



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
BIOLOGÍA MARINA

Título de tesis:

Evaluación transcripcional de la respuesta inmune en *Caligus rogercresseyi* sobre salmón del Atlántico inmunizados con vacuna antimicrobiota

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE
BIÓLOGO MARINO**

Alumna: Catalina Victoria Gutiérrez Inzunza

Profesor Guía: Cristian Gallardo Escárate

Diciembre 2024
Concepción, Chile.



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS



EVALUACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE RESPUESTA INMUNE EN
CALIGUS ROGERCRESSEYI SOBRE SALMÓN ATLÁNTICO
INMUNIZADOS CON VACUNA ANTIMICROBIOTA

Por

CATALINA VICTORIA GUTIÉRREZ INZUNZA

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

CONCEPCIÓN - CHILE

2024

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

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

Profesor Guía:

Dr. Cristian Gallardo Escárte
Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Ha sido aprobada por la
Siguiete Comisión Evaluadora:

Dra. Valentina Valenzuela Muñoz
Centro de Biotecnología, INCAR
Universidad de Concepción, Concepción

Dra. Yeni Leal Acosta
Centro de Biotecnología, INCAR
Universidad de Concepción, Concepción

Dr. Ariel Valenzuela Saldías
Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Jefe de carrera:

Dr. Ariel Valenzuela Saldías
Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

A mis amores, Luz Marina y Héctor, a mis padres Victoria y Nelson, porque este logro también es de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi profesor guía Dr. Cristian Gallardo por el inmenso apoyo, fé y confianza depositada en mí durante el transcurso de la tesis. También quisiera agradecer a todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola, por estar presentes y ayudarme durante todo este proyecto, por sus enseñanzas y entregarme nuevas herramientas para mi desarrollo personal y profesional.

También quisiera agradecer a toda mi familia, por apoyarme en la difícil labor de ser mamá y estudiante, por soportarme y creer en mí, principalmente a Héctor, por tu incondicional soporte, amor y comprensión durante esta etapa de mi vida.

Por último, agradecer a mi compañera de carrera y amiga, Catalina Pizarro, por todas las risas, apañe y los lindos recuerdos.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS.....	8
INDICE DE TABLAS.....	10
INDICE DE ANEXOS.....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1 Caligidosis.....	16
1.2 <i>Caligus rogercresseyi</i>	16
1.3 Información transcriptómica de <i>C. rogercresseyi</i>	19
1.3.1 Respuesta inmune innata.....	19
1.3.2 Vía de señalización receptores tipo Toll (TLR).....	21
1.3.3 Vía de inmuno deficiencia (IMD).....	22
1.3.4 Sistema antioxidante.....	24
1.3.5 Productos secretorios.....	26
1.4 Tratamientos de control para la caligidosis	28
1.4.1 Tratamientos químicos.....	29
1.4.2 Tratamientos no farmacológicos.....	30
1.4.3 Vacunas.....	30
1.5 Vacunas antimicrobiota.....	31
1.5.1 Comunidades microbianas asociadas a <i>C. rogercresseyi</i>	34
1.6 Justificación de la investigación.....	36
2. HIPOTESIS.....	37
3. OBJETIVOS.....	38
4. METODOLOGIA.....	39
4.1 Objetivo I: Evaluación de cambios de expresión, a través de un análisis <i>in silico</i> , de genes asociados a respuesta inmune y vías de señalización de	

muerte celular en <i>C. rogercresseyi</i> tras la exposición a la vacuna antimicrobiota.....	39
4.1.1 Formulación de la vacuna.....	39
4.1.2 Diseño experimental.....	39
4.1.3 Extracción y Secuenciación de ARN.....	41
4.1.4 Análisis de secuenciación de ARN e identificación de expresión génica diferencial.....	42
4.1.5 Anotación génica y Mapeo a vías metabólicas.....	42
4.2 Objetivo II: Analizar los patrones de transcripción en <i>C. rogercresseyi</i> expuesto a vacuna antimicrobiota para genes asociados a repuesta inmune innata (vías TLR e IMD).....	43
4.2.1 Extracción de ARN y síntesis de cDNA.....	43
4.2.2 Selección de partidores.....	44
4.2.3 Evaluación y análisis de expresión génica mediante RT-qPCR...45	
4.3 Objetivo III. Determinar la modulación de genes de estrés oxidativo y Secretoma en <i>C. rogercresseyi</i> colectados de peces inmunizados con vacuna antimicrobiota.....	45
4.3.1 Extracción de ARN y síntesis de cDNA.....	45
4.3.2 Selección de partidores.....	45
4.3.3 Evaluación y análisis de expresión génica mediante RT-qPCR..47	
RESULTADOS.....	48
DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES.....	79
BIBLIOGRAFIA.....	82

INDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Ciclo de Vida de <i>C. rogercresseyi</i>	18
Figura N°2: Vías de señalización Toll identificadas por RNAseq asociadas a la respuesta inmunológica de <i>C. rogercresseyi</i>	22
Figura N°3: Vías de señalización IMD identificadas por RNAseq asociadas a la respuesta inmunológica de <i>C. rogercresseyi</i>	23
Figura N°4: Manipulación del microbioma vectorial con vacunas antimicrobiota.....	33
Figura N°5: Esquema experimental de vacunación en salmón del Atlántico.....	40
Figura N°6: Gel de MOPS al 1,2% de la extracción de ARN de <i>C. rogercresseyi</i>	42
Figura N°7: Gel TAE al 1.5% de la síntesis de cDNA de <i>C. rogercresseyi</i>	44
Figura N°8: Heatmap de expresión génica de vía de apoptosis en <i>C. rogercresseyi</i> bajo diferentes tratamientos.....	50
Figura N°9: Mapa de la vía de Apoptosis en <i>C. rogercresseyi</i> basado en la base de datos KEGG, mostrando los productos proteicos involucrados en cada etapa de la vía..	51
Figura N°10: Heatmap de expresión génica de vía TNF en <i>C. rogercresseyi</i> bajo diferentes tratamientos.....	52
Figura N°11: Mapa de la vía NTF en <i>C. rogercresseyi</i> basado en la base de datos KEGG, mostrando los productos proteicos involucrados en cada etapa de la vía.....	53
Figura N°12: Heatmap de expresión génica de vía ferroptosis en <i>C. rogercresseyi</i> bajo diferentes tratamientos.....	54
Figura N°13: Mapa de la vía de Ferroptosis en <i>C. rogercresseyi</i> basado en la base de datos KEGG, mostrando los productos proteicos involucrados en cada etapa de la vía..	55

Figura N°14: Expresión relativa del ARNm de (A) IAP, (B) Dorsal Y (C) Ikk β en <i>C. rogercresseyi</i> extraídos a 25 y 68 días post infección tras exposición a vacuna antimicrobiota.....	58
Figura N°15: Expresión relativa del ARNm de (A) ferritina, (B) SOD, (C) catalasa y (D) PHGP en <i>C. rogercresseyi</i> extraídos a 25 y 68 días post infección (dpi) tras tratamiento con vacuna antimicrobiota.....	61
Figura N°16: Expresión relativa del ARNm de Serpinas 3 y 10 en <i>C. rogercresseyi</i> extraídos a 25 y 68 días post infección (dpi) tras tratamiento con vacuna antimicrobiota.....	63
Figura N°17: Expresión relativa del ARNm de Tripsinas 2 y 12 de <i>C. rogercresseyi</i> extraídos a 25 y 68 días post infección (dpi) tras tratamiento con vacuna antimicrobiota.....	64
Figura N°18: Expresión relativa del ARNm de Catepsinas B y D en <i>C. rogercresseyi</i> extraídos a 25 y 68 dpi tras tratamiento con vacuna antimicrobiota.....	65
Figura N°19: Análisis de componentes principales (PCA) por grupos para todos los genes evaluados relacionados a la respuesta Inmune Innata, ROS y Secretoma en <i>C. rogercresseyi</i> expuestos a vacuna antimicrobiota a los 25 y 68 dpi y grupos control...	67
Figura N°20: Análisis de componentes principales (PCA) total para todos los genes evaluados relacionados a la respuesta Inmune Innata, ROS y Secretoma en <i>C. rogercresseyi</i> expuestos a vacuna antimicrobiota versus grupo control.....	68

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Índices de pureza y concentración de las muestras utilizadas indicados por espectrofotómetro ND 1000 (Nanodrop Technologies).....	41
Tabla N°2: Partidores seleccionados y estandarizados para transcritos de vías TLR e IMD para <i>C. rogercresseyi</i>	44
Tabla N°3: Partidores seleccionados y estandarizados para transcritos de ROS para <i>C. rogercresseyi</i>	46
Tabla N°4: Partidores seleccionados y estandarizados para transcritos de Secretoma para <i>C. rogercresseyi</i>	46

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°1: Master mix para la reacción de síntesis de cDNA.....	81
Anexo N°2: Master mix para la reacción PCR en tiempo final.....	81

RESUMEN

La comprensión de la respuesta inmune de los organismos ante la presencia de patógenos es crucial para el desarrollo de estrategias efectivas de control y prevención de enfermedades. En el contexto de la acuicultura, donde la salud de los peces es fundamental para el éxito de la industria, el estudio de los mecanismos inmunes de los parásitos que afectan a las poblaciones de peces es de suma importancia. En este sentido, *Caligus rogercresseyi* emerge como un agente patógeno de relevancia en la salmicultura chilena, siendo una de las mayores problemáticas que afectan a las principales especies de salmónidos de exportación de nuestro país. Se sabe que el estado de salud equilibrado está estrechamente relacionado con la interacción entre el sistema inmunitario y la microbiota del organismo. La microbiota cumple funciones esenciales como el metabolismo de nutrientes y la resistencia a infestación de patógenos. Sin embargo cuando este equilibrio se ve alterado pueden generar una depresión del sistema inmune del organismo. Las vacunas antimicrobiota están diseñadas para intervenir este equilibrio, desfavoreciendo el microbioma del huésped y fortaleciendo el sistema del hospedador. En el caso específico de *C. rogercresseyi*, la interacción entre su microbiota y su sistema inmune aún no ha sido completamente explorada. Entender esta interacción es crucial, ya que puede proporcionar información valiosa sobre los mecanismos de defensa del parásito y potenciales puntos de intervención para el desarrollo de vacunas más efectiva. El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta transcriptómica de los genes involucrados en vías de muerte celular o apoptosis, como también en la respuesta inmune innata, procesos de estrés oxidativo y secretoma en *C. rogercresseyi* expuesto a una vacuna antimicrobiota. Para ello se consideró un pool de 6 individuos de ambos sexos, extraídos de peces inmunizados con vacuna antimicrobiota formulada con un mix de bacterias inactivas aisladas desde *C. rogercresseyi*. La evaluación se realizó a los 25 y 68 días post-infección. Las muestras fueron secuenciadas con el objetivo de realizar un análisis *in silico* de expresión génica, y posteriormente se realizó una validación mediante qPCR. Como resultados, basado en el análisis bioinformático, se evidencia un considerable número de transcritos involucrados en vías metabólicas clave, como la apoptosis, la señalización de factores de necrosis tumoral (TNF) y Ferroptosis.

De estas vías, la Ferroptosis fue la más consistentemente validada por los resultados de expresión relativa. Los análisis transcriptómicos basados en qPCR revelan una expresión diferencial de genes relacionados con homeostasis del hierro y la respuesta al estrés oxidativo, como ferritina, SOD, catalasa y PHGP. Además, el análisis *in silico* indica que la vacuna antimicrobiota induce una regulación diferencial de genes que codifican para ferroportina y ferritina, proteínas esenciales en la vía de la ferroptosis. Estas desempeñan roles críticos en la regulación del metabolismo del hierro y la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ROS), y su sobreexpresión podría actuar como un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo, previniendo la muerte celular. Asimismo, los resultados de expresión diferencial muestran la sobreexpresión IKK β , involucrado en la cascada de señalización de la respuesta inmune innata en *C. rogercresseyi*, lo que sugiere que la vacuna antimicrobiota parece modular parcialmente la respuesta inmune del ectoparásito frente al hospedador. Dentro de los resultados de expresión relativa no se evidenció un efecto negativo consistente en la capacidad del parásito para evadir la respuesta inmune del hospedador, ya que la modulación de genes como serpinas, catepsinas y tripsinas no mostró diferencias significativas con respecto a los estudios previos. En conclusión, los resultados de este estudio destacan el potencial de las vacunas antimicrobicas para alterar vías de señalización críticas en *C. rogercresseyi* y contribuir a estrategias innovadoras para el control de este parásito en la salmonicultura, lo que puede minimizar los impactos negativos en el medio ambiente y mejorar la sostenibilidad de la producción.

ABSTRACT

Understanding the immune response of organisms in the presence of pathogens is crucial for the development of effective disease control and prevention strategies. In the context of aquaculture, where fish health is critical to the success of the industry, the study of the immune mechanisms of parasites affecting fish populations is of utmost importance. In this sense, *Caligus rogercresseyi* emerges as a pathogenic agent of relevance in Chilean salmon farming, being one of the major problems affecting the main species of salmonids exported from our country. It is known that a balanced state of health is closely related to the interaction between the immune system and the microbiota of the organism. The microbiota fulfills essential functions such as nutrient metabolism and resistance to pathogen infestation. However, when this balance is disturbed, it can lead to a depression of the body's immune system. Antimicrobiota vaccines are designed to intervene in this balance, depleting the host microbiome and strengthening the host system. . In the specific case of *C. rogercresseyi*, the interaction between its microbiota and its immune system has not yet been fully explored. Understanding this interaction is crucial, as it can provide valuable information on the defense mechanisms of the parasite and potential points of intervention for the development of more effective vaccines. The aim of the present study is to evaluate the transcriptomic response of genes involved in cell death pathways, as well as in the innate immune response, oxidative stress processes and secretomes in *C. rogercresseyi* exposed to an antimicrobial vaccine. For this purpose, a pool of 6 individuals of both sexes , extracted from fish immunized with vaccine formulated with a mix of inactivated bacteria, was considered after 25 and 68 dpi. . The samples were sequenced in order to perform an *in silico* analysis of gene expression, and the results were subsequently validated by qPCR. As results, based on the bioinformatics analysis, a considerable number of transcripts involved in key metabolic pathways, such as apoptosis, tumor necrosis factor (TNF) signaling and Ferroptosis, are evident. Of these pathways, Ferroptosis was the most consistently validated by relative expression results. Transcriptomic analysis based on qPCR revealed differential expression of genes related to iron homeostasis and the response to oxidative stress, such as ferritin, SOD, catalase and PHGP. Furthermore, *in silico*

analysis indicates that the vaccine induces differential regulation of genes encoding for ferroportin and ferritin, essential proteins in the ferroptosis pathway. These play critical roles in the regulation of iron metabolism and reactive oxygen species (ROS) homeostasis, and their overexpression could act as a defense mechanism against oxidative stress, preventing cell death. Likewise, the differential expression results show the overexpression of IKK β , involved in the signaling cascade of the innate immune response in *C. rogercresseyi*, suggesting that the antimicrobial vaccine appears to partially modulate the immune response of the ectoparasite against the host. Within the results of relative expression, there was no evidence of a consistent negative effect on the parasite's ability to evade the host's immune response of the host, since the modulation of genes such as serpins, cathepsins and trypsins did not show significant differences with respect to previous studies. In conclusion, the results of this study highlight the potential of antimicrobial vaccines to alter critical signaling pathways in *C. rogercresseyi* and to contribute to innovative strategies for the control of this parasite in salmon farming, which can minimize negative impacts on the environment and improve production sustainability.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Caligidosis

En las últimas décadas, la industria acuícola en Chile ha visto un incremento en el cultivo de especies de alto valor comercial como el *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Oncorhynchus kisutch*. Sin embargo, esta actividad enfrenta desafíos significativos, como por ejemplo las enfermedades patógenas. El ectoparásito *Caligus rogercresseyi* es el causante de una enfermedad conocida como Caligidosis al infestar a sus hospedadores (Bravo et al., 2008), la cual es una de las mayores problemáticas que afectan a las principales especies de salmónidos de exportación de nuestro país, provocando pérdidas en producción de alrededor de US\$ 480 millones al año producto a la extensión del tiempo de cosecha y debido a la necesidad de gestionar tratamientos antiparasitarios (Costello, 2009).

Esta enfermedad está presente desde los inicios de la industria del salmón en Chile en los años '70, donde se ha visto una cantidad importante de copépodos marinos. Sin embargo, fue en los años '80 con los primeros cultivos de salmón coho (*O. kisutch*) en el mar, cuando se tuvo registros de Caligidosis por *Caligus teres*. Posteriormente, en el año 1997 se generaron reportes de Caligidosis por la presencia de *Caligus flexispina*, lo que fue considerado como un problema potencial en la industria acuícola (Bravo et al., 2013). Posteriormente, *C. flexispina* en el año 2000 fue caracterizado como *C. rogercresseyi* (Oelckers et al., 2014).

1.2. *Caligus rogercresseyi*

El ciclo de vida de *C. rogercresseyi* se divide en ocho estados de desarrollo (Fig. 1), de los cuales tres corresponden a una fase de vida libre (planctónica), con dos estados nauplius y un estado copepodito, los otros cinco estados corresponden a la denominada fase adherida al hospedador (parásito), con cuatro estados de chalimus (I-IV), terminando con la etapa de machos y hembras maduros (González & Carvajal, 2003;

Rozas, 2006). Durante la fase de copepodito ocurre la infección en el hospedador. El proceso de infestación ocurre cuando el copepodito se asienta en el hospedador, enganchándose con su segundo par de antenas y maxilípedos. Durante el proceso de muda, el copepodito extruye el filamento frontal con el fin de adherirse de manera permanente, pasando los demás estados de desarrollo adherido a la piel del hospedador (González & Carvajal, 2003).

La abundancia del parásito depende de factores bióticos, como la temperatura del agua, para pasar de un estado a otro en su ciclo de vida. Existe una temperatura umbral mínima a la cual el parásito no se desarrolla (4,2°C en larvas, 5,4°C a 6,3°C para chalimus 4 y adultos desde el asentamiento), el correcto conocimiento de este factor permite calcular el tiempo que demoraría el parásito en producir huevos. Para su desarrollo, *Caligus* requiere una acumulación de calor en el tiempo sobre la temperatura umbral o temperatura efectiva (Vera, 2015). Otro factor determinante para la abundancia del piojo del mar es la salinidad la cual afecta el desarrollo de las larvas. Se ha observado que los nauplius no mudan a copepodito a salinidades iguales o inferiores a 15 ‰. En estado adultos de estos parásitos, sin embargo, podrían sobrevivir por ciertos períodos a bajas salinidades (Bravo et al., 2008). Otros estudios indican que la salinidad y la temperatura tienen un efecto significativo en el éxito de la eclosión de este parásito. Salinidades entre 26 y 32 PSU dan como resultado un éxito de eclosión del 100%, mientras que salinidades más bajas (14 PSU) reducen el éxito de eclosión en un 60% (en todas las temperaturas experimentales), generando un aumento en la mortalidad de estas primeras etapas de desarrollo. Una reducción de la temperatura de 18 °C a 6 °C en las condiciones de cultivo extiende significativamente el tiempo de incubación de *C. rogercresseyi* en un 50 %. Resaltando que la temperatura tiene un mayor impacto en las larvas de nauplio I y nauplio II, aumentando los tiempos de desarrollo a 50 y 100 h respectivamente, cuando la temperatura disminuyó a 6 °C (Montory et al., 2018).

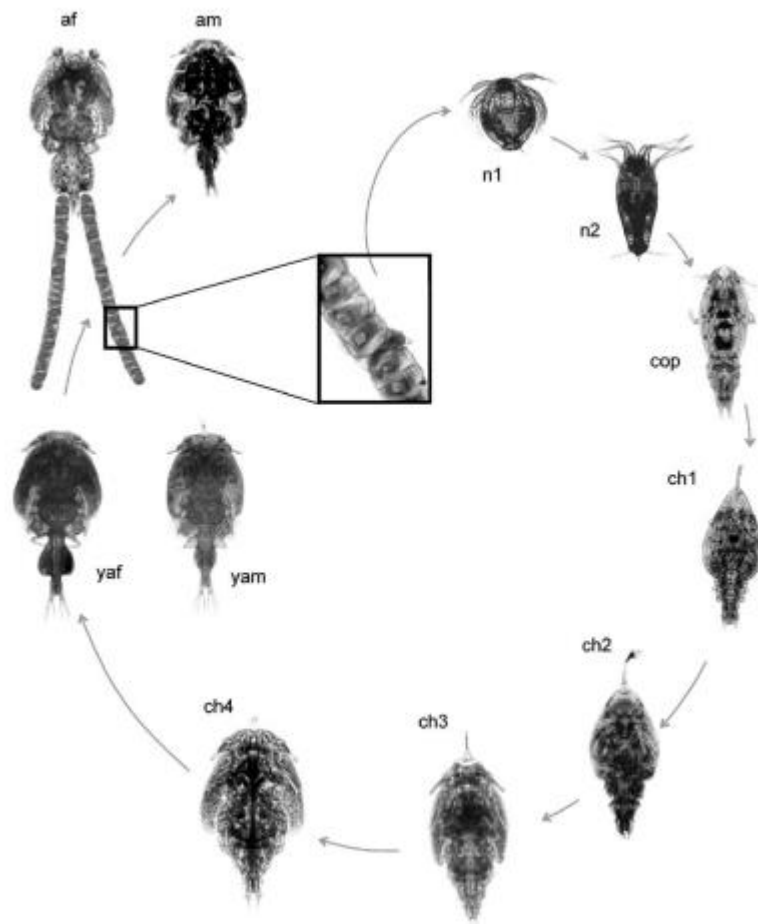


Figura 1. Ciclo de *C. rogercresseyi*. Se distinguen las dos etapas de nauplios (n1 y n2), el estado de copepodito (cop), y las etapas siguientes, las que constan de 4 estados de chalimus (ch1, ch2, ch3 y ch4), estados juveniles de macho (yam) y hembra (yaf), y por último se observan el macho maduro (am) y la hembra madura (af), esta última con sacos ovígeros. Tomado de (González & Carvajal, 2003).

Una vez asentado *C. rogercresseyi* se alimenta del mucus, sangre y piel, provocando la descamación del hospedador (Pino-Marambio et al., 2007), causando heridas que pueden llevar a infecciones secundarias y, en casos de infestación severa, incluso a la muerte (Oelckers et al., 2014); Según el grado de infestación, los peces pueden experimentar una reducción del apetito, una disminución en la eficiencia de conversión alimenticia y un aumento del estrés, lo cual afecta negativamente su crecimiento (Montorya et al., 2018). El estrés provocado, sumado a la pérdida en las funciones protectoras y

antimicrobianas, junto a la pérdida de continuidad de la piel trae como consecuencia un desbalance osmótico, así como inmunodepresión en los peces. Debido a esto es que se cree que la presencia de este ectoparásito en los peces facilita el contagio de otro tipo de enfermedades como la Anemia Infecciosa del Salmón (ISAV) (Oelckers et al., 2014), Síndrome Rickettsial Salmonídeo (SRS), o la Enfermedad del Virus Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) (Bravo et al., 2008).

Además, se ha observado que *Caligus* presenta diferencias en los niveles de infestación entre especies de salmónidos, siendo la trucha arcoíris (*O. mykiss*) y el salmón del Atlántico (*S. salar*) las especies más susceptibles a la infección, mientras que el salmón coho (*O. kisutch*) es más resistente cuando no está afectado por otra enfermedad (Bravo et al., 2013; Vera-Bizama et al., 2015). Ante esto, se sabe que esta mayor resistencia puede estar vinculada a una mayor respuesta Th1 y bajos niveles de actividad de la respuesta Th2 durante la infestación, donde la elevada respuesta Th1 en el salmón Coho podría representar la estrategia utilizada para limitar la cantidad de mucus disponible para los ectoparásitos, al tener en cuenta que la respuesta Th2 puede favorecer la producción de mucina para aumentar la disponibilidad de mucus. Es importante destacar que el aumento de la disponibilidad de mucus probablemente beneficiaría al parásito, ya que esta sustancia es la principal fuente de alimento para *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Muñoz, 2016).

1.3. Información transcriptómica de *C. rogercresseyi*

1.3.1. Respuesta inmune innata

El sistema de defensa de los organismos invertebrados se restringe solo al sistema inmune innato, el cual incluye la encapsulación, fagocitosis y la formación de nódulos, además del sistema de coagulación identificado en artrópodos, la síntesis de una amplia gama de proteínas antimicrobianas, registrado para insectos y crustáceos, y la activación del sistema profenoloxidasa (Ong et al., 2006). Esta tiene capacidad de constituir la respuesta inicial contra microorganismos para evitar la infección del huésped, puesto que se ha demostrado que al inhibir o eliminar cualquiera de los diversos mecanismos de

la inmunidad innata aumenta considerablemente la susceptibilidad a las infecciones, incluso cuando el sistema inmunitario adaptativo está intacto. Para ello las principales células efectoras de la inmunidad innata la componen los neutrófilos, los fagocitos mononucleares y los linfocitos NK (natural killer), encargados de la fagocitosis y lisis de los microorganismos, pero además cuenta con otros componentes tales como las barreras epiteliales, que previenen el ingreso de los microorganismos, proteínas efectoras circulares, implicadas en la destrucción del agente y activación del sistema complemento, y citosinas, vinculadas con el proceso de proliferación (Abbas, 2008). Esto se lleva a cabo mediante la acción de receptores presentes en la membrana celular, los cuales identifican patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), gatillando el comienzo de una serie de cadenas de transducción de señales moleculares a nivel celular (Li, 2012) Entre los receptores se encuentran los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales reconocen estructuras características de los microorganismos patógenos que no están presentes en las células del huésped. Estas estructuras incluyen los ácidos nucleicos específicos de los microorganismos, como el ARN bicatenario, lipopolisacáridos (LPS) en las bacterias Gram negativas (Abbas, 2008). Estas cadenas lo que hacen es activar las vías de señalización en la respuesta inmune, la vía Toll y la vía de Inmuno Deficiencia (IMD), las cuales son activadas en presencia de diferentes patógenos (Beutler & Moresco, 2008). En la actualidad ya existen estudios que han logrado describir las vías TLR e IMD presentes en la respuesta inmune de *C. rogerscresseyi* (Fig. 2 y 3) (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárte, 2014), las cuales han entregado información de los mecanismos de defensa, las vías activas durante una infección, identificación de factores celulares implicados en la destrucción de los agentes patógenos, así como la regulación y la reparación del daño. Con los antecedentes anteriores, y las observaciones realizadas tanto en *Drosophila melanogaster*, como en *Litopenaeus vannamei*, se ha demostrado que la iniciación de una vía u otra depende del tipo de patógeno que afecta al organismo, y que además son dependientes de genes como Dorsal, homólogo de NF- κ B y Relish. Estos, a través de una serie de interacciones, activan la generación de moléculas efectoras como péptidos antimicrobianos (AMPs) (Hou et al., 2013; Valanne et al., 2011).

1.3.2. Vía de señalización receptores tipo Toll (TLR)

La vía TLR posee receptores encargados de reconocer diferentes tipos de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), lo que conlleva a la activación de esta vía. Los microorganismos que la activan son bacterias Gram-positivas, y hongos que atacan al organismo (Mydlarz et al., 2006). En trabajos anteriores sobre *C. rogercresseyi* realizados por Valenzuela-Muñoz and Gallardo-Escárate (2014), se identificaron mediante RNA seq los genes que pertenecen a la vía de señalización tipo Toll. El mecanismo de acción de esta vía, ilustrado en la Figura 2, prosigue con la acción de intermediarios o moléculas adaptadoras como MyD88, que tiene como función el hacer de puente entre los receptores TLR y la quinasa para que ocurra una transducción de señales. Función similar cumple Tollip, Proteína de Interacción Toll, la cual interactúa con IRAK (Shen & Manley, 2002). A raíz de esto se han descrito anteriormente, dos rutas principales de señalización, una dependiente de MyD88 y una independiente de MyD88 (Méndez, 2008). En la primera ruta, ocurre la interacción antes descrita. Luego MyD88 recluta, proteínas IRAK, como IRAK4 que activa por fosforilación a IRAK1, la cual se asocia con TRAF6. Posteriormente ocurre la activación del complejo TAB/TAK1, ya que el blanco de estas quinasas es IKK, proteína encargada de fosforilar a IKK β , para que sea degradado y libere a Dif/Dorsal, lo cual permite la translocación de Dorsal en el núcleo, permitiendo la síntesis de AMP (Méndez, 2008). Por lo tanto, las vías de señalización que conducen a la activación del complejo IKK son eventos reguladores cruciales en la activación de Dorsal (Hayden & Ghosh, 2011). En la segunda ruta, la independiente de MyD88, se presenta a la proteína TRADD la cual recluta a TRAF2/5, esta última tiene similar función que TRAF6, activando el complejo TAB/TAK1, permitiendo la translocación de Dorsal en el núcleo permitiendo la síntesis de AMPs (Méndez, 2008).

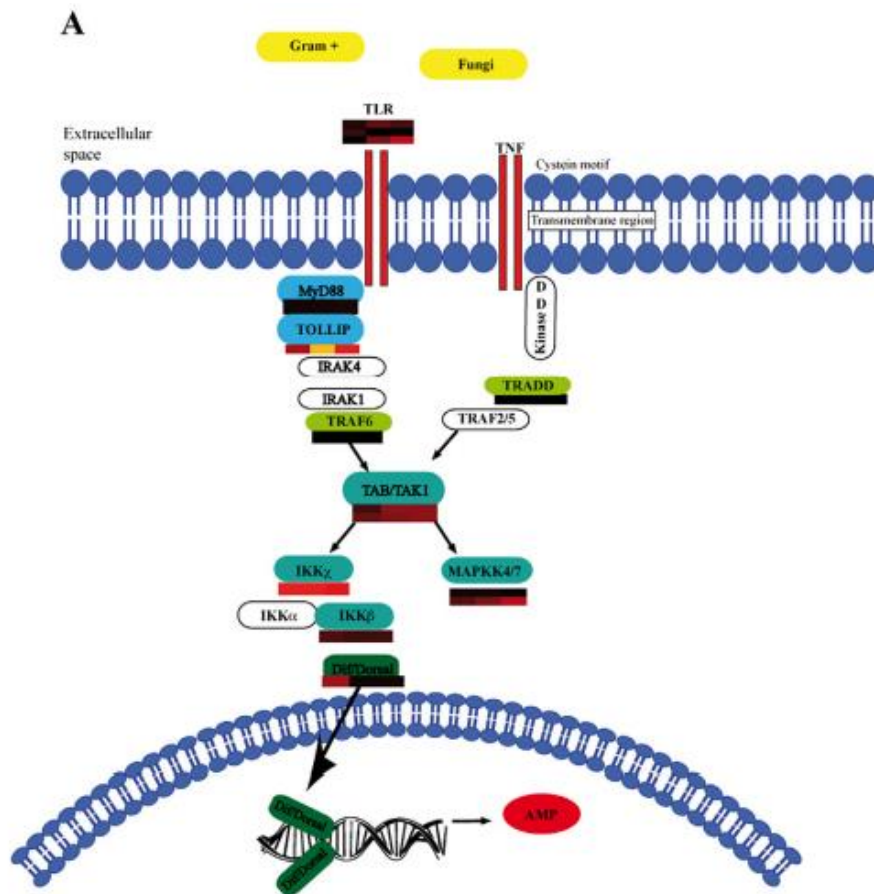


Figura 2. Vías de señalización Toll identificadas por RNAseq asociadas a la respuesta inmunológica de *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárte, 2014).

1.3.3. Vía de Inmuno Deficiencia (IMD)

La vía IMD es activada en presencia de infección por bacterias Gram-negativas. Al comparar la velocidad de reacción con respecto a la vía de señalización Toll, esta última tarda en algunos casos horas en activarse. Es por lo anterior que es probable que la vía IMD sea más efectiva contra patógenos, como bacterias (Kleino & Silverman, 2014). En trabajos anteriores sobre *C. rogercresseyi* realizados por Valenzuela-Muñoz and Gallardo-Escárte (2014), se identificaron mediante RNA seq los genes que pertenecen a la via de señalización tipo IMD. La activación de IMD, como se observa en la Figura 3, es iniciada por proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRP), las cuales detectan el peptidoglicano (PGN) de las bacterias Gram-negativas (Beutler & Moresco,

2008). Otros componentes asociados a estas bacterias son los lipopolisacáridos, los cuales son reconocidos por la Caspasa 8, la cual es homólogo de DREDD (Leulier et al., 2000). Posteriormente DREDD y FADD son reclutados para que activen AIP. En paralelo, se recluta a JNK, quinasa c-Jun-N-terminal. AIP además permite la activación del complejo TAB/TAK1, con la misma finalidad que en la vía Toll, ya que el blanco de estas quinasas es IKK, proteína encargada de fosforilar a IKK β , para que sea degradado y libere a Relish, lo cual permite la translocación de Relish y Akirin en el núcleo, permitiendo la síntesis de AMP (Hou et al., 2013; Méndez, 2008).

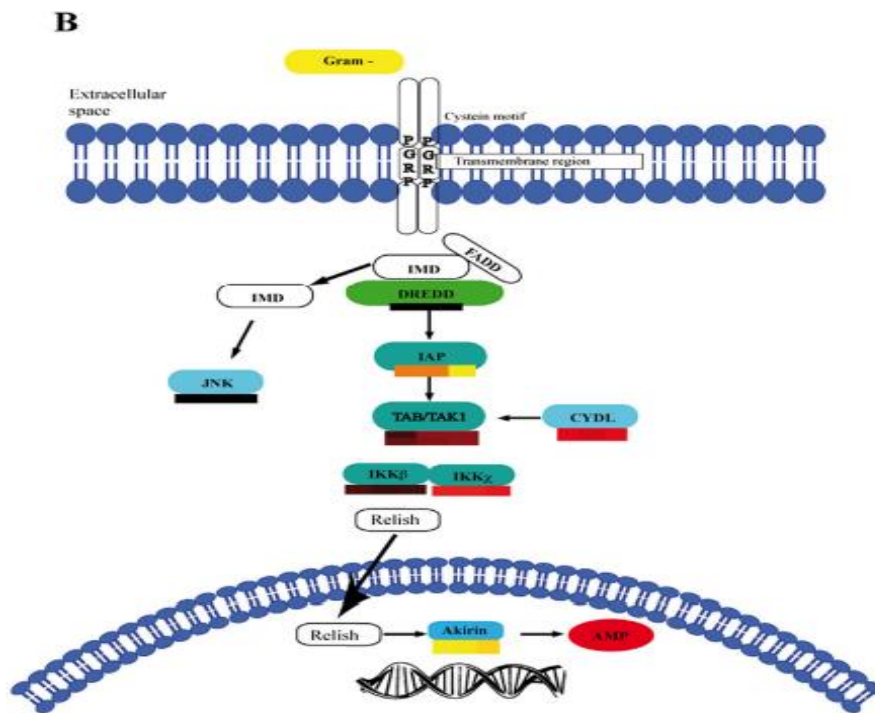


Figura 3. Vías de señalización IMD identificadas por RNAseq asociadas a la respuesta inmunológica de *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárte, 2014).

De acuerdo a estudios realizados por Vera-Bizama et al. (2015), se sabe que para las vías de señalización TLR e IMD, a los 3 días post-infección (dpi), los niveles de expresión de Caspasa, Akirin, Inhibidor de Apoptosis (AIP), Ikappa B quinasa beta (IKK- β), Dorsal y proteína de unión a TAK1 (TAB) se ven sobreexpresados en los piojos de mar que infectaban salmón del Atlántico. Por lo que existen diferencias transcripcionales para los genes de las vías TLR e IMD durante las etapas de desarrollo de *C. rogercresseyi*. Los

genes evaluados presentaron una respuesta temprana, con aumento en la expresión a los 3 dpi. Los piojos de mar que infectaban salmón del Atlántico mostraron niveles transcriptómicos más altos en asociación con la vía IMD. Los cambios transcripcionales asociados con la vía IMD en *C. rogercresseyi* podrían deberse a la presencia de microbiota que coloniza naturalmente los salmónidos evaluados, la cual podría liberar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) reconocidos por *C. rogercresseyi*, activando así vías de respuesta inmune. Sin embargo, la regulación de estas vías tras la infección establecida, así como las diferencias presentadas entre los piojos de mar que infestan especies hospederas, sugieren la presencia de otros mecanismos o moléculas liberadas por los peces que activarían el sistema inmune de *C. rogercresseyi*. (Vera-Bizama et al., 2015).

1.3.4. Sistema Antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) corresponden a un conjunto de moléculas químicamente reactivas producidas por algunos procesos metabólicos en los que el oxígeno está involucrado. Esta reactividad se debe a que poseen electrones desapareados, lo que les permite reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido-reducción (Valko, 2006). Las ROS se dividen principalmente en dos categorías: especies no radicales y radicales libres. Entre los radicales libres de interés biológico se encuentran el radical superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), mientras que entre las especies no radicales destaca el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La formación de ROS puede ser inducida por varios factores, como la irradiación con luz ultravioleta, rayos gamma y rayos X; la actividad de neutrófilos y macrófagos durante la inflamación; reacciones catalizadas por metales; la presencia de contaminantes atmosféricos; y como subproductos de las reacciones de transporte de electrones y otros mecanismos en las mitocondrias (Valko, 2006).

En sistemas biológicos, las ROS pueden tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales. Entre los efectos beneficiosos se incluyen funciones fisiológicas como la transducción de señales, crecimiento, apoptosis, defensa inmune innata y homeostasis. Por otro lado, altas concentraciones de ROS pueden causar daño a estructuras celulares,

incluyendo lípidos y membranas, proteínas y ácidos nucleicos, así como la inactivación de enzimas específicas, lo que se conoce como estrés oxidativo (Lushchak, 2014).

Para evitar los daños causados por el estrés oxidativo, existen varios mecanismos de eliminación y/o transformación de ROS, mediado por la acción de diversas enzimas (Chen, 2011). Un ejemplo es la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del anión superóxido, produciendo peróxido de hidrógeno. Existen distintas formas de SOD, dependiendo del metal del centro catalítico: Cu/Zn-SOD citosólica, Mn-SOD mitocondrial y Fe-SOD (Lu et al., 2015). Otra estrategia para superar el estrés oxidativo es mediante proteínas como la ferritina, que desintoxica y mantiene la homeostasis del hierro, eliminando ROS mediante el secuestro de hierro y la ecuación de Fenton, impidiendo así la generación de OH[•] y el consiguiente daño oxidativo (Arosio et al., 2009).

Respecto al sistema antioxidante en *C. rogercresseyi*, se han descrito algunas enzimas involucradas, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxiredoxina (PRX), fosfolípido-hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGP), glutatión S-transferasa (GST) y ferritina, entre otras (Chavez-Mardones & Gallardo-Escárate, 2014).

Actualmente, se sabe que durante los estados de copepodito y chalimus, las enzimas PHGP, PRX y ferritina muestran una expresión diferencial entre los grupos de salmón del Atlántico y Coho. Se ha observado que el patrón de respuesta de los piojos de mar que infectan al salmón Atlántico se caracteriza por la expresión de Tryp12 y baja expresión de ferritina, PRX e IKK- β . Esto es seguido por un aumento en la expresión de estos genes con el tiempo hacia una respuesta dominada por genes del secretoma, sistema inmunológico y ROS, incluyendo ferritina y PRX (Vera-Bizama et al., 2015). Además, se observa que la transcripción de SOD está sobreexpresada en *C. rogercresseyi* que infecta al salmón Coho y se regula negativamente en aquellos que infectan al salmón del Atlántico (Vera-Bizama et al., 2015). En el estudio realizado por Vera-Bizama et al. (2015) sugieren que el aumento en la expresión de genes de la respuesta antioxidante en los piojos de mar que infectan tanto al salmón del Atlántico como al Coho podría estar asociado con el proceso de muda que este copepodo

experimenta durante la infección, ya que se sabe que este proceso no solo incrementa la actividad metabólica, sino que también eleva los niveles de ROS (Fanjul-Moles & Gonsebatt, 2011). Otros genes en los peces que muestran un aumento de expresión durante la infección incluyen hepcidina-1, serotransferrina-2 y hemo oxigenasa, los cuales secuestran iones de la piel del hospedador para minimizar los iones disponibles para el parásito (Sutherland et al., 2014). Vinculado a estas observaciones, el estudio realizado por Vera-Bizama et al. (2015) demostró que los piojos de mar que infectan al salmón del Atlántico presentaban una sobreexpresión de ferritina, una proteína involucrada en el secuestro de iones de hierro y en la regulación de ROS a través de la reacción de Fenton (Salinas-Clarot et al., 2011). Esto podría ser indicativo de una competencia por los iones entre el parásito y el huésped (Vera-Bizama et al., 2015).

1.3.5. Productos secretorios

Las interacciones hospedador-parásito representan relaciones biológicas complejas, en las cuales un organismo se beneficia a expensas de otro, frecuentemente generando un impacto negativo en el hospedador. Ante la presencia de un parásito, el huésped experimenta cambios en diversos procesos, incluyendo el comportamiento, la reproducción y la regulación de la respuesta inmune. Por su parte, el parásito debe superar los mecanismos de defensa del hospedador para establecerse exitosamente (Froeschke & von der Heyden, 2014; Kan et al., 2012). Para ello, los mecanismos de evasión incluyen la secreción de moléculas que alteran la respuesta inmune del hospedador (Biron & Loxdale, 2013). Por ejemplo, en ectoparásitos como *L. salmonis*, se liberan proteasas, inhibidores de proteasas, catepsinas y otras moléculas, que tienen el poder de inmunosuprimir al huésped, facilitando su penetración en tejidos de piel intactos donde puede ocurrir la alimentación (Lewis et al., 2014).

Los mecanismos empleados por *C. rogercresseyi* para invadir el huésped y evadir respuestas de defensa posteriores aún no están claros, aunque Maldonado-Aguayo and Gallardo-Escárate (2014) informaron la presencia de genes similares a inhibidores de la serina proteasa expresados diferencialmente durante el desarrollo ontogénico, lo que podría representar una estrategia para evadir las defensas del huésped. Además, los

estudios han demostrado que la saliva de los artrópodos parásitos está compuesta principalmente de proteasas, fosfatasas y prostaglandinas (Fast et al., 2007), productos que han demostrado ser inmunomodulares del huésped y facilitan el proceso de infestación (Firth et al., 2000). De acuerdo a esto, se sabe que la patogenicidad se ha relacionado con la actividad de la proteasa en varias especies parasitarias diferentes (Sajid & McKerrow, 2002).

Las proteasas son péptidos hidrolíticos que catalizan la escisión de uniones macromoleculares entre proteínas y péptidos oligómeros. Las proteasas desempeñan un papel directo en el crecimiento y la supervivencia de los parásitos y también se consideran esenciales durante los momentos más críticos de la interacción parásito-huésped (Tort, 1999). De las diferentes familias de proteasas, las catepsinas se encuentran entre las más estudiadas. Estas participan en la degradación de proteínas en lisosomas o endosomas a pH bajo, así como en el citosol y el núcleo. Las catepsinas se dividen en varios grupos según los mecanismos catalíticos, y estos incluyen las serina (A y G), treonina, aspartato (D y E) y metalo y cisteína proteasas (B, C, H, F, K, L), O, S, V y W) (Cunningham et al., 2010; Maldonado-Aguayo et al., 2015; McCarthy et al., 2012).

Las proteasas en los invertebrados pueden desempeñar un papel en la penetración y digestión de los tejidos, la muda y la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Gui et al., 2006). De acuerdo a estudios realizados por Maldonado-Aguayo et al. (2015), se sabe de la presencia y expresión diferencial de un grupo de proteasas en *C. rogercresseyi*, las catepsinas, los cuales identificaron y distribuyeron 56 secuencias similares a catepsina en los grupos de cisteína proteasa B, F, L, Z y S y en el grupo de proteasa aspártica D. Estas se expresan de manera diferencial durante sus etapas de desarrollo ontogénico. Los roles putativos de las catepsinas identificadas varían desde la invasión y digestión del tejido del huésped hasta la evasión del sistema inmunológico del hospedador y la capacidad reproductiva (Maldonado-Aguayo et al., 2015).

Otra de las posibles estrategias para evadir las respuestas del huésped está relacionada con la presencia de inhibidores de serina proteasa, comúnmente conocidos como

serpinas, que podrían bloquear las funciones de defensa del hospedador mediante la inhibición de enzimas involucradas en la generación de señales inmunológicas (Yang et al., 2009). Las serpinas forman una superfamilia de proteínas, generalmente tienen entre 300 y 400 aminoácidos de longitud, y tienen funciones diversas en la coagulación de la sangre, inflamación (Shigetomi, 2010), metamorfosis (Bayer et al., 1997), el sistema del complemento (Gál et al., 2013), y en la respuesta inmune innata (Maldonado-Aguayo et al., 2013). Resultados presentados por Maldonado-Aguayo and Gallardo-Escárate (2014) evidenciaron secuencias tipo serpina en *C. rogercresseyi*, las cuales se expresaron de manera diferencial durante las distintas etapas del desarrollo ontogenético. En particular, Cr-serpina 10 fue una de las secuencias más prolíficas y mostró la mayor expresión en la etapa infectiva de copépodo, en comparación con las etapas de chalimus y adulto. Esto sugeriría un papel participativo en los mecanismos relacionados con la evasión de la respuesta inmune del huésped (Maldonado-Aguayo & Gallardo-Escárate, 2014).

Análisis de los genes del secretoma en *C. rogercresseyi* infectando al salmón del Atlántico realizados por Vera-Bizama et al. (2015) han mostrado un aumento en los transcritos principalmente de catepsina y tripsina a los 3 y 7 dpi. Esta observación está en línea con estudios previos, donde hay una mayor respuesta inflamatoria en el salmón Coho en comparación con el salmón del Atlántico durante la infección por piojos de mar (Johnson, 1992). Estos datos sugieren un efecto inmunosupresor como resultado de moléculas secretadas por el ectoparásito, tales como tripsinas, prostaglandina E2 y catepsinas. Esto se evidenció aún más por el patrón revelado por el análisis de componentes principales (PCA), en el cual la respuesta de los piojos de mar al salmón del Atlántico aumentó fuertemente la expresión de genes relacionados con el secretoma. Además, en *C. rogercresseyi* algunas catepsinas están sobrerreguladas en la etapa de copépodo, lo que podría favorecer el proceso infectivo de este ectoparásito (Maldonado-Aguayo et al., 2015).

1.4. Tratamientos de control para la Caligidosis

1.4.1. Tratamientos químicos

Los métodos de control de la Caligidosis utilizados en la industria incluyen desde la administración de productos químicos, pesticidas como organoclorados, organofosforados y carbonatos, los cuales tienen como desventaja que causan daños ambientales y efectos secundarios en otras especies (Dinu et al., 2010). Como alternativa a este problema se han utilizado piretroides, que son sustitutos de los plaguicidas. Estos provienen de extractos naturales de flor, que tiene una estructura similar a los pesticidas tradicionales, con la diferencia que están modificados para una mejor estabilidad en una solución acuosa (Velíšek et al., 2007). Un ejemplo de pesticida en base a piretroides es Deltametrina, la cual es un piretroide tipo II, que se caracteriza por ser altamente selectivo, de baja toxicidad, fácilmente degradable en el ambiente, comparado con los pesticidas tradicionales (Parvez & Raisuddin, 2006). Además tiene una vida media corta en el ambiente y en la mayoría de los organismos estudiados (Kan et al., 2012). La biodegradación de los piretroides través de la oxidación se ha descrito en crustáceos y peces como gatillante de un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chavez-Mardones & Gallardo-Escárate, 2014), que incluyen el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot).

En Chile se comenzó utilizando Ivermectina, para el control de Caligus, el cual es un antiparasitario de administración oral que tuvo controlado al parásito por un tiempo. La desventaja que presentó fue su efecto tóxico en los peces, presentándose una mortalidad asociada al uso del producto (Roth et al., 1993). Posteriormente se utilizó Benzoato de Emamectina, la cual tuvo un corto período de eficacia, ya que fue usado de manera no controlada en la industria, por lo que el piojo de mar generó rápidamente resistencia a este fármaco (García, 2012). Cuando se demostró la pérdida de sensibilidad de este fármaco, se buscaron nuevas alternativas. Es por ello que el año 2007 se incorporaron el uso de Deltametrina, luego tratamientos con Peróxido de Hidrógeno (Wehner, 2012). Este último posee una discutible eficiencia debido a que los ejemplares adultos de caligus una vez se sueltan del hospedador, al pasar 10 minutos post- tratamiento, éstos se recuperan logrando parasitar nuevamente (Wehner, 2012). Desde el 2013 se ha utilizado el organofosforado, conocidos como Azametifos, el cual atacan a los estados planctónicos de caligus, afectando al sistema nervioso central mediante la inactivando la

enzima acetilcolinesterasa (Wehner, 2012). La efectividad de este tipo de tratamientos es baja, ya que caligus ha generado resistencia a ellos, es por esto que se han desarrollado planes de rotación de fármacos (Aaen et al., 2015).

Dentro de los tratamientos orales como los de baño que se utilizan para controlar el Caligus en Chile, el azametifos, los piretroides y el benzoato de emamectina son los productos químicos más utilizados actualmente (Zalcman et al., 2021). Tanto los piretroides como el azametifos son menos eficaces contra los piojos juveniles en comparación con los adultos y la reinfección puede ocurrir fácilmente inmediatamente después del tratamiento (Zalcman et al., 2021).

1.4.2. Tratamientos no farmacológicos

Otro método de control de Caligus utilizados en la industria salmonera, es mediante la incorporación de componentes enmascarantes y/o inmunoestimulantes en la dieta de los salmones. En los últimos años, se han realizado estudios basados en la estimulación de la respuesta inflamatoria e innata del pez con respecto a la infección por *Lepeophtheirus salmonis*, mediante el uso de aditivos en el alimento del pez. El aditivo enmascarante encubre sustancias específicas de reconocimiento en el salmón, con lo cual se confunde a los caligus y éstos no liberan la carga completa de compuestos inmunosupresores, reduciendo su infestación, con ello no llegan a fijarse y los que se unen quedan expuestos a una respuesta inmune mucho más eficaz por parte del pez, lo que genera una significativa reducción en las cargas parasitarias (Fast, 2014). Esto se traduce en una disminución en un 50% de la abundancia del parásito en los peces inmunoestimulados. Además observaron cambios en genes en la piel del huésped cuando el parásito llega a la etapa de chalimus, sugiriendo que los alimentos inmunoestimulantes pueden proteger al huésped mediante cambios en la respuesta inmune del pez afectando la capacidad infectiva del piojo de mar (Fast, 2014).

1.4.3. Vacunas

Otros de los métodos de control planteados contra Caligus son mediante el desarrollo de vacunas. Estudios en base a una proteína recombinante de un gen involucrado en la

respuesta inmune, Akirin, el cual actúa como factor de transcripción vinculado al inicio de la expresión de genes del sistema inmune en vertebrados e invertebrados (Carpio et al., 2011). Los salmones inmunizados con este candidato vacunal recombinante denominado my32 e infectados con *C. rogercresseyi* mostraron una reducción de la infestación en un 57%, lo que demostró el potencial uso de Akirin para el control de la Caligidosis (Carpio et al., 2013). También en la actualidad existen algunos prototipos de vacunas como IPath®, a base de una proteína recombinante, donde resultados preliminares han mostrado que los peces vacunados presentan una baja en la carga parasitaria, cercana al 96%, y un retraso en las curvas de mortalidad de los peces vacunados e infectados con *P. salmonis* y *Aeromonas salmonicida* (Valenzuela-Munoz et al., 2021; Valenzuela-Muñoz et al., 2021). Por otro lado, se observó que los piojos de mar recuperados desde peces inmunizados sufrieron una alteración el desarrollo de sacos ovígeros y expresión de genes involucrados en procesos reproductivos, como vitelogenina, lo que sugiere que IPath® puede alterar la reproducción de los Caligus expuestos a peces vacunados (Valenzuela-Munoz et al., 2021; Valenzuela-Muñoz et al., 2021).

1.5. Vacunas antimicrobiota

Una de las amenazas más importantes para el manejo de la Caligidosis es la pérdida de sensibilidad de Caligus frente a los tratamientos farmacológicos que hoy se emplean para el control del parásito. Debido a esto, se han explorado nuevos mecanismos de control no-farmacológicos que permitan obtener nuevas soluciones sustentables. Dentro de estas opciones, las vacunas anti-microbiota corresponden a una nueva generación de vacunas que ha sido recientemente descrita como una alternativa (Wu-Chuang et al., 2023). En los últimos años el conocimiento genómico de Caligus ha mostrado que la microbiota asociada a este parásito cumple un rol vital tanto para su ciclo de vida como en su capacidad de infestación en salmones de cultivo (Valenzuela-Miranda et al., 2022).

Las vacunas antimicrobiota representan una novedosa estrategia inmunológica que no apunta directamente a patógenos infecciosos, sino a las bacterias residentes en el organismo que desempeñan un papel crucial en su fisiología. El proceso implica la

identificación y selección de bacterias clave, conocidas como "key Stone taxa", fundamentales para la salud del organismo huésped (Valenzuela-Miranda et al., 2022). Estas bacterias son posteriormente inactivadas para desarrollar la vacuna. La idea fundamental es que al administrar esta vacuna, se desencadenará una respuesta inmunológica específica dirigida hacia estas bacterias particulares, con el potencial de afectar adversamente al organismo huésped, al interferir con sus bacterias esenciales (Wu-Chuang et al., 2023).

El punto de partida para este estudio se originó a partir de investigaciones centradas en los agentes vectores de patógenos, como las garrapatas. Las garrapatas, siendo vectores de patógenos, no solo transmiten enfermedades, sino que también interactúan con una diversidad de bacterias formando una unidad holobiótica en su organismo (Wu-Chuang et al., 2023). Dentro de este contexto se desarrollaron las vacunas contra la microbiota de las garrapatas, con el propósito de modular su microbioma de manera específica para cada taxón (Mateos-Hernández, 2021). Combinando la secuenciación del amplicón de ARNr 16 S y el análisis de red (Co-occurrence networks), se identificaron taxones clave en el microbioma de la garrapata y se utilizaron para atacar las bacterias de la microbiota en garrapatas alimentadas con ratones inmunizados con una vacuna de bacterias vivas que contenía los taxones seleccionados (Fig. 4).

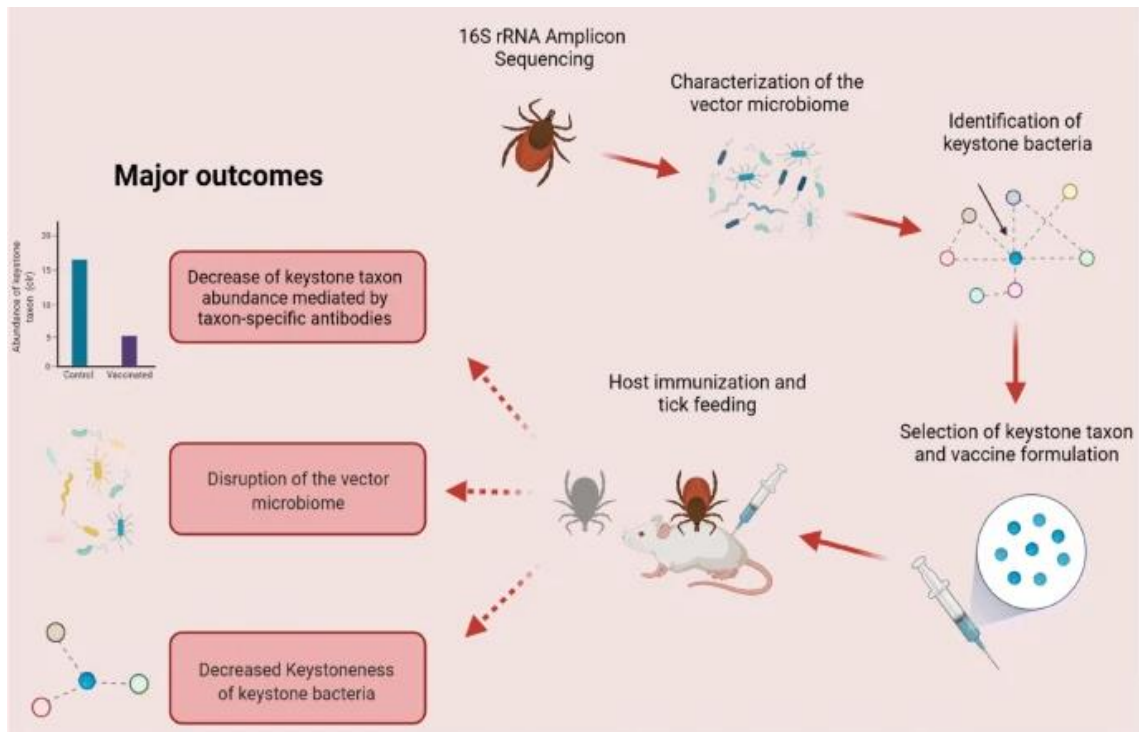


Figura 4. Manipulación del microbioma vectorial con vacunas antimicrobiota. Utilizando la secuenciación del amplicón 16 S rRNA se pueden caracterizar los perfiles taxonómicos del microbioma de la garrapata. Las redes de coocurrencia (Co-occurrence networks) se pueden utilizar para identificar bacterias clave (keystone taxa) en la comunidad microbiana. Las bacterias clave seleccionadas se pueden utilizar en vacunas antimicrobiota, formuladas para inducir anticuerpos específicos de bacterias en ratones (Mateos-Hernández, 2021).

Se sabe que los anticuerpos del huésped dirigidos a las bacterias clave de las garrapatas afectan la abundancia de estas, donde la modulación del microbioma expuesto a vacunas antimicrobiota se asocia con una disminución de la diversidad del microbioma de las garrapatas (Mateos-Hernández, 2021). La modulación del microbioma del vector estuvo mediada por anticuerpos del huésped, que junto con las proteínas del complemento no solo retuvieron sus funciones inmunes dentro de las garrapatas, sino que también accedieron a tejidos generales de las garrapatas, incluidos el intestino medio y las glándulas salivales (Mateos-Hernández, 2021).

También se sabe que el uso eficaz de vacunas contra la microbiota de las garrapatas en el campo ha dependido de la existencia de un microbioma central de garrapatas. Si la composición taxonómica del microbioma de la garrapata es muy variable y no se comparte ningún núcleo bacteriano entre las garrapatas individuales de la población, el posible daño causado por los anticuerpos del huésped dirigidos contra uno de sus componentes bacterianos afectaría sólo a un número reducido de garrapatas (Wu-Chuang et al., 2023). Otros estudios demostraron que algunas especies de garrapatas (p. ej., *Ornithodoros maritimus* Vermeil & Marguet, 1967 e *Ixodes scapularis*) tienen asociaciones estables con bacterias de su microbioma, lo que sugiere la existencia de un microbioma central (Estrada-Peña et al., 2020).

1.6. Comunidades microbianas asociadas a *C. rogercresseyi*

La microbiota asociada a organismos puede cumplir funciones clave en el desarrollo de casi todos los organismos vivos. En los parásitos, esta función puede comprender funciones tanto biológicas como funcionales durante la patogénesis (Valenzuela-Miranda et al., 2022).

Se sabe que la microbiota asociada a artrópodos puede desempeñar funciones fundamentales en el desarrollo (Degli Esposti & Martínez Romero, 2017; Zientz et al., 2004). En este sentido, la interdependencia metabólica es un fenómeno generalizado entre bacterias y artrópodos que se ha informado previamente (Zientz et al., 2004). Estas interacciones se han identificado para diferentes vías metabólicas, incluidas la glucólisis, la gluconeogénesis, los fosfolípidos, los nucleótidos y el metabolismo del azufre (Zientz et al., 2004).

En estudios recientes sobre la microbiota asociada a *C. rogercresseyi*, los autores Valenzuela-Miranda et al. (2022) evidenciaron una gran cantidad de genes asociados al metabolismo de proteínas, aminoácidos y derivados, seguidos de cofactores, vitaminas, pigmentos y otros. La mayoría de los genes fueron anotados en la biosíntesis, degradación, procesamiento y modificación de proteínas. Sus resultados evidenciaron que el genoma de *C. rogercresseyi* carece de diferentes genes relacionados con el

metabolismo, que supuestamente están codificados en el microbioma. El metabolismo de los aminoácidos fue el conjunto más extenso de genes exclusivos de la microbiota, siendo la biosíntesis de fenilalanina, tirosina, triptófano y lisina las vías más enriquecidas. Valenzuela-Miranda et al. (2022) sugieren que la ausencia de estos genes en el genoma de *C. rogercresseyi* imposibilitaría la biosíntesis de estos aminoácidos; por lo tanto, deben obtenerse a través de la alimentación. Sin embargo, otra posibilidad es que *C. rogercresseyi* pueda complementar la maquinaria metabólica presente en su microbiota asociada al núcleo para obtener estos aminoácidos (Valenzuela-Miranda et al., 2022).

Este fenómeno es conocido en los parásitos pulgones. Estudios anteriores han sugerido que la bacteria *Buchnera aphidicola* proporciona aminoácidos esenciales a su insecto huésped (Shigenobu et al., 2000). Del mismo modo, a través del análisis de secuencias de ARN y de vías, los investigadores han descubierto que el huésped áfido puede regular positivamente los genes para llenar los vacíos de las vías de aminoácidos esenciales de *Buchnera* (Hansen & Moran, 2011).

Gonçalves et al. (2020) han identificado recientemente un microbioma central de piojos de mar recolectados en diferentes áreas geográficas de Chile. Entre las especies identificadas, se sugirió que *Dokdonia* sp. podría cumplir roles durante el proceso infectivo de los piojos de mar debido a la capacidad secretora de compuestos bioactivos de esta bacteria. En particular, en el estudio realizado por Valenzuela-Miranda et al. (2022), se muestra que uno de los genomas más representados en el microbioma de piojos de mar fue *Dokdonia* sp., donde sus análisis de la vía evidenciaron que el genoma de *Dokdonia* sp. codifica genes que pueden llenar los vacíos para la biosíntesis y degradación de valina, leucina e isoleucina (Valenzuela-Miranda et al., 2022).

Si bien, aunque existen estudios relacionados al microbioma asociado a *Caligus*, aún se necesitan más estudios para confirmar la interdependencia metabólica entre los piojos de mar y su microbiota asociada.

1.6. Justificación de la investigación

La comprensión de la respuesta inmune de los organismos ante la presencia de patógenos es crucial para el desarrollo de estrategias efectivas de control y prevención de enfermedades. En el contexto de la acuicultura, donde la salud de los peces es fundamental para el éxito de la industria, el estudio de los mecanismos inmunes de los parásitos que afectan a las poblaciones de peces es de suma importancia. En este sentido, *C. rogercresseyi* emerge como un agente patógeno de relevancia en la salmonicultura chilena. La necesidad de comprender la respuesta inmune de este parásito se vuelve aún más apremiante ante el uso extendido de agentes químicos para su control, los cuales no solo pueden generar resistencia en el ectoparásito, sino también tener impactos negativos en el medio ambiente y la salud de los peces. En este contexto, el desarrollo de alternativas como las vacunas antimicrobiota surge como una estrategia prometedora para el control sostenible de este ectoparásito. La interacción entre la microbiota y sistema inmune de *C. rogercresseyi* aún no ha sido completamente explorada, por lo que evaluar su respuesta de Caligus frente la vacuna antimicrobiota nos proporciona información valiosa sobre los mecanismos de defensa del parásito y potenciales puntos de intervención para el desarrollo de vacunas más efectiva.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El piojo de mar *C. rogercresseyi* evidencia una modulación diferencial de genes asociados a respuesta inmune y muerte celular programada en respuesta a la inmunización en salmón del Atlántico con vacuna antimicrobiota.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de genes asociados a la respuesta inmune y muerte celular de *C. rogercresseyi* en respuesta a la inmunización con vacuna antimicrobiota en *Salmon salar*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar los cambios en la expresión, a través de un análisis *in silico*, de genes asociados a respuesta inmune y vías de señalización de muerte celular en *C. rogercresseyi* tras la exposición a la vacuna antimicrobiota.
- II. Analizar los patrones de transcripción en *C. rogercresseyi* expuesto a vacuna antimicrobiota para genes asociados a respuesta inmune innata (vías TLR e IMD).
- III. Determinar la modulación de genes de estrés oxidativo y secretoma en *C. rogercresseyi* colectados de peces inmunizados con vacuna antimicrobiota.

4. METODOLOGÍA

4.1. Objetivo I: Evaluación de cambios de expresión, a través de un análisis *in silico*, de genes asociados a respuesta inmune y vías de señalización de muerte celular en *C. rogercresseyi* tras la exposición a la vacuna antimicrobiota.

4.1.1. Formulación de la vacuna antimicrobiota

Previamente en el Laboratorio Biotecnología y Genómica Acuícola (LBGA), para la creación de la vacuna, se extrajeron *C. rogercresseyi* de peces infectados, los cuales fueron triturados y macerados con el fin de preparar cultivos que permitieron aislar y caracterizar las cepas bacterianas presentes en estos. Posteriormente, mediante un análisis de redes por co-concurrencia, se identificaron las bacterias clave asociadas al parásito. Dentro de este contexto se seleccionaron dos de las cepas bacterianas más abundantes, las cuales fueron inactivadas mediante tratamiento térmico y formaldehído. Posteriormente, las bacterias fueron mezcladas con Montanide ISA 763 Vg (Seppic, Francia)®, un adyuvante que sirvió para su administración intraperitoneal en los peces.

4.1.2. Diseño experimental

Para realizar el experimento, se prepararon ejemplares de salmón del Atlántico del laboratorio experimental de la Estación de Biología Marina en Dichato, Chile. Los peces (ejemplares) estaban aclimatados en estanques con agua de mar a 12°C, alimentados periódicamente. Se mantuvo un ambiente de agua estable, incluida la temperatura (11.5 ± 0.5 °C), el OD (7.5 ± 0.4 mg/L) ($\delta t = 5$ min, sonda Oxyguard 420, Oxyguard International), salinidad (35 ‰) y un fotoperiodo ambiental de 13 horas de luz y 11 horas de oscuridad.

Los ejemplares se dividieron en cuatro grupos experimentales:

- Live_Cr (GE): Grupo tratado con vacuna a base de bacterias vivas [10^{10}].

- CD_Cr (GE): Grupo tratado con vacuna a base de bacterias inactivadas.
- CDF_Cr (GE): Grupo tratado con vacuna a base de bacterias inactivadas más la proteína recombinante IPath®.
- PBS_Cr (GE): Grupo control tratado únicamente con buffer PBS (al cual se le administro una dosis de solución salina con el objetivo de igualar el estrés causado por la inyección).

Los peces de los grupos experimentales fueron vacunados intraperitonealmente con 100 μ L de la vacuna, mientras que los peces del grupo control recibieron una inyección de 100 μ L de PBS (solución salina). Luego de esto, los peces concretaron un período de inmunización de 400 unidades térmicas acumuladas (UTA) o 30 días, para luego ser infectados con 35 copepoditos por pez. Durante el experimento se tomaron muestras en 2 tiempos diferentes, la primera toma fue a los 25 días post infección (T1) y la segunda toma de muestra se realizó a los 68 días post infección (T2). Todas las muestras fueron fijadas en RNAlater® (Ambion, USA) y almacenadas a -80°C hasta la extracción de ARN.

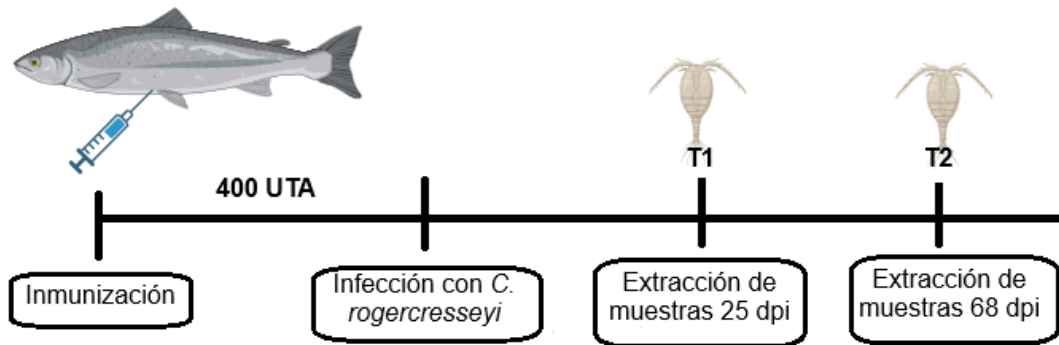


Figura 5. Esquema experimental de vacunación en salmón del Atlántico. Imagen creada por BioRender.com.

4.1.3. Extracción de ARN y Secuenciación Illumina:

La extracción de ARN total se realizó por medio del método TRIzol (Invitrogen, USA), de acuerdo con lo sugerido por el fabricante, donde se utilizaron pools de 3 machos y 3 hembras por grupo experimental y control.

La concentración y pureza del ARN extraído se determinó mediante un espectrofotómetro Nanodrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Waltham, MA, USA). La concentración se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza se evaluó mediante las razones 260/280 y 260/230. La integridad se analizó mediante una electroforesis en gel desnaturante MOPS al 1,2%, el cual fue visualizado mediante el sistema digital de fotodocumentación iBright® (Modelo 1500) bajo luz ultravioleta.

Tabla 1: Índices de pureza y concentración de las muestras utilizadas indicados por espectrofotómetro (Nanodrop Technologies). Muestras de *C. rogercresseyi* extraídas de peces inmunizados con vacuna antimicrobiota formulada con bacterias inactivadas a los 25 y 68 dpi. Las muestras de Caligus se representan como “CD_Cr”, mientras que los controles se representan como “PBS”.

Muestra	ng/ μ l	A 260/280	A 260/230
CD_Cr (25 dpi)	204,2	1,95	2,48
PBS (25 dpi)	195,9	1,97	2,40
CD_Cr (68 dpi)	201,1	2,02	2,64
PBS (68 dpi)	196,4	2,04	2,66

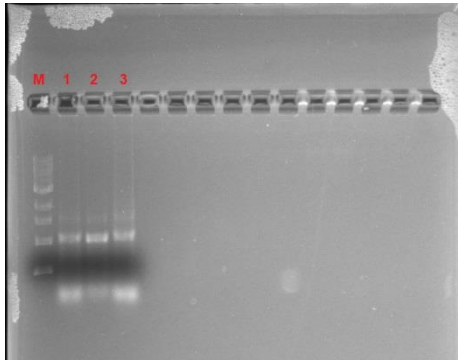


Figura 6: Gel de MOPS al 1,2% de la extracción de ARN de *C. rogercresseyi*. A) M: Marcador de peso molecular 1Kb. B) Carril 1 y 2: muestra PBS de *C. rogercresseyi* extraídos 25 días post infección. Carril 3: muestra de *C. rogercresseyi* extraídos de peces inmunizados 25 días post infección.

Las muestras enviadas a secuenciar correspondieron solo a las extraídas a los 25 dpi (T1).

4.1.4 Análisis de secuenciación de ARN e identificación de expresión génica diferencial

Los datos de secuenciación fueron analizados utilizando el software CLC. Genomics Workbench (versión 24.0). Los análisis de RNAseq y de expresión diferencial fueron realizados en el mismo software. Del análisis de la expresión de los genes entre los diferentes grupos experimentales y el control se obtuvieron los valores de expresión de genes en formato de CPM (Counts Per Million), lo que permitió una normalización de las lecturas para facilitar la comparación entre muestras. Este valor de CPM refleja el número de lecturas alineadas para un gen, ajustado por la profundidad de la secuenciación y la longitud del gen.

4.1.5. Anotación génica y mapeo en vías de señalización:

Se realizó una anotación génica mediante la base de datos del genoma de *Caligus*, para clasificar y describir los genes que presentaban cambios significativos en su expresión. Luego se realizaron heatmaps empleando el software TBtools (Chen C., 2023) para visualizar los patrones de expresión diferencial de los genes más relevantes, centrándose en las vías de muerte celular programada, incluyendo apoptosis, TNF y ferroptosis.

Se compararon las secuencias obtenidas con la base de datos de referencia para identificar los genes y sus funciones, y finalmente se utilizó la base de datos KEGG para mapear los genes identificados en vías de señalización relacionadas con muerte celular programada, tales como Apoptosis, Factor de necrosis tumoral (TNF) y Ferroptosis.

4.2. Objetivo II: Analizar los patrones de transcripción en *C. rogercresseyi* expuesto a vacuna antimicrobiota para genes asociados a repuesta inmune innata (vías TLR e IMD).

4.2.1 Extracción de ARN y síntesis de cDNA

Para la extracción de ARN total se realizó el mismo protocolo descrito en el acápite 4.1.3. de la metodología del objetivo I. Las muestras de *Caligus* utilizadas correspondieron solo a las extraídas del grupo experimental que fue inmunizado con la vacuna antimicrobiota elaborada con bacterias inactivadas y grupo experimental.

Para la síntesis de ADNc a partir del ARN total, se realizó una RT-PCR (RT: Transcriptasa reversa) mediante el kit ReverAid H Minus First Strand cDNA Syntesis Kit (Thermo, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 1), a partir de una concentración de 200 ng/ μ L de ARN total. El programa del termociclador para la RT-PCR se inició con una etapa de 25°C por 5min, luego una de 42°C por 60min y un paso final de 70°C por 5min. Posteriormente, para verificar la correcta síntesis de cDNA de la muestra se realizó una PCR en tiempo final (Anexo 2) con el set de partidores housekeeping previamente estandarizado, que en este caso fue β -tubulina, y luego se visualizó el resultado mediante electroforesis de gel TAE al 1.5%.

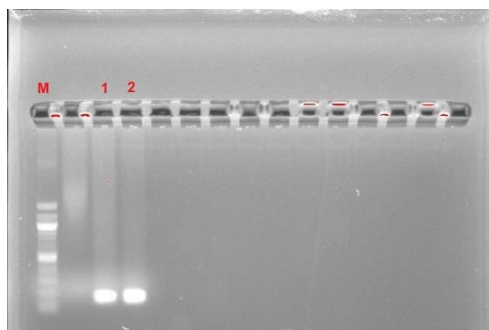


Figura 7: Gel TAE al 1.5% de la síntesis de cDNA de *C. rogercresseyi*. A) M: Marcador de peso molecular 100 Kb . B) Carril 2: muestra PBS de *C. rogercresseyi* extraídos 68 días post infección. Carril 3: muestra de *C. rogercresseyi* extraídos de peces inmunizados 68 días post infección.

4.2.2. Selección de partidores

Los primers específicos para los genes de interés con relación a la respuesta inmune de *C. rogercresseyi* fueron obtenidos y diseñados partir de una base de datos de *C. rogercresseyi* secuenciada por la plataforma MiSeq de ILLUMINA del Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola (Nuñez-Acuña et al., 2014).

Tabla 2. Listado de partidores utilizados para el análisis RT-qPCR de genes vinculados a vías TLR e IMD en *C. rogercresseyi*. En la primera columna se observa el nombre de cada partidor, en la segunda el gen, en la tercera la secuencia de cada uno y en la cuarta columna la temperatura de melting (Tm).

Nombre	Gen	Secuencia	Tm
Cr_AIP_F2	AIP	TCTTCTGCCTCACGGGACGA	62°
Cr_AIP_R2		TGAGAACCCCGTGCCTGTCT	
Cr_Ikk β _F1	Ikk β	TCGACCAGAGCTCCTTGGCT	63°
Cr_Ikk β _R1		TGCGTGATGAGTCCGAGGCT	
Cr_dorsal_F1	Dorsal	TCGATCCCCACACCGCAAGA	60°
Cr_dorsal_R1		TTAAGCTTGGGGGCCTCTGC	

4.2.3. Evaluación y análisis de expresión génica mediante RT-qPCR

A partir de la síntesis de cDNA de *C. rogercresseyi*, se realizaron análisis de expresión, mediante la cuantificación de la expresión génica por el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ comparativo utilizando como control endógeno β -tubulina (gen housekeeping (HKG)), diseñado y estandarizado en el LBGA, con el fin de normalizar los datos. Este método permitió determinar los cambios de expresión entre el gen de interés y el gen de referencia. Al contar con el valor $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ de cada una de las muestras, se realizaron los análisis estadísticos mediante el paquete de software estadístico GraphPad Prism (versión 10.3.1), donde se aplicó una ANOVA de dos vías y un test de comparaciones múltiples Tukey HSD. Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) donde se utilizaron los datos de expresión relativa de los 4 genes relacionados a la respuesta inmune como variables para evaluar la correlación entre la expresión génica y los diferentes tiempos de infección.

4.3. Objetivo III. Determinar la modulación de genes de estrés oxidativo y Secretoma en *C. rogercresseyi* colectados de peces inmunizados.

4.3.1. Extracción de ARN y síntesis de cDNA

Para la extracción de ARN total y para la síntesis de cDNA se realizó el mismo protocolo descrito en el acápite 4.1.3 de la metodología del objetivo I.

Las muestras utilizadas correspondieron solo a los Caligus extraídos del grupo experimental que fue inmunizado con la vacuna antimicrobiota elaborada con bacterias inactivadas y al grupo control.

4.3.2. Selección de partidores

Los partidores relacionados a genes vinculados con la respuesta frente a estrés oxidativo y productos secretorios en *C. rogercresseyi*, se obtuvieron de la información de

secuenciada por Vera-Bizama et al. (2015); los cuales se encontraban previamente estandarizados por el LBGA.

Tabla 3. Partidores estandarizados seleccionados para transcritos de ROS para *C. rogercresseyi*. En la primera columna se observa el nombre de cada partidor, en la segunda el gen, en la tercera la secuencia de cada uno y en la cuarta columna la temperatura de melting (Tm).

Nombre	Gen	Secuencia	TM
qCr_PHGP_F	PHGP	TGGAGCCGATGCCATTCCTCTTTTCA	66°
qCr_PHGP_R		TTTTTGCTGGGCGCCAGGCGTGA	
qCr_CAT_F	Catalasa	GGCACCCAGACGATAGCGATGAGCA	64°
qCr_CAT_R		TCGCTTTCAGTCCCGGAAATCTGGT	
qCr_SOD_Fa	SOD	TCCACATGCAACACGCGCTCCAG	60°
qCr_SOD_Ra		GCGTGCCCTGGTCGTACATGCCG	
qCr_Ferr_F2	Ferritina	GGAGTGACGGCCTAGAGGCACTCCG	65°
qCr_Ferr_R2		TCCAGCCAAGTGCCGGTGAGCCA	

Tabla 4. Partidores estandarizados seleccionados para transcritos de Secretoma para *C. rogercresseyi*. En la primera columna se observa el nombre de cada partidor, en la segunda el gen, en la tercera la secuencia de cada uno y en la cuarta columna la temperatura de melting (Tm).

Nombre	Gen	Secuencia	Tm
Cr_serpin3_F1	Serpina 3	GGGAGGATTAGGAATGGCGC	61°
Cr_serpin3_R1		GACTTCTCAGGGATGGCTGG	
Cr_serpin10_F1	Serpina 10	GGGAACTTTGACGCTCAAGTC	59°
Cr_serpin10_R1		CCCATTTGAAGAAGGGAGCCT	
CRtryp-2-F2	Tripsina 2	CAGACCCAATGAAATCAAG	52°
CRtryp-2-R2		ATAGAGTTCGTGGTAGATG	

CRtryp-12-F2	Tripsina 12	TG TTCAGGTTGTCTCTGA	54°
CRtryp-12-R2		GTTTCCTTGGACAAGTGG	
qCr-CatB1F	Catepsina B	CTAATAGTATCCTGTCATCG	52°
qCr-CatB1R		AGGTAGTAGAAGAAGTCTC	
qCr-CatD1F	Catepsina D	CTCTTCCATCTTCCTTATAG	52°
qCr-CatD1R		CAGAAGTTTGAGGTCATC	

4.3.3. Evaluación y análisis de expresión génica mediante RT-qPCR

Tanto la evaluación como el análisis de expresión génica se realizaron bajo la misma metodología descrita en el acápite 4.2.3. de la metodología del objetivo II.

5. RESULTADOS

5.1. Objetivo I. Evaluar los cambios en la expresión, a través de un análisis *in silico*, de genes asociados a respuesta inmune y vías de señalización de muerte celular en *C. rogercresseyi* tras la exposición a vacuna antimicrobiota.

5.1.1. Efectos de las vacunas antimicrobias sobre la expresión génica en *C. rogercresseyi* y mapeo de genes en Vías de Muerte Celular Programada.

Para analizar los efectos de las vacunas antimicrobias sobre *Caligus rogercresseyi*, se generaron heatmaps que muestran los niveles de expresión génica bajo cuatro condiciones experimentales tras los 25 días post infección (dpi). Los heatmaps ilustran la expresión relativa de genes asociados a vías de muerte celular programada, incluyendo apoptosis, TNF y ferroptosis. Los datos transcriptómicos, previamente normalizados para garantizar la comparabilidad entre muestras, se representaron mediante una escala de colores que permite identificar patrones de expresión diferencial entre los grupos.

Posteriormente al análisis expresión diferencial de los genes entre los grupos experimentales, se realizó un mapeo de los genes en la base de datos KEGG para identificar su localización dentro de las vías de muerte celular programada. Este mapeo permitió visualizar en qué segmentos específicas de las vías de apoptosis, TNF y ferroptosis actuaban los productos de los genes evaluados, proporcionando una comprensión más detallada de su implicación en estos procesos moleculares. Los productos destacados en color rojo en las diferentes vías representan aquellos en los que se centró el análisis, aunque no necesariamente exhibieron cambios en su expresión de forma diferencial. Por lo que los esquemas permitieron identificar el contexto funcional de estos productos en las vías de muerte celular programada, proporcionando una base para interpretar sus posibles roles en la respuesta a los tratamientos.

De acuerdo con los resultados del análisis de expresión in silico de genes vinculados a la vía de señalización de apoptosis (Fig. 8), los dendrogramas entre los diferentes grupos experimentales muestran que la respuesta del grupo control se encuentra más distanciada en términos de similitud con los grupos experimentales CDF_Cr, Live_Cr y CD_Cr. De estos, el grupo Live_Cr presenta la mayor diferencia respecto al control. Además, se observa que las respuestas de los grupos CDF_Cr y live_Cr tienden a compartir mayor similitud entre sí en comparación con las del grupo CD_Cr.

En cuanto a los clústeres de genes identificados, se evidencian tres grupos principales que congregan genes con patrones de expresión similares. Estos grupos sugieren que los genes podrían estar relacionados funcionalmente o responder de manera coordinada a los diferentes tratamientos. Entre los genes más destacados dentro de estos clústeres se encuentran tubulina, catepsinas, IAP, IKK y caspasas, entre otros, los cuales

desempeñan roles fundamentales en la regulación de la apoptosis.

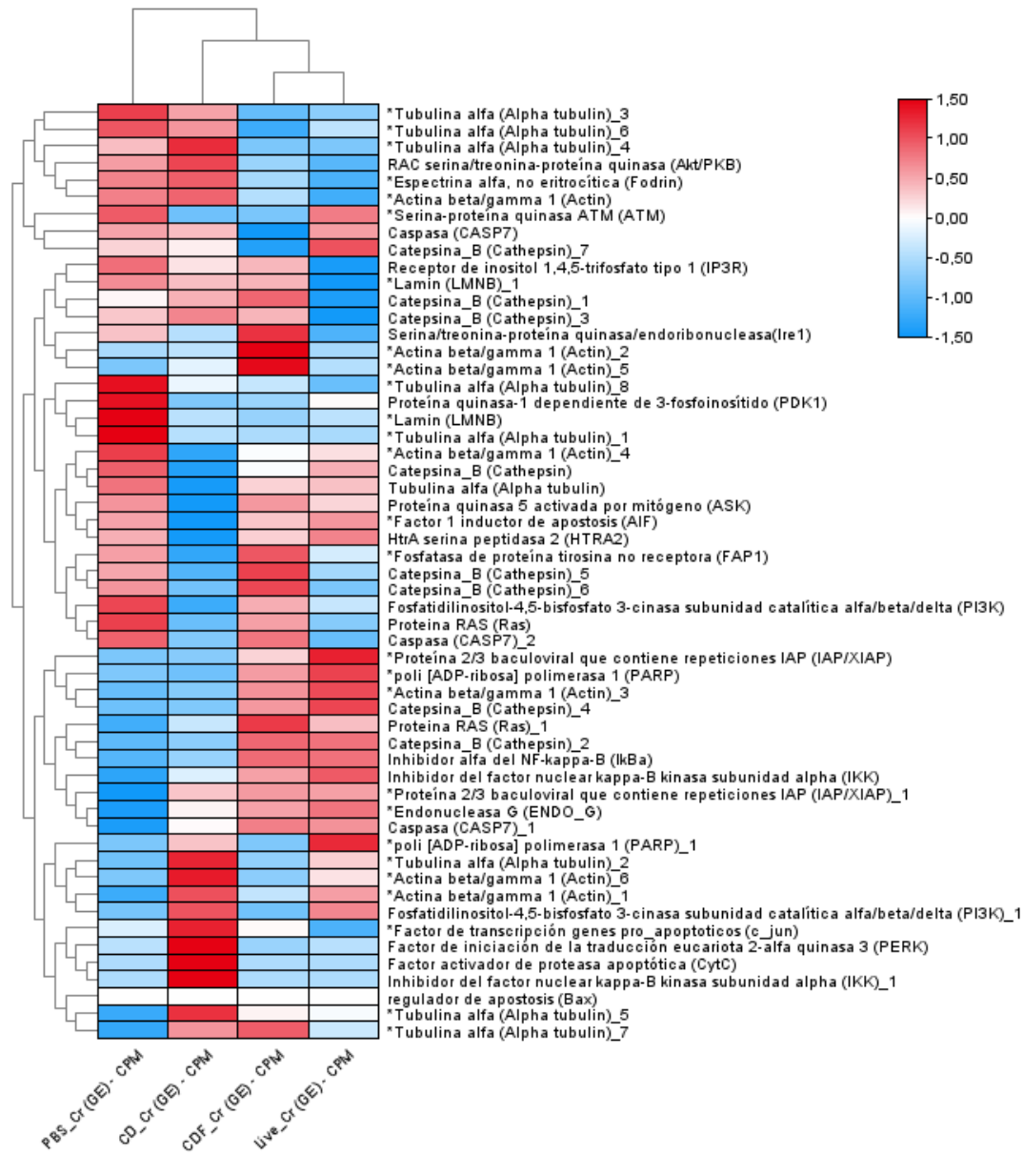


Figura 8: Heatmap de expresión génica diferencial en la vía de apoptosis en *C. rogercresseyi* bajo los diferentes tratamientos. Los niveles de expresión génica (representados por CPM) se representan en una escala de color, donde el color rojo indica niveles más altos de expresión y el color azul niveles bajos.

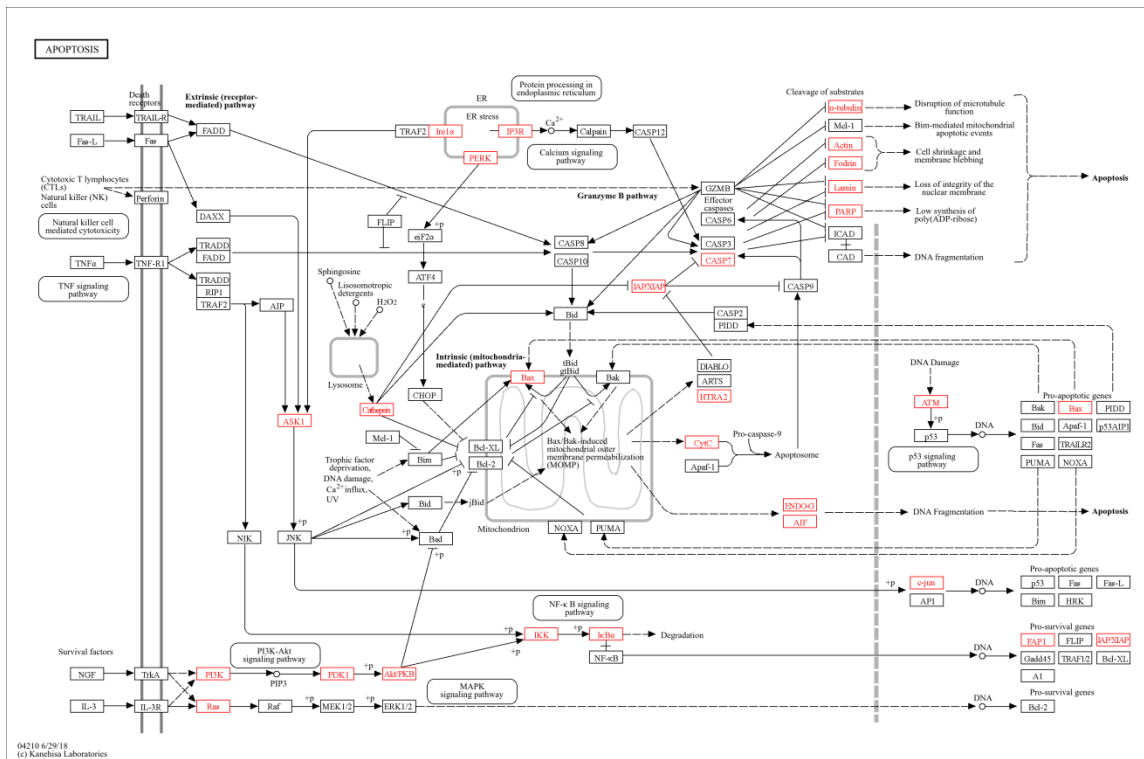


Figura 9: Mapa de la vía de apoptosis en *C. rogercrescey* basado en la base de datos KEGG, mostrando los productos proteicos involucrados en cada etapa de la vía.

De acuerdo con los resultados del análisis de expresión *in silico* de genes vinculados a la vía de señalización de TNF (Fig. 10), los dendrogramas muestran que la respuesta del grupo control (C_Cr) se encuentra más distanciada en términos de similitud de los patrones de expresión con respecto a los grupos experimentales CD_Cr y CDF_Cr. En contraste, el grupo Live_Cr presenta una mayor similitud con el grupo control, mientras que CDF_Cr muestra un patrón de expresión más cercano a CD_Cr. Esto indica que las respuestas entre CDF_Cr y CD_Cr están más emparentadas en comparación con la respuesta observada en Live_Cr.

Además, el análisis de los clústeres de genes evidencia al menos 4 grupos principales que agrupan genes con patrones de expresión similares. Entre los genes destacados dentro de estos clústeres se encuentran caspasas (CASP3, CASP7), involucradas también en la vía de apoptosis; metaloproteinasas de matriz (MMP9, MMP14), asociadas a procesos inflamatorios y remodelación celular; y componentes clave de la

casca de señalización, como las quinasas activadas por mitógeno (MKK4/7, ASK1) e inhibidores del NF- κ B (IKK e I κ B alfa). Estas agrupaciones reflejan la activación o represión de vías específicas dentro de la señalización mediada por TNF en respuesta a los tratamientos.

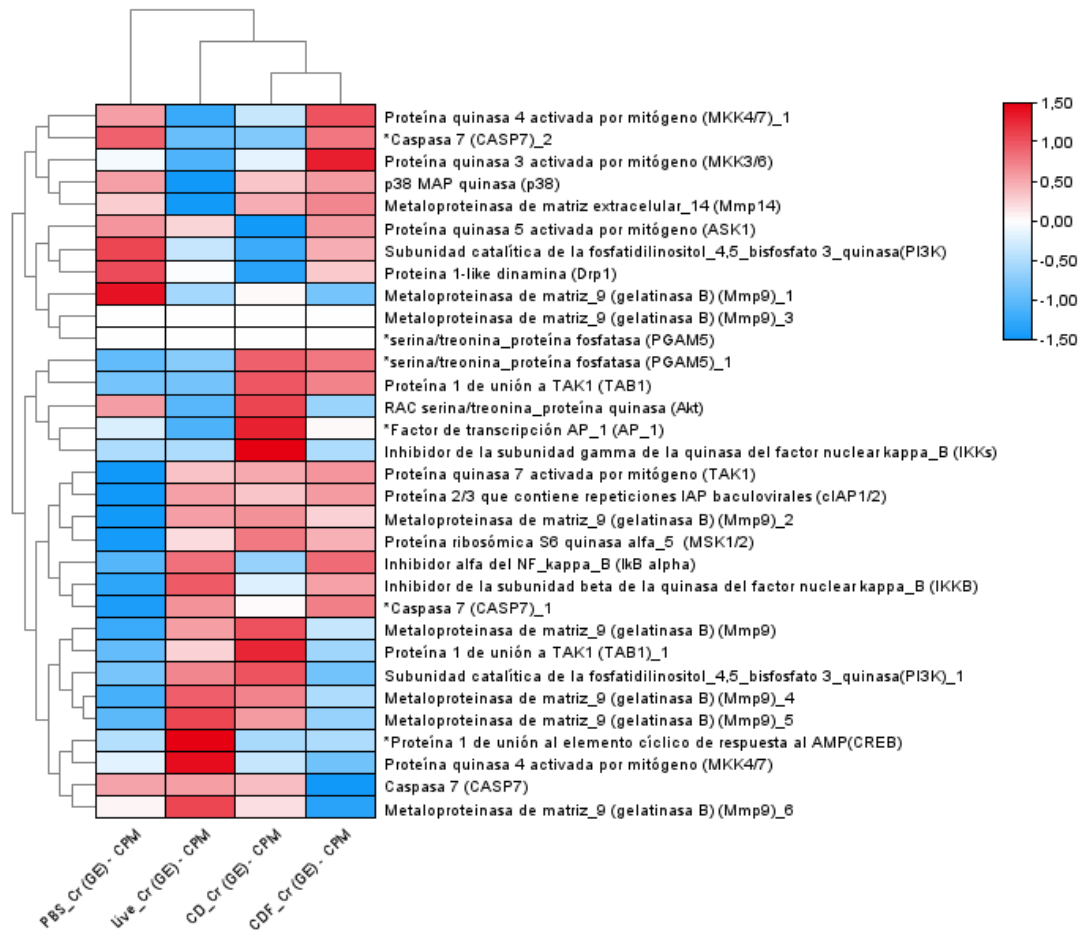


Figura 10: Heatmap de expresión génica diferencial en la vía TNF en *C. rogercresseyi* bajo diferentes tratamientos. Los niveles de expresión génica se representan en una escala de color, donde el color rojo indica niveles más altos de expresión y el color azul niveles más bajos.

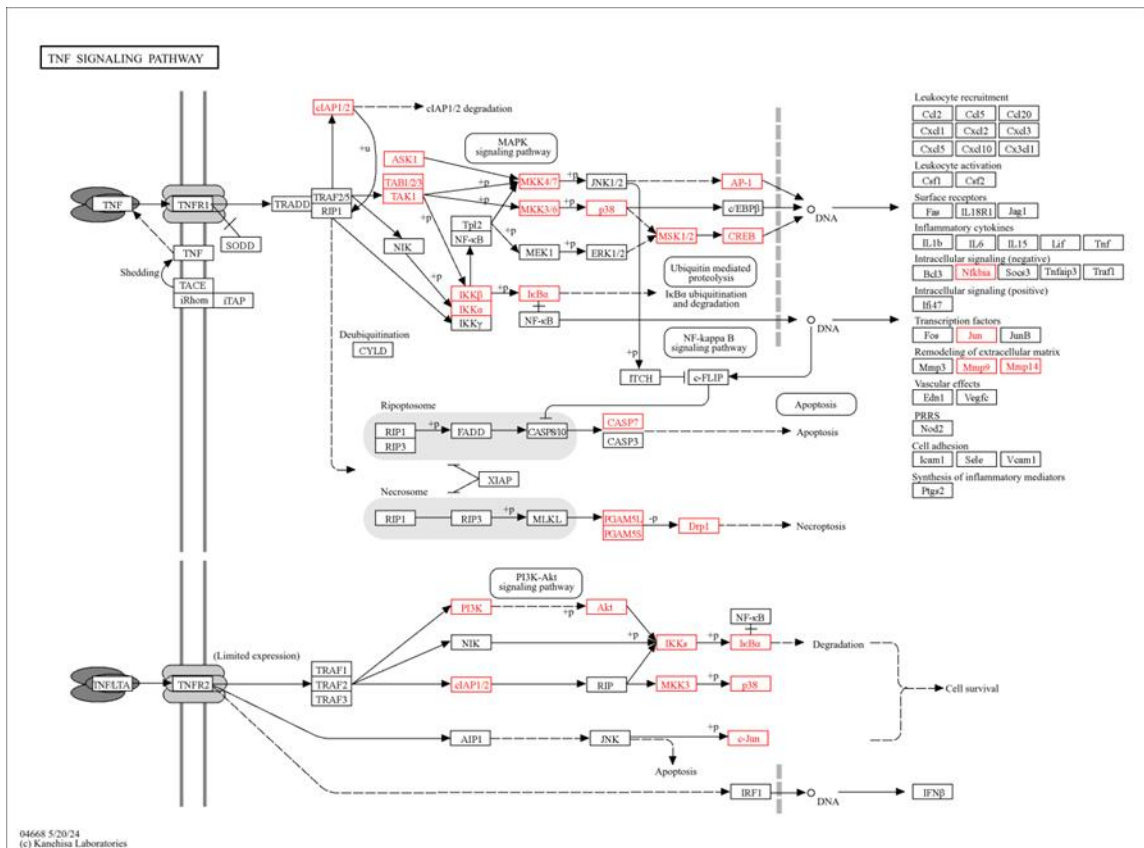


Figura 11: Mapa de la vía TNF en *C. rogercresseyi* basado en la base de datos KEGG, mostrando los productos proteicos involucrados en cada etapa de la vía.

De acuerdo con los resultados del análisis de expresión *in silico* de genes asociados a la vía de señalización de ferroptosis (Fig. 12), los dendogramas entre los diferentes grupos experimentales sugieren que la respuesta del grupo control está estrechamente relacionada con la del grupo CD_Cr. Además, se observa que está significativamente más alejada de los grupos experimentales CDF_Cr y live_Cr, siendo el grupo CDF_Cr el que presenta la menor similitud.

Además, el análisis de los clústeres de genes evidencia al menos 4 grupos principales que agrupan genes con patrones de expresión similares. Entre los genes destacados dentro de estos clústeres se encuentran ferritina (FT), involucrada en la regulación del hierro; ferroportina (FPN), responsable del transporte de hierro; acetil-CoA sintetasa de cadena larga (ACSL4), asociada a la síntesis de ácidos grasos y la regulación del estrés

oxidativo; y glutatión sintetasa (GSS), clave en la defensa antioxidante celular. Estas agrupaciones reflejan la activación o represión de vías específicas dentro de la señalización de ferroptosis en respuesta a los tratamientos.

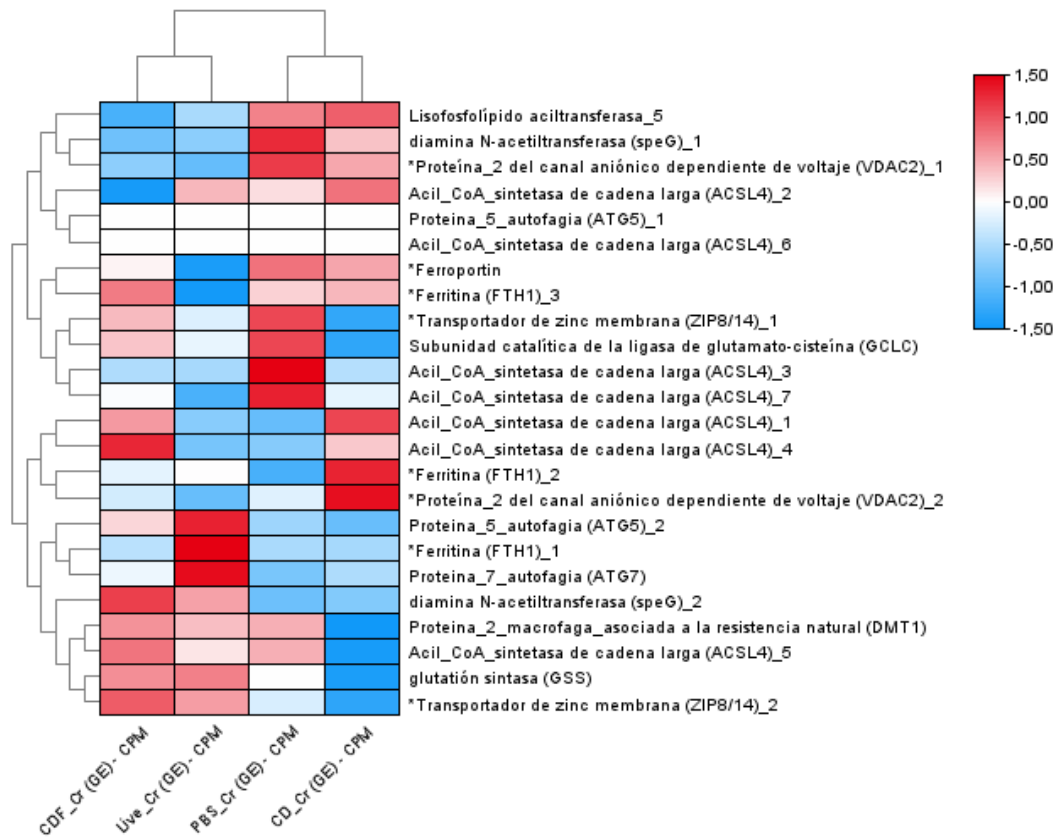


Figura 12: Heatmap de expresión génica diferencial en la vía de Ferroptosis en *C. rogercresseyi* bajo diferentes tratamientos. Los niveles de expresión génica se representan en una escala de color, donde el color rojo indica niveles más altos de expresión y el color azul niveles más bajos.

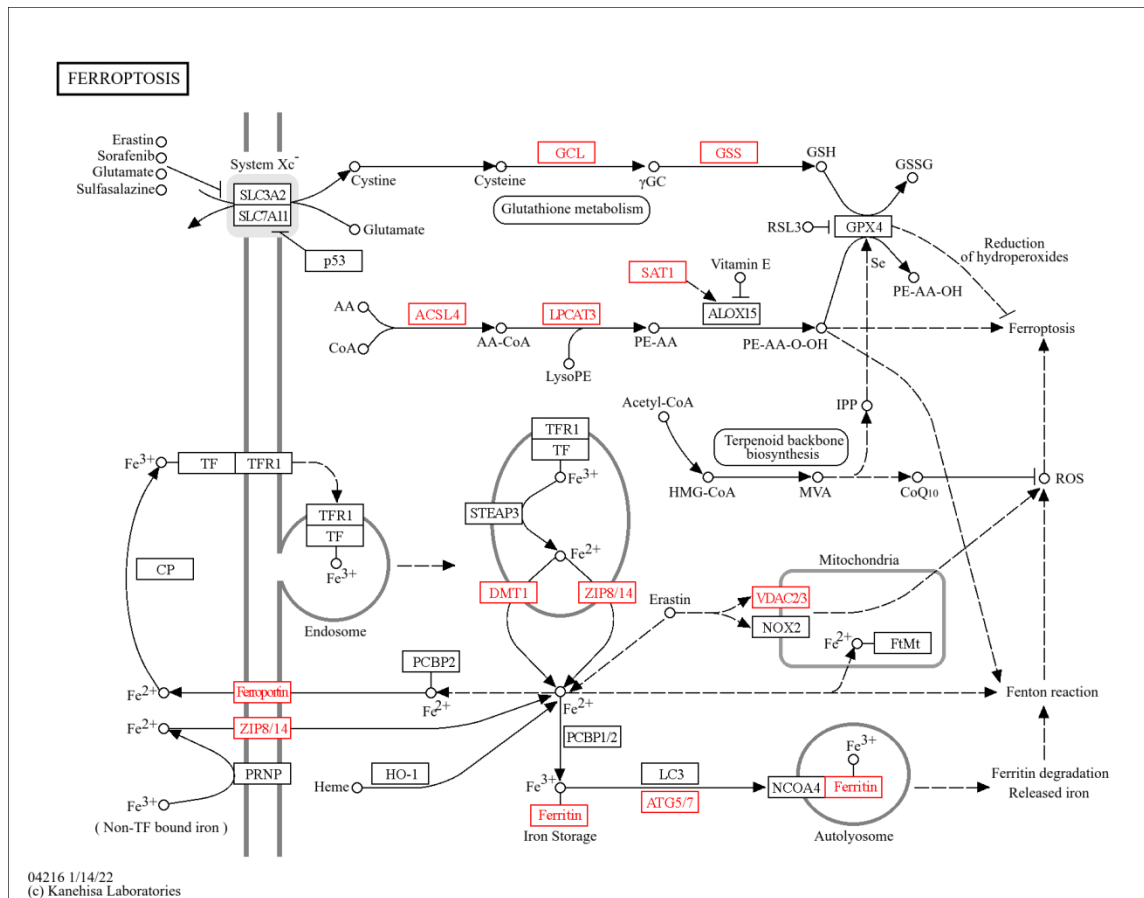


Figura N°13: Mapa de la vía de Ferroptosis en *C. rogercresseyi* basado en la base de datos KEGG, mostrando los productos proteicos involucrados en cada etapa de la vía.

De acuerdo con este análisis de expresión *in silico*, los genes evaluados mostraron diferencias significativas en sus niveles de expresión entre los tratamientos y el grupo control. Estas variaciones sugieren una modulación de las vías de apoptosis, TNF y ferroptosis como resultado de la aplicación de las vacunas antimicrobistas. En particular, los tratamientos con bacterias vivas y con bacterias inactivadas más IPath® parecen inducir un impacto más pronunciado en estas vías, lo que respalda la hipótesis de que la vacuna influye en los procesos moleculares asociados a la muerte celular programada en el parásito.

Estos resultados destacan el potencial de las vacunas antimicrobianas para alterar vías críticas en *C. rogercresseyi*, lo que podría contribuir a estrategias innovadoras para el control de este parásito en la salmonicultura.

5.2. Objetivo II. Analizar los patrones de transcripción en *C. rogercresseyi* expuesto a vacuna antimicrobiota para genes asociados a respuesta inmune innata (vías TLR e IMD).

Con el fin de validar los resultados del análisis *in silico* de los datos de secuenciación de las muestras de ARN extraídas del grupo experimental expuesto a la vacuna antimicrobiota formulada con bacterias inactivadas CD-Cr (Objetivo I), se evaluó el efecto de la vacuna sobre la expresión relativa de genes relacionados a la respuesta inmune innata del ectoparásito mediante qPCR.

Del análisis de expresión relativa de IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) (Fig. 14 A), gen vinculado a la vía IMD, se infiere que no hay una diferencia estadística significativa entre Caligus expuestos a la vacuna y el grupo control a los 25 dpi ($p= 0,2064$ (ns)) y 68 dpi ($p= 1,358$ (ns)). Además, se evidenció que la respuesta tampoco es significativamente diferente entre Caligus extraídos de peces vacunados a los 25 y 68 dpi, con un nivel de significancia de $p= 0,7155$ (ns).

El análisis de expresión relativa del gen Dorsal (Fig.14 B), vinculado a la vía TLR, reveló que no hay una diferencia estadística significativa entre los individuos expuestos a la vacuna y el grupo control a los 25 dpi ($p= 0,5100$ (ns)) y 68 dpi ($p= 0,9806$ (ns)). También demostró que la expresión relativa del gen no es significativamente diferente entre Caligus extraídos de peces vacunados a los 25 y 68 dpi, con un nivel de significancia de $p= 0,8551$ (ns).

Por último, del análisis de expresión relativa del gen IKK β (Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B Kinase Subunit beta) (Fig.14 C), vinculado la vía IMD y TLR, se observaron diferencias significativas entre los especímenes expuestos a la vacuna y el grupo control a los 25 dpi, con un nivel de significancia de $p= 0,0001$ (***). Por otra parte, para los

especímenes expuestos a la vacuna frente al grupo control a los 68 dpi, también se mostraron diferencias significativas, pero en un nivel de significancia menor, con un $p=0,0183(*)$. También se detectaron diferencias significativas de la respuesta entre los grupos expuestos a la vacuna a los 25 y 68 dpi, con un nivel de significancia de $p < 0,0001(****)$.

Dado estos resultados, se pudo observar que los genes AIP y Dorsal presentaron patrones de expresión similar ante la vacuna, sin diferencias significativas entre los grupos control y los expuestos a la vacuna, a diferencia del gen $Ikk\beta$, el cual mostró una sobreexpresión con respecto al control, siendo los individuos extraídos a los 25 dpi los que evidenciaron diferencias más significativas.

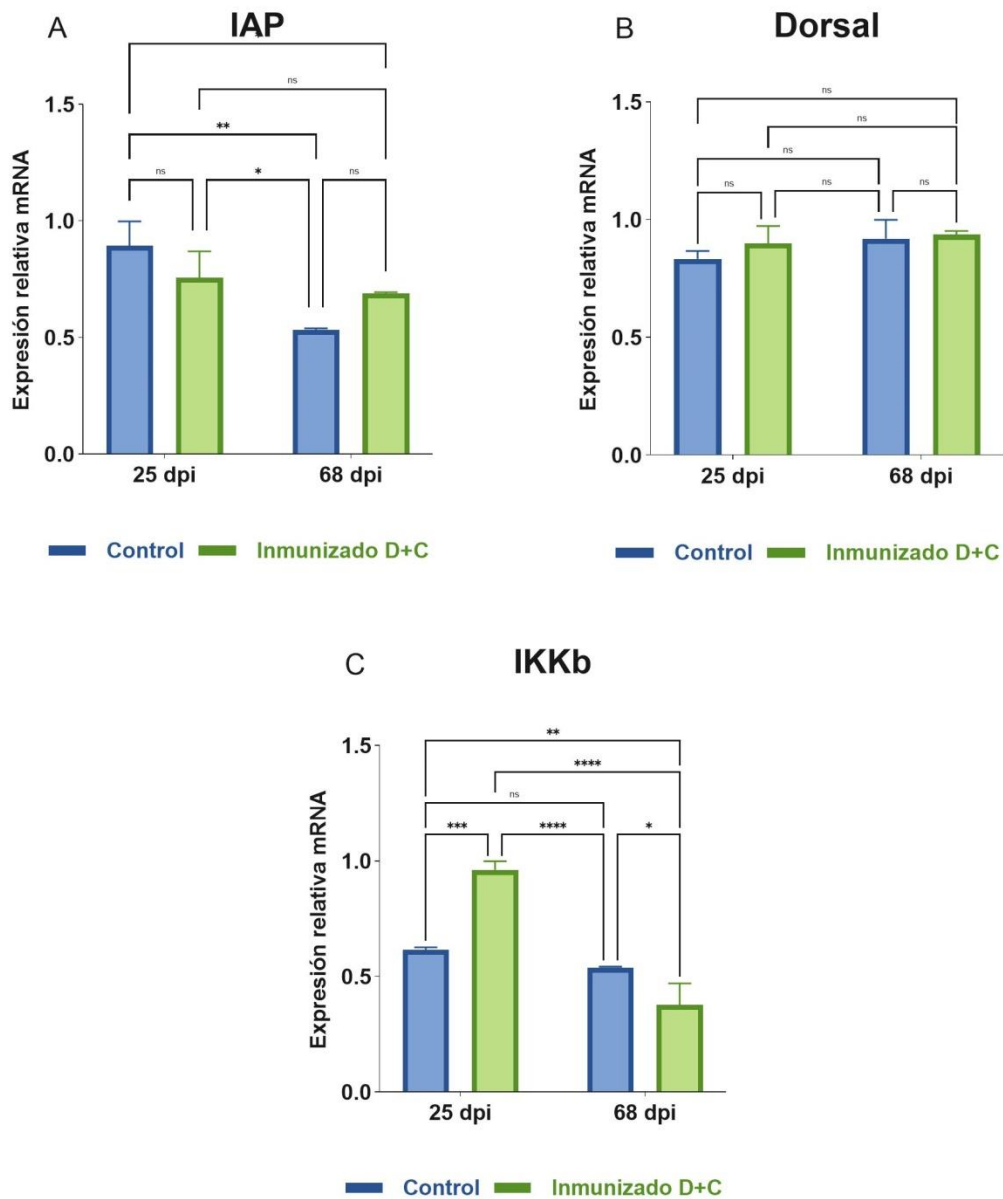


Figura 14: Niveles de expresión relativa ARNm para (A) AIP, (B) Dorsal y (C) *Ikkβ* en *C. rogercresseyi* extraídos a los 25 y 68 días post infección (dpi) tras la exposición a vacuna antimicrobiota. Normalizados con β - Tubulina. Donde las barras verticales representan el error estándar (Promedio \pm error estándar), (*) representa diferencias con $p < 0,05$ y (ns) representa diferencias con $p > 0,05$; ANOVA 2 vías; Tukey-HSD.

5.3. Objetivo III. Determinar la modulación de genes de estrés oxidativo y secretoma en *C. rogercresseyi* colectados de peces inmunizados con vacuna antimicrobiota.

Con el fin de validar los resultados del análisis *in silico* de los datos de secuenciación de las muestras de ARN extraídas del grupo experimental expuesto a la vacuna antimicrobiota formulada con bacterias inactivadas CD-Cr (Objetivo I), se evaluó el efecto de la vacuna sobre la expresión de genes relacionados a la respuesta oxidativa y secretora del ectoparásito.

5.3.1 Sistema antioxidante

Del análisis de expresión relativa para los genes relacionados a la respuesta oxidativa Ferritina, SOD, Catalasa y PHGP. Para Ferritina (Fig. 15 A) se observaron diferencias significativas entre el grupo expuestos a la vacuna y el grupo control a los 25 dpi, con un nivel de significancia de $p= 0,0002$ (***). Mientras que para los especímenes expuestos a la vacuna frente al control a los 68 dpi no mostraron diferencias significativas, con un nivel de significancia de $p= 0,0992$ (ns). En contraste, se puede ver que la respuesta entre Caligus extraídos de peces vacunados a los 25 y 68 dpi si es significativamente diferente, con un nivel de significancia de $p= 0,0010$ (***).

Con relación al análisis de expresión relativa de superóxido dismutasa (SOD) (Fig.15 B), evidencia diferencias significativas entre los especímenes expuestos a la vacuna frente al control a los 25 dpi, con un nivel de significancia de $p= 0,0041$ (**). Mientras que para los especímenes expuestos a la vacuna frente a los control a los 68 dpi no muestra diferencias significativas, con un nivel de significancia de $p= 0,0908$ (ns). En cambio, se observaron diferencias significativas de respuesta entre Caligus extraídos de peces vacunados a los 25 y 68 dpi, con un nivel de significancia de $p= 0,0275$ (*).

El análisis de expresión relativa de catalasa (Fig.15 C), mostró diferencias significativas entre los especímenes expuestos a la vacuna frente al control a los 25 dpi, con un nivel de significancia de $p= 0,0470$ (*). Mientras que para los especímenes expuestos a la

vacuna frente a los control a los 68 dpi no muestra diferencias significativas, con un nivel de significancia de $p= 0,0638$ (ns). Por el contrario, si se puede apreciar que la expresión génica entre *Caligus* extraídos de peces vacunados a los 25 y 68 dpi es significativamente diferente, con un nivel de significancia de $p= 0,0007$ (***).

Por su parte, el análisis de expresión relativa de la fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGP) (Fig.15 D), reveló diferencias significativas entre los grupos expuestos a la vacuna frente al control a los 25 dpi, con un nivel de significancia de $p< 0,0001$ (****). Mientras que para los especímenes expuestos a la vacuna frente a los control a los 68 dpi no muestra diferencias significativas, con un nivel de significancia de $p= 0,4766$ (ns). Por otro lado, se puede ver que la expresión génica entre *Caligus* extraídos de peces vacunados a los 25 y 68 dpi es considerablemente diferente, con un nivel de significancia de $p< 0,0001$ (****).

Dado estos resultados, se observó que existe un patrón de respuesta similar para los cuatro genes evaluados relacionados a la respuesta oxidativa en *C. rogercresseyi*, siendo los individuos extraídos a los 25 dpi los que mostraron una respuesta diferencial más consistente en el experimento. En particular se vio que los cuatro genes evaluados mostraron una sobreexpresión con relación al grupo control.

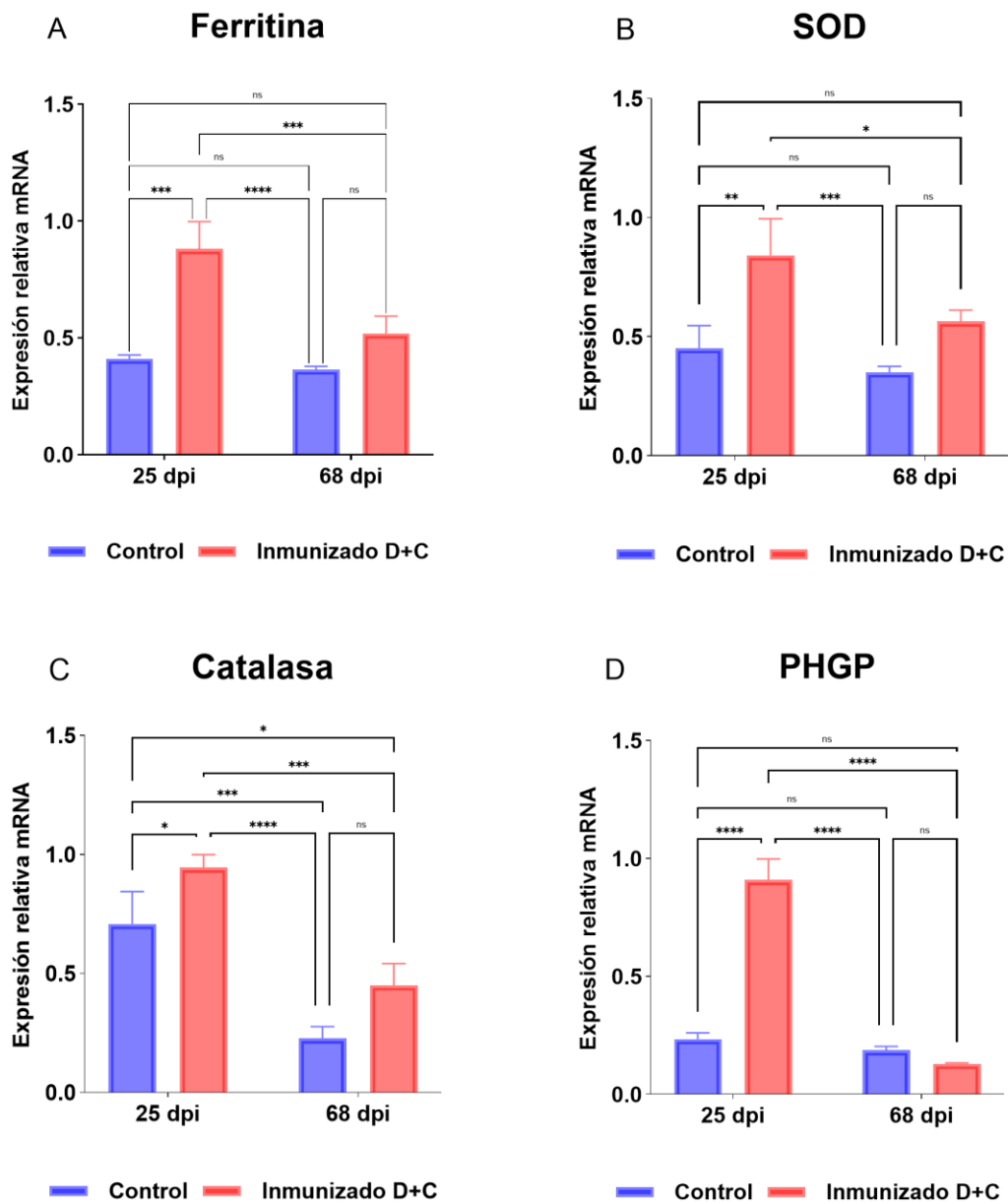


Figura 15: Niveles de expresión relativa ARNm para (A) Ferritina, (B) SOD, (C) catalasa y (D) PHGP en *C. rogercresseyi* extraídos a los 25 y 68 días post infección (dpi) tras la exposición a vacuna antimicrobiota. Normalizado con β - Tubulina. Donde las barras verticales representan el error estándar (Promedio \pm error estándar) y * representa diferencias con $p < 0,05$; ANOVA 2 vías; Tukey-HSD.

5.3.2. Productos Secretorios

Del análisis de expresión relativa para los genes relacionados al secretoma, serpina 10 y serpina 3. Para serpina 3 (Fig. 16 A) se observaron diferencias muy significativas entre los especímenes expuestos a la vacuna y el grupo control a los 25 dpi, con un nivel de significancia de $p < 0,0001$ (****). Por otro lado, los especímenes expuestos a la vacuna frente al grupo control a los 68 dpi no mostraron diferencias significativas, con un nivel de significancia de $p = 0,9997$ (ns). También se infiere que entre los caligus extraídos de peces vacunados a los 25 y 68 dpi existen diferencias significativas consistentes, con un nivel de significancia de $p < 0,0001$ (****).

Con relación a la serpina 10 (Fig. 16 B), podemos denotar que también hay diferencias muy significativas entre los especímenes expuestos a la vacuna frente al control a los 25 dpi, con un nivel de significancia de $p < 0,0001$ (****). Mientras que para los especímenes expuestos a la vacuna frente al control a los 68 dpi no hubo diferencias significativas, con un nivel de significancia de $p = 0,9905$ (ns). Aun así, se pudo ver diferencias significativas entre los individuos extraídos a los diferentes tiempos, con un nivel de significancia de $p \leq 0,0186$ (*).

Dado estos resultados, se observó que el grupo de individuos extraídos a los 25 dpi fueron los que mostraron una respuesta diferencial más significativa en el experimento. En particular, el gen serpina 3 mostró una sobreexpresión con niveles significativamente más altos en comparación con el grupo control, mientras que el gen serpina 10 presentó una subexpresión con respecto al control.

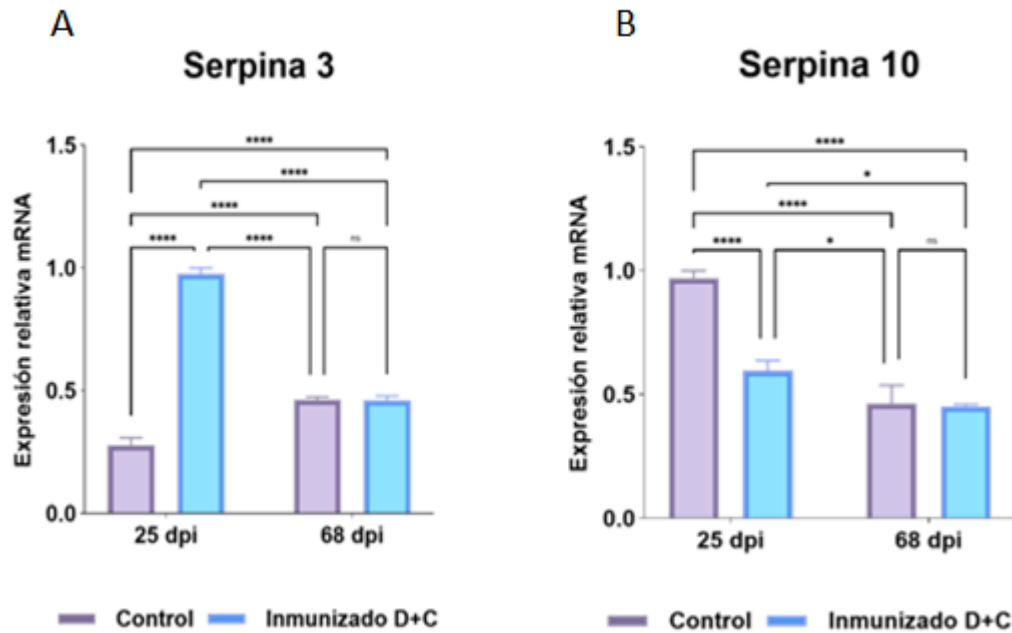


Figura 16: Niveles de expresión relativa ARNm para Serpinas 3 y 10 en *C. rogercresseyi* extraídos a los 25 y 68 días post infección (dpi) tras la exposición a vacuna antimicrobiota.. Normalizado con β - Tubulina. Donde las barras verticales representan el error estándar (Promedio \pm error estándar) y * representa diferencias con $p < 0,05$; ANOVA 2 vías; Tukey-HSD.

Del análisis de expresión relativa para los genes relacionados al secretoma, tripsina 2 y tripsina 12. Para tripsina 2 (Fig. 17 A) se observaron diferencias significativas entre los especímenes expuestos a la vacuna y el grupo control a los 25 dpi, con un nivel de significancia de $p = 0,0004$ (***). Mientras que para los especímenes expuestos a la vacuna frente a los control a los 68 dpi no mostraron diferencias significativas, teniendo un nivel de significancia de $p = 0,9867$ (ns). Por otro lado, se observaron diferencias significativas considerables entre Caligus extraídos de peces vacunados a los 25 y 68 dpi, con un nivel de significancia de $p = 0,0001$ (***). Para tripsina 12 (Fig. 17 B) se vieron perfiles de expresión similares a los anteriormente descritos.

Dado estos resultados, se puede inferir que los individuos extraídos a los 25 dpi fueron los que mostraron una respuesta diferencial significativa con respecto al control, donde se evidenció una sobre-expresión para ambos genes evaluados.

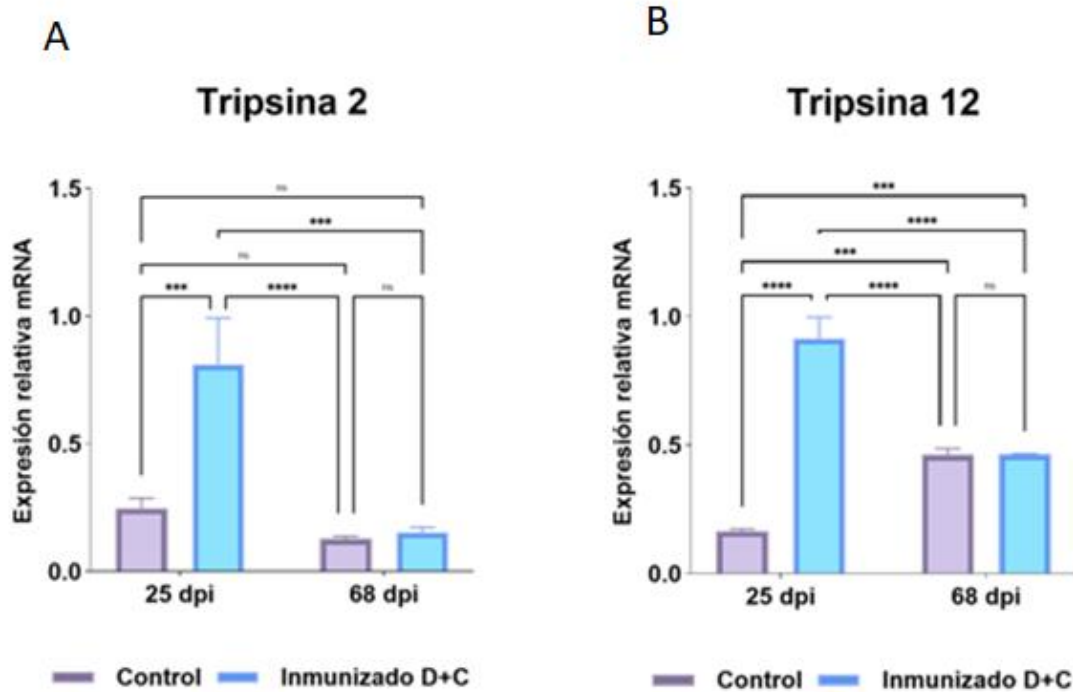


Figura 17: Niveles de expresión relativa ARNm para tripsina 2 y 12 en *C. rogercresseyi* extraídos a los 25 y 68 días post infección (dpi) tras la exposición a vacuna antimicrobiota.. Normalizado con β - Tubulina. Donde las barras verticales representan el error estándar (Promedio \pm error estándar) y * representa diferencias con $p < 0,05$; ANOVA 2 vías; Tukey-HSD.

Del análisis de expresión relativa de catepsina B y D. Para catepsina B (Fig.18 A) se observaron diferencias significativas entre los especímenes expuestos a la vacuna y el grupo control a los 25 dpi, con un nivel de significancia de $p = 0,0001$ (***). Por otra parte, también se vieron diferencias significativas entre las muestras extraídas a diferentes tiempos, con un nivel de significancia de $p = 0,9979$ (ns). Mientras que para los especímenes expuestos a la vacuna frente a los control a los 68 dpi, no hubieron diferencias significativas, teniendo un nivel de significancia de $p = 0,9999$ (ns).

Para catepsina D (Fig.18 B), el análisis de expresión relativa mostro diferencias significativas entre los especímenes expuestos a la vacuna y el grupo control a los 25 dpi, con un nivel de significancia de $p= 0,0265$ (*). Mientras que para los especímenes expuestos a la vacuna frente a los control a los 68 dpi, no mostró diferencias significativas, con un nivel de significancia de $p= 0,1723$ (ns). Además, tampoco se vieron diferencias significativas entre los Caligus extraídos de peces vacunados a los 25 y 68 dpi, con un nivel de significancia del orden de $p= 0,5592$ (ns).

Dado estos resultados, podemos inferir que ambos genes se vieron subexpresados significativamente con respecto al control a los 25 dpi, mientras que a los 68 dpi se comportaron de forma basal, por lo que no mostraron diferencias significativas de expresión con respecto al control.

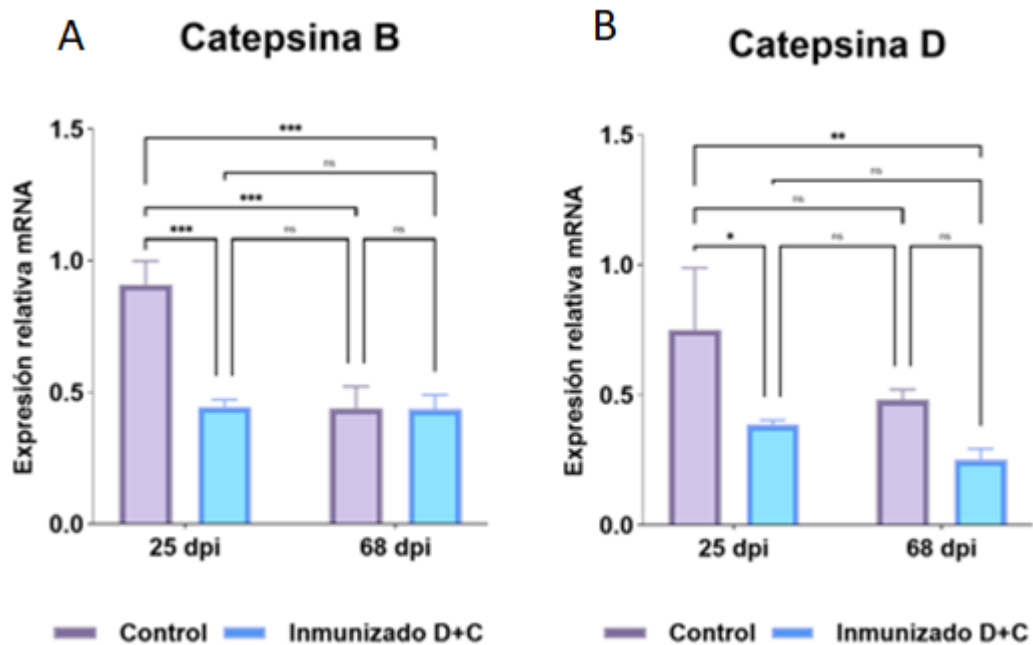


Figura 18: Expresión relativa del ARNm de catepsinas B y D de *C. rogercresseyi* extraídos a los 25 y 68 días post infección (dpi) tras la exposición a vacuna antimicrobiota. Normalizado con β - Tubulina. Donde las barras verticales representan el error estándar (Promedio \pm error estándar) y * representa diferencias con $p < 0,05$; ANOVA 2 vías; Tukey-HSD.

Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis realizado mediante PCA mostró dos componentes principales que explican conjuntamente una variabilidad de expresión del 86.1%, representando el primer componente principal (Dim 1) el 53% y el segundo componente principal (Dim 2) el 33.1% (Fig. 19). Los grupos control muestran una mayor asociación a la expresión de genes como serpina 10, catepsinas B y D, relacionados con los mecanismo de evasión a la respuesta inmune del pez y la degradación de proteínas de patógenos, facilitando así su reconocimiento en el sistema inmune innato. Por otro lado, los grupos vacunados se agrupan predominantemente en la región asociada con la expresión de genes como Ferritina, SOD, PHGP y Catalasa, los cuales están relacionados con la respuesta al estrés oxidativo. Asimismo, estos grupos muestran una mayor asociación con genes como Dorsal e Ikk β , junto con las Tripsinas 2 y 12, vinculados a la activación de la vía de señalización inmune mediada por receptores tipo Toll.

Este resultado sugiere diferencias en las respuestas entre los grupos analizados, destacando que los individuos expuestos a la vacuna podrían presentar una activación más intensa de la respuesta al estrés oxidativo y de la vía de señalización de los receptores tipo Toll, en comparación con el grupo control.

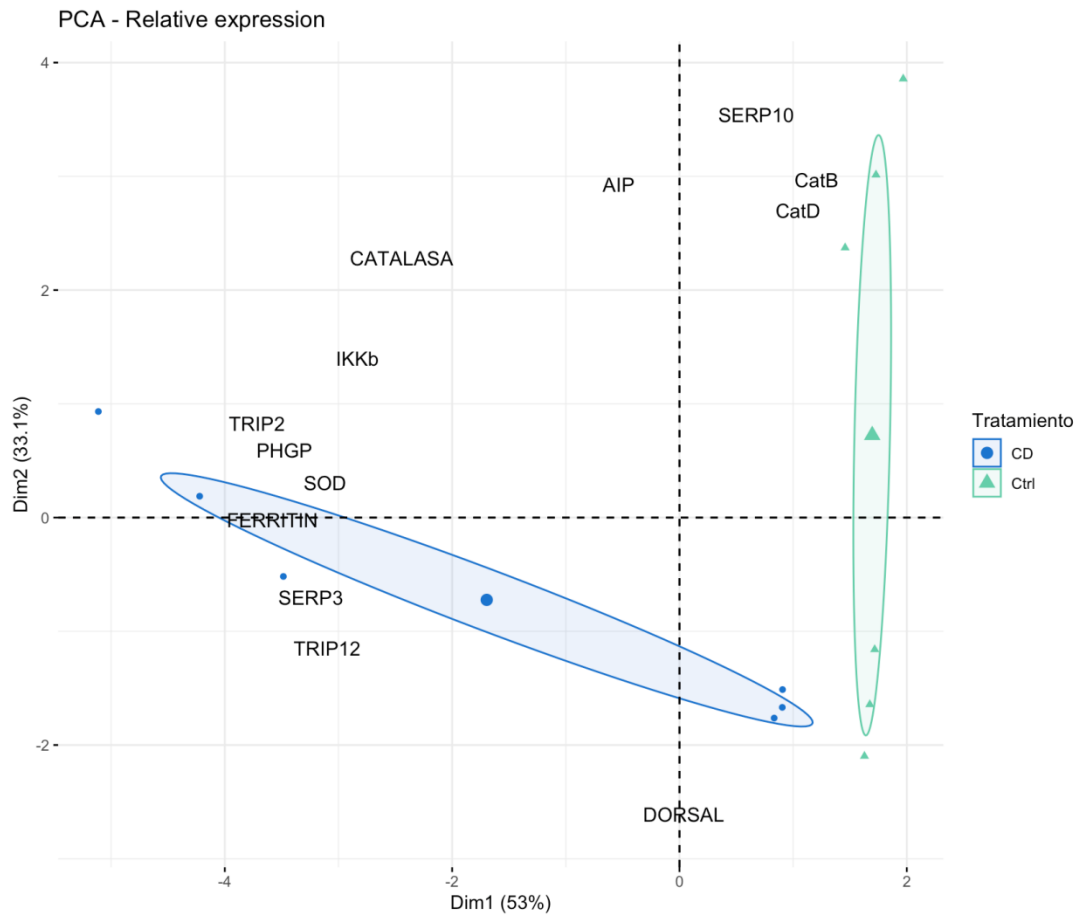


Figura 19: Análisis de componentes principales (PCA) para genes vinculados a la respuesta inmune, secretoma y especies reactivas del oxígeno (ROS) en *C. rogercresseyi* expuestos a vacuna antimicrobiota frente a los grupos control. El tratamiento (CD) representa a las muestras de *Caligus* obtenidas de individuos inmunizados, mientras que (Ctrl) representa a los grupos control del experimento. Los valores de expresión relativa se utilizaron como variable dependiente, mientras que la variable independiente correspondió a los diferentes tiempos.

El análisis realizado mediante PCA entre los diferentes grupos mostró diferencias claras en la asociación de los genes evaluados. El grupo control a los 25 dpi se agrupó más cerca de la expresión de genes como Serpina 10 y las Catepsinas B y D, mientras que el grupo control a los 68 dpi se asoció principalmente con el gen Dorsal.

Por su parte, el grupo expuesto a la vacuna a los 25 dpi presentó una mayor proximidad a genes como Ferritina, PHGP, SOD, Ikk β , Serpina 3 y las Tripsinas 2 y 12, los cuales son clave en la respuesta al estrés oxidativo y la activación de la respuesta inmune. En cambio, el grupo expuesto a la vacuna a los 68 dpi mostró una mayor correlación con el gen Dorsal.

Estos resultados sugieren que la vacuna antimicrobiana basada en bacterias inactivadas induce cambios en la expresión génica en comparación con el grupo control, particularmente a los 25 dpi. Esto destaca una posible activación más pronunciada de las vías inmunes mediadas por receptores tipo Toll y de las respuestas antioxidantes en los grupos vacunados respecto al control.

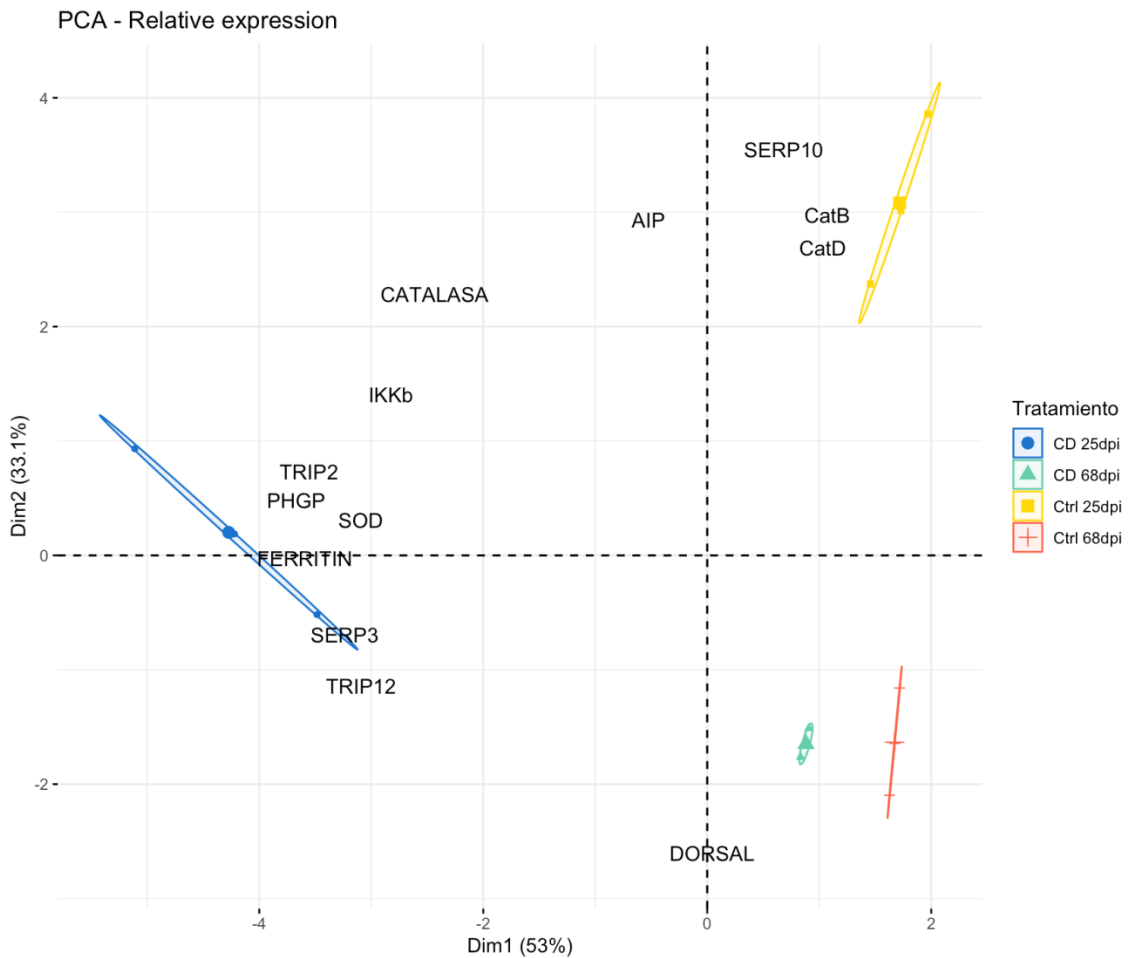


Figura 20: Análisis de componentes principales (PCA) para genes vinculados a la respuesta inmune, secretoma y especies reactivas del oxígeno (ROS) en *C. rogercresseyi* expuesto a vacuna antimicrobiota frente al grupo control, a los 25 y 68 días post infección. Los valores de expresión relativa se utilizaron como variable dependiente, mientras que la variable independiente correspondió a los diferentes tiempos.

DISCUSIÓN

La microbiota desempeña un papel crucial en diversas funciones esenciales para los organismos, siendo clave para el mantenimiento de la homeostasis, así como para los procesos nutricionales, metabólicos y de defensa (Merrifield & Rodiles, 2015). En los copépodos, se ha observado que la interacción con bacterias incluye asociaciones permanentes y transitorias, tanto internas como externas, que podrían influir significativamente en su salud. Estas bacterias simbióticas pueden contribuir a procesos como la digestión, la absorción de nutrientes, la reproducción, la respuesta inmune y otros mecanismos de defensa (Moisander et al., 2015). Particularmente en copépodos parásitos como *C. rogercresseyi*, la microbiota podría tener un efecto sobre su capacidad infecciosa y resistencia, y estar directamente relacionado con brotes de enfermedades en peces (Gallardo-Escárte et al., 2019).

En este contexto, la manipulación de la microbiota de parásitos ha surgido como una estrategia prometedora para su control. Entre las propuestas innovadoras, destaca el concepto de "vacuna antimicrobiota", que describe un tipo de vacuna diseñada específicamente para alterar bacterias clave de la microbiota del parásito, logrando este efecto mediante la inmunización del hospedador contra dichas bacterias (Mateos-Hernández, 2021).

Este estudio tuvo como objetivo evaluar cómo la inmunización de *S. salar* con vacunas antimicrobiota afectó los niveles de expresión de genes relacionados con la respuesta inmune y los procesos de muerte celular en *C. rogercresseyi*.

Con relación a lo anterior, se sabe que las interacciones hospedador-parásito son relaciones complejas en las que un organismo se beneficia a espensas de otro, generando frecuentemente efectos negativos en el hospedador. Ante un parásito, el huésped experimenta alteraciones en el comportamiento, la reproducción y la regulación inmune, mientras que el parásito despliega mecanismos de evasión para establecerse, como la secreción de moléculas que modulan la respuesta inmune (Biron & Loxdale, 2013; Froeschke & von der Heyden, 2014; Kan et al., 2012).

De acuerdo a esto, los resultados respaldan la hipótesis inicial en la cual se propone que la inmunización del hospedador induce una modulación molecular en el parásito, induciendo cambios en vías de respuesta inmune innata y de muerte celular programada. En general, los resultados fueron congruentes con la expresión génica diferencial revelada utilizando el enfoque *in silico*.

Respuesta inmune innata

En el ámbito inmunológico, la respuesta inicial a patógenos en invertebrados es mediada por el sistema inmune innato, que opera a través de diversas vías de señalización iniciadas por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) mediante receptores de membrana celular (Li, 2012). Estos receptores activan vías como Toll y la vía de Inmunodeficiencia (IMD). Según los estudios Valenzuela-Muñoz and Gallardo-Escárte (2014), en *C. rogercresseyi*, la vía IMD responde a bacterias Gram-negativas mediante proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRP), que activan cascadas de señalización involucrando proteínas como DREDD, FADD y TAB/TAK1, teniendo genes similares a los presentes en la vía del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) descrita en vertebrados (Beutler & Moresco, 2008). Estas cascadas culminan en la activación de factores NF- κ B, como Relish y Dorsal, que regulan la síntesis de péptidos antimicrobianos (AMP) (Hou et al., 2013; Valanne et al., 2011). Por otro lado, la vía de los receptores tipo Toll (TLR) se activa en respuesta a PAMPs como lipopolisacáridos (LPS), convergiendo también en la activación de NF- κ B. Además, esta vía está vinculada a procesos de apoptosis a través de genes clave como AIP e IKK β , los

cuales modulan tanto la supervivencia celular como la muerte programada (Hayden & Ghosh, 2011; Kim et al., 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, los genes relacionados con Dorsal y AIP, componentes clave de las vías de respuesta inmune en *C. rogercresseyi*, no mostraron diferencias significativas entre los grupos inmunizado y control a los 25 y 68 días post infección. Lo que podría estar vinculado a estudios realizados con anterioridad, donde se ha visto que la vía de señalización TLR/IMD en piojos de mar que infestan salmón, muestran respuestas tempranas (3 y 7 dpi) (Vera-Bizama et al., 2015) y con diferencias transcripcionales durante el desarrollo ontogenético (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárate, 2014), lo que explicaría porque no hubo una respuesta mucho más remarcada del grupo tratado con respecto al control y al tiempo de infección.

Por otro lado, el gen $IKK\beta$ mostro una sobreexpresión significativa con respecto al control, principalmente a los 25 días post infección. Se sabe que la señalización del factor de transcripción factor nuclear-kappaB (NF- κ B) está controlada por el inhibidor del complejo quinasa kappa B (IKK), una subunidad catalítica crítica del cual es $IKK-\beta$ (Ziegelbauer et al., 2005). NF- κ B, desempeña papeles críticos en la respuesta inmune, inflamación, el control de las vías de muerte celular como TNF y la proliferación celular, que son características de muchas enfermedades (Hayden & Ghosh, 2011). De acuerdo a esto se sabe que durante la inflamación $IKK-\beta$ es más crítico en la activación de la vía NF- κ B y casi todas las funciones proinflamatorias informadas para NF- κ B requieren la subunidad $IKK-\beta$ para la activación (Ziegelbauer et al., 2005). Por lo tanto, nuestros resultados concuerdan con esto, producto a que al tener una sobre expresión del gen $IKK-\beta$, se activarían los factores de transcripción NF- κ B, potenciando una respuesta proinflamatoria, reflejada también en la alta producción de especies reactivas de oxígeno y la necesidad de regular los niveles de estrés oxidativo por parte del ectoparásito. Ya que estudios previos han evidenciado que frente a una respuesta inflamatoria excesiva, el huésped puede sufrir consecuencias perjudiciales; incluso fatales (Kim et al., 2007), y uno de los motivos es producto a que cuando un ligando se une a un TLR por ejemplo, los fagocitos se estimulan dando como resultado la fagocitosis, la regulación positiva de

las citocinas proinflamatorias y la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROS) (Lewis et al., 2014).

Otro aspecto importante en la expresión de IKK- β es que, a los 68 días post infección, no hubo una diferencia significativa en su expresión en comparación con el control. Esto podría estar relacionado con que, según estudios previos, se ha observado que los genes de las vías TLR e IMD muestran variaciones transcripcionales durante las distintas etapas de desarrollo de *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Muñoz & Gallardo-Escárate, 2014). Por lo tanto, la respuesta transcriptómica de este gen particular en *Caligus* podría no ser tan evidente, ya que su expresión tiende a variar en función de su desarrollo ontogenético y de la respuesta inmune del hospedador.

De acuerdo a los resultados de expresión relativa de genes asociados a IMD/TLR, se puede deducir que la activación parcial de estas vías inmunológicas, junto con el estrés oxidativo observado en los resultados, podría estar relacionada con mecanismos más amplios, como la ferroptosis o la disbiosis microbiana, los cuales afectan tanto la supervivencia como la capacidad adaptativa del parásito (Merrifield & Rodiles, 2015). La activación de IKK- β podría estar actuando como un mediador clave en la coordinación de estas respuestas, conectando la inmunidad innata con la regulación del equilibrio redox y la homeostasis del hierro (Manoharan, 2024).

Sistema antioxidante

La regulación diferencial de genes asociados al estrés oxidativo y al manejo del hierro observada en este estudio evidencia el impacto de la vacuna antimicrobiana basada en bacterias inactivadas sobre la respuesta molecular de *C. rogercresseyi*. En particular, los genes clave como ferritina, catalasa, PHGP (fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa) y SOD (superóxido dismutasa) mostraron una alta expresión en el grupo vacunado con respecto al control a los 25 dpi, mientras que a los 68 dpi no fue lo significativamente diferente. Este patrón es consistente con estudios previos que relacionan estos genes con la neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la prevención de daños oxidativos (Vera-Bizama et al., 2015).

El análisis *in silico* indica que la vacuna induce una regulación diferencial de genes que codifican para ferroportina y ferritina, proteínas esenciales en la vía de la ferroptosis. Estas desempeñan roles críticos en la regulación del metabolismo del hierro y la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ROS), y su sobreexpresión podría actuar como un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo, previniendo la muerte celular (Distéfano et al., 2021).

Por su parte, la ferritina, regulada al alza, desempeña un papel crucial en la homeostasis del hierro y la protección contra la toxicidad del hierro libre, reduciendo la formación de ROS (Theil, 2003). El hierro participa en la reacción de Fenton, un proceso que genera ROS altamente reactivos como el radical hidróxilo (OH) (Endale et al., 2023). Un exceso de hierro disponible en el organismo puede favorecer esta reacción, incrementando los niveles de ROS. Esto puede desestabilizar procesos biológicos importantes en crustáceos, como la integridad celular o la regulación de vías metabólicas críticas (Fanjul-Moles & Gonsebatt, 2011). Los resultados de este estudio evidencian un aumento de expresión de ferritina, la cual al ser una proteína que almacena hierro intracelular de manera segura (Huerta Jiménez et al., 2005), previene que el hierro libre participe en reacciones de tipo Fenton que generan ROS (Huerta Jiménez et al., 2005), lo que nos indica que su sobreexpresión es producto a que *Caligus* está intentando limitar la disponibilidad de hierro libre, reduciendo así la producción de ROS.

Por su parte, SOD se relaciona con los procesos de generación y eliminación de ROS durante la respuesta de fagocitosis de materiales extraños que invaden el organismo (Campa-Córdova et al., 2005). SOD convierte el superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que posteriormente es detoxificado por catalasa o glutatión peroxidasa (Fanjul-Moles & Gonsebatt, 2011). De acuerdo a estudios realizados en camarones por Campa-Córdova et al. (2005), el incremento en la actividad de SOD sugiere un mecanismo adaptativo para gestionar un exceso de superóxidos en su entorno interno. En este sentido, los resultados de esta investigación indican que el aumento de SOD podría estar relacionado con el estrés oxidativo asociado a la respuesta inflamatoria del hospedador (Valenzuela-Muñoz, 2016), la cual genera ROS. Además, el propio

ectoparásito, al ser estimulado por la vacunación, podría desencadenar una respuesta proinflamatoria que contribuye aún más a la producción de ROS (Lewis et al., 2014).

Catalasa, por otro lado, actúa como un antioxidante primario, neutralizando ROS y protegiendo la integridad celular descomponiendo el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno, neutralizando así una de las principales especies ROS (Fanjul-Moles & Gonsebatt, 2011). El incremento en su expresión refleja la presencia de niveles elevados de H₂O₂ en el organismo, posiblemente derivados de la alteración del metabolismo y respuesta proinflamatorias inducidas por la vacuna.

La regulación al alza de PHGP, enzima esencial en la detoxificación de hidroperóxidos lipídicos, destaca como un marcador de la respuesta adaptativa frente al daño oxidativo. PHGP reduce peróxidos lipídicos y protege las membranas celulares de la peroxidación inducida por ROS (Afzal et al., 2014). Su aumento sugiere que los niveles elevados de ROS estarían dañando las membranas lipídicas del piojo de mar, y el organismo está tratando de mitigar este daño.

De acuerdo a los resultados de expresión relativa de genes asociados a especies reactivas del oxígeno, se puede deducir que la vacuna generó un notorio desbalance en la homeostasis del hierro y el estrés oxidativo, lo que podría inducir la modulación de vías de muerte celular, tales como ferroptosis, afectando la supervivencia de *Caligus* al desafiar su capacidad antioxidante. Cabe señalar que la mayoría de los genes evaluados mostraron cambios significativos en su expresión en comparación con el control solo a los 25 dpi. A los 68 dpi, los resultados fueron mayoritariamente no significativos, lo que podría indicar una atenuación de los efectos de la inmunización con el tiempo o una adaptación del parásito al ambiente inmunológico del hospedador.

Productos secretorios

Al igual que con cualquier otro parásito, la capacidad parasitaria y el éxito infeccioso de *C. rogercresseyi* dependen de su capacidad para eliminar y/o reducir las defensas del hospedador para unirse y permanecer en él. De acuerdo a estudios anteriores, se sabe que los mecanismos empleados por *C. rogercresseyi* para invadir al hospedador y evadir

las respuestas de defensa posteriores involucran genes como inhibidores de serina proteasa (serpinas) expresados diferencialmente a lo largo del desarrollo ontogénico (Maldonado-Aguayo & Gallardo-Escárte, 2014). Además, estudios previos realizados por Firth et al. (2000), han demostrado que la saliva de los artrópodos parásitos se compone principalmente de proteasas, fosfatasa y prostaglandinas que han demostrado inmunomodular al huésped y facilitar el proceso de infestación (Firth et al., 2000). Por ejemplo, la patogenicidad se ha relacionado con la actividad de la proteasa en varias especies parasitarias diferentes (Sajid & McKerrow, 2002), como la ameba *Entamoeba histolytica* (Que & Reed, 2000), el anisákido *Anisakis simplex* (Sakanari & McKerrow, 1990) y el mixozoo *Myxobolus cerebralis* (Kelley et al., 2003; Maldonado-Aguayo et al., 2015). En este estudio, se observó que los genes asociados al secretoma mostraron respuestas divergentes frente a la inmunización con la vacuna antimicrobiana.

Entre los genes evaluados se identifican las catepsinas B y D, que son proteasas involucradas en la capacidad de los parásitos para superar y/o modular las defensas del hospedador, lo que les permite completar su propio ciclo de vida (Sajid & McKerrow, 2002). De acuerdo con análisis transcriptómicos ontogénicos realizados previamente *C. rogercresseyi*, han demostrado que la proteasa de cisteína catepsina B se expresa principalmente en los estadios larvarios y en las hembras adultas, lo que sugiere su papel en los procesos de muda y desarrollo embrionario. Por otro lado, la proteasa aspártica catepsina D muestra una regulación positiva en la etapa infectiva del copépodo (Maldonado-Aguayo et al., 2015). En consonancia con los resultados de este estudio, se registró una subexpresión significativa de las catepsinas B y D en respuesta a la vacuna antimicrobiota. Este hallazgo es consistente con estudios previos que informaron que la catepsina B se regula positivamente durante las etapas de nauplio, pero su expresión disminuye de manera progresiva a lo largo del desarrollo en estados posteriores. En cuanto a la catepsina D, se supervisa una regulación positiva en el estadio copepodito, sugiriendo su posible implicación en procesos relacionados con la evasión del sistema inmune del hospedador, la alimentación o la muda (Maldonado-Aguayo et al., 2015). Así, los resultados de este estudio podrían estar relacionados con condiciones basales del ectoparásito, considerando que las muestras correspondían a individuos adultos.

Con relación a los genes inhibidores de serina proteasa evaluados en este estudio, se sabe que las proteasas pueden tener efectos directos sobre un patógeno o activar otros agentes inmunológicos como el sistema del complemento y las inmunoglobulinas (Gorman & Paskewitz, 2001). Esta activación ha sido descrita en el salmón del Atlántico donde la actividad enzimática y la presencia de proteasas de bajo peso molecular en el moco aumentan después de la infestación por el piojo de mar *L. salmonis*, que son rasgos ausentes en peces no infectados (Easy & Ross, 2009). De los mecanismos por los cuales *C. rogercresseyi* es capaz de evadir la respuesta inmune del hospedador, se sabe que los parásitos han desarrollado una serie de estrategias y factores de virulencia (Armstrong, 2006). Una de estas posibles estrategias está relacionada con la presencia de inhibidores de serina proteasas, comúnmente conocidos como serpinas, que podrían bloquear las funciones de defensa del hospedador a través de la inhibición de enzimas involucradas en la generación de inmunosignales (Reuben, 2003). Las serpinas tienen diversas funciones en la coagulación sanguínea (Davie et al., 1991), la inflamación (Shigetomi, 2010), la metamorfosis (Bayer et al., 1997) y en la respuesta inmune innata (Maldonado-Aguayo et al., 2013). El papel de las serpinas en la evasión de la respuesta inmune del hospedador ha sido evaluado en numerosos organismos parásitos. En el nemátodo *Clonorchis sinensis*, por ejemplo, la serpina conocida como rCrproSERPIN se expresa principalmente durante la etapa infectiva, sugiriendo su participación en el proceso de evasión de la respuesta inmune (Yang et al., 2009).

Resultados de estudios previos relacionados con la expresión diferencial en las distintas etapas de desarrollo de *C. rogercresseyi* mostraron que Cr-serpin 10 se expresa principalmente en la etapa de copepodito, lo que sugiere una función en la evasión de la respuesta inmune del hospedador; además evidenciaron que corresponde a un inhibidor de la elastasa leucocitaria (Maldonado-Aguayo & Gallardo-Escárate, 2014). Este inhibidor ha sido reportado en neutrófilos y es responsable de liberar múltiples productos microbicidas, incluyendo especies reactivas de oxígeno, péptidos catiónicos y enzimas proteolíticas que normalmente sirven como defensa del huésped contra patógenos invasores (Armstrong, 2006; Reuben, 2003). En el presente estudio se vio una baja expresión de la serpina 10 con respecto al grupo control, lo que es inconsistente con

resultados previos, ya que los individuos muestreados correspondían a estadios adultos y no a copepoditos, por lo que para evaluar si su baja expresión está relacionada con la vacuna, habría que considerar hacer muestreos futuros en estadios copepodito.

Con relación a la serpina 3, se sabe que los inhibidores con los aminoácidos alanina y serina, como Cr-serpina 3, tienden a inhibir la elastasa. Estudios previos de análisis filogenético realizados por Maldonado-Aguayo and Gallardo-Escárte (2014) sugieren que las Cr-serpinas 3 está estrechamente relacionada con los inhibidores de la elastasa leucocitaria de otros copépodos como *L. salmonis* y *C. clemensi* (Maldonado-Aguayo & Gallardo-Escárte, 2014), y que además tiende a tener una menor expresión en el estado de copepodito, mientras que en el estado de chalimus la actividad transcripcional aumenta considerablemente (Maldonado-Aguayo & Gallardo-Escárte, 2014). De acuerdo a estudios anteriores se sabe que la elastasa está estrechamente vinculada con la actividad fagocítica. Los fagocitos son los hemocitos que tienen la capacidad de reconocer y destruir mediante el proceso de fagocitosis una gran variedad de microorganismos y partículas tales como bacterias, esporas y células envejecidas propias del organismo. Durante este proceso se origina el fagolisosoma, y en él se liberan sustancias líticas como lisozimas, elastasas, peroxidasas, óxido nítrico (NO) y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Mydlarz et al., 2006). Los fagocitos de crustáceos se pueden encontrar en la hemolinfa o sobre la superficie de las arteriolas del hepatopáncreas y en las branquias (Iwanaga & Lee, 2005). Nuestros resultados son consistentes con los estudios previos, producto que serpina 3 se sobre-expresó considerablemente a los 25 dpi, pero aun así habría que evaluar si esta sobre-expresión es significativa con respecto a los valores de estudios previos, para así considerar si esta está dentro del rango normal o sobre este, a fin de comprobar si parte de la actividad fagocítica en *Caligus* se estaría inhibiendo producto de la vacuna.

Por otra parte, las tripsinas son serina proteasas, grupo de genes involucrados en la proteólisis pero que poseen una tríada catalítica en su estructura, similar a las encontradas en carboxilesterasas y otros genes involucrados en la desintoxicación de

fármacos (Núñez-Acuña, 2021). Se sabe que estos se encuentran expresados diferencialmente en *C. rogercresseyi* expuestos a fármacos azametifos y deltametrina (Valenzuela-Miranda & Gallardo-Escárte, 2016). Estos genes están presentes en los productos secretores/excretos en ectoparásitos, siendo compuestos inmunomoduladores, por ejemplo, estudios anteriores realizados por Fast et al. (2007) han demostrado que *L. salmonis* produce tripsina y prostaglandina E₂ (PGE₂), proponiendo que probablemente son responsables de la respuesta inflamatoria limitada del salmón del Atlántico a la infección. Además, se cree que las proteasas similares a la tripsina desempeñan papeles importantes en el establecimiento y mantenimiento de *L. salmonis* en los huéspedes. A partir de las tripsinas, se han descrito 44 isoformas diferentes en *C. rogercresseyi* (Valenzuela-Miranda & Gallardo-Escárte, 2016). Siendo la tripsina 2 uno de los genes de mayor interés, producto que se ha sugerido como un biomarcador para la sensibilidad a fármacos en *C. rogercresseyi* (Sáez-Vera et al., 2022). Además, otros estudios han propuesto evaluar la interacción gen-miRNA a través de ensayos *in vivo*, para explorar si el miRNA bantam podría reducir la expresión del gen tripsina-2, alterando la respuesta molecular del piojo de mar *C. rogercresseyi* a los fármacos despiojantes (Núñez-Acuña, 2021). Con relación a estudios realizados por Valenzuela-Miranda and Gallardo-Escárte (2016), evidenciaron que las secuencias similares a la tripsina de *C. rogercresseyi* mostraban patrones de expresión diferencial durante el ciclo de vida. Y donde además los valores de expresión obtenidos por análisis de RNA-seq y qPCR mostraron que las serina proteasas como Cr-Tryp2 se regularon positivamente en hembras y machos expuestos a deltametrina o azametifos.

En este estudio se vio una sobreexpresión significativa de las tripsina 2 y 12 en *Caligus* expuestos a la vacuna antimicrobiota, sugiriendo un esfuerzo del parásito por modular la respuesta inmune del hospedador, posiblemente a través de la activación de vías TLR o la activación de proteasas. Esta respuesta podría ser similar a la de estudios previos realizados con tratamientos pesticidas sobre el parásito (Valenzuela-Miranda & Gallardo-Escárte, 2016). Esto apunta de que la vacuna si logró modular vías de respuesta inmune en el parásito, siendo las tripsinas importantes dentro de la resistencia y respuesta inmune de *C. rogercresseyi* a largo plazo (estadios no tan tempranos).

De acuerdo a los resultados de expresión relativa de genes asociados a secretoma, podemos suponer que la vacuna no generó un efecto consistentemente negativo para *C. rogercresseyi* con relación a su capacidad de evasión temprana a la respuesta inmune del hospedador. Cabe destacar además que la mayoría de los genes evaluados mostraron cambios significativos en su expresión en comparación con el control solo a los 25 dpi. A los 68 dpi, los resultados fueron mayoritariamente no significativos.

CONCLUSIÓN

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio respaldan parcialmente la hipótesis de que la vacuna antimicrobiota tiene un efecto inmunogénico sobre *C. rogercresseyi*, modulando su sistema inmune en respuesta a la interacción con peces inmunizados.

- Los resultados de este estudio evidencian una modulación transcriptómica de vías de señalización de muerte celular como apoptosis, NTF y Ferroptosis, siendo esta última la mejor validada por el análisis de expresión relativa. Estos resultados destacan el potencial de las vacunas antimicrobianas para alterar vías críticas en *C. rogercresseyi*, lo que podría contribuir a estrategias innovadoras para el control de este parásito en la salmonicultura, reduciendo la dependencia de tratamientos químicos, lo que minimiza los impactos negativos en el ambiente.
- Los resultados del análisis de expresión relativa sugieren que la inmunización con la vacuna antimicrobiota induce un estrés fisiológico significativo en *C. rogercresseyi*, activando posiblemente vías de muerte celular como ferroptosis, alterando su homeostasis del hierro y activando mecanismos antioxidantes como respuesta al incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS). La sobreexpresión de genes antioxidantes, como ferritina, catalasa, SOD y PHGP, refleja un intento del parásito por mitigar el daño oxidativo inducido por la respuesta inmune del hospedador.

- La activación de genes como IKK β indica que la vacuna antimicrobiota influye en las vías TLR e IMD del parásito de forma parcial, lo que sugiere que la respuesta inmune del hospedador está modulando parcialmente la fisiología de *C. rogercresseyi*. Este hallazgo sugiere que el parásito podría estar intentando activar de manera controlada las vías de señalización inflamatoria para evadir la respuesta inmune efectiva del pez, lo que destaca las complejas interacciones entre el parásito y el sistema inmunológico del hospedador. Esto podría afectar su viabilidad, especialmente cuando se combinan con el estrés oxidativo prolongado.
- En cuanto a los resultados de genes como serpinas, catepsinas y tripsinas, se observó que la vacuna no generó un efecto consistentemente negativo sobre la capacidad de *C. rogercresseyi* para evadir la respuesta inmune del hospedador. La modulación de estos genes no mostró diferencias significativas en comparación con los resultados de estudios previos realizados en individuos no expuestos a tratamientos.
- Cabe destacar además que la mayoría de los genes evaluados mostraron cambios significativos en su expresión en comparación con el control solo a los 25 dpi. A los 68 dpi, los resultados fueron mayoritariamente no significativos, lo que podría indicar una atenuación de los efectos de la inmunización con el tiempo o una adaptación del parásito al ambiente inmunológico del hospedador.

ANEXOS

Anexo 1: Master mix para la reacción de síntesis de cDNA.

Reactivo	Reacción 1x (20ul)
Random Primer/oligo (dT)18	1ul
Agua grado B.M.	10ul
Reaction Buffer 5X	4ul
Ribolock (20U/ul)	1ul
dNTPs mix 10 mM	2ul
RevertAid H Minus (200 U/ul)	1ul
ARN (200 ng/ul)	1ul

Anexo 2: Master mix para la reacción PCR en tiempo final.

Ractivo	Reacción 1x (12.50 ul)
Agua grado B.M.	6.60 ul
Taq Buffer	1.25 ul
BSA	0.25ul
Deoxynucleotide (dNTP)	0.25 ul
MgCl ₂	0.75 ul
Primer Forward	0.625 ul
Primer Revers	0.625 ul
Taq Polimerasa	0.15 ul
Cdna	2ul

LITERATURA CITADA

- Aaen, S. M., Helgesen, K. O., Bakke, M. J., Kaur, K., & Horsberg, T. E. (2015). Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends in Parasitology*, 31(2), 72-81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.006>
- Abbas, A., Andrew, L., & Pillai, S. . (2008). *Inmunología celular y molecular* (10 ed., Vol. 6). Elsevier España.
- Afzal, F., Khurshid, R., Ashraf, M., & Gul Kazi, A. (2014). Chapter 13 - Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Response to Pathogens and Wounding. In P. Ahmad (Ed.), *Oxidative Damage to Plants* (pp. 397-424). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00013-7>
- Armstrong, P. B. (2006). Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology*, 211(4), 263-281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.01.002>
- 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>
- Bayer, C. A., Kalm, L. v., & Fristrom, J. W. (1997). Relationships between Protein Isoforms and Genetic Functions Demonstrate Functional Redundancy at the Broad-Complex during Drosophila Metamorphosis. *Developmental Biology*, 187(2), 267-282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8620>
- Beutler, B., & Moresco, E. M. Y. (2008). Akirins versus infection. *Nature Immunology*, 9(1), 7-9. <https://doi.org/10.1038/ni0108-7>
- Biron, D. G., & Loxdale, H. D. (2013). Host-parasite molecular cross-talk during the manipulative process of a host by its parasite. *J Exp Biol*, 216(Pt 1), 148-160. <https://doi.org/10.1242/jeb.073825>
- Bravo, S., Nuñez, M., & Silva, M. T. (2013). Efficacy of the treatments used for the control of *aligus rogercresseyi* infecting Atlantic salmon, *almo salar* L., in a new fish-farming location in Region XI, Chile. *Journal of Fish Diseases*, 36(3), 221-228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfd.12023>
- Bravo, S., Pozo, V., & Silva, M. T. (2008). The tolerance of *Caligus rogercresseyi* to salinity reduced in southern Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 28(5), 198-206. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-57149142822&partnerID=40&md5=da90796a5341163431257bc2f9da8a59>
- Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., Aguirre-Guzmán, G., & Ascencio, F. (2005). Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to immunostimulants. *Ciencias marinas*, 31(4), 661-669. <https://doi.org/10.7773/cm.v31i4.32>
- Carpio, Y., Basabe, L., Acosta, J., Rodríguez, A., Mendoza, A., Lisperger, A., Zamorano, E., González, M., Rivas, M., Contreras, S., Haussmann, 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>

- Carpio, Y., García, C., Pons, T., Haussmann, D., Rodríguez-Ramos, T., Basabe, L., Acosta, J., & Estrada, M. P. (2013). Akirins in sea lice: First steps towards a deeper understanding. *Experimental Parasitology*, 135(2), 188-199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.018>
- Chavez-Mardones, J., & Gallardo-Escárate, C. (2014). Deltamethrin (AlphaMax™) reveals modulation of genes related to oxidative stress in the ectoparasite *Caligus rogercresseyi*: Implications on delousing drug effectiveness. *Aquaculture*, 433, 421-429. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.017>
- Chen C., W. Y., Li J., Wang X., Zeng Z., Xu J., Liu Y., Feng J., Chen H., He Y., & Xia R (2023). *TBtools-II: A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining*. In *Plant*
- Chen, P., Li, J., Gao, B., Liu, P., & Li, Q. W. J. (2011). cDNA cloning and characterization of peroxiredoxin gene from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture*, 322-323, 10-15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.009>
- Costello, M. J. (2009). The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of Fish Diseases*, 32(1), 115-118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.01011.x>
- Cunningham, E., McCarthy, E., Copley, L., Jackson, D., Johnson, D., Dalton, J. P., & Mulcahy, G. (2010). Characterisation of cathepsin B-like cysteine protease of *Lepeophtheirus salmonis*. *Aquaculture*, 310(1), 38-42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.013>
- Davie, E. W., Fujikawa, K., & Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, 30(43), 10363-10370. <https://doi.org/10.1021/bi00107a001>
- Degli Esposti, M., & Martinez Romero, E. (2017). The functional microbiome of arthropods. *PLOS ONE*, 12(5), e0176573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176573>
- Dinu, D., Marinescu, D., Munteanu, M. C., Staicu, A. C., Costache, M., & Dinischiotu, A. (2010). Modulatory Effects of Deltamethrin on Antioxidant Defense Mechanisms and Lipid Peroxidation in *Carassius auratus gibelio* Liver and Intestine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3), 757-764. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9401-0>
- Distéfano, A. M., López, G. A., Setzes, N., Marchetti, F., Cainzos, M., Cascallares, M., Zabaleta, E., & Pagnussat, G. C. (2021). Ferroptosis in plants: triggers, proposed mechanisms, and the role of iron in modulating cell death. *Journal of Experimental Botany*, 72(6), 2125-2135. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa425>
- 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.2009.02.001>
- Endale, H. T., Tesfaye, W., & Mengstie, T. A. (2023). ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis [Mini Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1226044>

- Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., & Obregón, D. (2020). Behind Taxonomic Variability: The Functional Redundancy in the Tick Microbiome. *Microorganisms*, 8(11).
- Fanjul-Moles, M. L., & Gonsebatt, M. E. (2011). Oxidative Stress and Antioxidant Systems in Crustacean Life Cycles. In *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* (pp. 208-223). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781444345988.ch15>
- Fast, M. D. (2014). Fish immune responses to parasitic copepod (namely sea lice) infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 43(2), 300-312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.019>
- Fast, M. D., Johnson, S. C., Eddy, T. D., Pinto, D., & Ross, N. W. (2007). Lepeophtheirus salmonis secretory/excretory products and their effects on Atlantic salmon immune gene regulation. *Parasite Immunology*, 29(4), 179-189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00932.x>
- 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. *The Journal of Parasitology*, 86(6), 1199-1205. <https://doi.org/10.2307/3285000>
- Froeschke, G., & von der Heyden, S. (2014). Chapter Four - A Review of Molecular Approaches for Investigating Patterns of Coevolution in Marine Host-Parasite Relationships. In D. Rollinson (Ed.), *Advances In Parasitology* (Vol. 84, pp. 209-252). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800099-1.00004-1>
- Gál, P., Dobó, J., Beinrohr, L., Pál, G., & Závodszky, P. (2013). Inhibition of the Serine Proteases of the Complement System. In J. D. Lambris, V. M. Holers, & D. Ricklin (Eds.), *Complement Therapeutics* (pp. 23-40). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4118-2_2
- 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>
- García, X. (2012). Cálígus: El regreso de la pesadilla. . *Aqua* 9-15.
- Gonçalves, A. T., Collipal-Matamal, R., Valenzuela-Muñoz, V., Núñez-Acuña, G., Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escárate, C. (2020). Nanopore sequencing of microbial communities reveals the potential role of sea lice as a reservoir for fish pathogens. *Scientific Reports*, 10(1), Article 2895. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59747-0>
- González, L., & Carvajal, J. (2003). Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220(1), 101-117. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00512-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00512-4)
- Gorman, M. J., & Paskewitz, S. M. (2001). Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem Mol Biol*, 31(3), 257-262. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(00\)00145-4](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(00)00145-4)
- Gui, Z. Z., Lee, K. S., Kim, B. Y., Choi, Y. S., Wei, Y. D., Choo, Y. M., Kang, P. D., Yoon, H. J., Kim, I., Je, Y. H., Seo, S. J., Lee, S. M., Guo, X., Sohn, H. D., & Jin, B. R. (2006). Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect

- metamorphosis. *BMC Developmental Biology*, 6(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-49>
- Hansen, A. K., & Moran, N. A. (2011). Aphid genome expression reveals host-symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2849-2854. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013465108>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). NF- κ B in immunobiology. *Cell Research*, 21(2), 223-244. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.13>
- Hou, F., Wang, X., Qian, Z., Liu, Q., Liu, Y., He, S., Mi, X., Bai, C., Sun, C., & Liu, X. (2013). Identification and functional studies of Akirin, a potential positive nuclear factor of NF- κ B signaling pathways in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(4), 703-714. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.005>
- Huerta Jiménez, M., Ortega Cerrilla, M. E., Cobos Peralta, M., G, J., Herrera Haro, A. D.-C., & Guinzberg Perrusquía, R. (2005). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia*, 30, 728-734. http://homolog-ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005001200002&nrm=iso
- Iwanaga, S., & Lee, B. (2005). Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 38, 128-150. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2005.38.2.128>
- Johnson, S., & Albright, L. (1992). Comparative susceptibility and histopathology of the response of naive Atlantic Chinook and coho salmon to experimental infection with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Diseases Of Aquatic Organisms*, 14(179-193). <https://doi.org/https://doi.org/10.3354/dao014179>
- Kan, Y., Cengiz, E. I., Ugurlu, P., & Yanar, M. (2012). The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(2), 170-179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.03.009>
- Kelley, G. O., Adkison, M. A., Leutenegger, C. M., & Hedrick, R. P. (2003). *Myxobolus cerebralis*: identification of a cathepsin Z-like protease gene (MyxCP-1) expressed during parasite development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Exp Parasitol*, 105(3-4), 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2003.12.004>
- Kim, L. K., Choi, U. Y., Cho, H. S., Lee, J. S., Lee, W.-b., Kim, J., Jeong, K., Shim, J., Kim-Ha, J., & Kim, Y.-J. (2007). Down-Regulation of NF- κ B Target Genes by the AP-1 and STAT Complex during the Innate Immune Response in *Drosophila*. *PLOS Biology*, 5(9), e238. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050238>
- Kleino, A., & Silverman, N. (2014). The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. *Developmental & Comparative Immunology*, 42(1), 25-35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.014>
- Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R. S., Abrams, J. M., & Lemaitre, B. (2000). The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist Gram-negative bacterial infection. *EMBO reports*, 1(4), 353-358-358. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd073>

- 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>
- Li, F., & Xiang, J. (2012). Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(4), 973-980. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.023>
- Lu, X., Wang, C., & Liu, B. (2015). The role of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. *Fish & Shellfish Immunology*, 42(1), 58-65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.027>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*, 224, 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Maldonado-Aguayo, W., Chávez-Mardones, J., Gonçalves, A. T., & Gallardo-Escárate, C. (2015). Cathepsin Gene Family Reveals Transcriptome Patterns Related to the Infective Stages of the Salmon Louse *Caligus rogercresseyi*. *PLOS ONE*, 10(4), e0123954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123954>
- Maldonado-Aguayo, W., & Gallardo-Escárate, C. (2014). Increasing transcriptome response of serpins during the ontogenetic stages in the salmon louse *Caligus rogercresseyi* (Copepoda: Caligidae). *Marine Genomics*, 15, 55-64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.margen.2014.04.006>
- Maldonado-Aguayo, W., Núñez-Acuña, G., Valenzuela-Muñoz, V., Chávez-Mardones, J., & Gallardo-Escárate, C. (2013). Molecular characterization of two kazal-type serine proteinase inhibitor genes in the surf clam *Mesodesma donacium* exposed to *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(6), 1448-1454. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.356>
- Manoharan, R. R., Prasad, A., Pospíšil, P., & Kzhyshkowska, J. (2024). ROS signaling in innate immunity via oxidative protein modifications. *Frontiers In Immunology*, 15. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1359600>
- Mateos-Hernández, L., Obregón, D., Wu-Chuang, A., Maye, J., Bornères, J., Versillé, N., De la Fuente, J., Díaz-Sánchez, S., Bermúdez-Humarán, L., Torres-Maravilla, E., Estrada-Peña, A., Hodžić, A., Šimo, L., & Cruz, A. C. (2021). Anti-Microbiota Vaccines Modulate the Tick Microbiome in a Taxon-Specific Manner. *Frontiers In Immunology*, 12. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.704621>
- 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>
- Méndez, T., Huizar, M., García, L., Villalobos, A., Aceves, M., & Islas, A. (2008). El modelo del peligro: la importancia de los receptores tipo TOLL en la inmunidad innata. *Investigación en Salud*, X(1), 1405-7980. <https://www.redalyc.org/pdf/142/14219995003.pdf>
- Merrifield, D. L., & Rodiles, A. (2015). 10 - The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In B. H. Beck & E. Peatman (Eds.), *Mucosal Health in*

- Aquaculture* (pp. 273-295). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00010-8>
- Moisander, P. H., Sexton, A. D., & Daley, M. C. (2015). Stable Associations Masked by Temporal Variability in the Marine Copepod Microbiome. *PLOS ONE*, *10*(9), e0138967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138967>
- Montory, J. A., Cumillaf, J. P., Cubillos, V. M., Paschke, K., Urbina, M. A., & Gebauer, P. (2018). Early development of the ectoparasite *Caligus rogercresseyi* under combined salinity and temperature gradients. *Aquaculture*, *486*, 68-74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.017>
- Mydlarz, L. D., Jones, L. E., & Harvell, C. D. (2006). Innate Immunity, Environmental Drivers, and Disease Ecology of Marine and Freshwater Invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *37*(Volume 37, 2006), 251-288. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110103>
- Núñez-Acuña, G., Valenzuela-Muñoz, V., & Gallardo-Escárate, C. (2014). High-throughput SNP discovery and transcriptome expression profiles from the salmon louse *Caligus rogercresseyi* (Copepoda: Caligidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, *10*, 9-21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbd.2014.01.003>
- Núñez-Acuña, G., Valenzuela-Muñoz, V., Carrera-Naipil, C., Sáez-Vera, C., Benavente, B. P., Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escárate, C. (2021). Trypsin Genes Are Regulated through the miRNA Bantam and Associated with Drug Sensitivity in the Sea Louse *Caligus rogercresseyi*. *Non-Coding RNA*, *7*(4), 76. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ncrna7040076>
- Oelckers, K., Vike, S., Duesund, H., Gonzalez, J., Wadsworth, S., & Nylund, A. (2014). *Caligus rogercresseyi* as a potential vector for transmission of Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus in Chile. *Aquaculture*, *420-421*, 126-132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.016>
- 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>
- Parvez, S., & Raisuddin, S. (2006). Copper modulates non-enzymatic antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to deltamethrin. *Chemosphere*, *62*(8), 1324-1332. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.025>
- 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>
- Que, X., & Reed, S. L. (2000). Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, *13*(2), 196-206. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.2.196>
- Reuben, A. (2003). Chopin's serpin. *Hepatology*, *37*(2). https://journals.lww.com/hep/fulltext/2003/02000/chopin_s_serpin.44.aspx
- Roth, M., Richards, R. H., & Sommerville, C. (1993). Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: a review.

- Journal of Fish Diseases*, 16(1), 1-26.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1993.tb00844.x>
- Rozas, M., & Asencio, G. (2006). Evaluación de la Situación Epidemiológica de la Caligiasis en Chile: Hacia una Estrategia de Control Efectiva. *Salmo Ciencia*, 43-59. https://www.researchgate.net/profile/Gladys-Asencio/publication/285708305_Evaluacion_de_la_Situacion_Epidemiologica_d_e_la_Caligiasis_en_Chile_Hacia_una_estrategia_de_control_efectiva/links/5aa94331458515178818a809/Evaluacion-de-la-Situacion-Epidemiologica-de-la-Caligiasis-en-Chile-Hacia-una-estrategia-de-control-efectiva.pdf
- Sáez-Vera, C., Núñez-Acuña, G., & Gallardo-Escárate, C. (2022). Sensitivity assessment to azamethiphos by time-to-response bioassay and biomarkers in the sea louse *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, 546, 737340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737340>
- Sajid, M., & McKerrow, J. H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120(1), 1-21. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00438-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00438-8)
- Sakanari, J. A., & McKerrow, J. H. (1990). Identification of the secreted neutral proteases from *Anisakis simplex*. *J Parasitol*, 76(5), 625-630.
- Salinas-Clarot, K., Gutiérrez, A. P., Núñez-Acuña, G., & Gallardo-Escárate, C. (2011). Molecular characterization and gene expression of ferritin in red abalone (*Haliotis rufescens*). *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 430-433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.009>
- Shen, B., & Manley, J. L. (2002). Pelle kinase is activated by autophosphorylation during Toll signaling in *Drosophila*. *Development*, 129(8), 1925-1933. <https://doi.org/10.1242/dev.129.8.1925>
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., & Ishikawa, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 407(6800), 81-86. <https://doi.org/10.1038/35024074>
- Shigetomi, H., Onogi, A., Kajiwara, H., Yoshida, S., Furukawa, N., Haruta, S., Tanase, Y., Kanayama, S., Noguchi, T., Yamada, Y., Oi, H., & Kobayashi, H. (2010). Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. *Inflammation Research*, 59(9), 679-687. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00011-010-0205-5>
- 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>
- Theil, E. C. (2003). Ferritin: At the Crossroads of Iron and Oxygen Metabolism. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1549S-1553S. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1549S>
- Tort, J., Brindley, P. J., Knox, D., Wolfe, K. H., & Dalton, J. P. (1999). Proteinases and Associated Genes of Parasitic Helminths. *Advances In Parasitology*, 161-266. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60243-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60243-2)

- Valanne, S., Wang, J.-H., & Rämetsä, M. (2011). The Drosophila Toll Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 186(2), 649-656. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>
- Valenzuela-Miranda, D., & Gallardo-Escárate, C. (2016). Caligus rogercresseyi serine proteases: Transcriptomic analysis in response to delousing drugs treatments. *Aquaculture*, 465, 65-77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.027>
- Valenzuela-Miranda, D., Gonçalves, A. T., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Liachko, I., Nelson, B., & Gallardo-Escarate, C. (2022). Author Correction: Proximity ligation strategy for the genomic reconstruction of microbial communities associated with the ectoparasite Caligus rogercresseyi. *Scientific Reports*, 12(1), 7530. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11969-0>
- Valenzuela-Munoz, V., Benavente, B. P., Casuso, A., Leal, Y., Valenzuela-Miranda, D., Núñez-Acuña, G., Saez-Vera, C., & Gallardo-Escarate, 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/10.1016/j.fsi.2021.08.005>
- Valenzuela-Muñoz, V., Benavente, B. P., Casuso, A., Leal, Y., & Gallardo-Escárate, C. (2021). Chimeric Protein IPath(R) with Chelating Activity Improves Atlantic Salmon's Immunity against Infectious Diseases. *VACCINES*, 9(4), Article 361. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040361>
- Valenzuela-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., & 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>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Velíšek, J., Jurčíková, J., Dobšíková, R., Svobodová, Z., Piačková, V., Máchová, J., & Novotný, L. (2007). Effects of deltamethrin on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(3), 297-301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.006>
- 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>
- Vera, F. B. (2015). *Diferencias en la modulación transcriptómica de Caligus rogercresseyi durante la infección en Salmo salar y Oncorhynchus kisutch* [Universidad de Concepción].

- Wehner, O. (2012). Caligidosis en Chile. *Aqua*, *161*, 16-19.
- Wu-Chuang, A., Mateos-Hernandez, L., Maitre, A., Rego, R. O. M., Šíma, R., Porcelli, S., Rakotobe, S., 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>
- Yang, Y., Hu, D., Wang, L., Liang, C., Hu, X., Wang, X., Chen, J., Xu, J., & Yu, X. (2009). Molecular cloning and characterization of a novel serpin gene of *Clonorchis sinensis*, highly expressed in the stage of metacercaria. *Parasitology Research*, *106*(1), 221-225. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1654-z>
- Zalcman, E., Burroughs, A., Meyer, A., Hillman, A., Sadler, R., Madin, B., Mackenzie, C., Ward, M. P., Stevenson, M., Happold, J., Hutchison, J., Gallardo Lagno, A. L., Cameron, A., & Cowled, B. (2021). Sea lice infestation of salmonids in Chile between 2011 and 2017: Use of regulatory data to describe characteristics and identify risk factors. *Aquaculture*, *530*, 735752. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735752>
- Ziegelbauer, K., Gantner, F., Lukacs, N. W., Berlin, A., Fuchikami, K., Niki, T., Sakai, K., Inbe, H., Takeshita, K., Ishimori, M., Komura, H., Murata, T., Lowinger, T., & Bacon, K. B. (2005). A selective novel low-molecular-weight inhibitor of I κ B kinase- β (IKK- β) prevents pulmonary inflammation and shows broad anti-inflammatory activity. *British Journal of Pharmacology*, *145*(2), 178-192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706176>
- Zientz, E., Dandekar, T., & Gross, R. (2004). Metabolic Interdependence of Obligate Intracellular Bacteria and Their Insect Hosts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *68*(4), 745-770. <https://doi.org/10.1128/mubr.68.4.745-770.2004>