzymatic changes, and a weakened immune system, which allows other pathogens to enter and causes significant economic losses. Currently, parasite control mainly depends on pharmacological treatments, but overuse has led to resistance, emphasizing the need for new non-pharmacological solutions. In this context, our research team at LBGA-INCAR has tested antigens such as cathepsin and IPath in experimental injectable vaccines, achieving a reduction of between 57% and 97% in parasite load during the adult stages. Although effective, their use in aquaculture is limited by stress from individual handling, the impracticality for smaller fish, and the challenges of large-scale recombinant protein production. Therefore, this study aims to evaluate the use of oral formulation with the antigens (IPath and cathepsin) expressed in the yeast *P. pastoris* (Pp) for Atlantic salmon against sea lice infestation. Three experimental groups were created with the antigens *Pp_IPath*, *Pp_Cath*, and a combination (*Pp_IP+Cath*), along with two controls: normal feed (Ctrl) and non-recombinant yeast (*Pp_Ctrl*). The fish were challenged with 35 copepods per individual, starting the treatment the next day. Results showed a lower parasite load in males. The *Pp_Ctrl* group exhibited a significant decrease in total counts and female counts compared to the control group (Ctrl), while no significant differences appeared in the other treatments. Fish vaccinated with IPath showed modulation of genes related to iron transport and adaptive immune response, whereas in recovered lice, changes were observed in genes associated with oxidative stress. These findings suggest that oral immunization with recombinant yeasts stimulates the host's immune response and indirectly affects the parasite's metabolism, supporting the potential of IPath and *P. pastoris* as candidates for oral vaccines in salmon farming.

INTRODUCCIÓN

1.1. Salmonicultura Chilena

En la última década, Chile se ha consolidado como uno de los líderes mundiales en la producción de salmónidos en cultivo, destacándose en particular en la producción de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (FIPA, 2025). Actualmente, Chile es el segundo mayor productor a nivel global, solo detrás de Noruega, con una cosecha acumulada de 703.000 toneladas a diciembre de 2024, lo que representa el 49,5% del total de la acuicultura nacional (Subpesca, 2024). No obstante, el desarrollo de esta industria se ve constantemente amenazado por diversas enfermedades, que han estado presentes en cada una de las etapas de desarrollo de estos organismos acuáticos sometidos a cultivos (Bravo et al., 2005). Las pérdidas económicas no solo derivan de la mortalidad directa de los peces, sino también de las pérdidas en peso, calidad del producto y los costos incurridos por efecto de los tratamientos empleados para su control, como también para su prevención (vacunas, desinfectantes, etc.) (Sernapesca, 2022).

Uno de los principales desafíos sanitarios corresponde a la Caligidosis, enfermedad producida por el ectoparásito *Caligus rogercresseyi*, que ha estado presente en Chile desde la década de 1980, época en la cual comenzó la producción masiva de salmónes (Reyes & Bravo, 1983). Tanto la presencia como la proliferación de este parásito han afectado directamente la salud de los peces repercutiendo negativamente en la productividad, rentabilidad y sostenibilidad de la industria acuícola (Morales et al., 2016). Su creciente resistencia a los tratamientos farmacológicos tradicionales agrava la situación, generando la necesidad de implementar estrategias innovadoras y sostenibles de control (Jerez, 2022). En este escenario, la cooperación entre la industria, la comunidad científica y los organismos reguladores resulta fundamental para garantizar la viabilidad y competitividad a largo plazo de la salmonicultura chilena (Bravo & Moya, 2024).

1.2. Caligidosis

La Caligidosis es una enfermedad producida por *Caligus rogercresseyi*, conocido comúnmente como “piojo de mar”, corresponde a un ectoparásito copépodo que habita las aguas marinas y salobres de Chile, está presente tanto en las especies de cultivo: salmón del Atlántico (*S. salar*) y trucha (*O. mykiss*) como en especies silvestres (robalo, lenguado, pejerrey) (Boxshall & Bravo, 2000). Este copépodo en estado adulto tiene diversas adaptaciones en su vida parasitaria, posee un cuerpo dorso ventralmente aplanado que le permite adherirse a su huésped presionando el cefalotórax en forma de escudo como una ventosa sobre la piel del pez, junto con la presencia de un cono oral que funciona como un sifón y estructuras orales (maxilípedos MX), los que son usados como ganchos para sostenerse (Fig. 1) (González & Carvajal, 2003). Estos parásitos causan serios problemas en la salmonicultura marina, debido a que los peces, al estar en las altas densidades de confinamiento, favorecen la reproducción del ectoparásito, aumentando así su patogenicidad. Su alimentación consiste principalmente en mucus, piel y sangre del pez, provocando lesiones por erosión y daño enzimático, pudiendo ocasionar a la vez una falla osmorreguladora en su huésped (Carvajal et al., 1998). La parasitosis produce, además, una condición de estrés ocasionando una disminución en el sistema inmunológico, dejando a los peces más susceptibles a enfermedades secundarias como bacterias y virus, y afectando su crecimiento o factor de condición (González & Carvajal, 2003).

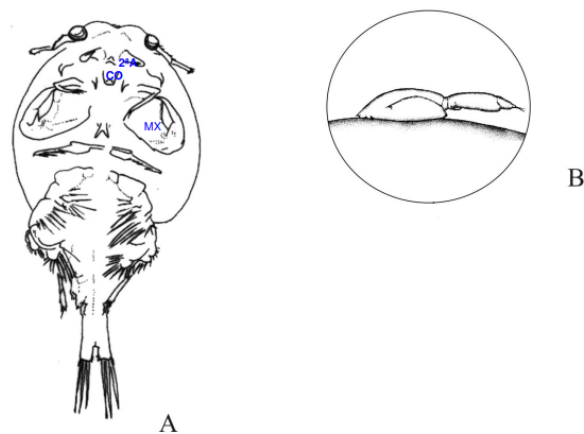


Figura 1. Vista ventral de un adulto macho de *Caligus rogercresseyi* (longitud: 4,8 mm) (2ªA: segunda antena, CO: cono oral, MX: maxilípedo). (B) Vista lateral de una hembra del calígido sobre el pez (González & Carvajal, 2003).

El ciclo de vida de *C. rogercresseyi* presenta 8 estados de desarrollo, 3 planctónicos (la fase de vida libre) y 5 parásitos (la fase adherida al huésped) (Fig.2) (González & Carvajal, 2003). En los planctónicos hay 2 nauplius y 1 copepodo que es la fase infectante (González & Carvajal, 2003). Estas larvas son estados de diseminación del parásito que viven de sus reservas en el cuerpo y no se alimentan del fitoplancton (Piasecki & Mackinnon, 1993). El copepodito (cop) se asienta en el huésped aferrándose mediante el segundo par de antenas (2ªA) y maxilípedos (MX), y en caso de ser un lugar adecuado para él, retorna su filamento rostral (FR) que lo fija definitivamente al pez (Reyes & Bravo, 1983). Luego este piojo se muda pasando por los 4 distintos estados de chalimus, el cual siempre está adherido al huésped por dicho filamento, aumentando gradualmente de tamaño; tanto la hembra como el macho pasan a adultos (HA y MA, HO y M) (González & Carvajal, 2003). Las hembras poseen sacos los que alcanzan una longitud total de alrededor de 10 mm en donde los huevos ya maduros son listos para eclosionar; estos toman una coloración más oscura (Tully, 1992). En su aspecto biológico, el desarrollo del parásito para pasar de un estado a otro en su ciclo de vida depende directa y principalmente de la temperatura del agua; existe una temperatura umbral mínima a la cual el parásito no se desarrolla (4,2°C en larvas, 5,4°C a 6,3°C para chalimus 4 y adultos desde el asentamiento) (Wilson & Barnett, 1983). Para pasar de un estado de desarrollo a otro se necesita la acumulación en el tiempo de una cantidad de calor sobre esta temperatura o temperatura efectiva, la cual se conoce como grados-días y corresponde al inverso de la pendiente de la regresión lineal entre la tasa de desarrollo del parásito y la temperatura media del agua (Wilson & Barnett, 1983). El registro de la temperatura, por lo tanto, es determinante para calcular el tiempo que demoraría el parásito en producir huevos (Bravo & Ponce, 2022). Por otro lado, se pudo comprobar que la salinidad también afecta el desarrollo de las larvas, observando que los nauplius no mudan a copepodito a salinidades iguales o inferiores a 15 psu; además, los adultos podrían sobrevivir por ciertos períodos a bajas salinidades (Bravo & Ponce, 2022).

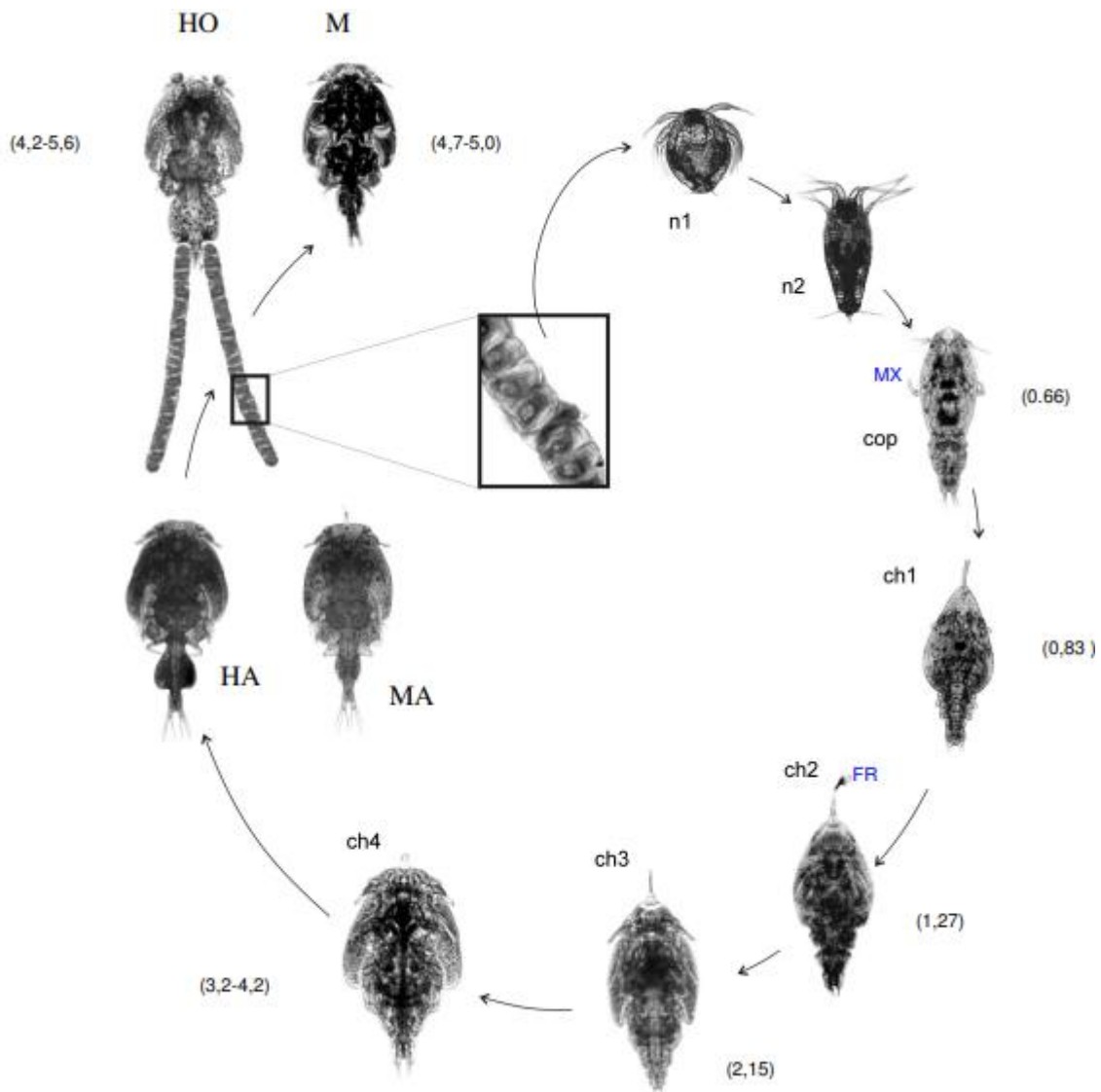


Figura 2. Estados de desarrollo de *Caligus rogercresseyi*, n1: primer nauplius, n2: segundo nauplius, cop: copepodito, ch1: chalimus 1, ch2: chalimus 2, ch3: chalimus 3, ch4: chalimus 4, MA: macho adulto joven, HA: hembra adulta joven, HO: hembra ovígera, M: macho adulto. MX: maxilípodo (González & Carvajal, 2003).

1.3. Interacción *Caligus-salmón*

El salmón del Atlántico (*Salmo salar*) es la especie más susceptible a la infestación por *Caligus rogercresseyi* en comparación con otros peces cultivados (Valenzuela-Muñoz et al., 2016). Esta interacción parásito–hospedero se sostiene en complejos mecanismos moleculares que permiten al ectoparásito reconocer al pez, modular su respuesta inmune, obtener nutrientes y activar sus propias defensas, asegurando así el éxito de la infestación (Gallardo-Escarate et al., 2019; Valenzuela-Muñoz et al., 2016). Cuando se produce un desequilibrio en esta relación, el salmón manifiesta signos clínicos como hipersecreción de mucus, erosiones y ulceraciones cutáneas, pérdida de escamas, edema, inflamación en la zona de fijación y hemorragias (Boltaña et al., 2016). Estas alteraciones impactan negativamente en su fisiología y comportamiento, afectando la reproducción, la regulación inmune y otros procesos vitales (Froeschke & Goetz von der Heyden, 2014).

En la actualidad, el desarrollo y aplicación de herramientas genómicas han permitido profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la interacción entre parásito y hospedador (Gallardo-Escarate et al., 2014). Las patologías pueden ser directas, debido a la fijación y alimentación del copépodo, o indirectas, por la respuesta inmune del pez (Gallardo-Escarate et al., 2019). El reconocimiento del hospedador está mediado por receptores ionotrópicos (IR) (Nunez-Acuna et al., 2014). Por ejemplo, en *L. salmonis*, se ha descrito que la mucosidad de *S. salar* contiene compuestos químicos, denominados kairomonas, como el péptido cathelicidina CATH-2; este compuesto promueve el desarrollo del filamento frontal de *C. rogercresseyi* y activa la expresión de los IR, así como de genes relacionados con la formación de la cutícula (Nunez-Acuna et al., 2016).

La infestación por *C. rogercresseyi* desencadena una compleja red de procesos moleculares en el hospedador (Gallardo-Escarate et al., 2019). La respuesta temprana se establece dentro de los primeros cinco días posteriores al inicio de su infestación (Gallardo-Escarate et al., 2019). Durante la adhesión a la piel, el parásito secreta a través de sus glándulas salivales, diversas enzimas proteolíticas excretoras/secretoras (SEPs), entre ellas catepsinas L y B, serina proteasas (serpinas) y enzimas con actividad similar a tripsinas y carboxipeptidasas (Maldonado-Aguayo et al., 2015; Vera-Bizama et al., 2015).

El hospedador, al detectar la presencia del ectoparásito, activa una respuesta inflamatoria inicial mediada por moléculas como NLRC5 y caspasa-1, junto con el reconocimiento de patrones moleculares a través de receptores tipo Toll (Valenzuela-Munoz & Gallardo-Escarate, 2014). Particularmente tlr22a2 (Vera-Bizama et al., 2015) y tlr19 en salmón del Atlántico y tlr13 en salmón Coho (Gallardo-Escarate et al., 2019) (Fig. 3). Estos receptores desencadenan la vía de señalización dependiente de myd88 e IRAK-1, promoviendo la activación del factor nuclear NF- κ B y, en consecuencia, la producción de citocinas y quimiocinas (Gallardo-Escarate et al., 2019). En el salmón del Atlántico se genera un perfil de respuesta tipo Th1, caracterizado por la expresión de IL-1 β , IL-8, IL-13 y TNF- α , mientras que en el Coho genera un perfil de respuesta tipo Th2, caracterizado por la expresión de IL-4, IL-10, IL-13 y TNF- β (Boltaña et al., 2016). Adicionalmente, se ha descrito en peces una respuesta mediada por una respuesta conocida como inmunidad nutricional que busca limitar la disponibilidad del hierro el cual, es un metal esencial para el desarrollo del parásito (Valenzuela-Munoz et al., 2017). En este proceso participan la hemo oxigenasa (HO) y la biliverdina reductasa (BLVr), que degradan el grupo hemo liberando biliverdina, monóxido de carbono y hierro ferroso (Fe²⁺) (Valenzuela-Munoz et al., 2017). Parte de este hierro es captado y almacenado por la ferritina, lo que reduce la concentración de hierro férrico (Fe³⁺) circulante (Valenzuela-Munoz et al., 2017). En paralelo, la inflamación incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), moléculas que ejercen un efecto dual, contribuyendo a dañar las estructuras del parásito, pero también generando estrés oxidativo en el pez (Valenzuela-Munoz et al., 2021). La ferritina cumple aquí un rol regulador, al limitar el hierro libre disponible que podría potenciar la reacción de Fenton y, con ello, la sobreproducción de ROS (Valenzuela-Munoz et al., 2017).

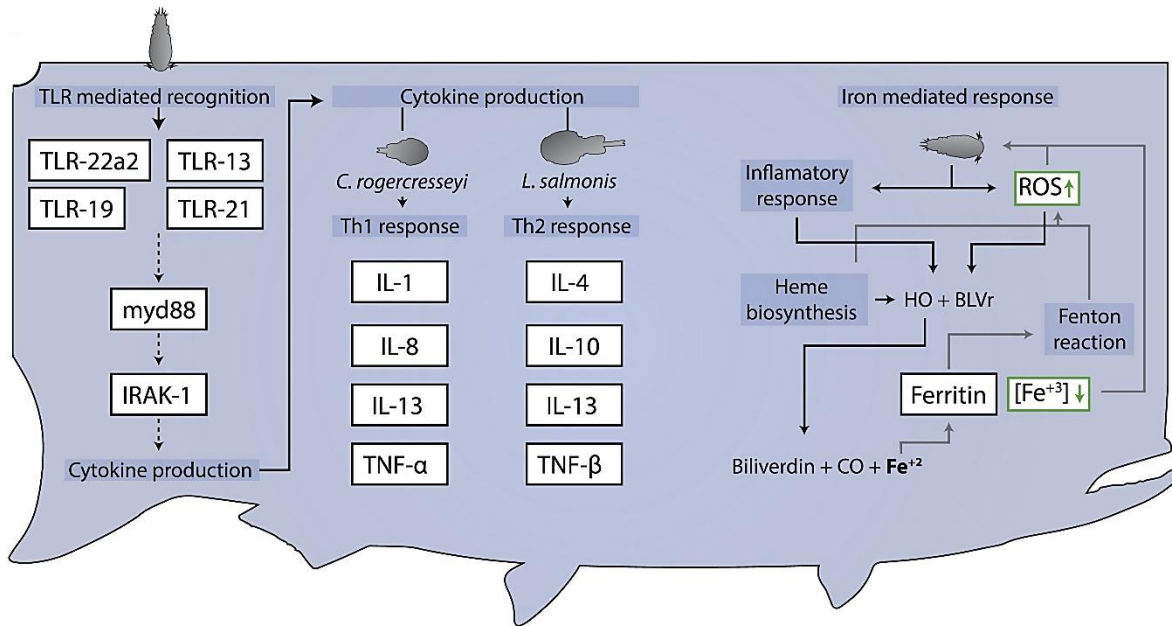


Figura 3. Modelo esquemático de las interacciones entre el salmón y el piojo de mar. Mecanismo inmunitario innato y adaptativo del huésped y modulación de la homeostasis del hierro en respuesta a la infestación por piojos de mar (Gallardo-Escarate et al., 2019).

La sobrerregulación de *tlr13* en el salmón coho sugiere que esta especie de salmón podría responder a través de TLR a la infestación de *C. rogercresseyi*, de manera similar al salmón del Atlántico con *tlr22a2* (Valenzuela-Muñoz et al., 2016). La baja expresión de genes Th2 en el salmón Coho podría ser una estrategia para evitar la sobreproducción de moco en los peces, principal fuente de alimento de *C. rogercresseyi*, ya que se ha descrito que la respuesta Th2 aumenta la secreción de moco a través de la producción de mucina (Holm et al., 2015). Estos mecanismos reflejan una estrategia defensiva del hospedador basada en la inflamación y la restricción nutricional (Nunez-Acuna et al., 2016). Sin embargo, *C. rogercresseyi* responde activando genes antioxidantes y sobreexpresando su propia ferritina, lo que le permite tolerar el estrés oxidativo y mantener el acceso al hierro necesario para su metabolismo y reproducción (Vera-Bizama et al., 2015).

1.4. Tratamientos para el control de la Caligidosis

Desde la consolidación de la salmonicultura en Chile, *Caligus rogercresseyi* se ha constituido en el principal desafío sanitario en la fase marina, provocando daños directos a los peces, aumentando la susceptibilidad a infecciones secundarias (*Piscirickettsia salmonis*) y generando pérdidas económicas y productivas (Navarro, 2022). Ante esta situación, la industria respondió inicialmente con el uso de quimioterapéuticos administrados por baño y por vía oral (Navarro, 2022).

Entre las primeras opciones evaluadas a nivel global, con aplicación en varios países y en registros puntuales en Chile, fue la ivermectina, la cual consistió en una alternativa oral que mostró eficacia frente a algunos piojos marinos, pero con riesgos ambientales y efectos colaterales reportados en invertebrados bentónicos y otras consecuencias no deseadas (Roth et al., 1993). Más adelante, durante los primeros años del siglo XXI, benzoato de emamectina (EMB) se convirtió en uno de los tratamientos orales de uso habitual en Chile (Subpesca, 2017). Sin embargo, su uso continuo y exclusivo terminó asociándose a una pérdida de sensibilidad del parásito en varias áreas productivas (Subpesca, 2017). Para diversificar herramientas, a partir de 2007 se autorizaron y adoptaron tratamientos por baño como los piretroides (deltametrina) y el peróxido de hidrógeno como alternativas a EMB (Sernapesca, 2022). Estudios y bioensayos detectaron reducción de eficacia de los piretroides a partir de 2008 y evidencias de pérdida de sensibilidad en regiones productivas (pérdida de control con deltametrina y luego con cipermetrina) (Sernapesca, 2022). Asimismo, el peróxido de hidrógeno presentó una eficacia variable y limitaciones operacionales, ya que los ejemplares adultos de *Caligus* que se desprendían del hospedador podían recuperarse a los pocos minutos post-tratamiento, reinfestando nuevamente al pez (Wehner, 2012). Estas observaciones llevaron a la búsqueda de nuevos principios activos y a estrategias de manejo integrado (Subpesca, 2017).

Esta situación llevó a que en 2007 el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) incorporara la Caligidosis en la Lista 2 de Enfermedades de Alto Riesgo, al ser considerada una enfermedad de importancia sanitaria presente en el país. De este modo, pasó a formar parte del Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Caligidosis, cuyo objetivo fue identificar la condición sanitaria de los cultivos de salmónidos en relación

con *C. rogercresseyi*, dada su alta prevalencia e impacto (Sernapesca, 2022). Más tarde, en 2015, se implementó la actual estrategia para la vigilancia y control de esta enfermedad (Res. Ex.- N°13/2015) (BCN, 2015), que reforzó medidas como la rotación de fármacos, tratamientos coordinados y cosechas anticipadas (Sernapesca, 2022) (BCN, 2015).

Actualmente, se cuenta con opciones terapéuticas administradas por inmersión con principios activos como azametifos, deltametrina, cipermetrina, peróxido de hidrógeno y hexaflumurón (Zalcman et al., 2021). Además, se utiliza la vía de administración oral incorporando al alimento de principios activos como lufenurón, que se administra a los peces en centros de agua dulce, y benzoato de emamectina, que se utiliza durante el proceso de siembra (Zalcman et al., 2021). Siendo la principal estrategia de control desarrollada por la industria el empleo de azametifos en conjunto con deltametrina para cumplir con la rotación definida por el programa de SERNAPESCA (Sernapesca, 2022). Documentos técnicos y estudios de campo continúan evaluando la eficacia de los antiparasitarios y reportan variaciones regionales en la sensibilidad del parásito a las moléculas autorizadas (Sernapesca, 2022; Valenzuela-Miranda & Gallardo-Escárte, 2016).

La empresa AVS Chile desarrolló un proyecto que evaluó la efectividad de diferentes estrategias farmacológicas integradas para el control del ectoparásito *Caligus rogercresseyi* en salmónidos, incluyendo antecedentes oceanográficos en dos áreas de trabajo de la macrozona 3 en Chile: Este Isla Apiao y Este Butachauques (Subpesca, 2017). Este estudio recopiló información sanitaria y productiva del período 2012 a 2015 de los centros de cultivo de la macrozona, a partir de la cual se realizaron diversos análisis estadísticos (Subpesca, 2017). Los resultados obtenidos permitieron caracterizar epidemiológicamente la carga parasitaria y los centros de la macrozona, junto con identificar los factores que afectan la eficacia de los tratamientos y evaluar el efecto de las corrientes oceanográficas en la infestación con *Caligus* (Subpesca, 2017). Se consideraron los seis principios activos autorizados para el tratamiento de *Caligus* en los centros de cultivo, los cuales atacan procesos clave del parásito como son la muda y su sistema nervioso central (Subpesca, 2017). Sin embargo, en algunos casos se ha evidenciado una reducción en la eficacia y reportes de baja sensibilidad, según se detalla en la Tabla 1 (Subpesca, 2017).

Tabla 1. Información de fármacos disponibles para el control de *Caligus* en Chile y reportes de baja sensibilidad (Subpesca, 2017).

Principio activo.	Familia.	Mecanismos de acción	Estadios afectados.	Reporte baja de sensibilidad (año).
Benzoato de emamectina.	Avermectinas.	Incrementa la permeabilidad de la neurona a los iones cloruro inhibiendo la sinapsis.	Juveniles y adultos.	2005
Diflubenzurón.	Benzoilureas.	Inhiben la síntesis de quitina/impiden la muda.	Juveniles.	-
Deltametrina.	Piretroides.	Interfieren con la función de la membrana nerviosa, causando despolarización de la terminación nerviosa.	Juveniles y adultos.	2008
Cipermetrina.	Piretroides.	Interfieren con la función de la membrana nerviosa, causando despolarización de la terminación nerviosa.	Juveniles y adultos.	2014
Azametifos.	Organofosforado.	Inhiben la enzima acetilcolinesterasa.	Adultos.	-
Peróxido de hidrógeno.	Peróxidos.	Formación de burbujas en el intestino y hemolinfa.	Adultos.	-

Ante este escenario, *C. rogercresseyi* ha evidenciado tener cambios en su comportamiento epidemiológico asociados a su dependencia casi exclusiva de estos tratamientos farmacológicos. Esta situación ha obligado a introducir modificaciones en el programa de control sanitario, incorporando medidas como la vigilancia intensiva, la rotación de principios activos, la aplicación de tratamientos coordinados entre centros, el control de la diseminación y la cosecha anticipada de biomasa infestada (Subpesca, 2017). No obstante, dichas estrategias han puesto de manifiesto la fragilidad de un modelo de control sustentado principalmente en químicos, impulsando la búsqueda de alternativas no farmacológicas, como el desarrollo de vacunas, aditivos funcionales, selección genética de peces más resistentes y métodos de biocontrol (IFOP, 2021; Zalzman et al., 2021).

1.5. Vacunas contra Caligus

En la actualidad, la industria de la acuicultura ha intensificado su interés en los métodos de prevención de enfermedades, dirigiendo su atención hacia el desarrollo de vacunas innovadoras y efectivas para peces (Barrett et al., 2020). Aunque los avances en vacunas contra ectoparásitos en peces son prometedores, persisten limitaciones que han impedido su consolidación a nivel comercial (Shivam et al., 2021). Entre los desarrollos experimentales más relevantes se encuentra el uso de antígenos de superficie inmovilizados frente a *Ichthyophthirius multifiliis*, los cuales han demostrado inducir respuestas inmunes protectoras en peces de agua dulce (Dickerson & Clark, 1998). De igual modo, se ha documentado una vacuna atenuada contra *Cryptobia salmositica*, capaz de disminuir significativamente la mortalidad en salmónidos (Woo, 1998). Sin embargo, la mayoría de estas aproximaciones no han superado las barreras técnicas, biológicas y regulatorias. (Shivam et al., 2021).

Con respecto al control de la Caligidosis, aún no existe ningún tipo de vacuna disponible y vigente en Chile y ha sido un objetivo largamente anhelado en la industria acuícola (Shivam et al., 2021). Entre las estrategias exploradas en la literatura científica para el control del piojo de mar, está el antígeno quimérico TT-P0, compuesto por la proteína ribosomal P0 de *L. salmonis* y fusionada con un epítipo de la toxina tetánica. Los ensayos con este antígeno evidenciaron una reducción cercana al 40% en cuanto al número de hembras ovígeras, además de un aumento en los niveles de inmunoglobulinas en peces inmunizados (Swain et al., 2020). Asimismo, se han evaluado otros antígenos como transportadores de potasio-cloro y de aminoácidos (Contreras et al., 2020), así como la proteína recombinante my32 (Carpio et al., 2011), la cual se utilizó en un ensayo de vacunación-desafío, demostrando resultados de una reducción significativa en el número de parásitos con eficacias reportadas que oscilan entre un 30 y 57% (Carpio et al., 2011). No obstante, ninguno de estos desarrollos ha logrado ser transferido a nivel comercial (Shivam et al., 2021).

Debido a esto, persiste la necesidad de diseñar herramientas no farmacológicas más efectivas para el control del parásito (Shivam et al., 2021). En 2014, investigadores del Centro Interdisciplinario de Investigaciones Acuícolas (INCAR) de la Universidad de Concepción llevaron a cabo el primer ensamblaje *de novo* del transcriptoma de *C.*

rogercresseyi, revelando procesos moleculares relacionados con su desarrollo, respuesta inmune y metabolismo (Gallardo-Escarate et al., 2014). Este avance presentó un hito en el conocimiento existente y facilitó futuras investigaciones orientadas al desarrollo de vacunas (Gallardo-Escarate et al., 2014). Posteriormente, otro estudio analizó la expresión génica del ectoparásito durante la infestación en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y coho (*Oncorhynchus kisutch*), evidenciando patrones dependientes del hospedador que explican en parte la mayor susceptibilidad del salmón del Atlántico (Vera-Bizama et al., 2015). Luego, en 2021, se diseñó bioinformáticamente una proteína quimérica recombinante denominada IPath (Valenzuela-Munoz et al., 2021). Esta molécula se compuso de residuos del dominio de unión al hierro de la transferrina y del centro dihierro ferroxidasa de la subunidad H de la ferritina (Valenzuela-Munoz et al., 2021). A diferencia de muchas vacunas tradicionales basadas en antígenos inactivados o muertos, IPath fue expresada en bacterias *Escherichia coli*, demostrando *in vitro* su capacidad de unión al hierro (actividad quelante) (Valenzuela-Munoz et al., 2021). Se evaluó su eficacia formulándola como antígeno o como refuerzo en una vacuna inyectable vía intraperitoneal en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), el cual fue expuesto a patógenos comunes como *Piscirickettsia salmonis* y *Aeromonas salmonicida*, así como al ectoparásito *Caligus rogercresseyi* (Valenzuela-Munoz et al., 2021). Los resultados evidenciaron que IPath tuvo una reducción significativa en la mortalidad y una mayor eficacia reportada a la fecha para una vacuna contra *Caligus*, con una reducción del 97% de la carga parasitaria de piojos de mar adultos de los peces inmunizados, lo que confirma una protección efectiva y una mejora en la respuesta inmune frente a enfermedades infecciosas (Valenzuela-Munoz et al., 2021).

En 2022, el equipo continuó con la investigación, analizaron la modulación transcriptómica de *Salmo salar* inmunizado con tres prototipos de vacuna durante la fase temprana de infección por *Caligus rogercresseyi* (Casuso et al., 2022). El estudio evidenció patrones de expresión génica diferenciados según el tipo de formulación empleada (Casuso et al., 2022). En particular, las vacunas B y C, que contenían como antígeno la catepsina, mostraron una reducción significativa en el número de parásitos adheridos (Casuso et al., 2022). De manera general, los peces inmunizados con los tres prototipos presentaron cambios en la regulación de procesos biológicos clave, como la homeostasis, el metabolismo celular y la producción de energía, los cuales podrían ser determinantes en las etapas iniciales de la

respuesta frente al ectoparásito (Casuso et al., 2022). Además, se registró una disminución del 24–52% en los estadios parasitarios tempranos de *C. rogercresseyi* (Casuso et al., 2022).

La vacunación constituye una estrategia sustentable que se fundamenta en el entrenamiento del sistema inmunológico (SI), mediante la exposición del hospedador a antígenos derivados de organismos patógenos (Petruzzo et al., 2012). Su eficacia depende de la capacidad de imitar de manera adecuada al patógeno de origen, activando el SI del pez e iniciando una cascada de procesos moleculares y celulares que permiten inducir respuestas protectoras frente a futuras exposiciones (Petruzzo et al., 2012). Sin embargo, el uso de vacunas inyectables en la acuicultura para controlar la Caligidosis conlleva desventajas (Tammam et al., 2024). Estas generan estrés en los peces debido al manejo requerido para su administración, lo que debilita su sistema inmune y los hace más susceptibles a enfermedades (Tammam et al., 2024). Durante este proceso, existe el riesgo de que los peces sufran lesiones o daños en sus tejidos debido a errores en la técnica de administración o a la reacción de los peces al ser manipulados (Tammam et al., 2024). Su eficacia puede verse afectada por factores como la salud del pez, las condiciones ambientales y la dosis administrada (Petruzzo et al., 2012). Además, la aplicación en el campo de vacunas inyectables con base en proteínas recombinantes presenta desventajas, como su producción, que puede ser costosa y técnica, limitando su accesibilidad, especialmente en países en desarrollo (Liu et al., 2024).

En contraparte, la vacunación oral se ha consolidado como una estrategia atractiva en acuicultura, ya que permite inmunizar un gran número de peces con mínima manipulación, reduciendo el estrés asociado a la inyección y favoreciendo la aplicación en sistemas de cultivo a gran escala (Embregts & Forlenza, 2016). La incorporación de antígenos en el alimento permite una distribución homogénea, lo que resulta ventajoso en especies de rápido crecimiento y sistemas de producción que requieren programas de vacunación masiva (Du et al., 2022). Sin embargo, su eficacia depende en gran medida del uso de adyuvantes y tecnologías de formulación que permitan proteger los antígenos de la degradación en el tracto gastrointestinal y asegurar su liberación en los sitios de interacción con el sistema inmune del hospedador (Tafalla et al., 2013).

En este sentido, los adyuvantes orales basados en matrices oleosas, como Montanide GR01, representan un enfoque prometedor (Seppic & Healthcare, 2022). Este producto se mezcla con el pienso compuesto, protegiendo la integridad del pellet y evitando la pérdida de propiedades nutricionales en condiciones gástricas, lo que permite una liberación controlada en el intestino y un contacto más efectivo con células inmunitarias de la mucosa intestinal (Seppic & Healthcare, 2022). Ensayos recientes en *Oreochromis niloticus* (tilapia del Nilo) vacunada contra *Streptococcus agalactiae* demostraron que el uso de Montanide GR01 al 2% aumentó parámetros de la inmunidad innata como la actividad de lisozima (LZM), mieloperoxidasa (MPO), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), en comparación con peces vacunados sin adyuvante (Pholchamat et al., 2024). Estos resultados sugieren que Montanide GR01 no solo mejora la protección frente a infecciones bacterianas, sino que también potencia la capacidad antioxidante del hospedador, indicador clave de resistencia frente al estrés oxidativo (Pholchamat et al., 2024).

Además del empleo de adyuvantes y sistemas de encapsulación, en la actualidad se han desarrollado enfoques innovadores que utilizan microorganismos como vehículos vacunales (Ma et al., 2019). Entre ellos, las levaduras han cobrado especial relevancia debido a su capacidad de expresar y presentar antígenos recombinantes en una forma que es inmunológicamente activa y estable frente a la degradación gástrica (Ortuño et al., 2002). En particular, *Pichia pastoris* ha emergido como una de las levaduras más utilizadas en la acuicultura moderna, ya que combina un bajo costo de producción con la posibilidad de generar antígenos correctamente plegados y con modificaciones postraduccionales, características, que aumentan su potencial como sistema de entrega oral en peces (Erden Karaoglan & Karaoglan, 2022). Este enfoque abre nuevas perspectivas en el desarrollo de vacunas orales contra patógenos parasitarios y bacterianos, posicionando a las levaduras como herramientas biotecnológicas de alto impacto para un control más sostenible de enfermedades en la salmonicultura (Erden Karaoglan & Karaoglan, 2022).

1.6. Levadura *Pichia pastoris* y su uso en biotecnología

Hace aproximadamente 40 años, Koichi Ogata, un destacado científico japonés por su contribución al estudio de levaduras metilotróficas, descubrió que ciertas levaduras eran capaces de utilizar metanol como su única fuente de carbono y energía (Ogata et al., 1969). En ese entonces, el metanol se obtenía del metano presente en el gas natural, un subproducto clave en la industria petrolera en pleno auge (Ogata et al., 1969). Este descubrimiento despertó interés en las levaduras metilotróficas, como *Pichia pastoris*, por su potencial para producir biomasa y proteína unicelular destinada a la alimentación animal (Hollenberg & Gellissen, 1997). Es así como la Compañía de Petróleo Phillips y el Instituto de Biotecnología de Salk en La Jolla desarrollaron tecnologías avanzadas que permitieron utilizar *P. pastoris* como plataforma para la producción de proteínas recombinantes, con una alta tasa de replicación (Karbalaei et al., 2020). Además, uno de los principales componentes de su pared celular es el β -glucano, conocido por su actividad inmunoestimulante en peces, como también su capacidad para multiplicarse y alcanzar altas densidades celulares en medios de cultivo no complejos, lo que ha sido fundamental para su éxito en fermentaciones a gran escala (Erden Karaoglan & Karaoglan, 2022; Petit & Wiegertjes, 2016). El interés en esta levadura se debe a varias características, entre ellas su promotor AOX1, promotor que regula la expresión del gen que codifica para la enzima alcohol oxidasa (AOX1), este es inducido por metanol ya que tiene la facilidad y simplicidad de manipulación genética, gracias a la disponibilidad de diversos vectores de expresión los cuales son conocidos y bien caracterizados (Karbalaei et al., 2020). Además, posee una capacidad para secretar proteínas heterólogas al medio extracelular y realizar modificaciones postraduccionales, como glicosilación, metilación, acilación y formación de puentes disulfuro (Erden Karaoglan & Karaoglan, 2022).

En 2018, un estudio realizado por científicos de Estados Unidos, Países Bajos, España, Alemania y Dinamarca utilizó la levadura *P. pastoris* como vehículo para el suministro de antígenos vía oral (Embregts et al., 2019). En su ensayo experimental, los investigadores alimentaron a larvas de platija (*Platichthys flesus*), ejemplares de carpa (*Cyprinus carpio* L.) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con una *P. pastoris* modificada para producir una proteína verde fluorescente (GFP) como antígeno (Embregts et al., 2019). Lo que permitió localizar y evaluar la respuesta en los animales (Embregts et al., 2019). De esta

manera, los científicos fueron capaces de detectar la GFP en el epitelio intestinal de la carpa, la trucha y las larvas de platija (Embregts et al., 2019). Como conclusión, los autores afirmaron que sus resultados destacan a *P. pastoris* como un vehículo prometedor (bioencapsulado y no encapsulado) para la administración de antígenos y potencial adyuvante para su uso en vacunas orales en la etapa temprana y tardía del ciclo de producción (Embregts et al., 2019). Esto a la vez confirma que es capaz de proteger el antígeno mientras viaja a través del tracto gastrointestinal, permitiendo que llegue intacto a la parte posterior del intestino, donde pueden interactuar con las células inmunes residentes (Embregts et al., 2019).

Bajo esta perspectiva, el objetivo de este estudio fue evaluar el uso, como vehículo, de *P. pastoris* expresando los antígenos IPath y Catepsina para inmunizar salmón del Atlántico (*S. salar*) por vía oral y evaluar sus niveles de protección contra *C. rogercresseyi*.

HIPÓTESIS

La administración vía oral de *Pichia pastoris* recombinante que expresa la proteína quimérica IPath y catepsina en *Salmo salar* incrementa la respuesta inmune en el pez durante una infestación con *Caligus rogercresseyi*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto sobre la respuesta inmune de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de *Pichia pastoris* recombinante expresando IPath y catepsina como estrategia de vacunación oral para el control de la caligidosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Formular y evaluar la eficacia de una vacuna oral con *P. pastoris* recombinante expresando IPath y catepsina para el control de *Caligus* en salmón del Atlántico (*Salmo salar*).
2. Analizar patrones de expresión de genes asociados a la respuesta inmune y transporte de hierro en peces inmunizados vía oral con *Pichia pastoris* expresando IPath y catepsina.
3. Evaluar los cambios de expresión de genes asociados al estrés oxidativo en *C. rogercresseyi* obtenidos desde peces inmunizados vía oral con *P. pastoris* expresando IPath y catepsina.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Formulación de la vacuna

Para la formulación de la vacuna, se dispuso de una cepa de *Pichia pastoris* activa recombinante liofilizada que expresa Ipath (*Pp*-Ipath) y Catepsina (*Pp*-Catep), desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola (LBGA).

Se evaluó la presencia de las proteínas catepsina y ferritina (IPath) expresadas en la levadura (*P. pastoris*). Para ello, se tomaron 0,1 g de levadura liofilizada que expresa las proteínas de catepsina, ferritina y un control de *P. pastoris*. Las muestras se hidrataron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en tubos Eppendorf de 2 ml, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se les aplicó vórtex durante 30 segundos, se lisaron en un homogeneizador TissueLyser durante 10 minutos y se centrifugaron a 15,000 rpm por 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se almacenó a 4 °C. El lisado se evaluó mediante gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Se prepararon geles de poliacrilamida al 12,0%. Se mezclaron 30 µL de las proteínas extraídas con 10 µL de tampón de carga y se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos. De manera complementaria, se utilizó un marcador de peso molecular y se incluyeron proteínas recombinantes purificadas de ferritina y catepsina como controles, lo que permitió verificar la presencia y el tamaño esperado de las proteínas en los lisados obtenidos, garantizando así la validez comparativa del análisis proteico. La electroforesis se corrió a 100 V durante aproximadamente 2 horas. Posteriormente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie para visualizar las bandas proteicas, las cuales se observaron y documentaron en un sistema digital de fotodocumentación iBright CL1500 Imaging System (ThermoScientific, USA) bajo luz ultravioleta.

Se formularon tres dietas (Vacunas orales) *Pp*_IPath, *Pp*_Cath y *Pp*_IP+Cath en un porcentaje de inclusión del 1% en el alimento. Para determinar las cantidades necesarias de cada levadura, se realizaron cálculos previos considerando la cantidad de peces y el periodo de inmunización, con una tasa de alimentación equivalente al 1,6% del peso corporal diario. En este caso, el peso promedio de los peces fue de 300 g con un total de 65 individuos, alcanzando una biomasa de 19.500 g. La inmunización se llevó a cabo durante 31 días, por

lo que se requirió un total de 9.672 kg de alimento lo que correspondió a 1,5 kg por grupo experimental. Se preparó una emulsión que contenía 30 gramos de levaduras disueltas en 30 ml de PBS de cada cepa (*Pp_IPath* y *Pp_Cath*), combinada con 70 ml de adyuvante oral comercial Montanide GR01 (Seppic, Francia). En el caso del grupo experimental combinado (*Pp_IP+Cath*) la emulsión se formuló con 15 gramos de cada cepa disueltos en 30 ml de PBS y 70 ml de adyuvante. Esta emulsión fue mezclada con el alimento de los peces. Para ello, 100 ml de cada emulsión fue unificada con 1 kg de alimento calibre 3 mm (Cargill). Además, se consideraron dos grupos control: uno en el que 1 kg de alimento fue mezclado con 100 ml de una emulsión compuesta por 30 gramos de levadura *P. pastoris* sin antígeno disueltas en 30 ml de PBS y 70 ml de adyuvante GR01, y el otro que recibió únicamente alimento sin emulsiones.

Grupos experimentales:

- Ctrl: Grupo control, alimentado solo con alimento (sin antígeno)
- *Pp_Ctrl*: Grupo control tratado con alimento incluido con levadura activa (*P. pastoris*).
- *Pp_IPath*: Grupo tratado con vacuna a base de levadura activa recombinante expresando proteína IPath.
- *Pp_Cath*: Grupo tratado con vacuna a base de levadura activa recombinante expresando proteína catepsina.
- *Pp_IP+Cath*: Grupo tratado a base de levadura activa recombinante expresando ambas proteínas IPath y catepsina.

2.2. Diseño experimental

Se aclimataron 65 individuos de salmón del Atlántico (*S. salar*) desde el laboratorio experimental de la Estación de Biología Marina de la Universidad de Concepción, localizada en Dichato, Chile. Los peces tenían un peso promedio de 300 g divididos en cinco grupos y aclimatados en diferentes estanques con agua de mar a 12°C, siendo alimentados periódicamente. Se mantuvo un ambiente de agua estable, incluida la temperatura (11.5 ± 0.5 °C), el OD (7.5 ± 0.4 mg/L) ($\delta t = 5$ min, sonda Oxyguard 420, Oxyguard International), salinidad (35 ‰). La selección de los grupos experimentales y controles fue de manera aleatoria. Los peces se distribuyeron en cuatro grupos experimentales con 10 individuos por estanque, a excepción del segundo grupo control (alimento sin adición de antígeno) que contó con 25 individuos. Todos los grupos fueron infestados con 35 copépodos/pez, siguiendo el protocolo establecido en el Laboratorio Experimental del Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola (LBGA) ubicado en Dichato. Al día siguiente, de manera simultánea (día siguiente) se comenzó a suministrar la vacuna oral junto con un registro diario de apetencia de los peces por 31 días. Dos días posterior al término de la inmunización, se realizó tomas de muestras de piel y riñón anterior con un registro de peso y talla de *Salmo salar* y de recuento de piojos de mar en la superficie de los peces/grupo como también toma de muestras de *Caligus* (Fig. 4). Todas las muestras fueron fijadas en RNAlater® (Ambion, USA) y almacenadas a -80°C hasta la extracción de ARN.

El nivel de apetencia de los peces se evaluó mediante un registro diario, en el que se asignaron categorías de 1 a 3, siendo 1 equivalente a bajo apetito, 2 a apetito intermedio y 3 a alto apetito. La evaluación consideró tanto la intensidad como la rapidez en el consumo del alimento, tanto en presencia como en ausencia de antígeno, en todos los grupos experimentales. Asimismo, se calculó el índice del factor de condición de Fulton a partir de los datos de peso y talla obtenidos, con el fin de evaluar la condición física de los peces. La fórmula empleada fue $K = \left(\frac{P}{L^3}\right) * 100$, donde K es el índice de condición, P representa el peso en gramos y L la talla total en centímetros (Nash et al., 2006). Este índice entrega una medida relativa de la robustez o “condición” del pez, siendo un valor cercano a 1 indicativo de un ejemplar en buen estado. Valores superiores a 1 reflejan una mayor proporción de peso respecto a la longitud (peces más robustos), mientras que valores inferiores a 1 indican

ejemplares más delgados o en menor condición. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de 2 vías; Tukey-HSD).

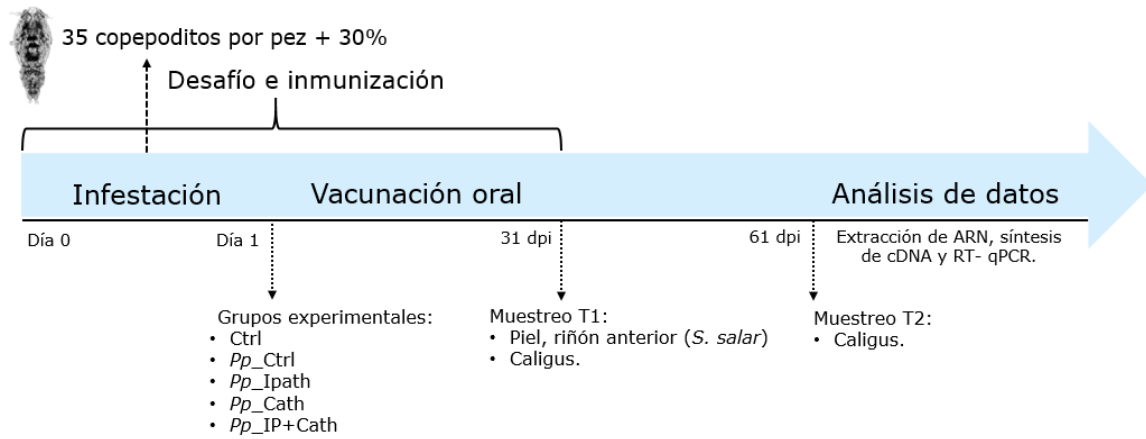


Figura 4. Diseño experimental de infestación con *Caligus rogercresseyi* y vacunación oral en grupos experimentales de *Pichia pastoris* recombinante, expresando IPath y catepsina, junto con grupos control, en salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

2.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA en tejidos de piel y riñón anterior de *Salmo salar* y *Caligus* de los peces vacunados.

Para la extracción de ARN total se realizó el método TRIzol (Invitrogen, USA) de acuerdo con lo sugerido por el fabricante. La concentración y pureza del RNA extraído total obtenido se determinó mediante un espectrofotómetro Nanodrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Waltham, MA, USA). Las muestras se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza se evaluó mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. La integridad del ARN se analizó mediante electroforesis en gel desnaturizante MOPS 1.2%, se observó en un sistema digital de fotodocumentación iBright CL1500 Imaging System (ThermoScientific, USA) bajo luz ultravioleta.

Para la síntesis de cDNA se utilizó 200ng/ μ L de ARN y se realizó la reacción de RT-PCR con el kit comercial RevertAid H Minus First Strand cDNA Syntesis (Thermo Scientific, USA) de acuerdo con lo sugerido por el fabricante. Para verificar la correcta síntesis de cDNA se realizó un PCR en tiempo final previamente estandarizado y posteriormente se visualizó el resultado mediante electroforesis.

2.4. Análisis de expresión mediante RT-qPCR de *Salmo salar* y *Caligus*.

Se realizaron análisis de RT-qPCR de genes asociados con la respuesta inmune y transporte de hierro en los grupos experimentales de salmón del Atlántico junto con los genes asociados al estrés oxidativo en *Caligus* obtenidos de los peces inmunizados (Tabla 1) con el kit PowerUp SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystems, USA), usando los partidores reportados utilizando las temperaturas de anelning descritas por (Valenzuela-Munoz et al., 2021; Vera-Bizama et al., 2015). La reacción de RT-qPCR se llevará a cabo en el equipo QuantStudio3 (Applied Biosystems, USA). Para la cuantificación relativa se utilizó un gen normalizador.

Tabla 2. Listado de los partidores usados para el análisis RT-qPCR (Valenzuela-Munoz et al., 2021; Vera-Bizama et al., 2015).

Primer Name	Gene	Sequence 5' – 3'	Tm	Referencias
β _actin_F β _actin_R	<i>Beta actin</i> (reference gene)	CAACTGGGACGACATGGAGA AGTGAGCAGGACTGGGTGCT	60°	(Valenzuela-Munoz et al., 2021)
FerritinM_F1 FerritinM_R1	<i>Ferritin M</i>	TCTCACCACGATTGCGAAGC CTCGTCCGCTGTTCTCCTTGA	60°	(Valenzuela-Munoz et al., 2021)
IL1b_F6 IL1b_R6	<i>Interleukin-1b</i>	GATCTGGAGGTATCCCATCA CACAGCACTCTCCAGCAAGA	60°	(Valenzuela-Munoz et al., 2021)
IgT_F IgT_R IgT_Probe	<i>Immunoglobulin T</i>	CAAACTGACTGGAACAACAAGT CGTCAGCGGTTCTGTTTTGGA AGTACAGCTGTGTGGTGCA	60°	(Valenzuela-Munoz et al., 2021)
Cox-2_F Cox-2_R	<i>Cyclooxygenase 2</i>	CAGTGCTCCCAGATGCCAAG GCGAAGAAGGCGAACATGAG	60°	(Valenzuela-Munoz et al., 2021)
β -tubulin_F2 β -tubulin_R2	<i>Beta-tubulin</i> (reference gene)	TTTGTGTGTGAGCTCTGGG GCTGATCTCCGAAAATTGC	60°	(Vera-Bizama et al., 2015)
SOD_F1 SOD_R1	<i>Superoxide dismutase</i>	TCAACATGCAACACGGCTCCAG GCGTGCCCTGGTTCGTACATGCCG	60°	(Vera-Bizama et al., 2015)
CAT_F1 CAT_R1	<i>Catalase</i>	GGCACCCAGACGATAGCGATGAGCA TCGCTTTCAGTCCCGGAAATCTGGT	64°	(Vera-Bizama et al., 2015)
Ferritin_F1 Ferritin_R1	<i>Ferritin</i>	GGAGTGACGGCCTAGAGGCACTCCG TCCAGCCAAGTGCCGGTGAGCCA	65°	(Vera-Bizama et al., 2015)

2.5. Análisis de datos

A partir de los datos entregados por el termociclador se realizaron los análisis de expresión, mediante la cuantificación de la expresión relativa de ARNm por el método $\Delta\Delta CT$ (Livak & Schmittgen, 2001) y posteriormente se calculó el valor $2^{-\Delta\Delta CT}$. Luego de obtener los resultados, se realizó un análisis estadístico, utilizando la prueba ANOVA-2 vías. Finalmente, los datos fueron graficados en GraphPad Prism (Versión 10.3.0; GraphPad Software, Inc). Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) mediante un script en programa R, utilizando como variable los datos de expresión génica obtenidos por separado. Para *Salmo salar* se usaron cinco genes asociados a la respuesta inmune y al transporte de hierro, mientras que para *Caligus* se incluyeron tres genes vinculados al estrés oxidativo. Esto es para evaluar la correlación entre la expresión de genes y los diferentes tiempos para ambas especies.

RESULTADOS

3.1 Formular y evaluar la eficacia de una vacuna oral con IPath y catepsina expresadas en *P. pastoris* en el control de *Caligus* en salmón de Atlántico (*Salmo salar*).

Se evaluó la expresión de las proteínas recombinantes IPath y Catepsina expresadas en la cepa de *P. pastoris*. Para ello, se realizó un análisis de proteínas totales mediante electroforesis en gel SDS-PAGE (Fig. 5). Para catepsina (Fig. 5A) se observó una banda definida en ~36 kDa, con mayor intensidad en la fracción purificada (pocillo 2) y menor en el sobrenadante y pellet de la levadura transformada (pocillos 5 y 6), mientras que no se detectaron señales en la levadura sin inducir (pocillos 3 y 4). De forma similar, IPath (Fig. 5B) presentó una banda en ~20 kDa en la fracción purificada (pocillo 2) y en las muestras transformadas (pocillo 5 y 6), pero ausente en la levadura control (Pocillo 3 y 4). Estos resultados confirman la correcta expresión de ambas proteínas recombinantes en el sistema de *P. pastoris*.

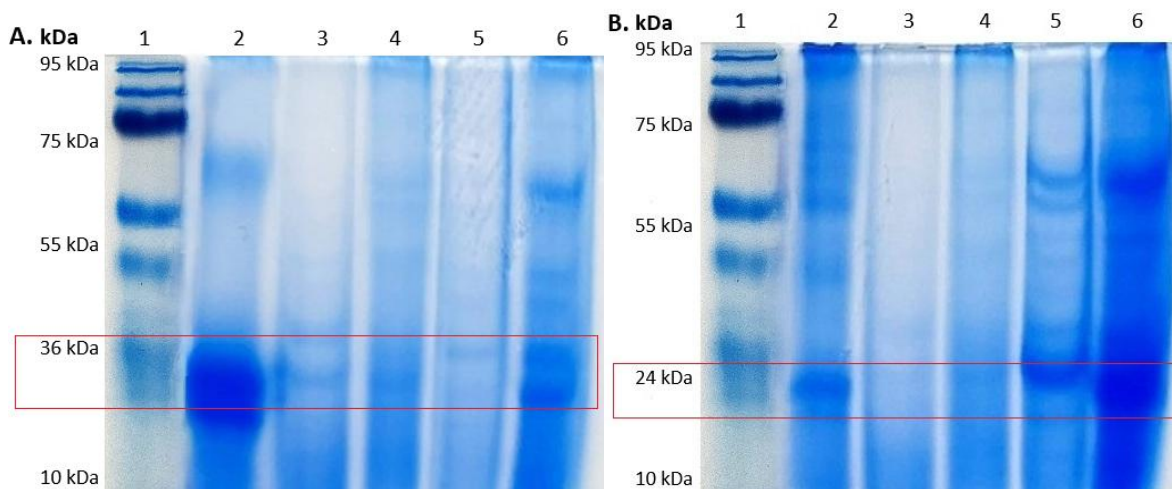


Figura 5. Análisis mediante SDS-PAGE de *P. pastoris* activada recombinante expresando proteína catepsina (A) y ferritina (IPath) (B). Pocillo 1A: marcador de peso molecular (kDa); Pocillo 2A: control de proteína purificada de catepsina; Pocillo 3 y 4A: sobrenadante y pellet de *P. pastoris* sin inducir; Pocillo 5 y 6A: sobrenadante y pellet de *P. pastoris* inducida expresando catepsina. Pocillo 1B: marcador de peso molecular (kDa); Pocillo 2B: control de proteína purificada de ferritina; Pocillo 3 y 4B: sobrenadante y pellet de *P. pastoris* sin inducir; Pocillo 5 y 6B: sobrenadante y pellet de *P. pastoris* inducida expresando IPath.

Índice de apetencia e índice de condición de Fulton.

En relación con el registro diario del índice de apetencia, se observó que el apetito de los peces fue similar entre todos los grupos experimentales, con la categoría 3 correspondiente a alto apetito. En general, los individuos manifestaron una adecuada conducta de consumo de alimento a lo largo del ensayo.

El análisis del índice de condición de Fulton mostró que no hubo diferencias significativas entre el grupo control (Ctrl) y los peces pertenecientes a los distintos tratamientos de vacunación oral con *P. pastoris* recombinante (*Pp_Ctrl*, *Pp_IPath*, *Pp_Cath* y *Pp_IP+Cath*) ($p > 0,05$; ANOVA dos vías, Tukey-HSD) (Fig. 6). En todos los grupos se registraron valores cercanos a 1.0, lo que corresponde a peces en buen estado corporal. Estos resultados sugieren que la administración de las vacunas no tuvo un efecto adverso sobre la condición general de los ejemplares.

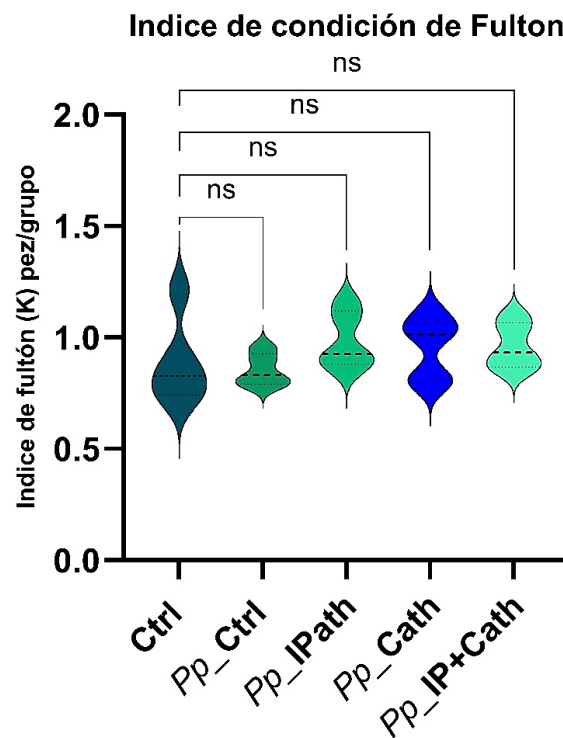


Figura 6. Índice de condición de Fulton (K) en salmón del Atlántico (*S. salar*). El eje X muestra los diferentes grupos experimentales (Ctrl, *Pp_Ctrl*, *Pp_IPath*, *Pp_Cath*, *Pp_IP+Cath*), mientras que el eje Y representa los valores del índice de Fulton por pez en cada grupo (n=10).

Para determinar el efecto protector de la vacunación oral, se realizó el conteo de *C. rogercresseyi* (hembras y machos) a los dos días posteriores al término de la inmunización simultánea (31 días) en todos los grupos experimentales (Fig. 7A, B y C). En el análisis del total de ectoparásitos (hembras + machos) (Fig. 7A), los grupos *Pp_IPath* y *Pp_IP+Cath* presentaron la mayor carga parasitaria, alcanzando un promedio cercano a 47 piojos por pez, mientras que *Pp_Cath* mostró valores intermedios con 25 piojos por pez. En contraste, el grupo *Pp_Ctrl* presentó la menor abundancia, con un promedio de 18 piojos por pez, diferencia que resultó estadísticamente significativa en comparación con el grupo control (Ctrl) ($p < 0,01$). Al analizar el conteo de solo hembras (Fig. 7B), se observó un patrón similar al análisis total de piojos hembras + machos (Fig. 7A), destacando nuevamente el grupo *Pp_Ctrl* con una reducción significativa en la abundancia parasitaria (promedio de 16 piojos por pez) respecto al control ($p < 0,01$). En el caso del conteo de solo machos (Fig. 7C), no se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales y control ($p > 0,05$). No obstante, en los tres análisis (total H+M, hembras y machos) se observó que la proporción de machos fue consistentemente menor que la de hembras. En conjunto, estos resultados indican que únicamente el tratamiento *Pp_Ctrl* presentó una reducción significativa en la abundancia total de *C. rogercresseyi*, especialmente en hembras, en comparación con el grupo control.

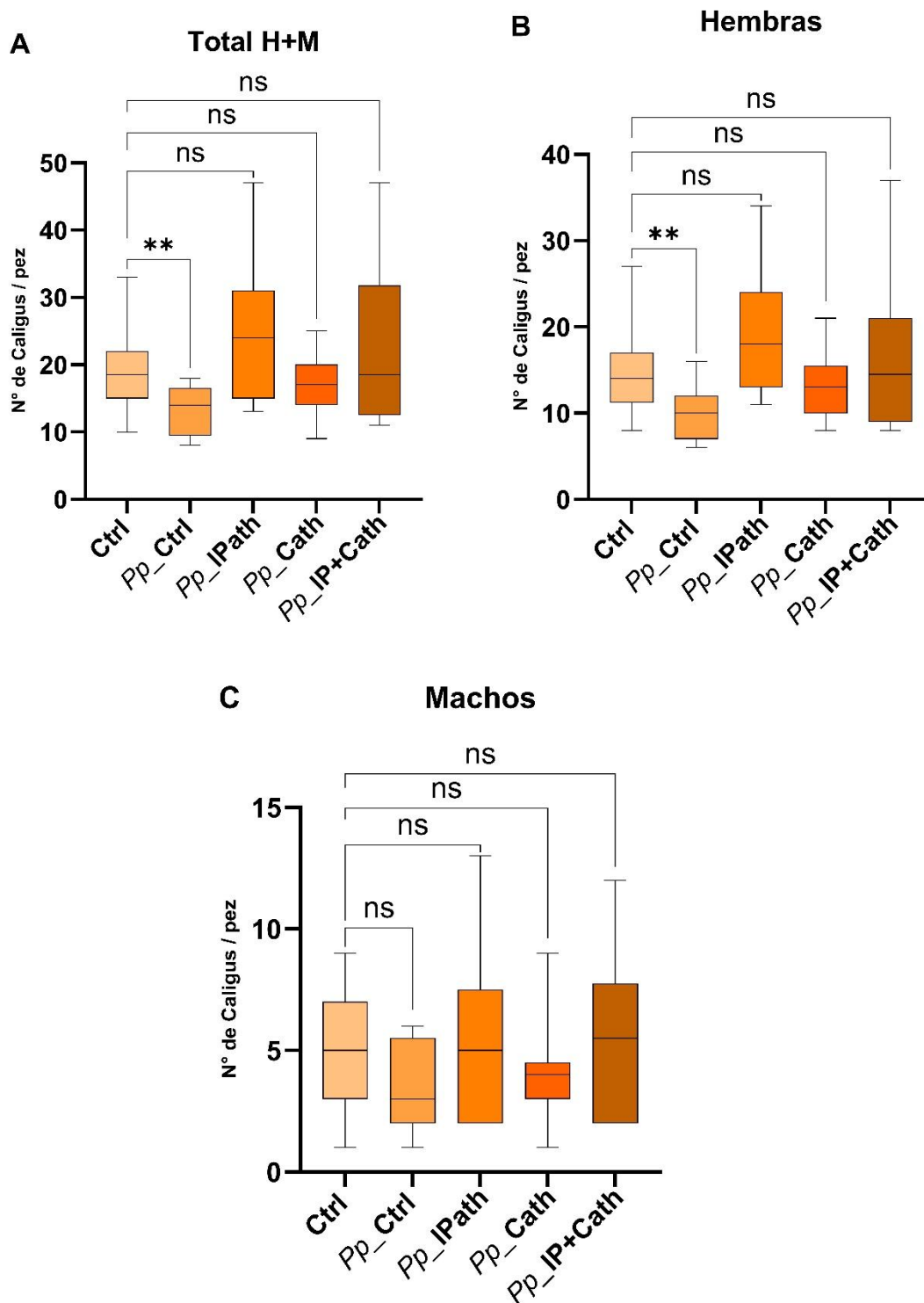


Figura 7. Conteo de Caligus por pez evaluado por grupo experimental luego de dos días de la inmunización. A) Conteo total de Caligus hembras + machos; B) Caligus hembras; C) Caligus Machos. La barras verticales indican la media aritmética y los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0,01$) mientras que “n” indica ausencia de significancia.

3.2. Evaluación de genes de respuesta inmune y transporte de hierro en *S. salar* inmunizados con vacuna oral con *P. pastoris* expresando IPath y catepsina infestados con *C. rogercresseyi*.

El efecto de la inmunización con *Pichia pastoris* recombinante, expresando las proteínas IPath y Catepsina, fue evaluado mediante el análisis de la expresión relativa de los genes IL-1 β , COX-2 e IgT, relacionados con la respuesta inmune y Ferritina M como transporte de hierro, en piel y riñón anterior de salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

En el tejido de piel de *Salmo salar*, la expresión génica asociada a la respuesta inmune (IL-1 β , COX-2 e IgT) y al transporte de hierro (Ferritina M) mostró variaciones significativas entre los grupos experimentales (Fig. 8). Los peces inmunizados con la formulación *Pp_IPath* presentaron una expresión marcada de IL-1 β ($p < 0,0001$), COX-2 ($p < 0,001$) e IgT ($p < 0,0001$) en comparación con ambos controles (Ctrl y *Pp_Ctrl*), evidenciando una activación de la respuesta inmune. En el caso de Ferritina M, se observó un aumento significativo en los grupos *Pp_IPath* y *Pp_Cath* ($p < 0,01$), mientras que el grupo combinado *Pp_IP+Cath* presentó niveles reducidos de expresión en todos los genes evaluados. Estos resultados indican que la vacuna experimental basada en la proteína IPath (*Pp_IPath*) fue la más efectiva en inducir una respuesta inmune positiva a nivel de piel.

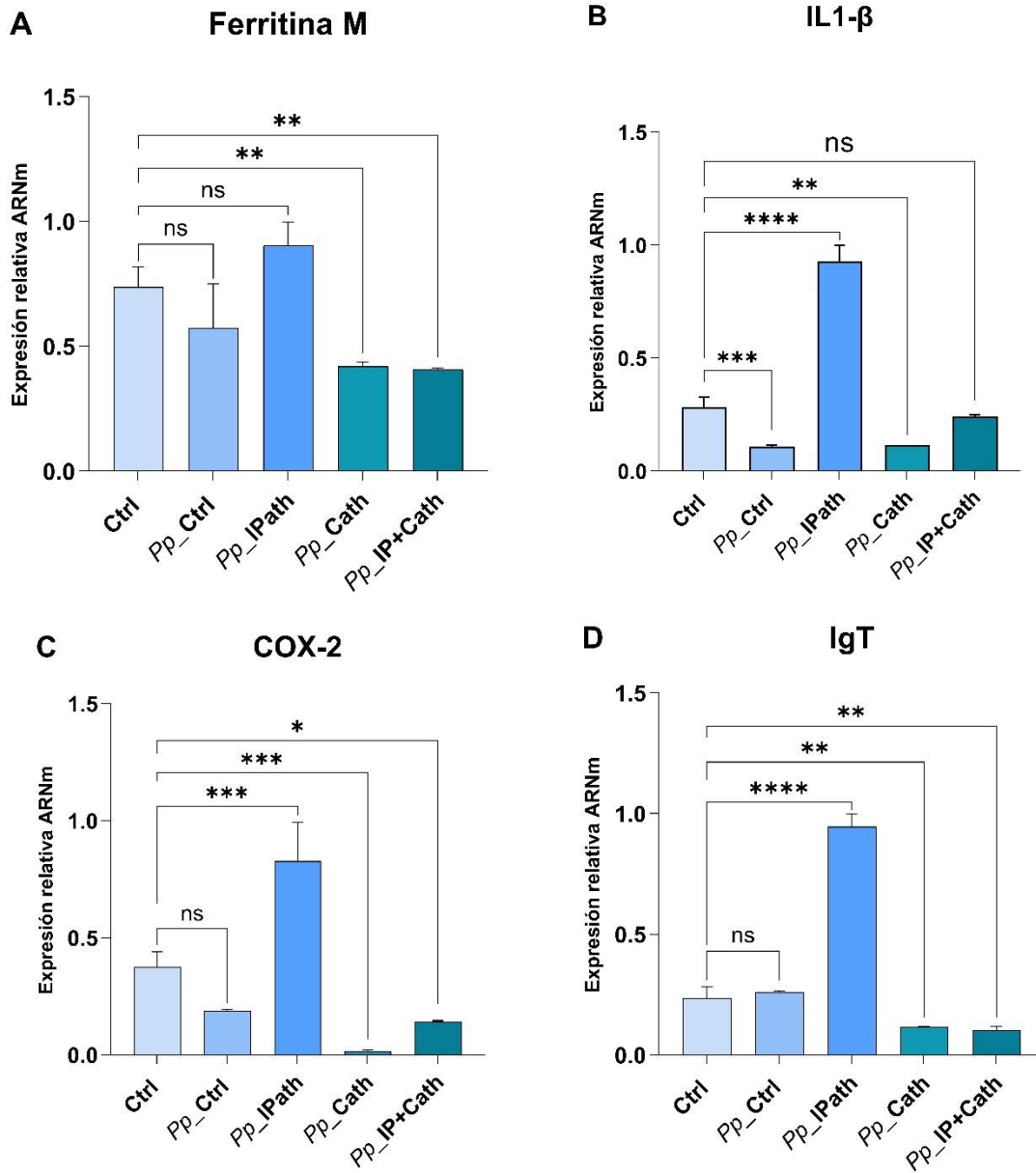


Figura 8. Niveles de expresión relativa ARNm para Ferritina M, IL-1 β , COX-2 e IgT en piel de *S. salar*, después de una infestación con *C. rogercresseyi* y posterior vacunación simultánea con *P. pastoris* viva recombinante expresando IPath (*Pp_IPath*), catepsina (*Pp_Cath*) y un grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) junto con dos grupos controles; Ctrl (alimento sin antígeno) y *Pp_Ctrl* (alimento solo con levadura). El nivel de expresión se normalizó por el control endógeno β -actina. Las barras verticales representan la media aritmética, (*) representa diferencias con $p < 0,05$ y (ns) representa no significativo, diferencias con $p > 0,05$; ANOVA 2 vías; Tukey-HSD.

En el riñón anterior de *Salmo salar*, la expresión relativa de genes asociados a la respuesta inmune y al transporte de hierro presentó variaciones significativas entre los grupos experimentales (Fig. 9). En el caso de Ferritina M, el grupo control (Ctrl) presentó la mayor expresión relativa, la cual fue significativamente superior ($p < 0,0001$) en comparación con todos los grupos vacunados (*Pp_Ctrl*, *Pp_IPath*, *Pp_Cath* y *Pp_IP+Cath*). Para IL-1 β , se observó una reducción significativa de la expresión en los grupos vacunados respecto al control ($p < 0,001$). No obstante, el grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) presentó un aumento en la expresión en comparación con *Pp_Ctrl* y *Pp_IPath* ($p < 0,01$), aunque sin alcanzar los niveles observados en el grupo control. En COX-2, el grupo *Pp_Ctrl* mostró una mayor expresión en comparación con el control ($p < 0,01$), mientras que las formulaciones vacunales no evidenciaron diferencias significativas (ns). Finalmente, en IgT, los grupos *Pp_IPath* y *Pp_Cath* presentaron niveles de expresión similares al control (ns), en comparación con el grupo combinado (*Pp_IP+Cath*), que presentó una disminución significativa en la expresión relativa ($p < 0,0001$). En conjunto, estos resultados indican que la inmunización oral con *Pichia pastoris* recombinante moduló de manera diferencial la expresión de genes vinculados a la respuesta inmune y al transporte de hierro en el riñón anterior de *S. salar*, en comparación con la marcada represión observada en el grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) frente a los genes analizados.

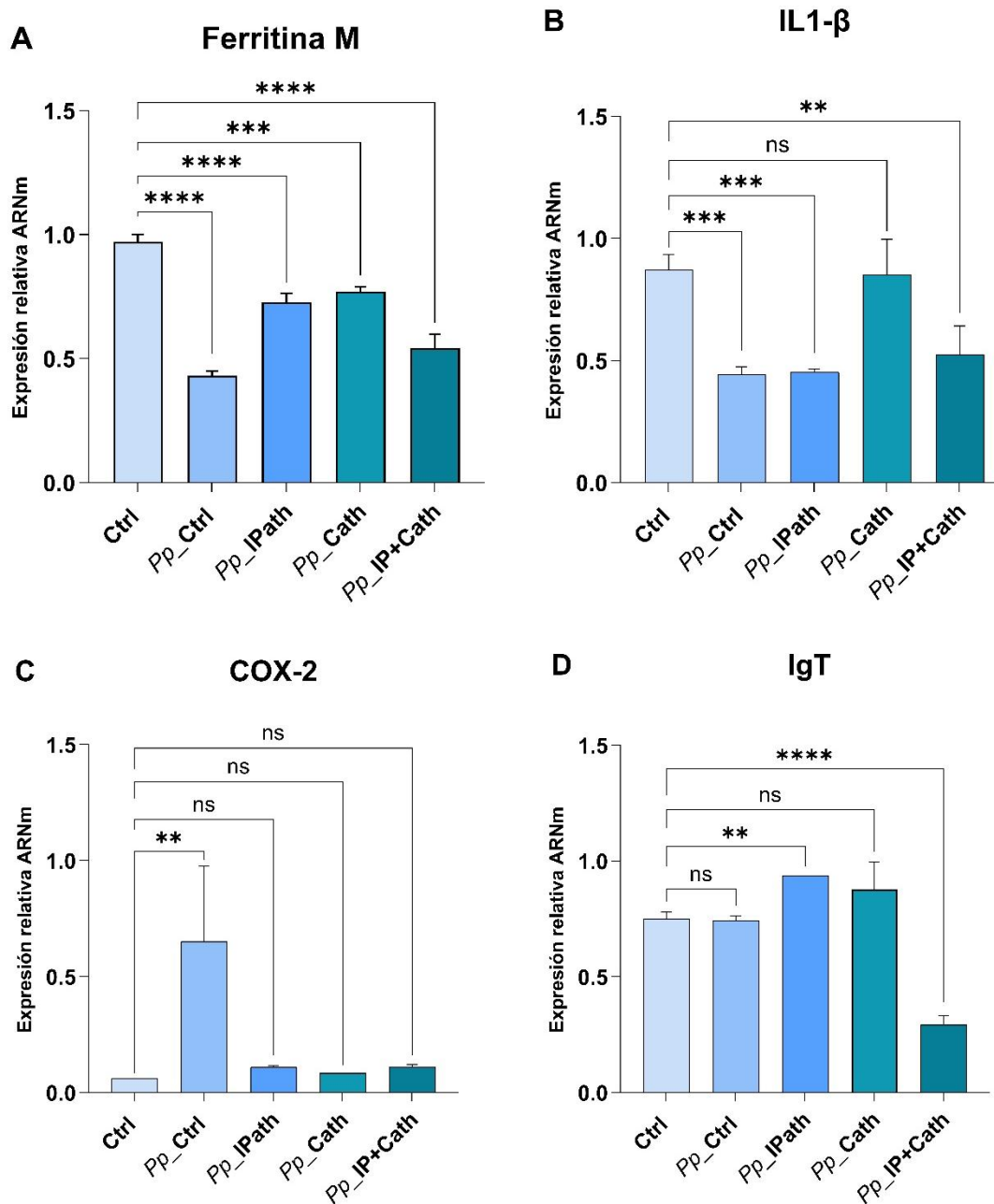


Figura 9. Niveles de expresión relativa ARNm para Ferritina M, IL-1 β , COX-2 e IgT en riñón anterior de *S. salar*, después de una infestación con *C. rogercresseyi* y posterior vacunación simultánea con *P. pastoris* viva recombinante expresando IPath (*Pp_IPath*), catepsina (*Pp_Cath*) y un grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) junto con dos grupos controles; Ctrl (alimento sin antígeno) y *Pp_Ctrl* (alimento solo con levadura). El nivel de expresión se normalizó por el control endógeno del factor de elongación β -actina. Las barras verticales representan la media aritmética, (*) representa diferencias con $p < 0,05$ y (ns) representa no significativo, diferencias con $p > 0,05$; ANOVA 2 vías; Tukey-HSD.

El análisis de componentes principales (PCA) en piel (Fig. 10A) mostró dos factores principales que explican conjuntamente una variabilidad de expresión del 98.1%, representando el primer componente principal (Dim 1) el 91.6% y el segundo componente principal (Dim 2) el 6.5%. Se demostró que el grupo Ctrl, presentó una mayor asociación en el gen ferritina M y parte del sistema inmunológico como COX-2. El grupo *Pp_Ctrl* mostró un patrón cercano al de Ctrl. Para los grupos *Pp_Cath* y *Pp_IP+Cath* no se observa asociación con genes de respuesta inmune como IL-1 β e IgT, ubicándose en una zona del PCA distante a los principales ejes de variabilidad. En contraste, el grupo *Pp_IPath* se posicionó de manera diferenciada, con clara asociación a los genes inmunes IgT e IL-1 β , evidenciando una mayor activación de la inmunidad adaptativa e inflamatoria.

Para el análisis de componentes principales (PCA) en riñón anterior (Fig. 10B) mostró dos factores principales que explican conjuntamente una variabilidad de expresión del 84.7%, representando el primer componente principal (Dim 1) el 58.9% y el segundo componente principal (Dim 2) el 25.8%. Se demostró que el grupo Ctrl, presentó una mayor asociación en el gen IL-1 β . El grupo *Pp_Ctrl* se vinculó principalmente con COX-2. Para el grupo *Pp_Cath* presentó asociación directa con la expresión de Ferritina M, demostrando una regulación del metabolismo del hierro. Por su parte, el grupo *Pp_IPath* se ubicó en una zona intermedia del PCA, sin asociación hacia ninguno de los genes. Finalmente, el grupo *Pp_IP+Cath* se separó de los demás tratamientos, sin mostrar relación clara con genes específicos.

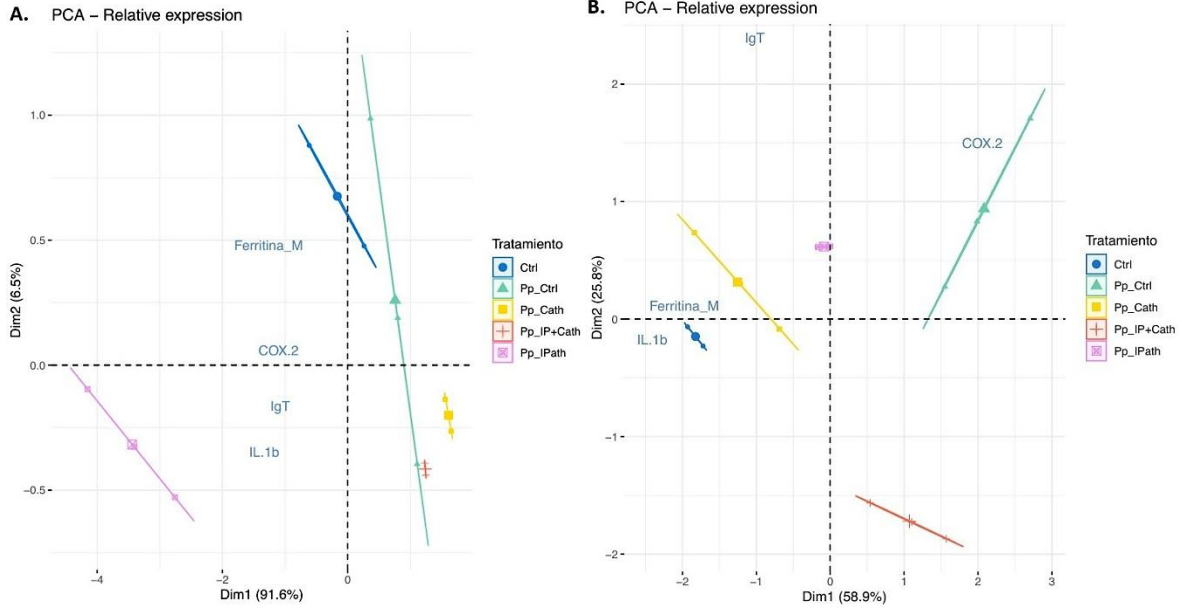


Figura 10. Análisis de componentes principales (PCA) para cuatro genes relacionados con la respuesta inmune (IL-1b, COX-2, IgT) y transporte de hierro, (Ferritina M), expresados en piel (A) y en riñón anterior (B) en peces (*S. salar*) vacunados vía oral con *P. pastoris* viva recombinante expresando IPath y catepsina (*Pp_IPath*, *Pp_Cath*) y un grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) junto a dos grupos control (Ctrl, *Pp_Ctrl*). Los valores de expresión relativa se utilizaron como variable dependiente, mientras que la variable independiente correspondió a los diferentes tiempos.

3.3. Evaluación de genes de estrés oxidativo en *C. rogercresseyi* extraídos de *S. salar* inmunizados con vacuna oral *P. pastoris* recombinante que expresa proteína IPath y catepsina.

Se analizaron los niveles de expresión relativa de genes asociados al estrés oxidativo (ferritina, catalasa y SOD) en *C. rogercresseyi* recolectados desde peces inmunizados, en dos tiempos de muestreo: 31 dpi (Fig. 11A, B y C) y 61 dpi (Fig. 11D, E y F). Los resultados evidenciaron variaciones significativas en la expresión génica entre los grupos experimentales en comparación con el control (Ctrl).

En el 31 dpi, la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo en piojos de mar mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales. Para ferritina, se observó un aumento de la expresión en los parásitos provenientes de peces vacunados con *Pp_Ctrl* ($p < 0,0001$) y *Pp_IPath* ($p < 0,001$), mientras que los piojos del grupo *Pp_Cath* presentaron una reducción significativa en la expresión en comparación con el control (Ctrl). En el caso de catalasa (CAT), los niveles fueron significativamente más altos en los parásitos del grupo *Pp_IPath* ($p < 0,0001$), en contraste con una disminución en *Pp_Ctrl* ($p < 0,05$). Por último, para SOD, se detectó un aumento significativo en los piojos provenientes de peces del grupo *Pp_Ctrl* ($p < 0,001$) y *Pp_IP+Cath* ($p < 0,0001$), mientras que los grupos *Pp_IPath* y *Pp_Cath* no mostraron diferencias significativas respecto al control (Ctrl).

A los 61 dpi, la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo en piojos de mar mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales. Para ferritina, se observó un aumento de la expresión en los parásitos provenientes de peces vacunados con *Pp_Ctrl* ($p < 0,0001$), mientras que los piojos del grupo *Pp_IPath*, *Pp_Cath* y *Pp_IP+Cath* presentaron una reducción significativa de la expresión respecto al control (Ctrl). Para catalasa (CAT), los niveles fueron significativamente más altos en los parásitos del grupo *Pp_Ctrl* ($p < 0,0001$), en contraste con una disminución significativa en *Pp_IPath* ($p < 0,001$). Por último, para SOD, se detectó un aumento significativo en *Pp_Ctrl* ($p < 0,005$) y una mayor expresión en *Pp_IPath* ($p < 0,0001$). Por el contrario, el grupo *Pp_IP+Cath*, presentó una disminución significativa en la expresión de este gen ($p < 0,0001$), mientras que *Pp_Cath* no mostró diferencias significativas respecto al control (Ctrl).

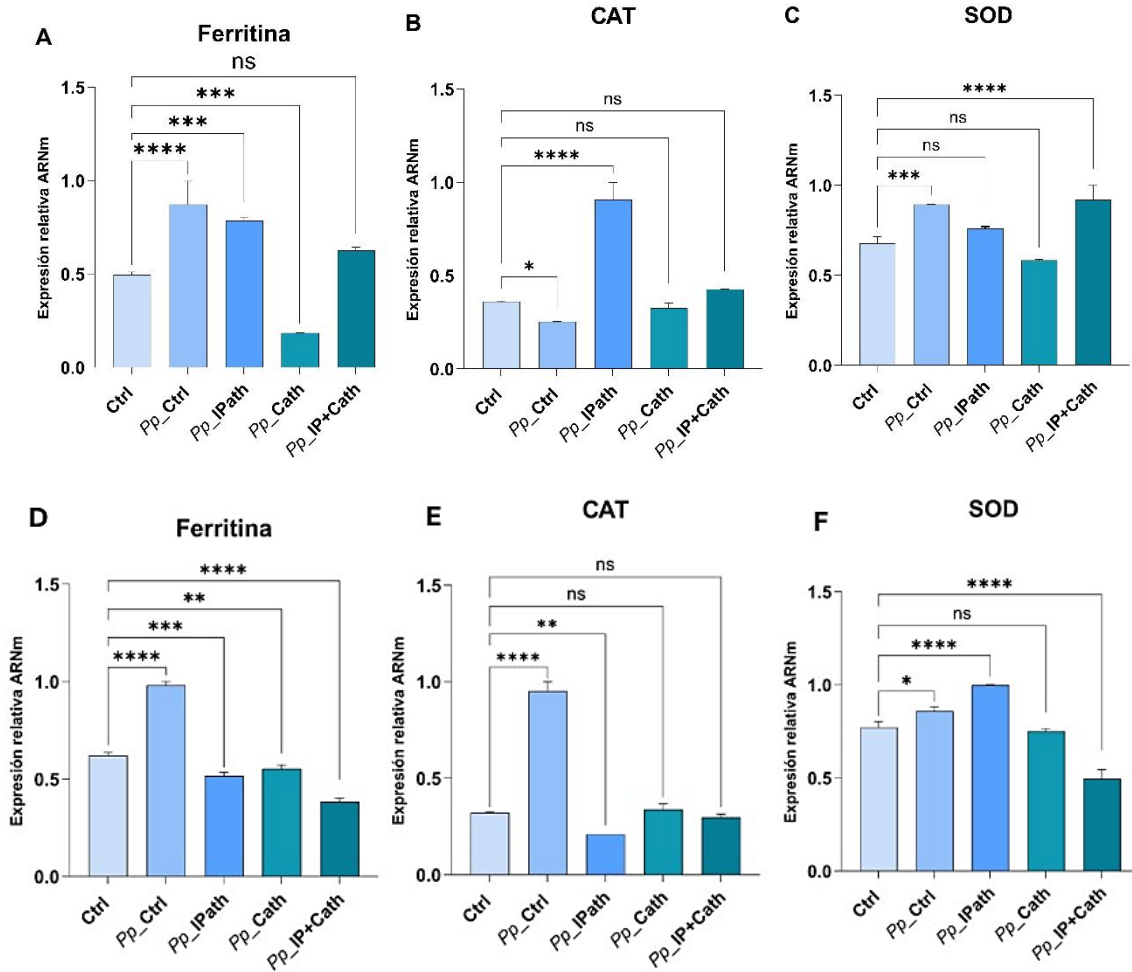


Figura 11. Niveles de expresión relativa ARNm en 31 dpi (A, B y C) y 61 dpi (D, E y F) para ferritina, catalasa y SOD en *C. rogercresseyi* de peces (*S. salar*) inmunizados con *P. pastoris* viva recombinante expresando IPath (*Pp_IPath*), catepsina (*Pp_Cath*) y un grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) junto con dos grupos control: Ctrl (Alimento sin antígeno) y *Pp_Ctrl* (alimento solo con levadura). El nivel de expresión se normalizó por el control endógeno b-actina. Las barras verticales representan la media aritmética y los asteriscos indican diferencias significativas y “ns” indican no significativo de expresión de un gen entre cada condición ($p < 0.05$) (Anova-2 vías).

El análisis de componentes principales (PCA) en *C. rogercresseyi* correspondiente a los 31 dpi (Fig. 12A) explicó una variabilidad conjunta del 94.3%, donde el primer componente (Dim1) representó el 60.8% y el segundo (Dim2) el 33.5%. El grupo *Pp_Ctrl* se asoció fuertemente con la expresión de SOD, mientras que el grupo *Pp_IP+Cath* también mostró relación con este gen, aunque en una zona diferenciada dentro del PCA. En contraste, el grupo *Pp_IPath* se ubicó en una región separada y se asoció principalmente con catalasa. Por otro lado, los grupos *Ctrl* y *Pp_Cath* se posicionaron cercanos al origen de los ejes, con una leve relación con ferritina, indicando una respuesta menos marcada en comparación con los demás tratamientos. El PCA en *C. rogercresseyi* para 61 dpi (Fig. 12B) explicó una variabilidad acumulada del 99.2%, de la cual el primer componente (Dim1) representó el 70% y el segundo (Dim2) el 29.2%. El grupo *Pp_IP+Cath* se diferenció del resto, mostrándose asociado a la expresión de SOD, mientras que el grupo *Pp_IPath* se relacionó con catalasa. En tanto, el grupo *Pp_Ctrl* se vinculó con ferritina y catalasa. Los grupos *Ctrl* y *Pp_Cath* se agruparon próximos entre sí, con asociación principalmente hacia ferritina.

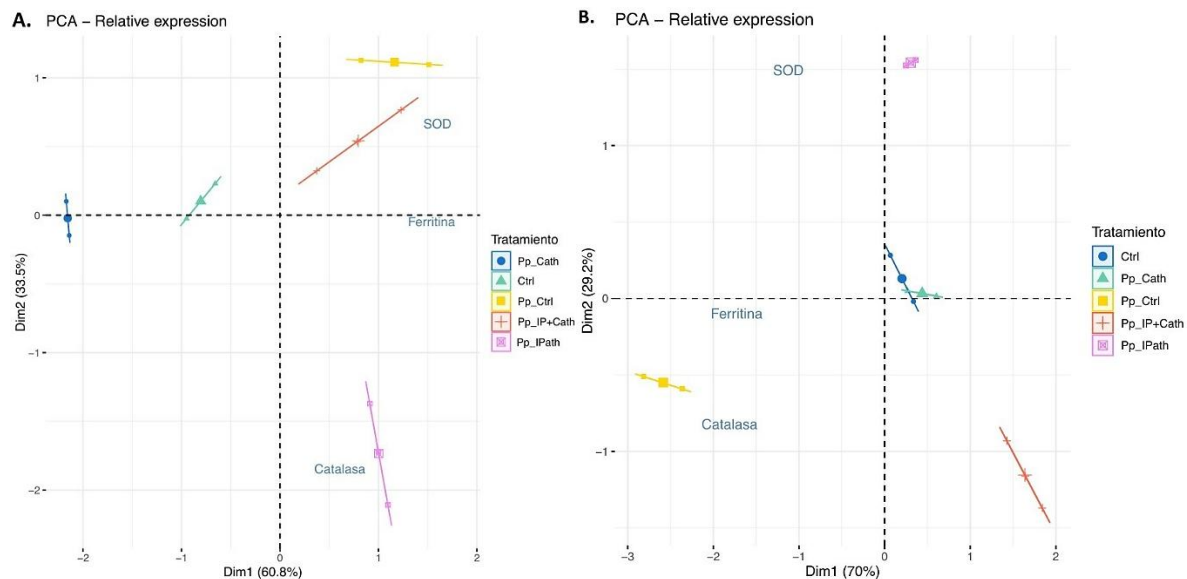


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) para tres genes relacionados con el estrés oxidativo (Ferritina, catalasa y SOD) expresados en *C. rogercresseyi* de peces (*S. salar*) vacunados vía oral con *P. pastoris* viva recombinante expresando IPath y catepsina (*Pp_IPath*, *Pp_Cath*) y un grupo combinado (*Pp_IP+Cath*) junto a dos grupos control (*Ctrl*, *Pp_Ctrl*). Realizado en dos tiempos de muestreo, 31 dpi (A) y 61 dpi (B). Los valores de expresión relativa se utilizaron como variable dependiente, mientras que la variable independiente correspondió a los diferentes tiempos.

DISCUSIÓN

La caligidosis, enfermedad causada por *C. rogercresseyi*, es multifactorial y combina daño físico (erosiones dérmicas), estrés fisiológico y alteraciones inmunológicas en *Salmo salar*, con consecuencias productivas y sanitarias importantes para la industria salmonera (Gallardo-Escarate et al., 2019). Diversos esfuerzos se han generado para el control de esta enfermedad. Bajo este contexto, este estudio evaluó el uso de una levadura (*P. pastoris*) recombinante que expresa IPath y catepsina, dos antígenos previamente evaluados por el grupo de investigación INCAR como vacuna inyectable, que han demostrado alta eficacia en la reducción de la carga parasitaria, como herramienta de inmunización de *S. salar* a través de vacunas de tipo oral y su efecto en la modulación de genes de respuesta inmune en los peces. Además, en los Caligus recolectados de estos peces se evaluó la carga parasitaria y la modulación de genes asociados a la respuesta al hospedero.

Evaluación de eficacia de la vacuna oral.

Previamente, en el laboratorio, las proteínas recombinantes IPath y Catepsina fueron evaluadas en formulación inyectable. La proteína quimérica IPath, diseñada para modular la homeostasis del hierro, demostró una reducción de hasta un 97% en la carga parasitaria (Valenzuela-Munoz et al., 2021). De manera similar, el uso de catepsina recombinante de *C. rogercresseyi*, proteasa del parásito y moduladora de la inflamación, ha mostrado capacidad inmunogénica luego de 400 UTAs post-inmunización, registrando una disminución del 52% en los estadios parasitarios tempranos (chalimus I-II) de *C. rogercresseyi* (Casuso et al., 2022). Los resultados de este seminario mostraron que la vacunación oral con *P. pastoris* recombinante viva que expresa los antígenos IPath y catepsina no generó una reducción significativa de la carga parasitaria en *S. salar*. Esto contrasta con los estudios de vacunación inyectable. No obstante, los conteos de piojos de mar a los 31 dpi evidenciaron menor abundancia de machos en comparación con hembras. Además, solo el grupo *Pp_Ctrl* (levadura sin antígeno) mostró una reducción estadísticamente significativa en la abundancia total (Fig. 7A) y en el número de hembras (Fig. 7B) con respecto al control no tratado (Ctrl). Aunque no se observó un efecto protector directo frente a *C. rogercresseyi*, sí se evidenció una modulación de la respuesta inmune en el hospedador, particularmente asociada al transporte de hierro y respuesta inmune, al incrementar la expresión del gen de ferritina M e

IgT. Esto sugiere que la levadura recombinante expresando IPath actuó como un inmunoestimulante. En este contexto, estudios previos respaldan el potencial de *P. pastoris* como vehículo de administración oral de antígenos. Por ejemplo, Embregts et al. (2019) demostraron que *P. pastoris* modificada para producir una proteína verde fluorescente (GFP) como antígeno, constituye un vehículo prometedor para la administración oral de antígenos. Esta estrategia fue evaluada en peces en etapas larvales de platija (*Platichthys flesus*) y adultos de carpa (*Cyprinus carpio L.*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), logrando inducir tanto una respuesta inmune local en mucosas como una respuesta sistémica. Además, se ha observado que esta levadura protege al antígeno frente a la degradación en el tracto gastrointestinal (Embregts et al., 2019). Los resultados de este seminario coinciden con lo anterior, evidenciando que la levadura cumple un doble rol, como vector de entrega del antígeno y como adyuvante inmunológico intrínseco, reforzando la activación de células inmunes en el intestino de los peces. Esto se refleja en el aumento de expresión de genes de respuesta inmune en piel y riñón anterior.

En relación con el uso de vacunas orales en acuicultura, se han explorado otras formulaciones que muestran un efecto inmunoestimulante, aunque con eficacia limitada. Jones (2022) evaluó en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) una vacuna oral basada en bacterias inactivadas de *Aeromonas salmonicida* encapsuladas en partículas de alginato. La formulación indujo una respuesta inmune específica y otorgó una protección significativa frente a la furunculosis, con supervivencias relativas del 50 % a las 4 semanas y 40,5 % a las 13 semanas post-vacunación. Incluso las partículas de alginato sin antígeno mostraron un efecto adyuvante, alcanzando un RPS del 23,6 % en los desafíos tempranos, lo que evidencia un potencial inmunoestimulante de la matriz encapsulante (Jones, 2022). No obstante, la protección alcanzada fue inferior a la observada en vacunas inyectables, y su eficacia disminuyó con el tiempo, lo que sugiere que la optimización de la formulación y los regímenes de administración son necesarios para lograr una inmunización oral más duradera (Jones, 2022). En la misma línea, Sotomayor-Gerding et al. (2020) evaluaron una vacuna oral con antígenos inactivados de *Piscirickettsia salmonis* encapsulados en micropartículas de alginato para inmunizar salmón del Atlántico (*Salmo salar*), comparándola con una vacuna inyectable comercial (Sotomayor-Gerding et al., 2020). La administración vía oral en el alimento durante 10 días, en dosis equivalentes al 30% y al 100% de la formulación

inyectable comercial, demostró inducir una respuesta humoral significativa, alcanzando niveles de IgM comparables a la vacunación inyectable comercial, sin afectar parámetros productivos (Sotomayor-Gerding et al., 2020). En conjunto, los resultados obtenidos en este seminario, sumados con *A. salmonicida* y *P. salmonis*, confirman la brecha existente entre la eficacia de las vacunas inyectables y las limitaciones actuales de la vía oral. Tal como señalan Mutoloki et al., (2015) el uso de vacunas orales tipo subunitaria para el control de patógenos relevantes en acuicultura enfrenta desafíos conocidos como la degradación del antígeno en el tracto digestivo, la baja biodisponibilidad y la posibilidad de inducir tolerancia si la formulación no protege adecuadamente el antígeno. Además, la dosis, la frecuencia de administración y la matriz alimentaria son factores determinantes, pues condicionan la cantidad de antígeno que alcanza los sitios inductores de la respuesta inmune (Mutoloki et al., 2015). Una dosificación insuficiente o irregular puede generar respuestas subóptimas, mientras que la composición del alimento influye directamente en la liberación, estabilidad y absorción del antígeno. Estos problemas han sido observados en especies como salmón del Atlántico (*Salmo salar*) vacunado contra *Infectious Pancreatic Necrosis Virus* (IPNV), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) frente a *Lactococcus garvieae*, tilapia (*Oreochromis niloticus*) contra *Aeromonas hydrophila* y lubina asiática (*Lates calcarifer*) contra *Vibrio anguillarum*, donde la eficacia final de la vacuna depende en gran medida de la formulación y el sistema de administración (Mutoloki et al., 2015). En este seminario, la inclusión de vacuna en el alimento fue de apenas 1 %, con una tasa de alimentación de 1,6 %, lo que probablemente resultó insuficiente para inducir una respuesta inmune robusta. Coincidiendo con lo planteado por Kwong et al. (2023), la eficacia de las vacunas orales depende en gran medida de la preservación del antígeno y la dosis administrada (Kwong et al., 2023). El futuro del desarrollo de vacunas orales en salmonicultura debe considerar con especial énfasis plataformas para bioencapsular y estrategias prime-boost, como pasos necesarios hacia vacunas eficaces contra la Caligidosis. Por ejemplo, estudios recientes han propuesto estrategias avanzadas para vacunas orales, incluyendo el uso de nanopartículas, bioencapsulación y adyuvantes novedosos como flagelina bacteriana, CpG-ODN o vesículas de membrana externa, que han demostrado mejorar la inmunidad mucosal (Zhong et al., 2024). Asimismo, plataformas basadas en alginato han mostrado resultados alentadores en peces, ofreciendo protección parcial y estimulación inmune incluso en ausencia de antígeno,

lo que sugiere un efecto adyuvante intrínseco de la matriz (Jones, 2022).

Modulación de la respuesta inmune en peces vacunados vía oral.

La piel en peces cumple un rol fundamental como primera barrera física, química e inmunológica frente a patógenos y parásitos (Secombes & Wang, 2012). Además de proteger frente a agresiones mecánicas, constituye un tejido inmunológicamente activo gracias a la presencia de células inmunocompetentes como linfocitos T y B, macrófagos, células dendríticas y granulocitos, que participan en el reconocimiento y eliminación de agentes externos (Olabuenaga, 2000), también en la producción de mucosidad (principalmente IgM e IgT), y secreción de moléculas antimicrobianas (Tiralongo et al., 2020). En este contexto, al evaluar niveles de expresión genes de respuesta inmune en piel, como primer sitio de contacto con *C. rogercresseyi*, se observó un aumento en la expresión de genes proinflamatorios y adaptativos IL-1 β , COX-2 e IgT en los peces vacunados con *Pp_IPath* (Fig. 8). El aumento de la expresión de estos marcadores indica una combinación de respuesta innata (IL-1 β , COX-2) y movilización de la inmunidad mucosal (IgT), que en conjunto promueven el reclutamiento celular, producción de mediadores y generación de anticuerpos/mucinas que interfieren con la adherencia y alimentación del parásito (Valenzuela-Munoz et al., 2017). En paralelo, se observó un aumento en los niveles de expresión del gen Ferritina M relacionado con el transporte de hierro en los grupos *Pp_IPath* y *Pp_Cath*. Esta respuesta sugiere la activación de mecanismos de respuesta inmune nutricional, es decir, el hospedador moviliza proteínas de almacenamiento de hierro para reducir la fracción biodisponible que el parásito podría explotar (Valenzuela-Munoz et al., 2021). Dado que la ferritina posee una alta capacidad de almacenamiento de hierro intracelular (Ullah & Lang, 2023), su sobreexpresión en el tejido dérmico genera un microambiente local con menor disponibilidad de este micronutriente, lo que limita el acceso del ectoparásito a un recurso esencial para su metabolismo y proliferación (Valenzuela-Munoz et al., 2021). Como resultado, el aumento de ferritina en la piel de los peces vacunados no solo constituye una estrategia de inmunidad nutricional orientada a privar al parásito de hierro, sino que, también con la activación de una respuesta inflamatoria local, esto configura un mecanismo defensivo sinérgico en el que la inflamación dificulta la interacción del piojo en la epidermis y el secuestro de hierro restringe el componente nutricional crítico para la supervivencia del parásito (Gallardo-Escarate et al., 2019).

El riñón anterior es un órgano linfoide y metabólico central en peces, constituye el principal sitio de hematopoyesis y generación de células inmunocompetentes además, actúa como un centro de activación de la respuesta inmune adaptativa e innata (Zwollo et al., 2005). En el presente estudio, se detectó que el grupo vacunado con *Pp_Cath* indujo la mayor sobreexpresión de IL-1 β , mientras que *Pp_IPath* presenta incremento de expresión de Ferritina M por encima del grupo *Pp_Ctrl*, también se evidenció que ambos tratamientos (*Pp_IPath* y *Pp_Cath*) aumentaron en el gen IgT en distinto grado (Fig. 9). Estas respuestas se interpretan como una activación sistémica que complementa la defensa cutánea (Gallardo-Escarate et al., 2019). El riñón responde integrando señales inflamatorias y ajustando el metabolismo del hierro a escala corporal (Zwollo et al., 2005).

Las diferencias en los niveles de expresión de los genes evaluados en riñón y piel sugieren una divergencia funcional de los antígenos (Casuso et al., 2022). *IPath*, el cual fue diseñado bioinformáticamente para tener actividad quelante de hierro, modula con mayor fuerza las rutas de homeostasis del hierro (Valenzuela-Munoz et al., 2021), en cambio, catepsina, activa con más fuerza las vías proinflamatorias sistémicas (Maldonado-Aguayo et al., 2015). En conjunto con el análisis PCA el cual explicó el 84,7 % de la variabilidad. Explica de una manera más fácil cómo *Pp_IPath* se asoció con IgT, *Pp_Ctrl* con COX-2, *Pp_Cath* con Ferritina M, y el control presentó predominancia en IL-1 β y Ferritina M. Esto sugiere respuestas inmunológicas y de homeostasis del hierro diferenciadas según el antígeno administrado.

Estrés oxidativo en *C. rogercresseyi*

La selección de genes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ferritina corresponde a su rol esencial en la regulación del estrés oxidativo y el metabolismo del hierro, los cuales son procesos críticos en la interacción hospedador-parásito (Vera-Bizama et al., 2015). SOD y catalasa, conforman defensas antioxidantes primarias frente al exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), mientras que la ferritina regula la disponibilidad de hierro, indispensable para la supervivencia del parásito y para su capacidad de tolerar ambientes prooxidantes (Gallardo-Escarate et al., 2019; Valenzuela-Munoz et al., 2017).

En este estudio, los piojos recuperados de los peces inmunizados presentaron distintos niveles de expresión génica en función del antígeno y del tiempo de muestreo (31 dpi y 61 dpi). En ectoparásitos de peces tratados con *Pp_IPath* se observó un aumento en la expresión de SOD y CAT en determinados tiempos, mientras que en piojos de *Pp_Cath* se registró una disminución de ferritina a los 61 dpi (Fig. 11B). Por el contrario, el grupo *Pp_Ctrl* mostró un patrón alternativo de aumento de la expresión en algunos genes (Fig. 11A y B). Estas respuestas reflejan la necesidad del ectoparásito de contrarrestar ROS generados por la inflamación del hospedador y de ajustar su metabolismo férrico frente a la alteración de la disponibilidad de hierro (Valenzuela-Munoz et al., 2021). El análisis multivariado de componentes principales (PCA) reforzó estos hallazgos, ya que permitió observar una clara separación entre los grupos tratados (*Pp_Ctrl*, *Pp_IPath*, *Pp_Cath*, *Pp_IP+Cath*) y control (*Ctrl*) a lo largo de los tiempos experimentales. En particular, los piojos expuestos a *Pp_IPath* se agruparon en función de una mayor contribución de las variables asociadas a CAT y SOD, mientras que los de *Pp_Cath* se asociaron a cambios en ferritina a los 61 dpi. Esto evidencia que las modulaciones de los genes antioxidantes no ocurren de manera aislada, sino como un patrón coordinado de respuesta adaptativa frente a la presión inmune y nutricional impuesta por el hospedador (Boltaña et al., 2016; Vera-Bizama et al., 2015). Estos resultados son consistentes con lo reportado por Valentina-Muñoz et al. (2017), quienes destacaron que *C. rogercresseyi* activa rutas inmunes innatas (IMD y TLR) durante el proceso de interacción con el hospedero (Vera-Bizama et al., 2015), junto con genes antioxidantes y del secretoma, como serpinas y catepsinas, para sostener su supervivencia durante la infestación (Maldonado-Aguayo et al., 2015). La observación en la modulación de ferritina también refuerza la hipótesis de una competencia cruzada por el hierro entre hospedador y parásito, donde ambos incrementan sus mecanismos de secuestro férrico como estrategia de inmunidad nutricional (Gallardo-Escarate et al., 2019; Valenzuela-Munoz et al., 2017).

En conjunto, los resultados de este seminario sugieren que la vacunación oral con *P. pastoris* recombinante induce modulación inmunológica tanto a nivel local como sistémico. Provocó una activación inflamatoria local (IL-1 β , COX-2) y movilización de inmunidad mucosal (IgT) en la piel (Nunez-Acuna et al., 2016; Valenzuela-Muñoz et al., 2016). Además, generó una regulación sistémica del metabolismo del hierro (ferritina M) y la respuesta del parásito que integran defensas antioxidantes y manejo del hierro (Valenzuela-Munoz et al., 2021).

También la evidencia del PCA demuestra que estas respuestas conforman perfiles de expresión génica distintivos según el antígeno utilizado, apoyando la idea de que, aun sin una disminución inmediata en la carga parasitaria, la fitness del ectoparásito se ve comprometida, lo que constituye un paso relevante hacia estrategias de control más sostenibles de la Caligidosis.

CONCLUSIONES

1. En conjunto, estos resultados evidencian que la vacunación moduló la expresión génica en la piel y el riñón del salmón, destacando la activación de genes proinflamatorios (IL-1 β , COX-2), adaptativos (IgT) y de metabolismo del hierro (Ferritina M), con patrones diferenciales según el antígeno utilizado.
2. En el ectoparásito se observaron cambios en la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (SOD, CAT, ferritina), lo que evidencia un efecto indirecto de la inmunización del hospedador sobre la fisiología de *C. rogercresseyi*.
3. Si bien los resultados no reflejaron una protección efectiva en términos de reducción de la carga parasitaria, sí aportan evidencia sobre la capacidad de las vacunas orales con levaduras recombinantes para modular la respuesta inmune del hospedador y afectar al parásito a nivel molecular.
4. Los resultados respaldan el potencial del uso de *P. pastoris* como plataforma vacunal oral en salmonicultura, aunque se requiere optimizar la formulación, la dosificación y el uso de adyuvantes para incrementar su eficacia protectora frente a la caligidosis.

PROYECCIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación respaldan el potencial de *P. pastoris* viva recombinante como vehículo para el desarrollo de vacunas orales dirigidas al control de la caligidosis en salmón del Atlántico (*S. salar*). Sin embargo, aún se requiere continuar con la optimización de esta estrategia, considerando la estabilidad de los antígenos en el tracto gastrointestinal y la magnitud junto con la duración de la respuesta inmune inducida en el hospedador. Es por ello, que futuras investigaciones deberían enfocarse en sistemas de encapsulación que protejan los antígenos y potencien su inmunogenicidad, para asegurar una mayor eficacia protectora. Además, se plantea la necesidad de realizar nuevos ensayos experimentales para incrementar la eficacia, evaluando diferentes dosis, tiempos de inmunización y refuerzos, con la finalidad de determinar la aplicabilidad de esta vacuna en un escenario productivo.

Esta aproximación biotecnológica basada en levaduras recombinantes se proyecta como una herramienta de gran relevancia no solo para el control de *Caligus rogercresseyi*, sino también como plataforma adaptable frente a otros patógenos de importancia sanitaria en la salmonicultura. Su implementación contribuiría al fortalecimiento de un manejo sanitario más sustentable, reduciendo la dependencia de antiparasitarios químicos, disminuyendo el riesgo de resistencia y promoviendo prácticas de cultivo más responsables y alineadas con las demandas de sostenibilidad de la industria acuícola global.

BIBLIOGRAFÍA

- Barrett, L. T., Oppedal, F., Robinson, N., & Dempster, T. (2020). Prevention not cure: a review of methods to avoid sea lice infestations in salmon aquaculture [Review]. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2527–2543. <https://doi.org/10.1111/raq.12456>
- BCN. (2015). Resolución 13 EXENTA. Establece programa sanitario específico de vigilancia y control de caligidosis (psevc-caligidosis). deja sin efecto resolución n° 1.141 exenta, de 2012. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?i=1074098>
- Boltaña, S., Sanchez, M., Valenzuela, V., & Gallardo-Escárate, C. (2016). Density-dependent effects of *Caligus rogercresseyi* infestation on the immune responses of *Salmo salar*. *Fish & shellfish immunology*, 59, 365-374.
- Boxshall, G., & Bravo, S. (2000). On the identity of the common Caligus (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen systems in southern Chile [; Proceedings Paper]. *Contributions to Zoology*, 69(1-2), 137-146. <https://doi.org/10.1163/18759866-0690102015>
- Bravo, Dölz;, H., Silva;, M. T., Lagos;, C., Millanao;, A., & Urbina, M. (2005). Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. . https://www.subpesca.cl/fipa/613/articles-89033_informe_final.pdf
- Bravo, S., & Moya, J. (2024). Caligus en Chile: Un reto para la sostenibilidad de la industria.
- Bravo, S., & Ponce, N. (2022). Factores que perjudican la abundancia del Piojo de Mar. Instituto de Acuicultura; Universidad Austral de Chile. <https://issuu.com/verdiseno/docs/vd342022/s/15168373#:~:text=Efectos%20de%20la%20salinidad%20en%20la%20supervivencia%20de%20Caligus:&text=A%2015%20E%80%B0%20se%20ha,adaptando%20a%20una%20menor%20salinidad.>
- Carpio, Y., Basabe, L., Acosta, J., Rodriguez, A., Mendoza, A., Lisperger, A., Zamorano, E., Gonzalez, M., Rivas, M., Contreras, S., Haussmann, D., Figueroa, J., Osorio, V. N., Asencio, G., Mancilla, J., Ritchie, G., Borroto, C., & Pablo Estrada, M. (2011). Novel gene isolated from *Caligus rogercresseyi*: A promising target for vaccine development against sea lice. *Vaccine*, 29(15), 2810-2820. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.109>
- Carvajal, J., Gonzalez, L., & George-Nascimento, M. (1998). Native sea lice (Copepoda: Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile. *Aquaculture*, 166(3-4), 241-246. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00301-9](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00301-9)
- Casuso, A., Valenzuela-Munoz, V., Benavente, B. P., Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escarate, C. (2022). Exploring Sea Lice Vaccines against Early Stages of Infestation in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Vaccines*, 10(7), Article 1063. <https://doi.org/10.3390/vaccines10071063>
- Contreras, M., Karlsen, M., Villar, M., Olsen, R. H., Leknes, L. M., Furevik, A., Yttredal, K. L., Tartor, H., Grove, S., Alberdi, P., Brudeseth, B., & de la Fuente, J. (2020). Vaccination with Ectoparasite Proteins Involved in Midgut Function and Blood Digestion Reduces Salmon Louse Infestations. *Vaccines*, 8(1), Article 32. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010032>
- Dickerson, H., & Clark, T. (1998). *Ichthyophthirius multifiliis*: a model of cutaneous infection and immunity in fishes [Review]. *Immunological Reviews*, 166, 377-384. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01277.x>
- Du, Y., Hu, X., Miao, L., & Chen, J. (2022). Current status and development prospects of

- aquatic vaccines [Review]. *Frontiers in Immunology*, 13, Article 1040336. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1040336>
- Embregts, Reyes-Lopez, F., Pall, A. C., Stratmann, A., Tort, L., Lorenzen, N., Engell-Sorensen, K., Wiegertjes, G. F., Forlenza, M., Sunyer, J. O., & Parra, D. (2019). *Pichia pastoris* yeast as a vehicle for oral vaccination of larval and adult teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 85, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.033>
- Embregts, C. W. E., & Forlenza, M. (2016). Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. *Developmental and Comparative Immunology*, 64, 118-137. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.024>
- Erden Karaoglan, F., & Karaoglan, M. (2022). Applicability of the heterologous yeast promoters for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(21), 7073-7083. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12183-8>
- FIPA. (2025). Informe final. Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura (FIPA) https://www.subpesca.cl/fipa/613/articulos-117624_informe_final.pdf
- Froeschke, & Goetz von der Heyden, S. (2014). A Review of Molecular Approaches for Investigating Patterns of Coevolution in Marine Host-Parasite Relationships. In D. Rollinson (Ed.), *Advances in Parasitology*, Vol 84 (Vol. 84, pp. 209-252). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800099-1.00004-1>
- Gallardo-Escarate, C., Valenzuela-Munoz, V., & Nunez-Acuna, G. (2014). RNA-Seq Analysis Using De Novo Transcriptome Assembly as a Reference for the Salmon Louse *Caligus rogercresseyi*. *Plos One*, 9(4), Article e92239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092239>
- Gallardo-Escarate, C., Valenzuela-Munoz, V., Nunez-Acuna, G., Carrera, C., Teresa Goncalves, A., Valenzuela-Miranda, D., Benavente, B. P., & Roberts, S. (2019). Catching the complexity of salmon-lice interactions [; Proceedings Paper]. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 199-209. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.065>
- González, L., & Carvajal, J. (2003). Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220(1-4), 101-117. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(02\)00512-4](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(02)00512-4)
- Hollenberg, C., & Gellissen, G. (1997). Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts [Review]. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(5), 554-560. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(97\)80028-6](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(97)80028-6)
- Holm, H., Santi, N., Kjøglum, S., Perisic, N., Skugor, S., & Evensen, Ø. (2015). Difference in skin immune responses to infection with salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of families selected for resistance and susceptibility. *Fish & shellfish immunology*, 42(2), 384-394.
- IFOP. (2021). Estado del arte de los métodos de tratamiento no farmacológicos para la Caligidosis, evaluación de sus ventajas y desventajas y sus posibles aplicaciones en Chile. Informe final. Instituto de Fomento Pesquero CUI 2020-39-DAC-9 https://www.subpesca.cl/portal/618/articulos-114339_documento.pdf
- Jerez, C. N. (2022). *Estrategias de Manejo Integrado para el Control de Caligus en la Industria del Salmón en Chile*.
- Jones, E. M. (2022). Evaluating a Novel Oral Vaccine Particle for use in Disease Prevention in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Development of Important Tools for the Study of Immunity in Sablefish (*Anoplopoma fimbria*)

- file:///C:/Users/Javiera%20Briones/Downloads/out.pdf
- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins [Review]. *Journal of Cellular Physiology*, 235(9), 5867-5881. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
- Kwong, Ying Xin, Nelson Cheuk-Yin Lai, Johnny Chun-Chau Sung, Kam-Chau Wu, Yusuf Khwaja Hamied, Eric Tung-Po Sze 5, & Lam, D. M.-K. (2023). Vacunas orales: un futuro mejor para la inmunización. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10383709/>
- Liu, Y., Lam, D. M.-K., Luan, M., Zheng, W., & Ai, H. (2024). Recent development of oral vaccines (Review) [Review]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 27(5), Article 223. <https://doi.org/10.3892/etm.2024.12511>
- Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 SUP- $\Delta\Delta C$ SUP sub T sub method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., & Cain, K. D. (2019). A Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches [Review]. *Microorganisms*, 7(11), Article 569. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>
- Maldonado-Aguayo, W., Chavez-Mardones, J., Teresa Goncalves, A., & Gallardo-Escarate, C. (2015). Cathepsin Gene Family Reveals Transcriptome Patterns Related to the Infective Stages of the Salmon Louse *Caligus rogercresseyi*. *Plos One*, 10(4), Article e0123954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123954>
- Morales, Serna, F., Brown, Medina-Guerrero, & Fajer-Ávila, E. J. (2016). Impacto de los caligidos en peces cultivados <https://www.scielo.cl/pdf/lajar/v44n3/art01.pdf>
- Mutoloki, S., Munang'andu, H. M., & Evensen, O. (2015). Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake, and immune induction [Review]. *Frontiers in Immunology*, 6, Article 519. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00519>
- Nash, R., Valencia, A. H., & Geffen, A. J. (2006). The origin of Fulton's condition factor - Setting the record straight. https://www.researchgate.net/publication/233388972_The_origin_of_Fulton's_condition_factor_-_Setting_the_record_straight
- Navarro, J. C. (2022). Informe técnico; Nuevo programa de vigilancia y control de la caligidosis. .
- Nunez-Acuna, G., Pino Marambio, J., Valenzuela, T., Wadsworth, S., & Gallardo-Escarate, C. (2016). Antimicrobial peptides from Salmon salar skin induce frontal filament development and olfactory/cuticle-related genes in the sea louse *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, 464, 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.023>
- Nunez-Acuna, G., Valenzuela-Munoz, V., & Gallardo-Escarate, C. (2014). High-throughput SNP discovery and transcriptome expression profiles from the salmon louse *Caligus rogercresseyi* (Copepoda: Caligidae). *Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics*, 10, 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2014.01.003>
- Ogata, Hideo Nishikawa, & Masahiro Ohsugi. (1969). A Yeast Capable of Utilizing Methanol. *Agricultural and Biological Chemistry*, Volume 33, Issue 10, 1 October 1969, Pages 1519–1520, . <https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859497>
- Olabuenaga, S. E. (2000). *FISH IMMUNE SYSTEM Gayana (Concepc.) v.64 n.2*. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-

[65382000000200010](#)

- Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M., & Meseguer, J. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85(1-2), 41-50, Article Pii s0165-2427(01)00406-8. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(01\)00406-8](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(01)00406-8)
- Petit, J., & Wiegertjes, G. F. (2016). Long-lived effects of administering β -glucans: Indications for trained immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 64, 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.003>
- Petrizzo, A., Tornesello, M., Buonaguro, F. M., & Buonaguro, L. (2012). Immunogenomics approaches for vaccine evaluation [Review]. *Journal of Immunotoxicology*, 9(3), 236-240. <https://doi.org/10.3109/1547691x.2012.707698>
- Pholchamat, S., Vialle, R., Luang-In, V., Phadee, P., Wang, B., Wang, T., Secombes, C. J., & Wangkahart, E. (2024). Evaluation of the efficacy of MONTANIDE™ GR01, a new adjuvant for feed-based vaccines, on the immune response and protection against *Streptococcus agalactiae* in oral vaccinated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under laboratory and on-farm conditions. *Fish & Shellfish Immunology*, 149, 109567. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109567>
- Piasecki, W., & Mackinnon, B. (1993). Changes in structure of the frontal filament in sequential developmental stages of caligus-elongatus von nordmann, 1832 (crustacea, copepoda, siphonostomatoida). *Canadian Journal of Zoology*, 71(5), 889-895. <https://doi.org/10.1139/z93-116>
- Reyes, x., & Bravo, S. (1983). Nota sobre una copepodosis en salmones de cultivo. *Invest. Mar. Valparaiso*.11: 55-57.
- Roth, M., Richards, R., & Sommerville, C. (1993). Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture - a review [Review]. *Journal of Fish Diseases*, 16(1), 1-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1993.tb00844.x>
- Secombes, C. J., & Wang, T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish. In B. Austin (Ed.), *Infectious Disease in Aquaculture: Prevention and Control* (pp. 3-68). <Go to ISI>://WOS:000310235400002
- Seppic, & Healthcare. (2022). *Adyuvante para vacunación oral: MONTANIDE™ GR 01*. <https://www.seppic.com/en/animal-health/seppic-widens-its-range-dedicated-animal-health-new-adjuvant-oral-vaccination>
- Sernapesca. (2022). *Informe técnico; Nuevo programa de vigilancia y control de caligidiosis*. <https://www.sernapesca.cl/app/uploads/2024/01/INFORME-TECNICO-PSEVC-CALIGIDOSIS-ENERO-2022.pdf>
- Shivam, S., El-Matbouli, M., & Kumar, G. (2021). Development of Fish Parasite Vaccines in the OMICs Era: Progress and Opportunities [Review]. *Vaccines*, 9(2), Article 179. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020179>
- Sotomayor-Gerding, Troncoso, J. M., Pino Alejandro, Almendras Felipe, & Rubilar Diaz Monica. (2020). Evaluación de la respuesta inmune del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) después de la ingesta oral de antígenos de *Piscirickettsia salmonis* encapsulados en alginato. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030450>
- Subpesca. (2017). *Informe final Proyecto FIP N°2014-62: Diseño y evaluación de efectividad de diferentes estrategias integradas para el control del ectoparásito Caligus rogercresseyi en salmónidos*. https://www.subpesca.cl/fipa/613/articulos-89420_informe_final.pdf

- Subpesca. (2024). Informe sectorial de pesca y acuicultura, departamento de análisis sectorial, diciembre 2024. . https://www.subpesca.cl/portal/618/articles-124435_documento.pdf
- Swain, J. K., Carpio, Y., Johansen, L.-H., Velazquez, J., Hernandez, L., Leal, Y., Kumar, A., & Estrada, M. P. (2020). Impact of a candidate vaccine on the dynamics of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Plos One*, 15(10), Article e0239827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239827>
- Tafalla, C., Bogwald, J., & Dalmo, R. A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives [Review]. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1740-1750. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.029>
- Tammam, I., Bitchava, K., & Gelasakis, A. I. (2024). Transforming Aquaculture through Vaccination: A Review on Recent Developments and Milestones [Review]. *Vaccines*, 12(7), Article 732. <https://doi.org/10.3390/vaccines12070732>
- Tiralongo, F., Messina, G., Lombardo, B. M., Longhitano, L., Li Volti, G., & Tibullo, D. (2020). Skin Mucus of Marine Fish as a Source for the Development of Antimicrobial Agents [Review]. *Frontiers in Marine Science*, 7, Article 541853. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.541853>
- Tully, O. (1992). Predicting infestation parameters and impacts of caligid copepods in wild and cultured fish populations [; Proceedings Paper]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 22(1-3), 91-102. <https://doi.org/10.1080/07924259.1992.9672261>
- Ullah, I., & Lang, M. (2023). Key players in the regulation of iron homeostasis at the host-pathogen interface [Review]. *Frontiers in Immunology*, 14, Article 1279826. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1279826>
- Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escárate, C. (2016). *Caligus rogercresseyi* serine proteases: Transcriptomic analysis in response to delousing drugs treatments. *Aquaculture*, 465, 65-77.
- Valenzuela-Munoz, V., Benavente, B. P., Casuso, A., Leal, Y., & Gallardo-Escarate, C. (2021). Chimeric Protein IPath(R) with Chelating Activity Improves Atlantic Salmon's Immunity against Infectious Diseases. *Vaccines*, 9(4), Article 361. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040361>
- Valenzuela-Munoz, V., Boltana, S., & Gallardo-Escarate, C. (2017). Uncovering iron regulation with species-specific transcriptome patterns in Atlantic and coho salmon during a *Caligus rogercresseyi* infestation. *Journal of Fish Diseases*, 40(9), 1169-1184. <https://doi.org/10.1111/jfd.12592>
- Valenzuela-Munoz, V., & Gallardo-Escarate, C. (2014). TLR and IMD signaling pathways from *Caligus rogercresseyi* (Crustacea: Copepoda): In silico gene expression and SNPs discovery. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(2), 428-434. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.019>
- Valenzuela-Muñoz, V., Boltaña, S., & Gallardo-Escárate, C. (2016). Comparative immunity of *Salmo salar* and *Oncorhynchus kisutch* during infestation with the sea louse *Caligus rogercresseyi*: An enrichment transcriptome analysis. *Fish & shellfish immunology*, 59, 276-287. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.046>
- Vera-Bizama, F., Valenzuela-Munoz, V., Teresa Goncalves, A., Pino Marambio, J., Hawes, C., Wadsworth, S., & Gallardo-Escarate, C. (2015). Transcription expression of immune-related genes from *Caligus rogercresseyi* evidences host-dependent patterns on Atlantic and coho salmon. *Fish & Shellfish Immunology*, 47(2), 725-731.

- <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.022>
- Wehner, O. (2012). Caligidosis en Chile. *Aqua*, 161, 16-19. .
- Wilson, & Barnett. (1983). Degree–days: an aid in crop and pest management. *California Agriculture*, 37 (1983), pp. 4-7.
- Woo, P. (1998). Protection against *Cryptobia (Trypanoplasma) salmositica* and salmonid cryptobiosis [Review]. *Parasitology Today*, 14(7), 272-277. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(98\)01265-4](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(98)01265-4)
- Zalcman, E., Burroughs, A., Meyer, A., Hillman, A., Sadler, R., Madin, B., Mackenzie, C., Ward, M. P., Stevenson, M., Happold, J., Hutchison, J., Gallardo Lagno, A. L., Cameron, A., & Cowled, B. (2021). Sea lice infestation of salmonids in Chile between 2011 and 2017: Use of regulatory data to describe characteristics and identify risk factors. *Aquaculture*, 530, Article 735752. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735752>
- Zhong, Xinting Chen, Junhao Zhang, Xiaoyu Jiang, Junhui Zhang, Minyi Huang, Shuilian Bi, Chunmei Ju, & and Yongwen Luo. (2024). Recent Advances in Oral Vaccines for Animals. file:///C:/Users/Javiera%20Briones/Downloads/vetsci-11-00353-v2.pdf
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E., & Kaattari, S. (2005). B cell heterogeneity in the teleost kidney: Evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *Journal of Immunology*, 174(11), 6608-6616. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.6608>

Anexos

Anexo 1

Extracción de ARN

1. (Bajo cámara de extracción) Preparar 1 mL de trizol en un tubo eppendorf de 2 mL y agregar una esfera de cerámica autoclavada.
2. Cortar el tejido en una placa de vidrio sobre hielo y agregar 30-100mg de tejido a los tubos preparados anteriormente y rotular.
3. Homogenizar y triturar la muestra según el tipo de tejido: Tissuelyser: Frecuencia 24/s por 10min.
4. Incubar a T° ambiente durante 5 min.
5. Centrifugar 5 min a 4°C x 12000g transferir sobrenadante, descartar pellet y retirar esfera.
6. Agregar 200µL de cloroformo, mezclar invirtiendo unas 15 veces e incubar en hielo por 3 min.
7. Centrifugar a 12000 g por 15 min a 4°C, rotular tubos nuevos.
8. Recuperar la fase acuosa y traspasar a un tubo de 1.5 mL.
9. Agregar 500µL de isopropanol, mezclar invirtiendo las fases (sin vortex) e incubar por mínimo 20 min a -20 o -80°C.
10. Centrifugar a 12000 g por 10 min a 4 °C.
11. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 mL de etanol al 75% y homogenizar suavemente con micropipeta, sin realizar vortex.
12. Centrifugar a 7500g por 5 min a 4°C
13. Repetir el lavado (desde el paso 11)
14. Descartar el sobrenadante y eliminar el excedente con micropipeta
15. Puede dejar secar boca arriba por 10 minutos.
16. Resuspender en 20-50 µL de agua con grado biología molecular, homogenizar con micropipeta evitando la formación de burbujas.
17. Cuantificar en Nanodrop (concentración; Razón 260/280; Razón 260/230) y determinar la integridad mediante electroforesis en gel MOPS 1.2%. se recomienda sembrar 400ng de muestra por pocillo para una mejor visualización.

Anexo 2

Síntesis de cDNA

1. En un tubo estéril de 1.5mL preparar el máster mix de la reacción de 20uL:
 - a. Agregar 1uL de random hexamer primer u oligo (dT)₁₈ primer, según corresponda.
 - b. Agregar 4uL de 5X reaction buffer.
 - c. Agregar 9uL de agua DEPC.
 - d. Mezclar con pipeta.
 - e. Agregar 1uL de RiboLock RNase inhibitor (20U/uL).
 - f. Agregar 2uL de dNTP mix.
 - g. Agregar 1uL RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/uL).

Mezcla de reacción

Reactivo	Reacción 1X (10 µL)	Reacción 1X (20 µL)
Random Primer/ oligo (dT) ₁₈	0.5 µL	1 µL
Reaction Buffer 5X	2 µL	4 µL
agua DEPC	4.5 µL	9 µL
RiboLock (20U/µL)	0.5 µL	1 µL
dNTP mix.	1 µL	2 µL
RevertAid H Minus (200U/µL)	0.5 µL	1 µL

2. En un tubo estéril de 0.2mL agregar los 9 ó 18 uL correspondientes al Máster Mix de cada reacción individual, y 1 ó 2 µL de RNA (200ng/µL) en la tapa del tubo según corresponda.
3. Homogenizar suavemente y realizar spin de ser necesario.
4. Ubicar tubos en termociclador y continuar con el siguiente programa según corresponda (Para random hexamer primer):

	Temperatura	Tiempo
Incubación	25 °C	5 min
	42 °C	60 min
	70 °C	5 min

5. Se recomienda almacenar muestras a -20°C por menos de 1 semana, para almacenamiento mayor se recomienda -80°C .
6. Para verificar la correcta síntesis de cDNA realizar PCR en tiempo final con un set de partidores de housekeeping previamente estandarizado, y posteriormente visualizar el resultado mediante electroforesis.

Anexo 3

qPCR SYBR Green

1. Antes de empezar: verificar disponibilidad de hielo; Descongelar reactivos (preferentemente sobre hielo); Descongelar muestras de DNA/cDNA en hielo, tener preparadas las diluciones con las que se va a trabajar; Preparar estación de trabajo, revisar que estén todos los implementos necesarios (puntas, micropipetas, placa para termociclador, film óptico, guantes, agua, gradillas, lápiz) y poner UV; Encender el computador y luego el termociclador QuantStudio 3. Programar el Instrumento (QuantStudio Software) antes de partir.
2. En un tubo estéril de 1.5mL preparar el Mix de Trabajo de la reacción:

Reactivo	Reacción 1X (10 μL)
PowerUp SYBR Green Master Mix (2X)	5 μL
Primer Forward	0,625 μL
Primer Reverse	0,625 μL
Agua grado B.M.	2,75 μL
Volumen final	9 μL
DNA/cDNA	1 μL

3. En cada pocillo de la placa, cargar 8-9 μL del mix de trabajo recién preparado. Evitar la formación de burbuja.
4. Cargar la muestra con puntas con filtro y cambiar la punta cada pocillo. Resuspender la muestra en el mix de trabajo y al terminar botar el ultimo tope en la pared del pocillo.
5. La cantidad de ADN es variable según la muestra. Debería estar entre los 1-40 ng de ADN.

Para cDNA, la cantidad de μL dependerá de la cantidad de RNA con la que se preparó el cDNA: si se agregó 200ng de RNA, agregar 2 μL de cDNA; si se agregaron 400 ng de RNA, 1 μL de cDNA.

6. Sellar la placa con film óptico y dar spin. Procurar que no queden burbujas.
7. Ubicar placa en termociclador y continuar con el siguiente programa térmico:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
50 °C	2 min	Hold
95 °C	2-10 min	1 ciclo
95 °C	15 seg	40 ciclos
$T_m \geq 60^\circ\text{C}$	1 min	40 ciclos
Para curva de melting, utilizar valores por defecto		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
50 °C	2 min	Hold
95 °C	2-10 min	1 ciclo
95 °C	15 seg	40 ciclos
$T_m 55-60^\circ\text{C}$	15 seg	40 ciclos
72°C	1 min	40 ciclos
Para curva de melting, utilizar valores por defecto		