



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS

**EVALUACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE *CALIGUS*
ROGERCRESSEYI OBTENIDO DE PECES INMUNIZADOS VÍA ORAL CON
VACUNA ANTIMICROBIOTA**

MATEO JESÚS COSTA INOSTROZA

SEMINARIO DE TÍTULO PRESENTADO AL DEPARTAMENTO DE
OCEANOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO MARINO

CONCEPCIÓN – CHILE

2025

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA

Este seminario de título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor guía:

Dr. Cristian Gallardo Escárte

Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Ha sido aprobada por la siguiente Comisión Evaluadora:

Dra. Valentina Valenzuela Muñoz

Centro de Biotecnología, INCAR
Universidad de Concepción

Dr. Antonio Casuso Cabrera

Centro de Biotecnología, INCAR
Universidad de Concepción

Dr. Fernando Cruzat Cruzat

Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Jefe de carrera:

Dr. Ariel Valenzuela Saldias

Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

A mis madres Katia y Marina

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi profesor guía Dr. Cristian Gallardo por la oportunidad de realizar mi seminario bajo su tutela, A Dra. Valentina Valenzuela por su enorme apoyo y guía para la realización del trabajo. Agradecer a todo el equipo del LGBA por su apoyo y buena onda durante todo el tiempo que pasé en el laboratorio, me hicieron sentir como en casa.

Gracias a mi familia por su apoyo incondicional durante el transcurso de la carrera, sobre todo a mis padres Katia y Henry por darme la oportunidad de tener un título.

Gracias a mis amigos Tonino, Catu, Felipe y Benja por las risas y los buenos momentos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS.....	7
INDICE DE TABLAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 <i>Caligus rogercresseyi</i>	11
1.2 Caligidosis.....	14
1.3 Reproducción.....	15
1.4 Mecanismos de evasión de la respuesta del salmón.....	16
1.4.1 Secretoma.....	16
1.4.2 Respuesta inmune.....	17
1.4.3 Estrés oxidativo.....	18
1.5 Tratamientos contra la caligidosis.....	19
1.5.1 Vacunas antimicrobiota.....	21
1.6 Justificación del trabajo.....	22
2. HIPÓTESIS.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1 Objetivo I: Evaluar in silico los patrones de expresión de genes asociados a reproducción, secretoma, respuesta inmune y estrés oxidativo en distintos estadios de desarrollo de <i>Caligus rogercresseyi</i>	26
4.2 Objetivo II: Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a reproducción en <i>Caligus rogercresseyi</i> extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.....	26
4.2.1 Formulación de la vacuna.....	26

4.2.2	Diseño experimental.....	27
4.2.3	Extracción de ARN y Síntesis de cDNA.....	28
4.2.4	Selección de partidores.....	29
4.2.5	Evaluación de expresión génica por RT-qPCR.....	30
4.3	Objetivo III: Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a secretoma en <i>Caligus rogercresseyi</i> extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.....	30
4.3.1	Extracción de ARN y síntesis de CDNA.....	30
4.3.2	Selección de partidores.....	30
4.3.3	Evaluación de expresión génica por RT-qPCR.....	31
4.4	Objetivo IV: Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a respuesta inmune y estrés oxidativo en <i>Caligus rogercresseyi</i> extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.....	31
4.4.1	Extracción de ARN y síntesis de CDNA.....	31
4.4.2	Selección de partidores.....	32
4.4.3	Evaluación de expresión génica por RT-qPCR.....	32
5.	RESULTADOS.....	33
6.	DISCUSIÓN.....	48
7.	CONCLUSIONES.....	56
8.	BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>C. rogercresseyi</i>.....	12
Figura 2: esquema del diseño experimental a partir de la inmunización de salmones con vacuna antimicrobiota.....	27
Figura 3: Gel de MOPS al 1,2% de la extracción de ARN total de <i>C. rogercresseyi</i>.....	28
Figura 4: Heatmap de niveles de expresión de genes de estudio en hembras adultas, machos adultos y estadio copepodito de <i>C. rogercresseyi</i>.....	33
Figura 5: Niveles de expresión relativa de mRNA para Vitelogenina 1, Vitelogenina 2, Retinoid X receptor y Ecdisone receptor en grupos de <i>C. rogercresseyi</i> control e inmunizados con vacuna antimicrobiota.....	33
Figura 6: Niveles de expresión relativa de mRNA para Gliceroporin^a, VASA, Sex-lethal y Doublesex en grupos de <i>C. rogercresseyi</i> control e inmunizados con vacuna antimicrobiota.....	38
Figura 7: Análisis de componentes principales (PCA) para la expresión relativa de genes relacionados a reproducción en <i>C. rogercresseyi</i>.....	39
Figura 8: Niveles de expresión relativa de mRNA para Serpina 3, Tripsina 2 y Catepsina B en grupos de <i>C. rogercresseyi</i> control e inmunizados con vacuna antimicrobiota.....	41
Figura 9: Análisis de componentes principales (PCA) para la expresión relativa de genes relacionados a secretoma en <i>C. rogercresseyi</i>.....	42
Figura 10: Niveles de expresión relativa de mRNA para el gen inhibidor de la apoptosis e IκB kinasa β en grupos de <i>C. rogercresseyi</i> control e inmunizados con vacuna antimicrobiota.....	44
Figura 11: Niveles de expresión relativa de mRNA para fosfolípido-hidroperóxido glutatión peroxidasa, Catalasa, Superóxido dismutasa y Ferritina en grupos de <i>C. rogercresseyi</i> control e inmunizados con vacuna antimicrobiota.....	46
Figura 12: Análisis de componentes principales (PCA) para la expresión relativa de genes relacionados a respuesta inmune y estrés oxidativo en <i>C. rogercresseyi</i>.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resultados de espectrofotometría realizada al ARN extraído a partir de ejemplares de <i>C. rogercresseyi</i>.....	28
Tabla 2: Lista de partidores utilizados para análisis RT-qPCR de genes asociados a reproducción en <i>C. rogercresseyi</i>.....	29
Tabla 3: Lista de partidores utilizados para análisis RT-qPCR de genes asociados a secretoma en <i>C. rogercresseyi</i>.....	31
Tabla 4: Lista de partidores utilizados para análisis RT-qPCR de genes asociados a respuesta inmune y estrés oxidativo en <i>C. rogercresseyi</i>.....	32

RESUMEN

Caligus rogercresseyi es el principal ectoparásito que afecta a la salmonicultura chilena gracias a su capacidad de inmunosuprimir a los peces y hacerlos susceptibles a contraer infecciones secundarias. La salud de los organismos en general está dada por la interacción de su sistema inmune y su microbioma. La microbiota de *C. rogercresseyi* desempeña un rol simbiótico en el organismo y, al verse perturbada, puede afectar distintas funciones fisiológicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una vacuna antimicrobiota administrada por vía oral sobre la expresión de distintos genes relacionados con la reproducción, el secretoma, la respuesta inmune y el estrés oxidativo en *C. rogercresseyi*. Para esto, se comparó la expresión de hembras y machos adultos recolectados antes y después de aplicar el tratamiento, analizando sus cambios de expresión a través de RT-qPCR. Los resultados demostraron una diferencia de expresión entre sexos, tanto antes como después de aplicar el tratamiento. En hembras, los genes asociados a la reproducción y la diferenciación sexual presentaron una alta expresión incluso tras aplicarse el tratamiento, lo que sugiere la presencia de mecanismos para resguardar los procesos reproductivos. Los machos presentaron cambios marcados en genes vinculados al secretoma, lo que sugiere adaptaciones a un ambiente adverso regido por la microbiota epitelial del hospedador. La inmunización de los peces tuvo un impacto importante sobre genes relacionados a respuesta inmune y estrés oxidativo en el parásito, viéndose aumentos de expresión principalmente en machos, evidenciando el efecto pro-oxidante de la vacuna. Este trabajo deja en evidencia que la vacuna antimicrobiota tiene efectos significativos sobre la expresión de los genes evaluados, demostrando la eficiencia que tiene esta vacuna oral como herramienta de control poblacional para combatir el parasitismo de *C. rogercresseyi*.

ABSTRACT

Caligus rogercresseyi is the main ectoparasite affecting Chilean salmon farming, due to its capacity to immunosuppress fish and increase their susceptibility to secondary infections. The health of organisms is largely determined by the interaction between their immune system and microbiome. The microbiota of *C. rogercresseyi* plays a symbiotic role within the parasite, and disturbances to this community can affect multiple physiological functions. The aim of this study was to evaluate the effect of an orally administered anti-microbiota vaccine on the expression of genes related to reproduction, secretome activity, immune response, and oxidative stress in *C. rogercresseyi*. For this purpose, the gene expression of adult males and females collected before and after treatment was compared using RT-qPCR. The results demonstrated clear sex-dependent differences in gene expression, both before and after vaccination. In females, genes associated with reproduction and sexual differentiation remained highly expressed even after treatment, suggesting the presence of mechanisms that safeguard essential reproductive processes. Males, on the other hand, exhibited prominent changes in genes linked to the secretome, which likely reflect adaptations to the altered epithelial microbiota of the vaccinated host. Vaccination also had a notable effect on genes related to immune response and oxidative stress in the parasite, with increases in expression primarily observed in males, highlighting the pro-oxidant environment generated by the vaccine. Overall, this study shows that the anti-microbiota vaccine induces significant changes in the expression of the evaluated genes, demonstrating the potential effectiveness of this oral immunization strategy as a population-control tool to combat *C. rogercresseyi* parasitism.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Caligus rogercresseyi*

Caligus rogercresseyi es un crustáceo perteneciente a la clase Maxillopoda, subclase copepoda y familia caligidae, descrito por Boxshall y Bravo en el año 2000. Posee un desarrollo directo, con 8 estadios de desarrollo, siendo 3 de ellos planctónicos (naupilus I - II, copepodito) y 5 parasíticos (chalimus I-IV, adulto) (González y Carvajal, 2003). El estadio encargado de la infestación es el copepodito, el cual utiliza su par de antenas y cono bucal para adherirse al hospedero, una vez adherido al pez, muda a chalimus I, estadio en el cual desarrolla un filamento frontal el cual permite la adhesión para los siguientes estadios hasta la adultez. Copepodito, gracias a su vitelo, puede sobrevivir hasta 10 días en la columna de agua sin adherirse a un hospedador (Farias, 2005).

C. rogercresseyi habita las aguas marinas y salobres del pacífico sur oriental, por ende, se especula que la llegada del parásito a los centros de cultivo de salmones fue a través del robalo (*E. maclovinus*), pejerrey marino (*O. regia*) o pejerrey de mar (*O. nigricans*), ya que el *Caligus* parasita sobre individuos de esta especie de forma natural (Bravo et al., 2006; Carvajal et al., 1998). *Caligus* presenta dimorfismo sexual, siendo una de las más notorias observable en el segmento genital en individuos adultos, donde esta es más prominente en hembras reproductivas que en machos debido a la producción de huevos, mientras que en machos este segmento es más pequeño con una forma redonda, siendo de dimensiones similares durante todo el desarrollo (González & Carvajal, 2003). Otra diferencia notoria está en las antenas, donde en hembras son delgadas y con forma de garra en la parte superior, mientras que en machos estas son más gruesas y redondas en la zona superior (González & Carvajal, 2003).

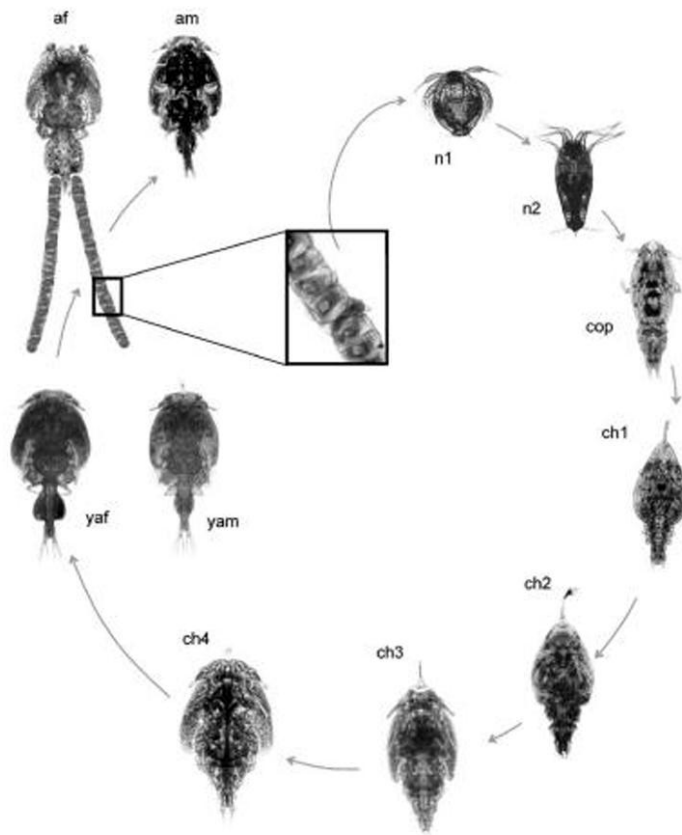


Figura 1: Ciclo de vida de *C. rogercresseyi*. Se distinguen estadios naupilus (n1-n2), copepodito (cop), chalmus (ch1-ch4), juveniles de macho (yam) y de hembra (yaf), adultos de macho (am) y hembra (af). Extraído de González & Carvajal (2003).

En estudios relacionados a los sistemas reproductores de hembras y machos, se describe el de las hembras adultas como un par de ovarios de forma ovalada y de apariencia granular, los cuales se sitúan en la zona media del cefalotórax. Junto con ellos, existen un par de oviductos que comienzan desde el ovario y se extienden por el sistema digestivo hasta el final del segmento genital, lugar donde se sitúa un receptáculo seminal y un par de glándulas cementantes (Levicoy, 2013). El sistema reproductor de los machos adultos es descrito como un par de testículos ubicados en la zona media del cefalotórax, junto con un par de vasos deferentes, los cuales se extienden hasta la zona genital (Levicoy, 2013).

La conducta reproductiva de *C. rogercresseyi* fue descrita como similar a la de *L. salmonis* (Ritchie et al. 1996). La cópula comienza con el macho asentándose sobre la hembra cercano al segmento genital, posteriormente expulsa sus espermatozoides que a su vez producen un fluido cementante el cual impide a la hembra ser inseminada más de una vez (Osorio, 2007). Las hembras se caracterizan por mantenerse fijas en un hospedero y ser copuladas por un solo macho, al contrario de los mismos, los cuales tienen la facultad de moverse entre peces e inseminar a varias hembras (Osorio, 2007). Aun así, se ha determinado que hembras de *L. salmonis* pueden presentar conductas polígamas, pudiéndose aparear más de una vez durante su ciclo de vida, así demostrando una conducta reproductiva similar a los machos (Todd et al. 2005), por ello se cree que esta conducta se puede ver replicada en *C. rogercresseyi* (Bravo, 2010).

La abundancia de esta especie depende de factores abióticos de su hábitat, como la salinidad, la temperatura y el oxígeno, la primera de ellas afecta directamente el desarrollo de las larvas, Bravo et al. (2008) determinaron que el estadio naupilus no es capaz de mudar a copepodito en ambientes donde la salinidad sea igual o inferior al 15%, Aun así, los adultos podrían sobrevivir por determinados periodos a salinidades bajas. Las bajas salinidades también afectan la supervivencia de estadios naupilus y copepodito, la cual se imposibilita a salinidades menores a 20 g/L (Gonzalez & Carvajal, 2003). Por otro lado, la temperatura es un factor crucial para que el organismo pueda desarrollarse, ya que existe un umbral que a temperaturas inferiores el organismo no puede desarrollarse (4,2°C para larvas, 5,4°C a 6,3°C para chalimus IV y adultos asentados), gracias a esto se puede estimar el tiempo que le tomaría a la hembra producir huevos (Vera, 2015). En condiciones de cultivo, una reducción de temperatura de 12°C (18°-6°C) incrementa el tiempo de incubación del parásito en un 50% (Montory et al. 2018). La disminución del mismo rango de temperatura afecta en mayor medida a los estadios naupilus I y II, en los cuales el tiempo de desarrollo se vio incrementado en 50 y 100 horas respectivamente (Montory et al. 2018). La saturación de oxígeno también resulta ser un factor importante, ya que se ha demostrado una mortalidad del 100% en saturaciones de 30-60% de oxígeno en Naupilus II y 97% de mortalidad en copepodito (Montory et al. 2018).

1.2 Caligidosis

Se conoce por caligidosis a una patología que afecta a la salmonicultura a nivel global, con especies como *C. clemensi*, *C. elongatus*, *L. salmonis* afectando a distintos países como Noruega, Escocia, Irlanda y Canadá (Johnson et al. 2004). En Chile, la caligidosis lleva siendo relevante desde los inicios de los cultivos de salmónidos en los años 70, pero fue en 1997 donde se reportó la presencia de *Caligus Flexispina*, la cual fue considerada un potencial problema para los cultivos de salmónidos, posteriormente esta especie fue caracterizada como *Caligus rogercresseyi* (Oelckers et al. 2014).

La caligidosis produce un deterioro de la condición general del pez, en algunos casos incluso la muerte del individuo infectado. *C. rogercresseyi* se adhiere al hospedero y se alimenta en base a su mucus epidérmico, piel y sangre (González et al., 2000). Las zonas comúnmente parasitadas son el vientre y las aletas pectorales (González, 2006). La infestación producida por el “piojo de mar” desencadena niveles altos de estrés en los peces, llegando a ser crónico (Bowers et al. 2000, Skilbrei et al. 2013), junto con ello, baja eficiencia en conversión de alimento, reducción en el crecimiento y pérdida de apetito (Arriagada et al. 2014). La acción de alimentación del parásito genera daños severos en el epitelio del pez, causando el mismo impacto mucosa epitelial y en la musculatura, viéndose afectado el proceso de osmorregulación de hospedero (Davies & Rodger 2000, Rozas & Asencio 2008). Los altos niveles de estrés fisiológico de manera prolongada junto con los datos recién mencionados dan como resultado la inmunosupresión del pez, lo que deriva en una alta susceptibilidad a contraer infecciones secundarias (Bravo et al., 2013). En Chile, se estima la presencia de *C. rogercresseyi* en 99% de los centros de cultivo de salmónidos (Pino-Marambio et al., 2007), debido a esto, los costos de producción se ven aumentados a 1.4 USD por kilo de de salmón producido (Dresdner et al., 2019).

1.3 Reproducción

La reproducción en *C. rogercresseyi* es un proceso fundamental y es la base para la persistencia y la dispersión de la caligidosis en los centros de cultivo, siendo el éxito reproductivo de las hembras ovígeras quien determina el nivel de infestación en los peces. A nivel molecular, la determinación y la diferenciación sexual en artrópodos son procesos altamente conservados los cuales contemplan un eje regulador, donde los genes Sex-lethal (Sxl), Transformer (Tra) y Doublesex (Dsx) participan en procesos coordinados (Gempe & Beye, 2011; Kiuchi et al., 2014). En artrópodos, Sxl actúa como el regulador maestro del sexo femenino, regulando en splicing alternativo Tra, mientras que Dsx es el gen terminal de la cascada de diferenciación sexual, por ende, genera isoformas específicas para cada sexo, permitiendo una diferenciación fenotípica entre machos y hembras (Burtis & Baker, 1989). Estos genes han sido caracterizados en *C. rogercresseyi* y se estima que están relacionados a la regulación de expresión de distintos genes encargados de vitelogenesis y del desarrollo gonadal y de características sexuales secundarias (Farlora et al. 2014).

Genes como la vitelogenina (Vg), ecdysone receptor (EcR) y retinoid X receptor (RxR) influyen directamente en proceso reproductivos y de maduración gonádica. Las vitelogeninas son las principales proteínas precursoras de la yema de los huevos y son fundamentales para el desarrollo de los gametos en hembras (Hannas et al. 2015). La síntesis de estas proteínas suele estar regulada por la vía de la ecdisona, la cual es mediada por los receptores nucleares EcR y RXR, quienes están encargados de la regulación hormonal de la vitelogénesis, remodelación tisular durante la muda y reproducción (Subramoniam, 2011). VASA es considerado un marcador conservado de células germinales, este gen tiene participación en procesos fundamentales en la gametogénesis y diferenciación de gametos en metazoos, lo que lo hace un indicador de actividad reproductiva en copépodos y crustáceos en general (Extavour & Akam, 2003). Las gliceroporinas (Glp) son una subfamilia de las acuaporinas, quienes facilitan el transporte

pasivo de agua, glicerol y otros solutos a través de las membranas celulares, participando en procesos de osmorregulación, metabolismo energético y homeostasis (Finn, 2015). *Glp1_v1* en *C. rogercresseyi* muestra una expresión mayor en individuos machos adultos, lo que sugiere un papel en la diferenciación sexual o en el metabolismo asociado a la reproducción (Farlora et al. 2016). La comprensión de este conjunto de genes otorga una aproximación a procesos fisiológicos y reproductivos de esta especie de parásito, lo que resulta útil para la búsqueda de estrategias de control poblacional novedosas para combatir la caligidosis.

1.4 Mecanismos de evasión de la respuesta del salmón

1.4.1 Secretoma

La interacción hospedador-hospedero entre *C. rogercresseyi* y el salmón es un proceso dinámico que contempla distintos factores, donde ambos organismos utilizan mecanismos moleculares de defensa y adaptación. Durante el proceso de infestación, *Caligus* interviene en la epidermis del pez y libera distintas proteínas excretoras y secretoras (secretoma), entre las cuales se destacan las serinas proteasas (Trypsina 2), las cisteín proteasas (Catepsina B) y las serina proteasas inhibidoras (Serpín 3). Estas moléculas son responsables de la degradación de tejidos en el hospedador, facilitando la alimentación del parásito, y al mismo tiempo actuando como moduladores inmunológicos que interfieren en las cascadas proinflamatorias del salmón (Maldonado-Aguayo et al. 2015; Maldonado-Aguayo & Gallardo-Escárate, 2014). Particularmente, las serpinas inhiben la activación de las proteasas en el pez asociadas a la melanización y a la síntesis de péptidos antimicrobianos, mientras que las catepsinas y tripsinas son responsables de la digestión de proteínas dérmicas y del remodelamiento de la cutícula del parásito, actuando como componentes esenciales del desarrollo y la evasión inmune por parte del parásito (Gallardo-Escárate et al., 2019). Se ha demostrado que *C. rogercresseyi* expresa distintas isoformas de serpinas y catepsinas, como *Cr-serpin 3*, *Cr-serpin 10* y *Cr-CatB1*, las cuales se expresan durante los estadios copepodito y adulto, indicando su papel activo durante el

ciclo de vida del huésped para la evasión del sistema inmunológico de su hospedador (Vera-Bizama et al., 2015; Gallardo-Escárate et al., 2019).

1.4.2 Respuesta inmune

C. rogercresseyi, al igual que gran parte de los seres vivos, posee un sistema inmune innato, el cual es la primera barrera de defensa ante patógenos, este está compuesto por una serie de señales la cual comienza con la identificación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), realizado por receptores presentes en la membrana celular (Li & Xiang, 2013). La activación de estos receptores inicia vías de señalización como la Toll y la de inmunodeficiencia IMD (Beutler & Moresco, 2008). En invertebrados, la iniciación de una vía u otra depende del tipo de patógeno que esté infectando al individuo, siendo la vía Toll activada por hongos y bacterias gram positivas (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárate, 2014). La vía Toll está compuesta por distintos receptores tipo Toll (TLR), estos receptores son capaces de reconocer distintos tipos de PAMPs, cuando estos son reconocidos, efectores intermediarios como MyD88, Tube y Pelle se activan, seguidos de la activación de genes como Dorsal y NF- κ B, los cuales se translocan al núcleo y regulan la síntesis de péptidos antimicrobianos (AMP) (Tauszig et al. 2008; Li & Xiang, 2013; Ganesan et al. 2010). La vía IMD se inicia por el reconocimiento de peptidoglicano presente en la pared celular de las bacterias patógenas gracias a una proteína de reconocimiento de peptidoglicano (PGRP-LE), la cual posteriormente activa moléculas como TAB2/TAK1, JNK, IKK y Relish, induciendo la transcripción de AMP (Tanji & Ip, 2005; Kleino & Silverman, 2013).

Se ha demostrado la expresión diferencial de genes homólogos a los de otros artrópodos en *C. rogercresseyi*, entre ellos I κ B kinasa β (IKKB) y el inhibidor de apoptosis (AIP), quienes participan en la regulación del factor transcripcional NF- κ B, encargado de la inducción de síntesis de AMPs y modular la inflamación local (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárate, 2014). Durante estadios parasitarios como chalmus y adulto, se ha observado sobreexpresión de IKKB, gen asociado a la activación de proteínas de la vía Toll, sugiriendo que esta sobreexpresión refuerza la capacidad del ectoparásito para

mantener su integridad frente al estrés oxidativo generado por el hospedador (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárte, 2014). El gen AIP actúa como un regulador de la apoptosis, lo que favorece la integridad celular del parásito mediante la inhibición de caspasas y la promoción de la traslocación nuclear de NF- κ B, este mecanismo contrarresta las respuestas inflamatorias generadas por el pez (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárte, 2014).

1.4.3 Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas reactivas químicamente producidas durante distintos procesos metabólicos donde se ve involucrado el oxígeno, la reactividad de estas moléculas se debe a su característica de poseer electrones desapareados, permitiéndoles reaccionar con otras moléculas en procesos redox (Valko, 2006). Dentro de las ROS existen dos principales divisiones, radicales libres y especies no radicales. Dentro de los radicales libres, las moléculas de mayor interés son el superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^-). Dentro de las especies no radicales, la principal es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Valko, 2006). La formación de estas moléculas puede deberse a distintos factores, entre ellos la actividad de macrófagos y neutrófilos durante inflamación, presencia de contaminantes atmosféricos, reacciones catalizadas por metales, irradiación de luz UV, rayos gamma y rayos X, y también pueden presentarse como subproductos de reacciones en la mitocondria, como el transporte de electrones (Valko, 2006). Niveles de producción altos de ROS pueden ser causante de distintos perjuicios, como daño a estructuras celulares como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y membranas, al igual que puede ser causante de inactivación de enzimas específicas, a este fenómeno se le conoce como estrés oxidativo (Lushchak, 2014).

Para *C. rogercresseyi* se han descrito enzimas antioxidantes, las cuales se encargan de evitar daños por estrés oxidativo eliminando y/o transformando los ROS, por ejemplo, superóxido dismutasa (SOD) la cual cataliza la dismutación del anión superóxido, dando como resultado peróxido de hidrógeno (Chavez-Mardones & Gallardo-Escárte, 2014) (Lu et al. 2015). Otra proteína encargada de reducir el estrés oxidativo es la ferritina, la

cual desintoxica y mantiene la homeostasis de hierro en el organismo mediante la eliminación de ROS por secuestro de hierro y la ecuación de Fenton, impidiendo la generación de iones hidroxilos y evitando el daño oxidativo (Arosio et al. 2009). Otras enzimas antioxidantes descritas para *C. rogercresseyi* son catalasa (CAT), la cual cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; fosfolípido-hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGP), quien reduce hidroperóxidos de fosfolípidos en las membranas celulares, entre otras (Chavez-Mardones & Gallardo-Escárate, 2014).

1.5 Tratamientos contra la caligidosis

La primera droga oficialmente autorizada en Chile para combatir la caligidosis fue el benzoato de emamectina, el cual es una lactona macrocíclica perteneciente al grupo de las avermectinas. Este medicamento aparece a fines de los años 90 (Stone et al., 1999, 2000) y se emplea en nuestro país de forma legal en el año 2000 (Bravo et al., 2008). El efecto que tiene sobre los parásitos radica en potenciar la acción de neurotransmisores tales como el glutamato y GABA, potenciando la entrada de iones cloruro dentro de distintas células como las nerviosas y musculares, derivando en pérdida de función celular y trastorno de impulso nervioso de las células, hiperpolarizándolas y previniendo su despolarización en la placa terminal (Roberts & Hutson, 1999; Davies & Rodger, 2000). Bravo et al. (2008) reportaron una reducción en la sensibilidad por parte de *C. rogercresseyi* hacia el benzoato de emamectina en todos los centros de cultivo que fueron parte de la investigación, ubicados en distintos puntos de la X región de Los Lagos, se estima que el nivel de pérdida de sensibilidad ante el medicamento fue causado por el uso de ivermectina, droga que pertenece al mismo grupo. La ivermectina es un antiparasitario administrado vía oral, el cual terminó por tener efectos nocivos en los peces, existiendo niveles de mortalidad causados a partir de la administración de este medicamento (Roth et al., 1993). Debido a la rápida pérdida de sensibilidad del parásito hacia el benzoato de emamectina se exploraron nuevas formas de controlar las infestaciones, como el uso de deltametrina y tratamientos con peróxido de hidrógeno (Wehner, 2012). La eficiencia del peróxido de hidrógeno para como método de control para la caligidosis se ha visto cuestionada, ya que

los ejemplares adultos que se desprenden del hospedero por acción del tratamiento pueden parasitar nuevamente a los peces en un periodo muy corto de tiempo, cercano a 10 minutos (Wehner, 2012). A partir del año 2013 se han utilizados métodos farmacológicos organofosforados conocidos como azamentidos, los cuales afectan principalmente a estadios planctónicos de *C. rogercresseyi* inactivando la enzima acetilcolinesterasa, atacando así el sistema nervioso central (Wehner, 2012). Al igual que los métodos de control mencionados con anterioridad, la efectividad de este tipo de tratamientos se ha visto disminuida debido a la resistencia que presentan los individuos de *Caligus*, por ello las empresas productoras de salmónidos han optado por desarrollar planes de rotación de fármacos (Aaen et al., 2015).

El uso de tratamientos farmacológicos, además del problema de presentar pérdida de sensibilidad por parte del parásito, existen problemas de contaminación ambiental asociados a la aplicación de estos medicamentos, ya que los antiparasitarios químicos tienen el potencial de acumularse en el sedimento y afectar a organismos marinos no objetivo (Langford et al. 2014). Por ello, el uso de tratamientos no farmacológicos cada vez está tomando más protagonismo dentro de la industria salmonicultura, por ejemplo, el uso de baños de agua dulce ha demostrado tener una alta eficacia sobre estadios juveniles de *Caligus*, llegando a tener un 100% de eficacia tras más de 2 horas de exposición (Mancilla-Schulz et al. 2025). Otro método novedoso es la implementación de peces biocontroladores como la lisa (*Mugil cephalus*) y el róbalo (*Eleginops maclovinus*), estos peces actúan como limpiadores y pueden reducir la carga parasitaria de los salmones hasta en un 48% (Feest, 2015). Un método innovador utilizado en la industria salmonicultura es la incorporación de inmunoestimulantes vía oral a los salmones mediante el alimento, gracias a estudios publicados en los últimos años basados en la respuesta inflamatoria de los peces a partir de la infección por *L. salmonis*, el inmunoestimulante encubre sustancias específicas de reconocimiento en el hospedador, por lo que el huésped libera parcialmente la carga de compuestos inmunosupresores hacia el pez, reduciendo su capacidad de infestación y a su misma vez, viéndose fortalecida la respuesta inmune de los peces ante la acción del parásito, reduciéndose significativamente el nivel de carga parasitaria (Fast, 2014). La acción de estos inmunoestimulantes se

demonstró apreciándose una disminución en un 50% la carga parasitaria en peces inmunoestimulados (Fast, 2014).

1.5.1 Vacunas antimicrobiota

Las vacunas antimicrobiota son una alternativa prometedora en cuanto al control poblacional de *C. rogercresseyi* y de la caligidosis, consolidándose como una alternativa sustentable y prometedora. Gracias a la secuenciación del genoma de *C. rogercresseyi*, se ha demostrado que el microbiota presente en los individuos de esta especie es de suma importancia en su desarrollo hasta llegar a estadios adultos y en la capacidad de los parásitos para poder infectar a un hospedador eficazmente (Valenzuela-Miranda et al., 2022)

Las vacunas antimicrobiota no tienen como objetivo a patógenos u organismos infecciosos en sí, sino que a los microorganismos que se desarrollan dentro de los individuos, que representan gran relevancia para su desarrollo óptimo y supervivencia, en este caso los microorganismos que componen la microbiota de los piojos de mar. El proceso para la elaboración de este tipo de vacunas conlleva la identificación “keystone taxa”, especies de microorganismos que juegan papeles fundamentales para la supervivencia del hospedero (Valenzuela-Miranda et al. 2022). Una vez identificadas las especies, son inactivadas para el desarrollo de la vacuna, con esto se espera que, al momento de administrarse la vacuna, se vea efectuada una respuesta inmunológica contra las bacterias identificadas con anterioridad, con el potencial de afectar negativamente al hospedero, interfiriendo en procesos fisiológicos importantes a los cuales las bacterias están estrechamente relacionadas (Wu-Chuang et al., 2023).

La interdependencia metabólica es una condición generalizada que se da entre bacterias y artrópodos (Zientz et al., 2004), esta interdependencia contempla diferentes procesos, se han identificado para artrópodos distintas vías metabólicas como la glucólisis, gluconeogénesis, metabolismo de fosfolípidos, nucleótidos y del azufre (Zientz et al., 2004).

Valenzuela-Miranda et al. (2022) realizaron un estudio asociado a la microbiota de *C. rogercresseyi*, pudiendo determinar la presencia de distintos genes relacionados al metabolismo proteico, aminoacídico, cofactores, vitaminas, entre otros. Gran parte de los genes identificados se relacionan a la biosíntesis, procesamiento, modificación y degradación de proteínas. Gracias al mismo estudio fue posible determinar que el genoma de *Caligus* carece de algunos genes asociados a metabolismo, siendo estos codificados en el microbioma. La microbiota de *Caligus* presenta genes que solo se encuentra en ella, siendo los genes encargados del metabolismo de aminoácidos los más predominantes, siendo la biosíntesis de fenilalanina, tirosina, triptófano y lisina las vías más enriquecidas. Se sugiere que la ausencia de estos genes en el genoma de *Caligus* impediría la biosíntesis de estos aminoácidos, por ello, estos deben ser incorporados al organismo a través de la alimentación, aunque existe la posibilidad que *C. rogercresseyi* pueda complementar su metabolismo propio con la maquina metabólica presente en la microbiota para la obtención de estos aminoácidos (Valenzuela-Miranda et al., 2022).

El microbioma central de piojos de mar en las costas de Chile ha sido identificado por Gonçalves et al. (2020), el estudio pudo identificar distintas especies dentro de la microbiota, donde se sugirió que la especie *Dokdonia sp.* tendría implicancia en el proceso de infección del piojo de mar, debido a su capacidad secretora de compuestos bioactivos. Se ha demostrado que en el microbioma de *Caligus*, uno de los genomas más representados fue el de *Dokdonia sp.*, se determinó que el genoma de esta bacteria puede ayudar a suplir la biosíntesis y degradación de valina, leucina e isoleucina (Valenzuela-Miranda et al., 2022).

1.6 Justificación del trabajo

El tratamiento contra la patología de la caligidosis ha sido y continúa siendo uno de los principales desafíos de la industria salmoniculora a nivel mundial debido a la basta presencia los parásitos en las granjas de cultivo y la resistencia que estos mismos han presentado a los distintos tratamientos que se han implementado con el paso de los años. Esta situación ha impulsado a investigadores a desarrollar nuevas estrategias de control

poblacional innovadoras y sostenibles, dentro de las cuales se ubican las vacunas antimicrobiota, tratamiento que apunta a alterar la microbiota presente en los parásitos, la cual es crucial para su supervivencia y producción de moléculas esenciales. Dado que la microbiota de *C. rogercresseyi* participa en funciones metabólicas importantes como la síntesis de aminoácidos y cofactores esenciales, la alteración de esta podría impactar en distintos procesos fisiológicos como la reproducción, secretoma y respuesta *Caligus* hacia mecanismos de defensa del hospedador. Genes como Sex-lethal, Doublesex y VASA están relacionados directamente con la determinación, diferenciación sexual y gametogénesis, mientras que Vitelogeninas, EcR, RxR y gliceroporinas participan en la regulación hormonal, vitelogénesis y metabolismo reproductivo. Serpina 3, Trypsina 2 y catepsina B son genes relacionados al secretoma del parásito, encargados de suprimir la respuesta inmune epitelial del hospedador, ayudar a la digestión y degradación proteica. Los genes relacionados a respuesta inmune como AIP e IKKB son responsables de suprimir la respuesta inmune del hospedador y mantener la homeostasis en el parásito. Genes como PHGP, Catalasa, Superóxido dismutasa y Ferritina tienen la característica de ser antioxidantes, combatiendo los altos niveles de estrés oxidativo y radicales libres producidos por la acción inmunológica del hospedador. La evaluación de expresión de estos genes en ejemplares de *C. rogercresseyi* provenientes desde peces inmunizados con esta vacuna permitirá determinar si la manipulación de la microbiota del parásito afecta distintos mecanismos moleculares, entre ellos los encargados de la reproducción, del funcionamiento del secretoma y de la respuesta por parte del parásito ante procesos inmunológicos del pez en el intento de combatir el parasitismo de *Caligus*. Esta investigación ayudará a comprender la interacción entre el microbiota y algunos de los procesos fisiológicos de *C. rogercresseyi*, ampliando el alcance que ha tenido el desarrollo de esta herramienta de control poblacional.

2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Caligus rogercresseyi expuestos salmones inmunizados con la vacuna antimicrobiota presentan cambios en la modulación de genes asociados a reproducción, secretoma y respuesta inmune.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar cambios de expresión génica asociados a reproducción, secretoma y respuesta inmune de *Caligus rogercresseyi* ante salmones inmunizados con vacuna antimicrobiota.

Objetivos específicos

- Evaluar *in silico* los patrones de expresión de genes asociados a reproducción, secretoma, respuesta inmune y estrés oxidativo en distintos estadios de desarrollo de *C. rogercresseyi*.
- Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a reproducción en *Caligus rogercresseyi* extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.
- Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a secretoma en *Caligus rogercresseyi* extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.
- Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a respuesta inmune y estrés oxidativo en *Caligus rogercresseyi* extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.

4. Materiales y métodos

- **4.1 Objetivo I: Evaluar *in silico* los patrones de expresión de genes asociados a reproducción, secretoma, respuesta inmune y estrés oxidativo en distintos estadios de desarrollo de *C. rogercresseyi*.**

Utilizando la base de datos de secuenciación transcriptómica de los distintos estadios de desarrollo de *C. rogercresseyi* disponibles en el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola (LBGA), se determinaron los niveles de transcritos por millón (TPM) de los genes Vg1, Vg2, RXR, EcR, Glp, VASA, Sxl, Dsx, AIP, PHGP, SOD, Ferr, Serp3, Tryp2 y CatB. El perfil de expresión se graficó en un heatmap utilizando la herramienta TBtools-II (v2.323).

4.2. Objetivo II: Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a reproducción en *Caligus rogercresseyi* extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.

4.2.1. Formulación de la vacuna antimicrobiota

Se recolectaron ejemplares de *C. rogercresseyi* a partir de peces infectados, posteriormente en el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Marina (LBGA) de la Universidad de Concepción, se procedió a tratar a los ejemplares del parásito, triturándolos y macerándolos, para preparar cultivos bacterianos que permitan aislar y caracterizar las cepas presentes. Se identificaron bacterias “keystone taxa” de *Caligus* a través de análisis de redes por co-concurrencia. Posteriormente se procedió a seleccionar dos de las cepas bacterianas más abundantes, las cuales fueron inactivadas a través de tratamientos térmicos y de formaldehído. Las bacterias inactivadas se mezclaron con el adyuvante oral comercial Montanide GR01® (Seppic, Francia) y luego incluido en el alimento de los peces. Posteriormente, los peces se alimentaron por 21 días a saciedad.

4.2.2. Diseño experimental

Se seleccionaron 30 peces de la especie *Salmo salar* y se mantuvieron en estanques equipados con oxigenación, sistemas de agua filtrada mediante filtros de arena de cuarzo, espumadores, filtros UV y filtros biológicos y se mantuvieron bajo parámetros controlados ($T^{\circ} 13^{\circ} \pm 1$, $\text{pH} = 7,6 \pm 0,7$, oxígeno disuelto >8 mg/L, $\text{NH}_3 < 0,01$ mg/L y $\text{NO}_2 < 0,1$ mg/L) en el laboratorio experimental de la Estación de Biología Marina de la Universidad de Concepción, ubicada en Dichato, Chile. Los peces se aclimataron durante 3 semanas y posteriormente se separaron en grupos experimentales de 15 peces por grupo (control y tratados con la vacuna). Los peces de cada grupo fueron infectados con 35 copepoditos cada uno, siendo alimentados durante 21 días a saciedad con alimento común para el grupo control y alimento con la vacuna para el grupo inmunizado. Concluido este periodo se recolectaron individuos de *C. rogercresseyi* utilizando benzocaína al 20% como anestésico. Se seleccionaron 6 individuos por pez (3 hembras y 3 machos). Las muestras fueron etiquetadas y almacenadas a -80°C para su posterior análisis en el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción.

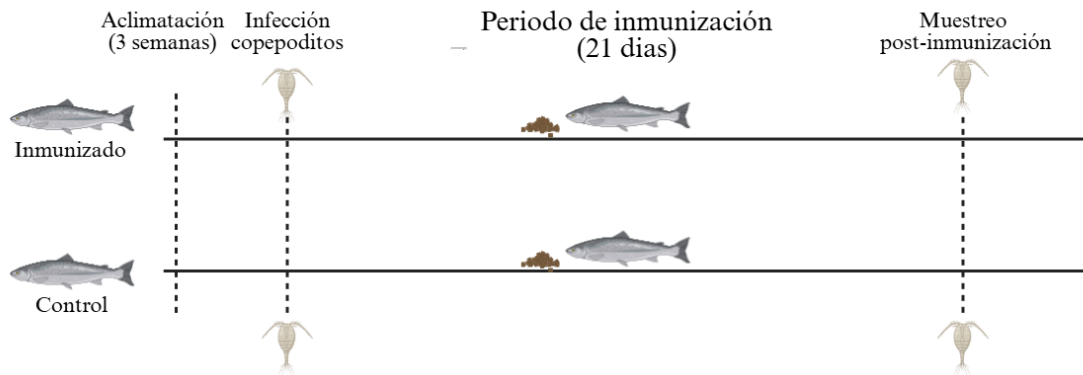


Figura 2: esquema del diseño experimental a partir de la inmunización de salmónes con vacuna antimicrobiota. Imagen creada a través de BioRender.com.

4.2.3. Extracción de ARN y Síntesis de cDNA

Se realizaron extracciones de ARN total para hembras y machos recolectados antes y después de la inmunización con la vacuna. La extracción del ARN se realizó mediante método TRIzol (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizaron pools de 3 individuos de hembras y machos para formar los grupos a analizar, antes y después del tratamiento.

Se cuantificó la concentración y pureza del ARN extraído a través de espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Waltham, MA, USA). La concentración fue cuantificada determinando la absorbancia a 260 nanómetros y la pureza se evaluó mediante las razones 260/280 y 260/230. La integridad del ARN se analizó mediante electroforesis en gel MOPS al 1,2% siendo visualizado a través del sistema iBright® bajo luz UV.

Tabla 1: Resultados de espectrofotometría realizada al ARN extraído a partir de ejemplares de *C. rogercresseyi*. En la primera columna se observa el nombre de la muestra, seguido de su concentración, la relación de absorbancia entre 260 y 280 nanómetros y la relación de absorbancia entre 260 y 230 nanómetros.

Muestra	Ng/ μ L	A 260-280	A 260-230
Macho control	911,6	2,08	2,34
Macho inmunizado	729,6	2,05	2,35
Hembra control	1461,5	2,15	2,46
Hembra inmunizado	1378,6	2,14	2,45

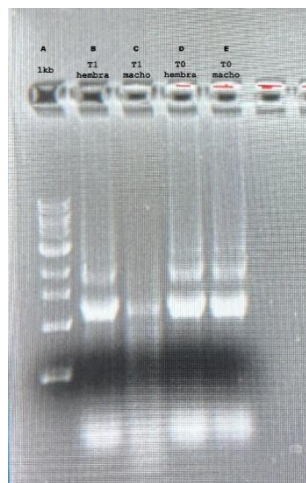


Figura 3: Gel de MOPS al 1,2% de la extracción de ARN de *C. rogercresseyi*. A) marcador de peso molecular a 1 Kb. B) y C) representan hembras y machos de *C. rogercresseyi* expuesto a vacuna antimicrobiana. D) y E) representan grupos de hembras y machos control de *C. rogercresseyi*.

Para la síntesis de ARN complementario a partir del ARN total extraído, se realizó una reacción de transcriptasa inversa (RT-PCR) mediante el kit Rever Aid H Minus First Strand cDNA Syntesis Kit (Thermo, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de una concentración de ARN de 200 ng/ μ L. Se programó el termociclador para RT-PCR iniciando con una etapa de 25°C por 5 minutos, luego a 42°C por 60 minutos y finalmente una etapa a 70°C por 5 minutos. Para verificar la correcta síntesis de cDNA se realizó un PCR en tiempo final y se visualizó el resultado mediante electroforesis en gel TAE 1,5%.

4.2.4. Selección de partidores

Los partidores específicos utilizados para la cuantificación de los genes de interés relacionados a reproducción en *C. rogercresseyi* fueron obtenidos y posteriormente diseñados a partir de un estudio previamente realizado por Farlora et al. (2017). Para los genes VASA, Doublesex y Sex-lethal, los partidores específicos fueron diseñados en LBGA a través de la plataforma Genious.

Tabla 2: lista de partidores utilizados para análisis RT-qPCR de genes asociados a reproducción en *C. rogercresseyi*. En la primera columna se observa el nombre del partidor, seguido del gen, la secuencia y la temperatura de melting (T_m).

Nombre	Gen	Secuencia	T_m (°C)
Cr-Vg1_F Cr-Vg1_R	Vitelogenin 1	TTGCACCGTGCCTGCGTGAA TGCCCAACGCCTTCATGACG A	61
Cr-Vg2_F Cr-Vg2_R	Vitelogenin 2	AGACCAAGGAGATCTCTACC CAGTGTTGTACAGGATGGG	62
Cr-RXR_F Cr-RXR_R	Retinoid X receptor	AGACCTTTTCTCGGAGACTC ATCGGGTCCTAGTAGAACTC	60
Cr-EcR_F Cr-EcR_R	Ecdisone receptor	GATCGGAGCTCAGTGAGAA TGATAGACACTCTCTACGGG	60

Cr-Glp1_v1_F Cr-Glp1_v1_R	Gliceroporin ^a	GGGACTGTAGCTCAAGTGAC GGGACTGTAGCTCAAGTGAC	60
Cr_Vasa_F3 Cr_Vasa_R3	Vasa	GGTATTGTGGGCGGAGTGAA TTCTCAGAGAGCCAGCTTGC	62
Cr_lethalsex_F Cr_lethalsex_R	Sex-lethal	TTGGGGAGGAAGTGTGTTCG ATCCAAGGGGCTCTCGTAGT	60
Cr_doublesex5_F Cr_doublesex5_R	doublsex	GAAGACAGCAGGCACAGGA A TCGTTTGGCTTCCGACTTGA	60

4.2.5. Evaluación de expresión génica por RT-qPCR

Se realizaron análisis de expresión de los genes de interés mediante la cuantificación de su expresión a través del método comparativo $\Delta\Delta\text{Ct}$, utilizando como gen endógeno o housekeeping gene (HKG) a β -tubulina. Gracias a este método fue posible determinar cambios de expresión entre el gen a evaluar y el gen endógeno. Se calculó el valor de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ para cada una de las muestras, posteriormente se realizaron análisis estadísticos mediante el software estadístico GraphPad Prism (versión 10.3.1), se aplicó una prueba de ANOVA de dos vías y un test de Tukey HSD para determinar diferencias significativas entre grupos.

4.3. Objetivo III: Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a secretoma en *Caligus rogercresseyi* extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.

4.3.1. Extracción de ARN y síntesis de cDNA

Se llevó a cabo la extracción de ARN total y la síntesis de cDNA bajo el mismo protocolo descrito en el acápite 4.1.3, utilizando las mismas muestras descritas, antes y después de realizada la inmunización.

4.3.2. Selección de partidores

Los primers vinculados a genes relacionados a secretoma de *C. rogercresseyi* se obtuvieron gracias al trabajo de Vera-Bizama et al. (2015). Los partidores se encontraban previamente estandarizados por LBGA.

Tabla 3: lista de partidores utilizados para análisis RT-qPCR de genes asociados a secretoma en *C. rogercresseyi*. En la primera columna se observa el nombre del partidor, seguido del gen, la secuencia y la temperatura de melting (Tm).

Nombre	Gen	Secuencia	Tm (°C)
Cr_serpin3_F1 Cr_serpin3_R1	Serpina 3	GGGAGGATTAGGAATGGCGC GACTTCTCAGGGATGGCTGG	61
CRtryp-2-F2 CRtryp-2-R2	Tripsina 2	CAGACCCAATGAAATCAAG ATAGAGTTCGTGGTAGATG	52
qCr-CatB1F qCr-CatB1R	Catepsina B	CTAATAGTATCCTGTCATCG AGGTAGTAGAAGAAGTCTC	52

4.3.3. Evaluación de la expresión génica mediante RT-qPCR

La evaluación de la expresión génica de los genes relacionados a secretoma en *C. rogercresseyi* se realizaron bajo la misma metodología descrita en el acápite 4.1.5 del objetivo I.

4.4. Ojetivo IV: Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a respuesta inmune y estrés oxidativo en *Caligus rogercresseyi* extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.

4.4.1. Extracción de ARN y síntesis de cDNA

Se llevó a cabo la extracción de ARN total y la síntesis de cDNA bajo el mismo protocolo descrito en el acápite 4.1.3, utilizando las mismas muestras descritas, antes y después de realizada la inmunización.

4.4.2. Selección de partidores

Los partidores específicos para genes relacionados a respuesta inmune y estrés oxidativo de *C. rogercresseyi* fueron obtenidos y diseñados a partir de dos estudios realizados en LGBA (Nuñez-Acuña et al. 2014; Vera-Bizama et al. 2015). Los partidores se encontraban previamente estandarizados.

Tabla 4: lista de partidores utilizados para análisis RT-qPCR de genes asociados a secretoma en *C. rogercresseyi*. En la primera columna se observa el nombre del partidor, seguido del gen, la secuencia y la temperatura de melting (Tm).

Nombre	Gen	Secuencia	Tm (°C)
Cr_AIP_F2 Cr_AIP_R2	AIP	TCTTCTGCCTCACGGGACGA TGAGAACCCCGTGCCTGTCT	62
Cr_Ikkβ_F1 Cr_Ikkβ_R1	Ikkβ	TCGACCAGAGCTCCTTGGCT TGCGTGATGAGTCCGAGGCT	63
qCr_PHGP_F qCr_PHGP_R	PHGP	TGGAGCCGATGCCATTCTCTTTTCA TTTTTGCTGGGCGCCAGGCGTGA	66
qCr_CAT_F qCr_CAT_R	Catalasa	GGCACCCAGACGATAGCGATGAGCA TCGCTTTCAGTCCCGGAAATCTGGT	60
qCr_SOD_Fa qCr_SOD_Ra	SOD	TCCACATGCAACACGCGCTCCAG GCGTGCCCTGGTCGTACATGCCG	60
qCR_Ferr_F2 qCR_Ferr_R2	Ferritina	GGAGTGACGGCCTAGAGGCACTCCG TCCAGCCAAGTGCCGGTGAGCCA	60

4.4.3. Evaluación de la expresión génica mediante RT-qPCR

La evaluación de la expresión génica de los genes relacionados con la respuesta inmune y el estrés oxidativo en *C. rogercresseyi* se realizó bajo la misma metodología descrita en el acápite 4.1.5 del objetivo I.

Finalmente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) a partir de los niveles de expresión relativa de cada uno de los genes a evaluar para machos y hembras adultos

antes y después de la inmunización con la vacuna antimicrobiota. Las gráficas se generaron en la plataforma RStudio (v2025.9.2)

5. RESULTADOS

5.1 Objetivo I: Evaluar *in silico* los patrones de expresión de genes asociados a reproducción, secretoma, respuesta inmune y estrés oxidativo en distintos estadios de desarrollo de *C. rogercresseyi*.

Se generó un heatmap para visualizar los niveles de expresión génica de los genes a evaluar en hembras adultas, machos adultos y copepodito. En términos generales, los niveles de expresión génica de las hembras adultas fueron diferentes a los de los machos y copepodito, que tuvieron niveles de expresión similares. En hembras, los genes asociados a reproducción presentaron valores de expresión más altos en general, destacando el alto nivel de expresión de las vitelogeninas, particularmente la vitelogenina 2. Los genes relacionados a la determinación sexual como Sxl y dsx también mostraron niveles relativamente altos en el grupo de las hembras. Los machos en general presentan niveles de expresión moderados, con niveles de expresión similares a hembras en gran parte de los genes evaluados. Los copepoditos exhibieron niveles bajos de expresión en la mayoría de los genes, siendo coherente con su condición de estadio larval. Destacan en este grupo los niveles de expresión de SOD, Ferr, y CatB.

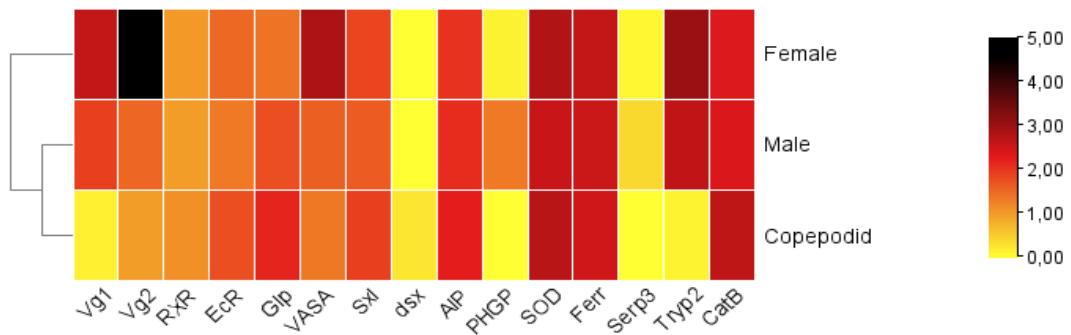


Figura 4: Heatmap de niveles de expresión de genes de estudio en hembras adultas, machos adultos y estadio copepodito de *C. rogercresseyi*,

5.2 Objetivo II: Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a reproducción en *Caligus rogercresseyi* extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.

Para Vitelogenina 1 (Vg1) (Fig. 5 A), los individuos hembra inmunizados con la vacuna antimicrobiota aumentaron significativamente su expresión con respecto a su grupo control ($p = <0,0001$), al igual que con el grupo control de machos ($p = <0,0001$). El grupo de individuos macho inmunizados con la vacuna disminuyó significativamente con respecto a su grupo control ($p = 0,0010$), al igual que con el grupo de hembras inmunizado ($p = <0,0001$) y el grupo de hembras control ($p = <0,0001$). Los grupos control de ambos sexos presentaron diferencias significativas, expresándose en mayor medida el grupo control de hembras ($p = <0,0001$).

Al analizar la expresión relativa del gen Vitelogenina 2 (Vg2) (Fig. 5 B), es posible determinar que sigue patrones similares a Vitelogenina 2, se observándose un aumento significativo del nivel de expresión del grupo de hembras inmunizado con respecto a su grupo control ($p = <0,0001$) y al grupo control de machos ($p = <0,0001$). Para el grupo de machos tratado con la vacuna antimicrobiota se determinó una disminución significativa de la expresión con respecto a su grupo control ($p = <0,0001$), al igual que con respecto a los grupos de hembras control ($p = <0,0001$) e inmunizados ($p = <0,0001$). La diferencia entre la expresión de los grupos control fue significativa, viéndose expresado mayormente el gen en hembras ($p = <0,0001$).

El análisis de la expresión relativa del gen Retinoid X receptor (RxR) (Fig. 5 C), determinó que no existen diferencias significativas entre el grupo de hembras inmunizado y su grupo control ($p = 0,4030$ (ns)), mientras que, si existen diferencias significativas con el grupo control de machos, siendo mayor expresión en el grupo de hembras inmunizado ($p = <0,0001$). El grupo de machos inmunizado presentó un aumento significativo de la expresión en relación con su grupo control ($p = 0,0134$), una disminución significativa de la expresión a comparación del grupo control de hembras ($p = 0,0002$), al igual que con el grupo hembras inmunizado ($p = 0,0009$). Los grupos control de ambos sexos presentaron diferencias significativas, siendo la expresión mayor en hembras ($p = <0,0001$).

Al analizar la expresión relativa del gen Ecdisone receptor (EcR) (Fig. 5 D), se ha determinado que el grupo de hembras inmunizado no presenta diferencias significativas respecto a su grupo control ($p= 0,2254$), mientras que presenta una expresión significativamente mayor con el grupo control de machos ($p= 0,0003$). El grupo de machos inmunizado presentó un aumento significativo de la expresión con respecto a su grupo control ($p= <0,0001$) y una expresión significativamente mayor con el grupo de hembras inmunizado ($p= 0,0128$). La diferencia de expresión no fue significativa con respecto al grupo control de hembras ($p= 0,2392$). Se pudo determinar que existen diferencias significativas entre los grupos control de ambos sexos, siendo esta mayor en hembras ($p= <0,0001$).

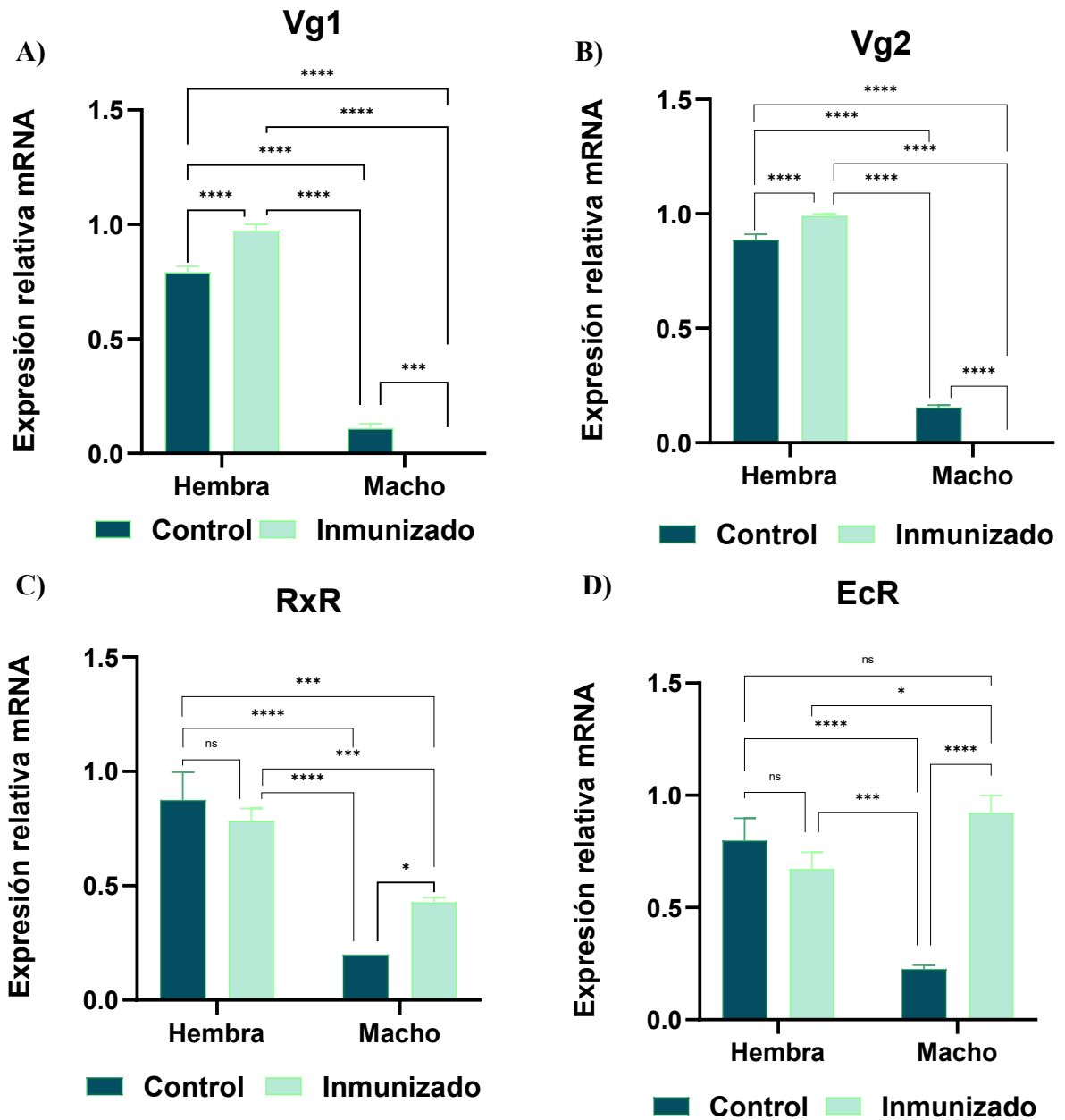


Figura 5: Niveles de expresión relativa de mRNA para Vitelogenina 1 (A), Vitelogenina 2 (B), Retinoid X receptor (C) y Ecdisone receptor (D) en grupos de *C. rogerresseyi* control e inmunizados con vacuna antimicrobiota. Las barras verticales representan la desviación estándar. (*) representa diferencias significativas ($p < 0,05$). (ns) representa $p > 0,05$.

El análisis de la expresión relativa del gen Gliceroporin^a (Glp) (Fig. 6 A), ha permitido determinar que el grupo de hembras inmunizado no presenta diferencias significativas con respecto a su grupo control ($p > 0,9999$) al igual que con el grupo control en machos ($p = 0,1010$). El grupo de machos inmunizado presenta un aumento significativo de expresión en relación con su grupo control ($p < 0,0001$), el grupo control en hembras ($p < 0,0001$) y con el grupo de hembras inmunizado ($p < 0,0001$). La diferencia de expresión entre los grupos control de ambos sexos no fue significativa ($p = 0,0985$).

Gracias al análisis de expresión relativa del gen VASA (Fig. 6 B), se ha podido establecer que existe una disminución significativa de la expresión entre el grupo de hembras inmunizado y su grupo control ($p = < 0,0001$), mientras que existe una expresión mayor con respecto al grupo control de machos ($p = < 0,0001$). El grupo de machos inmunizado disminuyó significativamente su expresión a comparación con su grupo control ($p = < 0,0001$), también con el grupo control de hembras ($p = < 0,0001$) y el grupo de hembras inmunizado ($p = < 0,0001$). Los grupos control de ambos sexos presentaron diferencias significativas en la expresión, siendo esta mayor en machos ($p = < 0,0001$).

Al analizar la expresión relativa del gen Sex-lethal (Sxl) (Fig. 6 C), es posible determinar que el grupo de hembras inmunizado presenta un aumento significativo en la expresión del gen con respecto a su grupo control ($p = 0,0328$), al igual que con el grupo control de machos ($p < 0,0001$). El grupo de machos inmunizado presenta un aumento significativo comparado a grupo control ($p = 0,0003$), presenta un nivel menor de expresión en comparación al grupo de hembras inmunizado ($p = 0,0014$) y no presenta diferencias significativas con el grupo control de hembras ($p = 0,1244$). En relación con los grupos control, la expresión fue significativamente mayor en hembras ($p = < 0,0001$).

El análisis de la expresión relativa del gen Doublesex (Dsx) (Fig. 6 D), ha permitido establecer que el grupo de hembras inmunizado presenta un aumento significativo de expresión respecto a su grupo control ($p = 0,0019$) y una expresión significativamente menor comparado al grupo control de machos ($p < 0,0001$). El grupo de machos inmunizado presenta una disminución significativa de la expresión en comparación con su grupo control ($p < 0,0001$), una expresión mayor comparado al control de hembras

($p < 0,0001$) y el grupo de hembras inmunizado ($p < 0,0001$). La diferencia de expresión entre los grupos control de ambos sexos fue significativa, siendo esta mayor en machos ($p = < 0,0001$).

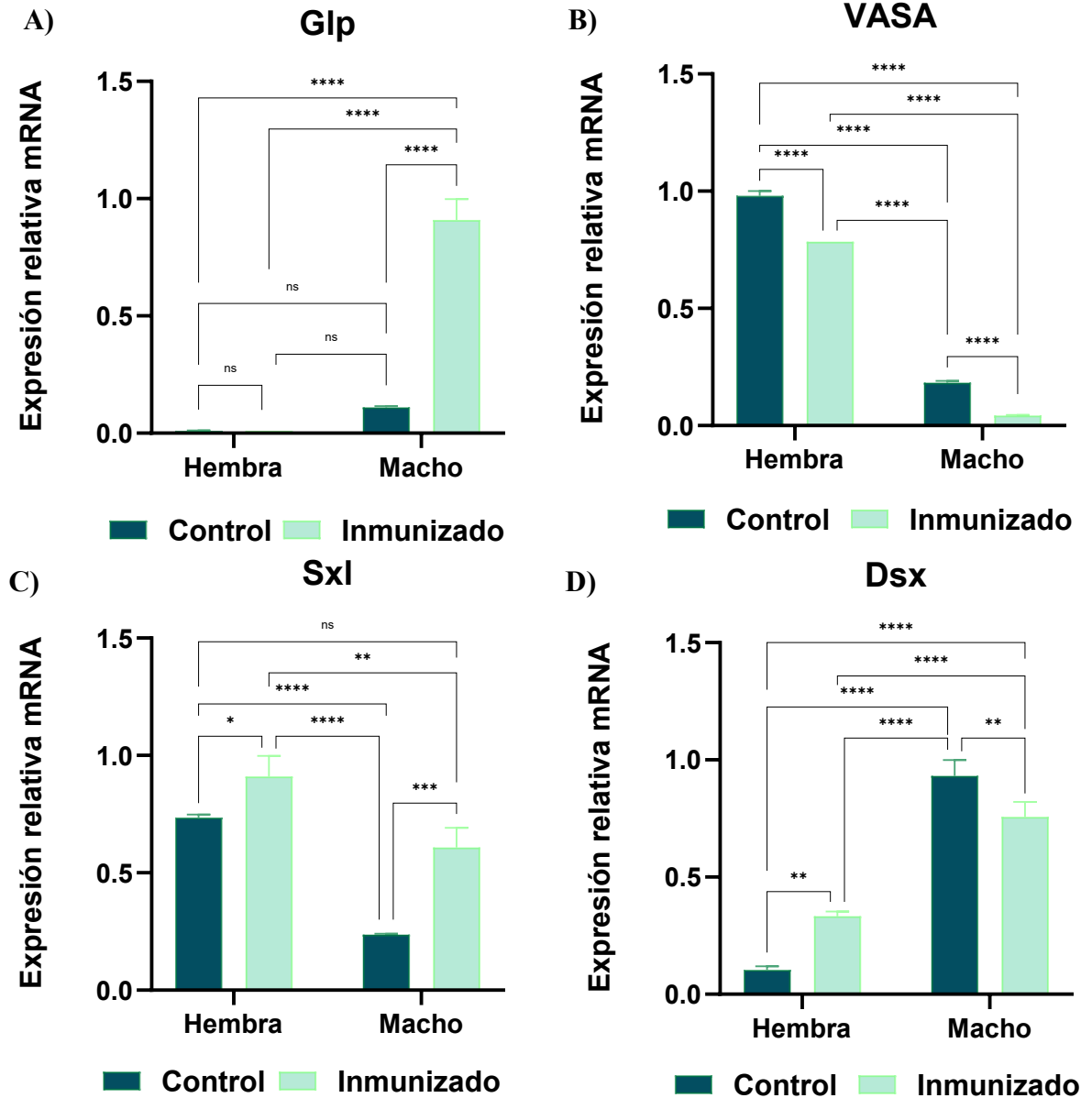


Figura 6: Niveles de expresión relativa de mRNA para Gliceroporin^a (A), VASA (B), Sex-lethal (C) y Doublesex (D) en grupos de *C. rogerscresseyi* control e inmunizados con vacuna antimicrobiota. Las barras verticales representan la desviación estándar. (*) representa diferencias significativas ($p < 0,05$). (ns) representa $p > 0,05$.

Finalmente se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 7) con los niveles de expresión relativa de los genes relacionados a reproducción demostró una separación según grupos y según tratamiento, siendo el componente principal 1 (Dim1) quien explica la mayor parte de la variabilidad total, con un 73,1% y el Dim2 explicando un 22,9% de la misma. Se observó que los grupos de hembras, tanto control como inmunizadas se agrupan en los cuadrantes izquierdos, indicando perfiles transcripcionales similares entre grupos y que están relacionados principalmente a genes como Vg1, Vg2, VASA, RXR y Sxl en menor medida. El grupo de machos control se posiciona en el cuadrante superior derecho, principalmente influenciado por la contribución del gen dsx, el cual tiene una expresión mayor en machos y genera una separación respecto a los grupos de hembras. Los machos inmunizados se agrupan en el cuadrante inferior derecho, asociados mayormente al gen Glp, el cual incrementa su nivel de expresión cuando los machos se ven expuestos a la inmunización.

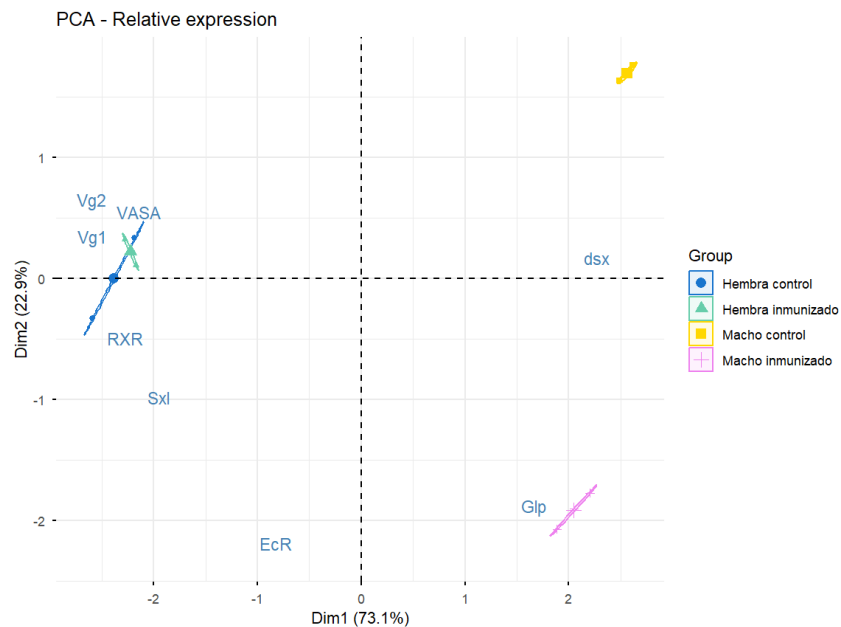


Figura 7: Análisis de componentes principales (PCA) para la expresión relativa de genes relacionados a reproducción en *C. rogersesseyi*.

5.3 Objetivo III: Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a secretoma en *Caligus rogercresseyi* extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.

Gracias al análisis de la expresión relativa del gen Serpina 3 (Serp3) (Fig. 8 A), es posible determinar que el grupo de hembras inmunizado con la vacuna antimicrobiota presenta una disminución significativa en la expresión con respecto a su grupo control ($p < 0,0001$) y una expresión menor respecto al grupo control de machos ($p = 0,0004$). Es posible determinar que el grupo de machos inmunizado presenta un aumento significativo de la expresión relativa del gen comparado a su grupo control ($p < 0,0001$) y al grupo de hembras inmunizado ($p < 0,0001$). No se observan diferencias significativas de expresión entre los machos inmunizados y el grupo control de hembras ($p = 0,8741$). Los grupos control de ambos sexos presentan diferencias significativas en la expresión relativa del gen, siendo esta mayor en hembras ($p = < 0,0001$).

Al analizar los resultados de la expresión relativa del gen Tripsina 2 (tryp2) (Fig. 8 B), se ha podido determinar que el grupo de hembras inmunizado presenta un aumento significativo en la expresión respecto a su grupo control ($p < 0,0001$) y el grupo control de machos ($p < 0,0001$). El grupo de machos inmunizado presenta un aumento significativo de la expresión respecto a su grupo control ($p < 0,0001$), el grupo control de hembras ($p < 0,0001$) y una disminución significativa respecto al grupo de hembras inmunizado ($p = 0,0184$). La diferencia entre los grupos control de ambos fue significativa, siendo mayor en hembras ($p = 0,0007$).

El análisis de la expresión relativa del gen Catepsina B (CatB) (Fig. 8 C) permitió determinar que el grupo de hembras inmunizado no presenta diferencias significativas respecto a su grupo control ($p = 0,4145$), pero presenta una expresión significativamente mayor comparado al grupo control de machos ($p < 0,0001$). El grupo de machos inmunizado presenta un aumento significativo en la expresión comparado con su grupo control ($p < 0,0001$), pero la expresión relativa es menor comparado al grupo control y al grupo inmunizado en hembras ($p < 0,0001$). La diferencia de expresión entre los grupos

control de ambos sexos también fue significativa, siendo significativamente mayor en hembras ($p < 0,0001$).

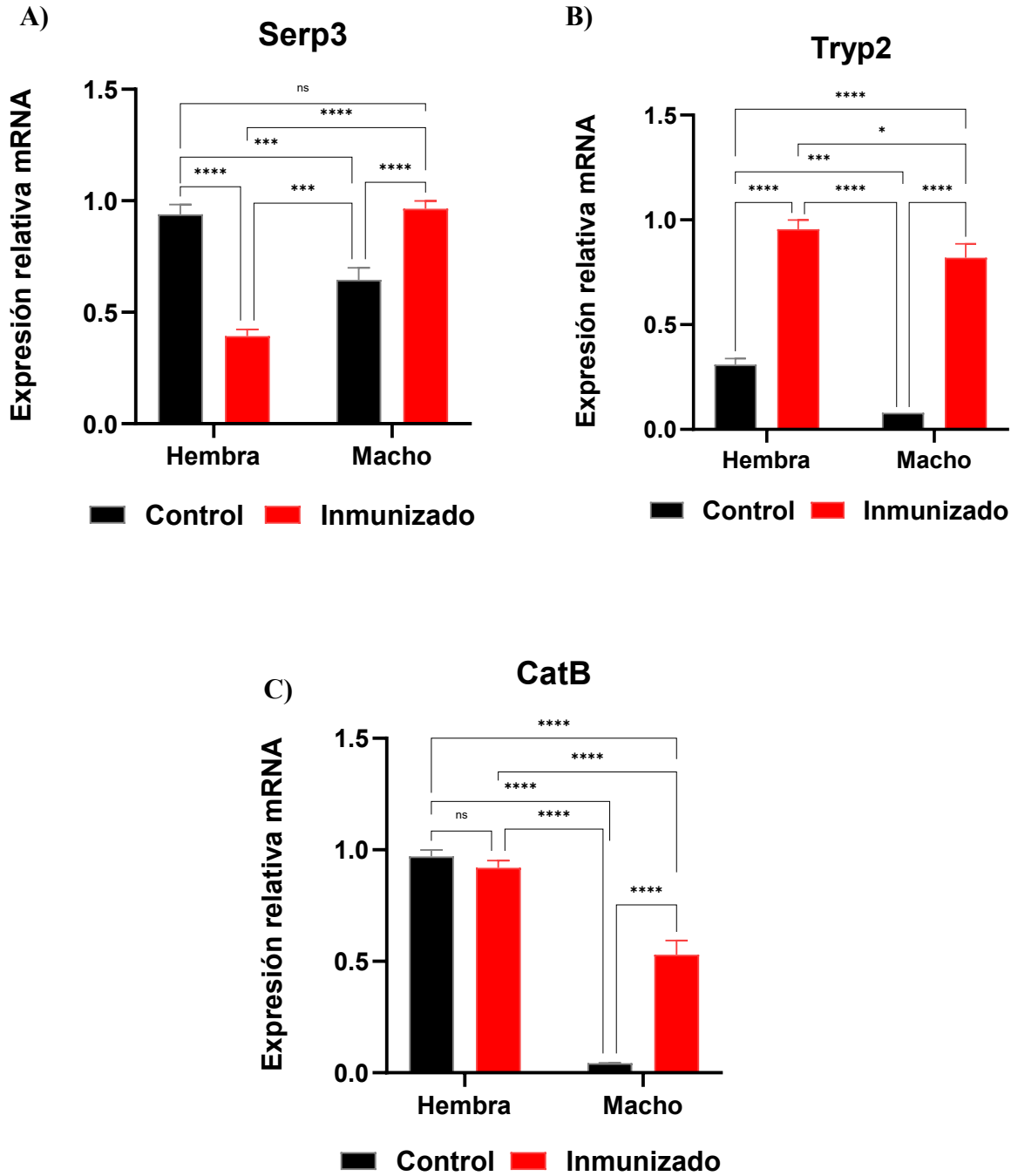


Figura 8: Niveles de expresión relativa de mRNA para Serpina 3 (A), Tripsina 2 (B) y Catepsina B (C) en grupos de *C. rogersesseyi* control e inmunizados con vacuna antimicrobiota. Las barras verticales representan la desviación estándar. (*) representa diferencias significativas ($p < 0,05$). (ns) representa $p > 0,05$.

el análisis PCA realizado a partir de los niveles de expresión relativa de genes relacionados a secretoma de hembras y machos control e inmunizados con la vacuna antimicrobiota (Fig. 9), permitió determinar que el componente Dim1 explica 52,8% de la variabilidad total, mientras que Dim2 explica un 33,5%. El grupo de hembras control se posicionó en el cuadrante inferior izquierdo y está relacionado con la expresión del gen *Serp3*, mientras que el grupo de hembras inmunizado se posicionó en el cuadrante superior derecho, sin presentar influencia por ninguno de los genes evaluados. El grupo de machos control, se posicionó en el cuadrante superior izquierdo del PCA, sin presentar relación los genes evaluados, por otro lado, el grupo de machos inmunizado se posicionó en el cuadrante inferior derecho, estando relacionado con los genes *Tryp2* y *CatB*.

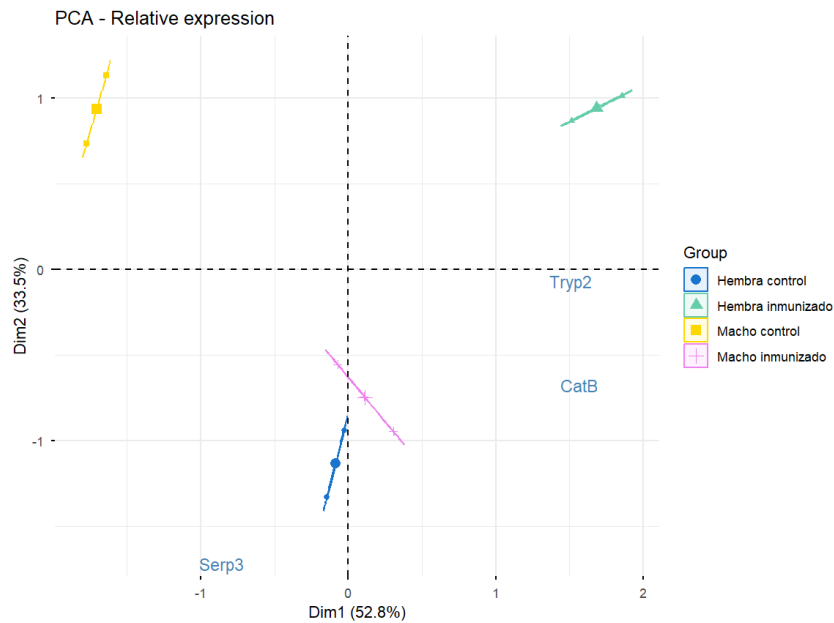


Figura 9: Análisis de componentes principales (PCA) para la expresión relativa de genes relacionados a secretoma en *C. rogercresseyi*.

5.4. Objetivo IV: Cuantificar la expresión relativa de los genes asociados a respuesta inmune y estrés oxidativo en *Caligus rogercresseyi* extraídos a partir de peces tratados con vacuna antimicrobiota.

Al analizar la expresión relativa del gen inhibidor de la apoptosis (AIP) (Fig. 10 A), se determinó que el grupo de hembras inmunizado con la vacuna antimicrobiota presenta una expresión significativamente menor respecto a su grupo control ($p < 0,0001$) pero no presenta diferencias significativas con el grupo control de machos ($p = 0,9913$). El grupo de machos inmunizado presenta un aumento significativo en comparación a su grupo control ($p = 0,0002$), una expresión menor comparado al grupo control de hembras ($p < 0,0001$) y una expresión significativamente mayor el grupo de hembras inmunizado ($p < 0,0001$). Se determinó que existen diferencias significativas entre los grupos control de ambos sexos, siendo la expresión mayor en hembras ($p < 0,0001$).

Se analizó la expresión relativa del gen I κ B kinasa β (IKKB) (Fig. 10 B), determinando que existen un aumento significativo de la expresión relativa del gen en el grupo de hembras inmunizado con respecto a su grupo control ($p < 0,0001$), mientras que la diferencia de la expresión no es significativa con respecto al grupo control de machos ($p = 0,1304$). El grupo de machos inmunizado presenta un aumento significativo de la expresión comparado a su grupo control ($p = 0,0003$), y el grupo de hembras inmunizado ($0,0038$). El grupo de machos inmunizado presentó un nivel de expresión menor comparado al grupo de al grupo control de hembras ($p = 0,0036$), además se hallaron diferencias significativas entre los grupos control, donde las hembras tuvieron un nivel de expresión mayor ($p < 0,0001$).

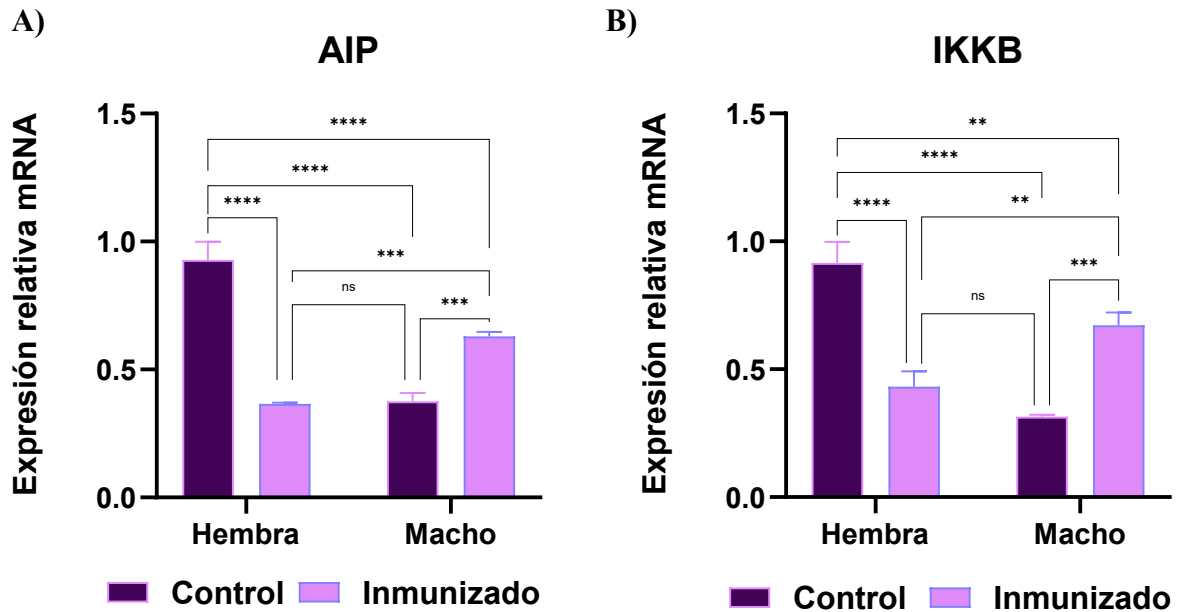


Figura 10: Niveles de expresión relativa de mRNA para el gen inhibidor de la apoptosis (A) e IκB kinasa β (B) en grupos de *C. rogerresseyi* control e inmunizados con vacuna antimicrobiota. Las barras verticales representan la desviación estándar. (*) representa diferencias significativas ($p < 0,05$). (ns) representa $p > 0,05$.

Al analizar la expresión relativa del gen fosfolípido-hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGP) (Fig. 11 A) se determinó que no existen diferencias significativas entre el grupo de hembras inmunizado y su grupo control ($p = 0,2341$) al igual que con respecto al grupo control en machos ($p = 0,4239$). El grupo de machos inmunizado presentó un aumento significativo de la expresión con respecto a su grupo control ($p < 0,0001$), el grupo control de hembras ($p < 0,0001$) y el grupo de hembras inmunizado ($p < 0,0001$). Se determinó que existen diferencias significativas entre los grupos control de ambos sexos, siendo la expresión mayor en machos ($p = 0,0249$).

Gracias al análisis de la expresión relativa del gen Catalasa (CAT) (Fig. 11 B) fue posible determinar que no existen diferencias significativas entre el grupo de hembras tratado con

la vacuna antimicrobiota y su grupo control ($p > 0,9999$), pero si presentó un nivel significativamente menor con respecto al grupo control en machos ($p = 0,0354$). El grupo de machos inmunizado presenta diferencias significativas con respecto a su grupo control ($p < 0,0001$), el grupo control de hembras ($p < 0,0001$) y el grupo de hembras inmunizado ($p < 0,0001$). La diferencia entre los grupos control de ambos sexos fue significativa, siendo la expresión mayor en machos ($p = 0,0357$).

Se analizó la expresión relativa del gen superóxido dismutasa (SOD) (Fig. 11 C), determinándose que existe un aumento significativo en el nivel de expresión entre el grupo de hembras inmunizado y su grupo control ($p = 0,0041$), también observándose una expresión significativamente mayor comparado con el grupo control de machos ($p < 0,0001$). El grupo de machos inmunizado presentó un nivel de expresión significativamente mayor con respecto a su grupo control ($p < 0,0001$), el grupo control de hembras ($p < 0,0001$) y el grupo de hembras inmunizado ($p = 0,0048$). La diferencia entre los grupos control de ambos sexos fue significativa, siendo mayor en hembras. ($p < 0,0001$).

El análisis de la expresión relativa del gen Ferritina (Ferr) (Fig. 11 D) permitió determinar que existe una expresión significativamente menor del gen en el grupo de hembras inmunizado con la vacuna antimicrobiota con respecto grupo control ($p < 0,0001$), siguiendo la misma tendencia con el grupo control de machos ($p < 0,0001$). El grupo de machos inmunizado presentó un aumento significativo de la expresión comparado con su grupo control ($p < 0,0001$), el grupo control de hembras ($p < 0,0001$) y el grupo de hembras inmunizado ($p < 0,0001$). La diferencia entre ambos grupos control fue significativa, siendo mayor en machos ($p < 0,0001$).

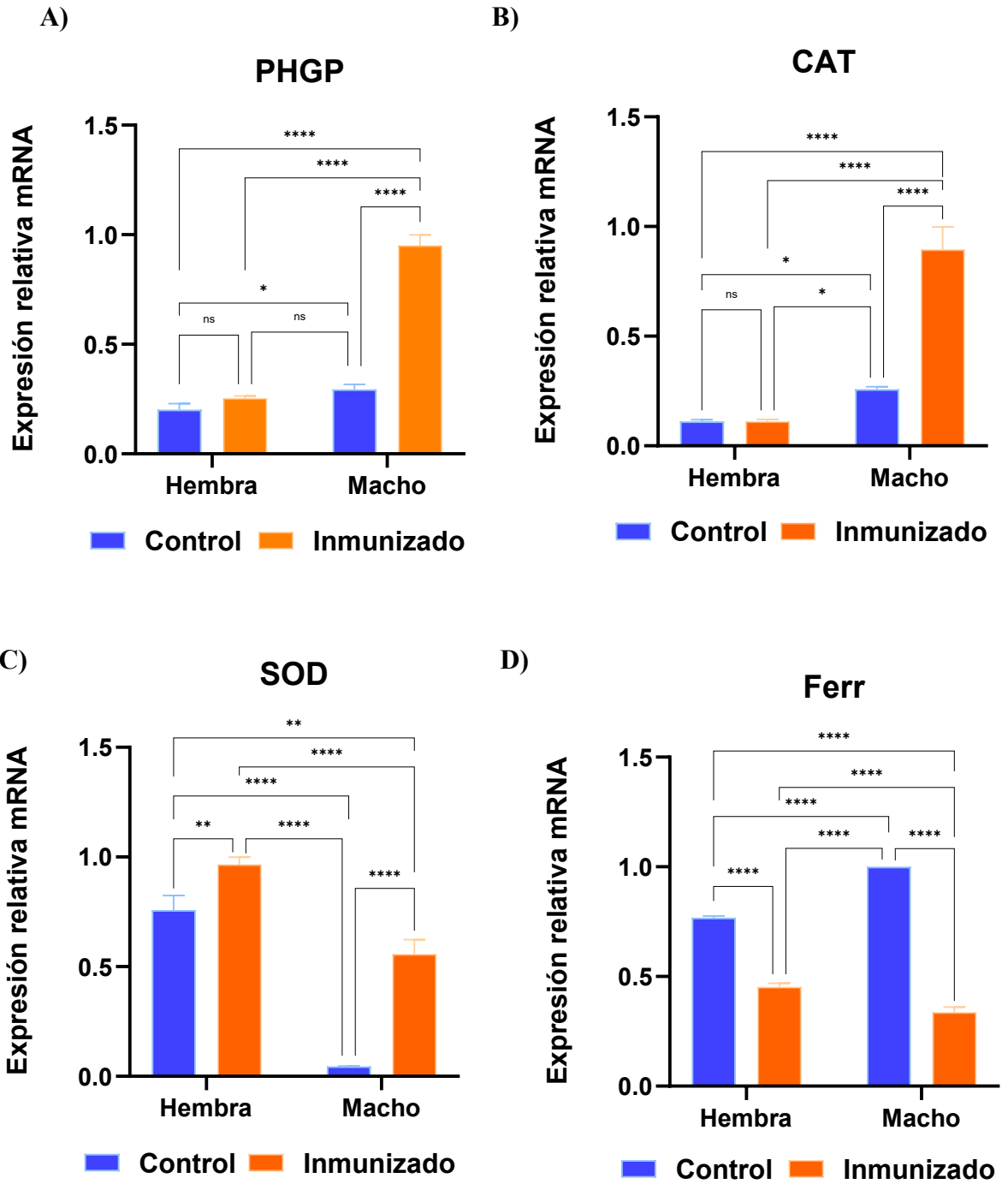


Figura 11: Niveles de expresión relativa de mRNA para fosfolípido-hidroperóxido glutatión peroxidasa (A), Catalasa (B), Superóxido dismutasa (C) y Ferritina (D) en grupos de *C. rogercresseyi* control e inmunizados con vacuna antimicrobiota. Las barras verticales representan la desviación estándar. (*) representa diferencias significativas ($p < 0,05$). (ns) representa $p > 0,05$.

Gracias al análisis PCA realizado a partir de los niveles de expresión relativa de los genes relacionados a estrés oxidativo y respuesta inmune (Fig. 12), se pudo determinar que el componente Dim1 explicó 43,6% de la variabilidad, mientras que Dim2 un 34,9%. El grupo de hembras control se posicionó en el cuadrante superior izquierdo de la gráfica, demostrando su relación con los genes AIP, SOD e IKKB. El grupo de hembras expuesto a la inmunización se posicionó en el cuadrante superior derecho, demostrando su relación con el gen Ferr. El grupo de machos control se posicionó en el sector inferior derecho de la gráfica, sin observarse relación con ninguno de los genes evaluados, mientras que el grupo de machos inmunizado se posicionó en el sector inferior izquierdo, dejando en evidencia una estrecha relación con los genes PHGP y CAT.

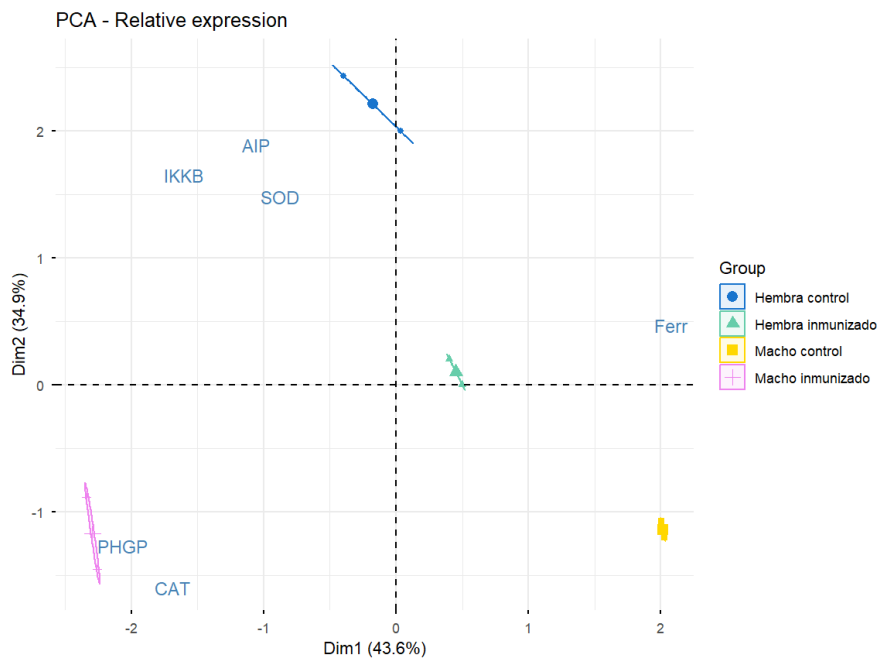


Figura 12: Análisis de componentes principales (PCA) para la expresión relativa de genes relacionados a respuesta inmune y estrés oxidativo en *C. rogercresseyi*.

6. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que el rol desempeñado por la microbiota en los seres vivos en general es sumamente esencial y e indispensable para la homeostasis, procesos metabólicos, nutricionales e inmunológicos (Merrifield & Rodiles, 2015). Para *C. rogercresseyi* y copépodos en general, se ha establecido que la microbiota presenta asociaciones estrechas con los organismos, teniendo influencia sobre procesos digestivos, absorción de nutrientes, reproducción y mecanismos de defensa (Moisander et al., 2015). También se ha descrito que la microbiota de este copépodo ectoparásito podría tener una influencia sobre su capacidad de infectar peces y la capacidad que tienen estos para contrarrestar la respuesta inmune por parte de los hospedadores, lo que está directamente relacionado con su eficacia en el proceso de parasitismo- (Gallardo-Escárate et al. 2019).

La creación de una vacuna antimicrobiota como herramienta de control poblacional para este parásito resulta como una alternativa innovadora diferente de los tratamientos utilizados comúnmente, diseñada para alterar la actividad de bacterias específicas que cumplen roles clave dentro de la microbiota y son responsables de distintos procesos fundamentales en la fisiología del organismo.

El presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar cambios de expresión génica asociados a reproducción y respuesta de *Caligus rogercresseyi* ante salmones inmunizados con vacuna antimicrobiota.

Por definición, el parasitismo es una interacción ecológica donde un organismo se beneficia a costas del otro, generando un efecto perjudicial en él. Ante la acción de un parásito, comúnmente el hospedador presenta cambios conductuales, alteraciones en procesos reproductivos y de respuesta inmune, por otro lado, el huésped acciona mecanismos de evasión hacia las respuestas inmunológicas del hospedador para parasitar de manera efectiva, como la secreción de distintas sustancias que modulan la respuesta inmune (Biron & Loxdale, 2013; Froeschke & Von Der Heyden, 2014; Kan et al., 2012).

De acuerdo con los antecedentes presentados y los resultados observados, se establece el respaldo hacia la hipótesis del trabajo la cual estipula *Caligus rogercresseyi* expuestos

salmones inmunizados con la vacuna antimicrobiota presentan cambios en la modulación de genes asociados a reproducción, secretoma y respuesta immune.

Reproducción

Al analizar los resultados obtenidos para las vitelogeninas (Vg1 y Vg2), los hallazgos señalan una respuesta similar a la vacuna por parte de los dos genes, viéndose expresados en mayor medida en hembras que en machos, y gracias al efecto de la vacuna antimicrobiota, se observa un aumento de la expresión en hembras y una disminución de ella en machos. Esto sugiere que la vacuna altera procesos reproductivos en ambos sexos, pero de manera diferente. En hembras, el aumento de la expresión relativa de las vitelogeninas por acción de la vacuna se puede deber a una respuesta compensatoria por parte del parásito al encontrarse en un ambiente hostil inmunológicamente, lo que induciría a los ejemplares hembras a una sobreexpresión de los genes para mantener la fecundidad y poder seguir reproduciéndose. Por otro lado, la menor expresión de los genes en machos control es esperable debido a la conocida función de estas proteínas como precursoras de vitelo, la reducción significativa de la expresión de estos genes en machos gracias al efecto de la vacuna puede deberse a las vitelogeninas pueden cumplir distintas funciones que no tienen que ver necesariamente con la reproducción, se ha demostrado que para artrópodos estos genes pueden tener funciones asociadas a respuestas a patógenos, coagulación y estrés oxidativo (Harwood & Amdam 2021; Salmela et al. 2016; Li et al. 2017). Por esto, la disminución de expresión observada en machos podría deberse a alteraciones en alguna de estas funciones secundarias, posiblemente asociadas a la condición inmunológica a la que los ejemplares de *Caligus* fueron expuestos.

Retinoid X receptor (RxR) y Ecdisone receptor (EcR) actúan como un complejo nuclear clave en la regulación del desarrollo del organismo, la muda y la maduración reproductiva (Subramoniam, 2011) por ello, los resultados arrojan patrones consistentes en ambos genes, siendo estos contrastantes entre sexos debido al efecto de la vacuna. En hembras, existen variaciones leves no significativas en la expresión de los genes, lo que sugiere que en hembras adultas existen una regulación endocrina más robusta o compleja, que se puede deber a la prioridad fisiológica de mantener la reproducción activa, manteniendo la

producción de ootecas incluso bajo condiciones adversas. En el caso de los machos, hubo un aumento significativo de la expresión relativa de ambos genes en los organismos que fueron expuestos a salmones inmunizados con la vacuna, lo que podría indicar sobreexpresión compensatoria frente al ambiente inmunológicamente adverso al cual fueron expuestos.

El gen gliceroporina se caracteriza por pertenecer a la familia de las acuaporinas, facilitando el transporte pasivo de glicerol, agua etc. Además, siendo responsable de procesos de osmorregulación, metabolismo energético y homeostasis (Finn, 2015). En estudios previos se ha demostrado que las gliceroporinas se expresan mayormente en machos (Farlora et al. 2016). Bajo ese contexto, los resultados de los análisis de expresión relativa arrojan resultados similares a los esperados; habiendo una expresión baja en las hembras control y una expresión similar en el grupo de hembras inmunizado. Los niveles estables y bajos de expresión sugieren que los procesos donde se ve involucrado este gen, como transporte de glicerol, regulación osmótica y metabólica, no se ven significativamente afectados por el ambiente inmunológicamente adverso a los que se vieron expuestos los individuos hembra de *C. rogersesseyi*. En el caso de los individuos machos, hubo un aumento significativo en la expresión del gen en los individuos expuestos a la vacuna antimicrobiota en comparación al grupo control. Las causas de este aumento significativo pueden deberse a una respuesta metabólica compensatoria relacionada a distintos procesos que pudo haber estado afectando la inmunización del hospedador, como una posible mayor demanda energética, realizar ajustes osmóticos, mayor movilización de sustratos para sostener el desarrollo del organismo o los procesos reproductivos, o simplemente mantener la homeostasis en el parásito ante la exposición a un ambiente desfavorable. El nivel de expresión en ambos sexos evidencia una mayor susceptibilidad por parte de los machos a presentar alteraciones gracias al efecto del microambiente en el hospedador, teniendo como respuesta un ajuste de las vías metabólicas donde la gliceroporina está involucrada.

VASA es un gen considerado un marcador de células germinales, teniendo influencia en la creación y mantenimiento de gametos y diferenciación de estos, lo que lo hace un indicador de actividad reproductiva (Extravour & Akam, 2003). En hembras adultas, el

análisis de la expresión de este gen determinó que su nivel disminuye significativamente luego de aplicado el tratamiento. esto puede explicarse por la prioridad que presentan las hembras por sostener la reproducción activa en todo momento, siendo parte importante la producción continua y el mantenimiento de gametos, lo que puede traducirse en una menor fecundidad producida por el estrés generado gracias a la vacuna. La disminución de la expresión en el grupo inmunizado indica la presencia de alguna perturbación germinal. En machos, la expresión en el grupo control es considerablemente menor a comparación del grupo control de hembras, disminuyendo significativamente en los organismos expuestos a la inmunización. Comparando los resultados de ambos sexos es posible determinar que el efecto de la vacuna antimicrobiota afecta a ambos sexos disminuyendo la expresión del gen y con ello el nivel de fecundidad, pero las hembras se muestran más resistentes al efecto de la inmunización.

Al ser Sex-lethal un gen maestro de la determinación sexual, las diferencias de expresión en machos y hembras siguen un patrón común, aumentando significativamente el nivel de expresión génica al ser los individuos expuestos a la vacuna antimicrobiota. En crustáceos, se ha demostrado que Sxl presenta expresión en ambos sexos y participan en el desarrollo gonadal regulación postranscripcional y gametogénesis, teniendo distintas funciones a las descritas para insectos modelo (Farhadi et al., 2021). Por otro lado, las vacunas antimicrobiota en artrópodos han demostrado modificar la composición microbiana, alterando la fisiología del organismo, respaldando la idea de que una perturbación en el microbioma del parásito puede afectar la modulación de genes como Sxl, en este caso aumentando su nivel de expresión (Mateos-Hoyos et al. 2021). En conjunto, se puede deducir que la sobreexpresión del gen puede estar asociada a un ajuste fisiológico generado a partir de un ambiente microbiano modificado gracias al efecto del tratamiento. Los resultados reflejan que los machos se ven más afectados por la vacuna antimicrobiota, teniendo que elevar en mayor medida la expresión génica para mantener las funciones del gen activas.

Doublesex se caracteriza por ser un gen terminal en la cascada de determinación sexual en artrópodos, presentando isoformas sexo específicas y teniendo influencia en diferenciación sexual y el desarrollo de características sexuales secundarias (Gempe & Beye, 2011). Bajo este contexto, las diferencias de expresión de dsx en machos y hembras fue independiente del sexo, aumentando significativamente la expresión en hembras luego de aplicarse el tratamiento, y disminuyendo significativamente en machos. El significativo aumento de la expresión de dsx en hembras después de la inmunización sugiere un refuerzo del programa de diferenciación sexual para mantener la actividad reproductiva y también mantener las características sexuales secundarias activas. Por otra parte, la disminución significativa de la expresión en machos deja en evidencia que el sexo masculino es más vulnerable a ambientes hostiles inmunológicamente, lo que podría traducirse en un impacto negativo en la diferenciación sexual y en el mantenimiento de características sexuales masculinas, lo que podría traducirse en una menor eficacia en la reproducción por parte de los machos.

Secretoma

Los resultados de los análisis demuestran un aumento significativo de la expresión génica de serpina 3 en machos expuestos a la inmunización con la vacuna microbiota, mientras que en hembras la expresión disminuyó significativamente. Serpina 3 es un gen inhibidor de las proteasas implicadas en el control de daño tisular, regulación de proteasas digestivas y secretadas, entre otros (Gallardo-Escárate et al., 2019). Por esto, un aumento significativo en la expresión en machos inmunizados sugiere que la vacuna genera aumento de los niveles de estrés fisiológico y un ambiente desfavorable para el parásito, donde los machos son los más susceptibles a ser afectados, incrementando así la expresión de los genes como un mecanismo compensatorio para mantener la integridad tisular o modular sus propias proteasas secretadas. Por otra parte, la disminución significativa de la expresión del gen en hembras inmunizadas da a inferir que el efecto de la vacuna interfiere con los requerimientos secretorios relacionados a su alimentación, lo que puede ser provocado por un mayor nivel de estrés en los organismos. La reducción de la

expresión génica puede reflejarse en un menor éxito en la alimentación por altos niveles de estrés o una disrupción en el ambiente microbiano del hospedador que afecta la funcionalidad del secretoma en hembras.

El gen tripsina 2 aumenta significativamente su expresión en ambos sexos, este gen junto a Catepsina B están relacionados con la digestión y degradación de los tejidos del hospedador, además del mantenimiento tisular del organismo (Gallardo-Escárate et al., 2019). El marcado aumento de Tripsina 2 sugiere que la vacuna antimicrobiota provoca cambios en la microbiota cutánea del hospedador, lo que termina por dificultar el proceso de alimentación del parásito, generando sobreexpresión del gen para realizar una alimentación eficaz y poder acceder a nutrientes. El aumento de la expresión del gen podría ser provocado por una respuesta compensatoria frente al ambiente desfavorable inmunológicamente en el hospedador generado por la vacuna.

Catepsina B no experimenta cambios significativos en la expresión en hembras, mientras que en machos la expresión aumenta significativamente en el grupo expuesto a la inmunización. El mantenimiento del nivel de expresión en hembras luego de la exposición a peces inmunizados sugiere que la actividad de esta proteasa lisosomal se mantiene estable a pesar de la exposición a la microbiota modificada del hospedador, dando a entender que las hembras al tener un metabolismo y demanda alimentaria mas más elevada que los machos gracias a su reproducción, pueden mantener un nivel estable de CatB para sostener procesos de digestión, degradación proteica y mantenimiento tisular incluso cuando son expuestas a ambientes desfavorables como es el caso de la microbiota del hospedador inmunizado. En el caso de los machos, el aumento significativo de la expresión del gen sugiere que existe una necesidad de activar rutas proteolíticas lisosomales gracias a la microbiota epitelial modificada del hospedador. El aumento de la expresión del gen podría reflejar una respuesta de adaptación para mejorar el proceso de digestión y degradación de nutrientes en respuesta al estrés fisiológico generado por el efecto de la vacuna antimicrobiota.

Respuesta inmune y estrés oxidativo

Los genes AIP e IKB presentan patrones de expresión similares en ambos sexos luego que los ejemplares de *C. rogercresseyi* fueran expuestos a peces inmunizados con la vacuna antimicrobiota, en hembras disminuyendo significativamente y en machos aumentando. El declive de ambos genes en hembras puede deberse a que la vacuna crea un ambiente desfavorable para el parásito, aumentando el estrés y haciendo que disminuya la eficacia de la función de los genes, provocando que los organismos hembra sean menos capaces de prevenir la apoptosis y viéndose reducida la capacidad de activar la vía NF- κ B, encargada de la inducción de síntesis de AMPs y modular la inflamación local (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárte, 2014), por ende una menor capacidad de respuesta frente a estrés. Dado que las hembras dependen del correcto funcionamiento de estos genes para mantener la homeostasis, actividad reproductiva y alimentaria (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárte, 2014), la disminución de ambos genes podría tener repercusiones biológicas importantes. En el caso de los machos, al verse sobreexpresados los genes luego de la inmunización, sugiere que estos activan respuestas adaptativas para resistir el estrés ambiental provocado por la microbiota alterada, donde se aumenta la expresión de los genes para mantener la integridad celular, procesos asociados a respuesta inmune, inflamación, entre otros.

Los cambios de expresión en los genes PHGP y Catalasa presentaron patrones similares en hembras y machos, donde no existen diferencias significativas en hembras una vez aplicada la inmunización, y un aumento significativo de la expresión de ambos genes en machos expuestos al tratamiento. El mantenimiento del nivel de expresión relativa en hembras puede deberse a su fisiología basal, que generalmente es más activa debido a procesos reproductivos y alimentarios, manteniendo elevados los niveles de defensa antioxidante, así contrarrestando el efecto de la vacuna. Por otro lado, el aumento de la expresión en machos da a entender que la vacuna antimicrobiota eleva los niveles de ROS. En consecuencia, se activa una respuesta antioxidante compensatoria para prevenir los daños provocados por los ROS, aumentando la expresión de ambos genes.

Los cambios de expresión relativa del Superóxido dismutasa fueron similares en machos y hembras, aumentando significativamente en ambos sexos luego de someter a los individuos a peces inmunizados. Superóxido dismutasa se encarga de convertir el superóxido en peróxido de hidrógeno, que posteriormente es detoxificado por catalasa o glutatión peroxidasa, disminuyendo los niveles de ROS. (Fanjul-Moles & Gonsebatt, 2011). Un aumento de la expresión del gen deja en evidencia el efecto que tiene la vacuna antimicrobiota sobre el parásito, creando un ambiente adverso y aumentando la producción de ROS en el organismo, quien, con el afán de contrarrestar los altos niveles de estas especies y sus efectos, aumenta la expresión del gen.

Tanto hembras como machos tuvieron cambios de expresión similares de Ferritina luego de ser expuestos a los efectos de la vacuna antimicrobiota, disminuyendo su expresión relativa. La ferritina se encarga de la homeostasis del hierro y la prevención de la formación de ROS debido a la reacción de Fenton gracias a la presencia de hierro libre (Theil, 2003; Endale et al., 2023). Esto deja en evidencia el efecto nocivo de la vacuna sobre el parásito, disminuyendo su capacidad de almacenar hierro de forma segura en las células y aumentando los niveles de hierro libre, lo que provocaría un aumento considerable de ROS en el organismo.

7. CONCLUSIONES

La hipótesis planteada en este proyecto se valida, lo que permite indicar que *Caligus rogercresseyi* expuestos salmones inmunizados con la vacuna antimicrobiota presentan cambios en la modulación de genes asociados a reproducción, secretoma y respuesta inmune.

- Los resultados de los análisis *in silico* realizados evidencian en general un mayor nivel de expresión de los genes evaluados en hembras, en comparación a machos y copepodito, destacando los genes vitelogenina, VASA y tripsina 2.
- Los niveles de expresión de los genes evaluados difieren entre sexos antes y después de la aplicación de la vacuna, reflejando una diferencia en sus mecanismos moleculares y en las respuestas ante el tratamiento.
- Las hembras presentan un mayor nivel de expresión relativa y un menor nivel de variación de los genes relacionados a reproducción, reflejando una prioridad por mantener los procesos reproductivos activos pese a encontrarse en un ambiente inmunológicamente adverso.
- Los machos fueron más afectados por el efecto de la vacuna antimicrobiota, viéndose en genes relacionados a secretoma, estrés oxidativo y respuesta inmune, sobreexpresiones en respuesta a altos niveles de estrés fisiológico y síntesis de ROS generados a partir del efecto de la vacuna antimicrobiota.
- Las hembras presentan mayor tolerancia a los efectos de la vacuna antimicrobiota, presentando menor nivel de variación en los genes evaluados a comparación de los machos luego de haberse aplicado el tratamiento.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Andrew, L., & Pillai, S. (2008). *Inmunología celular y molecular* (10ª ed., Vol. 6). Elsevier España.
- 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 in Parasitology*, 31(2), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>
- Arosio, P., Ingrassia, R., & Cavadini, P. (2009). Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790(7), 589–599. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.09.004>
- Arriagada, G. A., Stryhn, H., Campistó, J. L., Rees, E. E., Sanchez, J., Ibarra, R., Medina, M., & St-Hilaire, S. (2014). Evaluation of the performance of pyrethroids on different life stages of *Caligus rogercresseyi* in southern Chile. *Aquaculture*, 426–427, 231–237.
- Beutler, B., & Moresco, E. M. Y. (2008). Akirins versus infection. *Nature Immunology*, 9(1), 7–9.
- Biron, D. G., & Loxdale, H. D. (2013). Host-parasite molecular cross-talk during the manipulative process of a host by its parasite. *J Exp Biol*, 216(Pt 1), 148-160. <https://doi.org/10.1242/jeb.073825>
- Bowers, J., Mustafa, A., Speare, D. J., Conboy, G. A., Brimacombe, M., Sims, D. E., & Burka, J. F. (2000). The physiological response of Atlantic salmon, *Salmo*

salar L., to a single experimental challenge with sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*. *Journal of Fish Diseases*, 23, 165–172.

- Bravo, S. (2010). The reproductive output of sea lice *Caligus rogercresseyi* under controlled conditions. *Experimental Parasitology*, 125, 51–54.
- Bravo, S., Perroni, M., Torres, E., & Silva, M. (2006). Report of *Caligus rogercresseyi* in the anadromous brown trout (*Salmo trutta*) in the Río Gallegos Estuary, Argentina.
- Bravo, S., Pozo, V., & Silva, M. T. (2008). The tolerance of *Caligus rogercresseyi* to reduced salinity in southern Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 28(5), 198–206.
- Bravo, S., Treasurer, J. W., Sepúlveda, M., & Lagos, C. (2013). Effectiveness of hydrogen peroxide against the sea louse *Caligus rogercresseyi* in vitro and in vivo. *Aquaculture*, 388–391, 30–35.
- Burtis, K. C., & Baker, B. S. (1989). *Drosophila* doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell*, 56(6), 997–1010.
- Carvajal, J., González, L., & George-Nascimento, M. (1998). Native sea lice (Copepoda: Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile. *Aquaculture*, 166(3), 241–246. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00301-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00301-9)
- Chávez-Mardones, J., & Gallardo-Escárate, C. (2014). Deltamethrin (AlphaMax™) reveals modulation of genes related to oxidative stress in the

ectoparasite *Caligus rogercresseyi*: Implications on delousing drug effectiveness. *Aquaculture*, 433, 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.017>

- Davies, I., & Rodger, G. (2000). A review of the use of ivermectin as a treatment for sea lice infestation in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture Research*, 31, 869–883.
- Dresdner, J., Chávez, C., Quiroga, M., Jiménez, D., Artacho, P., & Tello, A. (2019). Impact of *Caligus* treatments on unit costs of heterogeneous salmon farms in Chile. *Aquaculture Economics & Management*, 23(1), 1–27. <https://doi.org/10.1080/13657305.2018.1449271>
- Extavour, C. G., & Akam, M. (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: Epigenesis and preformation. *Development*, 130(24), 5869–5884.
- Farias, D. (2005). Aspectos biológicos y conductuales del estadio infectante de *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo 2000 (Copepoda: Caligidae) [Tesis de Biología Marina]. Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Farhadi, A., Cui, W., Zheng, H., Li, S., Zhang, Y., Ikhwanuddin, M., & Ma, H. (2021). The regulatory mechanism of sexual development in decapod crustaceans. *Frontiers in Marine Science*, 8, 679687. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.679687>
- Farlora, R., Araya-Garay, J., & Gallardo-Escárate, C. (2014). Discovery of sex-related genes through high-throughput transcriptome sequencing from the salmon louse *Caligus rogercresseyi*. *Marine Genomics*, 15, 85–93.

- Farlora, R., Valdebenito-Aguayo, F., Valenzuela-Muñoz, V., & Gallardo-Escárate, C. (2017). Hydrogen peroxide treatment modulates the transcription of sex-related genes in the sea lice *Caligus rogercresseyi*. *Journal of Fish Diseases*, 40(12), 1823–1832. <https://doi.org/10.1111/jfd.12700>
- Farlora, R., Valenzuela-Muñoz, V., Chávez-Mardones, J., & Gallardo-Escárate, C. (2016). Aquaporin family genes exhibit developmentally-regulated and host-dependent transcription patterns in the sea louse *Caligus rogercresseyi*. *Gene*, 585(1), 119–127.
- Fanjul-Moles, M. L., & Gonsebatt, M. E. (2011). Oxidative Stress and Antioxidant Systems in Crustacean Life Cycles. In *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* (pp. 208-223). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781444345988.ch15>
- Fast, M. D. (2014). Fish immune responses to parasitic copepod (namely sea lice) infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 43(2), 300–312.
- Feest, P. (2015). Peces biocontroladores: Avances en el control biológico de *Caligus rogercresseyi*. *SalmonExpert*.
- Finn, R. N. (2015). Evolution and functional diversity of aquaporins. *Biological Reviews*, 90(4), 1080–1108.
- Froeschke, G., & von der Heyden, S. (2014). Chapter Four - A Review of Molecular Approaches for Investigating Patterns of Coevolution in Marine Host–Parasite Relationships. In D. Rollinson (Ed.), *Advances In Parasitology* (Vol. 84, pp. 209-252). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800099-1.00004-1>

- Gallardo-Escárate, C., Valenzuela-Muñoz, V., Núñez-Acuña, G., et al. (2019). Catching the complexity of salmon-lice interactions. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 199–209.
- Ganesan, S., Aggarwal, K., Paquette, N., & Silverman, N. (2010). NF-κB/Rel Proteins and the humoral immune responses of *Drosophila melanogaster*. In M. Karin (Ed.), *NF-κB in Health and Disease* (pp. 25–60). Springer.
- Gempe, T., & Beye, M. (2011). Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *BioEssays*, 33(1), 52–60.
- Gonçalves, A. T., Collipal-Matamal, R., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-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(1), 2895. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59747-0>
- González, L., & Carvajal, J. (2003). Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220, 101–117.
- González, M. (2006). Selectividad del copepodito de *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae) frente a diferentes hospederos [Tesis de grado]. Universidad Austral de Chile, Puerto Montt.
- Hannas, B. R., Wang, Y. H., Thomson, S., Kwon, G., Li, H., & Leblanc, G. A. (2015). Regulation and dysregulation of vitellogenin mRNA accumulation in daphnids (*Daphnia magna*). *Aquatic Toxicology*, 101(2), 351–357.
- Harwood G, Amdam G (2021). Vitellogenin in the honey bee midgut. *Apidologie* 52:837–847

- Johnson, S. C., Treasurer, J. W., Bravo, S., Nagasawa, K., & Kabata, Z. (2004). A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zoological Studies*, 43(2), 229–243.
- Kan, Y., Cengiz, E. I., Ugurlu, P., & Yanar, M. (2012). The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(2), 170-179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.03.009>
- Kiuchi, T., et al. (2014). A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature*, 509, 633–636.
- Kleino, A., & Silverman, N. (2013). The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Developmental and Comparative Immunology*, 42(1), 25–35.
- Langford, K. H., Reid, M., & Thomas, K. V. (2014). The occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products and endocrine-disrupting compounds in salmon aquaculture operations in Norway. *Science of the Total Environment*, 408(19), 5417–5424.
- Levicoy, C. (2013). Estudio histológico de las estructuras reproductivas de dos géneros de ectoparásitos caligidos de *Eleginops maclovinus* en el sur de Chile [Tesis de Biología Marina]. Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Li L, Li XJ, Wu YM, Yang L, Li W, Wang Q (2017) Vitellogenin regulates antimicrobial responses in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 69:6–14

- Li, F., & Xiang, J. (2013). Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(4), 973–980. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.023>
- Lu, X., Wang, C., & Liu, B. (2015). The role of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. *Fish & Shellfish Immunology*, 42(1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.027>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Mateos-Hernández, L., Obregón, D., Wu-Chuang, A., Maye, J., Borneres, J., Versillé, N., de la Fuente, J., Díaz-Sánchez, S., Bermúdez-Humarán, L. G., 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, 704621. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.704621>
- Maldonado-Aguayo, W., Chávez-Mardones, J., Gonçalves, A. T., & Gallardo-Escárate, C. (2015). Cathepsin gene family reveals transcriptome patterns related to the infective stages of the salmon louse *Caligus rogercresseyi*. *PLoS ONE*, 10(4), e0123954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123954>
- Maldonado-Aguayo, W., & Gallardo-Escárate, C. (2014). Increasing transcriptome response of serpins during the ontogenetic stages in the salmon louse *Caligus rogercresseyi* (Copepoda: Caligidae). *Marine Genomics*, 15, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2014.04.006>

- Mancilla-Schulz, J., Vivar, D., Santana, J., Peralta, A., Schulze, F., Espinoza, M., & González-Gómez, M. P. (2025). Effectiveness of freshwater on *Caligus rogercresseyi* juveniles. *Journal of Fish Diseases*, e70045. <https://doi.org/10.1111/jfd.70045>
- Merrifield, D. L., & Rodiles, A. (2015). 10 - The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In B. H. Beck & E. Peatman (Eds.), *Mucosal Health in 86 Aquaculture* (pp. 273-295). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00010-8>
- Moisander, P. H., Sexton, A. D., & Daley, M. C. (2015). Stable Associations Masked by Temporal Variability in the Marine Copepod Microbiome. *PLOS ONE*, 10(9), e0138967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138967>
- Montory, J. A., Cumillaf, J. P., Cubillos, V. M., Paschke, K., Urbina, M. A., & Gebauer, P. (2018). Early development of the ectoparasite *Caligus rogercresseyi* under combined salinity and temperature gradients. *Aquaculture*, 486, 68–74.
- Oelckers, K., Vike, S., Duesund, H., Gonzalez, J., Wadsworth, S., & Nylund, A. (2014). *Caligus rogercresseyi* as a potential vector for transmission of infectious salmon anaemia (ISA) virus in Chile. *Aquaculture*, 420–421, 126–132.
- Ong, S. T., Shan Ho, J. Z., Ho, B., & Ding, J. L. (2006). Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology*, 211(4), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.02.004>
- Osorio, V. (2007). Conducta de apareamiento y reproducción del ectoparásito *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo 2000 en *Eleginops maclovinus* [Tesis de Biología Marina]. Universidad de Los Lagos, Osorno.

- Pino-Marambio, J., Mordue, A. J., Birkett, M., Carvajal, J., Asencio, G., Mellado, A., & Quiroz, A. (2007). Behavioural studies of host, non-host and mate location by the sea louse *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, 271(1), 70–76.
- Ritchie, G., Mordue, A., Pike, A., & Rae, G. (1996). Observations on mating and reproductive behaviour of *Lepeophtheirus salmonis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 201, 285–298.
- Roberts, T. R., & Hutson, D. H. (1999). *Metabolic pathways of agrochemicals*. The Royal Society of Chemistry, UK.
- Roth, M., Richards, R. H., & Sommerville, C. (1993). Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: A review. *Journal of Fish Diseases*, 16(1), 1–26.
- Rozas, M., & Asencio, G. (2008). Evaluación de la situación epidemiológica de la caligiasis en Chile: Hacia una estrategia de control efectiva. *Salmo Cienc.*, 2, 43–59.
- Salmela H, Stark T, Stucki D, Fuchs S, Freitag D, Dey A, Kent CF, Zayed A, Dhaygude K, Hokkanen H (2016). Ancient duplications have led to functional divergence of vitellogenin-like genes potentially involved in inflammation and oxidative stress in honey bees. *Genome Biol Evol* 8:495–506
- Skilbrei, O. T., Finstad, B., Urdal, K., Bakke, G., Kroglund, F., & Strand, R. (2013). Impact of early salmon louse infestation and differences in survival and marine growth of sea-ranched Atlantic salmon. *Journal of Fish Diseases*, 36, 249–260.

- Stone, J., Sutherland, I. H., Sommerville, C., Richards, R. H., & Varma, K. J. (1999). The efficacy of emamectin benzoate as an oral treatment of sea lice. *Journal of Fish Diseases*, 22, 261–270.
- Stone, J., Sutherland, I. H., Sommerville, C., Richards, R. H., & Varma, K. J. (2000). Field trials to evaluate the efficacy of emamectin benzoate in the control of sea lice. *Aquaculture*, 186, 205–219.
- Tanji, T., & Ip, Y. T. (2005). Regulators of the Toll and Imd pathways in the *Drosophila* innate immune response. *Trends in Immunology*, 26(4), 183–188.
- Tauszig, S., Jourdane, E., Hoffmann, J. A., & Imler, J. L. (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13), 7362–7367.
- Todd, C. D., Stevenson, R. J., Reinardy, H., & Ritchie, M. G. (2005). Polyandry in the ectoparasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis*. *Marine Ecology Progress Series*, 303, 225–234.
- Valenzuela-Miranda, D., Gonçalves, A. T., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, 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*. *Scientific Reports*, 12(1), 7530.
- Valenzuela-Muñoz, V., & Gallardo-Escárate, C. (2014). TLR and IMD signaling pathways from *Caligus rogercresseyi* (Crustacea: Copepoda): In silico gene expression and SNPs discovery. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(2), 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.019>

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vera, F. B. (2015). Diferencias en la modulación transcriptómica de *Caligus rogercresseyi* durante la infección en *Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch* [Tesis de grado]. Universidad de Concepción.
- Vera-Bizama, F., et al. (2015). Proteomic analysis of *Caligus rogercresseyi* secretome during infestation stages.
- Wehner, O. (2012). Caligidosis en Chile. *Aqua*, 161, 16–19.
- Wu-Chuang, A., Mateos-Hernandez, L., Maitre, A., Rego, R. O. M., Šíma, R., Porcelli, S., Rakotobe, S., et al. (2023). Microbiota perturbation by anti-microbiota vaccine reduces the colonization of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus*. *Microbiome*, 11(1), 151.
- Zientz, E., Dandekar, T., & Gross, R. (2004). Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 745–770.