



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

**EVALUACIÓN DE VACUNAS ANTIMICROBIOTA ORAL E INMERSIÓN
CONTRA *CALIGUS ROGERCRESSEYI* EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO**

CRISTOFER ESTEBAN AZÓCAR MUÑOZ

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

CONCEPCIÓN, CHILE 2025

EVALUACIÓN DE VACUNA ANTIMICROBIOTA ORAL E INMERSIÓN CONTRA *CALIGUS ROGERCRESSEYI* EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO

Por

CRISTOFER ESTEBAN AZÓCAR MUÑOZ

Profesor Guía

Dr. CRISTIAN GALLARDO ESCÁRATE

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

CONCEPCIÓN, CHILE 2025

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

Este Seminario de Título ha sido realizado en la Unidad de Biotecnología Marina, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor Guía: Dr. Cristian Gallardo Escárte
Departamento de Oceanografía
crisgallardo@udec.cl
Universidad de Concepción, Concepción

Cotutora:

Comisión Evaluadora: Dra. Valentina Valenzuela (valevalenzuela@gmail.com)
Dra. Yeny Leal Acosta (yleal@udec.cl)
Dr. Fernando Cruzat Cruzat (fecruzat@udec.cl)

Coordinador Seminario de Título: Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía
fecruzat@udec.cl
Universidad de Concepción, Concepción

DEDICATORIA

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincera gratitud al Dr. Cristian Gallardo, mi profesor guía, por su invaluable apoyo en la elaboración de este seminario de título. Su orientación constante en cada etapa del proyecto fue fundamental para alcanzar los objetivos planteados. Asimismo, agradezco profundamente las herramientas, capacitaciones y conocimientos que me brindó, los cuales no solo fueron esenciales para el desarrollo de esta tesis, sino también para mi crecimiento profesional. Su dedicación y compromiso han sido una fuente constante de inspiración a lo largo de este proceso. Del mismo modo agradecer a Yeny por toda su alegría, recomendaciones y ayuda brindada para lograr el éxito de este seminario de título.

También extiendo mi agradecimiento al Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola (LBGA), INCAR, en la Estación de Biología Marina de la Universidad de Concepción, Dichato, Chile. En especial, agradezco a Álvaro Gallardo por su valiosa ayuda en la parte experimental de mi seminario de título, además de la motivación que me entregaba y las enriquecedoras conversaciones que compartimos, las cuales sin duda siempre recordaré. Un sincero agradecimiento al equipo de trabajo de Dichato: Lucía, Rosita y Don Hugo, tres grandes personas que hicieron mi estadía muy llevadera durante todo el proceso experimental. Sus consejos personales, historias, chistes y soluciones a problemas eléctricos quedarán grabados en mi memoria.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis compañeros de universidad y amigos, quienes me acompañaron en este camino con su apoyo incondicional, compañía y palabras de aliento en los momentos más desafiantes. Su amistad y confianza fueron fundamentales para llegar hasta aquí. También quiero recordar con gratitud a aquellas personas que, aunque ya no estén, dejaron una huella imborrable en mi vida y en este proceso, brindándome enseñanzas y motivación que siempre llevaré conmigo.

Finalmente, un especial saludo a todos los integrantes del laboratorio LBGA: Tony, Camila, Claudia, Coni, Marcelo, Milton, Diego, Cris y Valentina. Muchas gracias por sus consejos y por ser parte de esta experiencia. A todos, mi más profundo agradecimiento por su apoyo, compañía y enseñanzas a lo largo de este camino.

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
INDICE DE CONTENIDOS	6
INDICE FIGURAS.....	8
INDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Salmonicultura en Chile.....	12
1.2 Principales enfermedades en la salmonicultura en Chile.....	12
1.3 <i>Caligus rogercresseyi</i> : Estadios de desarrollo y tratamientos	13
1.4 Interacción parásito-hospedero.....	15
1.5 Mecanismos inmunológicos del sistema inmune en salmón del Atlántico frente a patógenos	16
1.6 Vacunas antimicrobiota	19
1.7 Adyuvantes como potenciadores de la respuesta inmune	21
2. HIPÓTESIS.....	23
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 <i>Objetivo específico 1: Evaluar la eficacia contra Caligus rogercresseyi de las formulaciones de vacuna antimicrobiota administradas por vía oral e inmersión en salmónes del Atlántico.</i>	24
4.1.1 Formulación vacuna oral antimicrobiota	24
4.1.2 Formulación de vacuna antimicrobiota por inmersión	24
4.1.3 Formulación de vacuna antimicrobiota por inmersión con adyuvante.	24
4.1.4 Diseño experimental	25
4.2 <i>Objetivo específico 2: Evaluar respuesta inmune en piel y riñón anterior de salmón del atlántico expuestos a vacuna oral e inmersión durante infección con C. rogercresseyi.</i>	27
4.2.1 Extracción de RNA y Síntesis de cDNA.....	27

4.2.2	Partidores utilizados	27
4.2.3	Análisis de expresión de genes utilizando RT-qPCR.....	28
4.2.4	Análisis de datos.....	28
4.3	Objetivo específico 3: Determinar la modulación de genes de estrés oxidativo en <i>C. rogercresseyi</i> colectados de peces inmunizados con vacuna oral e inmersión.	29
4.3.1	Extracción de RNA y Síntesis de cDNA.....	29
4.3.2	Partidores utilizados para análisis de <i>C. rogercresseyi</i>	29
4.3.3	Análisis de expresión de genes utilizando RT-qPCR.....	29
4.3.4	Análisis de datos.....	29
<u>5.</u>	RESULTADOS	30
5.1.	<i>Eficacia de vacuna oral e inmersión durante infección experimental con <i>C. rogercresseyi</i> en salmón del Atlántico</i>	<i>30</i>
5.2	Eficacia de vacunación por inmersión, utilizando adyuvante Montanide 1312 VG.....	31
5.3	Evaluación de genes de respuesta inmune en <i>S. salar</i> inmunizados con vacuna antimicrobiota oral e infectados con <i>C. rogercresseyi</i>	31
5.4	Evaluación de genes de respuesta inmune y estrés oxidativo en <i>C. rogercresseyi</i> extraídos de <i>S. salar</i> inmunizados con vacuna antimicrobiota oral e inmersión.	41
<u>6.</u>	DISCUSIÓN	44
<u>7.</u>	CONCLUSIONES.....	55
<u>8.</u>	BIBLIOGRAFÍA.....	56
<u>9.</u>	ANEXO	74
	Anexo 1	74
	Anexo 2	75
	Anexo 3	76
	Anexo 4.....	77
	Anexo 5.....	78

INDICE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida <i>C. rogercresseyi</i>	13
Figura 2: Fotografía de los estanques experimentales	31
Figura 3: Diseño experimental.....	32
Figura 4: Conteo final <i>C. rogercresseyi</i> por grupo y sexo.....	38
Figura 5: Intervalo de confianza (Dunnett) de conteo de <i>C. rogercresseyi</i>	39
Figura 6: Niveles de expresión de mRNA (<i>S. salar</i>) riñón anterior S. inmune	42
Figura 7: Niveles de expresión de mRNA (<i>S. salar</i>) riñón anterior R. oxidativa	45
Figura 8: Análisis de componentes principales (<i>S. salar</i>) riñón anterior	46
Figura 9: Niveles de expresión de mRNA (<i>S. salar</i>) piel S. inmune	49
Figura 10: Niveles de expresión de mRNA (<i>S. salar</i>) piel R. oxidativa	52
Figura 11: Análisis de componentes principales (<i>S. salar</i>) piel.....	53
Figura 12: Niveles de expresión de mRNA (<i>C. rogercresseyi</i>).....	55
Figura 13: Análisis de componentes principales (<i>C. rogercresseyi</i>).....	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Partidores utilizados para <i>S. salar</i>.....	34
Tabla 2: Partidores utilizados para <i>C. rogercresseyi</i>.....	36

RESUMEN

La salmonicultura es una de las principales industrias acuícolas en Chile, que se enfrenta a desafíos significativos debido a enfermedades parasitarias como la caligidosis, causada por *Caligus rogercresseyi*. Este parásito genera grandes pérdidas económicas y compromete el bienestar de los peces, donde se han propuesto varios tratamientos inyectables para intentar disminuir la acción de este parásito. Aunque estos métodos continúan utilizándose, se han desarrollado alternativas menos invasivas, como vacunas orales y por inmersión. En este contexto, el presente seminario ha evaluado el uso de una vacuna antimicrobiota administrada por vía oral e inmersión en *Salmo salar* como una estrategia innovadora para el control de *C. rogercresseyi*. Para el presente estudio, se diseñaron tratamientos orales con distintas concentraciones bacterianas (1% y 2%), utilizando el adyuvante comercial Montanide GR01 para vacunación oral, además de un tratamiento por inmersión utilizando adyuvante Montanide 1312 VG. Los resultados muestran que el grupo GR1% fue asociado con una eficacia superior en la reducción de la carga parasitaria en *Caligus* hembras y machos, alcanzando una reducción del 59,3% en hembras y del 34,2% en machos. Por otro lado, la concentración del 2 % (GR2%) mostró una eficacia menor, lo que podría estar relacionado con efectos adversos en el equilibrio microbiano del hospedador. Además, se analizaron respuestas inmunológicas y de estrés oxidativo en salmones del Atlántico y en *C. rogercresseyi* expuestos a los diferentes tratamientos, observándose aumentos significativos en la expresión de genes clave asociados a la inmunidad innata y adaptativa, así como al metabolismo del hierro en el riñón anterior y la piel. El tratamiento por inmersión indujo una alta expresión de genes asociados al estrés oxidativo (SOD, Catalasa) y Ferritina en la piel de salmón del Atlántico. Por otra parte, los tratamientos orales GR1 y GR2 demostraron una actividad significativamente mayor en genes asociados al sistema inmune, estrés oxidativo y modulación de hierro. Además, el grupo GR1 fue el único grupo que logró una inmunosupresión notable en genes de *C. rogercresseyi* asociados a la respuesta inmune y capacidad de respuesta oxidativa. Estos resultados sugieren que las vacunas orales y por inmersión contra el microbiota tienen el potencial de ser una herramienta eficaz para mitigar el *C. rogercresseyi* en la salmonicultura. No obstante, es necesario realizar estudios adicionales en condiciones de cultivo más representativas para validar su eficacia y seguridad.

ABSTRACT

Salmon farming is one of the main aquaculture industries in Chile. It faces significant challenges due to parasitic diseases such as caligidosis, caused by *Caligus rogercresseyi*. This parasite generates considerable economic losses and compromises fish welfare. Several injectable treatments have been proposed to mitigate the effects of this parasite. Although these methods are still in use, less invasive alternatives have been developed, such as oral and immersion vaccines. In this context, the present seminar evaluated the efficacy of an oral anti-microbiota vaccine and by immersion in *Salmo salar* as an innovative strategy for controlling *C. rogercresseyi*. For this study, oral treatments were designed using different bacterial concentrations (1% and 2%), employing the commercial adjuvant Montanide GR01 for oral vaccination, along with an immersion treatment using the Montanide 1312 VG adjuvant. The results show that the GR1% group was associated with superior efficacy in reducing the parasite load in both female and male *Caligus*, achieving a 59.3% reduction in females and a 34.2% reduction in males. Conversely, the 2% concentration (GR2%) showed lower efficacy, possibly related to adverse effects on the host's microbial balance. Additionally, immune and oxidative stress responses were analyzed in Atlantic salmon and *C. rogercresseyi* exposed to the different treatments, revealing significant increases in the expression of key genes associated with innate and adaptive immunity, as well as iron metabolism in the anterior kidney and skin. The immersion treatment induced a high expression of genes related to oxidative stress (SOD, Catalase) and Ferritin in the skin of Atlantic salmon. On the other hand, the GR1 and GR2 oral treatments demonstrated significantly higher activity in genes associated with the immune system, oxidative stress, and iron modulation. Moreover, the GR1 group was the only one to achieve notable immunosuppression in *C. rogercresseyi* genes linked to immune response and oxidative response capacity. These results suggest that oral and immersion vaccines targeting the microbiota have the potential to be effective tools for mitigating *C. rogercresseyi* in salmon farming. However, additional studies under more representative farming conditions are necessary to validate their efficacy and safety.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Salmonicultura en Chile

La historia de la salmonicultura en Chile se remonta a 1885, cuando se realizaron los primeros intentos de aclimatación de especies salmónidas. Sin embargo, el desarrollo significativo no fue hasta el año 1975 cuando comenzó el proyecto *Japan-Chile Salmon Project*, que buscó repoblar y enriquecer los ríos de la región de Aysén (Carrera, 2020). Desde entonces, la industria salmonera ha experimentado un crecimiento exponencial, consolidándose con centros de cultivo alcanzando, para el año 2022, alcanzaron una producción de aproximadamente 487.460 toneladas, posicionando a Chile como el segundo exportador mundial de salmónidos (FAO, 2022).

En el contexto global es necesario mencionar que se alcanzó un hito histórico en 2022 al superar la producción de pesca extractiva total, y se proyecta que estas cifras continúen en aumento. En este contexto, el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) destaca como el principal recurso de exportación acuícola en Chile, con un valor FOB (Free on Board) superior a 1.200 millones de USD, lo que triplica la producción de salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) en el mismo año (Subpesca, 2022).

Este crecimiento sostenido ha consolidado a la salmonicultura como una industria clave para la economía chilena, no solo por su aporte al comercio exterior, sino también por la generación de empleo directo e indirecto, específicamente en regiones donde las oportunidades económicas son limitadas (FAO, 2022).

1.2 Principales enfermedades en la salmonicultura en Chile

Aunque la salmonicultura ofrece grandes beneficios a los países productores, también enfrenta numerosos desafíos, y el cultivo del salmón del Atlántico, no es una excepción. Actualmente, el principal obstáculo para la salmonicultura son las enfermedades patógenas (Subasinghe, 2005). Entre las enfermedades que más afectan en esta área, se encuentran, por ejemplo, necrosis pancreática infecciosa (IPN), causada por el virus IPNV (Godoy et al., 2022); la anemia infecciosa del salmón (ISA), provocada por el virus ISAV (Snow et al., 2006); la saprolegniosis, causada por el hongo *Saprolegnia* sp (Torto-Alalibo et al., 2005); la furunculosis, una enfermedad bacteriana ocasionada por *Aeromonas salmonicida* (Godoy et al., 2024); la enfermedad bacteriana del riñón (BKD), causada por *Renibacterium salmoninarum* (Grandón et al., 2021); y la tenacibaculosis, producida por la bacteria *Tenacibaculum maritimum* (Apablaza et al., 2017). Una de las más relevantes es el síndrome rickettsial del salmón (SRS), causado por la bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis* (McCarthy et al., 2008), que encabeza el ranking de causas de mortalidad, además de ser la enfermedad más prevalente durante 2021-2022 (Subpesca, 2022).

Al igual que las enfermedades virales y bacterianas, la caligidosis es una de las principales preocupaciones para el cultivo de salmónidos debido a su impacto significativo en la salud de los peces. En el hemisferio norte, esta enfermedad es provocada principalmente por *Lepeophtheirus salmonis*, mientras que en el hemisferio sur el agente responsable es *Caligus rogercresseyi*, conocido comúnmente como “piojo de mar”, perteneciente a la familia Caligidae (Hamilton-West et al., 2012). Esta patología afecta

especialmente al salmón del Atlántico, la especie más susceptible al parasitismo dentro de los productos acuícolas chilenos (González et al., 2000). Caligus fue registrado por primera vez en Chile en 1981, adherido a la superficie corporal de los peces en balsas-jaulas en la zona de Puerto Montt (Reyes & Bravo, 1983). Igualmente, es necesario mencionar que la infección de *C. rogercresseyi*, puede funcionar como vector de transmisión del virus ISA y tiene la capacidad de infectar a salmones sanos (Oelckers et al., 2017). Al mismo tiempo existen antecedentes que respaldan que *C. rogercresseyi*, como patógeno secundario en la especie *S. salar*, reduce la resistencia a *P. salmonis* (Yáñez et al., 2014) siendo esta última enfermedad una de las principales causas de mortalidad. Además, el piojo de mar afecta a todos los países productores de salmón (Oelckers et al., 2017), y se estima su presencia en el 99% de las balsas jaulas en Chile (Pino- Marambio et al., 2007), también se estima el impacto atribuido a *C. rogercresseyi*, asociado a los costos unitarios en promedio \$1.4 US/Kg de salmón producido (Dresdner et al., 2019). Las altas densidades de cultivos presentes en granjas acuícolas aumentan la competencia por el alimento y el espacio (Ogamba & Abowei, 2012), además del contagio de plagas parasitarias como es el caso de *C. rogercresseyi*. Por su parte, las altas densidades del cultivo es un factor promotor de estrés, en consecuencia, podría aumentar la susceptibilidad del huésped a una infección. En Chile las densidades máximas de cultivo para la especie *S. salar* eran igual a 31kg/m³ en el año 2007, seguidamente 17 kg/m³ en el año 2009 y hasta la fecha está fijado en 15 kg/m³ (Sernapesca, 2019).

1.3 *Caligus rogercresseyi*: Estadios de desarrollo y tratamientos

C. rogercresseyi posee 8 estadios de desarrollo, compuestos por tres estados planctónicos (dos estadios de nauplio y un copepodito) y cinco parasíticos (cuatro estadios de chalimus y uno adulto) (Bravo, 2010). En el estadio de copepodito se enfoca en la búsqueda de un hospedador definitivo. Para lograrlo el copepodito tiene una fuente limitada de energía, por lo cual se sugiere que el proceso infectivo no es aleatorio y existe una preferencia en la búsqueda de un hospedador (Steen Dobloug et al., 2023). Una vez asentado, el ectoparásito se alimenta de manera exógena gracias al mucus, piel y sangre del hospedador (González et al., 2000).

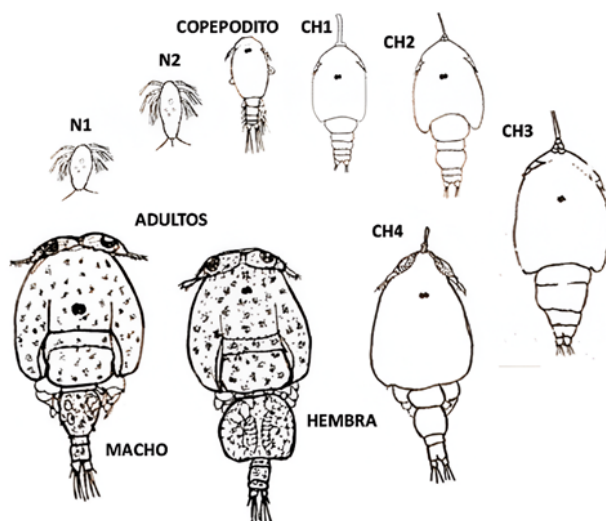


Figura 1: Ciclo de vida de *C. rogercresseyi* (González & Carvajal, 2003).

El origen del Caligus en Chile es desconocido, sin embargo, se sugiere que fue transmitido desde el róbalo (*Eleginops maclovinus*), el pejerrey marino (*Odonthestes regia*) o pejerrey de mar (*Odonthestes nigricans*), ya que estas especies presentan Caligus en forma natural (Bravo et al., 2006; Carvajal et al., 1998). El salmón del Atlántico y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) son las especies salmónidas más susceptibles a *C. rogercresseyi*. En las mismas circunstancias, el salmón Coho (*O. kisutch*) muestra mayor resistencia, manteniendo las mismas condiciones de cultivo, siendo parasitado solo por estadios juveniles que no alcanzan el estado adulto (Pino-Marambio et al., 2007). *C. rogercresseyi* presenta una membrana adoral que rodea el cefalotórax la cual les permite mantenerse firmemente adheridos a la superficie corporal del pez, protegiéndolos de las condiciones ambientales adversas (Bravo et al., 2015). Además, el Caligus adulto tiene una morfología que permite una correcta hidrodinámica ya que su cuerpo está diseñado para que el flujo del agua lo presione contra la superficie del pez hospedero (Costello, 2006).

En el año 2007 el tratamiento autorizado por la autoridad sanitaria en Chile para tratar *C. rogercresseyi* era el insecticida y acaricida benzoato de emamectina ($C_{49}H_{75}NO_{13}$), el cual era administrado de forma oral mezclado con el alimento (Hamilton-West et al., 2012). El mecanismo de acción consistía en unirse a los canales de cloro regulados por glutamato, incrementando la permeabilidad al ion cloruro en la sinapsis inhibitorias de los invertebrados, lo que provocaba parálisis flácida y la muerte (Stone et al., 1999). En este mismo año se aprobó el uso de peróxido de hidrógeno en casos de alta carga parasitaria (Hamilton-West et al., 2012). El peróxido tiene efecto en la síntesis de quitina, en consecuencia, es efectiva para detener el desarrollo de estadios parasitarios y disminución en la eclosión de huevos (McAndrew et al., 1998). En el año 2011 un grupo de investigadores logró aislar un gen denominado my32 y sugirió que la proteína my32 puede ser un objetivo prometedor para el desarrollo de vacunas para controlar las infestaciones de piojos de mar en los peces, ya que, en condiciones experimentales, logró disminuir la carga parasitaria (Carpio et al., 2011). De la misma manera, en el año 2016 se realizó un estudio en el cual se identificó todos los genes asociados a la infestación por Caligus, marcando un hito para la información que se manejaba y dando paso a nuevas investigaciones para el desarrollo de vacunas (Valenzuela-Muñoz et al., 2016). Es a partir de este momento donde se identificó la alta dependencia del Caligus al hierro. Gracias a estas nuevas investigaciones, en el año 2021, fue desarrollado un candidato vacunal denominado IPATH[®], basado en una proteína recombinante que actúa como quelante de hierro, aislando el hierro del parásito, alterando el desarrollo parasítico y disminuyendo la carga parasitaria (Valenzuela-Muñoz, Benavente, Casuso, Leal, Valenzuela-Miranda, et al., 2021). Actualmente IPATH[®], se encuentra en fase experimental, sin embargo, es necesario realizar pruebas de campo para evaluar si los resultados son similares a los observados en condiciones controladas de laboratorio. No obstante, el uso de vacunas por inyección se considera una limitante debido a la dificultad física de vacunar peces pequeños (<20g) o grandes volúmenes de peces (Plant & LaPatra, 2011). Adicionalmente, las vacunas por inyección están asociadas a una manipulación intensiva y estrés (Embregts & Forlenza, 2016). Por tanto, se hace necesaria la búsqueda de nuevos métodos de formulación más innovadores, como vacunas por inmersión o vacunas orales que faciliten su aplicación en campo, combinando otras estrategias para el control de la caligidosis.

1.4 Interacción parásito-hospedero

La interacción entre el parásito *C. rogercresseyi* y su hospedero, el salmón del Atlántico, se caracteriza por una serie de complejos mecanismos moleculares que permiten al parásito evadir la respuesta inmune del pez y garantizar el éxito de la infestación, sin dejar de lado que también depende de múltiples factores, como la edad y competencia inmunológica del huésped, así como cambios ambientales (Khan, 2012). Los hospedadores y los parásitos han desarrollado interacciones moleculares complejas y dinámicas, que suelen avanzar de manera secuencial. Ambos participantes están inmersos en una constante “carrera armamentista”, donde los parásitos buscan adaptarse para maximizar su capacidad de aprovechar al hospedador, mientras que este último evoluciona mecanismos para reducir al mínimo el impacto negativo de la infección parasitaria (Biron & Loxdale, 2013).

La interacción parásito-hospedero en *C. rogercresseyi* ha sido intensamente estudiada mediante herramientas de biología molecular, revelando mecanismos que permiten a este ectoparásito, evadir las respuestas inmunes del hospedero (Gallardo-Escárte et al., 2019). Por ejemplo, en *L. salmonis* se ha descrito, que la mucosidad de *S. salar* contiene compuestos químicos, denominados kairomonas, como el péptido cathelicidina CATH-2 (Núñez-Acuña et al., 2016), isoforona y sulcatona (Bailey et al., 2006). Estos compuestos son moléculas atractantes de los piojos de mar, y son detectadas mediante sus antenas, que actúan como estructuras sensoriales (Pike & Wadsworth, 1999) en las cuales se encuentran ionotrópicos (Núñez-Acuña et al., 2019) y vías sinápticas (Núñez-Acuña et al., 2016).

Por otra parte, cuando el piojo de mar logra fijarse al hospedador, inicia la secreción de diversas enzimas proteolíticas (SEPs) como lo son prostaglandina E₂ (Fast et al., 2004), también una enzima similar a tripsina (Firth et al., 2000) y la catepsina L (McCarthy et al., 2012). Estas enzimas desempeñan un papel clave en la degradación de los tejidos del hospedador (Willadsen, 2006) y en la alimentación (Lewis et al., 2014). Este proceso provoca en el hospedador, daño tisular, respuesta oxidativa (Toh et al., 2010) y desencadena una respuesta inmunológica (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárte, 2014). Al detectar la presencia del parásito, el hospedador activa varias vías de señalización inmunológicas. Estas incluyen la activación de receptores tipo Toll (TLRs), como el TLR13 (Quiniou et al., 2013), TLR19, TLR21, TLR22a2. La activación de estos TLRs también desencadena vías de señalización dependientes como Myd88 e IRAK1, lo que lleva a la producción de citoquinas inflamatorias (Rauta et al., 2014). En el caso de *C. rogercresseyi*, se activa la liberación de citoquinas proinflamatorias Th1, como interleucina-1 (IL-1), interleucina-8 (IL-8), interleucina-13 (IL-13) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Valenzuela-Muñoz et al., 2016). Por otro lado en *L. salmonis*, se observa la activación de citoquinas Th2, como IL-4, IL-10, IL-13 (Skugor et al., 2008) y TNF- β (Braden et al., 2015). La inflamación resultante promueve la biosíntesis de hemo y la actividad de enzimas como la hemo oxigenasa (HO) (Sutherland et al., 2014), generando biliverdina, monóxido de carbono y hierro libre. Además, la acción de la reductasa de biliverdina (BLVr), convirtiendo biliverdina en bilirrubina (Valenzuela-Muñoz et al., 2017).

Durante este proceso, el parásito enfrenta múltiples mecanismos de rechazo del hospedador, incluidas las respuestas inflamatorias iniciales que generan una fuerte modulación de genes relacionados con la inmunidad innata y las vías de señalización TLR e IMD (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárte, 2014). Estas rutas son críticas para la defensa del pez, pero también representan objetivos clave que el parásito utiliza para establecer la infección.

En este contexto, estudios recientes han demostrado que *L. salmonis*, modula la respuesta inmune del hospedador a través de efectos directos sobre los macrófagos, células clave en la inmunidad innata. Se ha evidenciado que las secreciones de *L. salmonis* afectan la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en macrófagos de diferentes especies de salmón. Por ejemplo, los macrófagos del salmón rosado muestran una mayor producción de ROS, pero un índice fagocítico reducido, mientras que en el salmón chum y del Atlántico ocurre lo contrario: un aumento en la fagocitosis, pero con producción mínima de ROS (Sutherland et al., 2014). Esto sugiere que *L. salmonis* puede inducir una activación alternativa de los macrófagos, lo que potencialmente altera su capacidad antimicrobiana y favorece la infección secundaria. Además, en el salmón rosado, la capacidad de montar una respuesta inflamatoria efectiva contra el parásito podría ser un factor determinante en su menor susceptibilidad, en comparación con el salmón del Atlántico y el salmón chum, donde la inflamación parece retrasarse o ser menos efectiva (Sutherland et al., 2011).

1.5 Mecanismos inmunológicos del sistema inmune en salmón del Atlántico frente a patógenos

El sistema inmune de los peces teleósteos, como *S. salar*, presenta características similares a las de otros vertebrados, con componentes innatos y adaptativos. Los estudios sobre la respuesta inmune en peces han priorizado mecanismos innatos, como las reacciones inflamatorias y celulares, las actividades fagocíticas, el complemento y otros factores humorales, principalmente la lisozima y las moléculas involucradas en la respuesta de fase aguda (APR, por sus siglas en inglés) (Alvarez-Pellitero, 2008). Estos mecanismos innatos han demostrado estar implicadas en la respuesta inmune frente a infecciones parasitarias. Por otro lado, en la inmunidad adaptativa, gran parte de la información disponible se centra en la producción de anticuerpos específicos, aunque los títulos de anticuerpos no siempre se correlacionan directamente con la protección (Gowda & Wu, 2018). Además, los estudios de expresión génica han permitido confirmar la participación de mecanismos innatos, principalmente los relacionados con la inflamación y algunas vías oxidativas, los cuales varían según la fase de infección y el órgano afectado. En particular, se ha confirmado la relevancia de la inmunidad mucosal, principalmente en órganos diana como las branquias y la piel, durante respuestas a parásitos como *Ichthyophthirius multifiliis*, *Neoparamoeba sp.*, y *L. salmonis* (Alvarez-Pellitero, 2008). Sin embargo, la información sobre genes asociados directamente con la inmunidad adaptativa sigue siendo limitada, aunque algunos estudios sugieren la participación de genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en enfermedades como la amebiasis branquial (AGD) y la lepeoftiriosis en *S. salar*, así como en infecciones de *O. mykiss* por *Gyrodactylus derjavini* y de *Ctenopharyngodon idella* por *Sinergasilus major* (Forlenza et al., 2008). En *S. salar* infectado con *L. salmonis*, se observa una rápida activación de respuestas inflamatorias mixtas, que posteriormente da paso a un estado de hiporreactividad y a un retraso en el proceso de cicatrización de las lesiones. Si la infección persiste, puede generar un deterioro en la inmunidad del hospedador y daños autoinfligidos como lo son la hipersecreción de mucus, auto traumatismo mecánico, hiporreactividad inmunológica, entre otros (Skugor et al., 2008).

En la familia de genes de los receptores tipo Toll (TLR), se han identificado algunos que son exclusivos de peces. En *S. salar* se ha descrito el TLR22, el cual se sugiere está relacionado con la detección de ligandos de patógenos y la inducción de interferón tipo 1 (Pietretti & Wiegertjes, 2014). Además, existen

estudios que respaldan el aumento en la expresión del gen TLR22 en la piel de *Labeo rohita* tras la infección con el parásito *Argulus siamensis*, lo que sugiere que una mayor expresión de este gen se asocia con una mayor carga parasitaria. En contraste, en el riñón, se observó una disminución en la expresión del gen TLR22, lo que podría indicar una posible inmunosupresión inducida por *A. siamensis* (Saurabh et al., 2011). Aunque el papel de las diferentes proteínas Toll aún se está investigando, se ha identificado que Toll actúa como un puente entre los sistemas inmunitarios innato y adaptativo. Para activarse, las células T vírgenes, que forman parte del sistema inmunitario adaptativo y no han estado en contacto con antígenos, requieren dos señales distintas (Vogel, 1998). Se ha identificado que los genes TLR13 se agrupan en dos clados principales, correspondientes a las subfamilias TLR21 y TLR22. La expresión de estos genes en tejidos inmunológicos y gónadas sugiere su posible rol en la defensa del huésped. Los experimentos de inmunoestimulación demostraron que responden a diversos componentes microbianos, lo que sugiere su participación en el reconocimiento de patógenos y su posible interacción en la respuesta frente a ectoparásitos (Sundaram et al., 2012; Valenzuela-Muñoz et al., 2016). La interleuquina 1 beta (IL-1 β) está principalmente asociada a la respuesta inmune innata, donde activa mecanismos como la inflamación, la activación de macrófagos y neutrófilos, y la inducción de otras citocinas y quimiocinas, como el TNF- α y la IL-8, amplificando así la respuesta inflamatoria (Pooley et al., 2013). Diversos antecedentes respaldan el uso del gen IL-1 β como marcador en ensayos de infección para evaluar la eficacia de IPATH contra *C. rogercresseyi* en *Salmo salar*. En el presente estudio, los resultados demostraron una mayor expresión de este gen en los peces tratados con IPATH en comparación con el grupo control, lo que indica una activación significativa de la respuesta inmunológica. Este incremento en la expresión de IL-1 β sugiere que IPATH modula la respuesta inmune innata, potencialmente fortaleciendo las defensas del hospedero frente a la infestación por *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Muñoz, Benavente, Casuso, Leal, & Gallardo-Escárate, 2021). Además, la expresión de IL-1 β está condicionada por varios factores, sin embargo, se sugiere que la smoltificación juega un papel fundamental (Ingerslev et al., 2006).

En peces infestados por ectoparásitos, las enzimas antioxidantes Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa son indicadores clave del estrés oxidativo debido a su función en la defensa contra los radicales libres generados por el daño tisular. En infecciones como la enfermedad branquial amebiana (AGD) causada por *Neoparamoeba perurans*, se ha observado una disminución en la actividad de Catalasa en branquias lesionadas, acompañada de un aumento en su expresión génica como respuesta compensatoria. De manera similar, la expresión del gen SOD aumenta en las áreas afectadas para contrarrestar el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), aunque su actividad puede agotarse en etapas avanzadas de la infección (Marcos-López et al., 2018).

Adicionalmente, estudios en otras especies han destacado el papel crítico de la SOD frente al daño oxidativo (Morga et al., 2011). La sobreexpresión de los genes subunidad de la enzima oligosacaryltransferasa (OGST) y SOD en presencia de parásitos vivos podría estar asociada con un incremento en la generación de componentes citotóxicos durante la respuesta inmune, como lo demostraron en *Biomphalaria glabrata*. Este fenómeno sugiere que la activación de estos genes ayuda a mitigar el daño causado por las ROS y otros compuestos tóxicos generados en el proceso de defensa inmunológica (Guillou et al., 2007). Además, tras la infección por *Bonamia ostreae* en *Ostrea edulis*, el gen SOD se sobreexpresó en células sanguíneas para mitigar el exceso de ROS. Similarmente, en *Epinephelus coioides*, la actividad de SOD aumentó significativamente en las primeras etapas de la infección para neutralizar el daño por radicales libres, disminuyendo en etapas posteriores a medida que

el pez desarrollaba inmunidad y producía menos ROS. Estos antecedentes respaldan el uso de los genes SOD y Catalasa como biomarcadores moleculares efectivos para evaluar el estrés oxidativo en infecciones parasitarias (Yin et al., 2014). Además de SOD y Catalasa, el gen GSHPx o GPx (Glutación peroxidasa) juega un papel crucial en la defensa celular contra el estrés oxidativo, eliminando eficazmente el H₂O₂ y previniendo su acumulación, que puede desencadenar peroxidación lipídica. Con una afinidad más alta por el H₂O₂ que la catalasa, la GPx actúa con mayor eficacia durante la fagocitosis, donde la producción rápida de ROS exige una respuesta antioxidante inmediata. Su función está directamente vinculada a la oxidación del glutatión, un proceso esencial para la desintoxicación de lípidos (Liu et al., 2010). No obstante, en etapas iniciales de infección, la expresión génica de GPx se reduce drásticamente debido a la inhibición del patógeno, aumentando posteriormente como una respuesta compensatoria (Liu et al., 2010). La inhibición de GPx, por tanto, refleja una capacidad reducida para eliminar H₂O₂, contribuyendo al daño oxidativo en tejidos afectados. De manera complementaria, la GST interviene en la desintoxicación de compuestos xenobióticos y endobióticos, y su disminución compromete directamente la capacidad antioxidante del organismo. Este fenómeno ha sido observado en infecciones fúngicas, como las causadas por *Fusarium solani* (Ruban et al., 2018). Ambas enzimas, integrantes del sistema antioxidante secundario, neutralizan ROS mediante la eliminación de peróxidos orgánicos, desempeñando un rol crucial en la prevención de la peroxidación lipídica (Zhang et al., 2004). La regulación positiva de estas enzimas es esencial para evitar el daño oxidativo, como se ha descrito en infecciones como la saprolegniosis (Halliwell, 2012).

El hierro es un elemento esencial para la mayoría de los organismos, incluidos los parásitos, que lo utilizan en procesos biológicos fundamentales como la respiración celular y la síntesis de ADN. Debido a su importancia crítica, el hierro también desempeña un papel clave en las interacciones entre los parásitos y sus hospedadores, ya que estos patógenos dependen de él para su supervivencia y proliferación, lo que lo convierte en un factor determinante para su éxito. Similar a los microorganismos invasores, los parásitos obtienen hierro del hospedador, lo que influye en su virulencia. A su vez, el hospedador aplica estrategias de inmunidad nutricional para limitar la disponibilidad de hierro y dificultar el acceso de los patógenos a este recurso esencial (Weinberg, 2009). Estas estrategias incluyen la intoxicación por metales, la interacción genética con infecciones bacterianas y el uso de proteínas especializadas para restringir el hierro, aunque su eficacia puede verse afectada por factores ambientales, genéticos o inmunológicos (Hood & Skaar, 2012).

El hierro y sus compuestos, como el hemo, son esenciales para los parásitos, aunque las vías para su captación y liberación aún no están completamente comprendidas. Los parásitos no sintetizan hemo y deben obtenerlo del hospedador. No obstante, el hemo libre es tóxico, por lo que su desintoxicación rápida es vital para la supervivencia de los parásitos hematófagos (Toh et al., 2010). Por lo tanto, el hierro, ya sea modificando su disponibilidad o limitándolo, se perfila como una estrategia de control prometedora para controlar *C. rogercresseyi*. Se ha demostrado que los piojos de mar y los salmónidos compiten por el hierro. En *L. salmonis*, se identificaron dos homólogos de IRP1 (Proteínas que regulan la homeostasis del hierro al unirse a los elementos de respuesta al hierro en los ARNm), LsIRP1A y LsIRP1B, que regulan el transporte y almacenamiento de hierro, con roles clave en órganos reproductores y huevos. La expresión de LsIRP1A aumenta durante las etapas parasíticas, reflejando una respuesta a la mayor disponibilidad de hierro en la dieta. Ambos homólogos se expresan en los órganos reproductores de hembras adultas, vinculándose a procesos reproductivos (Tröbke et al., 2015). En *C. rogercresseyi*, se ha observado una

sobrerregulación de la ferritina a los 7 días post-infección (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárte, 2017). La ferritina regula el hierro celular al secuestrar Fe(II) y prevenir su oxidación a Fe(III), evitando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la reacción de Fenton (Chávez-Mardones et al., 2013). Este proceso limita la conversión de H₂O₂ en radicales tóxicos (Arosio et al., 2009), que podrían causar daño celular y apoptosis (Ong et al., 2006). De este modo, la ferritina no solo gestiona el hierro disponible, sino que también protege a *C. rogercresseyi* del estrés oxidativo, destacando su importancia en la interacción parasito-hospedador.

1.6 Vacunas antimicrobiota

En la acuicultura, la mayoría de las vacunas desarrolladas son las vacunas inactivadas, vacunas vivas atenuadas y vacunas basada en ADN. Las vacunas inactivadas, que incluyen bacterias muertas de células enteras y bacterias fraccionadas, se utilizan ampliamente debido a su seguridad y eficacia para estimular las respuestas inmunitarias humorales (Ben Hamed et al., 2021). Sin embargo, las vacunas vivas atenuadas, aunque son altamente inmunogénicas y capaces de inducir una inmunidad duradera, plantean el riesgo de reversión a la virulencia (Lee et al., 2012). La vacuna de ADN funciona entregando al pez una secuencia genética que codifica un antígeno. Las células del huésped incorporan y transcriben este material en mRNA para producir las proteínas de la vacuna. Estas son reconocidas como antígenos por el sistema inmunológico, activando respuestas tanto celulares como humorales (Lorenzen & LaPatra, 2005). Además del tipo de vacuna, es importante la selección del método de administración, ya que, la seguridad y la eficacia de la vacuna depende de este factor. Dentro de los métodos tradicionales para la vacunación de peces, se encuentran, por ejemplo, inmersión, inyección intraperitoneal, inyección muscular, administración oral y administración anal (Ben Hamed et al., 2021). Por su parte la selección del método de vacunación depende del tamaño del pez, especie, dosis de antígeno utilizada, dosis de adyuvante utilizado y el tipo de vacuna, se sugiere que, para una protección de alto nivel, se necesita una dosis de refuerzo para algunas vacunas (Villumsen et al., 2014). La vía de administración oral, es la vía más sencilla de administración de antígenos, es menos estresante y segura que otras vías, aplicándose a peces de cualquier tamaño y el procedimiento puede aplicarse en ciclos de engorda en jaulas o estanques (Mutoloki et al., 2015)

La microbiota se define como la suma total de todos los organismos presentes en un organismo, incluidas bacterias, hongos, virus y otros organismos unicelulares (Khan, 2021). Algunos de ellos pueden definirse como unidades funcionales beneficiosas en base a su actividad frente al huésped (Shafquat et al., 2014).

En el desarrollo de las vacunas antimicrobiota, utilizando bacterias inactivadas, el mantenimiento de un estado de salud equilibrado es fundamental. Este equilibrio está estrechamente relacionado con la interacción entre un sistema inmunitario y la microbiota natural del organismo. La microbiota cumple funciones esenciales, como el metabolismo de nutrientes y la resistencia a la colonización de patógenos. Sin embargo, cuando este balance se ve alterado, los patógenos, que antes no representaban una amenaza, pueden multiplicarse y causar enfermedades (Gómez & Balcázar, 2008). La microbiota desempeña un papel clave en la inducción y funcionamiento del sistema inmunitario, facilitando una relación simbiótica que permite respuestas protectoras frente a patógenos. Sin embargo, alteraciones en este equilibrio, como el uso excesivo de antibióticos y cambios dietéticos, pueden afectar la resiliencia y diversidad de la microbiota, lo que contribuye a disfunciones inmunitarias (Dudek-Wicher et al., 2018). Las vacunas

antimicrobiota buscan restaurar este equilibrio, favoreciendo la acción de bacterias beneficiosas y potenciando la inmunidad del huésped, promoviendo así una mayor resistencia frente a infecciones oportunistas (Belkaid & Hand, 2014). La alimentación y los cambios en la dieta, pueden afectar la diversidad microbiana presente en el mucus de *S. salar* y su abundancia (Landeira-Dabarca et al., 2013)

Estudios previos han explorado el uso de vacunas basadas en bacterias de la microbiota de parásitos como estrategia de control. En investigaciones previas con garrapatas y ratones, una vacuna compuesta por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, específicamente la especie *Escherichia coli*, logró reducir la diversidad bacteriana en la garrapata común (*Ixodes ricinus*), mientras que en los ratones no se observó una alteración significativa en su microbiota. Estos hallazgos sugieren que la vacuna afecta de manera directa al parásito sin generar un impacto considerable en el hospedador (Mateos-Hernández et al., 2020). Otro antecedente que respalda el uso de vacunas antimicrobiota es la interacción entre la bacteria *Borrelia afzelli* e *I. ricinus*, donde se demostró que el uso de *B. afzelli* produjo una alteración en la diversidad beta, composición, abundancia y coocurrencia microbiana. Por lo tanto, la vacuna antimicrobiota es una herramienta adecuada para la manipulación del microbioma hacia un estado deseado y puede utilizarse para el control de enfermedades transmitidas por vectores (Wu-Chuang et al., 2023).

Por su parte en *S. salar*, se han utilizado bacterias probióticas como *Aliivibrio sp* mediante vacunación por inmersión en diferentes concentraciones contra *L. salmonis*. Los resultados demostraron una reducción significativa en la fijación exitosa de piojos de mar, con una disminución entre el 58% y el 65%. En un ensayo independiente, la presencia de la bacteria *Aliivibrio sp*, también impactó en la viabilidad de los piojos de mar, mostrando que la concentración de esta bacteria estaba directamente relacionada con la mortalidad de los piojos adultos. Estos resultados sugieren que *Aliivibrio sp*, afecta la viabilidad de *L. salmonis* mediante un mecanismo secundario, y podría ser un candidato prometedor como herramienta preventiva para reducir las infestaciones (Steen Dobloug et al., 2023).

En el año 2023 en el Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola (LBGA), se identificaron bacterias presentes en la microbiota de *C. rogercresseyi*, las cuales son fundamentales en la interacción parásito – hospedador. Además, se demostró que la inmunización con estas bacterias en *S. salar*, inhibe el crecimiento de estas. Por tanto, utilizando bacterias claves o bacterias “Keystone” para el desarrollo de una vacuna oral podría alterar o generar una disbiosis (desequilibrio en la composición, función y/o distribución de los microorganismos) en la microbiota del *C. rogercresseyi*. En un estudio que combinó la ligación de proximidad cromosómica (Hi-C) y la secuenciación de lectura larga para la reconstrucción genómica de la microbiota de *C. rogercresseyi*, se identificaron cinco bacterias con una completitud genómica superior al 83%, entre las cuales se encuentran *Tenacibaculum*, *Dokdonia*, *Cellulophaga*, *Colwellia*, *leucothrix* (Valenzuela-Miranda et al., 2022). Mientras que en *L. salmonis* se han identificado otra batería de bacterias, como *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, compartiendo algunas identificadas en *C. rogercresseyi* como *Tenacibaculum* (Llewellyn et al., 2017). Además, en *L. salmonis* se han identificado bacterias como *Tenacibaculum maritimum*, *Pseudomonas fluorescens* y *Vibrio spp* (Barker et al., 2009), evidenciando que en *L. salmonis* existe una diversidad microbiana más conservada, en comparación con *C. rogercresseyi*.

1.7 Adyuvantes como potenciadores de la respuesta inmune

A modo de inducir y desarrollar protección contra enfermedades en combinación con las vacunas, se presentan los adyuvantes. Estos se definen como sustancias que mejoran la respuesta inmune específica, aumentando los títulos de anticuerpos circulantes y el número de células formadoras de placas. Los adyuvantes pueden utilizarse antes, durante o después de la vacunación (Anderson, 1992). Adicional a lo anterior, en varios países las vacunas vivas no están aprobadas para su uso en acuicultura por razones de seguridad, sin embargo, para las vacunas con bacterias inactivadas, en la mayoría de los casos tienen menor actividad inmunogénica, por lo tanto, los adyuvantes o inmunopotenciadores son necesarios para obtener altas respuestas inmunitarias (Tafalla et al., 2013).

Los adyuvantes se clasifican en dos grupos según sus mecanismos principales de acción: sistemas de administración de vacunas y adyuvantes inmunoestimuladores. Los sistemas de administración de vacunas, que suelen ser particulados (como emulsiones, micropartículas, complejos inmunoestimuladores y liposomas), se diseñan para dirigir los antígenos hacia las células presentadoras de antígenos (Apostólico et al., 2016). Los adyuvantes de aceite mineral comercializados bajo la marca Montanide han sido diseñados para optimizar la eficacia y estabilidad de las vacunas, además de minimizar sus efectos adversos. Estos adyuvantes pueden estar formulados a partir de aceite mineral, no mineral o una combinación de ambos, e incluyen opciones basadas en una química específica de surfactantes con oleato de manitol. Su aplicación permite la fabricación de diversas emulsiones, que pueden emplearse en mamíferos y peces (Lawrence et al., 1997; Ravelo et al., 2006).

Un ejemplo de adyuvante acuoso es Montanide IMS 1312 VG, desarrollado por el laboratorio SEPPIC en Francia. Su formulación contiene nanopartículas líquidas dispersas en agua, utilizadas como vehículo para estimular la administración de vacunas. Este adyuvante es apropiado para la vacunación masiva mediante inmersión. Además, puede diluirse fácilmente en un medio acuoso a temperatura ambiente, sin necesidad de condiciones especiales para su preparación (Seppic, Francia). En un trabajo realizado el año 2014 se evaluó el efecto del adyuvante Montanide IMS 1312 VG, aplicado en tratamiento por inmersión en combinación con una vacuna contra *Yersinia ruckeri*, aplicado en la especie *O. mykiss* y compararla con una vacuna sin adyuvante. Se observó una mejora del 20% en la tasa de supervivencia relativa (RPS), transcurrido 4 semanas desde la inmunización y transcurrido 6 semanas la diferencia de RPS se mantuvo alrededor del 10% entre vacunas sin adyuvantes y con adyuvantes. Estos resultados demostraron que el uso del adyuvante Montanide 1312 VG mejora la tasa de supervivencia relativa frente a un agente patógeno como *Y. ruckeri* en la especie *O. mykiss* (Soltani et al., 2014).

Otro estudio que respalda el uso de adyuvante Montanide 1312 VG en la vacunación por inmersión, fue para proteger a la Platija oliva (*Paralichthys olivaceus*) contra infección por septicemia hemorrágica viral (VHSV) (Hwang et al., 2017). Tras la vacunación por inmersión con VHSV, se observó un aumento significativo en la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TLR3 en comparación con el grupo de control. La expresión de IL-1 β aumentó considerablemente después de la vacunación con VHSV y Montanide IMS 1312 VG. Además, el gen TLR3 fue significativamente modulado después de la vacunación con VHSV, lo que destaca la importancia del adyuvante como promotor de la respuesta inmune de los peces frente a los virus de ARN. Los resultados muestran que el uso de 10 μ g de adyuvante produjo una mayor eficacia en comparación con 50 μ g, lo que sugiere que una dosis más baja puede ser más afectiva para estimular la

respuesta inmune. En el mismo estudio se realizó un análisis de la mortalidad acumulada post infección. Tras la exposición a VHSV, 4 semanas después de la vacunación, se observó una mortalidad acumulada del 90% en el grupo de control tratado con PBS. La vacunación por inmersión con Montanide IMS 1312 VG mostró una mortalidad acumulada del 10% y 25% en presencia de 10 o 50 µg del adyuvante, respectivamente. A las 8 semanas post-vacunación, el tratamiento solo con la vacuna resultó en una mortalidad rápida sin protección, mientras que la vacunación por inmersión con adyuvante mostró una mortalidad más baja y retrasada, con valores de RPS del 67% y 47%. Esto sugiere que el uso de adyuvante Montanide 1312 VG disminuye la mortalidad acumulada y respalda la información entregada anteriormente de la existencia de una concentración de adyuvante óptima, para el tratamiento de VHSV en Platija oliva (Hwang et al., 2017).

Para el caso de adyuvantes orales Montanide, existe comercialmente el producto Montanide GR01 (Seppic, Francia), que se basa en una matriz oleosa la cual se mezcla con el alimento (pienso compuesto) con la finalidad de proteger las propiedades del pellet y mantener su integridad en un entorno gástrico, logrando su liberación en los intestinos y facilitando la interacción de las células inmunitarias (Seppic, Francia). Se realizó un ensayo que demuestra los parámetros inmunes innatos, asociado a una vacuna oral en la especie *Oreochromis niloticus* (Tilapia del Nilo) para el tratamiento contra *Streptococcus agalactiae*, donde se asocian actividades de Lizoenzima, Mieloperoxidasa, Catalasa, Superóxido dismutasa, Glutación peroxidasa y Glutación reductasa, comúnmente utilizados como indicadores de la respuesta inmune en peces contra el estrés oxidativo y protección contra bacterias. Los resultados fueron comparados entre los grupos experimentales y el grupo control, sugiriendo que existía una mayor actividad de la LZM en peces vacunados con Montanide GR01 a una concentración del 2%, de igual forma aumentó la actividad sérica de MPO, Catalasa, GPx, demostrando que el uso de Montanide GR01 puede inducir una respuesta inmunitaria y aumentar la protección en *O. niloticus* en comparación con el grupo control sin adyuvante (Pholchamat et al., 2024). En el lenguado japonés se utilizó un adyuvante para vacunación oral (PLGA), con tecnología de encapsulamiento, utilizada en una vacuna contra el virus de la enfermedad linfocítica, logrando aumentar la respuesta inmune desde la semana 1 en comparación a peces vacunados sin adyuvantes (Tian et al., 2008).

Finalmente, en base a la información presentada, *C. rogercresseyi* es un ectoparásito que representa una gran amenaza para la salmonicultura chilena, con una alta prevalencia en *S. salar*. Para mitigar su impacto, se buscan nuevas estrategias de control, incluyendo el uso de vacunas antimicrobiota. En este contexto, se plantea que el uso de bacterias inactivadas, previamente identificadas en *C. rogercresseyi*, podría inducir una respuesta inmune en el hospedador antes de la infestación, preparándolo para la llegada del parásito. Esta respuesta será evaluada mediante herramientas moleculares para analizar la expresión de genes asociados a la inmunidad y la eficacia del tratamiento se determinará en base a la reducción en la carga parasitaria. Además, considerando la naturaleza de las bacterias inactivadas, se evaluarán dos adyuvantes comerciales (Montanide GR01 y Montanide IMS 1312 VG), aún no probados en *S. salar*, en dos estrategias de vacunación: oral e inmersión.

2. HIPÓTESIS

La administración de vacuna antimicrobiota contra *Caligus rogercresseyi* por vía oral y de inmersión genera una respuesta inmunológica significativa en salmón del Atlántico durante un proceso infeccioso.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de una vacuna antimicrobiota contra el piojo de mar *Caligus rogercresseyi* administrada por vía oral y de inmersión en salmón del Atlántico.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar la eficacia contra *Caligus rogercresseyi* de las formulaciones de vacuna antimicrobiota administradas por vía oral e inmersión en salmones del Atlántico.
2. Evaluar respuesta inmune en piel y riñón anterior de salmón del Atlántico expuestos a vacuna antimicrobiota oral e inmersión durante infección con *C. rogercresseyi*.
3. Determinar la modulación de genes de estrés oxidativo en *C. rogercresseyi* recolectados de peces inmunizados con vacuna antimicrobiota oral e inmersión.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Objetivo específico 1: Evaluar la eficacia contra *Caligus rogercresseyi* de las formulaciones de vacuna antimicrobiota administradas por vía oral e inmersión en salmones del Atlántico.

4.1.1 Formulación vacuna oral antimicrobiota

Para la elaboración de las vacunas antimicrobias (AMV) se utilizaron dos bacterias aisladas previamente del microbiota de *C. rogercresseyi* en el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola. Ambas bacterias fueron liofilizadas quedando a una concentración de 1×10^9 UFC/g (Biosamer, Renca, Santiago, Chile). Se diseñaron 2 dietas experimentales con una combinación proporcional a partes iguales de ambas bacterias liofilizadas con las concentraciones de 1×10^6 UFC/g (1%) y 1×10^7 UFC/g (2%). Para la formulación de las AMV 1% y 2% se disolvieron 5 y 10 g respectivamente de cada bacteria liofilizada en 30 mL de PBS 1X. Una vez diluidas ambas soluciones de bacterias fueron formuladas en 100 mL de emulsión en una proporción 30% bacterias /70 % adyuvante (Pholchamat et al., 2024), empleando el adyuvante oral comercial Montanide GR01 (Seppic, Francia). Posteriormente, los 100 mL de emulsión de cada AMV fueron unificados con 1 kg de alimento calibre 3 mm no aceitado, EWOS.

4.1.2 Formulación de vacuna antimicrobiota por inmersión

Las bacterias liofilizadas para la elaboración de la vacuna antimicrobiota, descrita anteriormente, fueron utilizadas a razón 1:1, generando un mix de 50g de bacterias (25g bacteria 1; 25g bacteria 2). Estos 50g de bacterias fueron unificados en 100mL de caldo marino utilizando agitador magnético a baja velocidad, finalmente se unificó con 5L de agua mar.

4.1.3 Formulación de vacuna antimicrobiota por inmersión con adyuvante.

Las bacterias liofilizadas para la elaboración de la vacuna antimicrobiota, descrita anteriormente, fueron utilizadas a razón 1:1, se utilizaron 25 g de vacuna antimicrobiota (12.5g bacteria 1 y 12.5g bacteria 2) diluido en 125 mL de PBS estéril, unificado con 125 mL de adyuvante Montanide 1312 VG logrando 250 mL de emulsión que fue unificado en 2,5 L de aguamar. El tratamiento se aplicó durante 2 minutos.

4.1.4 Diseño experimental

Se seleccionaron 75 peces (144 g) de la especie *S. salar* del laboratorio experimental en la Estación de Biología Marina de la Universidad de Concepción, Dichato, Chile. Los peces se mantuvieron en estanques equipados con, oxigenación, sistemas de agua filtrada mediante filtros de arena de cuarzo, espumadores, filtros UV y filtros biológicos, con una temperatura constante de $13^{\circ}\text{C} \pm 1$, controlada mediante un equipo Chiller SUNSUN (Figura 2). Durante todo el experimento, se monitorearon los parámetros de calidad del agua, que se mantuvieron estables: $\text{pH} = 7,6 \pm 0,7$, oxígeno disuelto $>8 \text{ mg/L}$, $\text{NH}_3 < 0,01 \text{ mg/L}$ y $\text{NO}_2 < 0,1 \text{ mg/L}$. Los peces fueron aclimatados durante tres semanas y posteriormente se separaron en cuatro grupos experimentales, 15 peces por grupo (control y tratados por triplicado, 5 peces por estanque).

- Grupo Control (Ctrl): Sin tratamiento ni adyuvante.
- Grupo AMV (CD): Sin adyuvante, inmersión.
- Grupo AMV + Montanide 1312 VG (1312): adyuvante, inmersión.
- Grupo AMV + Montanide GR 1% (GR1): adyuvante, oral.
- Grupo AMV + Montanide GR 2% (GR2). adyuvante, oral

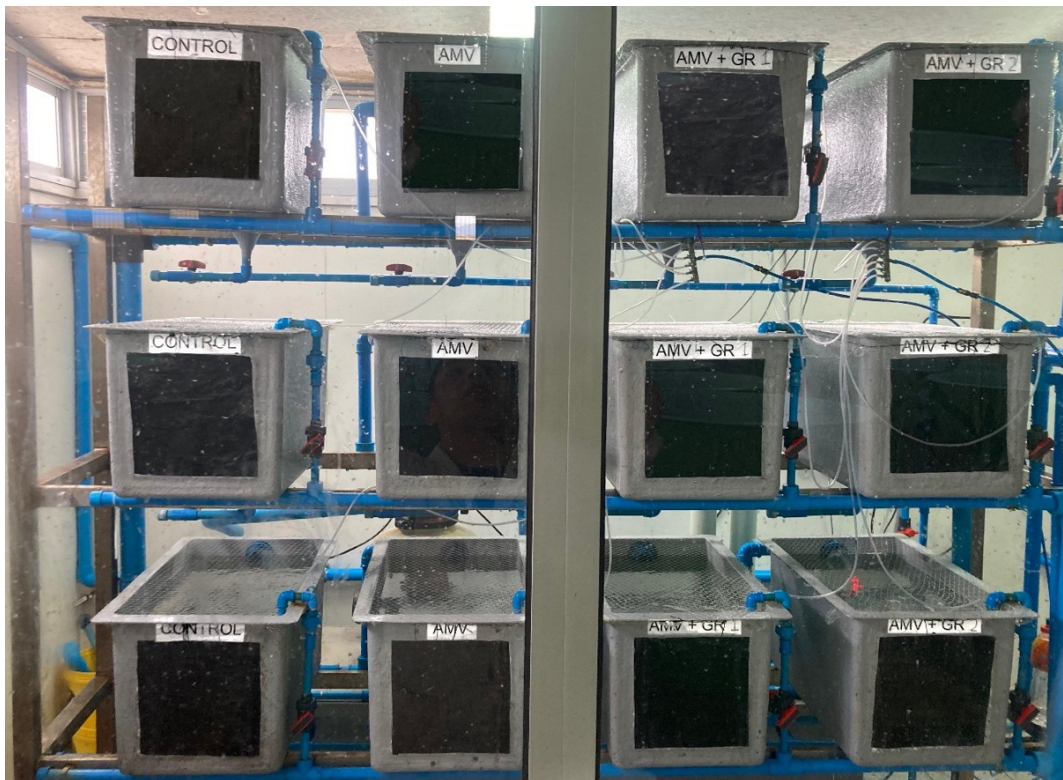


Figura 2: Fotografía de los estanques experimentales utilizados en el estudio. Los estanques están organizados según los distintos tratamientos aplicados, conectados a un sistema de flujo de agua y aireación controlada para garantizar condiciones homogéneas durante el experimento.

El grupo de vacuna antimicrobiota por inmersión sin adyuvante AMV (Inmersión), se expuso a el tratamiento durante 2 minutos en un volumen de 5 L cada 2 peces, con aireación constante. De la misma manera el grupo AMV + Montanide 1312 VG se expuso durante 2 minutos en un volumen de 5L, cada 2 peces, bajo aireación constante. Los grupos AMV + Montanide GR 1 y GR 2, comenzaron el tratamiento el mismo día, estos peces fueron alimentados a saciedad utilizando la vacuna oral con adyuvante y su tratamiento finalizó 1 día antes del último muestreo.

Los muestreos se realizaron a partir de unidades térmicas acumuladas (UTA), con el primer muestreo a las 400 UTA desde el comienzo de la inmunización, transcurrido el primer muestreo, se desafiaron a los peces con una infección experimental de *C. rogercresseyi* a una razón de 35 copepoditos por pez. El segundo y último muestreo se realizó transcurridos 25 días post-infección, utilizando benzocaína al 20% (2,5 mL disueltos en 10 L de agua de mar) como anestésico. Para determinación de eficacia, se realizó un recuento de *C. rogercresseyi* y a la posterior extracción de ectoparásitos, seleccionando seis por pez (tres hembras y tres machos). Además, se recolectaron muestras de tejidos, incluyendo riñón anterior y piel sin escamas (preservados en RNAlater, Ambion, USA). Todas las muestras fueron etiquetadas y almacenadas a -80 °C hasta su análisis en el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola del Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción. Durante todo el experimento, los peces de todos los grupos experimentales y de control fueron alimentados a saciedad. El esquema del diseño experimental se presenta en la figura 3.

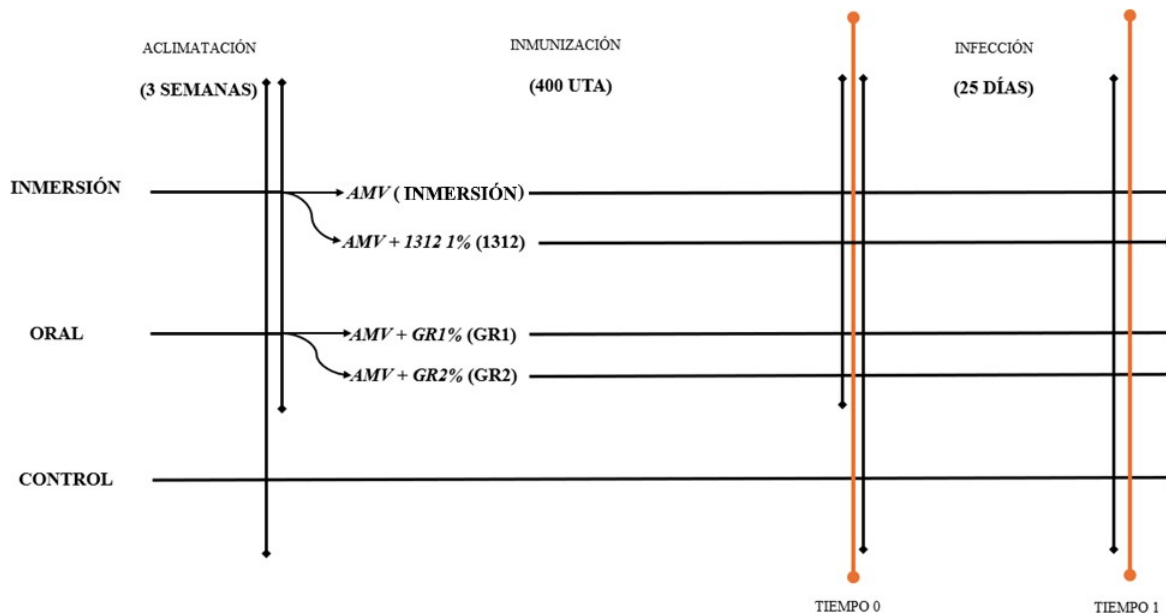


Figura 3: Esquema de conformación de grupos y actividades realizadas en escala temporal.

4.2 Objetivo específico 2: Evaluar respuesta inmune en piel y riñón anterior de salmón del atlántico expuestos a vacuna oral e inmersión durante infección con *C. rogercresseyi*.

4.2.1 Extracción de RNA y Síntesis de cDNA

La extracción de RNA total de las muestras almacenadas en RNA Later se llevó a cabo utilizando el método de TRIzol (Invitrogen, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de RNA fue determinada en ng/ μ L mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), evaluando la absorbancia a 260 nm. La pureza de las muestras se verificó a través de las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. Para evaluar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en gel desnaturalizante MOPS al 1,2%, cuyos resultados fueron visualizados bajo luz ultravioleta utilizando el sistema digital de foto documentación iBright CL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Para la síntesis de cDNA se estableció una concentración óptima de 200ng/ μ L para todas las muestras de RNA y se realizó la reacción de RT-PCR con el kit comercial RevertAid H Minus First Strand cDNA Syntesis (ThermoScientific, USA) de acuerdo con lo sugerido por el fabricante. Utilizando termociclador Esco Swift Maxi (Esco Healthcare, Singapur) con el siguiente protocolo de temperatura específico de RevertAid H Minus First Strand cDNA Syntesis: 25°C por 5 minutos, seguido de 24°C por 60 minutos, luego 70°C por 5 minutos y finalmente 42°C por 60 minutos. Para verificar la correcta síntesis de cDNA se realizó un PCR en tiempo final en termociclador APPLIED BIOSYSTEMS Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) previamente estandarizado y posteriormente se visualizó el resultado mediante electroforesis en gel TAE 1%.

4.2.2 Partidores utilizados

Con la finalidad de evaluar la respuesta inmune, adaptativa y estrés oxidativo de los peces asociado a los tratamientos en comparación con el grupo control, se seleccionaron 10 partidores previamente estandarizados en el LBG. En la tabla 1 se listan los partidores empleados con sus temperaturas de alineamiento.

Tabla 1: Partidores utilizados para análisis RT-qPCR en *S. salar*.

Nombre de Partidor	Gen	Secuencia 5'-3'	Tº Alineamiento (°C)
Ss_b_actin_F	Beta actina	CAACTGGGACGACATGGAGA	60
Ss_b_actin_R		AGTGAGCAGGACTGGGTGCT	
TLR-22_3_F	Receptor tipo Toll 22	TGCCTTCTAACCCTCTCCCT	61
TLR-22_3_R		CGCTGCTCTCAGACAGGAAG	
TLR-13_F	Receptor tipo Toll 13	CCAAGCGGAGGAACAGACAA	60
TLR-13_R		CCGGTGGTGAAGACACAAC	
IL-1β_F	Interleucina 1 beta	GATCTGGAGGTATCCCATCA	60
IL-1β_R		CACAGCACTCTCCAGCAAGA	
CD-4_F	Proteína de diferenciación CD4	CCACAGTGGAAAGACAGGCT	60
CD-4_R		CAACGGAAGTTGGTTGTGGC	
CAT_F	Catalasa	GGCTCTCACACCTTCAAGCT	60
CAT_R		GTTGCTGGGGTCAAAGGCTA	
SOD_F	Superóxido dismutasa	CCGTATTCTTTGAGCAGGAG	60
SOD_R		AGCCGTTGGTGTTGTCTC	
FerritinaM_F	Ferritina M	TCTCACCACGATTGCGAAGC	60
FerritinaM_R		CTCGTCGCTGTTCTCCTTGA	
GSHPx_F	Glutación peroxidasa	TAAAGTGGTGCTGATCGAGA	60
GSHPx_R		GTTCTCCTGATGTCCGAAC	

4.2.3 Análisis de expresión de genes utilizando RT-qPCR

Para el análisis de RT-qPCR de genes asociados a respuesta inmune y estrés oxidativo en *S. salar* se utilizó el kit de PowerUp SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando partidores descritos previamente y el cDNA sintetizado Utilizando Termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para determinar la cuantificación relativa se utilizó como gen normalizador β-actina gen procedente del LBGA.

4.2.4 Análisis de datos

Los análisis de expresión se llevaron a cabo utilizando los datos proporcionados por el termociclador. La cuantificación relativa de mRNA se determinó mediante el método $\Delta\Delta CT$ y los valores se calcularon como $2^{-\Delta\Delta CT}$. Posteriormente, se aplicó un análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Finalmente, los datos se representaron gráficamente empleando el software GraphPad Prism (versión 10.3.0; GraphPad Software, Inc). Además, se utilizó el software R studio (versión 2023.12.0+402; RStudio, PBC) para la elaboración de un análisis de componentes principales (PCA) con los valores de expresión relativa de los genes analizados en cada tejido, riñón anterior, piel y *C. rogercresseyi*.

4.3 Objetivo específico 3: Determinar la modulación de genes de estrés oxidativo en *C. rogercresseyi* colectados de peces inmunizados con vacuna oral e inmersión.

4.3.1 Extracción de RNA y Síntesis de cDNA

Para realizar la extracción de RNA y posterior síntesis de cDNA en *C. rogercresseyi*, se utilizó el mismo método descrito anteriormente en la sección 4.3.1, con la diferencia que se utilizó el método Fenol cloroformo.

4.3.2 Partidores utilizados para análisis de *C. rogercresseyi*

Con la finalidad de evaluar la expresión de genes asociados a estrés oxidativo en *C. rogercresseyi*, se seleccionaron 4 partidores previamente estandarizados y se utilizó como housekeeping β -tubulina. Estos partidores tienen diferentes temperaturas de alineamiento, las cuales se expresan en la tabla 2.

4.3.3 Análisis de expresión de genes utilizando RT-qPCR

Para el análisis de RT-qPCR, se utilizó el mismo método descrito en la sección 4.3.3, con la configuración de la Temperatura de alineamiento descrita en la tabla 2.

Para determinar la cuantificación relativa se utilizó un gen normalizador llamado β -tubulina, el cual actuó como Housekeeping, gen procedente del Laboratorio de Genómica y Biotecnología.

Tabla 2: Partidores utilizados para análisis RT-qPCR en *C. rogercresseyi*.

Nombre de Partidor	Gen	Secuencia 5'-3'	Tº Alineamiento (°C)
Cr β -tubulin_F	Beta-tubulina	TTTGTTGTGTGAGCTCTGGG	60
Cr β -tubulin_R		GCTGATCTCCGAAAACCTGC	
Cr Ferritina_F	Ferritina	GGAGTGACGGCCTAGAGGCACTCCG	65
Cr Ferritina_R		TCCAGCCAAGTGCCGGTGAGCCA	
Cr SOD_F	Superóxido dismutasa	TCAACATGCAACACGGCTCCAG	60
Cr SOD_R		GCGTGCCCTGGTCGTACATGCCG	
Cr CAT_F	Catalasa	GGCACCCAGACGATAGCGATGAGCA	64
Cr CAT_R		TCGCTTTCAGTCCC GGAAATCTGGT	
Cr PHGp_F	Fosfoglicerato mutasa	TGGAGCCGATGCCATTCTCTTTTCA	66
Cr PHGp_R		TTTTTGCTGGGCGCCAGGCGTGA	

4.3.4 Análisis de datos

Para el análisis de datos se utilizó la misma metodología descrita en la sección 4.2.4

5 RESULTADOS

5.1. Eficacia de vacuna oral e inmersión durante infección experimental con *C. rogercresseyi* en salmón del Atlántico

Para determinar la eficacia de la vacuna antimicrobiota se realizó un conteo de *C. rogercresseyi* a los 25 dpi en cada grupo experimental. Como se puede apreciar en la Figura 4, se muestra el conteo general de *C. rogercresseyi*, separado por grupos y sexo. En hembras (Figura 4.a), el grupo con mayor cantidad de Caligus por pez fue el Ctrl, con un promedio de 7,6 piojos por pez con una máxima (nmax) de 19 y una mínima (nmin) de 2, seguido por el grupo GR2 con 4,4 piojo por pez en promedio, siendo nmax=8 y nmin=0, le sigue CD con 3,9 piojos por pez, nmax=5 y nmin=1 y el grupo con menor cantidad de Caligus fue GR1 con un promedio de 3,0 nmax=5 y nmin=1. Mientras que en machos (4.b), el grupo con mayor cantidad de Caligus fue Ctrl con promedio 3,2, con nmax=10 y nmin= 0, seguido de GR2 con un promedio de 2,6, siendo nmax=5 y nmin=1 y finalmente GR1 (nmax=6, nmin=1) y CD (nmax= 7, nmin=0) tuvieron el mismo promedio 2,0. También un factor importante a considerar es la cantidad de hembras y machos encontrados, ya que existe un dominio de hembras en comparación con los machos. En promedio por cada macho, existía 1,85 hembras, en relación 1:1.85 (M/H).

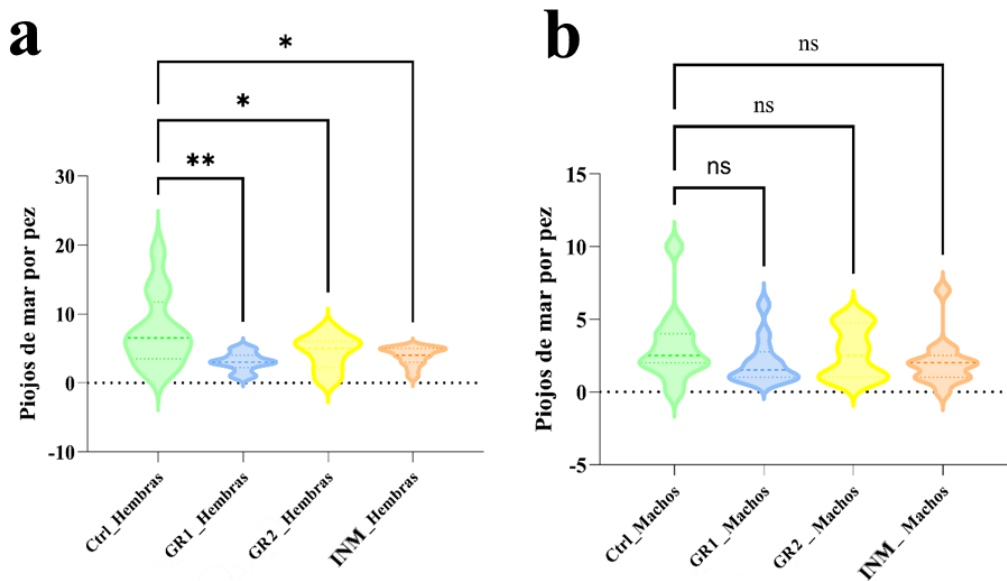


Figura 4: Conteo final *C. rogercresseyi*, separación por grupo y sexo; a) Caligus hembras; b) Caligus machos.

En la Figura 5 se observa una comparación entre las medias de los grupos experimentales, utilizando intervalo de confianza al 95% basados en la prueba de Dunnett, se expresan hembras y machos por separado, en ambos casos los grupos fueron comparados como base el grupo Ctrl y su respectivo sexo, con la finalidad de ver la diferencia directa entre grupo control y grupo tratamiento. Para las hembras (Figura 5. a) existe una diferencia (Δ) igual a 4,5 entre los grupos Ctrl y GR2 lo que respalda los resultados de la Figura 1, seguido de Ctrl e inmersión con un $\Delta=3,6$ y finalmente Ctrl y GR2 con la menor diferencia $\Delta= 3,1$.

En el caso de los *Caligus* machos (Figura 5. b), la magnitud de los resultados en general fue menor, siendo el grupo Ctrl:inmersión y Ctrl:GR1 muy similares cercano a 1 ($\Delta \approx 0.00646$), siendo valores no representativos, sin embargo, el grupo Ctrl y GR2 mostraron una baja diferencia $\Delta = 0,5$ esto nos demuestra que no existe una diferencia mayor entre la media del conteo de piojos entre Ctrl y GR2.

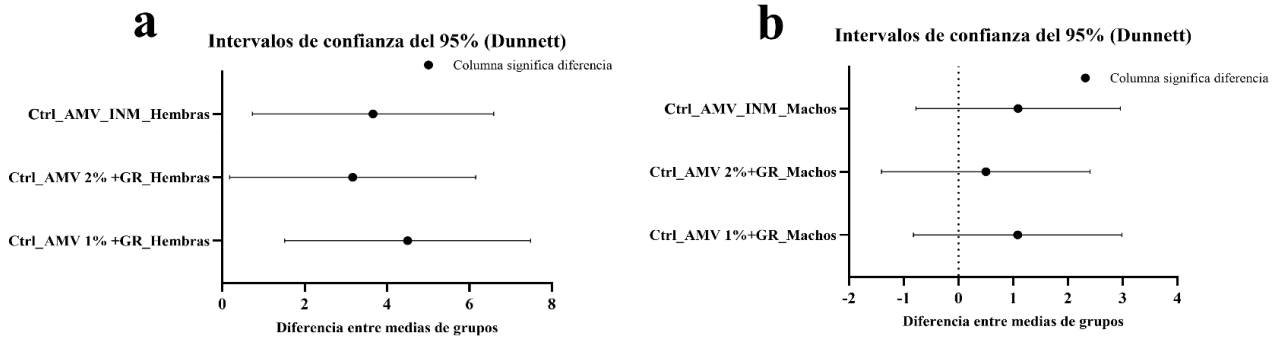


Figura 5: Intervalo de confianza (Dunnett) de medias de grupos experimentales en comparación con el grupo Ctrl en conteo de *C. rogercresseyi*.

5.2 Eficacia de vacunación por inmersión, utilizando adyuvante Montanide 1312 VG

La vacuna antimicrobiota, formulada con el adyuvante Montanide 1312 VG, específico para inmersión, no mostró resultados satisfactorios. Aunque todos los peces sobrevivieron inmediatamente después de la administración, a los 15 minutos post-tratamiento se observó una mortalidad del 100% en el grupo tratado.

5.3 Evaluación de genes de respuesta inmune en *S. salar* inmunizados con vacuna antimicrobiota oral e infectados con *C. rogercresseyi*

En este estudio, se evaluó la respuesta inmune de *S. salar* frente a la infección por *C. rogercresseyi* utilizando diferentes tratamientos. La evaluación se realizó mediante la expresión relativa de genes asociados a la inmunidad innata, adaptativa, síntesis de hierro y estrés oxidativo, tanto en el riñón anterior como en la piel.

El riñón anterior es un órgano clave en la respuesta inmune de los peces, ya que participa en la producción de células inmunitarias y en la activación de respuestas frente a patógenos. Por esta razón, se eligió este tejido para analizar la expresión relativa de genes relacionados con la inmunidad innata y adaptativa, antes (T0) y después (T1) de la infección. Los genes analizados incluyen IL-1 β , un mediador proinflamatorio fundamental en la respuesta inmune innata. CD4, marcador de linfocitos T colaboradores implicado en la inmunidad adaptativa y TLR13 y TLR22, receptores tipo Toll involucrados en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos. A continuación, se presentan los resultados de la expresión relativa de estos genes en los distintos grupos experimentales.

Además, se analizó la expresión relativa de genes involucrados en la síntesis de hierro y en la respuesta al estrés oxidativo en el riñón anterior. Los genes evaluados incluyen Ferritina, una proteína clave en el almacenamiento y regulación del hierro intracelular. GSHPx (Glutación peroxidasa), una enzima antioxidante que protege las células contra el daño oxidativo. SOD (Superóxido dismutasa), una enzima que facilita la conversión del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Catalasa, una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, contribuyendo a la protección celular. A continuación, se presentan los resultados de la expresión relativa de estos genes en los diferentes grupos experimentales.

Del análisis de expresión relativa en *S. salar* del gen IL-1 β en riñón anterior (Figura 6.a), se observó que antes de la infección (T0), la expresión relativa de IL-1 β en el grupo Ctrl fue alta y similar a la observada en el grupo INM (Inmersión), sin diferencias significativas (ns) entre ellos. Los grupos tratados, GR1 y GR2, mostraron niveles de expresión bajos y sin diferencias significativas entre ellos (ns). Sin embargo, sus niveles fueron significativamente bajos ($P < 0,0001$) en comparación con los grupos Ctrl e INM. Posterior a la infección (T1), la expresión de IL-1 β en el grupo Ctrl disminuyó significativamente ($P < 0,0001$) en comparación con los grupos GR1 e INM. Los niveles más altos en T1 se observaron en GR1 e INM, sin diferencias significativas entre ellos (ns). Por su parte, GR2 también presentó un aumento en su expresión respecto a T0, pero su nivel fue significativamente menor ($P < 0,0001$) que el de GR1.

El análisis de expresión relativa del gen CD4 en riñón anterior (Figura 6.b) mostró que en el tiempo T0, el grupo Ctrl tuvo una mayor expresión, seguida por el grupo INM, con una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,0236$). Los grupos GR1 y GR2 mostraron niveles de expresión bajos, con una diferencia moderada entre ellos ($P < 0,0091$) y significativamente altas ($P < 0,0001$) en comparación con los grupos Ctrl e INM. En el tiempo T1, la expresión en el grupo Ctrl disminuyó drásticamente respecto a T0 convirtiéndose en el grupo con menor actividad. Aunque la expresión también disminuyó en el grupo INM, esta reducción fue menor y siendo significativamente menor ($P < 0,0215$) en comparación con el grupo Ctrl. En contraste, los grupos GR1 y GR2 mostraron un aumento en su expresión respecto a T0, sin diferencias significativas entre ellos (ns), pero con niveles significativamente superiores ($P < 0,0001$) al grupo Ctrl. Además, se observó que la expresión en el grupo GR1 fue ligeramente mayor que en INM, con una diferencia significativa ($P < 0,0115$), mientras que entre INM y GR2 hubo una diferencia moderada ($P < 0,0004$).

En la evaluación de la expresión relativa del gen TLR13 en riñón anterior (Figura 6.c), mostró que en el tiempo T0, la expresión del gen TLR13 fue significativamente mayor ($P < 0,0001$) en el grupo Ctrl en comparación con los grupos GR1, GR2 e inmersión, entre los cuales no se observaron diferencias significativas (ns). En el tiempo T1, la expresión en el grupo Ctrl disminuyó significativamente, alcanzando niveles similares a los observados en los grupos GR1 y INM, sin diferencias significativas entre ellos (ns). Tanto GR1 como inmersión experimentaron un aumento en su expresión respecto a T0. Por otro lado, la expresión en el grupo GR2 mostró una disminución en T1, presentando diferencias estadísticamente significativas con GR1 ($P < 0,0014$), inmersión ($P < 0,0005$) y Ctrl ($P < 0,0222$).

Al examinar la expresión relativa del gen TLR22 en riñón anterior (Figura 6.d), se observó que en el tiempo T0, la expresión del gen TLR22 fue significativamente mayor ($P < 0,0001$) en el grupo Ctrl en comparación con el resto de los grupos. Los grupos GR1 e INM mostraron niveles bajos de expresión, sin diferencias significativas entre ellos (ns). El grupo GR2 presentó la menor expresión, con diferencias estadísticamente significativas respecto a GR1 ($P < 0,0198$) e inmersión ($P < 0,0123$). En el tiempo T1, la expresión en el grupo Ctrl disminuyó considerablemente, mientras que los grupos GR1 e INM aumentaron su expresión, aunque no se observaron diferencias significativas entre ellos ni en comparación con el grupo Ctrl. En contraste, el grupo GR2 mostró una disminución adicional en su expresión, siendo significativamente menor ($P < 0,0001$) que los grupos GR1 y INM, y también significativamente inferior al grupo Ctrl ($P < 0,0017$).

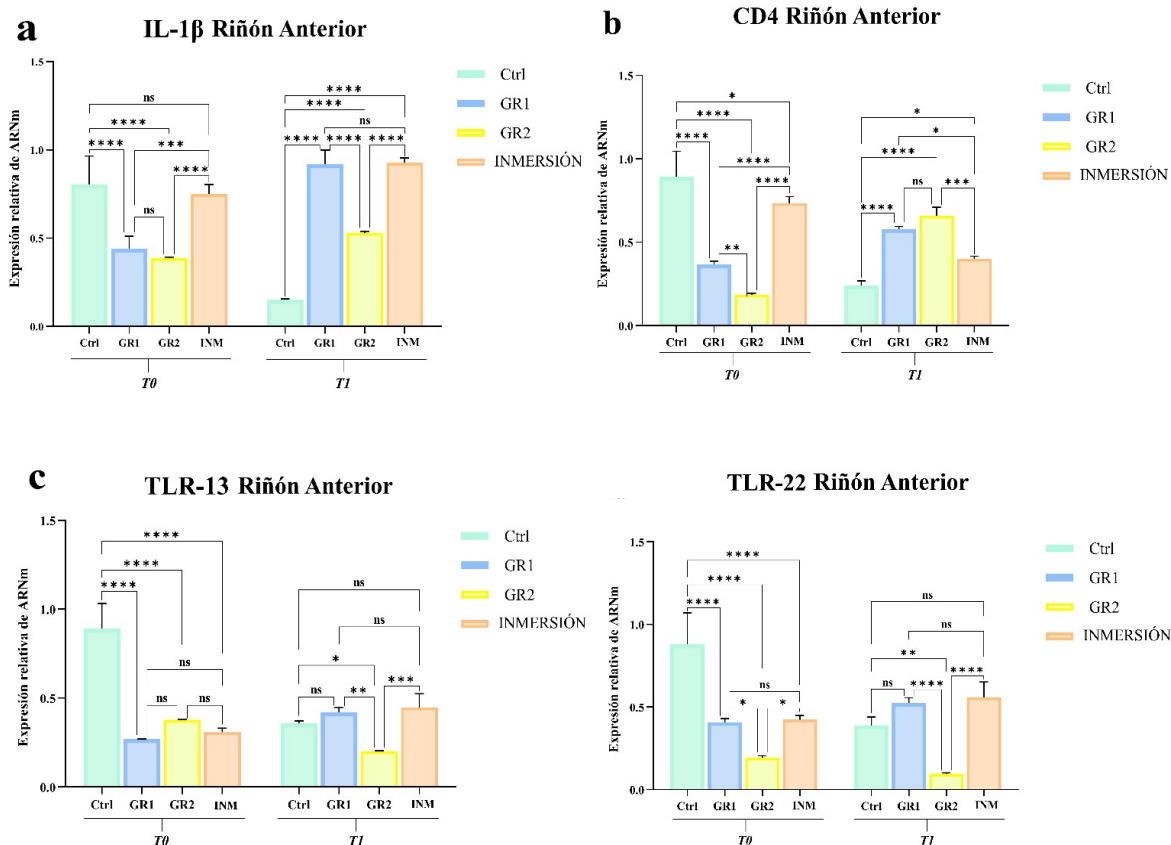


Figura 6: Niveles de expresión relativa de mRNA para IL-1 β , CD4, TLR13 Y TLR22 en riñón anterior, genes asociados principalmente al sistema inmune, siendo T0 400 UTA post-inmunización, T1 25 días post-infección (dpi). El nivel de expresión génica se normalizó utilizando β -actina como gen de referencia (Housekeeping) y SYBR Green como método de detección. Las barras verticales representan la media aritmética, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas ($*p < 0,05$), y 'ns' señala diferencias no significativas en la expresión génica entre los grupos y tiempos evaluados. el análisis estadístico se realizó mediante un anova de dos vías (TWO-WAY ANOVA).

El estudio de la expresión relativa del gen Ferritina en riñón anterior (Figura 7.a) mostró, en el tiempo T0, la mayor actividad en el grupo Ctrl, seguido del grupo GR1, sin diferencias significativas (ns). El grupo INM presentó una actividad significativamente menor que el grupo Ctrl ($P<0,0023$), mientras que el grupo GR2 tuvo una actividad significativamente más baja en comparación con el grupo Ctrl ($P<0,0001$). Entre los grupos GR1: INM e INM:GR2, no se observaron diferencias significativas (ns). En el tiempo T1, la actividad de los grupos GR1, GR2 e INM aumentó. El grupo GR1 presentó un incremento significativamente mayor que los demás grupos ($P<0,0001$). La actividad del grupo GR2 fue significativamente mayor que la del grupo INM ($P<0,001$), mientras que el grupo Ctrl disminuyó su actividad significativamente en comparación con los demás grupos ($P<0,0001$).

En la cuantificación de la expresión relativa del gen GSHPx en riñón anterior (Figura 7.b), se detectó en el tiempo T0, la mayor actividad en el grupo Ctrl, seguido por el grupo GR1, sin diferencias significativas (ns). El grupo INM presentó diferencias significativas con respecto al grupo GR1 ($P<0,0100$), mientras que el grupo GR2 mostró diferencias significativas con GR1 ($P<0,0052$). Se observaron diferencias significativas entre los grupos Ctrl:GR2 ($P<0,0014$) y Ctrl:inmersión ($P<0,0027$). En el tiempo T1, la actividad del grupo Ctrl disminuyó, mientras que el grupo GR1 aumentó significativamente su actividad en comparación con los demás grupos ($P<0,0001$). Los grupos GR2 e inmersión también mostraron un aumento, pero sin diferencias significativas entre ellos (ns). Entre los grupos Ctrl:GR2 hubo diferencias significativas ($P<0,0045$), mientras que entre Ctrl:inmersión las diferencias fueron mayores ($P<0,0002$).

El perfil de expresión relativa del gen SOD en riñón anterior (Figura 7.c), evidenció, en el tiempo T0, una actividad similar en los grupos Ctrl, GR1 y INM, sin diferencias significativas entre ellos (ns). El grupo GR2 presentó una actividad más baja, significativamente menor en comparación con el grupo Ctrl ($P<0,0001$), así como con los grupos GR1 ($P<0,001$) y INM ($P<0,001$). En el tiempo T1, todos los grupos incrementaron su actividad. El grupo INM mostró la mayor actividad, seguido por GR2, con diferencias significativas menores ($P<0,0160$). El grupo GR1 presentó una actividad significativamente mayor que el grupo inmersión ($P<0,0057$), mientras que el grupo Ctrl tuvo una actividad significativamente más baja en comparación con INM ($P<0,0001$).

La caracterización de la expresión relativa del gen Catalasa en riñón anterior (Figura 7.d), permitió observar, en el tiempo T0, una alta actividad en el grupo Ctrl, significativamente mayor en comparación con GR1 ($P<0,001$), GR2 ($P<0,0001$), e INM ($0,002$). Los grupos GR1 e inmersión presentaron actividades similares, sin diferencias significativas (ns), mientras que GR2 mostró una actividad significativamente menor en comparación con INM ($P<0,0255$). En el tiempo T1, la actividad del grupo Ctrl disminuyó significativamente en comparación con el grupo GR1 ($P<0,0001$). Los grupos GR1, GR2 y INM aumentaron su actividad, sin diferencias significativas entre ellos (ns), aunque GR1 presentó la mayor actividad. Hubo diferencias significativas entre Ctrl y GR2 ($P<0,0038$), así como entre Ctrl y INM ($P<0,0011$).

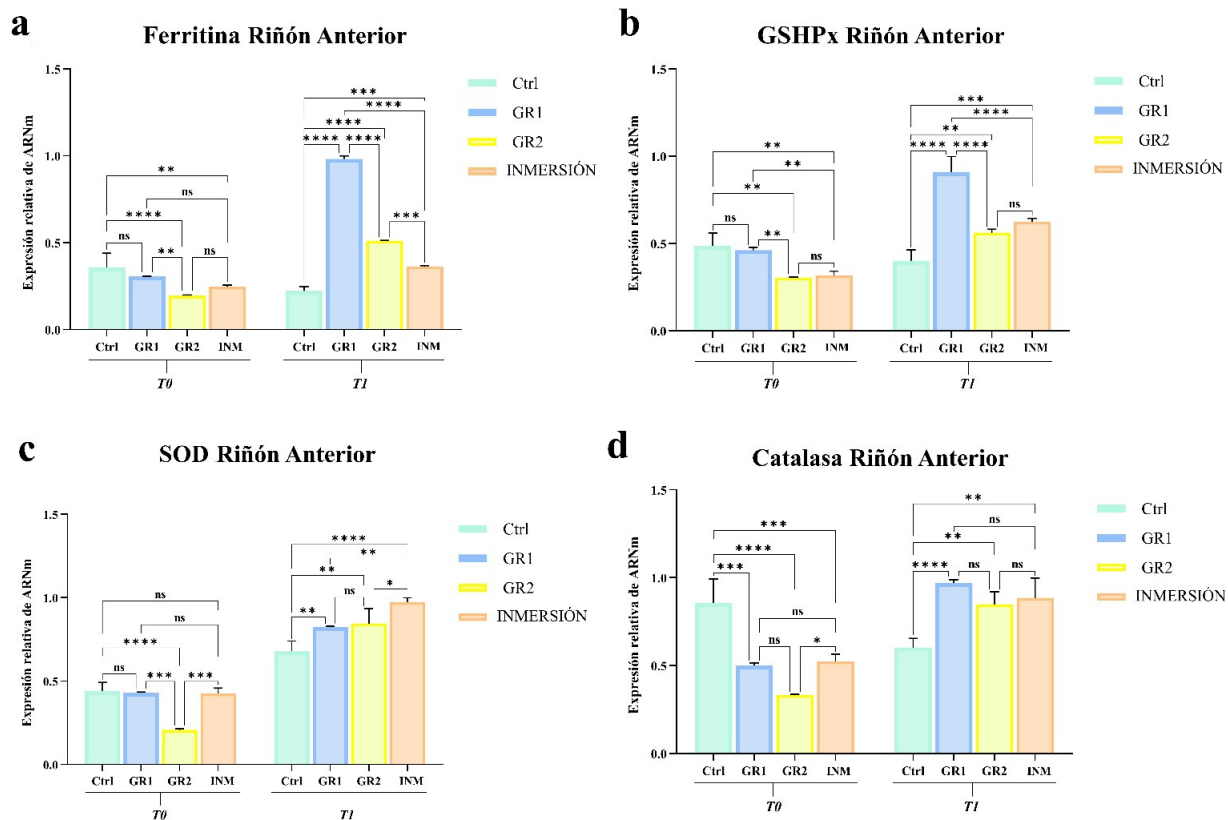


Figura 7: Niveles de expresión relativa de mRNA para Ferritina, GSHPx, SOD y Catalasa en riñón anterior, siendo T0 400 UTA post-inmunización y T1 25 días post-infección (dpi). El nivel de expresión génica se normalizó utilizando β -actina como gen de referencia (Housekeeping) y SYBR Green como método de detección. Las barras verticales representan la media aritmética, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas ($*p < 0,05$), y 'ns' señala diferencias no significativas en la expresión génica entre los grupos y tiempos evaluados. el análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías (TWO-WAY ANOVA).

El análisis de componentes principales (ACP) en riñón anterior (Figura 8) mostró dos factores principales que explican conjuntamente una variabilidad de expresión del 79.6%, representando el primer componente principal (Dim 1) el 53.7% y el segundo componente principal (Dim 2) el 25.9%. Los grupos con vacuna antimicrobiota oral GR1, GR2 y vacuna por Inmersión se agrupan principalmente en la región asociada a la expresión de genes de estrés oxidativo Catalasa, SOD, GSHPx y regulación del hierro Ferritina, lo que sugiere una respuesta más pronunciada en el ámbito de estrés oxidativo y hierro en comparación a el grupo Ctrl, que tuvo expresión basal de genes asociadas al sistema inmune IL-1b, CD4 y TLR22 al no tener tratamientos. El grupo con mejor respuesta antioxidante fue GR1. El grupo GR2 mostró una leve presencia en la región de estrés oxidativo, mientras que el grupo Inmersión (INM) presentó distribución en ambas

regiones, asociándose tanto a genes de respuesta inmune como de estrés oxidativo, aunque en menor magnitud.

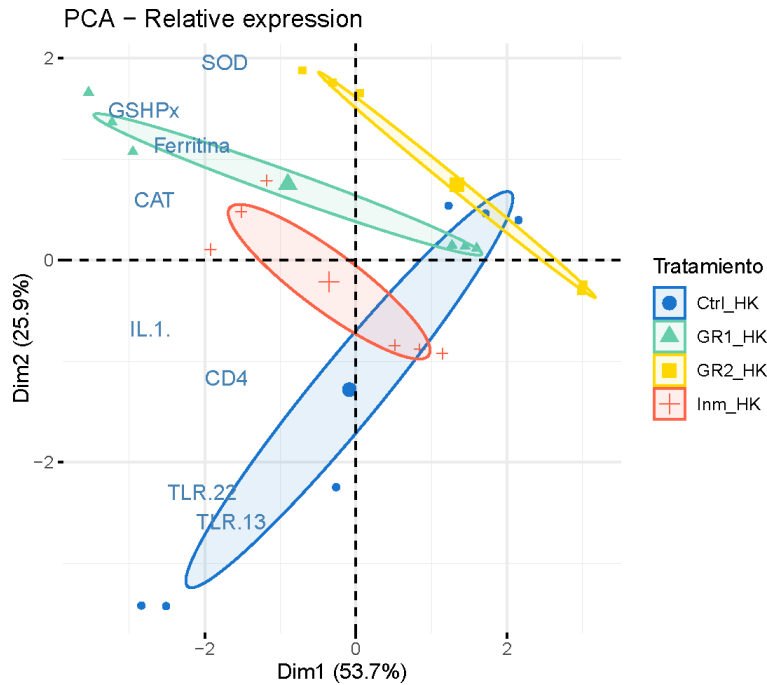


Figura 8: Análisis de componentes principales (ACP) para los 8 genes relacionados con la respuesta inmune, estrés oxidativo y secuestro de hierro (IL-1 β , CD4, TLR13, TLR22, Ferritina, GSHPx, SOD y Catalasa) expresados en riñón anterior de salmón del Atlántico, en peces inmunizados con vacuna antimicrobiota oral (GR1 y GR2), vacuna por inmersión y grupo control. Los valores de expresión relativa se utilizaron como variable dependiente, mientras que la variable independiente correspondió a los diferentes grupos.

La respuesta inmune en *S. salar* frente a la infección por *C. rogercresseyi* fue evaluada mediante la expresión relativa de genes asociados a la inmunidad innata y adaptativa en la piel. Este estudio se centró en comparar los efectos entre grupos tratados con vacunas orales y aquellos tratados por inmersión. Se analizó la expresión relativa de genes involucrados en la respuesta inmune en la piel de *S. salar* antes (T0) y después (T1) de la infección. La piel fue seleccionada para este análisis debido a su papel crucial como primera línea de defensa contra patógenos. La piel no solo actúa como una barrera física, sino que también alberga diversas células inmunitarias que interactúan para mantener la homeostasis del tejido e inducir respuestas inmunitarias. Evaluar la respuesta inmune en la piel permite obtener una visión directa de cómo el organismo responde a la infección en su punto de entrada y primera línea de defensa. Los genes evaluados fueron, IL-1 β , mediador clave en la respuesta inflamatoria y parte de la inmunidad innata. CD4, marcador de linfocitos T colaboradores implicado en la inmunidad adaptativa. TLR13 y TLR22, receptores tipo Toll que detectan patrones moleculares asociados a patógenos y activan la respuesta inmune. Ferritina, implicada en la regulación del hierro y en la respuesta frente al estrés oxidativo. GSHPx (Glutación peroxidasa), enzima antioxidante que protege contra el daño causado por los radicales libres. SOD (Superóxido dismutasa), enzima antioxidante que juega un papel crucial en la defensa celular contra el daño de especies reactivas de oxígeno. Catalasa, enzima que descompone el peróxido de hidrógeno,

contribuyendo a la protección celular frente al estrés oxidativo. A continuación, se presentan los resultados de la expresión relativa de estos genes en los diferentes grupos experimentales.

En el análisis de expresión relativa del gen IL-1 β en piel (Figura 9.a) se observó, que en el tiempo t0, el grupo con mayor actividad fue GR1, seguido de GR2 con una alta significancia (P<0,0001), seguido del grupo inmersión con alta significancia (P<0,0001), el grupo Ctrl presenta una actividad baja, significativamente mayor con todos los demás grupos (P<0,0001). En el tiempo 1 el Grupo Ctrl e inmersión aumentaron su actividad sin significancia entre ambos (ns), mientras los grupos GR1 y GR2 disminuyeron su actividad, siendo GR2 el grupo con menor actividad y mayor significancia con el resto de los grupos (P<0,0001), además existe significancia entre grupos GR1 e inmersión (P< 0,0009) y entre Ctrl y GR1 no se observa significancia (ns).

En el análisis de expresión relativa del gen CD4 en piel (Figura 9.b) mostró que, en el tiempo t0, el grupo con mayor actividad fue GR2, significativamente mayor a todos los demás grupos (P<0,0001), seguido del grupo GR1 e inmersión, con una significancia menor (P<0,0026) y finalmente el grupo Ctrl con menor actividad, sin tener significancia en comparación con el grupo inmersión (ns) y teniendo significancia si lo comparamos con el grupo GR1 (P<0,0005). En el tiempo 1 los grupos Ctrl, GR1 e inmersión aumentaron su actividad, el grupo con mayor actividad fue GR1 significativamente mayor que todos los demás grupos (P<0,0001), le sigue el grupo inmersión y Ctrl sin significancia entre ellos y finalmente el grupo con menor actividad GR2 con alta significancia en comparación con Ctrl e inmersión (P<0,0001).

En el análisis de expresión relativa del gen TLR13 en piel (Figura 9.c) se observó que, en el tiempo t0, el grupo con mayor actividad fue GR2, con alta significancia en comparación con los grupos Ctrl e inmersión (P<0,0001), seguido de GR1 con una baja significancia (P<0,0018), le sigue el grupo inmersión con una alta significancia en comparación con el grupo GR1 (P<0,0001) y finalmente el grupo Ctrl sin significancia en comparación con el grupo inmersión (ns), pero alta significancia en comparación con el grupo GR1. En el tiempo 1 el grupo con mayor actividad fue Ctrl, significativamente que los grupos GR1 y GR2 (P<0,0001) y con menor significancia con el grupo inmersión (P<0,0007), el grupo inmersión presenta una alta actividad en comparación con el grupo GR1, con significancia (P<0,0076), mientras que el grupo GR1 no presenta significancia en comparación con el grupo GR2 (ns), y el grupo con menor actividad GR2 presenta diferencia significativa en comparación con el grupo inmersión (P<0,0001).

En el análisis de expresión relativa del gen TLR22 en piel (Figura 9.d) mostró que, en el tiempo t0, el grupo con mayor actividad fue GR2, significativamente mayor que el resto de los grupos ($P < 0,0001$), le sigue el grupo GR1 con una alta significancia con comparación con Ctrl e inmersión ($P < 0,0001$), finalmente el grupo inmersión no presenta diferencias significativas en comparación con Ctrl (ns). En el tiempo 1, los grupos Ctrl, GR1 e inmersión aumentaron su actividad, siendo GR1 el grupo con mayor actividad, sin embargo, no presenta significancias en comparación con grupos Ctrl e inmersión, sin embargo, el grupo con menor actividad GR2, presenta alta significancia con el resto de los grupos ($P < 0,0001$).

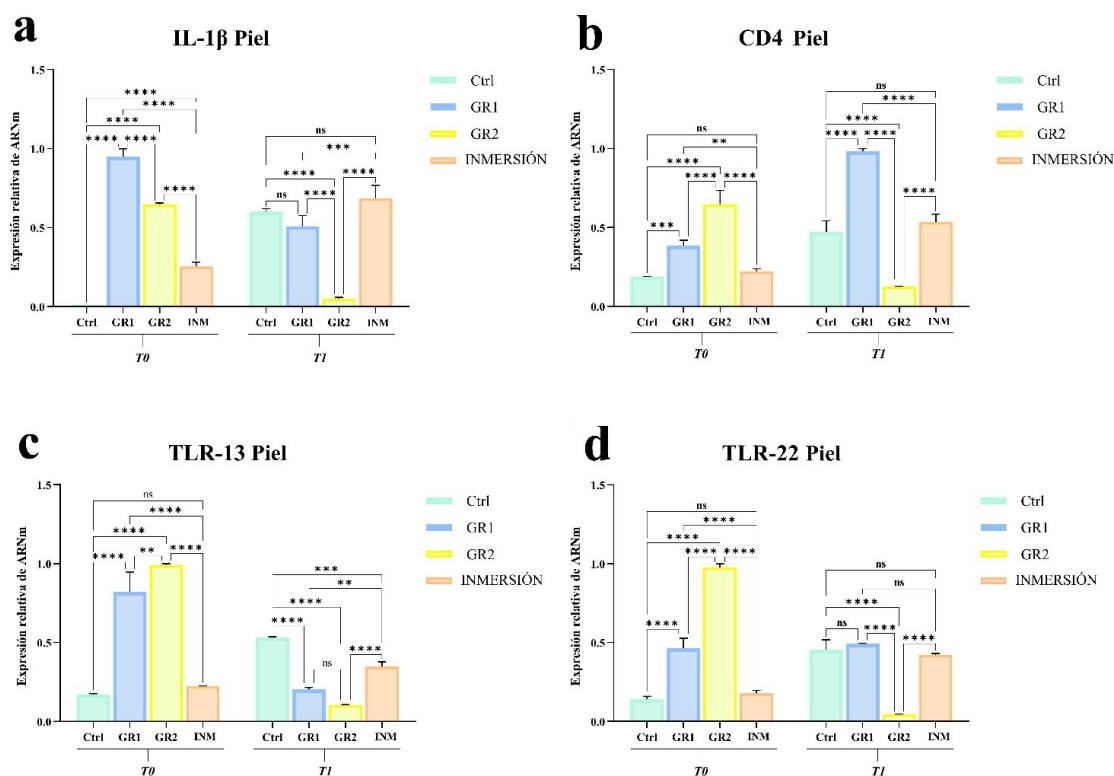


Figura 9: Niveles de expresión relativa de mRNA para IL-1 β , CD4, TLR13 Y TLR22 en piel, siendo T0 400 UTA post-inmunización y T1 25 días post infección (dpi). El nivel de expresión génica se normalizó utilizando β -actina como gen de referencia (Housekeeping) y SYBR Green como método de detección. Las barras verticales representan la media aritmética, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$), y 'ns' señala diferencias no significativas en la expresión génica entre los grupos y tiempos evaluados. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías (TWO-WAY ANOVA).

En el análisis de expresión relativa del gen Ferritina en piel (Figura 10.a) se observó, en el tiempo 0, que el grupo con mayor actividad fue GR2, con diferencias significativas con el resto de los grupos ($P < 0,0001$), seguido por el grupo GR1, también con diferencias significativas con el resto de los grupos ($P < 0,0001$), seguidamente el grupo inmersión presenta significancia en comparación con grupo Ctrl ($P < 0,0002$),

siendo grupo Ctrl el grupo con menor actividad. En el tiempo 1 los grupos Ctrl, GR2 e inmersión aumentaron su actividad, siendo el grupo inmersión representante de mayor actividad y una alta significancia en comparación con el grupo GR1 ($P<0,0001$) y Ctrl ($P<0,0001$), seguido por GR2 sin diferencias significativas (ns) en comparación con inmersión, seguidamente el grupo Ctrl presenta una alta actividad con diferencias significativas ($P<0,0001$) en comparación con el grupo GR1 y GR2, el grupo con menor actividad fue GR1 con una alta significancia en comparación con GR2 ($P<0,0001$).

En el análisis de expresión relativa del gen GSHPx en piel (Figura 10.b) mostró que, en el t0, el grupo con mayor actividad es GR1, significativamente mayor que el resto de los grupos ($P<0,0001$), seguidamente el grupo inmersión presenta alta actividad, similar el grupo GR2, entre ellos no presentaron significancias (ns), finalmente el grupo Ctrl presenta la menor actividad, significativamente menor en comparación con grupos GR2 e inmersión ($P<0,0001$). En el tiempo 1 los grupos Ctrl, GR2 e inmersión aumentaron su actividad, siendo inmersión el grupo con mayor actividad, significativamente mayor a los demás grupos ($P<0,0001$), le sigue el grupo Ctrl, con una actividad similar al grupo GR2 sin significancias (ns), finalmente el grupo GR1 presenta una baja actividad, significativamente menor ($P<0,0001$) en comparación con Ctrl y GR2.

En el análisis de expresión relativa del gen SOD en piel (Figura 10.c) se observó que, en el tiempo 0, el grupo con mayor actividad fue GR1, significativamente mayor que el resto de los grupos ($P<0,0001$), seguidamente el grupo GR2 presenta alta actividad, no teniendo significancias con el grupo Ctrl (ns), finalmente el grupo con menor actividad fue inmersión, significativamente menor que GR2 ($P<0,0001$) y menor que Ctrl ($P<0,0003$). En el tiempo 1 los grupos Ctrl e inmersión aumentaron su actividad, siendo inmersión el grupo con mayor actividad, significativamente mayor que los demás grupos ($P<0,0001$), seguidamente Ctrl presenta alta actividad con alta significancia en comparación con GR2 ($P<0,0001$), mientras que el grupo con menor actividad fue GR1, significativamente menor que Ctrl y GR2 ($P<0,0001$).

En el análisis de expresión relativa del gen Catalasa en piel (Figura 10.d) mostró que, en el tiempo 0, el grupo inmersión tuvo la mayor actividad, seguido por grupo GR1 sin significancias (ns), el grupo GR2 presenta una actividad menor, significativamente menor al comparar con el grupo inmersión ($P<0,0012$), finalmente el grupo Ctrl presenta la actividad más baja en comparación con GR1, GR2 y inmersión ($P<0,0001$), entre grupos GR1 y GR2 no se observan significancias (ns). En el tiempo 1 el grupo inmersión presentó la mayor actividad significativamente mayor al resto de grupos, seguidamente GR2 presenta una actividad similar a Ctrl sin significancias (ns), finalmente el grupo con menor actividad fue GR1, significativamente menor en comparación con grupos Ctrl y GR2 ($P<0,0001$).

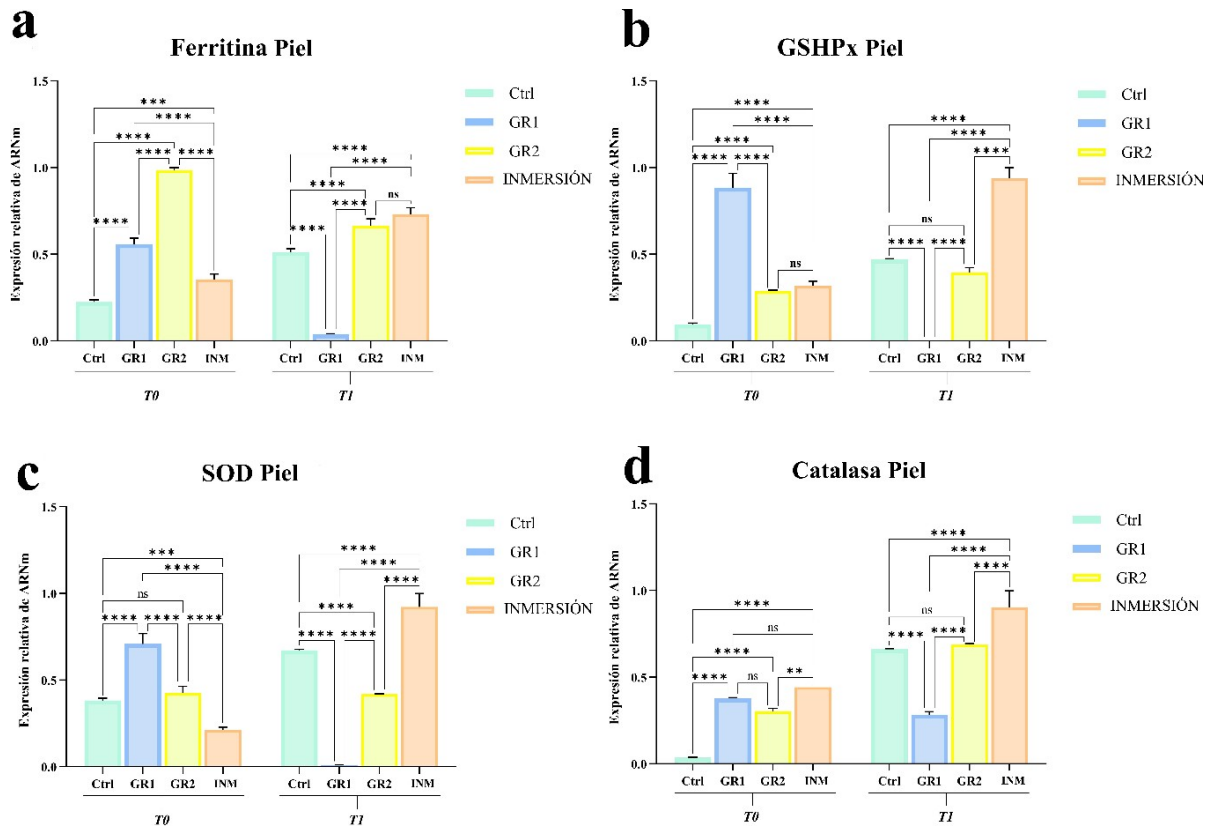


Figura 10: Niveles de expresión relativa de mRNA para Ferritina, GSHPx, SOD y Catalasa en piel, siendo T0 400 UTA post-inmunización y T1 25 días post infección (dpi). El nivel de expresión génica se normalizó utilizando β -actina como gen de referencia (housekeeping) y SYBR Green como método de detección. Las barras verticales representan la media aritmética, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas ($*P < 0,05$), y 'ns' señala diferencias no significativas en la expresión génica entre los grupos y tiempos evaluados. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías (Two-Way ANOVA).

El análisis de componentes principales (ACP) en piel (Figura 11) mostró dos factores principales que explican conjuntamente una variabilidad de expresión del 77.4%, representando el primer componente principal (Dim 1) el 48% y el segundo componente principal (Dim 2) el 29.4%. Se demostró que el grupo Ctrl, presentó una baja magnitud en regiones asociadas al estrés oxidativo. El grupo GR2, mostró una mayor presencia en la región asociada al sistema inmunológico como IL-1b, CD-4, TLR22 y TLR13. El grupo inmersión destacó en la región vinculada a los genes de estrés oxidativo, incluyendo Catalasa, SOD, GSHPx y Ferritina. Sin embargo, el grupo GR1 presentó la mayor magnitud en la región asociada al sistema inmunológico, abarcando también parte de la región vinculada al estrés oxidativo.

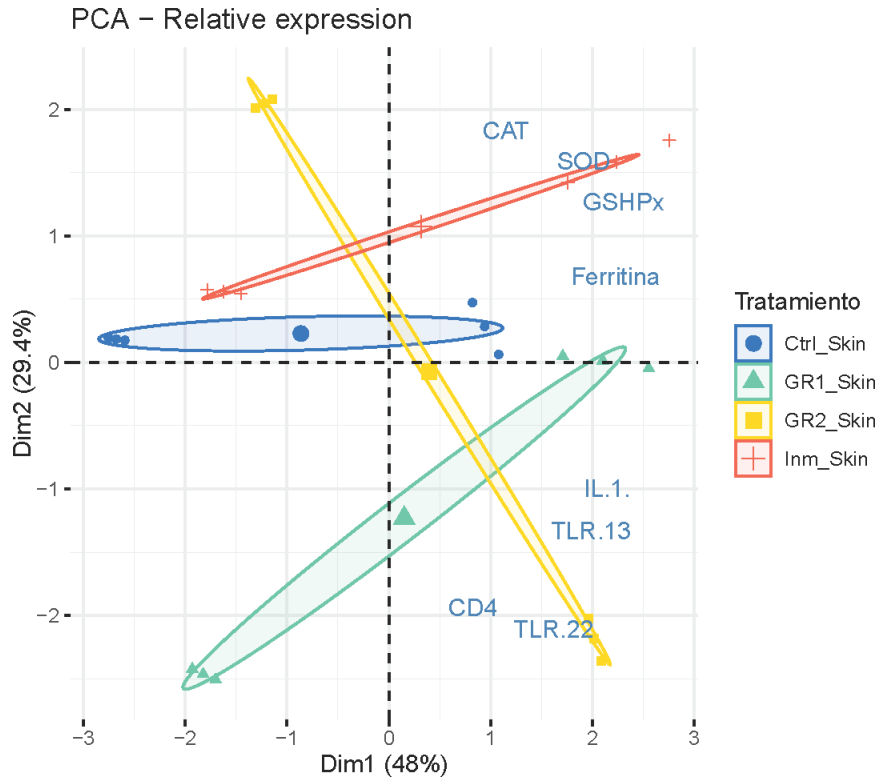


Figura 11: Análisis de componentes principales (ACP) para los 8 genes relacionados con la respuesta inmune, estrés oxidativo y secuestro de hierro (IL-1 β , CD4, TLR13, TLR22, Ferritina, GSHPx, SOD y Catalasa) expresados en piel, en peces inmunizados con vacuna antimicrobiota oral, vacuna por inmersión y grupo control. Los valores de expresión relativa se utilizaron como variable dependiente, mientras que la variable independiente correspondió a los diferentes grupos.

5.4 Evaluación de genes de respuesta inmune y estrés oxidativo en *C. rogercresseyi* extraídos de *S. salar* inmunizados con vacuna antimicrobiota oral e inmersión.

En el análisis de expresión relativa del gen Ferritina en *C. rogercresseyi* (Figura 12.a), el grupo con mayor actividad fue CTRL, sin significancias en comparación con inmersión (ns), sin embargo, al compararlo con GR1 se observa alta significancia ($P < 0,0010$) y al compararlo con GR2, se observa significancia media ($P < 0,0014$), el grupo con menor actividad fue GR1, sin significancia en comparación con GR2, existe significancia entre grupos GR1: inmersión ($P < 0,0277$) y GR2: inmersión ($P < 0,0429$).

Al examinar la expresión relativa del gen PHGp en *C. rogercresseyi* (Figura 12.b), el grupo con mayor actividad fue el grupo CTRL, sin significancias en comparación con el grupo GR1 (ns), el segundo grupo con mayor actividad fue inmersión, significativamente menor que CTRL ($P < 0,0396$), sin embargo, este grupo no presenta significancia con el grupo GR1, sin embargo, GR1 con el grupo GR2 si tienen diferencia significativa ($P < 0,0001$), además existe significancia entre CTRL y GR2 ($P < 0,0316$).

En la evaluación de la expresión relativa del gen *Catalasa* en *C. rogercresseyi* (Figura 12.c), el grupo con mayor actividad fue GR2, significativamente mayor que el grupo GR1 ($P < 0,0001$), mientras que si se compara GR2, con grupos CTRL ($P < 0,0165$) y inmersión muestran una significancia menor ($P < 0,0154$), seguidamente el grupo CTRL presenta alta actividad, no presenta significancias en comparación con el grupo inmersión (ns), sin embargo, si presenta significancias con el grupo GR1 ($P < 0,0003$), el grupo inmersión también presenta significancias con el grupo GR1 ($P < 0,0003$), siendo este último el grupo con menor actividad.

El análisis de los niveles de expresión relativa en el gen *SOD* en *C. rogercresseyi* (Figura 12.d), el grupo con mayor actividad fue GR2 significativamente mayor que el grupo GR1 ($P < 0,0001$), mientras que los grupos CTRL se tuvo una significancia en comparación con GR2 ($P < 0,0002$) e inmersión tuvo menor significancia ($P < 0,0014$), grupos CTRL y inmersión no presentaron significancias (ns), mientras que GR1 presentó baja significancia en comparación con inmersión ($P < 0,0131$).

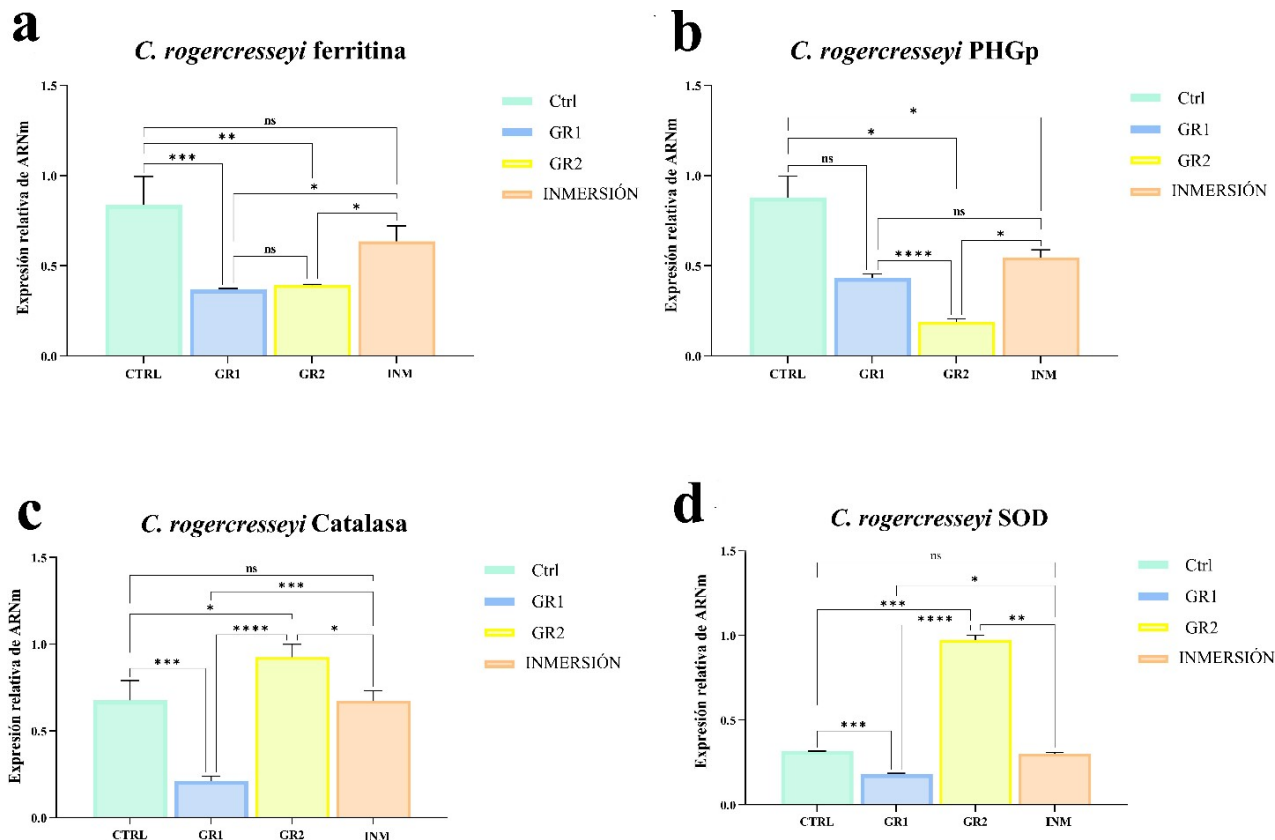


Figura 12: Niveles de expresión relativa de mRNA para Ferritina, PHGP, Catalasa y SOD en *C. rogercresseyi*, transcurrido 25 días post-infección. El nivel de expresión se normalizó utilizando β -tubulina como Housekeeping y como método de detección, SYBR Green. Las barras verticales representan la media aritmética, mientras que los asteriscos indican diferencias significativas ($*p < 0,05$) y 'ns' señala diferencias no significativas entre grupos y tiempos. El análisis estadístico fue realizado mediante un anova de dos vías (Two-Way anova).

El análisis de componentes principales (ACP) en *C. rogercresseyi* (Figura 13) mostró dos factores principales que explican conjuntamente una variabilidad de expresión del 98.4%, representando el primer componente principal (Dim 1) el 58.9% y el segundo componente principal (Dim 2) el 39.5%. El grupo Ctrl mostró una alta magnitud en la expresión de genes de Ferritina y PHGp. El grupo inmersión presentó una distribución similar a Cr_Ctrl, compartiendo la misma región asociada a la expresión de Ferritina y PHGp, pero en menor magnitud. El grupo GR2 destacó por una alta magnitud en la expresión del gen SOD. El grupo GR1 exhibió una baja magnitud en la expresión de todos los genes asociados, tanto al sistema inmunológico, como estrés oxidativo y Ferritina.

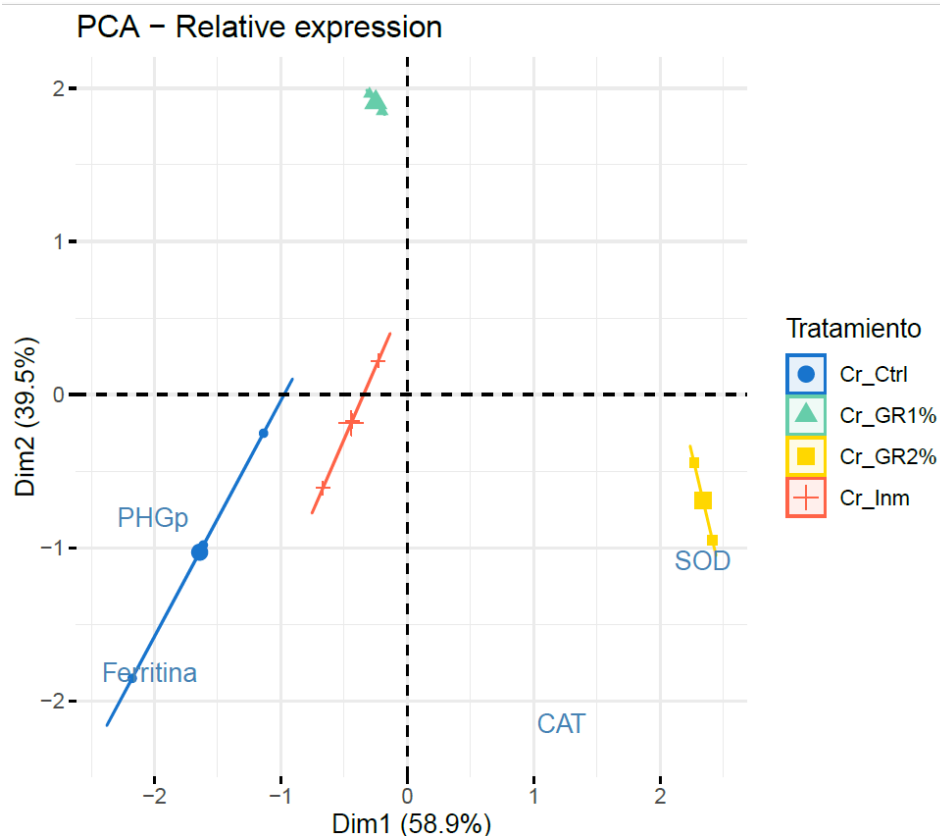


Figura 13: Análisis de componentes principales (ACP) para 4 genes relacionados con la respuesta inmune, estrés oxidativo y ferritina en *C. rogercresseyi* (Ferritina, PHGP, Catalasa y SOD) extraídos desde grupos experimentales y grupo control. Los valores de expresión relativa se utilizaron como variable dependiente, mientras que la variable independiente correspondió a los diferentes grupos.

6 DISCUSIÓN

Las vacunas antimicrobiota para inmunización del huésped contra bacterias clave representa una estrategia innovadora para manipular la microbiota de ectoparásitos. Este enfoque se basa en inducir la producción de anticuerpos específicos dirigidos a bacterias seleccionadas del microbiota, alterando así la composición microbiana en beneficio del huésped. Las vacunas antimicrobiota ofrecen una herramienta prometedora al permitir la modificación selectiva de taxones bacterianos críticos, lo que podría comprometer la aptitud biológica o interrumpir la transmisión de patógenos asociados en el caso de ectoparásitos como las garrapatas (Wu-Chuang et al., 2022). Además, se consideran métodos económicos, seguros y eficaces si se aplican los estándares necesarios (Pace et al., 1998).

Las vacunas orales en términos de aplicación tienen un mayor potencial para ser administradas comercialmente en la acuicultura, ya que es un método que tiene la característica de disminuir la manipulación de peces, lo que reduce el estrés (Embregts & Forlenza, 2016). Una situación similar ocurre con las vacunas por inmersión, ya que, si bien producen menos estrés que la vacunación por inyección, el aplicar este método implica sumergir o bañar a los peces en una solución con la vacuna, añadiendo más trabajo y posibilidades de error (Sudheesh & Cain, 2017), adicional a esto existen antecedentes que respaldan que la vacunación oral en *S. salar* proporciona una mayor protección que una vacuna por inmersión frente a yersiniosis (Ghosh et al., 2016).

En este seminario la vacuna antimicrobiota, está compuesta por bacterias inactivadas, las cuales por si solas no producen una alta respuesta inmune (Tafalla et al., 2013), ante esto, los adyuvantes pueden complementar la respuesta inmune para responder con más fuerza ante un patógeno, como es el caso de *S. salar* inmunizado con bacterias inactivadas con formalina, donde se utilizó un adyuvante denominado adyuvante incompleto de Freund FIA, el cual logró aumentar la respuesta inmune en comparación con el grupo sin adyuvante (van Gelderen et al., 2009).

En este seminario se evaluó el uso del adyuvante Montanide 1312 VG en la vacunación por inmersión, el producto demostró ser tóxico para *S. salar*, incluso en concentraciones bajas, induciendo mortalidad total en los grupos utilizados. Lo que contradice con un experimento en *O. mykiss*, donde se logró aumentar la tasa de supervivencia contra yersiniosis en comparación con el grupo control (Soltani et al., 2014). Esto nos demuestra que la efectividad del adyuvante varía en gran magnitud entre una especie y otra (Tammam et al., 2024).

Por otra parte, con la vacunación oral se logró una reducción de la carga parasitaria de *C. rogercresseyi*, principalmente en Caligus hembras, el grupo con mayor reducción de parásitos en comparación al grupo Ctrl fue GR1 con una reducción del 59,34% y el tratamiento con menor reducción de parásitos fue GR2 con 41,75%, mientras que el grupo inmersión presentó una reducción del 48,27%. Mientras que en Caligus machos, utilizando el mismo método, la situación fue diferente ya que se logró la reducción en el grupo GR1 de un 34,21%, mientras que en inmersión 34,42% y el grupo GR2 con menor reducción igual a 15,79%. Esto nos refleja que, el grupo GR1 mostró una efectividad superior a GR2, sugiriendo que la alta concentración de bacterias utilizadas en este último grupo podría exceder la capacidad fagocítica del pez

y causar estrés (Du et al., 2017). Por lo tanto, el grupo GR1 mostró mejores resultados en eficacia, evidenciados por la reducción de la carga parasitaria. El tratamiento de inmersión funcionó, en menor proporción que el grupo GR1 en hembras, esto puede deberse a varios factores que afectan en los tratamientos por inmersión como, la inestabilidad del antígeno y la baja cantidad absorbida (Moore et al., 1998). Para incrementar su efectividad, es fundamental ajustar múltiples variables que impactan la respuesta inmunológica. Entre estas se encuentran la temperatura del agua, el pH, la salinidad de la solución (Du et al., 2015), las propiedades del antígeno, el uso de adyuvantes, la concentración de la vacuna, el tiempo de inmersión y el estrés generado en los organismos (Heidari et al., 2016). Sin embargo, en la carga de *Caligus* machos, el grupo inmersión tuvo mayor reducción de parásitos que GR1, si bien no es una diferencia significativa, esto podría estar relacionado con la cantidad de parásitos hembras y machos fijados posterior a la inmunización, ya que la infección ocurrió cuando los piojos se encontraban en estadio copepodito, siendo imposible discriminar el sexo de los piojos al momento de infectar. La cantidad de piojos presentes en los peces analizados muestran una dominancia por piojos hembras en relación 1:1,85 (M/H). En *L. salmonis* esto se explica por la búsqueda de hembras por parte de los piojos machos que podrían incluir un cambio de hospedador (Ritchie et al., 1996), la proporción de piojos, el medio ambiente y el potencial reproductivo de los piojos (Cox et al., 2017), se sugiere que los componentes antes mencionados podrían ser similares en *C. rogercresseyi*.

Para evaluar la respuesta inmune en *S. salar* frente a la infección por *C. rogercresseyi*, se analizó cómo las vacunas antimicrobiota utilizadas modulan la expresión de genes asociados a la inmunidad, tales como IL-1b, CD4, TLR13 y TLR22, los cuales actúan como importantes indicadores de la activación y modulación respuestas inmunológicas, pudiendo ser analizados generalmente en riñón anterior (Salazar et al., 2016) y baso.

El aumento de la expresión del gen IL-1 β en piel, está asociado a una respuesta inflamatoria de la respuesta inmune innata, además es el precursor más importante de genes relacionados con la mucina (Enss et al., 2000), la cual es la encargada de producir y liberar mucus en la piel de los salmones. Si bien tanto la respuesta inflamatoria como la producción de mucus son respuestas defensivas favorables, también puede ser favorable para el parásito (Lindenstrøm et al., 2006), entregándole a *C. rogercresseyi* una oportunidad favorable de obtención de alimento, facilitando su génesis. En el tratamiento por inmersión se observó una evidente activación de genes de IL-1 β de mayor magnitud que los tratamientos orales, el método de administración y la concentración de bacterias utilizadas pudo inducir esta expresión elevada. Tras la infección, todos los grupos, exceptuando Ctrl, mostraron un aumento en la expresión de IL-1 β , siendo GR1 e inmersión los de mayor actividad, GR2 no aumentó en la misma magnitud, eso sugiere que existe una concentración óptima de bacterias inactivadas que puede potenciar la respuesta inmunitaria. En caso contrario, una alta concentración podría ser contraproducente, similar a los resultados obtenidos utilizando una vacuna oral con bacterias inactivadas de *S. agalactiae* en *Oreocromis sp*, donde se demostró que, una alta concentración de bacterias disminuyó la tasa de supervivencia (Le et al., 2024) , además, estos resultados son comparables con la infección de *L. salmonis* en *S. salar*, donde la infección provocó un aumento en la expresión de IL-1 β (Fast et al., 2006), respaldando los resultados de la vacuna antimicrobiota como una sobreexpresión en IL-1 β . En la piel de salmón del Atlántico expuestos a vacuna

oral e inmersión, la expresión de IL-1 β presentó un panorama diferente. El gen IL-1 β estuvo altamente expresado en los tratamientos antes de la infección, mientras que el grupo Ctrl tuvo una baja actividad, sugiriendo que el tratamiento con vacuna antimicrobiota oral e inmersión aumentó la respuesta inmune antes de la infección. Posterior a la infección el grupo Ctrl e inmersión aumentó la expresión del gen IL-1 β , mientras que en GR1 y GR2 disminuyó, este último grupo presentó la actividad más baja.

Por lo tanto, en riñón anterior, después de la infección, el gen IL-1 β se expresó con mayor actividad en grupo GR1 e inmersión. Mientras que en piel la expresión presenta una alta actividad antes de la infección, logrando preparar al pez de mejor manera ante una posible infección, siendo esta una reacción inmunitaria temprana y pronunciada, podría depender de mecanismos innatos (Lindenstrøm et al., 2003). Visto de esta manera, una baja actividad de IL-1 β en piel, podría verse como una respuesta epidérmica antiparasitaria, relacionada con la inanición debido al déficit productivo de mucus (Kania et al., 2010). La expresión del gen IL-1 β se expresó en mayor proporción en grupo inmersión, GR2 y GR1, este último siendo el de mayor actividad. En piel la actividad de mayor importancia fue el grupo inmersión. Esto puede estar respaldado por la acción de la vacuna por inmersión, ya que, aumenta inmunidad mucosal, al tener contacto directo (Gong et al., 2021). Los resultados sugieren que la respuesta inmune observada depende de la estrategia de tratamiento seleccionada. Además, en un estudio donde se evaluaron genes como IL-1 β , TLR22, GSHPx y Ferritina, la vacuna inyectable IPATH logró disminuir la actividad de IL-1 β tanto en piel como riñón, de la misma manera la actividad en TLR22 disminuyó en peces inmunizados con IPATH e infectados con *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Muñoz, Benavente, Casuso, Leal Acosta, et al., 2021).

El gen CD4 desempeña un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune adaptativa, actuando principalmente en las células T auxiliares (König et al., 2002). Este marcador está asociado con la activación y diferenciación de los linfocitos T específicos como Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras (Treg), lo que permite respuestas adaptativas altamente específicas, dependiendo del contexto inmunológico (Ruterbusch et al., 2020). Estas células pueden producir diferentes citoquinas, como IL-17, IL-4 o IFN- γ , modulando la respuesta inmune hacia un perfil celular o humoral dependiendo las necesidades (Zhu & Paul, 2008). Además, CD4 también desempeña un rol esencial en la detección de antígenos al interactuar con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII), facilitando la activación de los linfocitos T auxiliares en la inmunidad (Joyce, 2000). Estos tienen la capacidad de secretar grandes cantidades de IL-4 rápidamente tras la activación *in vivo* de sus receptores de antígenos, sin requerir un cebado previo a esta citocina (García et al., 1999). La IL-4, una citocina inmunomoduladora clave, polariza las células T auxiliares CD4⁺ recién activadas hacia una función efectora Th2, favoreciendo respuestas inmunes humorales (Mosmann & Coffman, 1989). Esto resalta la importancia del CD4 en la modulación de la inmunidad y en la coordinación de respuestas inmunológicas efectivas. Por lo tanto, estas funciones resaltan la importancia del CD4 en la activación, diferenciación de linfocitos T, modulación de la inmunidad y coordinación de respuestas inmunológicas efectivas. La actividad del gen CD4 en riñón anterior en los peces del grupo Ctrl mostró una alta actividad, representando una actividad basal de los salmones. Seguidamente el tratamiento inmersión presentó una

expresión alta del gen CD4, aunque ligeramente inferior al control, mientras que los tratamientos GR1 y GR2 mostraron una actividad significativamente más baja, sugiriendo que los tratamientos con vacunas antimicrobiota oral modularon a la baja la actividad de CD4 antes de la infección, ya que la modificación o alteración en la comunidad microbiana (Belkaid & Hand, 2014). Posterior a la infección, la actividad disminuyó significativamente en el grupo Ctrl, mientras que los tratamientos GR1 y GR2 experimentaron un aumento significativo en comparación con el control. Por su parte, el tratamiento inmersión redujo su actividad, aunque se mantuvo por encima del nivel observado en el control. Destacando que el uso de vacunas antimicrobiota oral y por inmersión modularon la expresión al alza del gen CD4 posterior a la infección, esto demuestra que el pez estuvo más preparado para afrontar la infección, ya que el gen CD4 está asociado a la inmunidad contra patógeno (Ashfaq et al., 2019). El gen CD4 en piel de salmón del Atlántico de los grupos GR1 y GR2 presentaron las actividades más altas, siendo esta última la más importante. Tras la infección el grupo GR1 aumentó significativamente su actividad, además del grupo inmersión que aumentó su expresión, superando al grupo control, esto nos refleja que la vacuna antimicrobiota oral e inmersión tuvieron una modulación al alza, posterior a la infección, obteniendo una actividad más fuerte el tratamiento oral que el tratamiento por inmersión, sin embargo al momento de ser infectados, la vacuna con mayor concentración de bacterias GR2 parece inmunosuprimir la actividad de CD4, obteniendo los mejores resultados el uso de vacuna GR1 y vacunación por inmersión. En este trabajo se utilizaron bacterias inactivadas para la elaboración de la vacuna antimicrobiota, sin embargo, en un estudio en el que se utilizaron inóculos inactivados de *P. salmonis* para infectar a *S. salar*, se observó un aumento en la expresión de CD4-1. Sin embargo, se sugiere que los inóculos inactivados inducen una respuesta inmune de menor intensidad en comparación con las bacterias vivas. Esto se debe a que la vacunación con la forma inactivada mejora solo la expresión de MHC I y MHC II, mientras que reduce las respuestas de CD8 e IgM (Martínez et al., 2023). En *S. salar* infectado con amebiasis branquial del salmón, se observó un aumento en la expresión de CD4, lo que proporciona evidencia de la infiltración y participación de la respuesta inmune celular, así como de la posible respuesta de anticuerpos en células B (Pennacchi et al., 2014). Si bien los resultados parecen prometedores, la actividad del gen CD4 se expresa con mayor proporción en otros tejidos, los cuales no fueron analizados en este seminario, por ejemplo, en *S. salar*, CD4 tiene dos moléculas: CD4-1, que cuenta con cuatro dominios y dos subtipos, a y b, y CD4-2, una molécula más corta con dos dominios. La expresión de CD4 se observa en diferentes tejidos, pero es más alta y representativa en el timo y el bazo (Moore et al., 2009).

El gen TLR13 se identifica generalmente como un receptor intracelular localizado en compartimentos endosómicos, especializado en la detección de RNA bacteriano. En *Labeo rohita*, se ha sugerido que podría activar la transducción de señales a través de vías adaptadoras como TRIF, promoviendo una respuesta inmunológica innata (Samanta et al., 2013). Este receptor reconoce secuencias específicas del RNA ribosomal bacteriano, lo que lo diferencia de otros TLRs endosómicos asociados a la detección de dsRNA viral. Aunque no se ha descrito su relación directa con la señalización mediada por TRIF, su activación puede producir citocinas proinflamatorias a través de la vía MyD88 (Lin et al., 2013). En peces teleosteos, el gen que codifica para el TL13 se expresa predominantemente en tejidos inmunitarios y

muestra homología entre especies como *S. salar* y *O. mykiss* (Cuvillier-Hot et al., 2011). En base los resultados obtenidos el gen TLR13 en riñón anterior ocurrió una situación similar, antes de la infección, la expresión de TLR13 en grupo control fue significativamente alta en comparación con los tratamientos, reflejando que los tratamientos utilizando vacuna antimicrobiota, modularon a la baja la actividad de TLR13 antes de la infección. Posterior a la infección, el grupo control disminuyó su expresión de gen TLR13 y tratamientos como GR1% e inmersión aumentaron su actividad, superando a la actividad del grupo control, el grupo GR2% disminuyó su actividad génica, posiblemente por la concentración de bacterias presentes en la vacuna oral, otra información que respalda el uso de una correcta concentración. Sin duda los tratamientos que utilizaron vacuna antimicrobiota oral tuvieron un efecto modulador positivo en comparación al grupo Ctrl.

El gen TLR13 en piel de salmón del Atlántico previo a la infección en el grupo Ctrl presentó una baja actividad, similar al grupo inmersión, mientras que los grupos con mayor expresión de TLR13 fueron GR1 y GR2. Posterior a la infección en el grupo Ctrl e inmersión hubo un aumento de la expresión de TLR13, mientras que en los grupos GR1 y GR2 disminuyeron su actividad. Sugiriendo que la vacuna antimicrobiota oral modula positivamente la expresión de TLR13 antes de la infección, sin embargo, posterior a la infección los grupos con vacuna antimicrobiota oral modularon a la baja la expresión de TLR13. En riñón anterior, la vacuna antimicrobiota oral moduló la respuesta al alza, posterior a la infección. Mientras que, en piel, la modulación al alza ocurre antes de la infección. Esta información concuerda con estudios realizados en *S. salar* y *O. kisutch* infectados con *C. rogercresseyi*, donde el gen TLR13 se expresa en mayor proporción en *O. kisutch*, sugiriendo un posible papel durante la respuesta a la infestación con parásitos en comparación con *S. salar* (Valenzuela-Muñoz et al., 2016)

El gen TLR22 puede utilizarse como indicador de la respuesta inmune, este es expresado en tejidos de alta actividad inmunológica como lo es el bazo y riñón anterior, en el caso de infección con bacteria patógena *A. salmonicida* aplicado en *O. mykiss*, provoca un aumento en la actividad de TLR22, con una respuesta más pronunciada a las 24 hrs de exposición (Rebl et al., 2007). En este estudio el gen TLR22 en riñón anterior de salmón del Atlántico tuvo una alta expresión en el grupo Ctrl, antes de la infección, mientras que tratamientos como GR1 e inmersión tuvieron una menor actividad significativamente, el tratamiento GR2 mostró la actividad más baja. Posterior a la infección, la actividad del grupo Ctrl disminuyó significativamente, mientras que tratamientos como GR1 e inmersión aumentaron su actividad, superando al grupo Ctrl, el tratamiento GR2, volvió a disminuir su actividad en comparación con el tiempo 0. Esto nos sugiere que la vacuna antimicrobiota con una concentración de 2% de bacterias, moduló negativamente la expresión del gen TLR22, mientras que la vacuna con una concentración de bacterias al 1% tuvo mejor actividad, al igual que la vacunación por inmersión. En el gen TLR22 en piel, el grupo significativamente con mayor actividad fue GR2, seguido por GR1, Ctrl e inmersión, estos dos últimos con actividades similares. Posterior a la infección, tanto el grupo Ctrl como GR1 e inmersión aumentaron su expresión, la mayor expresión fue en el tratamiento GR1. El tratamiento GR2 disminuyó significativamente su actividad. Esto nos indica que, en piel, antes de la infección, los tratamientos con

vacuna antimicrobiota oral, aumentaron significativamente la actividad del gen TLR22, sin embargo, la actividad disminuye posterior a la infección, destacando GR1 una actividad mayor en comparación al Ctrl, el tratamiento con vacuna antimicrobiota con concentración al 1% tuvo una mayor modulación de expresión de TLR22. Estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio realizado en *L. rohita* infestado con parásitos de *A. siamensis*, el gen TLR22 en riñón anterior, mostró una disminución significativa en su actividad, en comparación al grupo Ctrl. Mientras que en la piel se observó una regulación positiva del gen TLR22 en peces con alto grado infectivo (Saurabh et al., 2011)

En general, se acepta que los genes Catalasa, SOD, GSHPx pueden utilizarse como indicadores de mejora del estrés oxidativo (Wangkahart et al., 2022) así como la ferritina, una proteína altamente conservada, actúa secuestrando el hierro (Arosio & Levi, 2010), con el propósito de regular el hierro, dado que el hierro libre puede provocar la generación de radicales libres que afectan los lípidos celulares, las proteínas y los ácidos nucleicos (Lee et al., 2014).

El papel de la ferritina como modulador crítico del estrés oxidativo ha sido ampliamente reconocido. Se ha demostrado que la deficiencia de ferritina conduce a un aumento significativo en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), mediadas por hierro/hemo, lo que genera un daño oxidativo sustancial. Este efecto ha sido confirmado mediante el uso de sondas sensibles a ROS, como la DHE, que evidenciaron un aumento dramático en ROS tras el silenciamiento de ferritina. Además, este aumento en ROS se ha asociado con altas tasas de mortalidad en organismos modelo, destacando la relevancia de la ferritina en la homeostasis redox y la supervivencia celular (Walter-Nuno et al., 2018). En este trabajo la expresión de ferritina en riñón anterior de salmón del Atlántico, antes de la infección, mostró mayor expresión en el grupo Ctrl, seguidamente GR1 e inmersión, GR2 presentaron una expresión más baja de ferritina. Posterior a la infección la actividad de Ctrl disminuyó siendo el grupo con menor expresión, mientras que los grupos de tratamiento GR1, GR2 e inmersión aumentaron significativamente, en comparación al grupo Ctrl, el grupo de mayor expresión fue GR1. Esto nos sugiere que en el riñón anterior del salmón aumenta la actividad de ferritina como mecanismo de acción para limitar el acceso de ferritina al *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárate, 2017), mientras que en grupo Ctrl la actividad basal, disminuye. Estos resultados concuerdan con la sobreexpresión de ferritina en cerebro e hígado en lubina infestado con bacterias (Neves et al., 2009). Respecto a la modulación de la expresión de ferritina en piel de salmón del Atlántico antes de la infección, los grupos de mayor actividad fueron los tratamientos, en comparación al grupo Ctrl, esto nos demuestra que los tratamientos antes de la infección con *C. rogercresseyi* ya aumentaban la actividad de ferritina. Mientras que posterior a la infección, la actividad de Ctrl e inmersión aumentó y en los grupos GR1 y GR2 se observó una disminución. Siendo el grupo inmersión y GR2, los grupos de mayor expresión post-infección, esto nos demuestra que el tratamiento aplicado en vacuna oral y por inmersión tuvo un efecto en la expresión de ferritina en piel, desde antes de la infección que perduró hasta post-infección, los resultados concuerdan con los obtenidos en *S. salar* infestado con *C. rogercresseyi* utilizando IPATH como vacunación, donde se observó un

aumento de la expresión de Ferritina (Valenzuela-Muñoz, Benavente, Casuso, Leal, & Gallardo-Escárate, 2021)

El glutatión peroxidasas son un grupo de enzimas antioxidantes presentes en organismos eucariotas. Además de ser un componente vital de los sistemas antioxidantes, estas enzimas pueden estar involucradas en la defensa inmunológica contra la invasión de patógenos (Bathige et al., 2015). El gen GSHPx en riñón anterior, antes de la infección en el grupo Ctrl mostró una alta expresión, similar a la actividad mostrada por el tratamiento GR1. Posterior a la infección, la actividad del gen GSHPx en el grupo Ctrl disminuyó, dando paso a una sobre expresión significativa en los grupos GR1, GR2 e inmersión, nuevamente el grupo GR1 siendo el grupo que mostró una mayor expresión. En piel de salmón del Atlántico antes de la infección, e los grupos tratamientos GR1, GR2 e inmersión, mostraron una alta expresión del gen GSHPx en comparación con el grupo Ctrl, el grupo GR1 fue el que tuvo una mayor expresión significativa. Posterior a la infección, el grupo inmersión mostró una expresión significativamente mayor de este gen, mientras que grupos Ctrl y GR2 mantuvieron una actividad similar, y el grupo GR1 disminuyó su actividad significativamente. Esto refleja el esfuerzo del pez para contrarrestar el daño oxidativo inducido por la infección, su sistema inmune se activó sobre expresando GSHPx a modo de protegerse, ya que GSHPx mantiene un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, evitando el daño por radicales libres. Los tratamientos GR1, GR2 e inmersión mejoraron la actividad antioxidante en riñón anterior, mientras que, en piel, el tratamiento por inmersión tuvo mejores resultados en comparación con los tratamientos orales. Esto ya que lo tratamientos por inmersión están asociados a la mayor efectividad en activar las barreras inmunológicas naturales de los peces. Ambos métodos involucran la interacción con el sistema mucosal, pero la inmersión permite un contacto directo y rápido con las superficies epiteliales y mucosas, donde las actinas y otras proteínas inmunológicas juegan un papel clave en la respuesta frente a patógenos (Hoare et al., 2022), además, la inmersión activa los macrófagos y otras células inmunitarias en la mucosa, lo que refuerza la defensa local (Easy & Ross, 2009), se sugiere que la vacuna por inmersión garantiza una exposición más constante a las barreras mucosas, potencialmente ofreciendo una respuesta inmunitaria más rápida y eficaz (Hoare et al., 2022). Es necesario mencionar que las superficies mucosas de la piel y la epidermis de los peces actúan como la primera barrera contra la infección (Ingram, 1980). sin embargo, la efectividad de las vacunas por inmersión, son cuestionables, ya que se sugiere que confieren una inmunidad por corto periodo de tiempo en comparación con las vacunas orales (Huisling et al., 2003). Las vacunas orales ofrecen una protección a largo plazo, apto para grandes volúmenes de peces y además ideales para peces sensibles a factores estresantes (Bøgwald & Dalmo, 2021). Adicional a esto, los tratamientos orales dependen de la absorción y distribución de los compuestos a través del sistema digestivo, lo que puede ser menos directo y más lento en la activación de la respuesta inmune mucosal, sin embargo, de mayor magnitud. Además, el tratamiento oral puede verse afectado por la variabilidad en la absorción y el metabolismo de los compuestos.

El sistema de defensa antioxidante se compone de elementos enzimáticos y no enzimáticos. Dentro del componente enzimático, las superóxido dismutasas (SOD) destacan como las primeras y más importantes

metaloenzimas antioxidantes descritas (Zeinali et al., 2015). Estas enzimas catalizan la dismutación del radical superóxido, transformándolo en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2). No obstante, el H_2O_2 puede reaccionar en presencia de metales de transición reducidos, como el hierro (Fe^{2+}), generando el altamente reactivo radical hidroxilo (OH) a través de la reacción de Fenton. A pesar de este riesgo, los sistemas antioxidantes complementarios, como la catalasa y la glutatión peroxidasa, neutralizan el peróxido de hidrógeno al convertirlo en agua (H_2O) y oxígeno molecular, previniendo así el daño oxidativo (Fernández et al., 2009). El gen SOD en riñón anterior, antes de la infección, mostró una actividad similar en los grupos Ctrl, GR1 e inmersión, siendo GR2 el grupo con menor actividad de este gen. Posterior a la infección, todos los grupos aumentaron la expresión de SOD, siendo el grupo de mayor actividad inmersión, seguido por GR2, GR1 y finalmente el grupo Ctrl. Mientras tanto el gen SOD en piel de salmón del Atlántico evaluados, antes de la infección, presentó altos niveles de expresión en el grupo GR1, seguido de Ctrl y GR2 con una actividad similar y finalmente con menor expresión en el grupo inmersión. Posterior a la infección el grupo Ctrl mostró un aumento en los niveles de expresión del gen SOD y nuevamente el grupo inmersión presenta la mayor actividad, sugiriendo que los tratamientos por inmersión afectan directamente a los receptores en la piel, aumentando su actividad. SOD es una de las primeras enzimas en activarse frente al estrés oxidativo, protegiendo a las células de daño celular, regulando el ROS. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio donde, posterior a la infección de *S. salar* por *C. rogercresseyi*, en grupos sin vacuna IPATH, provocó una alta actividad de SOD (Valenzuela-Muñoz, Benavente, Casuso, Leal, & Gallardo-Escárate, 2021). Además, en la vacuna antimicrobiota administrada por inmersión, los antígenos son absorbidos a través de la piel, las branquias o el intestino, y luego son procesados por el sistema inmunológico, lo que puede generar una respuesta protectora (Bøgwald & Dalmo, 2019).

El gen Catalasa desempeña un papel importante en la protección de las células frente al daño oxidativo, y una reducción de su actividad produce estrés oxidativo. (Marcos-López et al., 2018). El gen Catalasa en riñón anterior de salmónes del Atlántico evaluados, antes de la infección, se expresa en mayor proporción en el grupo Ctrl, mientras que los tratamientos GR1 e inmersión presentan una actividad similar, finalmente GR2 presenta los niveles de expresión más bajos. Posterior a la infección la actividad de Catalasa en el grupo Ctrl disminuyó, mientras que en los tratamientos GR1, GR2 e inmersión aumentaron la expresión de Catalasa, esto demuestra que los tratamientos mejoraron la respuesta del gen Catalasa después de la infección. El gen Catalasa en piel de salmónes del Atlántico evaluados, antes de la infección mostró baja expresión en el grupo Ctrl, mientras que los tratamientos GR1, GR2 e inmersión presentaron niveles de expresión significativamente mayores. Posterior a la infección, la expresión de Catalasa en los grupos Ctrl y GR2 aumentó, mientras que en GR1 e inmersión disminuyeron los niveles de expresión. El gen Catalasa actúa en conjunto con SOD para eliminar el ROS, puede ayudar a proteger las células de los efectos secundarios de la inflamación, etc. Estos resultados son similares a un estudio realizado en *S. salar* infectado con *P. salmonis*, donde hubo una sobreexpresión de Catalasa posterior a los 21 días post infección (Xue et al., 2021). En base a los resultados obtenidos, posterior a la infección, el grupo que presentó la mayor actividad en todos los genes evaluados asociados al estrés oxidativo (Ferritina, GSHPx,

SOD y CAT) son GR2 e inmersión. El aumento de SOD, Catalasa y GSHPx se asocia a la presencia del parásito ya que *C. rogercresseyi* induce la producción de especies reactivadas de oxígeno (ROS), generando estrés oxidativo en *S. salar* (Gallardo-Escárate et al., 2019). Para contrarrestar este efecto, el salmón incrementa la expresión de genes antioxidantes (Pedro et al., 2019). Por otro lado, el aumento de ferritina está relacionado con la inmunidad nutricional, donde el hospedador limita la disponibilidad de hierro para reducir su acceso por parte del parásito (Lee et al., 2014). Por otra parte, en el análisis de componentes principales (ACP) en riñón anterior y piel, se observó que los grupos vacunados por vía oral GR1, GR2 y por inmersión se agruparon en la región asociada a genes de estrés oxidativo, sugiriendo que estos tratamientos inducen una respuesta en esta vía. En particular, GR1 mostró la mayor magnitud en esta respuesta, mientras que GR2 e inmersión se distribuyeron en ambas regiones, tanto en el ámbito inmunológico como en el estrés oxidativo. El grupo Ctrl, por otro lado, se mantuvo en la región asociada a una expresión basal de genes inmunitarios. En piel, se evidenció un patrón distinto, donde GR2 se asoció más a la expresión de genes del sistema inmunológico, mientras que inmersión mostró una respuesta más marcada en la región de estrés oxidativo. El grupo GR1 presentó la mayor magnitud en la respuesta inmunológica, pero también ocupó parcialmente la región vinculada al estrés oxidativo. Finalmente, el grupo Ctrl, permaneció con una baja magnitud en estas respuestas. Estos resultados destacan que las vacunas GR1 y GR2 logaron modular de manera más efectiva estas respuestas inmunes.

La respuesta molecular de *C. rogercresseyi* frente a los diferentes tratamientos utilizados en este seminario puede estar influenciada por la necesidad del parásito de adaptarse a cambios en la disponibilidad de recursos esenciales y a la presión ejercida por el sistema inmune del hospedador. En particular, mecanismos relacionados con la homeostasis del hierro y el estrés oxidativo desempeñan un papel clave en su supervivencia y capacidad infectiva. En este contexto, se evaluó la expresión de genes involucrados en estos procesos, como ferritina, PHGp, Catalasa y SOD, con el objetivo de determinar el impacto de los tratamientos en la fisiología del parásito y su capacidad de respuesta a condiciones adversas.

Los resultados obtenidos sobre la actividad de ferritina, PHGp, CAT y SOD en *C. rogercresseyi* evidencian diferencias significativas entre los grupos experimentales, reflejando posibles modulaciones en las respuestas antioxidantes e inmunológicas frente a los tratamientos evaluados.

En el caso de la ferritina, los Caligus colectados del grupo Ctrl mostraron mayores niveles de expresión, lo que podría interpretarse como una respuesta basal óptima para mantener la homeostasis del hierro en el parásito, ya que este necesita hierro. No se observaron significancias entre inmersión en comparación al grupo Ctrl. Los caligus de los grupos GR1 y GR2 presentaron baja expresión de ferritina. Demostrando que los tratamientos orales en *S. salar*, disminuyeron la actividad del ectoparásito, esto evidencia que existe una competencia por el hierro tanto en el parásito como en el huésped (Vera-Bizama et al., 2015). Es importante destacar que, en base a estos resultados, el parásito está experimentando dificultades para mantener la homeostasis del hierro. La ferritina es una proteína clave en la regulación del hierro, ya que permite la captura y almacenamiento de este mineral en una forma no tóxica, asegurando su disponibilidad para procesos metabólicos esenciales. En el caso de la Garrapata dura (*Haemaphysalis longicornis*) si no

se protege las reservas de hierro y la ferritina, el parásito puede dejar de alimentarse y morir, disminuyendo la población parasítica (Galay et al., 2013)

Respecto a PHGp, los Caligus del grupo Ctrl presentaron mayor expresión, respecto a los grupos inmersión mostraba una baja actividad, seguido de GR1 y finalmente GR2, siendo este último el grupo con la menor actividad. Esto concuerda con los resultados obtenidos en *C. rogercresseyi* recolectados en *S. salar* donde se observó una regulación positiva significativa de PHGp y PRX en piojos de mar que habían infectado a *S. salar* (Vera-Bizama et al., 2015). Finalmente, los tratamientos modularon a la baja la expresión de PHGp en *C. rogercresseyi*. A partir de esto podemos inferir que los tratamientos con vacuna antimicrobiota disminuyeron la actividad de PHGp en el parásito, la cual es la encargada de proteger a las células contra el estrés oxidativo, catalizando los hidroperóxidos lipídicos (Kim et al., 2009). Esto sugiere que el caligus podría estar más expuesto al estrés oxidativo. Esta disminución en la actividad de la enzima, responsable de proteger las células del daño oxidativo, implica una mayor vulnerabilidad del parásito frente a las condiciones hostiles del hospedador, lo que podría favorecer su eliminación, destacando a los tratamientos GR1 y GR2 como inmunosupresores.

En cuanto a la actividad de Catalasa, los Caligus colectados del grupo GR2 mostraron mayores niveles de expresión, respecto a los otros grupos experimentales. Estos resultados son interesantes ya que la vacuna antimicrobiota oral GR2 tuvo mayor actividad que el grupo Ctrl, esto sugiere que la vacunación con una concentración de bacterias al 2% aumenta el estrés oxidativo en *C. rogercresseyi*. Mientras que la vacunación al 1% suprime su capacidad de respuesta y por esto debe aumentar la expresión de Catalasa, este aumento de catalasa es similar a los resultados obtenidos en *Anopheles aquasalis*, donde la expresión de Catalasa disminuyó utilizando el parásito *Plasmodium vivax* (Bahia et al., 2013). La vacunación por inmersión no arrojó resultados significativos.

En el gen SOD, los Caligus colectados del grupo GR2 mostraron mayores niveles de expresión que los demás grupos experimentales, siendo el grupo GR1 el de menor expresión de SOD. La vacuna antimicrobiota logró expresar SOD en mayor proporción en comparación al grupo Ctrl, estos resultados reflejan una respuesta adaptativa del *C. rogercresseyi* para contrarrestar el estrés oxidativo y ROS, lo que también podría ser un indicador de eficacia de la vacuna, al menos en términos de presionar al parásito. Mientras que ellos Caligus colectados de los salmones del grupo GR1 mostró la menor actividad de SOD, esto podría debilitar la capacidad del parásito para manejar el estrés oxidativo, haciéndolo más susceptible al entorno generado por el sistema inmune del salmón, resultados similares se lograron en el parásito *Leishmania donovani*, al aplicar teofilina y epinefrina, logrando reducir la expresión de SOD (Dey et al., 1995).

Con respecto a el análisis de componentes principales (ACP) en *C. rogercresseyi*, el grupo Ctrl tuvo una alta magnitud en la expresión en genes relacionados con la homeostasis del hierro (Ferritina y PHGp), lo que indica una respuesta basal, al no tener tratamientos. Sin embargo, GR2 presentó una alta magnitud en

la expresión de SOD, sugiriendo una respuesta antioxidante diferenciada. Por otro lado, GR1 mostró una marcada supresión en la expresión de genes vinculados tanto al sistema inmunológico como al estrés oxidativo, lo que sugiere un impacto significativo de este tratamiento en la regulación génica de *C. rogercresseyi*. Finalmente, los tratamientos con vacuna antimicrobiota oral e inmersión, mostraron en *Caligus* efectos diferenciados en los sistemas antioxidantes e inmunológicos, debilitando su capacidad de adaptación a las condiciones adversas generadas por el hospedador, afectando su capacidad de manejar elementos esenciales como el hierro y disminuyendo su viabilidad, lo que resalta el potencial de la vacuna para el control de este ectoparásito en la salmonicultura. La vacuna con mejores resultados fue GR1.

7. CONCLUSIONES

El presente seminario evaluó la eficacia de una vacuna antimicrobiota contra *C. rogercresseyi*, administrada por vía oral e inmersión en *S. salar*, con un enfoque en su capacidad para modular la respuesta inmunológica del huésped, la del parásito y la eficacia de cada tratamiento. Se observó que el tratamiento oral, una concentración bacteriana al 1% (GR1) fue más efectivo en reducir la carga parasitaria en hembras y machos de *C. rogercresseyi* en comparación con otras concentraciones y tratamientos, destacándose una reducción del 59.34% en hembras, mientras que en machos el mismo grupo mostró una reducción del 34,21%. Sin embargo, el grupo GR2, con una concentración mayor al 2%, mostró una eficacia menor, posiblemente atribuida a una disbiosis negativa en el hospedador, al tener mayor concentración de bacterias.

En cuanto a *C. rogercresseyi*, la vacuna GR1, resultó ser la más significativa, ya que disminuyó la expresión relativa de todos los genes evaluados, sugiriendo una inmunosupresión, altamente diferenciado en comparación con el control. El grupo por inmersión sin adyuvante, en *C. rogercresseyi* mostró un bajo nivel de expresión, sin diferencias significativas en la mayoría de los casos en genes como Ferritina, Catalasa y SOD.

En términos de la respuesta inmunológica, las vacunas antimicrobiota GR1 y GR2 indujeron un aumento significativo en la expresión de genes clave, como IL-1 β , CD4, TLR13 y TLR22, con niveles elevados de expresión observados en riñón anterior y piel tras la infección con *C. rogercresseyi*, excepto para TLR13 en la piel. Además, los genes involucrados en la regulación del hierro, como Ferritina y GSHPx, presentaron una mayor expresión en riñón anterior, mientras que los genes asociados al estrés oxidativo, como SOD y Catalasa, también evidenciaron un aumento en la expresión en el mismo tejido. En cambio, en el grupo por inmersión sin adyuvante inmersión mostró una alta actividad en genes como GSHPx, SOD, Catalasa, IL-1b, CD4 y TLR22, resultados semejantes a los tratamientos orales.

La vacuna por inmersión con el adyuvante Montanide 1312 VG provocó una mortalidad del 100% de los peces tratados. Dado que se utilizó una concentración descrita previamente para el adyuvante y que no existen antecedentes que respalden su uso en *S. salar*, no recomendamos su aplicación debido a la toxicidad presentada para esta especie.

Estos resultados sugieren que las vacunas antimicrobias orales usando adyuvantes, en concentraciones específicas tienen el potencial de convertirse en herramientas viables y efectivas para el control de *C. rogercresseyi* en la salmonicultura. Sin embargo, se debe considerar que estos hallazgos se obtuvieron en condiciones experimentales controladas, incluyendo parámetros como temperatura, salinidad, sólidos suspendidos, oxigenación y filtración. Estudios futuros deberán validar estos resultados a mayor escala y bajo condiciones ambientales variadas para garantizar su aplicabilidad práctica en la industria acuícola, adicionalmente se necesitaría evaluar el efecto de la vacuna antimicrobiota en el resto de los tejidos o incluso analizar vías metabólicas, para garantizar que sea una vacuna segura.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126(3), 171-198.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.07.013>
- Anderson, D. P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 281-307.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90067-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90067-8)
- Apablaza, P., Frisch, K., Brevik, O. J., Småge, S. B., Vallestad, C., Duesund, H., Mendoza, J., & Nylund, A. (2017). Primary Isolation and Characterization of *Tenacibaculum maritimum* from Chilean Atlantic Salmon Mortalities Associated with a *Pseudochattonella* spp. Algal Bloom. *Journal of Aquatic Animal Health*, 29(3), 143-149.
<https://doi.org/10.1080/08997659.2017.1339643>
- Apostólico, J. d. S., Lunardelli, V. A. S., Coirada, F. C., Boscardin, S. B., & Rosa, D. S. (2016). Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *Journal of Immunology Research*, 2016(1), 1459394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2016/1459394>
- 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/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.09.004>
- Arosio, P., & Levi, S. (2010). Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1800(8), 783-792. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.02.005>
- Ashfaq, H., Soliman, H., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2019). CD4: a vital player in the teleost fish immune system. *Veterinary Research*, 50(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0620-0>
- Bahia, A. C., Oliveira, J. H. M., Kubota, M. S., Araújo, H. R. C., Lima, J. B. P., Ríos-Velásquez, C. M., Lacerda, M. V. G., Oliveira, P. L., Traub-Csekö, Y. M., & Pimenta, P. F. P. (2013). The Role of Reactive Oxygen Species in *Anopheles aquasalis* Response to *Plasmodium vivax* Infection. *PLOS ONE*, 8(2), e57014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057014>
- Bailey, R. J., Birkett, M. A., Ingvarsdóttir, A., Mordue, A. J., Mordue, W., O'Shea, B., Pickett, J. A., & Wadhams, L. J. (2006). The role of semiochemicals in host location and non-host avoidance by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) copepodids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63(2), 448-456. <https://doi.org/10.1139/f05-231>

- Barker, D. E., Braden, L. M., Coombs, M. P., & Boyce, B. (2009). Preliminary studies on the isolation of bacteria from sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*, infecting farmed salmon in British Columbia, Canada. *Parasitology Research*, *105*(4), 1173-1177. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1523-9>
- Bathige, S. D. N. K., Umasuthan, N., Godahewa, G. I., Thulasitha, W. S., Whang, I., Won, S. H., Kim, C., & Lee, J. (2015). Two variants of selenium-dependent glutathione peroxidase from the disk abalone *Haliotis discus discus*: Molecular characterization and immune responses to bacterial and viral stresses. *Fish & Shellfish Immunology*, *45*(2), 648-655. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.028>
- Belkaid, Y., & Hand, Timothy W. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*, *157*(1), 121-141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
- Ben Hamed, S., Tapia-Paniagua, S. T., Moriñigo, M. Á., & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2021). Advances in vaccines developed for bacterial fish diseases, performance and limits. *Aquaculture Research*, *52*(6), 2377-2390. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/are.15114>
- Biron, D. G., & Loxdale, H. D. (2013). Host–parasite molecular cross-talk during the manipulative process of a host by its parasite. *Journal of Experimental Biology*, *216*(1), 148-160. <https://doi.org/10.1242/jeb.073825>
- Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2019). Review on Immersion Vaccines for Fish: An Update 2019. *Microorganisms*, *7*(12), 627. <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/12/627>
- Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2021). Protection of Teleost Fish against Infectious Diseases through Oral Administration of Vaccines: Update 2021. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*.
- Braden, L. M., Koop, B. F., & Jones, S. R. M. (2015). Signatures of resistance to *Lepeophtheirus salmonis* include a TH2-type response at the louse-salmon interface. *Developmental & Comparative Immunology*, *48*(1), 178-191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.09.015>
- Bravo, S. (2010). The reproductive output of sea lice *Caligus rogercresseyi* under controlled conditions. *Experimental Parasitology*, *125*(1), 51-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.12.001>
- Bravo, S., Perroni, M., Torres, E., & Silva, M. (2006). Report of *Caligus rogercresseyi* in the anadromous brown trout (*Salmo trutta*) in the Rio Gallegos Estuary, Argentina.

- Bravo, S., Pozo, V., & Silva, M. T. (2015). Assessment of the freshwater treatment to control the sea lice *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000. *Latin American Journal of Aquatic Research; Vol 43, No 2 (2015): Special Issue: Proceedings of the 4th National Conference of Aquaculture, Chile.DO* - *10.3856/vol43-issue2-fulltext-8.*
<https://www.lajar.cl/index.php/rlajar/article/view/vol43-issue2-fulltext-8>
- Carpio, Y., Basabe, L., Acosta, J., Rodríguez, A., Mendoza, A., Lisperger, A., Zamorano, E., González, M., Rivas, M., Contreras, S., Hausmann, D., Figueroa, J., Osorio, V. N., Asencio, G., Mancilla, J., Ritchie, G., Borroto, C., & Estrada, M. P. (2011). Novel gene isolated from *Caligus rogercresseyi*: A promising target for vaccine development against sea lice. *Vaccine*, *29*(15), 2810-2820.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.109>
- Carrera, N. Í. (2020). Breve historia de la acuicultura y salmonicultura en el sur de Chile (1856-2000). *Territorios y Regionalismos*(3), 36-49. <https://revistas.udec.cl/index.php/rtr/article/view/2663>
- 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/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00301-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00301-9)
- Chávez-Mardones, J., Valenzuela-Muñoz, V., Núñez-Acuña, G., Maldonado-Aguayo, W., & Gallardo-Escárate, C. (2013). Concholepas concholepas Ferritin H-like subunit (CcFer): Molecular characterization and single nucleotide polymorphism associated to innate immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, *35*(3), 910-917. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.028>
- Costello, M. J. (2006). Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology*, *22*(10), 475-483. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.006>
- Cox, R., Groner, M. L., Todd, C. D., Gettinby, G., Patanasatienkul, T., & Revie, C. W. (2017). Mate limitation in sea lice infesting wild salmon hosts: the influence of parasite sex ratio and aggregation. *Ecosphere*, *8*(12), e02040. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ecs2.2040>
- Cuvillier-Hot, V., Boidin-Wichlacz, C., Slomianny, C., Salzet, M., & Tasiemski, A. (2011). Characterization and immune function of two intracellular sensors, HmTLR1 and HmNLR, in the injured CNS of an invertebrate. *Developmental & Comparative Immunology*, *35*(2), 214-226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.09.011>
- Dey, R., Mitra, S., & Datta, S. C. (1995). Cyclic AMP Mediates Change in Superoxide Dismutase Activity to Monitor Host-Parasite Interaction in *Leishmania donovani*. *The Journal of Parasitology*, *81*(5), 683-686. <https://doi.org/10.2307/3283954>

- 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>
- Du, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., & Zhan, W. (2015). Immune response of flounder (*Paralichthys olivaceus*) was associated with the concentration of inactivated *Edwardsiella tarda* and immersion time [Article]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 167(1-2), 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.07.002>
- Du, Y., Tang, X., Sheng, X., Xing, J., & Zhan, W. (2017). The influence of concentration of inactivated *Edwardsiella tarda* bacterin and immersion time on antigen uptake and expression of immune-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Microbial Pathogenesis*, 103, 19-28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.01>
- Dudek-Wicher, R., Junka, A. F., & Bartoszewicz, M. (2018). The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. *Przełąd Gastroenterologiczny*, 13, 85 - 92.
- Easy, R. H., & Ross, N. W. (2009). Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) epidermal mucus protein composition profiles following infection with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 4(3), 159-167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbd.2009.02.00>
- Embregts, C. W. E., & Forlenza, M. (2016). Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 118-137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.024>
- Enss, M. L., Cornberg, M., Wagner, S., Gebert, A., Henrichs, M., Eisenblätter, R., Beil, W., Kownatzki, R., & Hedrich, H. J. (2000). Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. *Inflammation Research*, 49(4), 162-169. <https://doi.org/10.1007/s000110050576>
- FAO. (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://digitallibrary.un.org/record/3978694/files/cc0461en.pdf>
- Fast, M. D., Muise, D. M., Easy, R. E., Ross, N. W., & Johnson, S. C. (2006). The effects of *Lepeophtheirus salmonis* infections on the stress response and immunological status of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology*, 21(3), 228-241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.11.010>

- Fast, M. D., Ross, N. W., Craft, C. A., Locke, S. J., MacKinnon, S. L., & Johnson, S. C. (2004). Lepeophtheirus salmonis: characterization of prostaglandin E2 in secretory products of the salmon louse by RP-HPLC and mass spectrometry. *Experimental Parasitology*, *107*(1), 5-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.04.001>
- Fernández, C., San Miguel, E., & Fernandez-Briera, A. (2009). Superoxide dismutase and catalase: tissue activities and relation with age in the long-lived species *Margaritifera margaritifera*. *Biological Research*, *42*(1), 57-68.
- Firth, K. J., Johnson, S. C., & Ross, N. W. (2000). Characterization of proteases in the skin mucus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) infected with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and in whole-body louse homogenate [Article]. *Journal of Parasitology*, *86*(6), 1199-1205. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[1199:copits\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[1199:copits]2.0.co;2)
- Forlenza, M., Walker, P. D., de Vries, B. J., Wendelaar Bonga, S. E., & Wiegertjes, G. F. (2008). Transcriptional analysis of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) immune response to the fish louse *Argulus japonicus* Thiele (Crustacea: Branchiura). *Fish & Shellfish Immunology*, *25*(1), 76-83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.12.013>
- Galay, R. L., Aung, K. M., Umemiya-Shirafuji, R., Maeda, H., Matsuo, T., Kawaguchi, H., Miyoshi, N., Suzuki, H., Xuan, X., Mochizuki, M., Fujisaki, K., & Tanaka, T. (2013). Multiple ferritins are vital to successful blood feeding and reproduction of the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Experimental Biology*, *216*, 1905 - 1915.
- Gallardo-Escárate, C., Valenzuela-Muñoz, V., Núñez-Acuña, G., Carrera, C., Gonçalves, A. T., Valenzuela-Miranda, D., Benavente, B. P., & Roberts, S. (2019). Catching the complexity of salmon-lice interactions. *Fish & Shellfish Immunology*, *90*, 199-209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.065>
- Garcia, K. C., Teyton, L., & Wilson, I. A. (1999). STRUCTURAL BASIS OF T CELL RECOGNITION. *Annual Review of Immunology*, *17*(Volume 17, 1999), 369-397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.369>
- Ghosh, B., Nguyen, T., Crosbie, P., Nowak, B., & Bridle, A. (2016). Oral vaccination of first-feeding Atlantic salmon, *Salmo salar* L., confers greater protection against yersiniosis than immersion vaccination. *Vaccine*, *34* 5, 599-608. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.044>
- Godoy, M., Kibenge, M. J. T., Montes de Oca, M., Pontigo, J. P., Coca, Y., Caro, D., Kusch, K., Suarez, R., Burbulis, I., & Kibenge, F. S. B. (2022). Isolation of a New Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) Variant from Genetically Resistant Farmed Atlantic Salmon (*Salmo*

- salar) during 2021–2022. *Pathogens*, 11(11), 1368. <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/11/1368>
- Godoy, M., Montes de Oca, M., Suarez, R., Martinez, A., Pontigo, J. P., Caro, D., Kusch, K., Coca, Y., Bohle, H., Bayliss, S., Kibenge, M., & Kibenge, F. (2024). Genomics of Re-Emergent *Aeromonas salmonicida* in Atlantic Salmon Outbreaks. *Microorganisms*, 12(1), 64. <https://www.mdpi.com/2076-2607/12/1/64>
- Gómez, G. D., & Balcázar, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2), 145-154. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x>
- Gong, H., Wang, Q., Lai, Y., Zhao, C., Sun, C., Chen, Z., Tao, J., & Huang, Z.-b. (2021). Study on Immune Response of Organs of *Epinephelus coioides* and *Carassius auratus* After Immersion Vaccination With Inactivated *Vibrio harveyi* Vaccine. *Frontiers in Immunology*, 11.
- González, L., Carvajal, J., & George-Nascimento, M. (2000). Differential infectivity of *Caligus flexispina* (Copepoda, Caligidae) in three farmed salmonids in Chile. *Aquaculture*, 183(1), 13-23. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00282-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00282-3)
- Gowda, D. C., & Wu, X. (2018). Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria [Review]. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03006>
- Grandón, M., Irgang, R., Saavedra, J., Mancilla, M., & Avendaño-Herrera, R. (2021). Proposed protocol for performing MIC testing to determine the antimicrobial susceptibility of *Renibacterium salmoninarum* in Chilean salmon farms. *Journal of Fish Diseases*, 44(3), 287-296. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfd.13281>
- Guillou, F., Mitta, G., Galinier, R., & Coustau, C. (2007). Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(7), 657-671. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.10.001>
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257-265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Hamilton-West, C., Arriagada, G., Yatabe, T., Valdés, P., Hervé-Claude, L. P., & Urcelay, S. (2012). Epidemiological description of the sea lice (*Caligus rogercresseyi*) situation in southern Chile in August 2007. *Preventive Veterinary Medicine*, 104(3), 341-345.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.12.002>

- Heidari, Z., Zou, J., Moore, R., Sattentau, Q., & Secombes, C. J. (2016). Development of a mucosal adjuvant for fish vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*, *53*, 103-104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.060>
- Hoare, R., Shahin, K., McLean, K., Adams, A., & Thompson, K. D. (2022). Skin mucus proteins of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to mucosal vaccination and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, *45*(3), 491-495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfd.13562>
- Hood, M. I., & Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(8), 525-537. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2836>
- Huising, M. O., Guichelaar, T., Hoek, C., Verburg-van Kemenade, B. M. L., Flik, G., Savelkoul, H. F. J., & Rombout, J. H. W. M. (2003). Increased efficacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. *Vaccine*, *21*(27), 4178-4193. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00497-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00497-3)
- Hwang, J. Y., Kwon, M. G., Kim, Y. J., Jung, S. H., Park, M. A., & Son, M. H. (2017). Montanide IMS 1312 VG adjuvant enhances the efficacy of immersion vaccine of inactivated viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish & Shellfish Immunology*, *60*, 420-425. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.011>
- Ingerslev, H. C., Cunningham, C., & Wergeland, H. I. (2006). Cloning and expression of TNF- α , IL-1 β and COX-2 in an anadromous and landlocked strain of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the smolting period. *Fish & Shellfish Immunology*, *20*(4), 450-461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.06.002>
- Ingram, G. A. (1980). Substances involved in the natural resistance of fish to infection—A review. *Journal of Fish Biology*, *16*(1), 23-60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb03685.x>
- Joyce, S. (2000). Natural T cells: Cranking up the immune system by prompt cytokine secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(13), 6933-6935. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.97.13.6933>
- Kania, P. W., Evensen, O., Larsen, T. B., & Buchmann, K. (2010). Molecular and immunohistochemical studies on epidermal responses in Atlantic salmon *Salmo salar* L. induced by *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957. *Journal of Helminthology*, *84*(2), 166-172. <https://doi.org/10.1017/S0022149X09990460>
- Khan, R. A. (2012). Host-Parasite Interactions in Some Fish Species. *Journal of Parasitology Research*, *2012*(1), 237280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2012/237280>
- Khan, I. (2021). Microbiome. *Indian J Med Paediatr Oncol*, *42*(05), 461-465. <https://doi.org/10.1055/s->

0041-1735599

- Kim, S. H., Cai, G. B., Bae, Y. A., Lee, E. G., Lee, Y. S., & Kong, Y. (2009). Two novel phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase genes of *Paragonimus westermani* induced by oxidative stress. *Parasitology*, *136*(5), 553-565. <https://doi.org/10.1017/S0031182009005654>
- König, R., Shen, X., Maroto, R., & Denning, T. L. (2002). The role of CD4 in regulating homeostasis of T helper cells. *Immunologic Research*, *25*(2), 115-130. <https://doi.org/10.1385/IR:25:2:115>
- Ladeira-Dabarca, A., Sieiro, C., & Álvarez, M. (2013). Change in food ingestion induces rapid shifts in the diversity of microbiota associated with cutaneous mucus of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology*, *82*(3), 893-906. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfb.12025>
- Lawrence, G. W., Saul, A., Giddy, A. J., Kemp, R., & Pye, D. (1997). Phase I trial in humans of an oil-based adjuvant SEPPIC MONTANIDE ISA 720. *Vaccine*, *15*(2), 176-178. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00150-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00150-8)
- Le, H. V., Bui, H. C. N., Ngo, T. P. H., Tran, M. T., & Trinh, C. V. (2024). Evaluation of the protective efficacy of inactivated vaccines from wild-type *Streptococcus agalactiae* (GBS) on red Tilapia (*Oreochromis sp.*). *J. Agric. Dev.*, *23*(1), 25-39. <https://doi.org/10.52997/jad.1.03.2024>
- Lee, J.-H., Pooley, N. J., Mohd-Adnan, A., & Martin, S. A. M. (2014). Cloning and Characterisation of Multiple Ferritin Isoforms in the Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *PLOS ONE*, *9*(7), e103729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103729>
- Lee, N.-H., Lee, J.-A., Park, S.-Y., Song, C.-S., Choi, I.-S., & Lee, J.-B. (2012). A review of vaccine development and research for industry animals in Korea. *Clin Exp Vaccine Res*, *1*(1), 18-34. <https://doi.org/10.7774/cevr.2012.1.1.18>
- Lewis, D. L., Barker, D. E., & McKinley, R. S. (2014). Modulation of cellular innate immunity by *Lepeophtheirus salmonis* secretory products. *Fish & Shellfish Immunology*, *38*(1), 175-183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.03.014>
- Lin, K., Ge, H., Lin, Q., Wu, J., He, L., Fang, Q., Zhou, C., Sun, M., & Huang, Z. (2013). Molecular characterization and functional analysis of Toll-like receptor 3 gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Gene*, *527*(1), 174-182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.06.014>

- Lindenstrøm, T., Buchmann, K., & Secombes, C. J. (2003). Gyrodactylus derjavini infection elicits IL-1 β expression in rainbow trout skin. *Fish & Shellfish Immunology*, 15(2), 107-115. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00142-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00142-0)
- Lindenstrøm, T., Sigh, J., Dalgaard, M., & Buchmann, K. (2006). Skin expression of IL-1 β in East Atlantic salmon, *Salmo salar* L., highly susceptible to Gyrodactylus salaris infection is enhanced compared to a low susceptibility Baltic stock. *Journal of Fish Diseases*, 29(2).
- Liu, K.-F., Yeh, M.-S., Kou, G.-H., Cheng, W., & Lo, C.-F. (2010). Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(9), 935-944. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.04.001>
- Llewellyn, M. S., Leadbeater, S., Garcia, C., Sylvain, F. E., Custodio, M., Ang, K. P., Powell, F., Carvalho, G. R., Creer, S., Elliot, J., & Derome, N. (2017). Parasitism perturbs the mucosal microbiome of Atlantic Salmon. *Scientific Reports*, 7(1), 43465. <https://doi.org/10.1038/srep43465>
- Lorenzen, N., & LaPatra, S. E. (2005). DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev Sci Tech*, 24(1), 201-213.
- Marcos-López, M., Espinosa, C. R., Rodger, H. D., O'Connor, I., MacCarthy, E., & Esteban, M. A. (2018). Oxidative stress is associated with late-stage amoebic gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Diseases*, 41(2), 383-387. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfd.12699>
- Martínez, D., Oyarzún-Salazar, R., Quilapi, A. M., Coronado, J., Enriquez, R., Vargas-Lagos, C., Oliver, C., Santibañez, N., Godoy, M., Muñoz, J. L., Vargas-Chacoff, L., & Romero, A. (2023). Live and inactivated *Piscirickettsia salmonis* activated nutritional immunity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1187209>
- Mateos-Hernández, L., Obregón, D., Maye, J., Borneres, J., Versille, N., de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Hodžić, A., Šimo, L., & Cabezas-Cruz, A. (2020). Anti-Tick Microbiota Vaccine Impacts *Ixodes ricinus* Performance during Feeding. *Vaccines*, 8(4), 702. <https://www.mdpi.com/2076-393X/8/4/702>

- McAndrew, K. J., Sommerville, C., Wootten, R., & Bron, J. E. (1998). The effects of hydrogen peroxide treatment on different life-cycle stages of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1837). *Journal of Fish Diseases*, 21(3), 221-228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1998.00096.x>
- McCarthy, E., Cunningham, E., Copley, L., Jackson, D., Johnston, D., Dalton, J. P., & Mulcahy, G. (2012). Cathepsin L proteases of the parasitic copepod, *Lepeophtheirus salmonis*. *Aquaculture*, 356-357, 264-271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.007>
- McCarthy, Ú. M., Bron, J. E., Brown, L., Pourahmad, F., Bricknell, I. R., Thompson, K. D., Adams, A., & Ellis, A. E. (2008). Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(5), 477-484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.07.005>
- Moore, J. D., Ototake, M., & Nakanishi, T. (1998). Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. *Fish & Shellfish Immunology*, 8(6), 393-408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0143>
- Moore, L. J., Dijkstra, J. M., Koppang, E. O., & Hordvik, I. (2009). CD4 homologues in Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(1), 10-18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.09.019>
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Segarra, A., Chollet, B., & Renault, T. (2011). Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an in vitro infection with *Bonamia ostreae*. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(3), 323-333. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.10.005>
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology*, 7(Volume 7, 1989), 145-173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>
- Mutoloki, S., Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2015). Oral Vaccination of Fish – Antigen Preparations, Uptake, and Immune Induction [Review]. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00519>
- Neves, J. V., Wilson, J. M., & Rodrigues, P. N. S. (2009). Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(7), 848-857. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.02.001>

- Núñez-Acuña, G., Gallardo-Escárate, C., Skiftesvik, A. B., Fields, D. M., & Browman, H. I. (2019). Silencing of ionotropic receptor 25a decreases chemosensory activity in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* during the infective stage. *Gene*, *697*, 35-39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.02.012>
- Núñez-Acuña, G., Marambio, J. P., Valenzuela, T., Wadsworth, S., & Gallardo-Escárate, C. (2016). Antimicrobial peptides from Salmon salar skin induce frontal filament development and olfactory/cuticle-related genes in the sea louse *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, *464*, 171-177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.023>
- Oelckers, K., Vike, S., Duesund, H., González, J., Nylund, A., & Yany, G. (2017). *Caligus rogercresseyi*: possible vector in the horizontal transmission of the virus of infectious salmon anaemia (ISAv). *Latin American Journal of Aquatic Research; Vol 43, No 2 (2015): Special Issue: Proceedings of the 4th National Conference of Aquaculture, Chile*. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue2-fulltext-15>
- Ogamba, E. N., & Abowei, J. F. N. (2012). Some Issues in Culture Fisheries Management and Practices. Ong, S. T., Shan Ho, J. Z., Ho, B., & Ding, J. L. (2006). Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology*, *211*(4), 295-314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.02.004>
- Pace, J. L., Rossi, H. A., Esposito, V. M., Frey, S. M., Tucker, K. D., & Walker, R. I. (1998). Inactivated whole-cell bacterial vaccines: current status and novel strategies. *Vaccine*, *16*(16), 1563-1574. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00046-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00046-2)
- Pedro, A. V., Martínez, D., Pontigo, J. P., Vargas-Lagos, C., Hawes, C., Wadsworth, S., Morera, F. J., Vargas-Chacoff, L., & Yáñez, A. J. (2019). Transcriptional activation of genes involved in oxidative stress in *Salmo salar* challenged with *Piscirickettsia salmonis*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, *229*, 18-25.
- Pennacchi, Y., Leef, M. J., Crosbie, P. B. B., Nowak, B. F., & Bridle, A. R. (2014). Evidence of immune and inflammatory processes in the gills of AGD-affected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fish & Shellfish Immunology*, *36*(2), 563-570. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.013>
- Pholchamat, S., Vialle, R., Luang-In, V., Phadee, P., Wang, B., Wang, T., Secombes, C. J., & Wangkahart, E. (2024). Evaluation of the efficacy of MONTANIDE™ GR01, a new adjuvant for feed-based vaccines, on the immune response and protection against *Streptococcus agalactiae* in oral vaccinated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under laboratory and on-farm conditions. *Fish & Shellfish Immunology*, *149*, 109567. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109567>
- Pietretti, D., & Wiegertjes, G. F. (2014). Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: Indications from infection studies. *Developmental & Comparative Immunology*, *43*(2), 205-222.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.010>

- Pike, A. W., & Wadsworth, S. L. (1999). Sealice on Salmonids: Their Biology and Control. In J. R. Baker, R. Muller, & D. Rollinson (Eds.), *Advances in Parasitology* (Vol. 44, pp. 233-337). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60233-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60233-X)
- 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* Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae). *Aquaculture*, 271(1), 70-76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.025>
- Plant, K. P., & LaPatra, S. E. (2011). Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1256-1262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.007>
- Pooley, N. J., Tacchi, L., Secombes, C. J., & Martin, S. A. M. (2013). Inflammatory responses in primary muscle cell cultures in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 14(1), 747. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-747>
- Quiniou, S. M. A., Boudinot, P., & Bengtén, E. (2013). Comprehensive survey and genomic characterization of Toll-like receptors (TLRs) in channel catfish, *Ictalurus punctatus*: identification of novel fish TLRs. *Immunogenetics*, 65(7), 511-530. <https://doi.org/10.1007/s00251-013-0694-9>
- Rauta, P. R., Samanta, M., Dash, H. R., Nayak, B., & Das, S. (2014). Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses. *Immunology Letters*, 158(1), 14-24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.11.013>
- Ravelo, C., Magariños, B., Herrero, M. C., Costa, L., Toranzo, A. E., & Romalde, J. L. (2006). Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 251(2), 153-158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.027>
- Rebl, A., Siegl, E., Köllner, B., Fischer, U., & Seyfert, H.-M. (2007). Characterization of twin toll-like receptors from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evolutionary relationship and induced

- expression by *Aeromonas salmonicida salmonicida*. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(5), 499-510. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.08.007>
- Reyes, X., & Bravo, S. (1983). Nota sobre una copepoidosis en salmones de cultivo. *Invest. Mar*, 11, 55-57.
- Ritchie, G., Mordue, A. J., Pike, A. W., & Rae, G. H. (1996). Observations on mating and reproductive behaviour of *Lepeophtheirus salmonis*, Kroyer (Copepoda: Caligidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 201(1-2), 285-298. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(96\)00008-1](https://doi.org/10.1016/0022-0981(96)00008-1)
- Ruban, V. V., Archana, P. T., Sundararajan, M., Geraldine, P., & Thomas, P. A. (2018). Inflammation and oxidative stress in corneal tissue in experimental keratitis due to *Fusarium solani*: Amelioration following topical therapy with voriconazole and epigallocatechin gallate. *Mycoses*, 61(3), 159-171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/myc.12718>
- Ruterbusch, M., Pruner, K. B., Shehata, L., & Pepper, M. (2020). In Vivo CD4+ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annual Review of Immunology*, 38, 705-725.
- Salazar, C., Hausmann, D., Kausel, G., & Figueroa, J. (2016). Molecular cloning of almo salar Toll-like receptors (TLR1, TLR22, TLR5M and TLR5S) and expression analysis in SHK-1 cells during *Piscirickettsia salmonis* infection. *Journal of Fish Diseases*, 39(2), 239-248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfd.12354>
- Samanta, M., Basu, M., Swain, B., Panda, P., & Jayasankar, P. (2013). Molecular cloning and characterization of toll-like receptor 3, and inductive expression analysis of type I IFN, Mx and pro-inflammatory cytokines in the Indian carp, rohu (*Labeo rohita*). *Molecular Biology Reports*, 40(1), 225-235. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2053-6>
- Saurabh, S., Mohanty, B. R., & Sahoo, P. K. (2011). Expression of immune-related genes in rohu *Labeo rohita* (Hamilton) by experimental freshwater lice *Argulus siamensis* (Wilson) infection. *Veterinary Parasitology*, 175(1), 119-128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.001>
- Sernapesca. (2019). *RESOLUCIÓN EX 2430 FIJA DENSIDAD DE CULTIVO PARA LA AGRUPACIÓN DE CONCESIONES DE SALMÓNIDOS*.
- Shafquat, A., Joice, R., Simmons, S. L., & Huttenhower, C. (2014). Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends in Microbiology*, 22(5), 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.011>
- Skugor, S., Glover, K. A., Nilsen, F., & Krasnov, A. (2008). Local and systemic gene expression

- responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*). *BMC Genomics*, 9(1), 498. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-498>
- Snow, M., McKay, P., McBeath, A. J. A., Black, J., Doig, F., Kerr, R., Cunningham, C. O., Nylund, A., & Devold, M. (2006). Development, application and validation of a Taqman real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developments in biologicals*, 126, 133-145; discussion 325-136. <http://europepmc.org/abstract/MED/17058489>
- Soltani, M., Shafiei, S., Yosefi, P., Mosavi, S., & Mokhtari, A. (2014). Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 37(1), 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.027>
- Steen Dobloug, M., Skagen-Sandvik, C., Evensen, Ø., Gadan, K., Bakke, M. J., Sørum, H., & Saloni, K. (2023). Reduced Infestation Levels of *Lepeophtheirus salmonis* in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) following Immersion Exposure to Probiotic *Aliivibrio* spp. *Applied Microbiology*, 3(4), 1339-1354. <https://www.mdpi.com/2673-8007/3/4/90>
- Stone, J., Sutherland, I. H., Sommerville, C. S., Richards, R. H., & Varma, K. J. (1999). The efficacy of emamectin benzoate as an oral treatment of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer), infestations in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 22(4), 261-270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00176.x>
- Subasinghe, R. P. (2005). Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Prev Vet Med*, 67(2-3), 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.11.004>
- Subpesca. (2022). *INFORME SECTORIAL DE PESCA Y ACUICULTURA*.
- Sudheesh, P. S., & Cain, K. D. (2017). Prospects and challenges of developing and commercializing immersion vaccines for aquaculture.
- Sundaram, A. Y. M., Consuegra, S., Kiron, V., & Fernandes, J. M. O. (2012). Positive selection pressure within teleost toll-like receptors tlr21 and tlr22 subfamilies and their response to temperature stress and microbial components in zebrafish. *Molecular Biology Reports*, 39(9), 8965-8975. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1765-y>
- Sutherland, B. J., Jantzen, S. G., Sanderson, D. S., Koop, B. F., & Jones, S. R. (2011). Differentiating size-dependent responses of juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) to sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infections. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 6(2), 213-223.

- Sutherland, B. J. G., Koczka, K. W., Yasuike, M., Jantzen, S. G., Yazawa, R., Koop, B. F., & Jones, S. R. M. (2014). Comparative transcriptomics of Atlantic *Salmo salar*, chum *Oncorhynchus keta* and pink salmon *O. gorbuscha* during infections with salmon lice *Lepeophtheirus salmonis*. *BMC Genomics*, *15*(1), 200. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-200>
- Tafalla, C., Bøgvold, J., & Dalmo, R. A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*, *35*(6), 1740-1750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.029>
- Tmmas, I., Bitchava, K., & Gelasakis, A. I. (2024). Advances in Vaccine Adjuvants for Teleost Fish: Implications for Aquatic Welfare and the Potential of Nanoparticle-Based Formulations. *Vaccines (Basel)*, *12*(12). <https://doi.org/10.3390/vaccines12121347>
- Tian, J., Sun, X., Chen, X., Yu, J., Qu, L., & Wang, L. (2008). The formulation and immunisation of oral poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules containing a plasmid vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *International Immunopharmacology*, *8*(6), 900-908. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.02.006>
- Toh, S. Q., Glanfield, A., Gobert, G. N., & Jones, M. K. (2010). Heme and blood-feeding parasites: friends or foes? *Parasites & Vectors*, *3*(1), 108. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-108>
- Torto-Alalibo, T., Tian, M., Gajendran, K., Waugh, M. E., van West, P., & Kamoun, S. (2005). Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. *BMC Microbiology*, *5*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-46>
- Tröbe, C., Kongshaug, H., Dondrup, M., & Nilsen, F. (2015). Characterisation of iron regulatory protein 1A and 1B in the blood-feeding copepod *Lepeophtheirus salmonis*. *Experimental Parasitology*, *157*, 1-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.06.010>
- 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), 783. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04485-0>
- Valenzuela-Muñoz, V., Benavente, B., Casuso, A., Leal Acosta, Y., Valenzuela-Miranda, D., Núñez-Acuña, G., & Sáez-Vera, C. (2021). Transcriptome and morphological analysis in *Caligus rogercresseyi* uncover the effects of Atlantic salmon vaccination with IPath®. *Fish & Shellfish Immunology*, *117*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.005>
- Valenzuela-Muñoz, V., Benavente, B., Casuso, A., Leal, Y., Valenzuela-Miranda, D., Núñez-Acuña, G., Sáez-Vera, C., & Gallardo-Escárate, C. (2021). Transcriptome and morphological analysis in *Caligus rogercresseyi* uncover the effects of Atlantic salmon vaccination with IPath®. *Fish &*

- Shellfish Immunology*, 117, 169-178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.005>
- Valenzuela-Muñoz, V., Benavente, B. P., Casuso, A., Leal, Y., & Gallardo-Escárate, C. (2021). Chimeric Protein IPath® with Chelating Activity Improves Atlantic Salmon's Immunity against Infectious Diseases. *Vaccines*, 9(4), 361. <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/4/361>
- Valenzuela-Muñoz, V., Boltaña, S., & Gallardo-Escárate, C. (2016). Comparative immunity of *Salmo salar* and *Oncorhynchus kisutch* during infestation with the sea louse *Caligus rogercresseyi*: An enrichment transcriptome analysis. *Fish & Shellfish Immunology*, 59, 276-287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.046>
- Valenzuela-Muñoz, V., Boltaña, S., & Gallardo-Escárate, C. (2017). Uncovering iron regulation with species-specific transcriptome patterns in Atlantic and coho salmon during a *Caligus rogercresseyi* infestation. *Journal of Fish Diseases*, 40(9), 1169-1184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfd.12592>
- 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/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.019>
- Valenzuela-Muñoz, V., & Gallardo-Escárate, C. (2017). Iron metabolism modulation in Atlantic salmon infested with the sea lice *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus rogercresseyi*: A matter of nutritional immunity? *Fish & Shellfish Immunology*, 60, 97-102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.045>
- Van Gelderen, R., Carson, J., & Nowak, B. (2009). Experimental vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against marine flexibacteriosis. *Aquaculture*, 288(1), 7-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.012>
- Vera-Bizama, F., Valenzuela-Muñoz, V., Gonçalves, A. T., Marambio, J. P., Hawes, C., Wadsworth, S., & Gallardo-Escárate, C. (2015). Transcription expression of immune-related genes from *Caligus rogercresseyi* evidences host-dependent patterns on Atlantic and coho salmon. *Fish & Shellfish Immunology*, 47(2), 725-731. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.022>

- Villumsen, K. R., Neumann, L., Ohtani, M., Strøm, H. K., & Raida, M. K. (2014). Oral and Anal Vaccination Confers Full Protection against Enteric Redmouth Disease (ERM) in Rainbow Trout. *PLOS ONE*, 9(4), e93845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093845>
- Vogel, G. (1998). Fly Development Genes Lead to Immune Find. *Science*, 281(5385), 1942-1944. <https://doi.org/doi:10.1126/science.281.5385.1942>
- Walter-Nuno, A., Taracena Agarwal, M., Mesquita, R., Oliveira, P., & Paiva-Silva, G. (2018). Silencing of Iron and Heme-Related Genes Revealed a Paramount Role of Iron in the Physiology of the Hematophagous Vector *Rhodnius prolixus*. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00019>
- Wangkahart, E., Bruneel, B., Wisetsri, T., Nontasan, S., Martin, S. A. M., & Chantiratikul, A. (2022). Interactive effects of dietary lipid and nutritional emulsifier supplementation on growth, chemical composition, immune response and lipid metabolism of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 546, 737341. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737341>
- Weinberg, E. D. (2009). Iron availability and infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects*, 1790(7), 600-605. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.07.002>
- Willadsen, P. (2006). Vaccination against ectoparasites. *Parasitology*, 133(S2), S9-S25. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001788>
- Wu-Chuang, A., Mateos-Hernandez, L., Maitre, A., Rego, R. O. M., Šíma, R., Porcelli, S., Rakotobe, S., Foucault-Simonin, A., Moutailler, S., Palinauskas, V., Aželytė, J., Šimo, L., Obregon, D., & Cabezas-Cruz, A. (2023). Microbiota perturbation by anti-microbiota vaccine reduces the colonization of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus*. *Microbiome*, 11(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01599-7>
- Wu-Chuang, A., Obregon, D., Mateos-Hernández, L., & Cabezas-Cruz, A. (2022). Anti-tick microbiota vaccines: how can this actually work? *Biologia*, 77(6), 1555-1562. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00818-6>
- Xue, X., Caballero-Solares, A., Hall, J. R., Umasuthan, N., Kumar, S., Jakob, E., Skugor, S., Hawes, C., Santander, J., Taylor, R. G., & Rise, M. L. (2021). Transcriptome Profiling of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Parr With Higher and Lower Pathogen Loads Following *Piscirickettsia salmonis* Infection. *Front Immunol*, 12, 789465. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.789465>

- Yáñez, J. M., Lhorente, J. P., Bassini, L. N., Oyarzún, M., Neira, R., & Newman, S. (2014). Genetic co-variation between resistance against both *Caligus rogercresseyi* and *Piscirickettsia salmonis*, and body weight in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 433, 295-298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.026>
- Yin, F., Dan, X.-M., Sun, P., Shi, Z.-H., Gao, Q.-X., Peng, S.-M., & Li, A.-X. (2014). Growth, feed intake and immune responses of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) exposed to low infectious doses of ectoparasite (*Cryptocaryon irritans*). *Fish & Shellfish Immunology*, 36(1), 291-298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.11.019>
- Zeinali, F., Homaei, A., & Kamrani, E. (2015). Sources of marine superoxide dismutases: Characteristics and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 627-637. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.053>
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., & Xue, Y. (2004). Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 55(2), 167-174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.10.048>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557-1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>

9. ANEXO

Anexo 1

Extracción de RNA

1. Limpiar y esterilizar gabinete de bioseguridad, seguidamente preparar 1mL de TRIzol en un tubo eppendorf de 2mL, agregar esfera de cerámica estéril y rotular.
2. En recipiente con hielo, sobre una placa de Petri, cortar entre 30-100 mg de tejido a extraer RNA y llevarlos a el tubo eppendorf previamente preparado.
3. Homogenizar en Tissuelyser, utilizando soporte de tubos para Tissuelyser previamente enfriado. Frecuencia 24 oscilaciones, durante 10 minutos.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
5. Centrifugar durante 5 minutos, a 4°C, con una velocidad de 12000g. Una vez finalizado transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 2mL, descartar pellet, rotular y retirar esfera de cerámica.
6. En el gabinete de bioseguridad, añadir 200µL de cloroformo al tubo nuevo, voltear manualmente 15 veces y dejar incubar en hielo durante 3 min.
7. Centrifugar durante 15 minutos, a 4°C con una velocidad de 12000g.
8. Una vez finalizado, transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5mL y rotular.
9. En gabinete de bioseguridad, añadir 500µL de isopropanol, voltear manualmente (sin vortex) e incuba durante mínimo 40 min a -20°C o -80°C.
10. Retirar de incubadora y manejar muestra sobre recipiente con hielo, centrifugar durante 10 min, a 4°C, con una velocidad de 12000g.
11. Descartar sobrenadante y añadir 1mL de etanol al 75% y aplicar vortex hasta lavar pellet.
12. Centrifugar durante 5 min, a 4°C, con una velocidad de 7500rpm.
13. Repetir paso 11 y 12
14. Descartar el maximo sobrenadante posible, utilizar spin de ser necesario.
15. Dejar el tubo secar sobre hielo durante 10 min.
16. En base a la cantidad de pellet, utilizar entre 20-50µL de agua BM (Grado biología molecular), homogenizar en vortex durante 20 segundos y spin.
17. Cuantificar en Nanodrop (Analizar concentración 260/280 y 260/230), finalmente determinar la integridad mediante electroforesis en gel MOPS 1.2% (Gel MOPS: 4µL gel Red, 900µL formalina, 50mL MOPS y 0,6g de agarosa) por pocillo añadir 4µL (2µL de azul y 2µL de muestra).
18. Una vez analizada la integridad y pureza, en un nuevo tubo de 1,5 mL rotulado concentrar la muestra a 200ng/µL, utilizando RNA y agua BM.

Anexo 2

Síntesis de cDNA

1. En un tubo estéril de 0,2 mL añadir:
 - a. 1µL de RNA (200ng/µL).
 - b. 1µL de Random Primer u Oligo (dt), según se requiera.
 - c. 10µL de agua BM.
 - d. Dar vortex y mezclar con micropipeta.
 - e. 4µL de Buffer reaction (5X).
 - f. 1µL de inhibidor de RNasa Ribolock (20U/µL)
 - g. 2µL de dNTP Mix
 - h. Agregar 1µL de transcriptasa inversa RevertAid H Minus (200 U/µl)

Reactivo	Reacción 1X (10µL)	Reacción 1X (20µL)
Random Primer / Oligo (dt)	0.5	1
Buffer reaction (5X)	2	4
Agua BM	4.5	9
Ribolock (20U/µL)	0.5	1
dNTP Mix	1	2
RevertAid H Minus (200 U/µl)	0.5	1

2. Homogenizar en vortex y luego spin.
3. Ubicar tubo en termociclador Esco Swift Maxi, utilizando el programa descrito a continuación.

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Ciclo	25	5
Ciclo	42	60
Ciclo	70	5

4. Una vez finalizado el programa, añadir 80µL de agua BM y almacenar muestras dependiendo necesidad, máximo 1 semana -20°C o máximo 5 años -80°C.
5. Para verificar la correcta síntesis de cDNA se puede realizar qPCR utilizando partidores estandarizados y una posterior visualización en electroforesis.

Anexo 3

qPCR SYBR Green

1. Sobre un recipiente con hielo, descongelar las muestras de cDNA, sin aplicar vortex o spin. Seguidamente esterilizar en gabinete de bioseguridad materiales a utilizar (Guantes, micropipetas, puntas de micropipeta, Agua BM, gradilla, placa de qPCR, Film óptico de placa, soporte de placa, recipiente de puntas, lápiz y tubos eppendorf), utilizando UV durante 10 minutos. De inmediato se enciende el computador y el termociclador QuantStudio 3, configurando el programa a utilizar y configurando la placa.
2. En un tubo eppendorf de 1,5 mL preparar mix reacción a trabajar.

Reactivo	Reacción 1X (10 μ L)
Agua BM	1,75
PowerUp SYBR Green Master Mix (2X)	5
Primer Forward	0,625
Primer Reverse	0,625
cDNA	2
Volumen final	10

3. En cada pocillo de la placa cargar 8 μ L de mix de trabajo sin cDNA, evitando formar burbujas.
4. Una vez añadido el mix de trabajo, se toman 2 μ L de cDNA, homogenizando con la micropipeta, y homogenizando en la placa con el mix de trabajo.
5. Sellar la placa con Film óptico y dar spin para eliminar las posibles burbujas que se pueden haber formado. En caso de haber burbujas, repetir.
6. Ubicar placa en el termociclador y continuar con el programa descrito en la siguiente tabla

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
50	2 min	Hold
95	2-10 min	1
95	15 seg	40
T _m \geq 60	1 min	40
Para curva de melting, utilizar valores por defecto.		
50	2 min	Hold
95	2-10 min	1
95	15 seg	40
T _m 55-60	15 seg	40
72	1 min	40
Para curva de melting, utilizar valores por defecto.		

Anexo 4

qPCR TaqMan

1. Sobre un recipiente con hielo, descongelar las muestras de cDNA, sin aplicar vortex ni spin. Seguidamente esterilizar en gabinete de bioseguridad materiales a utilizar (Guantes, micropipetas, puntas de micropipeta, Agua BM, gradilla, placa de qPCR, Film óptico de placa, soporte de placa, recipiente de puntas, lápiz y tubos eppendorf), utilizando UV durante 10 minutos. De inmediato se enciende el computador y el termociclador QuantStudio 3, configurando el programa a utilizar y configurando la placa.

2. En un tubo eppendorf de 1,5 mL preparar mix reacción a trabajar.

Reactivo	Reacción 1X (10,5µL)
Mix Kappa	6
Primer Forward	0,345
Primer Reverse	0,345
Probe	0,3
Low Rox	0,24
H ₂ O	3,27
cDNA	2

3. En cada pocillo de la placa cargar 10,5 µL de mix de trabajo sin cDNA, evitando formar burbujas.
4. Una vez añadido el mix de trabajo, se toman 2µL de cDNA, homogenizando con la micropipeta, y homogenizando en la placa con el mix de trabajo.
5. Sellar la placa con Film óptico y dar spin para eliminar las posibles burbujas que se pueden haber formado. En caso de haber burbujas, repetir.
6. Ubicar placa en el termociclador y continuar con el programa descrito para sonda Taqman y gen específico.

Anexo 5

Protocolo extracción de ADN con fenol cloroformo (Muestras almacenadas en etanol)

1. En gabinete de bioseguridad, tomar las muestras y dejar sobre papel absorbente para eliminar restos de etanol.
2. Agregar a un tubo eppendorf de 2 mL, 955µL de Buffer de lisis compuesto por
 - a. 10mM Tris HCL
 - b. 400mM NaCL
 - c. 100mM EDTA
3. Después de añadir Buffer, añadir 40µL de SDS (10%), seguido de 100µL de Proteínasa K (1mg/mL) o 5µL de proteínasa K (20mg/mL).
4. En una placa Petri, cortar las muestras en fracciones pequeñas y añadir al tubo de lisis previamente preparado.
5. Incubar a 37°C toda la noche o mínimo durante 2 hrs, realizando vortex cada 20 minutos. Para *C. rogercresseyi*, incubación mínima de 2 hrs y vortex inmediatamente.
6. Terminar de lisar las muestras en Tissuelyser, utilizando 1 esfera de cerámica estéril, configurar equipo con: Frecuencia 24 oscilaciones, durante 5 minutos.
7. Una vez finalizada la lisis, dejar incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y transferir a un tubo nuevo de 2mL rotulado.
8. En gabinete de bioseguridad, agregar a cada muestra, en relación 1:1 muestra: fenol-cloroformo, mezclar con vortex y dejar reposar durante 1 min a temperatura ambiente.
9. Centrifugar durante 5 minutos a temperatura ambiente, con una velocidad de 12000 rpm.
10. Recuperar la fase acuosa y agregar 1 Vol de cloroformo, en relación 1:1, muestra: cloroformo, mezclar en vortex.
11. Repetir paso 9 y 10
12. En un tubo eppendorf nuevo y rotulado, recuperar la fase acuosa y agregar 1 Vol de isopropanol, en relación 1:1, muestra:isopropanol, voltear manualmente e incubar a -20°C (mínimo 30 min).
13. Centrifugar durante 20 minutos a 4°C a una velocidad de 12000rpm
14. Eliminar el sobrenadante y lavar pellet con 1 mL de etanol (75%) y homogenizar suavemente con micropipeta.
15. Centrifugar durante 5 minutos a 4°C a una velocidad de 12000rpm
16. Repetir paso 14 y 15.
17. Eliminar restos de etanol con spin y pipeta, dejar secar entre 5-10 minutos a temperatura ambiente.
18. Resuspender en 50µL de Agua BM.
19. Cuantificar en Nanodrop (Analizar concentración 260/280 y 260/230), finalmente determinar la integridad mediante electroforesis en gel TAE 1.2% (Gel TAE: 50mL TAE y 0,5g de agarosa) por pocillo añadir 4µL (2µL de azul y 2µL de muestra).

20.

Khan, I. (2021). Microbiome. *Indian J Med Paediatr Oncol*, 42(05), 461-465. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1735599>
Shafquat, A., Joice, R., Simmons, S. L., & Huttenhower, C. (2014). Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends in Microbiology*, 22(5), 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.011>

21.