



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Ciencias con Mención en Microbiología

Análisis metagenómico y metatranscriptómico del microbioma bacteriano de *Caligus rogercresseyi* según el sexo y el desarrollo ontogenético.

Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the bacterial microbiome of *Caligus rogercresseyi* by sex and ontogenetic development.

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Microbiología

Por Marcelo Felipe Muñoz Troncoso

Profesor guía:
Cristian Gallardo Escárte

Diciembre, 2025
Concepción, Chile

Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio biotecnología y genómica acuícola, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción. Presentado a la Facultad de biológicas de la Universidad de Concepción para grado de Magíster en Ciencias con mención en Microbiología.

Profesor Guía:

Dr. Cristian Gallardo Escárte
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

Comité evaluador:

Dra. Maribet Gamboa Méndez
Facultad de Ciencias
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Dr. Andrés Opazo Capurro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Pablo Oyarzún Ruiz
Facultad de Ciencias de Biológicas
Universidad de Concepción

Director del programa:

Dr. Andrés Opazo Capurro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Agradecimientos

Creo que no había dimensionado lo que podría significar escribir agradecimientos de nuevo para una ocasión como esta, pero haremos el intento.

Gracias a cada uno y una de ustedes, bichos, tucanes, soquetes, ratas y demases por estar presentes y por el apoyo. No saben lo importantes que han sido en todo esto, oj-alá se encuentren 10 lucas en calle.

Muchas gracias

ÍNDICE

Índice de tablas	6
Índice de figuras	6
1. Resumen.....	9
1.1 Abstract	10
2. Introducción	11
2.1. Desafíos sanitarios de la salmonicultura en Chile	11
2.2. Caligidosis: una enfermedad endémica y emergente	12
2.4. Genómica de <i>Caligus rogercresseyi</i> como punto de inflexión	13
2.5. Importancia de estudiar la microbiota de <i>C. rogercresseyi</i>	14
2.6. Relevancia de identificar diferencias microbianas entre sexos y etapas de desarrollo	15
2.7. Del censo taxonómico al potencial funcional, la Necesidad de un Enfoque Multi-ómico Integrador	17
3. Hipótesis.....	19
4.Objetivo general.....	19
4.1.Objetivos específicos	19
5. Materiales y métodos	20
5.1. Recolección de muestras y diseño experimental.....	20
5.2. Extracción de ADN y amplificación del gen 16S rRNA	21
5.3. Preparación de bibliotecas y secuenciación	22
5.4. Procesamiento de datos y asignación taxonómica.....	23
5.5. Perfilado comunitario y análisis estadístico	23
5.6. Predicción del potencial funcional.....	24
5.7. Análisis metatranscriptómico y funcional del microbioma.....	25
5.8. Análisis de anotación funcional y enriquecimiento	26
5.9. Interpretación integrativa	27
6. Resultados.....	27
6.1. Análisis de diversidad en copepoditos, piojos de mar adultos e intestinos	27
6.2. Abundancia relativa bacteriana en piojos de mar adultos y copepoditos	30
6.3. Microbiota intestinal: diferencias de composición y abundancia	33
6.4. Composición del Core Microbiano	34
6.5. Análisis discriminante lineal (LDA).....	36
6.6. Predicción del potencial funcional del microbioma	39

6.7. Dinámica ontogénica de la actividad bacteriana.....	40
6.8. Análisis funcional del microbioma bacteriano en <i>Caligus rogercresseyi</i> mediante KEGG	43
6.9. Relación entre estructura génica y actividad transcripcional	47
6.10. Dinámica ontogénica de las principales rutas KEGG en el microbioma de <i>Caligus rogercresseyi</i>	49
6.11. Enriquecimiento funcional según Gene Ontology (GO).....	51
6.12. Relación entre nivel de expresión y significancia funcional.....	56
6.13. Enriquecimiento funcional GO específico por etapa de desarrollo.....	60
6.14. Integración entre genomas bacterianos y el transcriptoma de <i>Caligus rogercresseyi</i>	62
7. Discusión.....	63
8. Conclusiones	75
9. Referencias.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores para la amplificación del fragmento 16S de ADNr bacteriano	22
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Curvas de rarefacción de la microbiota bacteriana asociada a <i>Caligus rogercresseyi</i> . Construidas a partir de lecturas del gen 16S rRNA para evaluar la suficiencia del esfuerzo de secuenciación y comparar la riqueza bacteriana entre grupos biológicos. Se incluyen hembras, machos, copepoditos y muestras intestinales separadas por sexo.....	28
Figura 2 Diversidad alfa de la microbiota bacteriana en <i>Caligus rogercresseyi</i> según sexo y estadio de desarrollo. Boxplot de los índices de diversidad Chao1 (A), Shannon (B) y de Simpson (C) para machos, hembras adultas y copepoditos de <i>Caligus rogercresseyi</i> . Cada punto representa una muestra individual y el rombo negro indica el valor promedio del grupo.	29
Figura 3 Diagrama de Venn (A) y upset plot (B) que representa el número de taxones bacterianos exclusivos y compartidos entre machos, hembras y copepoditos de <i>Caligus rogercresseyi</i> a partir del análisis de secuenciación del gen 16S rRNA.	29
Figura 4 Gráfico de barras apiladas que muestra la abundancia relativa de los principales géneros bacterianos asociados a copepoditos (C-I), hembras adultas y machos adultos de <i>Caligus rogercresseyi</i> . Cada barra representa la proporción promedio de los géneros bacterianos más abundantes por grupo, mientras que la categoría “Otros” agrupa los taxones de menor abundancia relativa.	30
Figura 5 Mapa de calor que representa la abundancia relativa normalizada (Z-score) de especies bacterianas detectadas en individuos de <i>Caligus rogercresseyi</i> correspondientes a machos (M_1–M_3), hembras (F_1–F_3) y copepoditos (C_1–C_3). Cada fila corresponde a una repetición biológica y cada columna a una especie bacteriana. Los valores de color indican abundancia relativa estandarizada, donde tonos cálidos representan mayor abundancia relativa y tonos fríos menor abundancia	31
Figura 6 Composición taxonómica diferencial de la microbiota bacteriana en hembras, machos y copepoditos de <i>Caligus rogercresseyi</i> . Diagramas circulares jerárquicos (sunburst) que representan	

la composición taxonómica de la microbiota asociada a hembras (A), machos (B) y copepoditos (C). Cada anillo concéntrico corresponde a un nivel taxonómico crecientemente específico (filo → clase → orden → familia → género) y el tamaño de cada sector indica la abundancia relativa de los taxones detectados en cada grupo. 32

Figura 7 Mapa de calor que muestra la abundancia relativa de especies bacterianas reportadas como patógenas o potencialmente patógenas en peces, detectadas en *Caligus rogercresseyi*. Las columnas representan los tres grupos analizados: copepodito, hembras adultas y machos adultos, mientras que las filas corresponden a especies bacterianas. La escala de color refleja la intensidad de abundancia (valores normalizados), donde tonos claros indican baja presencia y tonos rojos señalan altas abundancias relativas. 33

Figura 8. Diferenciación sexual en la microbiota intestinal de *Caligus rogercresseyi*. **(A)** Mapa de calor que representa la abundancia relativa normalizada (Z-score) de los géneros bacterianos más representativos detectados en el intestino de machos (M_1–M_3) y hembras (F_1–F_3) adultas. **(B)** Abundancia relativa de los principales géneros bacterianos de la microbiota intestinal en cada individuo (barras apiladas). 34

Figura 9 El mapa de calor representa la prevalencia de los géneros bacterianos identificados como parte del microbioma núcleo de *Caligus rogercresseyi*. El eje horizontal muestra distintos umbrales crecientes de abundancia relativa (0.010–0.369%), que representan el porcentaje mínimo requerido para considerar un taxón como presente en una muestra. El eje vertical corresponde a los géneros bacterianos detectados, ordenados según su prevalencia decreciente, copepoditos y muestras intestinales separadas por sexo. 35

Figura 10 Gráfico de barras que representa las especies bacterianas con mayor capacidad discriminante entre machos, hembras y copepoditos de *Caligus rogercresseyi*, identificadas mediante análisis LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size). El eje horizontal muestra el puntaje LDA, el cual cuantifica el tamaño del efecto de cada taxón en la diferenciación entre grupos, mientras que el eje vertical lista las especies bacterianas identificadas. 38

Figura 11 La figura muestra las rutas metabólicas KEGG significativamente diferentes entre hembras (naranja) y machos (azul) de *Caligus rogercresseyi*, obtenidas mediante inferencia funcional basada en secuencias 16S rRNA utilizando PICRUST2 y comparadas mediante análisis estadístico en STAMP. En el panel izquierdo se presentan las proporciones relativas (%) de cada ruta metabólica por sexo. El panel derecho muestra la diferencia entre proporciones (hembras – machos) junto con los intervalos de confianza al 95%. 40

Figura 12 Dinámica ontogénica y diferenciación sexual de la actividad transcripcional bacteriana en *Caligus rogercresseyi*. Mapa de calor de expresión normalizada (Z-score) de contigs bacterianos detectados en el RNA-seq del parásito a lo largo del desarrollo ontogénico (Nauplius I, Nauplius II, Copepodid, Chalimus I–II, Chalimus III–IV) y en adultos diferenciados por sexo (Female, Male). Cada fila representa un contig bacteriano anotado contra genomas de referencia, mientras que cada columna corresponde a un estadio o sexo. Los colores cálidos representan mayor actividad transcripcional relativa y los colores fríos menor actividad. 42

Figura 13 Funciones metabólicas KEGG con mayor nivel de actividad transcripcional en la microbiota bacteriana para Nauplios I (A), Nauplios II (B), Copepoditos (C), Chalimus I-II (D), Hembra adulta (E) y Macho adulto (F). La figura muestra las veinte rutas metabólicas KEGG con mayor expresión acumulada, estimada a partir de datos metatranscriptómicos (TPM). Las barras horizontales representan la actividad transcripcional total por ruta metabólica, mientras que el eje vertical indica las categorías funcionales según la base de datos KEGG. 46

Figura 14. Relación entre número de genes asociados a cada ruta KEGG y su actividad transcripcional total. Las figuras corresponden a un diagrama de burbujas donde se representa la relación entre el número de genes bacterianos anotados por ruta metabólica KEGG (eje horizontal) y la actividad transcripcional acumulada expresada como TPM total (eje vertical) para Nauplios I (A),

Nauplios II (B), Copepoditos (C), Chalimus I-II (D), Hembra adulta (E) y Macho adulto (F). Cada punto representa una ruta metabólica individual. El tamaño del punto es proporcional al total de TPM registrados para cada ruta, mientras que la escala de color indica niveles relativos de expresión transcripcional. 48

Figura 15 Dinámica de la actividad transcripcional de rutas KEGG seleccionadas a lo largo del ciclo de vida de *Caligus rogercresseyi*. La figura muestra la variación en la actividad transcripcional total (TPM acumulado) de cuatro rutas metabólicas KEGG en distintos estadios del desarrollo ontogénico y en adultos diferenciados por sexo. El eje horizontal representa las etapas de desarrollo, mientras que el eje vertical indica los valores de TPM total en escala logarítmica (\log_{10}). Cada línea corresponde a una categoría funcional KEGG distinta. 50

Figura 16 Análisis de componentes principales (PCA) basado en perfiles funcionales KEGG de la microbiota bacteriana asociada a *Caligus rogercresseyi*. El gráfico representa la proyección de las muestras correspondientes a diferentes estadios de desarrollo (*Nauplius I*, *Nauplius II*, *Copepodito*, *Chalimus I-II*, *Chalimus III-IV*) y adultos diferenciados por sexo (hembra y macho) en los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), calculados a partir de la actividad transcripcional bacteriana asociada a rutas metabólicas KEGG. 51

Figura 17 Enriquecimiento funcional Gene Ontology (GO) La figura muestra los términos GO significativamente enriquecidos a partir del análisis funcional del conjunto de genes bacterianos detectados en Hembra (A), Macho (B), Copepodito (C) y Nauplio II (D) El eje vertical representa los términos GO, mientras que el eje horizontal corresponde a las tres categorías ontológicas: *Biological Process (BP)*, *Cellular Component (CC)* y *Molecular Function (MF)*. Cada punto representa un término enriquecido; el tamaño de la burbuja indica el grado de enriquecimiento relativo (Fold Enrichment) y el color corresponde a la significancia estadística expresada como $-\log_{10}(p\text{-value})$, según la escala mostrada. 56

Figura 18 Representación integrada de significancia estadística y nivel de expresión de términos Gene Ontology (GO). La figura muestra la relación entre enriquecimiento funcional e intensidad de expresión para los términos GO detectados en la microbiota asociada a Hembras (A), Machos (B), Copepoditos (C) y Nauplios II (D) El eje vertical representa la significancia estadística de cada término como $-\log_{10}(p\text{-value})$, mientras que el eje horizontal indica el valor de expresión agregado como $\log_{10}(\text{TPM} + 1)$. Cada punto corresponde a un término GO y está coloreado según su categoría ontológica: *Biological Process (BP)*, *Cellular Component (CC)* o *Molecular Function (MF)*, de acuerdo con la leyenda. El tamaño de los puntos es proporcional al número de genes asociados a cada término. La línea discontinua horizontal indica el umbral de significancia estadística, y la línea discontinua vertical corresponde al valor de corte de expresión utilizado en el análisis. 59

Figura 19. Distribución de los términos Gene Ontology (GO) exclusivamente expresados en distintos estadios de desarrollo de *Caligus rogercresseyi*. La figura presenta términos GO exclusivos para cada estadio de desarrollo (*Nauplius II*, *Copepodid*, *Chalimus I-II*, *Hembras* y *Machos*). Cada punto representa un término GO y su posición en el eje vertical corresponde al nombre del término funcional. El eje horizontal indica la etapa de desarrollo. 61

Figura 20 Comparación de funciones compartidas y exclusivas entre *Caligus rogercresseyi* y su microbiota. La figura muestra el número total de funciones anotadas clasificadas en tres categorías: funciones compartidas entre *Caligus rogercresseyi* y su microbiota asociada (“Compartido”), funciones exclusivas de la microbiota bacteriana (“Solo_bacterias”) y funciones exclusivas del hospedador (“Solo_caligus”). El eje vertical indica el número de funciones anotadas, mientras que el eje horizontal representa las categorías funcionales según su correspondencia entre hospedador y microbiota. Cada barra refleja el conteo absoluto de funciones detectadas en cada grupo funcional. 63

1. RESUMEN

La caligidosis, causada por el piojo de mar *Caligus rogercresseyi*, representa uno de los principales desafíos sanitarios de la salmonicultura chilena, generando pérdidas productivas significativas y favoreciendo la aparición de infecciones secundarias en los peces. Aunque en los últimos años se ha avanzado en la caracterización taxonómica de la microbiota asociada a este parásito, su rol funcional ha sido escasamente abordado. Este estudio presenta la primera caracterización integrada del microbioma bacteriano de *C. rogercresseyi*, combinando secuenciación del gen 16S rRNA de longitud completa, predicción funcional y análisis metatranscriptómico bacteriano a partir de datos de RNA-seq del hospedador.

Se analizó la microbiota de machos adultos, hembras adultas, intestinos y estadios infectivos (copepoditos). Los resultados evidenciaron una marcada influencia del sexo y del desarrollo ontogénico en la composición, la diversidad y la estructura funcional del microbioma. Las hembras presentaron una diversidad bacteriana significativamente mayor que la de los machos, mientras que los copepoditos exhibieron la mayor riqueza, posiblemente asociada a la exposición ambiental durante la fase planctónica. Se identificó un core microbioma conservado de 35 géneros compartidos entre todos los grupos, dominado por taxones marinos como *Vibrio*, *Aliivibrio*, *Tenacibaculum* y *Sulfitobacter*. La predicción funcional mediante PICRUST2 reveló una clara diferenciación metabólica. La microbiota asociada a hembras mostró un enriquecimiento en rutas catabólicas y de generación de energía, incluyendo la β -oxidación de ácidos grasos y la glicólisis, lo cual es coherente con las altas demandas energéticas asociadas a la reproducción. En contraste, la microbiota de machos presentó una mayor representación de rutas biosintéticas, incluyendo la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y lípidos, lo que sugiere un soporte metabólico orientado a la locomoción y al mantenimiento somático. Los análisis metatranscriptómicos confirmaron que estas funciones están expresadas activamente y revelaron una reorganización funcional a lo largo del desarrollo. La actividad bacteriana fue mínima en nauplios, disminuyó abruptamente en copepoditos y aumentó progresivamente desde chalimus hasta adultos, con una marcada diferenciación sexual. Los análisis KEGG y GO demostraron una microbiota altamente estructurada funcionalmente y acoplada a la fisiología del hospedador.

En conjunto, los resultados apoyan un modelo de holobionte funcional para *C. rogercresseyi*, donde la microbiota emerge como componente activo y regulador de la biología del parásito, abriendo nuevas perspectivas para el control sanitario basado en la microbiota.

1.1 ABSTRACT

Sea lice infestation caused by *Caligus rogercresseyi* is a significant health challenge in salmon aquaculture in Chile, leading to substantial economic losses and increased vulnerability to secondary infections in farmed salmon. Although recent years have seen progress in the taxonomic identification of the microbiota associated with this ectoparasite, its functional role remains largely unknown. This study offers the first comprehensive characterization of the bacterial microbiome of *C. rogercresseyi* by integrating full-length 16S rRNA gene sequencing with functional prediction and bacterial metatranscriptomic analysis based on host RNA-seq data. Microbial communities were examined in adult males, adult females, intestinal samples, and infective copepodite stages.

The results showed strong effects of both sex and ontogenetic development on microbiome composition, diversity, and functional structure. Females have significantly higher bacterial diversity than males, while copepodites showed the greatest overall richness, probably reflecting environmental acquisition during the planktonic stage. A conserved core microbiome comprising 35 genera was identified across all groups, dominated by marine-associated taxa including *Vibrio*, *Aliivibrio*, *Tenacibaculum*, and *Sulfitobacter*. Functional inference based on PICRUSt2 revealed clear metabolic specialization. The female-associated microbiota were enriched in catabolic and energy-generating pathways, such as fatty acid β -oxidation, glycolysis, and amino acid degradation, consistent with the energetic demands of reproduction. In contrast, the male-associated microbiota showed enrichment in anabolic pathways, including the biosynthesis of branched-chain amino acids, nucleotides, and lipids, suggesting metabolic support for mobility and somatic maintenance. Bacterial metatranscriptomic profiling confirmed that these predicted functions are actively expressed. Expression patterns varied markedly across development, with low activity in nauplius stages, a functional bottleneck at copepodite, and progressive metabolic activation in chalimus and adult stages, with strong sexual differentiation in adults. KEGG and Gene Ontology enrichment analyses further demonstrated a highly structured functional microbiome involved in metabolism, transport, energy production, and cellular regulation.

Overall, these findings support a holobiont model for *C. rogercresseyi*, in which microbiota is an active and adaptable part of parasite biology. This study emphasizes microbiota as a potential target for innovative control strategies such as microbiome manipulation or anti-microbiota vaccines.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. DESAFÍOS SANITARIOS DE LA SALMONICULTURA EN CHILE

La acuicultura desempeña un papel fundamental para satisfacer la creciente demanda de proteína de alta calidad a nivel mundial. Mientras la producción pesquera extractiva se ha mantenido relativamente estable durante las últimas dos décadas, la acuicultura ha experimentado un crecimiento continuo. En un escenario de consumo constante, se estima que la producción acuícola global deberá aumentar desde aproximadamente 82 millones de toneladas en 2018 a cerca de 129 millones de toneladas para el año 2050, con el fin de satisfacer la demanda proyectada (Boyd et al., 2022).

En Chile, la acuicultura se sustenta principalmente en el cultivo de salmónidos, incluyendo el salmón atlántico (*Salmo salar*), el salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (SERNAPESCA, 2021). En el año 2021, la cosecha nacional alcanzó 995.135 toneladas, posicionando a Chile como el segundo mayor productor mundial de salmónidos y el quinto productor global de peces de cultivo (FAO, 2021; SERNAPESCA, 2021). Sin embargo, el crecimiento del sector ha estado acompañado de diversos desafíos sanitarios, ambientales y sociales que dificultan el desarrollo sustentable de la actividad (Quiñones et al., 2019).

Las condiciones intensivas de producción, sumadas a prácticas de manejo como el transporte y la manipulación de peces, generan estrés crónico que debilita el sistema inmune y aumenta la susceptibilidad a enfermedades infecciosas causadas por bacterias, virus, parásitos y hongos (Pickering & Pottinger, 1989). Entre estas enfermedades, la caligidosis se ha consolidado como una de las principales problemáticas sanitarias de la salmonicultura chilena y como uno de los mayores retos para la sostenibilidad del sector (Gallardo-Escarate et al., 2019). Los piojos de mar son ectoparásitos que proliferan en condiciones de alta densidad, características de los sistemas de cultivo intensivo (Hemmingsen et al., 2020; Torrissen et al., 2013).

2.2. CALIGIDOSIS: UNA ENFERMEDAD ENDÉMICA Y EMERGENTE

La caligidosis es una enfermedad parasitaria causada por *Caligus rogercresseyi*, copépodo marino perteneciente a la familia Caligidae, ampliamente distribuido en el hemisferio sur (Riquelme, 2017). Este ectoparásito se alimenta de mucus, piel y ocasionalmente sangre de sus hospederos, generando heridas cutáneas que favorecen la deshidratación, alteraciones osmóticas, inflamación crónica y pérdidas productivas significativas (Correa et al., 2017; Gallardo, 2018).

Las infestaciones severas causan erosión cutánea, estrés fisiológico, disminución del crecimiento y aumento de la susceptibilidad a infecciones secundarias, lo que puede culminar en mortalidad (Zalcman et al., 2021). La gravedad de las lesiones está directamente asociada a la carga parasitaria y a factores como la especie hospedadora, la edad, el estado fisiológico y las condiciones ambientales (Bravo, 2010). La alta capacidad reproductiva de *C. rogercresseyi*, combinada con las condiciones de cultivo intensivas, favorece su rápida proliferación en sistemas de producción acuícola (Aaen et al., 2015; Costello, 2006).

Durante la última década, la epidemiología de *C. rogercresseyi* en Chile se ha vuelto considerablemente compleja. El aumento sostenido de las densidades de cultivo, la sincronización imperfecta de los tratamientos entre centros y la conectividad hidrodinámica han favorecido la diseminación del parásito a escala regional. Los informes técnicos han documentado una reducción progresiva en la eficacia de los antiparasitarios y un aumento del número de tratamientos por ciclo productivo, con consecuencias económicas y ambientales relevantes (Aaen et al., 2015; Helgesen et al., 2014).

La presión selectiva ejercida por el uso reiterado de compuestos antiparasitarios ha favorecido la emergencia de poblaciones resistentes, lo que ha disminuido la eficacia de productos como emamectina benzoato, deltametrina y azametifos (Aaen et al., 2015; Arriagada et al., 2020). A su vez, las lesiones causadas por el parásito incrementan el riesgo de infecciones bacterianas

oportunistas, lo que compromete aún más el bienestar animal. Este escenario ha impulsado la búsqueda de estrategias alternativas, como el control biológico, el uso de peces limpiadores, el desarrollo de vacunas y enfoques emergentes basados en la microbiota.

2.3. CICLO DE VIDA DE *CALIGUS ROGERCRESSEYI* Y RELEVANCIA ECOLÓGICA

El ciclo de vida de *C. rogercresseyi* comprende estadios larvales planctónicos (nauplio I y II), el estadio infectivo (copepodito), fases parasíticas tempranas fijadas (chalimus I–IV), estadios móviles preadultos (I–II) y el estado adulto. Las primeras etapas son no alimentarias y dependen de reservas energéticas internas, mientras que el copepodito representa el punto crítico de infección al reconocer y adherirse al hospedador. Desde el estadio chalimus, el parásito establece una relación ectoparasitaria obligada, desarrollando estructuras especializadas de fijación y alimentación (González & Carvajal, 2003; Marinkovic, 2012).

La ontogenia del parásito no solo define su morfología y fisiología, sino también su exposición microbiana. Las etapas planctónicas interactúan principalmente con la microbiota ambiental pelágica, mientras que las fases parasíticas incorporan microorganismos procedentes de la piel del pez, el moco y los tejidos lesionados. Estas fuentes contrastantes sugieren cambios drásticos en la composición microbiana a lo largo del desarrollo. Adicionalmente, las demandas metabólicas específicas de cada estadio podrían filtrar selectivamente los microorganismos capaces de persistir, favoreciendo simbioses asociados a la nutrición, la detoxificación o la modulación inmune.

2.4. GENÓMICA DE *CALIGUS ROGERCRESSEYI* COMO PUNTO DE INFLEXIÓN

La reciente secuenciación del genoma de *C. rogercresseyi* (Gallardo-Escarate et al., 2021) ha proporcionado un marco esencial para el estudio molecular del parásito. Esto invita a reconsiderar al parásito bajo el concepto de holobionte: una unidad ecológica funcional formada por el organismo hospedador y su

consorcio microbiano. En este marco, la aptitud biológica de *C. rogercresseyi*, su resistencia a fármacos, su éxito reproductivo y su capacidad de infestación pueden ser propiedades emergentes de su interactoma interno (parásito-microbiota) y externo (parásito-peíz). Este esfuerzo permitió identificar familias génicas involucradas en procesos como el parasitismo, la detoxificación xenobiótica (por ejemplo, los citocromos P450), la reproducción y la interacción hospedador-parásito. Además, el análisis del ensamblaje reveló la presencia de secuencias bacterianas asociadas al copépodo, lo que sugirió la coexistencia de una microbiota más compleja de lo previamente considerado (Valenzuela-Miranda et al., 2022).

Esto propone que la microbiota podría desempeñar funciones clave en el metabolismo del piojo de mar, abriendo nuevas perspectivas para comprender su biología desde un enfoque sistémico e integrador. En este contexto, la microbiota surge como un componente funcional potencialmente relevante del parásito y, por consiguiente, como una alternativa promisoría para el desarrollo de nuevas estrategias de control sanitario.

2.5. IMPORTANCIA DE ESTUDIAR LA MICROBIOTA DE *C. ROGERCRESSEYI*

El estudio de la microbiota asociada a *C. rogercresseyi* es fundamental para comprender su biología y su impacto en la industria acuícola. En artrópodos ectoparásitos, la microbiota cumple funciones críticas en procesos fisiológicos como digestión, inmunomodulación y adaptación a condiciones ambientales adversas (Degli Esposti & Martínez Romero, 2017). En garrapatas, por ejemplo, se ha identificado un *core microbiome*, es decir, un conjunto de bacterias esenciales que se mantienen a lo largo del ciclo de vida y desempeñan funciones clave en la supervivencia del parásito (Zhang et al., 2020). En *Dermacentor silvarum*, bacterias del género *Coxiella* se encuentran en altas abundancias en huevos y hembras adultas, lo que sugiere la transmisión vertical de simbiontes críticos para el desarrollo del parásito (Zhang et al., 2020).

La microbiota intestinal de insectos también ha demostrado estar involucrada en la detoxificación de pesticidas mediante procesos metabólicos específicos,

incluyendo la utilización de compuestos tóxicos como fuentes de carbono y energía (Jaffar et al., 2022; Siddiqui et al., 2022). Asimismo, se ha demostrado la expresión de genes bacterianos asociados a la resistencia frente a piretroides y organofosforados (Itoh et al., 2018), lo que indica que algunos simbioses pueden contribuir directamente a la tolerancia del hospedador frente a agentes químicos. Estos antecedentes plantean la posibilidad de que *C. rogercresseyi* albergue bacterias que modulen su susceptibilidad a fármacos antiparasitarios o influyan en su capacidad de infestación.

En el caso del piojo de mar, la identificación de su microbiota y de un posible *core microbioma* permitiría comprender con mayor profundidad sus procesos fisiológicos, los mecanismos de infestación y la transmisión de enfermedades, lo que facilitaría el diseño de estrategias de control más efectivas. En términos aplicados, se ha propuesto el desarrollo de vacunas dirigidas contra bacterias esenciales del parásito (*anti-microbiota vaccines*) como una alternativa innovadora (Mateos-Hernández et al., 2021). Asimismo, se ha sugerido que ciertos taxones bacterianos clave (*keystone taxa*) podrían representar blancos terapéuticos estratégicos, aun cuando no sean los más abundantes dentro de la comunidad (Banerjee et al., 2018).

2.6. RELEVANCIA DE IDENTIFICAR DIFERENCIAS MICROBIANAS ENTRE SEXOS Y ETAPAS DE DESARROLLO

Las diferencias en la composición microbiana entre etapas del desarrollo pueden reflejar adaptaciones fisiológicas a necesidades metabólicas y reproductivas cambiantes (Wang et al., 2019; Zhang et al., 2020). En *D. silvarum*, por ejemplo, se ha observado que las ninfas presentan una microbiota distinta de la de los adultos, con un aumento de *Brevibacterium*, lo que sugiere funciones específicas de determinadas bacterias en etapas concretas.

Las diferencias entre sexos también han sido ampliamente documentadas. En mamíferos como ratones y cerdos, la microbiota presenta patrones claramente

diferenciados entre machos y hembras (Elderman et al., 2018), lo cual está asociado a regulación hormonal (Hu et al., 2021; Org et al., 2016). En las garrapatas, los machos suelen presentar una mayor diversidad bacteriana que las hembras, posiblemente debido a diferencias conductuales, nichos ecológicos y estrategias reproductivas (Zhang et al., 2020). En crustáceos, *Eriocheir sinensis* presenta núcleos microbianos distintos entre sexos, con diferencias funcionales asociadas (Jiang et al., 2024).

En *C. rogercresseyi*, se plantea que machos, hembras y estados juveniles presentan ensamblajes microbianos diferenciados que podrían influir en el fitness, la reproducción, la resistencia química y la patogenicidad. Estudios sobre parásitos como *Schistosoma mansoni* indican que la diferenciación sexual puede estar regulada por mecanismos genéticos y epigenéticos que potencialmente influyen en la microbiota (Picard et al., 2016). Comprender estas interacciones en *C. rogercresseyi* podría revelar mecanismos fundamentales de adaptación e infección.

En los artrópodos parásitos, la microbiota desempeña funciones esenciales en la biosíntesis de vitaminas, la regulación inmune, la señalización endocrina, la detoxificación, la resistencia a patógenos y la reproducción (Degli Esposti & Martinez Romero, 2017; Speer et al., 2020; Vigneron & Weiss, 2017). En garrapatas, simbiontes intracelulares como *Coxiella* y *Rickettsiella* resultan indispensables para la oviposición y la supervivencia (Zhang et al., 2020). En insectos, las bacterias del intestino modulan la tolerancia a insecticidas y la susceptibilidad a infecciones (Jaffar et al., 2022; Siddiqui et al., 2022).

Cada vez hay más evidencia de que los microorganismos asociados influyen directamente en la evolución del parasitismo. En especies hematófagas, los simbiontes compensan deficiencias nutricionales, mientras que en otros sistemas manipulan procesos reproductivos, incluyendo la fertilidad e incluso la proporción sexual. En crustáceos marinos, se han identificado funciones asociadas al metabolismo energético, al desarrollo embrionario y a la tolerancia ambiental, sugiriendo que la microbiota desempeña un rol central también en copépodos parásitos.

A pesar de la relevancia sanitaria de la caligidosis, el conocimiento sobre la microbiota del piojo de mar sigue siendo fragmentario. Los estudios disponibles se han centrado mayoritariamente en caracterizaciones taxonómicas generales (Gallardo-Escarate et al., 2021; Valenzuela-Miranda et al., 2022), con escasa resolución funcional.

En contraste, *Lepeophtheirus salmonis*, especie relacionada y ampliamente estudiada en el hemisferio norte, ha mostrado comunidades microbianas complejas con variaciones entre regiones, estadios y tratamientos farmacológicos (Michaud et al., 2019). Se ha propuesto que las alteraciones microbianas pueden influir en la respuesta a los antiparasitarios y en el desarrollo del parásito, lo que refuerza la necesidad de estudios funcionales en *C. rogercresseyi*, especialmente considerando las particularidades ambientales de Chile.

La microbiota está moldeada por factores del hospedador (genética, inmunidad, fisiología, sexo) y del ambiente (temperatura, salinidad, comunidad microbiana) (Tang et al., 2020). En *C. rogercresseyi* se desconoce si las diferencias microbianas entre machos y hembras se originan tempranamente o emergen como consecuencia del desarrollo sexual.

Dado que los nauplios no se alimentan y el copepodito es la primera etapa en la que hay interacción directa con el hospedador, es posible que la microbiota inicial dependa en gran medida del ambiente, mientras que la estabilidad microbiana se consolida durante la fase parasítica. Identificar ventanas críticas de colonización podría abrir posibilidades de intervención temprana.

2.7. DEL CENSO TAXONÓMICO AL POTENCIAL FUNCIONAL, LA NECESIDAD DE UN ENFOQUE MULTI-ÓMICO INTEGRADOR

Tradicionalmente, la caracterización de estos consorcios microbianos se ha basado en el gen 16S rRNA (Fuks et al., 2017) . Si bien esta técnica permite un censo taxonómico rápido y económico, presenta limitaciones críticas: no discrimina entre cepas, no entrega información funcional directa y, crucialmente, no refleja la actividad metabólica real de la comunidad. Además, está sujeta a sesgos técnicos.

Para superar estas barreras, la metagenómica emerge como el siguiente escalón, permitiendo acceder al potencial metabólico total de la comunidad, reconstruir genomas bacterianos (MAGs) y catalogar sus funciones. Sin embargo, el potencial no siempre se traduce en acción.

Es aquí donde la metatranscriptómica se vuelve indispensable. Esta aproximación permite ir más allá del "qué puede hacer" de la comunidad para responder a "qué está haciendo activamente". Al capturar el ARN mensajero, identifica qué rutas metabólicas están expresadas en un momento dado, lo que permite distinguir a los taxones funcionalmente relevantes de los meros colonizadores pasivos (Zhang et al., 2021). Para dar sentido a esta avalancha de datos funcionales, marcos de referencia como KEGG (que permite mapear genes en rutas metabólicas concretas) y Gene Ontology (que categoriza funciones en términos celulares, moleculares y biológicos) son herramientas esenciales, proporcionando un marco cuantitativo y biológicamente interpretable (Rodríguez & Getino, 2024).

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar la microbiota de *C. rogercresseyi* a lo largo de su desarrollo ontogenético y entre sexos, para comprender su rol funcional y su potencial de aplicación en el control de la caligidosis.

3. HIPÓTESIS

El sexo y el desarrollo ontogenético de *Caligus rogercresseyi* determinan diferencias significativas en la composición metagenómica y en la actividad metatranscriptómica de su microbioma bacteriano, promoviendo funciones metabólicas específicas que influyen en la biología y adaptación del parásito.

4.OBJETIVO GENERAL

Analizar la composición metagenómica y la expresión metatranscriptómica del microbioma bacteriano asociado a *Caligus rogercresseyi* en función del sexo y del desarrollo ontogenético, con el fin de identificar taxones núcleo y funciones metabólicas relevantes para la biología del parásito.

4.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar y comparar la estructura metagenómica del microbioma bacteriano a lo largo de distintas etapas del ciclo de vida de *Caligus rogercresseyi* mediante secuenciación del gen 16S rRNA.
2. Identificar taxones del núcleo (*core microbiota*) compartidos entre sexos y etapas ontogénicas mediante análisis metagenómicos comparativos.
3. Caracterizar la expresión génica del microbioma bacteriano mediante análisis metatranscriptómicos, identificando rutas metabólicas activas asociadas a sexo y desarrollo.
4. Integrar datos metagenómicos y metatranscriptómicos para identificar asociaciones entre taxones bacterianos y funciones metabólicas relevantes en el ciclo de vida del parásito.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Ejemplares adultos de *Caligus rogercresseyi* fueron recolectados desde salmones del Atlántico (*Salmo salar*) cultivados en un centro de cultivo ubicado en la Región de Los Lagos, sur de Chile. Se priorizó un centro con un tiempo de producción en agua de mar mayor a ocho meses y con bajo uso de antiparasitarios y antibióticos. Los copepoditos fueron recolectados del criadero de parásitos del centro. El muestreo fue realizado por personal técnico de la empresa y ningún pez fue sacrificado para este estudio. Los peces fueron sedados con benzocaína al 20% y examinados para la recolección manual de parásitos. Todas las operaciones de manipulación de peces se realizaron conforme a los manuales aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Concepción y SERNAPESCA. *Caligus rogercresseyi*, al ser un copépodo, no está cubierto por las regulaciones sobre el uso de animales en investigación, por lo que no se requirió aprobación ética adicional.

Se estableció un diseño equilibrado según el sexo (machos y hembras), la etapa de desarrollo (copepodito) y el compartimiento biológico analizado (parásito completo o intestino aislado), con diez réplicas biológicas por grupo para los adultos y cuatrocientos individuos para los copepoditos. Los piojos adultos fueron retirados cuidadosamente de la piel utilizando pinzas estériles y colocados de inmediato en tubos estériles de 1,5 mL con etanol al 100%, a fin de preservar la microbiota bacteriana y minimizar posibles alteraciones en su composición. El sexo de los ejemplares se determinó mediante criterios morfológicos. Los copepoditos fueron recolectados con un filtro de 1,5 μm , según las UTAs correspondientes a su etapa de desarrollo (Boxshall & Bravo, 2000). Para reducir la agrupación intra-hospedador en el muestreo, no se recolectaron más de tres individuos por pez.

Para las muestras intestinales, los piojos se esterilizaron superficialmente para eliminar microorganismos externos. Los especímenes se enjuagaron con agua de mar estéril filtrada a 0,22 μm , se sumergieron brevemente en etanol al 70%

durante 30 segundos y se lavaron dos veces con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) estéril durante 1 minuto. Las disecciones se realizaron bajo un estereomicroscopio a 40× sobre placas de Petri estériles. Cada ejemplar se inmovilizó, fijándolo sobre cera derretida, con la superficie dorsal orientada hacia arriba. Se realizó una incisión a lo largo de la línea media ventral utilizando bisturís y pinzas finas estériles, y se extrajo el tracto intestinal desde el intestino anterior hasta el posterior, procurando no romper su contenido. Cada intestino se colocó en un nuevo tubo con etanol al 100% y se almacenó a -80 °C hasta la extracción de ADN. Cabe destacar que los piojos de mar son organismos diminutos, cuyos adultos miden aproximadamente 2 mm de longitud de cefalotórax.

5.2. EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S

El ADN bacteriano total se aisló a partir de piojos completos homogeneizados y de intestinos disectados mediante el método de extracción con fenol-cloroformo. Se recolectaron tejidos (20–30 mg) de diez piojos adultos por grupo y cuatrocientos copepoditos, los cuales se descongelaron, lavaron, picaron y homogeneizaron mediante agitación con perlas cerámicas. Las muestras se incubaron en un tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,4% SDS y 100 µg/mL de proteinasa K, pH 8,0) a 37 °C durante 2 horas, con agitación constante, para asegurar la lisis completa (Valenzuela-Miranda *et al.*, 2024).

Posteriormente, se adicionaron volúmenes iguales de fenol-cloroformo, y las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, se extrajo nuevamente con cloroformo y se centrifugó. El ADN se precipitó con etanol de grado molecular y se purificó con el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Germantown, MD, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La pureza y calidad del ADN se evaluaron con un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), y su integridad se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE. Las

concentraciones se determinaron por fluorimetría con un Qubit 4, utilizando el kit dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific).

Para la amplificación del gen 16S rRNA, el ADN purificado se diluyó a 100 ng/μL y se empleó como molde en reacciones de PCR de 25 μL que contenían la polimerasa LongAmp Taq DNA (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.). Se utilizaron los cebadores universales 27F y 1492R, según (Valenzuela-Miranda et al., 2024)

El programa térmico consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 20 s, alineamiento a 56 °C durante 30 s y extensión a 65 °C durante 2 min, y finalizó con una extensión a 65 °C durante 5 min. Los amplicones se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2 % en tampón TAE.

Tabla 1. Partidores para la amplificación del fragmento 16S de ADNr bacteriano

Primer	Secuencia	TM (°C)
27F	5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'	56
1492R	5' – GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'	56

5.3. PREPARACIÓN DE BIBLIOTECAS Y SECUENCIACIÓN

Los amplicones de PCR se agruparon por grupo experimental y se purificaron con perlas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) para eliminar dímeros de cebadores y productos inespecíficos. Los productos purificados se cuantificaron con un fluorómetro Qubit 4.

Se prepararon tres bibliotecas por grupo experimental utilizando el kit 16S Barcoding SQK-16S024 (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los amplicones se marcaron con códigos de barras mediante PCR con la polimerasa LongAmp Taq y se purificaron según el protocolo

del proveedor. La calidad y la distribución de tamaños de las bibliotecas se evaluaron con un sistema TapeStation 2200 (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) usando DNA ScreenTape, y las concentraciones se verificaron con Qubit.

Se incluyó una comunidad microbiana de referencia (ZymoBIOMICS Microbial Community Standard, Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) como control para monitorear el rendimiento de la corrida. Las bibliotecas codificadas se mezclaron en concentraciones molares iguales y se cargaron en una celda de flujo Spot-ON para su secuenciación en la plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies). La eficiencia de secuenciación y la calidad de la corrida se monitorearon en tiempo real mediante el software MinKNOW (versión 5.8.12).

5.4. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ASIGNACIÓN TAXONÓMICA

Las lecturas crudas se procesaron mediante *basecalling* con Guppy (versión 6.3.2). Las lecturas con valores de calidad (Q-score) inferiores a 7 se descartaron. Las secuencias adaptadoras se eliminaron y las lecturas se desmultiplexaron con Porechop (Bonenfant et al., 2023).

La clasificación taxonómica se realizó utilizando Emu, una herramienta desarrollada para lecturas completas de 16S rRNA obtenidas mediante Nanopore, que emplea un enfoque de maximización de expectativa para mejorar la precisión de asignación (Curry et al., 2022). Se utilizó una base de datos 16S personalizada, combinando secuencias de referencia con registros provenientes de estudios previos. Se aplicó un umbral de abundancia mínima de 0,01% para eliminar taxones poco representados, y las lecturas se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTUs) al 97% de similitud.

5.5. PERFILADO COMUNITARIO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La tabla de OTUs obtenida se analizó con MicrobiomeAnalyst 2.0 para explorar la estructura y diversidad de la comunidad microbiana. Los datos de abundancia se transformaron logarítmicamente para su normalización. Las curvas

de rarefacción se construyeron con el paquete Vegan de R para evaluar la cobertura de muestreo y la riqueza de especies (Dixon, 2003).

Las gráficas de barras apiladas de composición taxonómica se generaron con ggplot2 (Wickham, 2011). Los análisis de diversidad alfa, los diagramas de Venn y las pruebas de Welch también se realizaron con Vegan.

Los taxones diferencialmente abundantes entre sexos se identificaron mediante el análisis LEfSe (*Linear Discriminant Analysis Effect Size*), aplicando una corrección por tasa de falsos descubrimientos ($p < 0,05$ ajustado por FDR) y un puntaje LDA $\geq 4,0$ como criterios de significancia. Las principales características discriminantes se visualizaron para destacar los taxones más relevantes. La manipulación de datos se realizó con dplyr (Beckerman et al., 2017; Foster et al., 2017).

5.6. PREDICCIÓN DEL POTENCIAL FUNCIONAL

Las inferencias funcionales se evaluaron con PICRUST2 (Douglas et al., 2020). Dado que esta herramienta está optimizada para lecturas cortas, se extrajeron las regiones V3–V4 de las secuencias completas de 16S mediante HyperEx (v0.1.0) para generar archivos FASTA adecuados para el análisis.

Las tablas de OTUs y las secuencias se procesaron posteriormente en PICRUST2, empleando la base de datos MetaCyc para estimar la abundancia relativa de rutas metabólicas (Caspi et al., 2015). Las visualizaciones se generaron con los paquetes ggpicrust2 y STAMP (Yang et al., 2023).

El análisis estadístico de las diferencias en las rutas metabólicas entre grupos se realizó con STAMP (Parks et al., 2014), aplicando pruebas de chi-cuadrado con corrección de Benjamini–Hochberg. Se consideraron significativamente diferentes aquellas rutas con valores FDR $< 0,05$.

5.7. ANÁLISIS METATRANSCRIPTÓMICO Y FUNCIONAL DEL MICROBIOMA

Para complementar los análisis basados en la secuenciación del gen 16S rRNA y profundizar en el rol funcional del microbioma asociado a *Caligus rogercresseyi*, se analizó información transcriptómica proveniente de experimentos de RNA-seq realizados previamente por el Laboratorio de Genómica Acuícola, así como conjuntos de datos disponibles en bases de datos públicas. Esta estrategia permitió integrar información estructural del microbioma con datos de actividad transcripcional, lo que proporcionó una visión más completa del ecosistema microbiano asociado al parásito y de su relación funcional con el hospedador.

Previo al análisis, las lecturas de RNA-seq fueron sometidas a un control de calidad mediante filtrado de adaptadores, eliminación de secuencias cortas y descarte de lecturas de baja calidad, estableciendo un umbral de calidad de PHRED ≥ 20 , equivalente a una tasa de error esperada del 1%. Con el fin de permitir comparaciones directas entre muestras, se realizó un proceso de normalización por rarefacción, en el que se seleccionó aleatoriamente un número equivalente de lecturas al tamaño de biblioteca más bajo, asegurando así la comparabilidad de las abundancias relativas entre condiciones experimentales.

El perfilado taxonómico del componente microbiano de los datos transcriptómicos se realizó mediante el mapeo directo de lecturas contra bases de datos de referencia. Para ello, se emplearon bases de datos personalizadas desarrolladas por el equipo de trabajo, que integraron genomas de virus, protozoos y hongos provenientes de RefSeq, junto con la base de datos bacteriana del módulo *CLC Microbial Genomics Module* versión 21.1 (Qiagen, Hilden, Alemania). Este enfoque permitió una identificación taxonómica transversal del microbioma presente en las muestras transcriptómicas, complementando la resolución obtenida mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.

Con el objetivo de explorar asociaciones funcionales entre la microbiota bacteriana y la biología del parásito, se evaluó la relación entre la abundancia relativa de taxones microbianos y los niveles de expresión génica del hospedador.

Para ello, se aplicaron análisis de correlación de Pearson entre la expresión de genes del parásito (expresados como TPM) y la abundancia relativa de los principales taxones bacterianos detectados. Estos análisis se realizaron diferenciando por sexo y por etapa ontogenética, lo que permitió identificar patrones específicos de co-regulación potencial entre la microbiota y procesos fisiológicos clave durante el desarrollo del ectoparásito.

5.8. ANÁLISIS DE ANOTACIÓN FUNCIONAL Y ENRIQUECIMIENTO

Con el fin de caracterizar funcionalmente los transcriptomas bacterianos asociados a todos los estadios de desarrollo, se empleó un enfoque de anotación funcional basado en ontologías génicas y rutas metabólicas. Las secuencias transcriptómicas fueron anotadas utilizando la base de datos EggNOG a través de la plataforma *eggNOG-mapper* versión 2.1.12 (Huerta-Cepas et al., 2019), lo que permitió asignar ortólogos funcionales, términos GO y rutas KEGG a los genes expresados.

Las anotaciones de Ontología Genética (Gene Ontology, GO) ("The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong," 2019) fueron procesadas cuantificando dos métricas complementarias: (i) la frecuencia de genes anotados por término GO, y (ii) la actividad transcripcional total por término, calculada como la suma de los valores TPM de todos los genes asociados a una categoría funcional específica. Esta aproximación permitió distinguir entre funciones altamente representadas en el número de genes y aquellas dominantes en términos de actividad metabólica.

De forma complementaria, las rutas metabólicas de KEGG (Kanehisa & Goto, 2000) fueron analizadas mediante la agregación de los niveles de expresión (TPM) por ruta, lo que permitió identificar procesos metabólicos predominantes dentro de la comunidad bacteriana activa. Para enfocar el análisis en funciones biológicamente relevantes, se consideraron únicamente los genes con niveles de expresión superiores a 1 TPM en al menos una muestra. A partir de estas métricas,

se seleccionaron las veinte funciones y rutas más representativas según el número de genes anotados y la actividad transcripcional total.

El análisis funcional incluyó procedimientos de ordenamiento descendente para identificar las funciones dominantes, así como comparaciones entre métricas estructurales (recuento de genes) y métricas funcionales (TPM), lo que permitió detectar posibles discrepancias entre la abundancia genética y la actividad metabólica efectiva. Esta aproximación facilitó la identificación de procesos potencialmente clave para la fisiología bacteriana en el sistema parásito-hospedador.

5.9. INTERPRETACIÓN INTEGRATIVA

Finalmente, los resultados obtenidos a partir del perfilado taxonómico, de los análisis de correlación y de los enriquecimientos funcionales fueron integrados en una interpretación sistémica del microbioma de *C. rogercresseyi*. Esta integración permitió establecer asociaciones preliminares entre grupos bacterianos específicos y rutas metabólicas activas, aportando evidencia funcional sobre el posible rol del microbioma en procesos asociados al desarrollo, al metabolismo y a la adaptación del parásito en el ambiente de cultivo.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD EN COPEPODITOS, PIOJOS DE MAR ADULTOS E INTESTINOS

Las lecturas obtenidas mediante secuenciación del gen 16S rRNA fueron sometidas a un riguroso control de calidad y filtrado. Los análisis de diversidad alfa y beta de la microbiota de *Caligus rogercresseyi* evidenciaron diferencias significativas en la composición y estructura de la comunidad bacteriana en función de los factores estudiados: etapa de desarrollo e intestinos. Adicionalmente, se obtuvieron mesetas constantes en las curvas de rarefacción de todos los grupos analizados, lo que indica que la profundidad de secuenciación fue adecuada para representar la diversidad microbiana. Si bien la cobertura no influyó

significativamente en las estimaciones de diversidad, se observó una reducción evidente de la diversidad bacteriana en los grupos correspondientes a machos y machos-intestino, en comparación con hembras y copepoditos (Fig. 1).

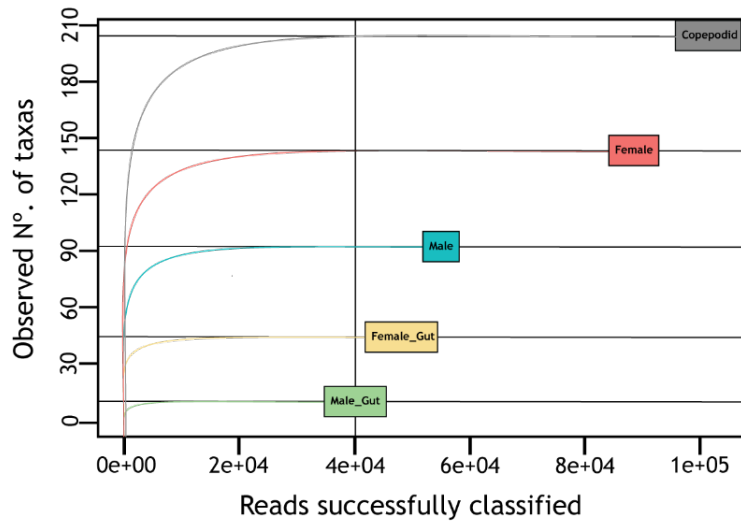


Figura 1 Curvas de rarefacción de la microbiota bacteriana asociada a *Caligus rogercresseyi*. Construidas a partir de lecturas del gen 16S rRNA para evaluar la suficiencia del esfuerzo de secuenciación y comparar la riqueza bacteriana entre grupos biológicos. Se incluyen hembras, machos, copepoditos y muestras intestinales separadas por sexo.

Los índices de diversidad alfa confirmaron una disminución significativa de la diversidad bacteriana en machos en comparación con los otros dos grupos (Fig. 2). Esta tendencia fue consistente tanto para la microbiota total como para las muestras intestinales. Los diagramas de Venn que muestran la distribución de taxones exclusivos y compartidos entre grupos (Fig. 3) reflejaron una menor riqueza microbiana asociada a los machos en relación con las hembras y al estadio juvenil; esta diferencia también se aprecia en los grupos de muestras intestinales, donde el intestino de macho demuestra una diversidad menor de bacterias asociadas.

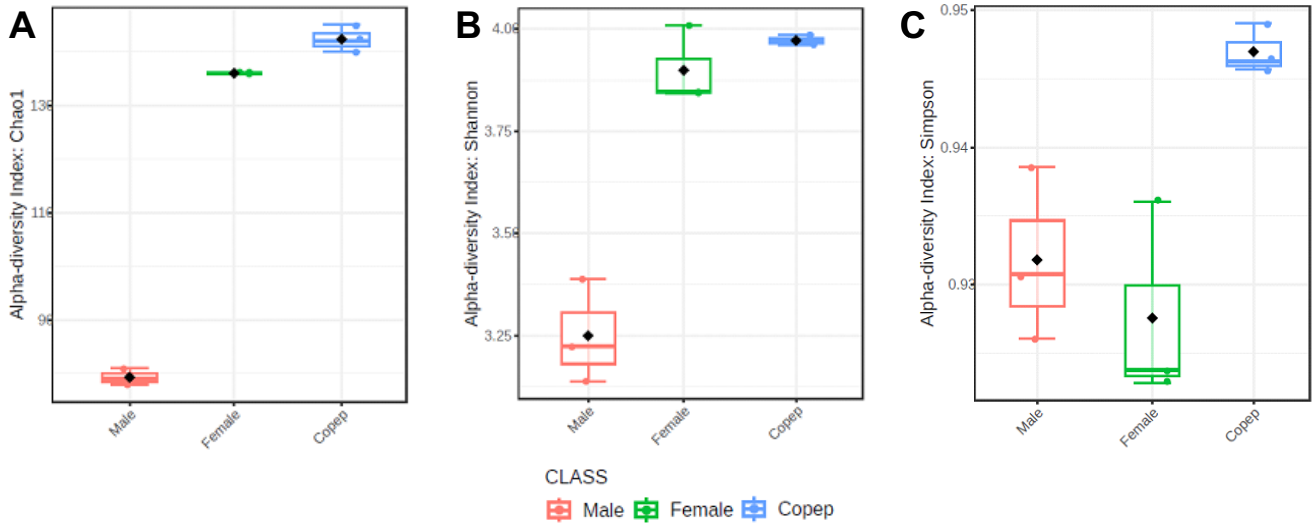


Figura 2 Diversidad alfa de la microbiota bacteriana en *Caligus rogercresseyi* según sexo y estadio de desarrollo. Boxplot de los índices de diversidad Chao1 (A), Shannon (B) y Simpson (C) para machos, hembras adultas y copepoditos de *Caligus rogercresseyi*. Cada punto representa una muestra individual y el rombo negro indica el valor promedio del grupo.

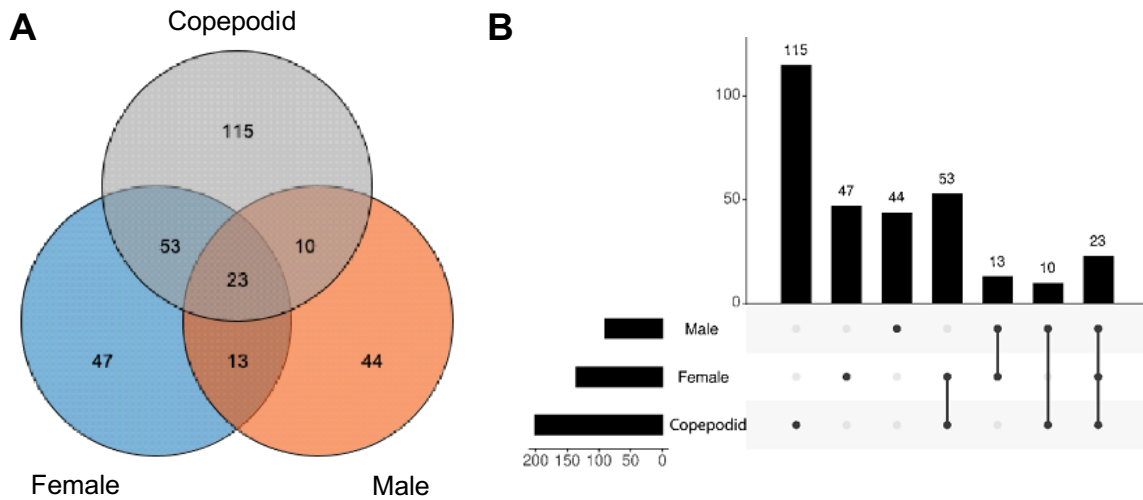


Figura 3 Diagrama de Venn (A) y upset plot (B) que representan el número de taxones bacterianos exclusivos y compartidos entre machos, hembras y copepoditos de *Caligus rogercresseyi* a partir del análisis de secuenciación del gen 16S rRNA.

6.2. ABUNDANCIA RELATIVA BACTERIANA EN PIOJOS DE MAR ADULTOS Y COPEPODITOS

La clasificación taxonómica reveló diferencias marcadas en la abundancia relativa de bacterias de la microbiota entre los tres grupos estudiados. El menor número de taxones detectados en los machos, observado previamente (Fig. 3), fue consistente con la baja riqueza y abundancia relativa registradas en los grupos Macho y Macho-Intestino, seguido del grupo de hembras, que presentó un mayor número de bacterias asociadas. Por último, el grupo de copepoditos presentó el mayor número de taxones asociados, lo que refleja una mayor diversidad y abundancia relativas que los grupos de piojos adultos (Fig. 4).

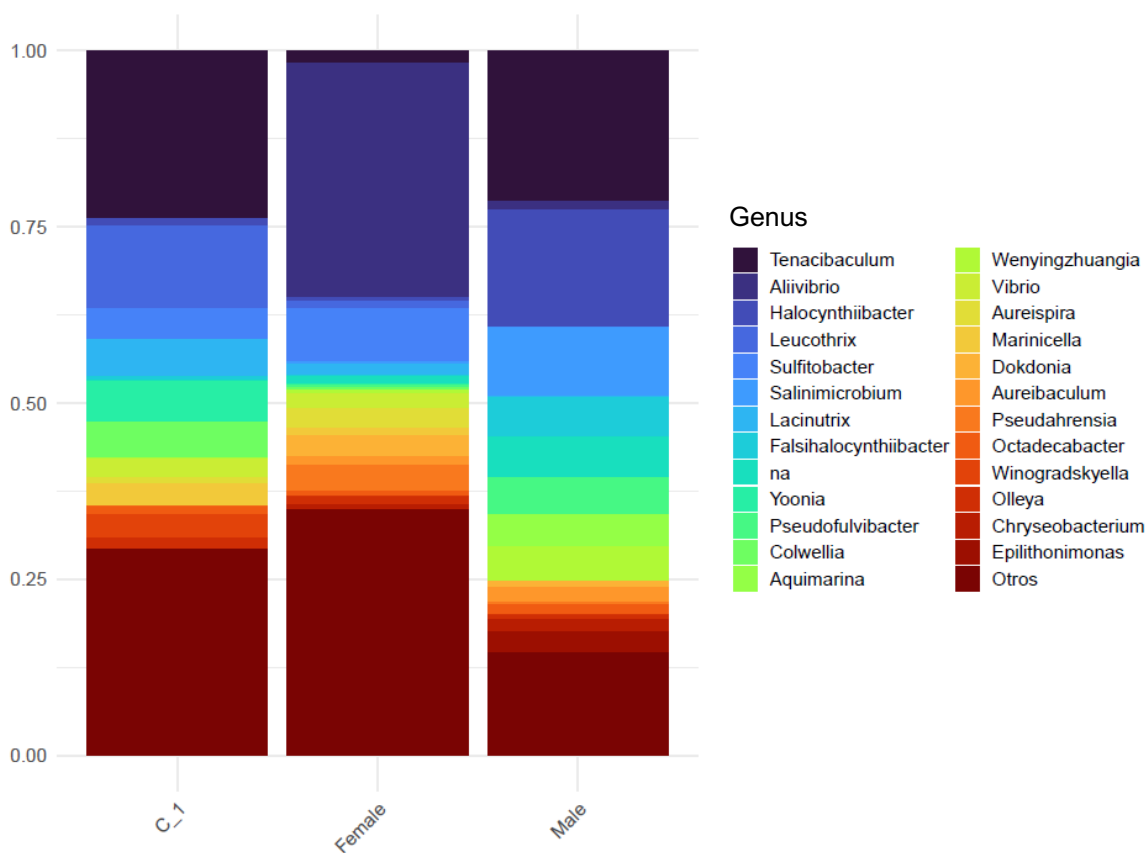


Figura 4 Gráfico de barras apiladas que muestra la abundancia relativa de los principales géneros bacterianos asociados a copepoditos (C-I), hembras adultas y machos adultos de *Caligus rogercresseyi*. Cada barra representa la proporción promedio de los géneros bacterianos más abundantes por grupo, mientras que la categoría “Otros” agrupa los taxones de menor abundancia relativa.

El análisis del mapa de calor (heatmap) confirmó estas diferencias, mostrando cambios claros en la abundancia relativa de taxones bacterianos entre sexos y etapas de desarrollo (Fig. 5). Las comunidades microbianas se agruparon de manera consistente en tres clústeres bien definidos, correspondientes a machos, hembras y copepoditos, lo que evidencia la existencia de perfiles microbianos específicos. Los géneros bacterianos presentaron distribuciones diferenciales, lo que confirma un sesgo sexual y ontogénico en la composición microbiana.

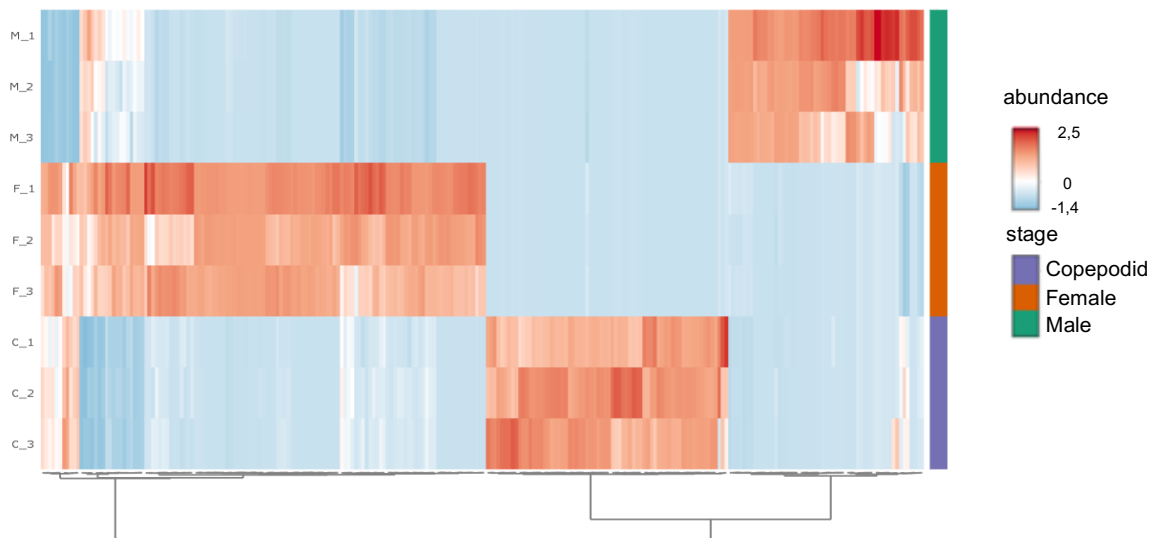


Figura 5 Mapa de calor que representa la abundancia relativa normalizada (Z-score) de especies bacterianas detectadas en individuos de *Caligus rogercresseyi* correspondientes a machos (M_1–M_3), hembras (F_1–F_3) y copepoditos (C_1–C_3). Cada fila corresponde a una repetición biológica y cada columna a una especie bacteriana. Los valores de color indican abundancia relativa estandarizada, donde tonos cálidos representan mayor abundancia relativa y tonos fríos menor abundancia

Los cladogramas circulares (Fig. 6). destacaron estas diferencias a nivel de género y etapa de desarrollo. En las hembras (Fig. 6A), el género *Aliivibrio* resultó dominante, representando aproximadamente el 33% de la abundancia total, mientras que en los machos (Fig. 6B) y en los copepoditos (Fig. 6C) predominó *Tenacibaculum*, con cifras superiores al 20% en ambos casos. Resulta relevante señalar que ambos géneros bacterianos incluyen especies reconocidas como patógenas de peces de cultivo. El heatmap (Fig. 7) muestra que estos y otros géneros de importancia sanitaria presentaron abundancias diferenciales entre los tres grupos, lo que sugiere que machos y hembras podrían constituir reservorios bacterianos distintos con potencial impacto en la interacción parásito–hospedador.

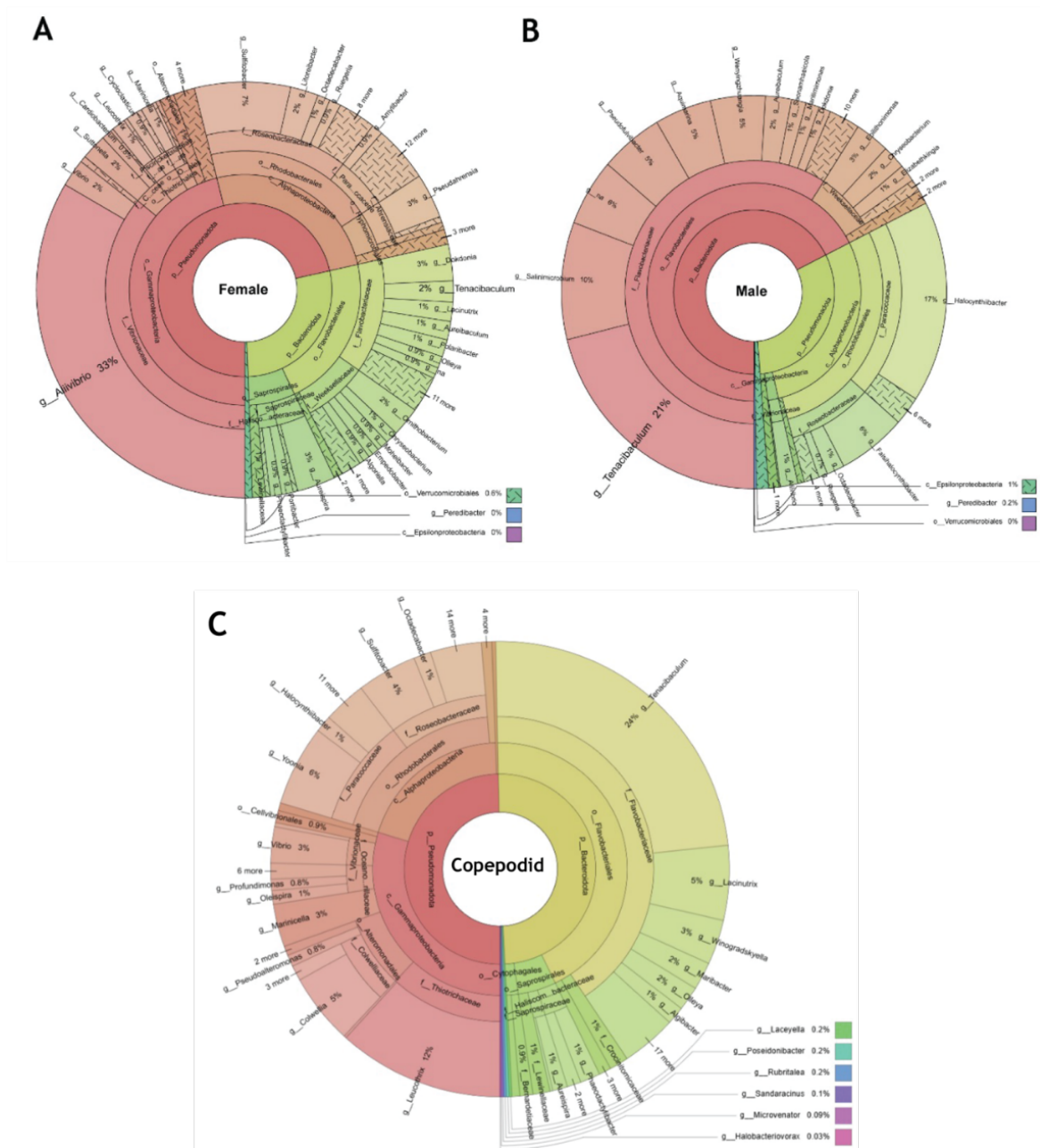


Figura 6 Composición taxonómica diferencial de la microbiota bacteriana en hembras, machos y copepoditos de *Caligus rogercresseyi*. Diagramas circulares jerárquicos (sunburst) que representan la composición taxonómica de la microbiota asociada a hembras (A), machos (B) y copepoditos (C). Cada anillo concéntrico corresponde a un nivel taxonómico crecientemente específico (filo → clase → orden → familia → género) y el tamaño de cada sector indica la abundancia relativa de los taxones detectados en cada grupo.

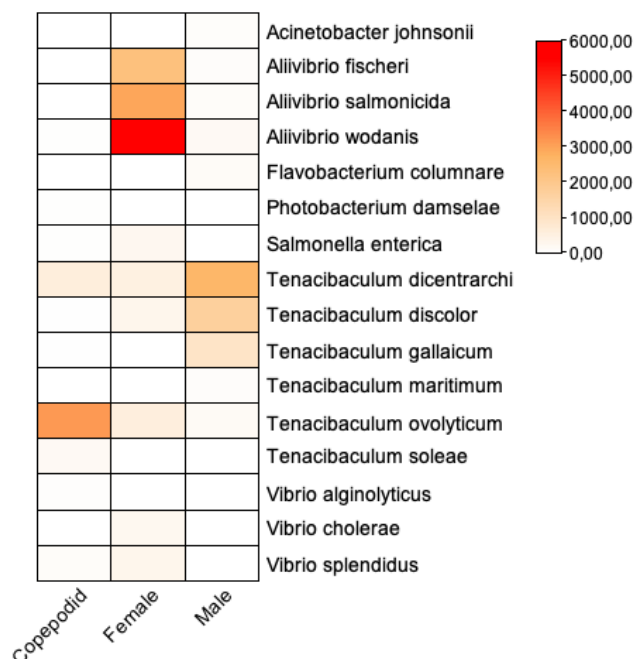


Figura 7 Mapa de calor que muestra la abundancia relativa de especies bacterianas reportadas como patógenas o potencialmente patógenas en peces, detectadas en *Caligus rogercresseyi*. Las columnas representan los tres grupos analizados: copepodito, hembras adultas y machos adultos, mientras que las filas corresponden a especies bacterianas. La escala de color refleja la intensidad de abundancia (valores normalizados), donde tonos claros indican baja presencia y tonos rojos señalan altas abundancias relativas.

6.3. MICROBIOTA INTESTINAL: DIFERENCIAS DE COMPOSICIÓN Y ABUNDANCIA

El análisis de abundancia relativa de la microbiota intestinal reveló una mayor riqueza y diversidad bacteriana en hembras que en machos, como se observa en el heatmap (Fig. 8A). Estos resultados confirman el patrón observado en los análisis de diversidad global, donde las hembras presentaron una comunidad microbiana más compleja.

El gráfico de barras (Fig. 8B) mostró que el género *Vibrio* es predominante en ambos sexos y puede ser el componente central de la microbiota intestinal. Este género bacteriano incluye especies patógenas para peces. Adicionalmente, las hembras presentaron mayores proporciones de *Aliivibrio* y *Tenacibaculum*, ambos géneros también asociados a patogenicidad en salmones. Estos resultados

sugieren que, más allá de una mayor diversidad, la microbiota intestinal de las hembras podría constituir un reservorio particularmente importante de bacterias potencialmente patógenas para los peces hospedadores.

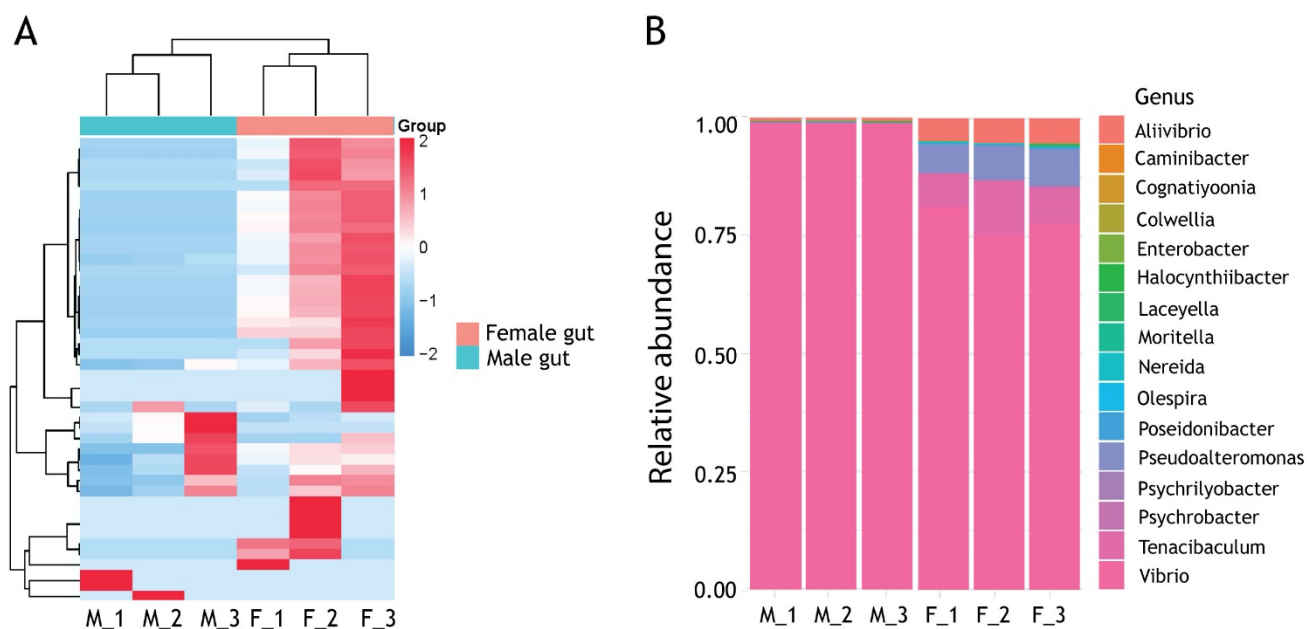


Figura 8. Diferenciación sexual en la microbiota intestinal de *Caligus rogercresseyi*. **(A)** Mapa de calor que representa la abundancia relativa normalizada (Z-score) de los géneros bacterianos más representativos detectados en el intestino de machos (M_1–M_3) y hembras (F_1–F_3) adultas. **(B)** Abundancia relativa de los principales géneros bacterianos de la microbiota intestinal en cada individuo (barras apiladas)

6.4. COMPOSICIÓN DEL CORE MICROBIANO

El análisis del core microbiano de *Caligus rogercresseyi* reveló una comunidad bacteriana conservada, compartida entre machos, hembras y copepoditos. Se identificó un total de 35 géneros bacterianos como parte del core microbiano, definido como aquellos taxones presentes en los tres grupos, independientemente de las variaciones en la abundancia. El análisis de prevalencia-abundancia de la figura 9 demostró que el core microbiano está dominado por varios géneros asociados a ambientes marinos que presentan alta prevalencia (>0,8) pero baja abundancia relativa (<0,05%). Entre los géneros más relevantes se encontraron *Tenacibaculum*, *Aliivibrio*, *Sulfitobacter*, *Halocynthiibacter*, *Leucothrix*, *Vibrio* y *Colwellia*. Estos taxones se detectaron en casi todos los individuos, lo que

sugiere su papel como miembros estables de la microbiota del piojo de mar. Por otro lado, varios géneros mostraron una prevalencia intermedia (0,4–0,8), entre ellos *Lacinutrix*, *Aquimarina* y *Dokdonia*. Mientras que un tercer grupo, que incluyó taxones como *Falsihalocynthiibacter*, *Aureispira*, e *Elizabethkingia*, presentó baja prevalencia (<0,4), lo que indica que están presentes solo de manera esporádica en los grupos del hospedador.

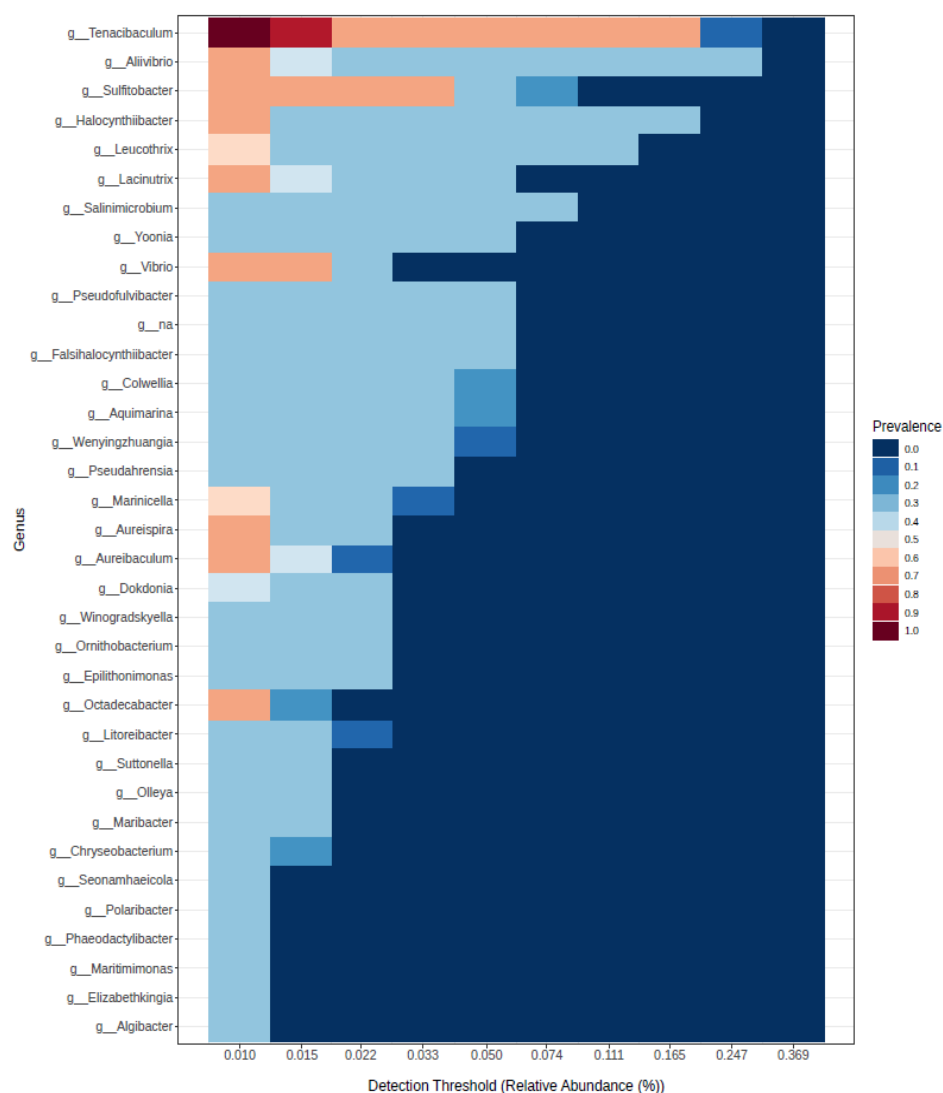


Figura 9. El mapa de calor representa la prevalencia de los géneros bacterianos identificados como parte del microbioma núcleo de *Caligus rogercresseyi*. El eje horizontal muestra distintos umbrales crecientes de abundancia relativa (0.010–0.369%), que representan el porcentaje mínimo requerido para considerar un taxón como presente en una muestra. El eje vertical corresponde a los géneros bacterianos detectados, ordenados según su prevalencia decreciente, copepoditos y muestras intestinales separadas por sexo.

El gradiente de umbral de detección (0,010–0,369%) ilustra que la mayoría de los taxones del core se detectaron de forma consistente incluso en umbrales de abundancia muy bajos, lo que refuerza su asociación persistente con el hospedador. Cabe destacar que algunos de los géneros con alta prevalencia, como *Vibrio* y *Tenacibaculum*, son conocidos por su capacidad quitinolítica y por su presencia común en ambientes marinos, lo que sugiere posibles roles funcionales en las interacciones huésped-microbio relacionadas con el exoesqueleto del parásito.

6.5. Análisis discriminante lineal (LDA)

El análisis discriminante lineal (LDA) identificó especies bacterianas con un valor discriminante significativo entre machos, hembras y copepoditos de *Caligus rogercresseyi*. La figura 10 muestra las especies ordenadas según su LDA score, que refleja su capacidad para diferenciar los tres grupos analizados.

Se observó una marcada representación del género *Aliivibrio*, con tres especies (*A. finisterrensis*, *A. wodanis* y *A. salmonicida*) entre las más discriminantes. Cabe destacar que *A. salmonicida* es reconocido como un patógeno relevante en salmónidos, lo que sugiere una potencial interacción tripartita entre el piojo de mar, las bacterias y el pez hospedero. El género *Tenacibaculum* también mostró una fuerte capacidad discriminante mediante *T. todarodis* y *T. ovolyticum*, especies frecuentemente asociadas a infecciones en organismos marinos. La presencia de especies como *Wenyngzhuangia fucanilytica*, conocida por su capacidad para degradar polisacáridos complejos, y *Ornithobacterium rhinotracheale*, sugiere diferencias en las capacidades metabólicas de la microbiota entre los distintos estadios y sexos de *C. rogercresseyi*. Esto indica que existen diferencias significativas en la composición de especies bacterianas entre machos, hembras y copepoditos. Estas diferencias podrían reflejar variaciones en la fisiología específica de cada grupo, las interacciones microbiológicas con el ambiente marino, los mecanismos de adaptación a la vida parasitaria y la potencial transmisión de patógenos bacterianos al salmón hospedero.

De manera concordante, el análisis LDA aplicado a la microbiota intestinal (Fig. 10B) reveló diferencias a nivel de especie. En los machos, *Vibrio splendidus* fue identificado como la especie más discriminante, mientras que en las hembras predominaron *Aliivibrio wodanis*, *Tenacibaculum dicentrarchi* y *Vibrio atlanticus*. Estos resultados refuerzan la existencia de una microbiota con fuerte sesgo sexual tanto a nivel del organismo completo como del intestino.

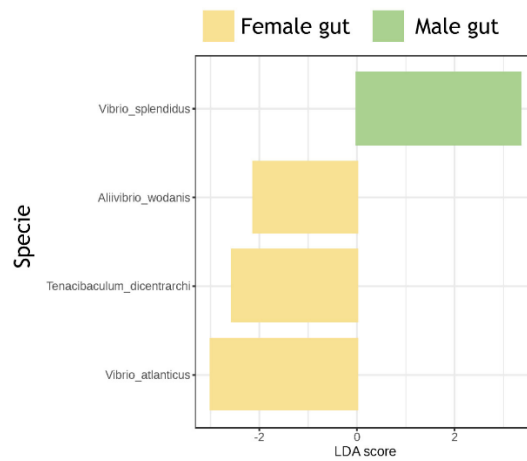
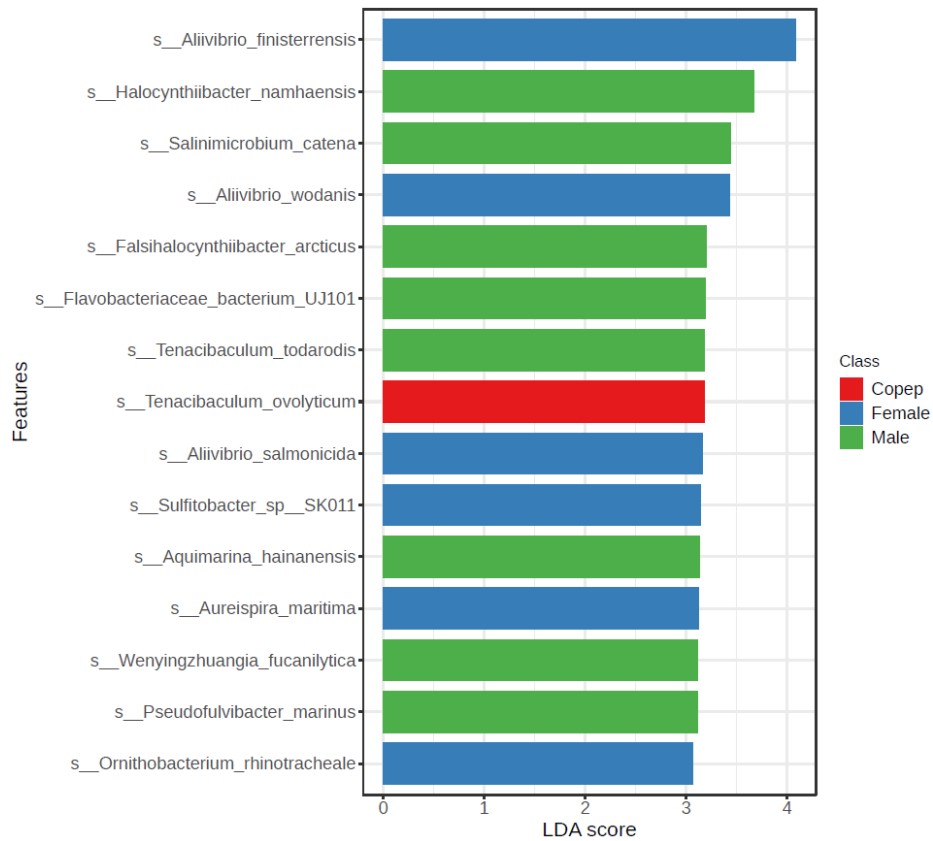


Figura 10. Gráfico de barras que representa las especies bacterianas con mayor capacidad de discriminación entre machos, hembras y copepoditos de *Caligus rogercresseyi*, identificadas mediante análisis LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size). El eje horizontal muestra el puntaje LDA, que cuantifica el tamaño del efecto de cada taxón en la diferenciación entre grupos, mientras que el eje vertical lista las especies bacterianas identificadas.

6.6. PREDICCIÓN DEL POTENCIAL FUNCIONAL DEL MICROBIOMA

Para inferir el potencial metabólico de las comunidades bacterianas asociadas a machos y hembras de *C. rogercresseyi*, se realizó un análisis de predicción funcional con PICRUSt2. Los perfiles funcionales obtenidos, basados en rutas de KEGG y MetaCyc, fueron comparados entre sexos mediante análisis estadístico en la plataforma STAMP.

Se identificaron 64 rutas metabólicas con diferencias estadísticamente significativas ($q < 0.05$), de las cuales 42 estuvieron enriquecidas en hembras y 22 en machos, lo que revela un patrón claro de especialización funcional dependiente del sexo. La microbiota asociada a hembras mostró un enriquecimiento notable de rutas vinculadas al catabolismo y a la producción de energía, incluyendo la β -oxidación de ácidos grasos, la glicólisis y la degradación de glucógeno. Además, se observaron rutas involucradas en la degradación de aminoácidos, nucleótidos y compuestos orgánicos complejos, así como procesos fermentativos, lo que indica una comunidad orientada a la obtención de energía y al reciclaje metabólico.

En contraste, la microbiota de machos presentó un perfil funcional orientado a procesos anabólicos. Se detectó un enriquecimiento significativo en las rutas de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina), en la síntesis de ácidos grasos y en la producción de lípidos específicos, como palmitato y cis-vaccenato. También se observó una mayor representación de rutas de biosíntesis de nucleótidos y de S-adenosilmetionina, una molécula clave en procesos de metilación y regulación metabólica.

En conjunto, estos resultados (Fig. 11) demuestran que el sexo no solo influye en la composición taxonómica de la microbiota de *C. rogercresseyi*, sino también en su perfil funcional. Estas diferencias podrían tener implicancias directas en la fisiología del parásito, en su respuesta a tratamientos antiparasitarios y en su rol como reservorio de patógenos bacterianos para los peces en cultivo.

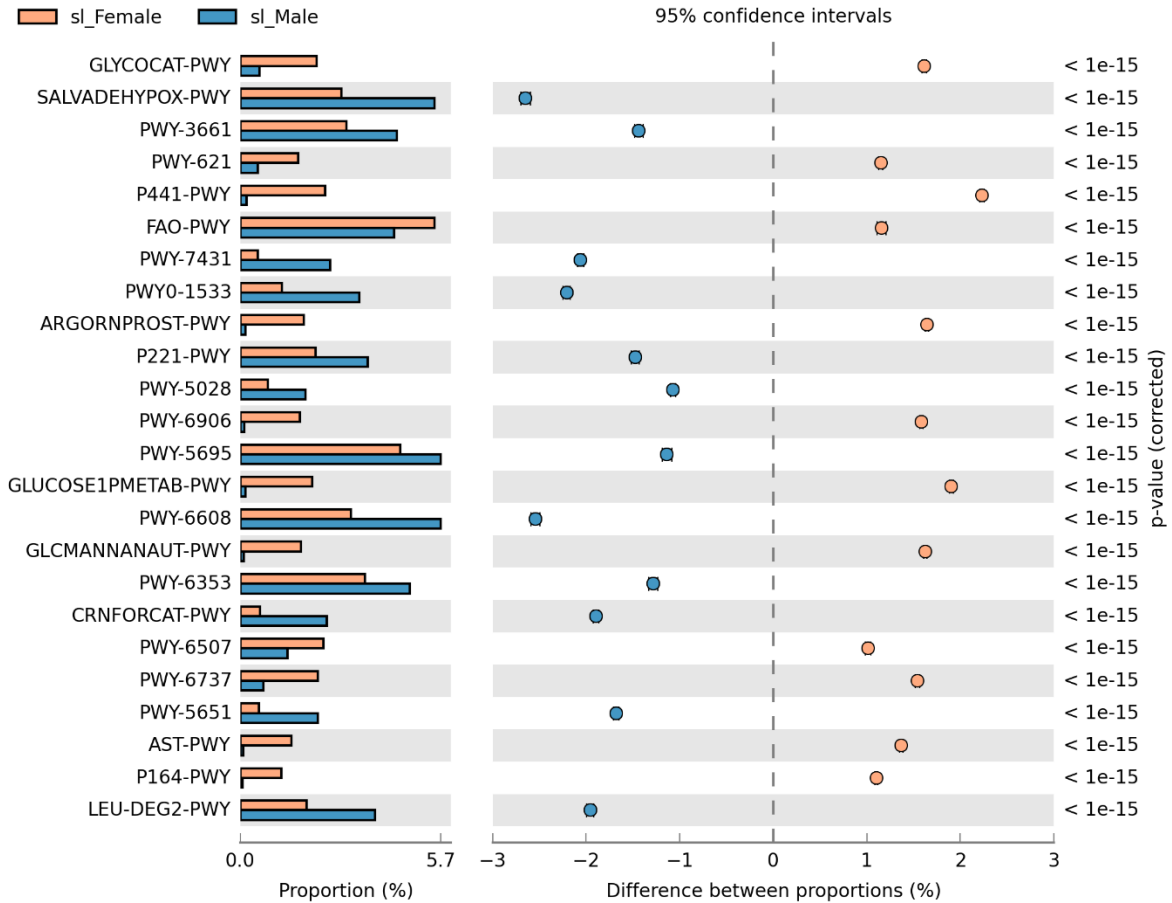


Figura 11. La figura muestra las rutas metabólicas KEGG significativamente diferentes entre hembras (naranja) y machos (azul) de *Caligus rogercresseyi*, obtenidas mediante inferencia funcional basada en secuencias de 16S rRNA utilizando PICRUSt2 y comparadas mediante análisis estadístico en STAMP. En el panel izquierdo se presentan las proporciones relativas (%) de cada ruta metabólica por sexo. El panel derecho muestra la diferencia entre proporciones (hembras – machos) junto con los intervalos de confianza del 95%.

6.7. DINÁMICA ONTOGÉNICA DE LA ACTIVIDAD BACTERIANA

La figura 12 muestra un mapa de calor de expresión génica bacteriana construido mediante la integración de datos de RNA-seq del piojo de mar con genomas reconstruidos de su microbiota. Cada fila representa contigs derivados de genomas bacterianos y cada columna corresponde a un estadio de desarrollo (*Nauplius I*, *Nauplius II*, *Copepodito*, *Chalimus I–II*, *Chalimus III–IV*) y adultos diferenciados por sexo (*Hembra* y *Macho*). La escala de color refleja niveles de

expresión normalizados (valores Z-score), donde los tonos cálidos indican mayor actividad transcripcional y los tonos fríos, menor actividad relativa. Donde se observa un patrón de reconfiguración funcional del microbioma a lo largo del desarrollo de *C. rogercresseyi*.

En las etapas tempranas Nauplius I y II, la expresión bacteriana es generalmente baja y homogénea, lo que sería consistente con que estas fases no son alimentarias y dependen principalmente de reservas endógenas de nutrientes del parásito. Esto sugiere que en estadios planctónicos la microbiota actúa como una comunidad ambiental transitoria, con baja actividad funcional integrada. Durante el estadio de copepodito, se observa la activación selectiva de algunos genomas bacterianos específicos. Esta etapa representa el punto crítico de infección y transición al parasitismo, lo que sugiere que ciertos taxones podrían desempeñar funciones asociadas al reconocimiento del hospedador, a la adaptación al nuevo nicho o a las respuestas al estrés ambiental durante el proceso de fijación al pez. Durante los estadios Chalimus I–II y III–IV, la actividad transcripcional bacteriana aumenta de forma marcada y heterogénea, lo que indica que el microbioma comienza a integrarse funcionalmente en el sistema huésped. En estas fases, el parásito ya se alimenta activamente, lo que podría favorecer el aumento de bacterias con capacidades metabólicas ligadas a la digestión, al procesamiento de nutrientes y a la detoxificación.

En los individuos adultos, el heatmap revela una clara divergencia funcional entre machos y hembras, reflejada en conjuntos distintos de contigs activamente transcritos. En hembras, se observa una activación de múltiples genomas bacterianos distintos de los del macho, lo que sugiere una microbiota metabólicamente activa. Esto podría estar relacionado con su mayor complejidad fisiológica, considerando la producción de huevos, la demanda energética asociada a la reproducción y el metabolismo lipídico.

En machos, en cambio, se observa una menor diversidad de genomas altamente activos, lo que sugiere una microbiota más especializada o funcionalmente reducida.

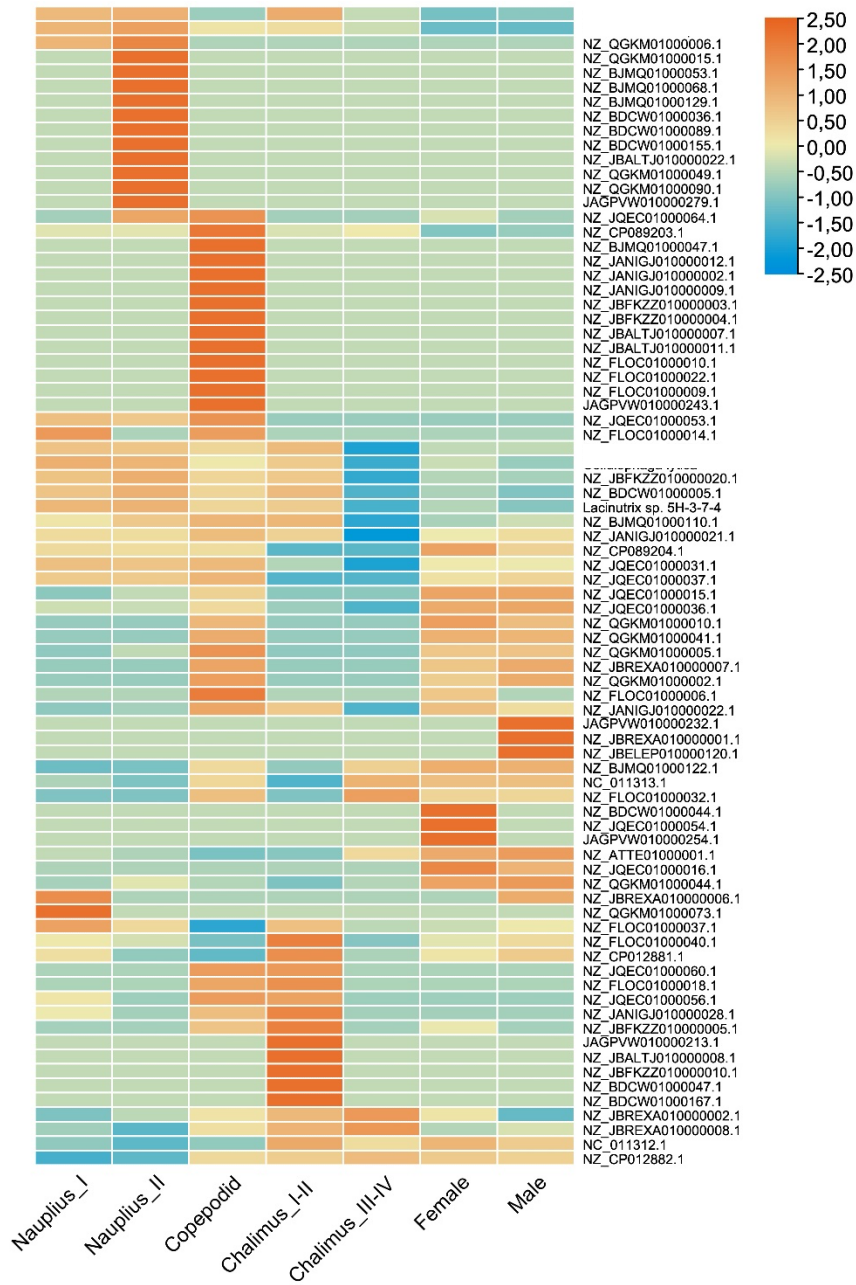


Figura 12. Dinámica ontogénica y diferenciación sexual de la actividad transcripcional bacteriana en *Caligus rogercresseyi*. Mapa de calor de expresión normalizada (Z-score) de contigs bacterianos detectados en el RNA-seq del parásito a lo largo del desarrollo ontogénico (Nauplius I, Nauplius II, Copepodid, Chalimus I-II, Chalimus III-IV) y en adultos diferenciados por sexo (Female, Male). Cada fila representa un contig bacteriano anotado contra genomas de referencia, mientras que cada columna corresponde a un estadio o sexo. Los colores cálidos representan mayor actividad transcripcional relativa y los colores fríos menor actividad.

6.8. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL MICROBIOMA BACTERIANO EN *CALIGUS ROGERCRESSEYI* MEDIANTE KEGG

Para caracterizar el perfil funcional activo de la microbiota bacteriana asociada a *Caligus rogercresseyi*, se integraron datos de RNA-seq del parásito con genomas bacterianos reconstruidos a partir de la microbiota, lo que permitió cuantificar la actividad transcripcional bacteriana mediante la asignación de rutas metabólicas KEGG.

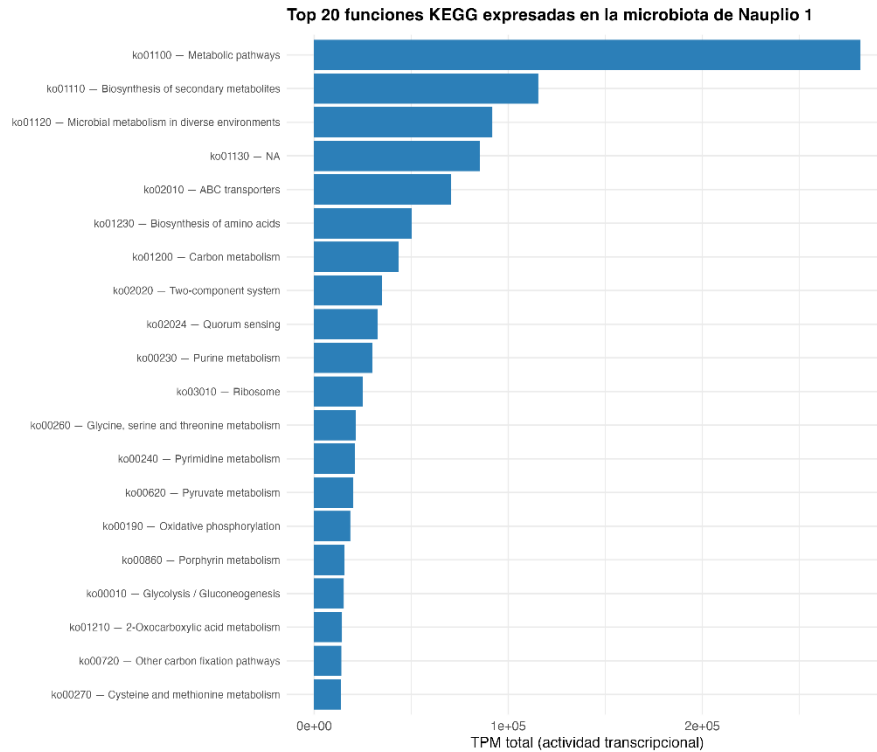
El análisis de las veinte rutas metabólicas con mayor actividad transcripcional (Fig. 13) reveló que la categoría ko01100–Metabolic pathways concentró el mayor nivel de expresión acumulada, lo que evidencia una alta activación global del metabolismo bacteriano dentro del sistema parásito–microbiota. Esta categoría, que agrupa múltiples procesos metabólicos centrales, mostró una actividad transcripcional sustancialmente superior a la de las demás rutas analizadas. La segunda categoría más activa correspondió a ko01110–Biosynthesis of secondary metabolites, seguida por ko01120–Microbial metabolism in diverse environments, lo que indica que la microbiota bacteriana presenta una notable capacidad biosintética y una alta adaptabilidad metabólica frente a condiciones ambientales variables. Asimismo, se detectó una actividad relevante en la categoría ko01130, que agrupa funciones metabólicas aún no completamente anotadas en la base de datos KEGG, lo que sugiere la presencia de repertorios funcionales no totalmente caracterizados.

Otras rutas altamente representadas incluyeron sistemas de transporte (ko02010 – ABC transporters), sistemas de señalización (ko02020–Two-component system), y comunicación bacteriana (ko02024–Quorum sensing), lo que sugiere una microbiota funcionalmente integrada, con capacidades activas de detección ambiental, regulación de la expresión génica y transporte de metabolitos.

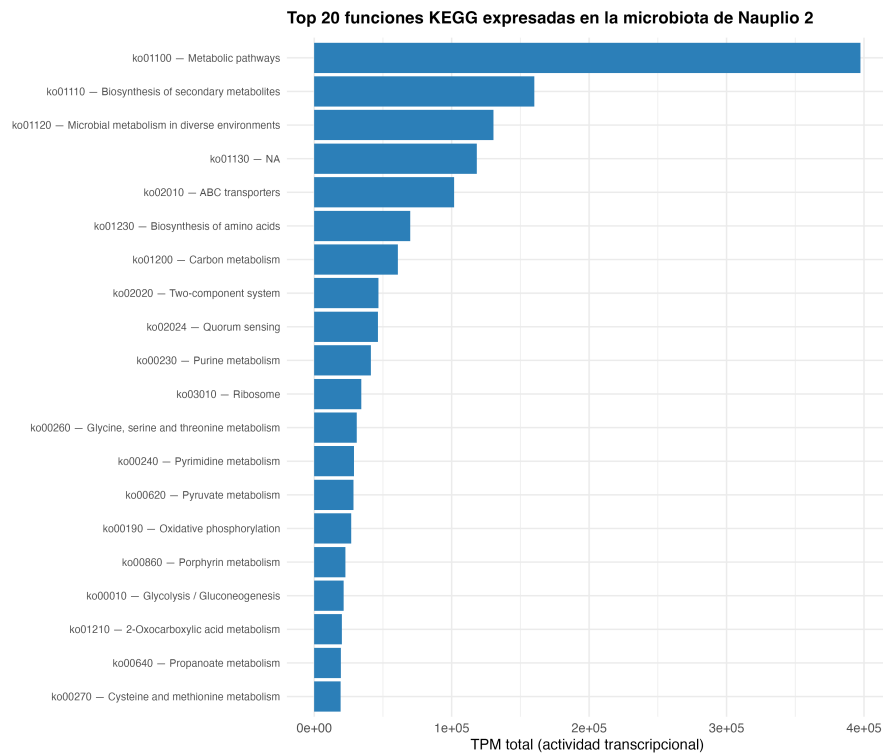
Adicionalmente, se observaron altos niveles de actividad en rutas asociadas al metabolismo central, tales como el metabolismo del carbono, el metabolismo de purinas y pirimidinas, el metabolismo de aminoácidos (glicina, serina, treonina, arginina y prolina), la glicólisis, la fosforilación oxidativa y el metabolismo del

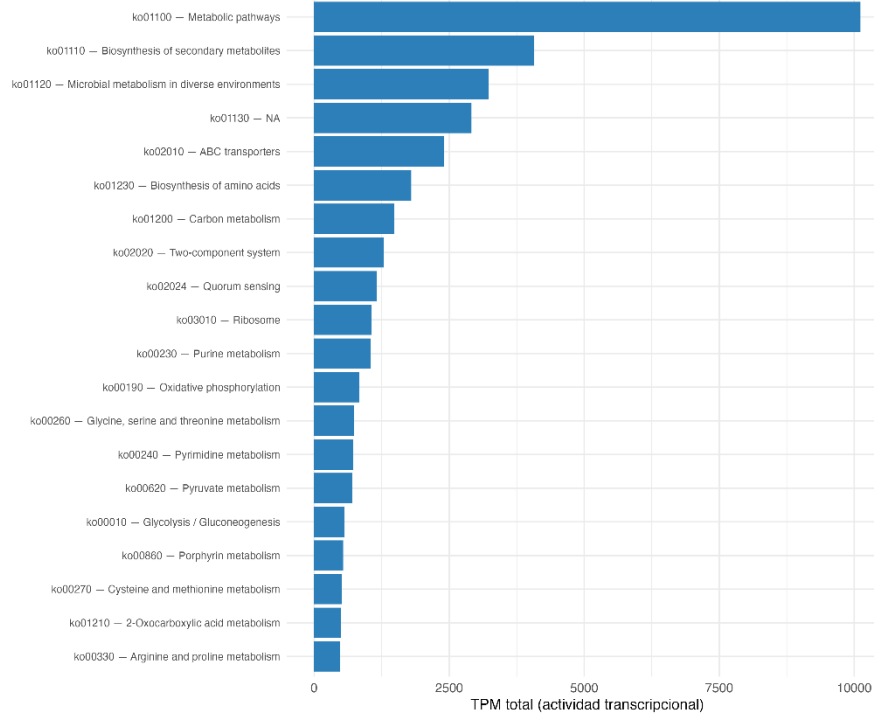
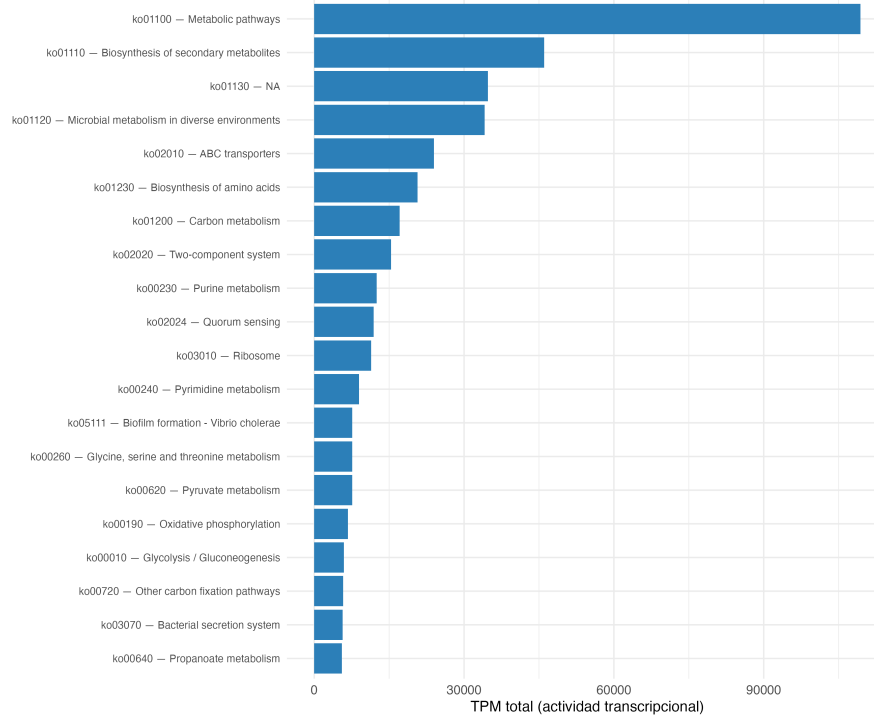
piruvato. Estas observaciones reflejan un perfil metabólico bacteriano energéticamente activo y orientado tanto a la producción de energía como a la biosíntesis celular.

A



B



C**Top 20 funciones KEGG expresadas en la microbiota de Copepodito****D****Top 20 funciones KEGG expresadas en la microbiota de Chalimus 1-2**

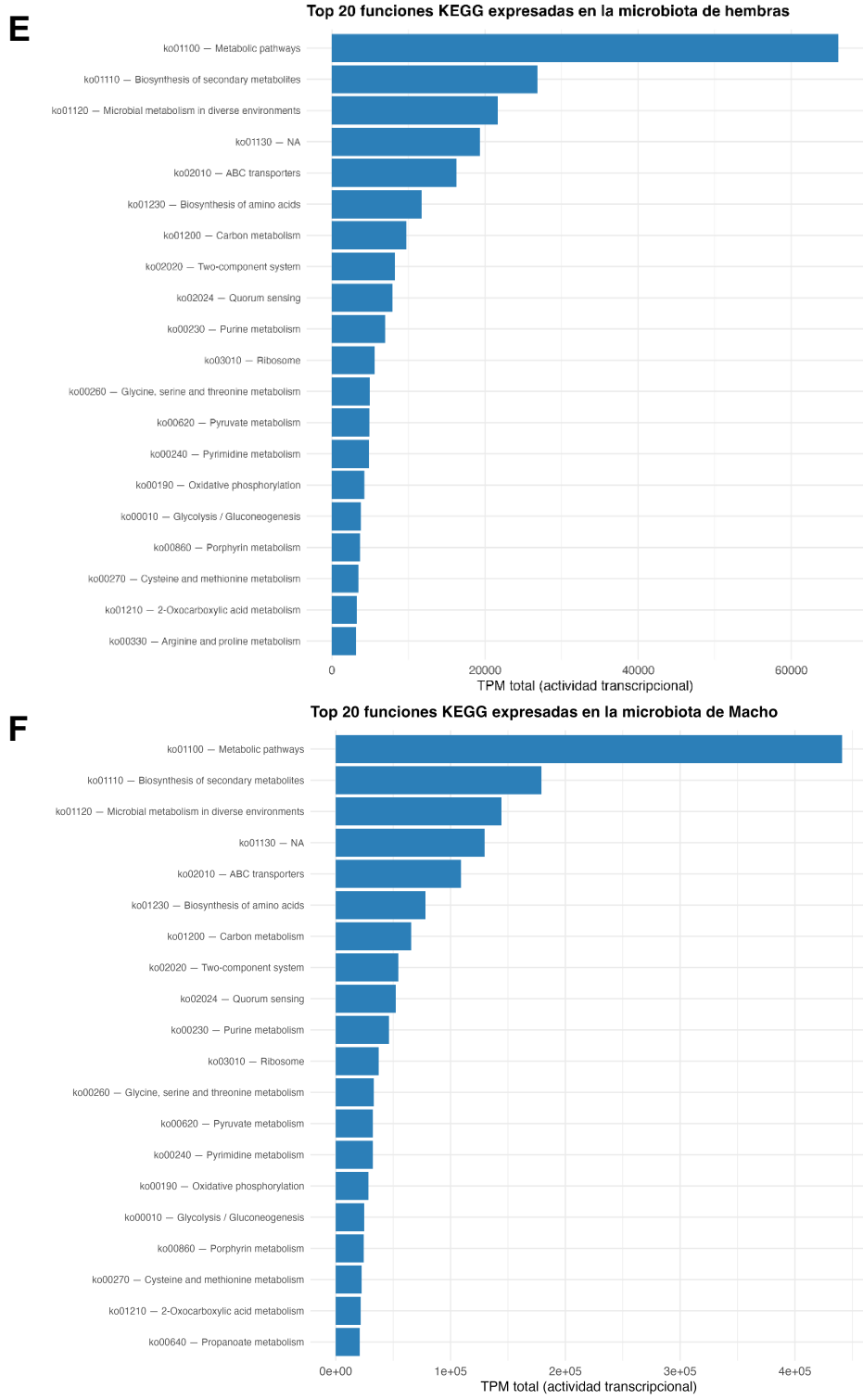
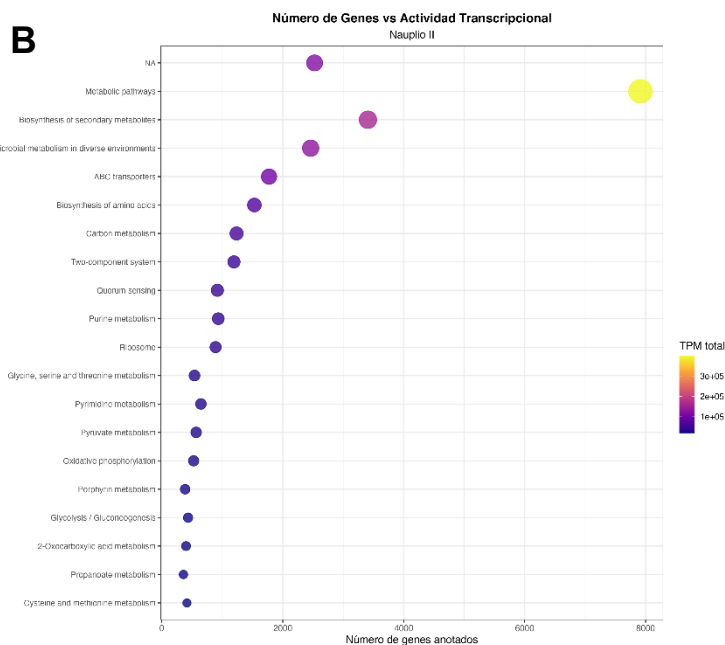
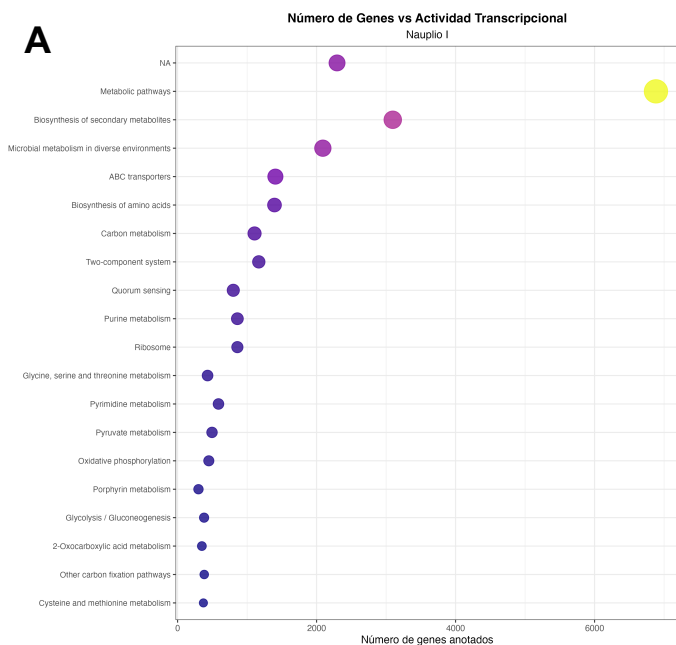


Figura 13. Funciones metabólicas de KEGG con mayor nivel de actividad transcripcional en la microbiota bacteriana para Nauplios I (A), Nauplios II (B), Copepoditos (C), Chalimus I-II (D), Hembra adulta (E) y Macho adulto (F). La figura muestra las veinte rutas metabólicas de KEGG con mayor expresión acumulada, estimada a partir de datos metatranscriptómicos (TPM). Las barras horizontales representan la actividad transcripcional total por ruta metabólica, mientras que el eje vertical indica las categorías funcionales según la base de datos KEGG

6.9. RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA GÉNICA Y ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL

Los diagramas de burbujas de la figura 14 permitieron evaluar de manera conjunta el número de genes anotados por ruta metabólica y la actividad transcripcional acumulada (TPM), entregando una visión integrada del potencial funcional versus uso efectivo de cada vía. En este análisis se observó que ko01100 (Metabolic pathways) no solo presentó la mayor cantidad de genes anotados, sino también el nivel más alto de expresión, lo que indica una correspondencia directa entre abundancia génica y relevancia funcional. En contraste, rutas como Biosynthesis of secondary metabolites y Microbial metabolism in diverse environments mostraron una alta actividad transcripcional, con un número relativamente menor de genes, lo que sugiere una priorización funcional de estas rutas en la microbiota asociada a hembras.

El grupo ko01130 presentó valores intermedios tanto en número de genes como en actividad transcripcional, lo que refuerza su posible importancia funcional. Por otro lado, rutas como Ribosome mostraron niveles moderados de expresión, consistentes con funciones celulares basales de traducción, lo que refleja actividad metabólica constitutiva.



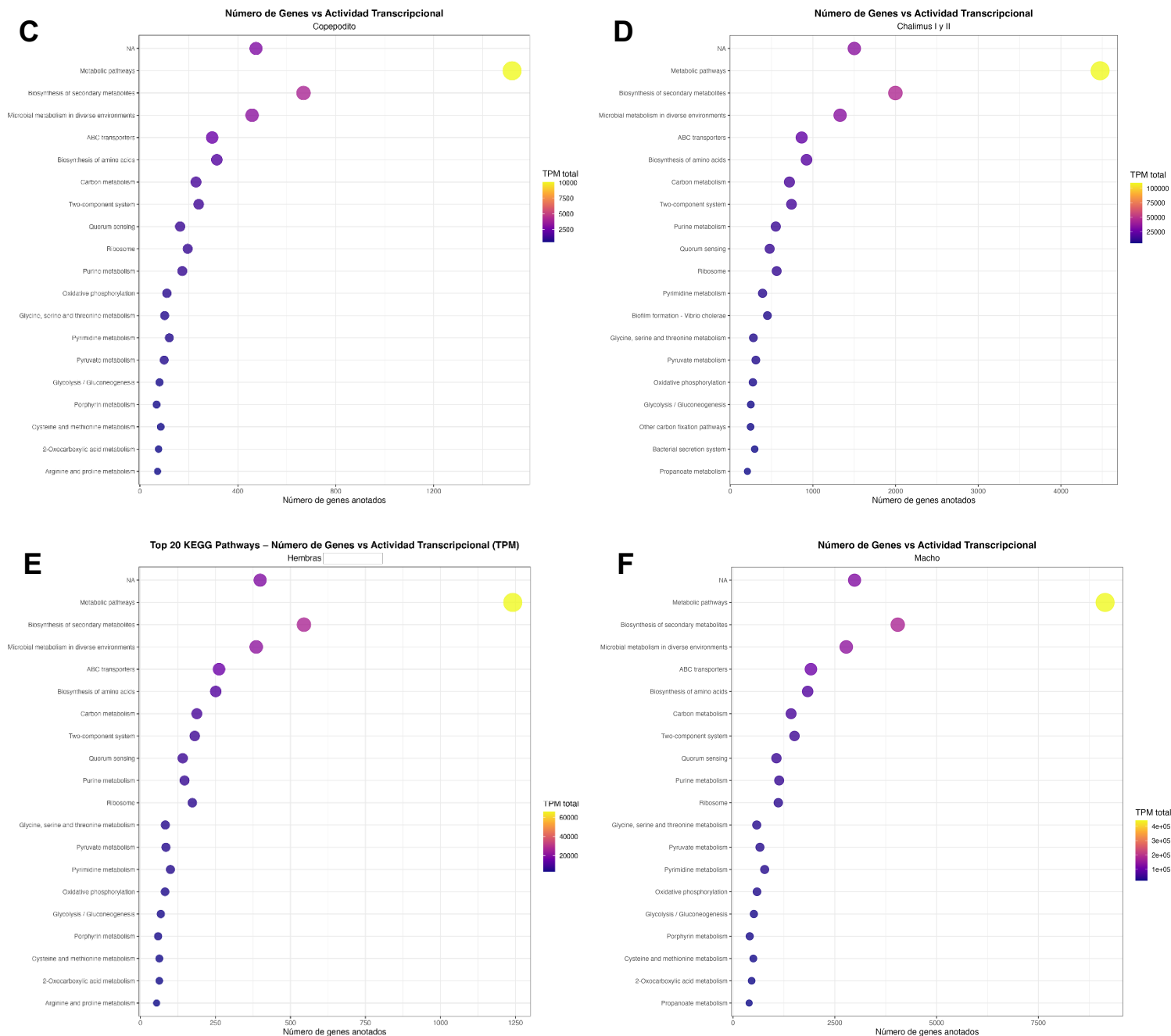


Figura 14. Relación entre el número de genes asociados a cada ruta KEGG y su actividad transcripcional total. Las figuras corresponden a un diagrama de burbujas en el que se representa la relación entre el número de genes bacterianos anotados por ruta metabólica KEGG (eje horizontal) y la actividad transcripcional acumulada, expresada como TPM total (eje vertical), para Nauplios I (A), Nauplios II (B), Copepoditos (C), Chalimus I-II (D), Hembra adulta (E) y Macho adulto (F). Cada punto representa una ruta metabólica individual. El tamaño del punto es proporcional al total de TPM registrados en cada ruta, mientras que la escala de color indica niveles relativos de expresión transcripcional.

6.10. DINÁMICA ONTOGÉNICA DE LAS PRINCIPALES RUTAS KEGG EN EL MICROBIOMA DE *CALIGUS ROGERCRESSEYI*

Aunque en los análisis anteriores todas las etapas de desarrollo evaluadas compartieron un conjunto funcional similar de rutas metabólicas, se observaron diferencias marcadas en los niveles de expresión (TPM) y en la abundancia relativa de genes asociados a cada función. Este patrón puede indicar que la microbiota mantiene un núcleo funcional conservado a lo largo del desarrollo, pero con modulaciones importantes en su nivel de actividad según estadio y sexo del hospedador.

La figura 15 muestra la comparación de las rutas metabólicas KEGG más representativas del microbioma bacteriano de *Caligus rogercresseyi* a lo largo de las distintas etapas de desarrollo ontogenético. El eje vertical representa la actividad transcripcional acumulada (TPM) en escala logarítmica, mientras que el eje horizontal corresponde a las fases del ciclo de vida. Se observa un patrón consistente de activación diferencial en todas las rutas analizadas durante el desarrollo, con variaciones marcadas entre las fases tempranas, intermedias y adultas. En particular, las rutas más destacadas en los análisis anteriores, ko01100, ko01110, ko01120 y ko02010, mostraron patrones paralelos de fluctuación, lo que sugiere una reorganización coordinada de la actividad metabólica bacteriana.

Durante las etapas planctónicas tempranas (Nauplius I y II), se registraron niveles elevados de expresión en todas las rutas evaluadas. Esta alta actividad sugiere la presencia de una microbiota ambiental metabólicamente activa asociada a los estadios larvales libres del parásito. En contraste, en el estadio copepodito se observó una disminución abrupta de la actividad transcripcional bacteriana en todas las rutas, lo que indicaría un evento de transición funcional coincidente con el inicio del proceso de infección del hospedador. Esta reducción podría estar asociada a un recambio microbiano durante la fijación al pez o a condiciones fisiológicas transitorias desfavorables para la expresión bacteriana. Posteriormente, durante los estadios chalimus I–II, se evidenció una reactivación generalizada de las rutas metabólicas, lo que sugiere que la microbiota comienza a establecerse

funcionalmente una vez que el parásito inicia su alimentación activa sobre el hospedador. Sin embargo, en Chalimus III–IV se detectó una nueva disminución significativa en la actividad bacteriana, especialmente en las rutas relacionadas con el transporte y la biosíntesis, reflejando un segundo punto crítico de reorganización funcional.

En adultos, se observó una activación marcada y diferenciada según el sexo. En ambos sexos, las rutas metabólicas mostraron un aumento significativo respecto a los estadios juveniles, lo que evidencia la consolidación de una microbiota metabólicamente activa en la fase adulta.

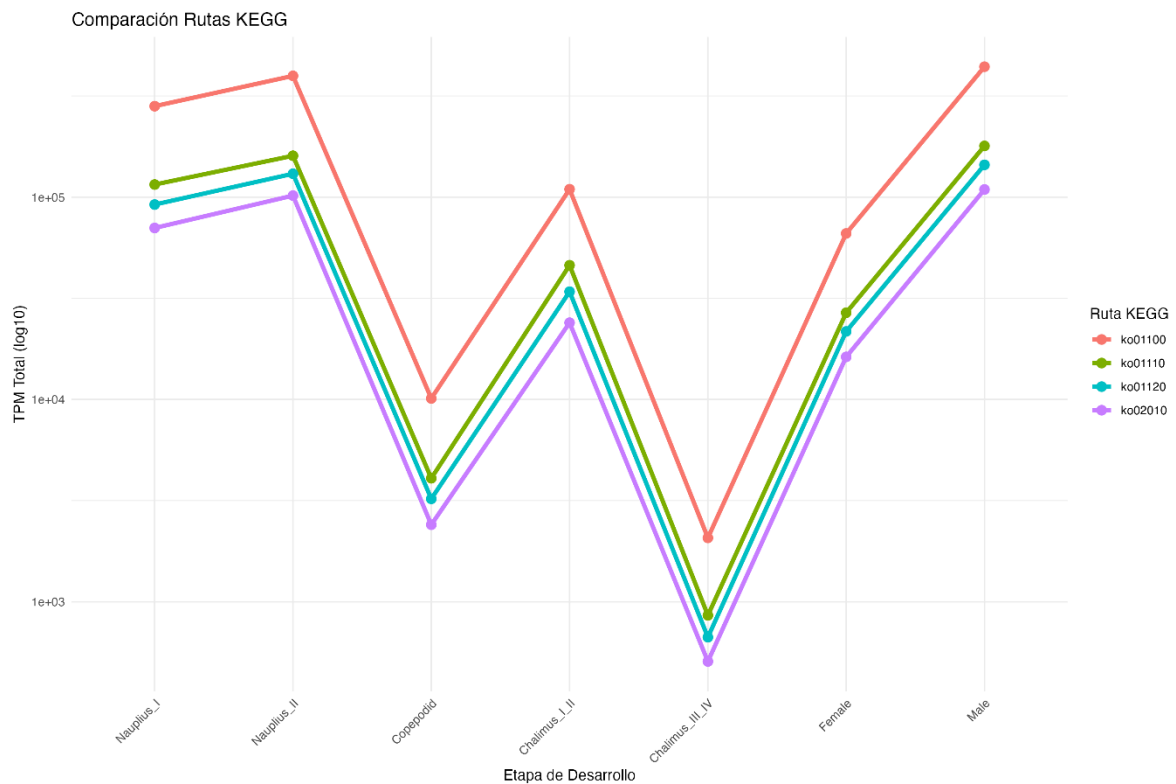


Figura 14. Dinámica de la actividad transcripcional de rutas KEGG seleccionadas a lo largo del ciclo de vida de *Caligus rogercresseyi*. La figura muestra la variación en la actividad transcripcional total (TPM acumulada) de cuatro rutas metabólicas de KEGG en distintos estadios del desarrollo ontogénico y en adultos diferenciados por sexo. El eje horizontal representa las etapas de desarrollo, mientras que el eje vertical indica los valores de TPM total en escala logarítmica (\log_{10}). Cada línea corresponde a una categoría funcional KEGG distinta

En el PCA de la figura 16 se observa una separación clara entre los distintos estadios de desarrollo, lo que evidencia que el perfil funcional del microbioma no se mantiene constante, sino que experimenta cambios profundos a lo largo de la ontogenia del parásito.

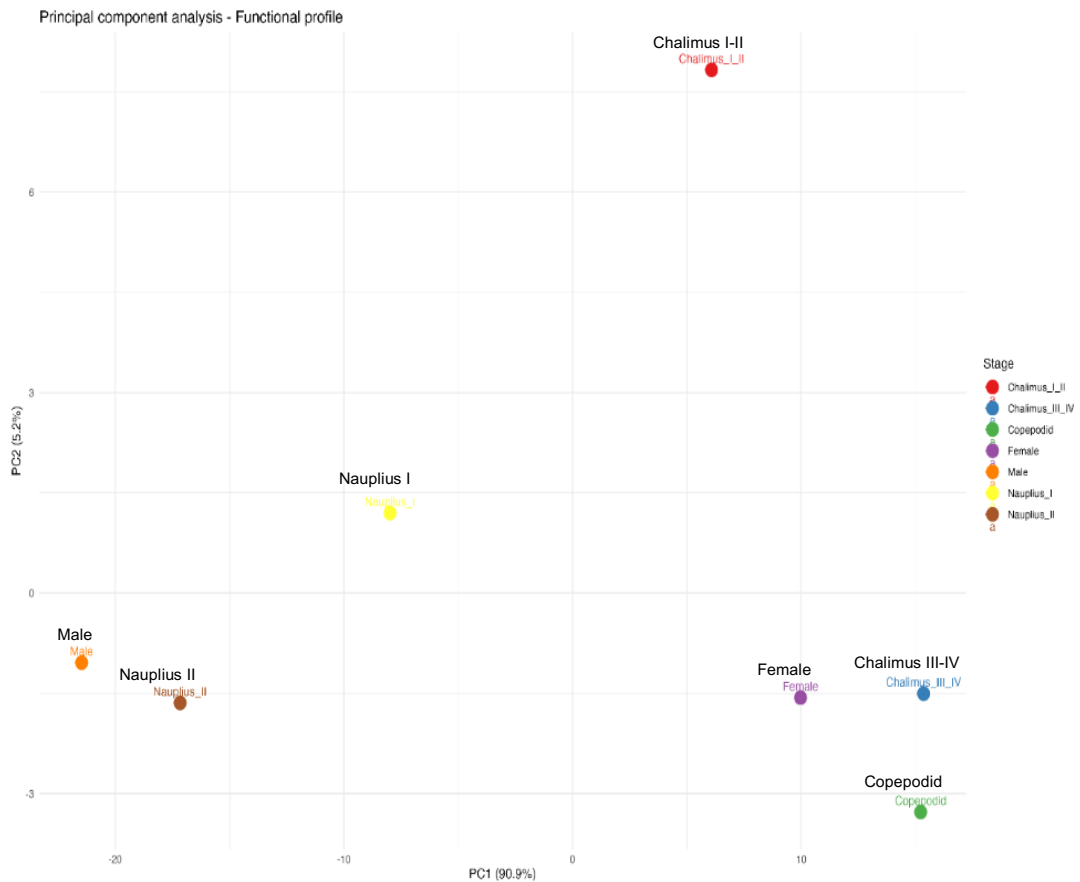


Figura 15. Análisis de componentes principales (PCA) basado en perfiles funcionales de KEGG de la microbiota bacteriana asociada a *Caligus rogercresseyi*. El gráfico representa la proyección de las muestras correspondientes a diferentes estadios de desarrollo (*Nauplius I*, *Nauplius II*, *Copepodito*, *Chalimus I-II*, *Chalimus III-IV*) y adultos diferenciados por sexo (hembra y macho) en los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), calculados a partir de la actividad transcripcional bacteriana asociada a rutas metabólicas KEGG

6.11. ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL SEGÚN GENE ONTOLOGY (GO)

El análisis de enriquecimiento funcional mediante Gene Ontology (GO) (Fig. 17) reveló que la microbiota asociada a *Caligus rogercresseyi* presenta una actividad funcional altamente estructurada y específica según el estadio de

desarrollo y sexo del hospedador. En la categoría de Procesos Biológicos, se observaron términos significativamente enriquecidos relacionados con el transporte y la respuesta a bacteriocinas, la división celular, la biosíntesis de cofactores como NAD y los procesos de interacción con el hospedador. Estos procesos sugieren una microbiota metabólicamente activa, involucrada en la competencia microbiana y en el establecimiento de relaciones huésped-microorganismo. Adicionalmente, la detección de procesos como la síntesis de translesión de ADN, la organización de la pared celular y la respuesta al frío indica una comunidad bacteriana adaptada para tolerar el estrés ambiental y el daño genético. En la categoría de Componentes Celulares, los términos enriquecidos incluyeron estructuras clave del metabolismo bacteriano, como el espacio periplásmico, los complejos de ATP sintasa y la maquinaria ribosomal. Esta sobrerrepresentación refleja una alta actividad en los procesos de generación de energía, traducción proteica y transporte molecular. Consistente, la categoría de Funciones Moleculares mostró enriquecimiento en actividades enzimáticas como metiltransferasas, transpeptidasas de peptidoglicano, deshidrogenasas dependientes de NADP^+ y enzimas involucradas en modificaciones postraduccionales. La identificación de funciones de unión a componentes virales sugiere posibles interacciones con fagos o mecanismos de defensa antiviral.

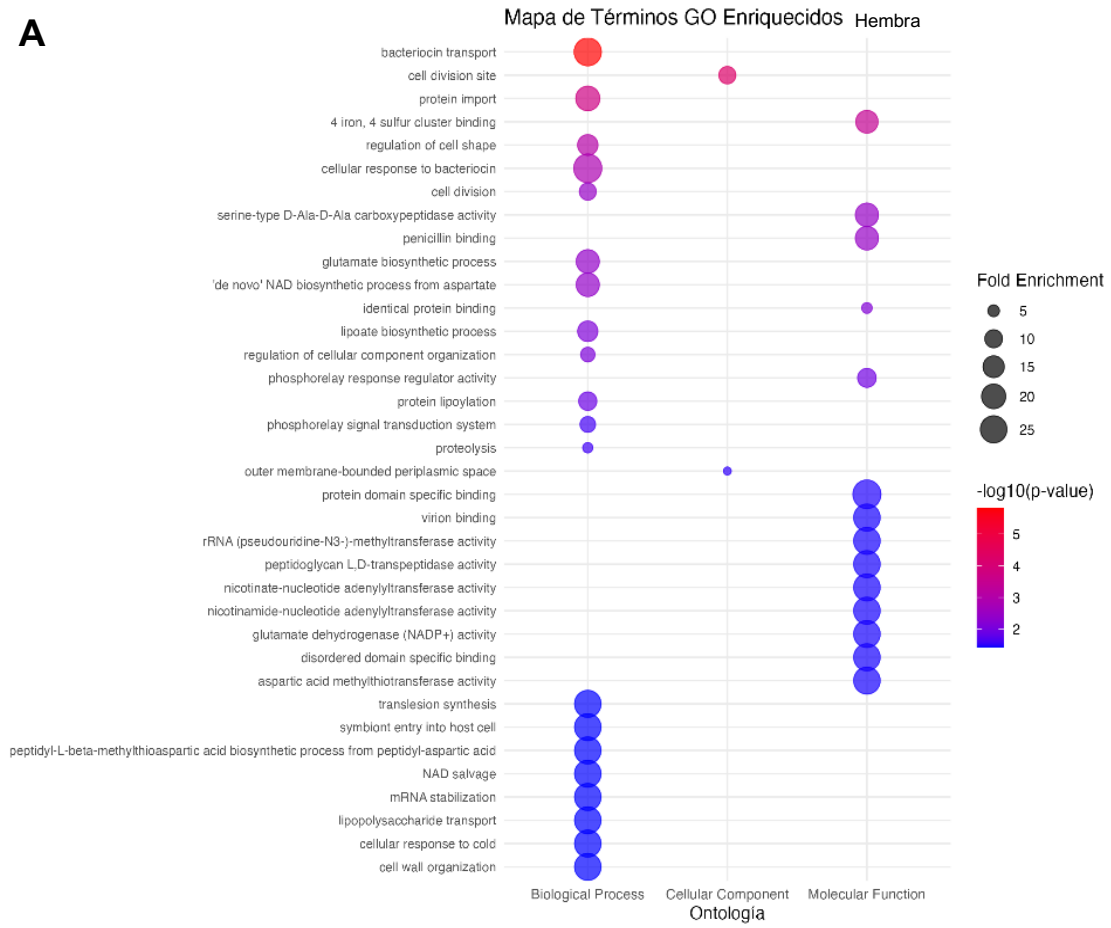
En hembras adultas (Fig. 17A), el perfil de enriquecimiento refleja un estado metabólico altamente activo y biosintético. La sobrerrepresentación de procesos como la división celular bacteriana, la biosíntesis de NAD *de novo* y la biosíntesis de glutamato, un precursor clave en el metabolismo nitrogenado, junto con funciones de lipoilación (esenciales en el ciclo de Krebs) y de metabolismo de compuestos sulfurados, indica una comunidad microbiana proliferativa y metabólicamente versátil. Este perfil es consistente con las demandas energéticas y biosintéticas asociadas a la producción de huevos. El dominio de actividades moleculares como metiltransferasas (modificación epigenética y de macromoléculas) y deshidrogenasas dependientes de NADP (biosíntesis reductora), y la prominencia de componentes celulares como el espacio

periplásmico (interfaz de transporte y detección), refuerzan la noción de una microbiota involucrada en un metabolismo primario y secundario activo.

En contraste, la microbiota de los machos (Fig. 17B) mostró un enriquecimiento en procesos regulatorios, de mantenimiento y de respuesta al estrés. Términos como síntesis por translesión (tolerancia al daño del ADN), organización de la pared celular (integridad estructural) y una fuerte señal en actividades ribosomales y de unión a macromoléculas, sugieren un perfil centrado en la homeostasis celular, la reparación y la síntesis proteica, más que en una proliferación activa. Esto podría reflejar diferencias fisiológicas ligadas al sexo, en las que la inversión energética de los machos no está dirigida hacia la reproducción en la misma medida que en las hembras.

Los estadios larvarios exhibieron características funcionales distintivas. En el copepodito (etapa infectiva) (Fig. 17C) el enriquecimiento sugiere un papel activo de la microbiota en la colonización o interacción temprana con el hospedador. Junto con términos de biosíntesis de nucleótidos, este perfil podría indicar una transición hacia un metabolismo especializado para la adhesión y la infección. Por su parte, el Nauplius II, una fase no alimentaria (Fig. 17D), presentó un perfil funcional orientado a la obtención de energía, con un enriquecimiento marcado en fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP. Esto es coherente con una dependencia total del metabolismo endógeno para la supervivencia durante esta fase de dispersión planctónica.

A



B**C**

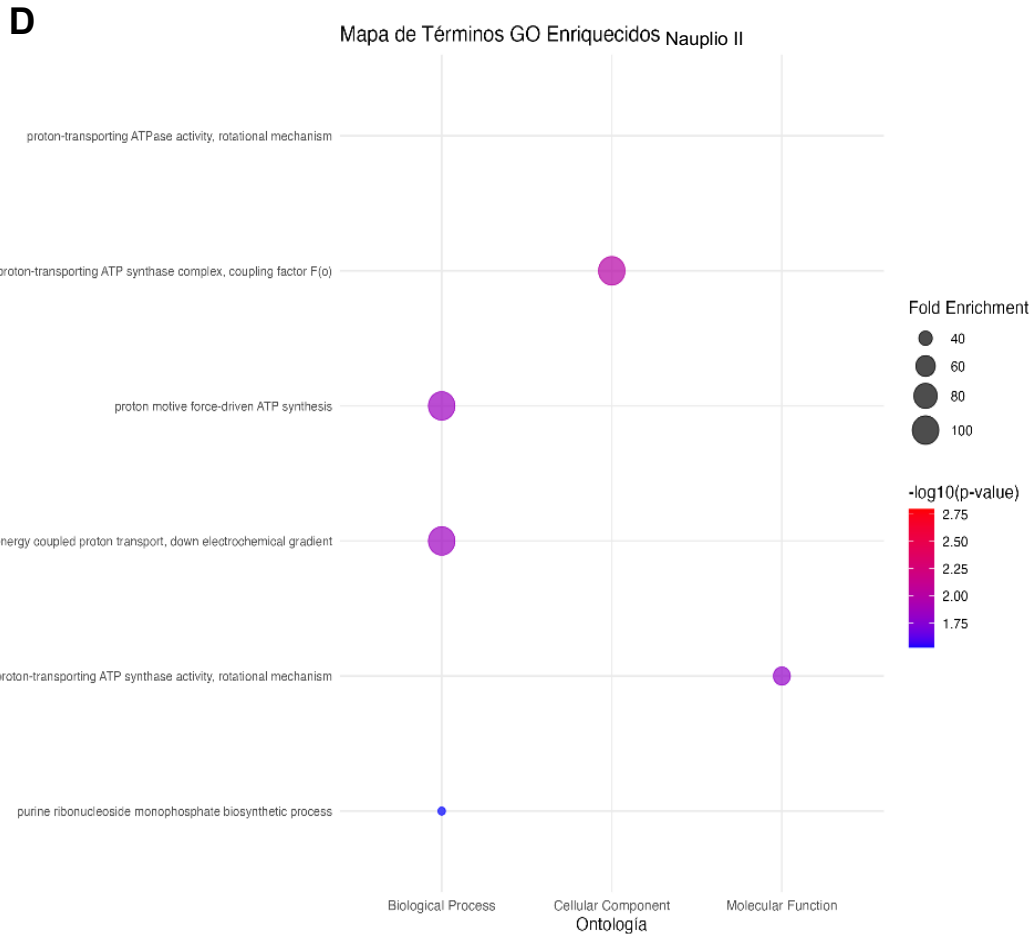


Figura 16. Enriquecimiento funcional Gene Ontology (GO) La figura muestra los términos GO significativamente enriquecidos a partir del análisis funcional del conjunto de genes bacterianos detectados en Hembra (A), Macho (B), Copepodito (C) y Nauplio II (D) El eje vertical representa los términos GO, mientras que el eje horizontal corresponde a las tres categorías ontológicas: *Biological Process* (BP), *Cellular Component* (CC) y *Molecular Function* (MF). Cada punto representa un término enriquecido; el tamaño de la burbuja indica el grado de enriquecimiento relativo (Fold Enrichment) y el color corresponde a la significancia estadística expresada como $-\log_{10}(p\text{-value})$, según la escala mostrada.

6.12. RELACIÓN ENTRE NIVEL DE EXPRESIÓN Y SIGNIFICANCIA FUNCIONAL

Para evaluar conjuntamente la abundancia transcripcional y la relevancia biológica de las funciones microbianas, se integraron los datos de expresión génica (media de \log_2 TPM) con la significancia estadística del enriquecimiento ($-\log_{10} p\text{-value}$) en la figura 18. Este enfoque permitió identificar no solo funciones

sobrerrepresentadas, sino también aquellas que son transcripcionalmente dominantes en cada estadio.

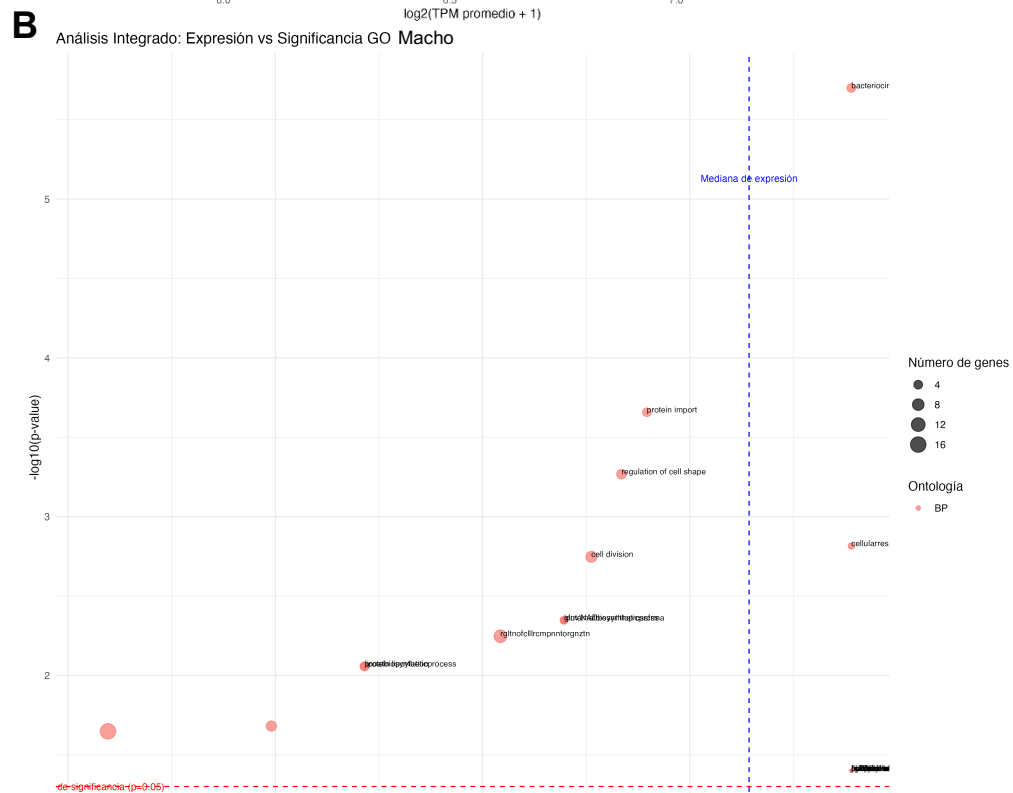
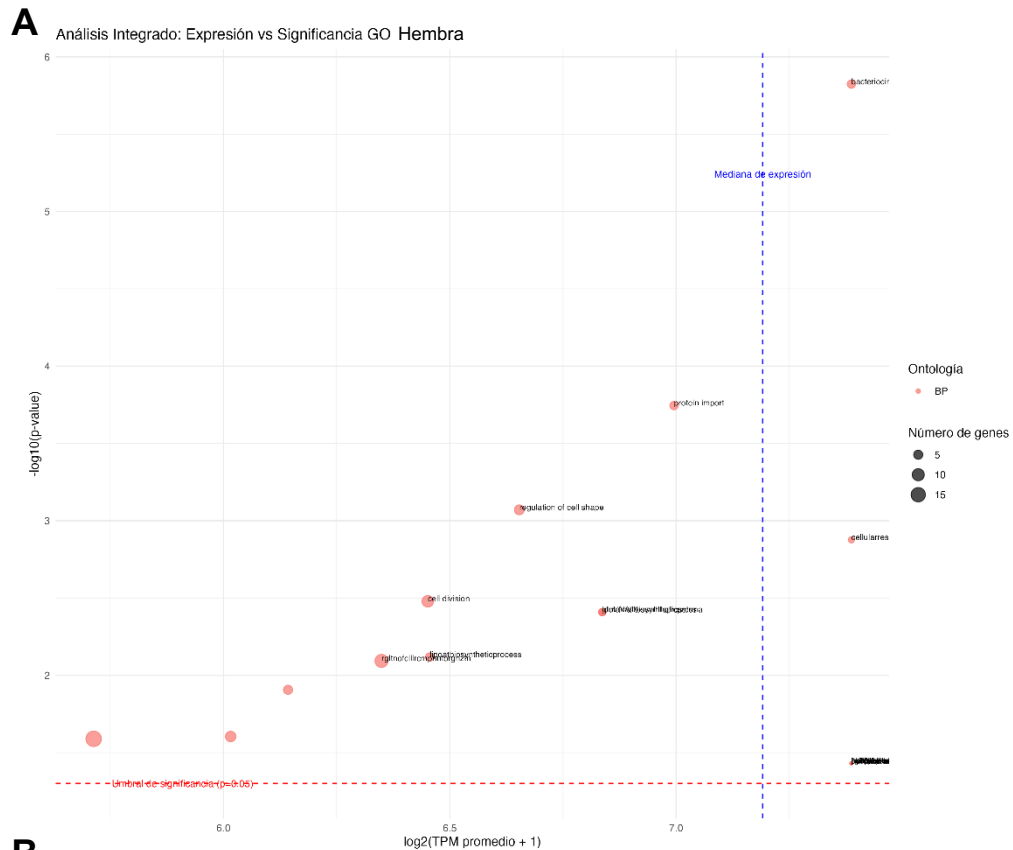
En hembras adultas (Fig. 18A), los términos que combinaron una alta expresión con una significancia estadística robusta incluyeron el transporte de bacteriocinas, la importación de proteínas, la regulación de la forma celular y la división celular. Esto indica que estos procesos no solo están genéticamente sobrerrepresentados, sino que están funcionalmente activos. Otros procesos, como la biosíntesis de aminoácidos y la organización de componentes celulares, mostraron niveles de expresión moderados pero alta significancia, lo que sugiere que constituyen una funcionalidad estructural central y constante del microbioma.

En los machos (Fig. 18B), el perfil fue distinto. Los términos más expresados y significativos se asociaron con la importación de proteínas y el procesamiento celular, mientras que otros procesos altamente enriquecidos (como diversas actividades de transferasas y de unión a ARN) presentaron una expresión moderada. Este patrón podría reflejar una especialización en funciones reguladoras o metabólicas, menos vinculadas a la proliferación activa que en las hembras.

El copepodito (Fig. 18C) mostró un conjunto más reducido de funciones, pero con una concentración notable en aquellas con alta expresión y significancia, principalmente vinculadas al metabolismo energético y al transporte acoplado a protones. Este hallazgo respalda la noción de una comunidad bacteriana funcionalmente especializada en el suministro bioenergético durante la transición hacia el estadio parasitario.

Finalmente, en el Nauplius II (Fig. 18D), a pesar de un repertorio funcional enriquecido más limitado, se observó una fuerte asociación entre la alta significancia estadística y la expresión de funciones ligadas al metabolismo energético. Esto confirma que, incluso en un contexto de diversidad funcional reducida, la actividad microbiana se concentra de manera intensa y específica en la generación de energía, lo cual es consistente con la fase no alimentaria de esta larva.

En conjunto, este análisis integrativo demuestra que las diferencias funcionales entre estadios y sexos no solo se deben a la identidad de las funciones enriquecidas, sino también a sus niveles de actividad transcripcional, lo que revela una modulación ontogénica y sexual del perfil funcional del microbioma de *C. rogercresseyi*.



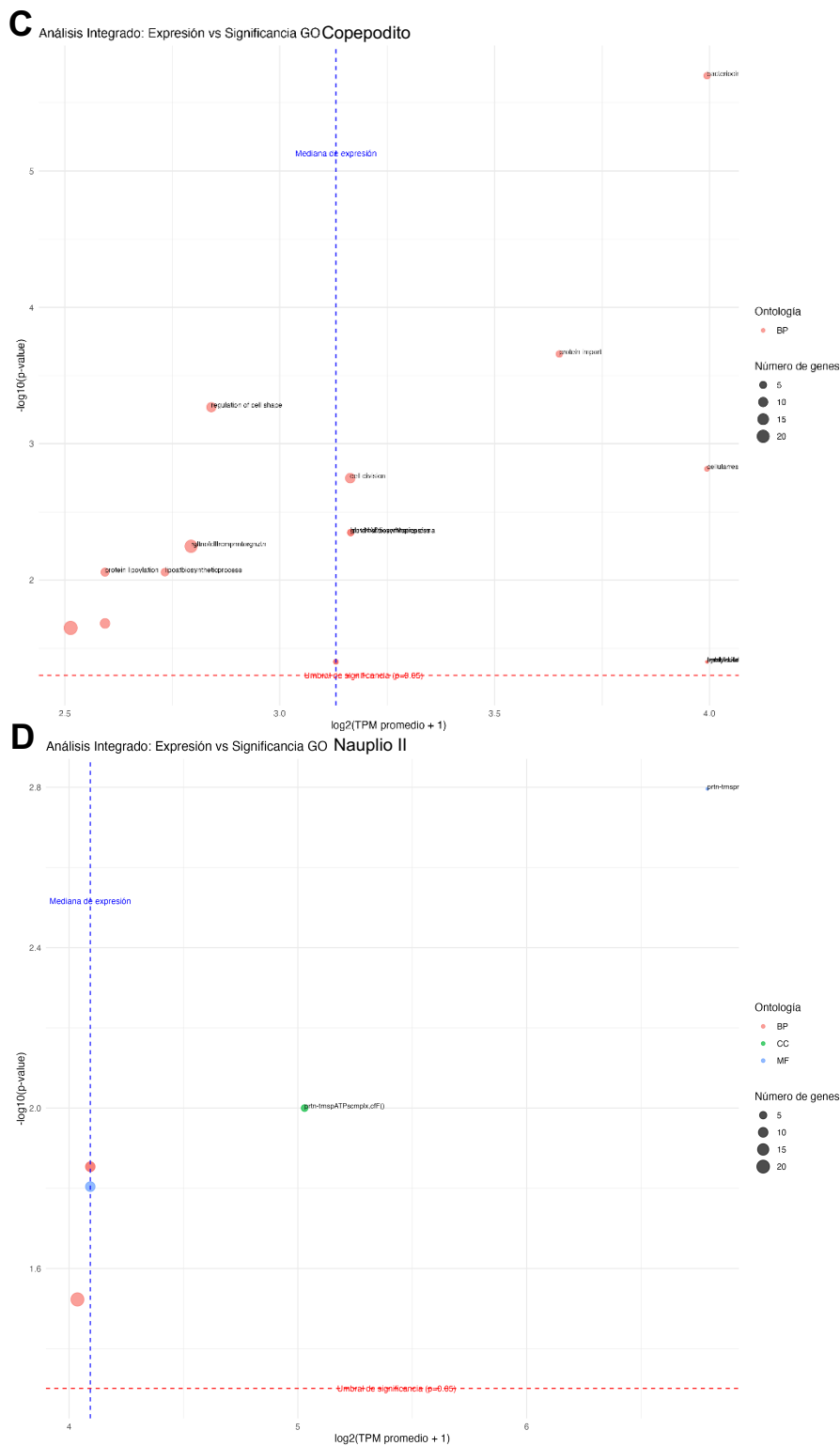


Figura 17. Representación integrada de significancia estadística y nivel de expresión de términos Gene Ontology (GO). La figura muestra la relación entre enriquecimiento funcional e intensidad de expresión para los términos GO detectados en la microbiota asociada a Hembras (A), Machos (B), Copepoditos (C) y Nauplios II (D) El eje vertical representa la significancia estadística de cada término como $-\log_{10}(p\text{-value})$, mientras que el eje horizontal indica el valor de expresión agregado como $\log_{10}(\text{TPM} + 1)$. Cada punto corresponde a un término GO y está coloreado según su categoría ontológica: *Biological Process* (BP), *Cellular Component* (CC) o *Molecular Function* (MF), según la leyenda. El tamaño de los puntos es proporcional al número de genes asociados a cada término. La línea discontinua horizontal indica el umbral de significancia estadística, y la línea discontinua vertical corresponde al valor de corte de expresión utilizado en el análisis.

6.13. ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL GO ESPECÍFICO POR ETAPA DE DESARROLLO

Con el fin de identificar funciones activas que fueran exclusivas de etapas particulares del desarrollo, incluso cuando no figuraran entre los términos globalmente más abundantes. Se realizó un análisis que permitió detectar conjuntos funcionales específicos por etapa que no necesariamente emergen en análisis comparativos basados únicamente en abundancia relativa global (Fig. 19).

En los estadios tempranos (*Nauplius II*), se observó un enriquecimiento de términos asociados al transporte transmembrana activo, especialmente relacionados con el transporte de cationes monovalentes y transportadores acoplados a hidrólisis de ATP. Esto sugiere una alta demanda metabólica asociada al mantenimiento de la homeostasis iónica y el potencial de membranal. En fases intermedias como *Chalimus I-II*, destacaron procesos vinculados a la traducción y biogénesis ribosomal, incluyendo ribosomas, subunidades ribosomales y complejos ribonucleoproteicos, lo que indica un incremento en la actividad translacional del microbioma durante este periodo de establecimiento sobre el hospedador.

En contraste, el estadio copepodito se caracterizó por el enriquecimiento de funciones metabólicas especializadas, incluyendo rutas biosintéticas específicas, procesos involucrados en el metabolismo de azufre, porfirinas y compuestos nitrogenados, lo que sugiere una reorganización metabólica hacia la biosíntesis de cofactores esenciales que podrían estar ligados con la transición a una fase parasítica más activa. Por su parte, los adultos mostraron patrones funcionales diferenciados por sexo: las hembras exhibieron un enriquecimiento de funciones relacionadas con replicación y mantenimiento del ADN bacteriano, reparación por escisión, regulación de la recombinación y metabolismo de nucleótidos, mientras que en los machos predominaron procesos metabólicos generales, particularmente relacionados con metabolismo primario, actividad catalítica y procesos celulares básicos.

GO Functions by Development Stage

Top 12 more expressed functions



Figura 18. Distribución de los términos de Gene Ontology (GO) expresados exclusivamente en distintos estadios de desarrollo de *Caligus rogercresseyi*. La figura presenta términos GO exclusivos para cada estadio de desarrollo (Nauplius II, Copepodid, Chalimus I-II, Hembras y Machos). Cada punto representa un término GO y su posición en el eje vertical corresponde al nombre del término funcional. El eje horizontal indica la etapa de desarrollo.

6.14. INTEGRACIÓN ENTRE GENOMAS BACTERIANOS Y EL TRANSCRIPTOMA DE *CALIGUS ROGERCRESSEYI*

Con el objetivo de evaluar el grado de solapamiento funcional entre el microbioma bacteriano activo y el genoma de *Caligus rogercresseyi*, se compararon los términos GO derivados de los contigs bacterianos detectados en el análisis metatranscriptómico con los términos GO anotados en el genoma del parásito. Esta comparación permitió clasificar los términos en tres categorías: compartidos entre la microbiota y el hospedador, exclusivos de bacterias y exclusivos de *Caligus* (Fig. 20).

El análisis reveló que una fracción importante de los términos GO está compartida entre la microbiota bacteriana y el genoma del parásito, lo que indica la existencia de funciones comunes expresadas simultáneamente por ambos sistemas biológicos. Estas funciones compartidas representan procesos metabólicos y celulares que podrían ser críticos para la interacción funcional entre el hospedador y la microbiota. En contraste, el número de términos GO exclusivos de bacterias fue considerablemente menor, lo que sugiere que una parte relevante de la actividad bacteriana detectada en el RNA-seq se superpone funcionalmente con procesos presentes también en el parásito, más que constituir rutas completamente independientes. Por otro lado, el genoma de *C. rogercresseyi* presentó una cantidad sustancialmente mayor de términos GO exclusivos, lo que refleja una mayor complejidad funcional intrínseca asociada a la biología del copépodo, incluyendo procesos propios del desarrollo, la reproducción, la regulación celular y las respuestas fisiológicas. No obstante, la presencia de un conjunto no trivial de términos compartidos evidencia una convergencia funcional entre la microbiota y el parásito, lo que apoya la idea de una interacción metabólica integrada más que de una simple coexistencia pasiva de bacterias dentro del organismo hospedador.

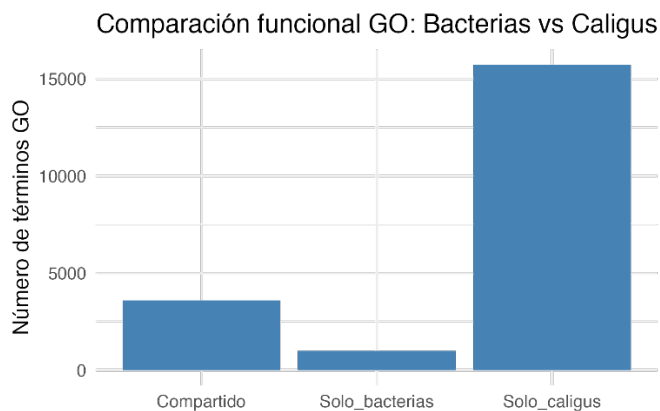


Figura 19. Comparación de las funciones compartidas y exclusivas entre *Caligus rogercresseyi* y su microbiota. La figura muestra el número total de funciones anotadas clasificadas en tres categorías: funciones compartidas entre *Caligus rogercresseyi* y su microbiota asociada (“Compartido”), funciones exclusivas de la microbiota bacteriana (“Solo_bacterias”) y funciones exclusivas del hospedador (“Solo_caligus”). El eje vertical indica el número de funciones anotadas, mientras que el eje horizontal representa las categorías funcionales según su correspondencia entre el hospedador y la microbiota. Cada barra representa el número absoluto de funciones detectadas en cada grupo funcional.

7. DISCUSIÓN

Este estudio constituye la primera caracterización integrada de la microbiota bacteriana asociada al piojo de mar *Caligus rogercresseyi*, combinando análisis taxonómicos basados en la secuenciación del gen 16S rRNA con predicción funcional y validación mediante metatranscriptómica bacteriana. En conjunto, los resultados revelan que la microbiota asociada no corresponde a un conjunto pasivo de microorganismos ambientales, sino a un sistema metabólicamente activo, estructurado y profundamente modulado tanto por el sexo como por el desarrollo ontogénico del hospedador.

A diferencia de estudios previos enfocados exclusivamente en la composición taxonómica (Gonçalves et al., 2020), este trabajo representa un avance conceptual que demuestra que las diferencias observadas en abundancia y diversidad no son solo descriptivas, sino que se traducen directamente en diferencias funcionales medibles a nivel de la expresión génica bacteriana. Así se

configura un modelo en el que parásito y microbiota operan como una unidad funcional acoplada, coordinando procesos clave de metabolismo, respuesta ambiental, proliferación bacteriana e interacción hospedador-microorganismo (Leung et al., 2018).

Estos resultados redefinen conceptualmente la biología de *C. rogercresseyi*, desplazándola desde una visión reduccionista del parásito como entidad aislada hacia una perspectiva de holobionte funcional, donde la fitness del ectoparásito resulta de la interacción integrada entre el genoma del hospedador, el microbioma y el ambiente (Simon et al., 2019). En este marco, la microbiota no es un epifenómeno, sino un componente activo de la biología del parásito, con impacto directo en su fisiología y ecología, y un potencial patogénico indirecto hacia el pez hospedador.

Uno de los hallazgos centrales de este trabajo es la existencia de una microbiota diferenciada según el sexo en *C. rogercresseyi*. A nivel taxonómico, observamos diferencias significativas en diversidad alfa y beta, abundancias relativas y composición bacteriana entre machos y hembras, tanto a nivel del organismo completo como en intestino. Esto indica una reorganización sistémica del microbioma asociada al sexo del hospedador.

Esta observación es congruente con la evidencia en vertebrados e invertebrados, donde el sexo biológico influye sustancialmente en la estructura del microbioma (Kim et al., 2019; Valeri & Endres, 2021). Sin embargo, lo que diferencia este trabajo es la demostración de que dicha diferenciación no es únicamente composicional, sino que se manifiesta en actividad funcional de la comunidad bacteriana. Mientras estudios previos documentaban diferencias de abundancia, aquí demostramos que las rutas metabólicas activas, procesos moleculares enriquecidos y perfil transcripcional son distintos entre sexos, confirmando que machos y hembras alojan sistemas metabólicos bacterianos diferentes. (Dittmer & Bouchon, 2018; Jiang et al., 2024; Zhang et al., 2020).

El hallazgo de menor diversidad bacteriana en machos, comparado con hembras, fue consistente tanto en individuos completos como en intestinos. Este patrón ha sido observado en otros artrópodos, pero no es universal, lo que sugiere que las diferencias sexuales en la microbiota no responden a una única causa estructural. (Guo et al., 2020; N. Li et al., 2024; Wan et al., 2020). De la misma manera como se identificó una diferenciación con la diversidad bacteriana en copepoditos, que al ser mayor que los otros dos grupos sugiere cambios en la composición de la microbiota a lo largo del ciclo de vida de los parásitos

En *C. rogercresseyi*, la biología comportamental proporciona una explicación funcional: los machos son altamente móviles, se desplazan entre hospederos y permanecen menos tiempo adheridos, lo que reduce su exposición prolongada al ambiente cutáneo del pez. Las hembras permanecen fijadas durante largos períodos, alimentándose continuamente, lo que facilita la colonización por bacterias asociadas al hospedador y la acumulación de comunidades más diversas (Boxshall & Bravo, 2000). Desde esta perspectiva, el sesgo sexual emerge como consecuencia ecológica de nichos diferenciados. Mientras que los copepoditos son de vida libre e interactúan constantemente con los microorganismos presentes en la columna de agua. Desde una perspectiva ecológica, copepoditos, machos y hembras ocupan nichos funcionales distintos, lo que se traduce en microbiotas estructuralmente diferenciadas, lo que refuerza la idea de que el microbioma debe interpretarse como componente dinámico del nicho ecológico del hospedador.

Más allá del comportamiento, el sesgo del ciclo de vida resulta de interacciones complejas entre la genética del hospedador, la fisiología y los simbioses. En los artrópodos existen numerosos ejemplos de bacterias endosimbióticas que manipulan procesos reproductivos y metabólicos. (Hornett et al., 2022). Aunque los copépodos carecen de hormonas sexuales vertebradas, la determinación sexual en artrópodos marinos está regulada por complejas redes genéticas que pueden ser moduladas indirectamente por el microbioma. La microbiota de *C. rogercresseyi* podría participar activamente en procesos de diferenciación sexual, de homeostasis endocrina funcional o de modulaciones

epigenéticas. La coexistencia estable de ciertos taxones bacterianos a lo largo de todos los grupos sugiere una relación simbiótica evolutivamente establecida, en línea con el concepto de coevolución hospedador-microbiota. (Valdebenito et al., 2024; Zuk & McKean, 1996).

A nivel de géneros bacterianos, observamos un enriquecimiento de *Aliivibrio* y *Vibrio* en hembras, mientras que *Tenacibaculum* predominó en machos y en copepoditos. Estos géneros incluyen patógenos relevantes en salmonicultura, asociados a ulceraciones, septicemias y lesiones bucales. Esta segregación sugiere que machos, copepoditos y hembras desempeñan roles epidemiológicos distintos (Baxter et al., 2017; Wang et al., 2023). Las hembras, por un prolongado contacto con el pez, podrían actuar como reservorios activos y fuentes directas de infección, mientras que los machos, por su alta movilidad, facilitarían la dispersión de patógenos entre individuos, y los copepoditos podrían utilizar los patógenos como sistema de infección secundaria para facilitar el anclaje a los peces. Esto da origen a un modelo epidemiológico dual:

- Hembra = reservorio estable
- Macho y Copepodito = vector móvil

Este modelo no ha sido propuesto previamente y constituye una contribución conceptual relevante a la ecología parasitaria. En *Lepeophtheirus salmonis*, cercano filogenéticamente, se ha descrito un dimorfismo transcriptómico profundo entre sexos (Poley et al., 2016). Nuestros resultados sugieren que este dimorfismo molecular es reforzado por la microbiota. El microbioma no solo acompaña esta diferencia, sino que la amplifica funcionalmente, actuando como un módulo metabólico diferencial según el sexo.

El análisis funcional basado en PICRUST2 reveló una especialización metabólica según el sexo del hospedador. Sin embargo, el aporte más relevante fue demostrar que estas predicciones reflejan procesos metabólicos activamente expresados, lo cual se confirmó mediante la integración de datos metatranscriptómicos.

En machos, observamos enriquecimiento en rutas biosintéticas, como la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, la biosíntesis de nucleótidos y la producción de lípidos estructurales. Estas funciones reflejan una microbiota orientada a procesos anabólicos, asociados a la generación de bloques estructurales esenciales. Este perfil podría interpretarse como soporte metabólico basal para un organismo altamente móvil, cuyos requerimientos se orientan a eficiencia metabólica más que a inversión energética intensiva. (Elgart et al., 2016) Una microbiota con alta capacidad biosintética permitiría compensar las limitaciones nutricionales temporales derivadas de una menor permanencia en el hospedero, otorgando una mayor autonomía metabólica.

En hembras, detectamos una sobrerrepresentación de rutas catabólicas y de generación de energía, incluyendo la β -oxidación de ácidos grasos, la glicólisis, la degradación de glucógeno y las rutas fermentativas (Guerra et al., 2022; Houten & Wanders, 2010). Este perfil sugiere una comunidad especializada en la extracción de energía a partir de múltiples fuentes de carbono, consistente con las demandas fisiológicas de ovogénesis, vitelogénesis y aumento de biomasa. (Gnainsky et al., 2021; Mao et al., 2020)

Lo relevante es que esta diferenciación funcional fue corroborada empíricamente mediante la actividad transcripcional. Rutas metabólicas enriquecidas en PICRUST2 mostraron una activación consistente en los perfiles de RNA-seq, lo que demuestra que estas funciones son efectivamente operativas. Este hallazgo confirma que el microbioma actúa como un órgano metabólico auxiliar diferenciable sexualmente.

Demostramos que la funcionalidad del microbioma bacteriano varía profundamente a lo largo del desarrollo ontogenético (Turón et al., 2024). El heatmap de actividad transcripcional reveló que el microbioma experimenta reorganizaciones funcionales coherentes con las transiciones fisiológicas del hospedador. En Nauplius I y II, de naturaleza planctónica y no alimentaria, la actividad transcripcional bacteriana fue baja y homogénea, lo que sugiere que la microbiota se comporta principalmente como una comunidad ambiental transitoria,

con escasa integración funcional. En copepodito, estadio infectivo, observamos reorganización abrupta de perfiles de expresión, caracterizada por activación selectiva de genomas bacterianos y reducción temporal de actividad global. Durante Chalimus I-IV, ya fijados al hospedero y en alimentación activa, registramos la recuperación de la actividad transcripcional y la diversificación funcional. La microbiota parece integrarse al metabolismo del hospedador, participando en la degradación de compuestos orgánicos, la síntesis de cofactores y la detoxificación. En adulto ocurre divergencia marcada por sexo, confirmando que el microbioma responde directamente a la fisiología interna del hospedador (De Vos et al., 2022; Rowland et al., 2017).

El análisis de rutas KEGG permitió la caracterización funcional de alto nivel. La categoría más representada fue ko01100: Metabolic pathways; esta categoría agrupa una amplia variedad de procesos celulares básicos, desde rutas catabólicas centrales hasta procesos biosintéticos, lo que sugiere una intensa activación global del metabolismo bacteriano dentro del sistema hospedador-microbiota. Esto indica que las bacterias mantienen un metabolismo funcional completo y activo. La elevada expresión de esta categoría no constituye un hallazgo trivial, sino que refleja que las bacterias presentes no se encuentran en un estado latente o residual, sino que están plenamente integradas al metabolismo del sistema, representa un componente metabólicamente activo, posiblemente involucrado en funciones fisiológicas fundamentales del hospedador. La segunda categoría más activa fue ko01110: Biosynthesis of secondary metabolites, lo que sugiere la producción de compuestos secundarios potencialmente bioactivos con funciones defensivas, comunicacionales y regulatorias. Ko01120: Microbial metabolism in diverse environments mostró una alta expresión, lo que indica una plasticidad metabólica crítica para adaptarse a las variaciones ambientales que experimenta el piojo. La activación consistente de rutas como ABC transporters, Two-component systems y Quorum sensing revela que la microbiota mantiene la capacidad de percibir estímulos ambientales, regular la expresión génica y coordinar respuestas comunitarias. Esto indica que es altamente sensible al microambiente del hospedador. La presencia activa de rutas relacionadas con metabolismo de

aminoácidos, nucleótidos, carbono y fosforilación oxidativa indica participación en redes metabólicas altamente activas, produciendo energía y precursores biosintéticos con implicancias funcionales directas sobre la biología del parásito.

La integración entre la arquitectura genómica bacteriana (número de genes) y la actividad transcripcional real mostró que las rutas metabólicas presentaron una mayor cantidad de genes anotados y niveles más altos de expresión, lo que indica una coincidencia directa entre la presencia génica y la relevancia funcional, siendo ko01100 la categoría más representada. En contraste, ko01110 y ko01120 presentaron actividad transcripcional elevada y un menor número de genes, lo que sugiere una priorización funcional en la que pocos genes altamente expresados sostienen procesos metabólicos estratégicos según las demandas fisiológicas.

Mientras KEGG proporcionó una visión sistémica de rutas metabólicas, Gene Ontology permitió abordar la funcionalidad desde una perspectiva diferente, revelando procesos celulares concretos. GO nos permitió identificar no solo que la microbiota metaboliza energía, sino también cómo lo hace, mediante enzimas específicas, estructuras celulares activas y rutas reguladas (Aleksander et al., 2023; Kanehisa & Goto, 2000). En conjunto, KEGG ofrece el mapa metabólico macro, mientras que GO aporta la microarquitectura funcional que sostiene dichos procesos. Los análisis GO desentrañaron procesos celulares, moleculares y estructurales que subyacen a la actividad metabólica inferida en KEGG. Demostró que el microbioma es un sistema altamente organizado, con funciones diferenciadas según estadio ontogénico y sexo. El enriquecimiento en funciones relacionadas con el transporte activo, la regulación de la expresión génica, la división celular bacteriana, la síntesis de cofactores y la competencia microbiana sugiere que la microbiota se encuentra en constante reorganización y expansión. Procesos asociados a la síntesis de NAD, al metabolismo del nitrógeno, a la biosíntesis de glutamato y a las rutas redox indican funciones ligadas al metabolismo energético central. Procesos relacionados con la respuesta a las bacteriocinas y la competencia bacteriana sugieren interacciones interespecíficas intensas dentro del piojo.

El enriquecimiento de ribosomas, complejos de ATP sintasa, periplasma y membranas bacterianas refleja una comunidad en estado metabólico activo, con maquinaria celular orientada a la producción energética, la traducción proteica y el transporte molecular (Pereira et al., 2011; Van Niftrik et al., 2010). La sobrerrepresentación del espacio periplásmico sugiere una microbiota altamente interactiva con su entorno, potencialmente influyente sobre la fisiología del parásito. El enriquecimiento de actividades enzimáticas, como metiltransferasas, transferasas, deshidrogenasas dependientes de NADP⁺ y transpeptidasas de peptidoglicano, revela una capacidad metabólica robusta y diversificada. La detección de funciones asociadas a proteínas de unión viral sugiere una interacción potencial entre bacterias y bacteriófagos, lo que introduce un nivel adicional de complejidad ecológica (Koh et al., 2004; J. Li et al., 2024; Xie et al., 2020).

La ontogenia revela reorganizaciones funcionales coherentes con las transiciones fisiológicas. En Nauplius II, el enriquecimiento se centró en la producción de energía, lo que refleja una condición no alimentaria. En copepodito, se indica una reorganización metabólica abrupta asociada a la transición al estadio parasítico. Durante Chalimus, aumenta la actividad biosintética, destacándose los procesos de traducción y la biogénesis ribosomal. Esto sugiere una microbiota estableciéndose en el hospedador y entrando en una fase de integración metabólica profunda. En adultos, se consolida la diferenciación por sexo. En hembras, la microbiota estuvo enriquecida en procesos asociados a la división celular bacteriana, la biosíntesis de NAD, el metabolismo del glutamato y funciones relacionadas con el estado redox. Estas funciones son congruentes con un microbioma altamente metabólico y replicativo, lo que sugiere una comunidad bacteriana en expansión funcional, capaz de sostener altos niveles de actividad bioquímica (Baquero et al., 2022; Beaufay et al., 2015; Zhang et al., 2018). Esto se alinearía con las demandas fisiológicas de la hembra, en particular durante la ovogénesis, cuando los requerimientos energéticos aumentan significativamente (Boxshall & Bravo, 2000). La microbiota podría estar contribuyendo directamente a la generación de cofactores esenciales, metabolitos energéticos y procesos secundarios que sostienen la reproducción. En contraste, los machos mostraron

enriquecimiento en funciones relacionadas con el mantenimiento celular, la reparación del ADN, la síntesis ribosomal y la regulación estructural, lo que sugiere una microbiota más conservadora, orientada a la estabilidad celular más que a la expansión proliferativa (Khan et al., 2024; Qi et al., 2021). La divergencia funcional observada entre sexos implica que cada microbiota está adaptada a sostener una biología distinta. En hembras, se priorizan procesos energéticos y replicativos; en machos, procesos homeostáticos.

El análisis de solapamiento GO entre microbioma y genoma de *C. rogercresseyi* reveló que una proporción importante de términos se comparte, sugiriendo convergencia funcional donde microbiota y parásito participan en redes metabólicas similares. Esto implica que la microbiota opera de forma funcionalmente integrada al hospedador, lo que apoya el concepto de holobionte funcional.

Los resultados trascienden la observación descriptiva e incorporan el marco ecológico y evolutivo más amplio. La microbiota debe entenderse como un actor ecológico adicional dentro del sistema pez-parásito-ambiente, con potencial para modificar las interacciones tróficas, la transmisión de patógenos y la dinámica poblacional (Sharpton et al., 2020; Toala-Franco et al., 2025). Que las hembras alberguen comunidades más diversas y metabólicamente activas las posiciona como reservorios activos de bacterias potencialmente patógenas. La asociación diferencial con géneros patógenos sugiere una heterogeneidad funcional dentro de la población parasitaria no previamente considerada. Ecológicamente, la población de piojos está estructurada funcionalmente por composición sexual, pudiendo traducirse en una dispersión funcional, donde las hembras concentran impacto ecológico desproporcionado. La movilidad diferencial entre sexos adquiere relevancia ecológica: machos como vectores entre peces (aunque con menor riqueza bacteriana), hembras como fuentes de transmisión directa sostenida. Este modelo dual representa una reinterpretación del rol epidemiológico del piojo, tradicionalmente considerado homogéneo (Morales-Rivera et al., 2022), emergiendo como metapoblación funcionalmente heterogénea.

A escala poblacional, la ontogenia funcional aporta una dimensión temporal. Durante los estadios tempranos, el microbioma exhibe un perfil ambiental. En copepodito, la marcada caída en la actividad sugiere un cuello de botella ecológico en el que la microbiota ambiental es desplazada durante la fijación al hospedador (Chen et al., 2024). Los copepoditos actuarían como filtros ecológicos, determinando qué bacterias integran la microbiota funcional. Durante la etapa de Chalimus, la intensificación de la actividad metabólica bacteriana sugiere un mutualismo metabólico en el que las bacterias aportan funciones relevantes para el aprovechamiento de los nutrientes del hospedador, lo que puede acelerar el daño tisular mediante enzimas degradativas o metabolitos secundarios (D'Souza et al., 2018; Sommer & Newell, 2018). En adultos, la especialización por sexo consolida esta heterogeneidad funcional, transformando el sistema ecológico pez-piojo en una red funcional modulada por microbiomas sexuados.

Tradicionalmente, la investigación sobre la microbiota en copépodos se centró en especies planctónicas, donde las comunidades bacterianas participan en la degradación de materia orgánica y en el ciclo de nutrientes, respondiendo principalmente a gradientes ambientales (Moisander et al., 2015; Shoemaker & Moisander, 2015). En contraste, copépodos parasitarios como *C. rogercresseyi* y *L. salmonis* representan un cambio radical: la microbiota deja de ser reflejo pasivo del ambiente y pasa a estar moldeada por procesos fisiológicos internos del hospedador. El parásito crea su propio nicho microbiano, seleccionando activamente determinadas bacterias.

Este estudio introduce un nivel de resolución no explorado previamente, mostrando que el sexo es una variable crítica en la diferenciación microbiana. *C. rogercresseyi* emerge como un modelo para el estudio de holobiontes marinos, en los que la microbiota actúa como extensión funcional del hospedador. Proponemos un nuevo marco conceptual: *Caligus rogercresseyi* debe entenderse como un holobionte funcional, en el que la aptitud biológica emerge de la interacción integrada entre el hospedador animal y la microbiota asociada.

En este modelo, el genoma del copépodo interactúa con un complemento funcional microbiano altamente dinámico. La expresión génica bacteriana demuestra que la microbiota es un componente metabólicamente activo que modula procesos fisiológicos clave durante una fase ambiental (nauplios), una fase de transición parasitaria (copepodos) y una fase madura (chalimus-adulto). Donde ocurre una profunda reorganización del microbioma, lo que evidencia un ensamblaje microbiano dirigido por el hospedador.

El análisis GO mostró una fracción importante de funciones compartidas, lo que implica redundancia metabólica, co-regulación y un posible intercambio funcional indirecto. Esto sugiere que el microbioma desempeña un papel compensatorio en la fisiología del hospedador (Cani et al., 2019; Zheng et al., 2020). Funcionalmente, este modelo sugiere un sistema metabólico distribuido. Ciertas rutas metabólicas bacterianas están activas simultáneamente con procesos fisiológicos del piojo, especialmente el metabolismo energético, la biosíntesis de cofactores, la reparación celular, la traducción proteica y la regulación oxidativa, lo que indica que el rendimiento bioenergético del parásito está amplificado por su microbiota. Adaptativamente, este sistema permite a *C. rogercresseyi* ampliar su repertorio metabólico sin expandir su genoma (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018). En un ambiente constantemente fluctuante como el mar, esta flexibilidad metabólica puede representar una ventaja selectiva decisiva. La microbiota se convierte en una extensión adaptativa del genoma del hospedador. La diferenciación sexual añade complejidad. Machos y hembras ensamblan microbiomas distintos: uno enfocado en procesos anabólicos y el otro en procesos catabólicos, lo que sugiere dos holobiontes funcionalmente diferentes dentro de una misma especie. Desde esta perspectiva, la caligidosis debe reinterpretarse como enfermedad mediada no solo por un ectoparásito, sino también por un consorcio microbiano asociado cuya composición varía según el sexo y el estadio.

Este estudio constituye un avance sustancial al trascender el paradigma clásico de análisis taxonómico para incorporar una interpretación funcional basada

en múltiples niveles de organización. Las evidencias demuestran consistentemente que la microbiota:

1. Presenta estructura influenciada por sexo y ontogenia
2. Está metabólicamente activa
3. Exhibe especialización funcional sexuada
4. Se reorganiza dinámicamente durante el desarrollo
5. Mantiene convergencia funcional con el hospedador

Esto consolida su rol como componente biológico activo, poniendo en duda interpretaciones que lo conciben como mera consecuencia pasiva de la colonización ambiental. Ecológicamente, redefine a *C. rogercresseyi* como un organismo funcionalmente heterogéneo dentro de su población. La diferencia entre sexos no es únicamente reproductiva, sino también metabólica y microbiológica, con consecuencias profundas para la epidemiología de la caligidosis. Aplicadamente, la microbiota emerge como un blanco terapéutico potencial. La diferenciación funcional por sexo permitiría diseñar estrategias sanitarias selectivas, focalizadas en individuos con mayor carga epidemiológica. Teóricamente, posiciona a *C. rogercresseyi* como un modelo emergente de holobionte marino. Metodológicamente, demuestra el valor de integrar aproximaciones basadas en la transcriptómica para identificar la actividad metabólica real, estableciendo un nuevo estándar para el estudio de microbiomas parasitarios.

Finalmente, esta investigación contribuye al entendimiento sistémico de la caligidosis, transformando la concepción del piojo de mar de un ectoparásito aislado a un sistema ecológico complejo, funcionalmente integrado y adaptativamente flexible. El piojo de mar ya no es solo un copépodo sino un holobionte.

8. CONCLUSIONES

Esta investigación representa la primera caracterización integral de la microbiota de *Caligus rogercresseyi*, integrando dimensiones taxonómicas, funcionales y de expresión génica. Los resultados demuestran que el microbioma del piojo de mar es una entidad metabólicamente activa e integral a su biología, no un componente pasivo. El sexo emerge como un determinante central, donde las hembras presentan comunidades más diversas y catabólicas, mientras que los machos exhiben microbiotas más simples, con perfiles anabólicos. Esta diferenciación funcional fue validada a nivel transcripcional, lo que confirma que machos y hembras constituyen holobiontes funcionalmente distintos.

El desarrollo ontogénico revela una reconfiguración microbiana dinámica, que transcurre desde una microbiota ambiental en nauplios hasta una comunidad simbiótica altamente integrada en estadios adultos, con un punto de ruptura funcional en el copepodito, coincidente con la transición al parasitismo. La integración funcional mediante KEGG y GO evidenció una especialización metabólica específica y una convergencia funcional entre la microbiota y el hospedador, lo que sustenta el modelo de *C. rogercresseyi* como holobionte metabólicamente integrado.

Epidemiológicamente, se establece un modelo dual: hembras como reservorios de patógenos (*Aliivibrio*, *Vibrio*, *Tenacibaculum*) y machos y copepoditos como vectores móviles, lo que redefine el impacto sanitario según la composición sexual poblacional. En conjunto, esta investigación transforma la comprensión de la caligidosis, demostrando que su control requiere abordar no solo al parásito, sino también el sistema biológico completo que lo sustenta.

9. REFERENCIAS

- Aaen, S. M., Helgesen, K. O., Bakke, M. J., Kaur, K., & Horsberg, T. E. (2015). Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends Parasitol*, 31(2), 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>
- Aleksander, S., Balhoff, J., Carbon, S., Cherry, J., Drabkin, H., Ebert, D., Feuermann, M., Gaudet, P., Harris, N., Hill, D., Lee, R., Mi, H., Moxon, S., Mungall, C., Muruganugan, A., Mushayahama, T., Sternberg, P., Thomas, P., Van Auken, K.,...Westerfield, M. (2023). The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*, 224. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>
- Arriagada, G., Figueroa, J., Marín, S. L., Arriagada, A. M., Lara, M., & Gallardo-Escárate, C. (2020). First report of the reduction in treatment efficacy of the organophosphate azamethiphos against the sea lice *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000). *Aquaculture Research*, 51(1), 436-439.
- Banerjee, S., Schlaeppli, K., & van der Heijden, M. G. A. (2018). Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 567-576. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0024-1>
- Baquero, F., Del Campo, R., & Martínez, J. (2022). Interventions in Nicotinamide Adenine Dinucleotide Metabolism, the Intestinal Microbiota and Microcin Peptide Antimicrobials. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.861603>
- Baxter, R., Contet, A., & Krueger, K. (2017). Arthropod Innate Immune Systems and Vector-Borne Diseases. *Biochemistry*, 56 7, 907-918. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00870>
- Beaufay, F., Coppine, J., Mayard, A., Laloux, G., De Bolle, X., & Hallez, R. (2015). A NAD-dependent glutamate dehydrogenase coordinates metabolism with cell division in *Caulobacter crescentus*. *The EMBO Journal*, 34, 1786-1800. <https://doi.org/10.15252/emj.201490730>
- Beckerman, A. P., Childs, D. Z., Petchey, O. L., Beckerman, A., Childs, D., & Petchey, O. (2017). 57Data Management, Manipulation, and Exploration with dplyr. In *Getting Started with R: An Introduction for Biologists* (pp. 0). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198787839.003.0003>
- Bonenfant, Q., Noé, L., & Touzet, H. (2023). Porechop_ABI: discovering unknown adapters in Oxford Nanopore Technology sequencing reads for downstream trimming. *Bioinform Adv*, 3(1), vbac085. <https://doi.org/10.1093/bioadv/vbac085>
- Boxshall, G., & Bravo, S. (2000). On the identity of the common *Caligus* (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen systems in southern Chile. *Contributions to Zoology*, 69, 137-146. <https://doi.org/10.1163/18759866-0690102015>
- Boyd, C. E., McNevin, A. A., & Davis, R. P. (2022). The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply. *Food Security*, 14(3), 805-827. <https://doi.org/10.1007/s12571-021-01246-9>
- Bravo, S. (2010). The reproductive output of sea lice *Caligus rogercresseyi* under controlled conditions. *Experimental parasitology*, 125(1), 51-54.
- Cani, P., Van Hul, M., Lefort, C., Depommier, C., Rastelli, M., & Everard, A. (2019). Microbial regulation of organismal energy homeostasis. *Nature Metabolism*, 1, 34-46. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0017-4>
- Caspi, R., Billington, R., Ferrer, L., Foerster, H., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D. S., & Karp, P. D. (2015). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D471-D480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1164>
- Chen, J., Kwong, Z., Gerardo, N., & Vega, N. (2024). Ecological drift during colonization drives within-host and between-host heterogeneity in an animal-associated symbiont. *PLOS Biology*, 22. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002304>
- Correa, K., Banger, R., Figueroa, R., Lhorente, J. P., & Yáñez, J. M. (2017). The use of genomic information increases the accuracy of breeding value predictions for sea louse (*Caligus rogercresseyi*) resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics Selection Evolution*, 49(1), 1-5.

- Costello, M. J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology*, 22(10), 475-483. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.006>
- Curry, K. D., Wang, Q., Nute, M. G., Tyshaieva, A., Reeves, E., Soriano, S., Wu, Q., Graeber, E., Finzer, P., Mendling, W., Savidge, T., Villapol, S., Dilthey, A., & Treangen, T. J. (2022). Emu: species-level microbial community profiling of full-length 16S rRNA Oxford Nanopore sequencing data. *Nature Methods*, 19(7), 845-853. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01520-4>
- D'Souza, G., Shitut, S., Preussger, D., Yousif, G., Waschina, S., & Kost, C. (2018). Ecology and evolution of metabolic cross-feeding interactions in bacteria. *Natural product reports*, 35 5, 455-488. <https://doi.org/10.1039/c8np00009c>
- De Vos, W., Tilg, H., Van Hul, M., & Cani, P. (2022). Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*, 71, 1020-1032. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326789>
- Degli Esposti, M., & Martinez Romero, E. (2017). The functional microbiome of arthropods. *PLoS One*, 12(5), e0176573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176573>
- Dittmer, J., & Bouchon, D. (2018). Feminizing Wolbachia influence microbiota composition in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25450-4>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), 685-688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Elderman, M., Hugenholtz, F., Belzer, C., Boekschoten, M., Van Beek, A., De Haan, B., Savelkoul, H., De Vos, P., & Faas, M. (2018). Sex and strain dependent differences in mucosal immunology and microbiota composition in mice. *Biology of Sex Differences*, 9. <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0186-6>
- Elgart, M., Stern, S., Salton, O., Gnainsky, Y., Heifetz, Y., & Soen, Y. (2016). Impact of gut microbiota on the fly's germ line. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11280>
- FAO. (2021). *FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2019/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2019/FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura 2019. Rome/Roma*
- Foster, Z. S., Sharpton, T. J., & Grünwald, N. J. (2017). Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLoS Comput Biol*, 13(2), e1005404. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005404>
- Fuks, G., Elgart, M., Amir, A., Zeisel, A., Turnbaugh, P., Soen, Y., & Shental, N. (2017). Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*, 6. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0396-x>
- Gallardo-Escarate, C., Arriagada, G., Carrera, C., Goncalves, A. T., Nunez-Acuna, G., Valenzuela-Miranda, D., & Valenzuela-Munoz, V. (2019). The race between host and sea lice in the Chilean salmon farming: a genomic approach. *Reviews in Aquaculture*, 11(2), 325-339. <https://doi.org/10.1111/raq.12334>
- Gallardo-Escarate, C., Valenzuela-Munoz, V., Nunez-Acuna, G., Valenzuela-Miranda, D., Goncalves, A. T., Escobar-Sepulveda, H., Liachko, I., Nelson, B., Roberts, S., & Warren, W. (2021). Chromosome-scale genome assembly of the sea louse *Caligus rogercresseyi* by SMRT sequencing and Hi-C analysis. *Sci Data*, 8(1), 60. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-00842-w>
- Gallardo, C. M. (2018). Análisis Técnico Económico de Problemática CALIGUS Post Tratamiento de Azametifos en Centro de Cultivo de Salmónidos "JORGE", Región de Aysén.
- The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. (2019). *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D330-d338. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1055>
- Gnainsky, Y., Zfanya, N., Elgart, M., Omri, E., Brandis, A., Mehlman, T., Itkin, M., Malitsky, S., Adamski, J., & Soen, Y. (2021). Systemic Regulation of Host Energy and Oogenesis by Microbiome-Derived Mitochondrial Coenzymes. *Cell reports*, 34 1, 108583. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108583>
- Gonçalves, A., Collipal-Matamal, R., Valenzuela-Muñoz, V., Núñez-Acuña, G., Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escárate, C. (2020). Nanopore sequencing of microbial communities reveals the potential role of sea lice as a reservoir for fish pathogens. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59747-0>

- González, L., & Carvajal, J. (2003). Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220(1-4), 101-117.
- Guerra, I. M. S., Ferreira, H. B., Melo, T., Rocha, H., Moreira, S., Diogo, L., Domingues, M. R., & Moreira, A. S. P. (2022). Mitochondrial Fatty Acid beta-Oxidation Disorders: From Disease to Lipidomic Studies-A Critical Review. *Int J Mol Sci*, 23(22). <https://doi.org/10.3390/ijms232213933>
- Guo, C., Peng, X., Zheng, X. L., Wang, X., Wang, R., Huang, Z.-Y., & Yang, Z. (2020). Comparison of bacterial diversity and abundance between sexes of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) from China. *PeerJ*, 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.8411>
- Helgesen, K., Bravo, S., Sevattal, S., Mendoza, J., & Horsberg, T. (2014). Deltamethrin resistance in the sea louse *Caligus rogercresseyi* (Boxhall and Bravo) in Chile: bioassay results and usage data for antiparasitic agents with references to Norwegian conditions. *Journal of fish diseases*, 37 10, 877-890. <https://doi.org/10.1111/jfd.12223>
- Hemmingsen, W., MacKenzie, K., Sagerup, K., Remen, M., Bloch-Hansen, K., & Imsland, A. (2020). *Caligus elongatus* and other sea lice of the genus *Caligus* as parasites of farmed salmonids: A review. *Aquaculture*, 522, 735160. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735160>
- Hornett, E., Kageyama, D., & Hurst, G. (2022). Sex determination systems as the interface between male-killing bacteria and their hosts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289. <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.2781>
- Houten, S. M., & Wanders, R. J. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis*, 33(5), 469-477. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9061-2>
- Hu, D., Chao, Y., Li, Y., Peng, X., Wang, C., Wang, Z., Zhang, D., & Li, K. (2021). Effect of Gender Bias on Equine Fecal Microbiota. *Journal of Equine Veterinary Science*, 97, 103355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103355>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2019). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D309-d314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Itoh, H., Tago, K., Hayatsu, M., & Kikuchi, Y. (2018). Detoxifying symbiosis: microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects. *Natural product reports*, 35 5, 434-454. <https://doi.org/10.1039/c7np00051k>
- Jaffar, S., Ahmad, S., & Lu, Y. (2022). Contribution of insect gut microbiota and their associated enzymes in insect physiology and biodegradation of pesticides. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.979383>
- Jiang, S., Guo, X., Qian, X., Ning, X., Zhang, C., Yin, S., & Zhang, K. (2024). Sex-bias of core intestinal microbiota in different stocks of Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 52, 101281. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2024.101281>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Khan, I. M., Nassar, N., Chang, H., Khan, S., Cheng, M., Wang, Z., & Xiang, X. (2024). The microbiota: a key regulator of health, productivity, and reproductive success in mammals. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1480811>
- Kim, Y., Unno, T., Kim, B., & Park, M.-S. (2019). Sex Differences in Gut Microbiota. *The World Journal of Men's Health*, 38, 48-60. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190009>
- Koh, H.-J., Lee, S.-M., Son, B.-G., Lee, S.-H., Ryoo, Z., Chang, K., Park, J.-W., Park, D.-C., Song, B., Veech, R., Song, H., & Huh, T. (2004). Cytosolic NADP⁺-dependent Isocitrate Dehydrogenase Plays a Key Role in Lipid Metabolism*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 39968-39974. <https://doi.org/10.1074/jbc.m402260200>
- Leung, J., Graham, A., & Knowles, S. (2018). Parasite-Microbiota Interactions With the Vertebrate Gut: Synthesis Through an Ecological Lens. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00843>
- Li, J., Wang, W., Li, B., Xue, Y., Wang, X., Liu, S., Hu, S., Tang, J., Yan, B., Li, T., & Xue, J. (2024). NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target for altering carbon flux to lipid

- accumulation and enhancing antioxidant capacity in *Tetrademus obliquus*. *Bioresource technology*, 130365. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130365>
- Li, N., Yuan, Q., Qi, Y., Wu, P., Cui, S., & Zheng, G. (2024). The Potential Implications of Sex-Specific Differences in the Intestinal Bacteria of the Overwintering Wolf Spider *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae). *Insects*, 15. <https://doi.org/10.3390/insects15070490>
- Mao, Q., Wu, W., Huang, L., Yi, G.-H., Jia, D., Chen, Q., Chen, H., & Wei, T. (2020). Insect Bacterial Symbiont-Mediated Vitellogenin Uptake into Oocytes To Support Egg Development. *mBio*, 11. <https://doi.org/10.1128/mBio.01142-20>
- Marinkovic, G. A. P. (2012). *Diseño, construcción y evaluación de un sistema de incubación de sacos ovígeros y cultivo larval de Caligus rogercresseyi y Lepeophtheirus mugiloidis* PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO].
- Mateos-Hernández, L., Obregón, D., Wu-Chuang, A., Mayé, J., Bornères, J., Versillé, N., De La Fuente, J., Díaz-Sánchez, S., Bermúdez-Humarán, L., Torres-Maravilla, E., Estrada-Peña, A., Hodžić, A., Šimo, L., & Cabezas-Cruz, A. (2021). Anti-Microbiota Vaccines Modulate the Tick Microbiome in a Taxon-Specific Manner. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.704621>
- Michaud, D., Poley, J., & Fast, M. (2019). Sex-biased gene expression and evolution of candidate reproductive transcripts in adult stages of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *FACETS*. <https://doi.org/10.1139/FACETS-2018-0016>
- Moisander, P., Sexton, A., & Daley, M. (2015). Stable Associations Masked by Temporal Variability in the Marine Copepod Microbiome. *PLoS One*, 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138967>
- Morales-Rivera, M., Valenzuela-Miranda, D., Valenzuela-Muñoz, V., Núñez-Acuña, G., Avendaño-Herrera, R., & Gallardo-Escárate, C. (2022). Nanopore sequencing evidenced the presence of fish bacterial pathogens in the sea louse (*Caligus rogercresseyi*) microbiota collected from distant salmon farms in Chile. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738026>
- Org, E., Mehrabian, M., Parks, B. W., Shipkova, P., Liu, X., Drake, T. A., & Lusi, A. J. (2016). Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. *Gut Microbes*, 7(4), 313-322. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1203502>
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21), 3123-3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Pereira, I., Ramos, A. R., Grein, F., Marques, M., Da Silva, S., & Venceslau, S. (2011). A Comparative Genomic Analysis of Energy Metabolism in Sulfate Reducing Bacteria and Archaea. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00069>
- Picard, M., Boissier, J., Roquis, D., Grunau, C., Allienne, J., Duval, D., Toulza, E., Arancibia, N., Caffrey, C., Long, T., Nidelet, S., Rohmer, M., & Cosseau, C. (2016). Sex-Biased Transcriptome of *Schistosoma mansoni*: Host-Parasite Interaction, Genetic Determinants and Epigenetic Regulators Are Associated with Sexual Differentiation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004930>
- Pickering, A. D., & Pottinger, T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7(1), 253-258. <https://doi.org/10.1007/BF00004714>
- Poley, J., Sutherland, B., Jones, S., Koop, B., & Fast, M. (2016). Sex-biased gene expression and sequence conservation in Atlantic and Pacific salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *BMC Genomics*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2835-7>
- Qi, X., Yun, C., Pang, Y., & Qiao, J. (2021). The impact of the gut microbiota on the reproductive and metabolic endocrine system. *Gut Microbes*, 13. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1894070>
- Quiñones, R. A., Fuentes, M., Montes, R. M., Soto, D., & León-Muñoz, J. (2019). Environmental issues in Chilean salmon farming: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(2), 375-402. <https://doi.org/10.1111/raq.12337>
- Riquelme, R. (2017). *Deep water, an effect on the temperature for the management of caligidosis in the Atlantic salmon (Salmon salar)*. <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/12938>

- Rodriguez, A., & Getino, A. M. (2024). BioFunctional: A Comprehensive App for Interpreting and Visualizing Functional Analysis of KEGG Pathways and Gene Ontologies. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.10.08.616405>
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, 6. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0457-9>
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2017). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*, 57, 1-24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>
- SERNAPESCA. (2021). ANUARIO ESTADÍSTICO DE PESCA Y ACUICULTURA 2021.
- Sharpton, T. J., Combrink, L., Arnold, H. K., Gaulke, C. A., & Kent, M. (2020). Harnessing the gut microbiome in the fight against anthelmintic drug resistance. *Curr Opin Microbiol*, 53, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.01.017>
- Shoemaker, K., & Moisaner, P. (2015). Microbial diversity associated with copepods in the North Atlantic subtropical gyre. *FEMS microbiology ecology*, 91, 7. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv064>
- Siddiqui, J. A., Khan, M. M., Bamisile, B. S., Hafeez, M., Qasim, M., Rasheed, M. T., Rasheed, M. A., Ahmad, S., Shahid, M. I., & Xu, Y. (2022). Role of Insect Gut Microbiota in Pesticide Degradation: A Review. *Front Microbiol*, 13, 870462. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.870462>
- Simon, J., Marchesi, J., Mougel, C., & Selosse, M. (2019). Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome*, 7. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4>
- Sommer, A., & Newell, P. (2018). Metabolic Basis for Mutualism between Gut Bacteria and Its Impact on the *Drosophila melanogaster* Host. *Applied and Environmental Microbiology*, 85. <https://doi.org/10.1128/aem.01882-18>
- Speer, K., Dheilly, N., & Perkins, S. (2020). Microbiomes are integral to conservation of parasitic arthropods. *Biological Conservation*, 250, 108695. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108695>
- Tang, J.-G., Wu, X., Mou, M., Wang, C., Wang, L., Li, F., Guo, M., Yin, J., Xie, W., Wang, X., Wang, Y., Ding, Y., Xue, W., & Zhu, F. (2020). GIMICA: host genetic and immune factors shaping human microbiota. *Nucleic Acids Research*, 49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa851>
- Toala-Franco, D., Torres-Cifuentes, D., Flores-Méndez, L., & Caña-Bozada, V. (2025). Integrative RNA-Seq analysis of host-parasite interactions and microbiota shifts in the gills of two fish species infected with monogeneans. *Veterinary parasitology*, 337, 110472. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2025.110472>
- Torrissen, O., Jones, S., Asche, F., Guttormsen, A., Skilbrei, O., Nilsen, F., Horsberg, T., & Jackson, D. (2013). Salmon lice – impact on wild salmonids and salmon aquaculture. *Journal of fish diseases*, 36, 171-194. <https://doi.org/10.1111/jfd.12061>
- Turon, M., Ford, M., Maldonado, M., Sitjà, C., Riesgo, A., & Díez-Vives, C. (2024). Microbiome changes through the ontogeny of the marine sponge *Crambe crambe*. *Environmental Microbiome*, 19. <https://doi.org/10.1186/s40793-024-00556-7>
- Valdebenito, J., Jones, W., & Székely, T. (2024). Evolutionary drivers of sex-specific parasite prevalence in wild birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 291. <https://doi.org/10.1098/rspb.2024.1013>
- Valenzuela-Miranda, D., Goncalves, A. T., Valenzuela-Munoz, V., Nunez-Acuna, G., Liachko, I., Nelson, B., & Gallardo-Escarate, C. (2022). Proximity ligation strategy for the genomic reconstruction of microbial communities associated with the ectoparasite *Caligus rogercresseyi*. *Sci Rep*, 12(1), 783. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04485-0>
- Valenzuela-Miranda, D., Valenzuela-Muñoz, V., Benavente, B. P., Muñoz-Troncoso, M., Nuñez-Acuña, G., & Gallardo-Escárate, C. (2024). The Atlantic salmon microbiome infected with the sea louse *Caligus rogercresseyi* reveals tissue-specific functional dysbiosis. *Aquaculture*, 580, 740328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740328>
- Valeri, F., & Endres, K. (2021). How biological sex of the host shapes its gut microbiota. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100912>
- Van Niftrik, L., Van Helden, M., Kirchen, S., Van Donselaar, E., Harhangi, H., Webb, R., Fuerst, J., Camp, H. O. D., Jetten, M., & Strous, M. (2010). Intracellular localization of membrane-bound ATPases in the compartmentalized anammox bacterium 'Candidatus Kuenenia

- stuttgartiensis'. *Molecular Microbiology*, 77, 701-715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07242.x>
- Vigneron, A., & Weiss, B. (2017). Role of the Microbiota During Development of the Arthropod Vector Immune System. 161-172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805350-8.00009-X>
- Wan, X., Jiang, Y., Cao, Y., Sun, B., & Xiang, X. (2020). Divergence in Gut Bacterial Community Structure between Male and Female Stag Beetles *Odontolabis fallaciosa* (Coleoptera, Lucanidae). *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 10. <https://doi.org/10.3390/ani10122352>
- Wang, J., Gao, L., & Aksoy, S. (2023). Microbiota in disease-transmitting vectors. *Nature Reviews Microbiology*, 21, 604-618. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00901-6>
- Wang, Z.-L., Wang, T.-Z., Zhu, H.-F., Pan, H.-B., & Yu, X. (2019). Diversity and dynamics of microbial communities in brown planthopper at different developmental stages revealed by high-throughput amplicon sequencing. *Insect Science*, 27. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12729>
- Wickham, H. (2011). ggplot2. *WIREs Computational Statistics*, 3(2), 180-185. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wics.147>
- Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P., Zhou, X., Li, C., Shen, G., & Zou, B. (2020). NAD+ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7>
- Yang, C., Mai, J., Cao, X., Burberry, A., Cominelli, F., & Zhang, L. (2023). ggpicrust2: an R package for PICRUSt2 predicted functional profile analysis and visualization. *Bioinformatics*, 39(8). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad470>
- Zalcman, E., Burroughs, A., Meyer, A., Hillman, A., Sadler, R., Madin, B., Mackenzie, C., Ward, M., Stevenson, M., Happold, J., Hutchison, J., Lagno, A. G., 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, 735752. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735752>
- Zhang, R., Yu, G., Huang, Z., & Zhang, Z. (2020). Microbiota assessment across different developmental stages of *Dermacentor silvarum* (Acari: Ixodidae) revealed stage-specific signatures. *Ticks Tick Borne Dis*, 11(2), 101321. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101321>
- Zhang, Y., Thompson, K., Branck, T., Yan, Y., Nguyen, L., Franzosa, E., & Huttenhower, C. (2021). Metatranscriptomics for the Human Microbiome and Microbial Community Functional Profiling. *Annual review of biomedical data science*, 4, 279-311. <https://doi.org/10.1146/annurev-biodatasci-031121-103035>
- Zhang, Z., Miliadis-Argeitis, A., & Heinemann, M. (2018). Dynamic single-cell NAD(P)H measurement reveals oscillatory metabolism throughout the *E. coli* cell division cycle. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20550-7>
- Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*, 30, 492-506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>
- Zuk, M., & McKean, K. (1996). Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *International journal for parasitology*, 26 10, 1009-1023. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)80001-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)80001-4)