



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IDENTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN CONSTITUTIVO *sdhA*,  
DE *Piscirickettsia salmonis* CEPA LF – 89 EN SALMONES DEL  
ATLÁNTICO (*Salmo salar*) DESAFIADOS Y EN CULTIVO CELULAR  
INFECTADO**

**Felipe Andrés Montecinos Rojas**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal.

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR MARTÍNEZ MONCADA  
Universidad de Chile

FONDECYT 1120608

SANTIAGO, CHILE  
2015



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IDENTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN CONSTITUTIVO *sdhA*,  
DE *Piscirickettsia salmonis* CEPA LF – 89 EN SALMONES DEL  
ATLÁNTICO (*Salmo salar*) DESAFIADOS Y EN CULTIVO CELULAR  
INFECTADO**

**Felipe Andrés Montecinos Rojas**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

Nota Final: .....

Nota:                      Firma:

Profesor Guía:	Víctor Martínez M.	.....	.....
Profesor Consejero:	Patricio Retamal M.	.....	.....
Profesora Consejera:	Consuelo Borie P.	.....	.....

FONDECYT 1120608

SANTIAGO, CHILE  
2015

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>7</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
1. Identificación de la secuencia candidata para el gen <i>sdhA</i> en <i>P.salmonis</i> .....	8
2. Diseño de partidores.....	8
3.1. Extracción del RNA en tejidos de peces desafiados .....	9
3.2. Extracción del RNA de cultivo celular infectado .....	9
4. Transcripción reversa .....	10
5. Eficiencia de PCR cuantitativo .....	10
5.1. Matriz de Partidores .....	10
5.2. Curva estándar.....	11
5.3. PCR en gradiente de temperatura.....	11
6. PCR cuantitativo .....	12
7. Análisis Estadístico. ....	12
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>13</b>
1. Identificación de la secuencia candidata para el gen <i>in silico</i> .....	13
2. Diseño de partidores.....	14
2.1. Secuencias de partidores.....	14
2.2. Curva uMelt .....	14
2.3. Prueba de partidores.....	15
3. Matriz de Partidores .....	16
3.1. Derivada de la curva de melting .....	17
3.2. PCR en gradiente de temperatura.....	18
4. Curva estándar.....	18
4.1. Eficiencia de reacción.....	19
5. Ensayo PCR cuantitativo de muestras desafiadas y cultivo celular infectado .....	19
6. Análisis Estadístico .....	21
6.1. Expresión Comparativa.....	21
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>23</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>26</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>27</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>30</b>
1. Anexo 1 .....	30

## **AGRADECIMIENTOS**

No puedo hacer entrega de esta memoria sin reconocer a todos quienes han dejado algo en mí, a quienes han sido un real sustento en tiempos difíciles, y a aquellos que me han sembrado la sed de crecer como profesional y persona. En primer lugar quisiera agradecer a mi familia, a mi padre Francisco, quien cultivó en mí desde pequeño no sólo la auto exigencia, sino que además el amor eterno que tengo por la música. A mi madre Ana Mónica, por ser aquella persona incondicional que pese a la adversidad jamás renunció a mí ni a mis sueños. A mi hermano Pablo, mi principal referente de quien quiero ser como profesional, culpable también de mi amor por esta hermosa Universidad. A mi nueva familia, Javiera, María Ignacia y Francisco, por ser el motor de amor que mueve mis días y mis ganas de llevar mis límites lo más lejos posible. A mis amigos y compañeros de carrera, Rodrigo, Christian, Gustavo y Fabrizio, con quienes en muchas ocasiones pasé de llantos a risas y con quienes espero jamás romper el vínculo que nos une. A mis amigos, cuasi hermanos, Nicolás y Maximiliano, son años que les debo de felicidad por retribuir, también espero nuestro lazo indisoluble nos vuelva a unir en alguna aventura futura. A mis amigos y compañeros de banda Cristian, Eric, Eduardo, Maximiliano y Cesar, por compartir el placer de la música y vivirla a concho. A mi tutor, al Doctor Víctor Martínez, por su sapiencia y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y aprender cosas que me llevaron a nuevos desafíos. Al equipo de INBIOGEN y a gente tan importante que colaboró con su conocimiento, tiempo y paciencia en la realización de esta memoria, a Moni, Gonzalo, Phillip, Daniela, Karen, Paola y Giannina, ellos saben cuan importantes fueron para la realización de esto. A mi querida compañera de laboratorio y amiga Yasna, por ser un apoyo constante para sacar a flote la memoria, aún en los momentos personales más difíciles que se presentaron. Finalmente quiero agradecer a mi *alma máter*, a la honorable y majestuosa Universidad de Chile, los mejores años de mi juventud se los debo por todas las lindas experiencias que en ella viví y jamás olvidaré, gracias por darme ese tacto con la realidad social-nacional que espero logre embeber el espíritu progresista que este país necesita en su juventud.

## RESUMEN

*P. salmonis* es la bacteria responsable de la enfermedad denominada “piscirickettsiosis”, una de las principales amenazas para la industria acuícola de salmones en Chile. La gran tasa de mortalidad que produce la enfermedad en los sistemas productivos justifica la necesidad de entender cómo el agente es capaz de diseminarse y de persistir en los peces. Es así que los métodos moleculares se presentan como una vía rápida de diagnóstico mediante el uso de sus diferentes herramientas. Mediante el uso de herramientas de alineamiento de secuencias genéticas, se logró identificar la secuencia codificante, nunca antes descrita, del gen constitutivo *sdhA*, ampliamente estudiado en diversos organismos y utilizado en estudios como marcador de viabilidad celular y bacteriana. El presente estudio, utilizando qPCR realizó la comparación de la expresión del gen *sdhA* en los tejidos hepático, renal, esplénico y cultivo celular infectado, mostrando una expresión significativamente mayor en riñón y cultivo celular infectado, y por otra parte, familias de peces *Salmo salar* con una susceptibilidad diferencial a la enfermedad.

Palabras clave: *P. salmonis*, *sdhA*, qPCR, viabilidad, gen constitutivo.

## ABSTRACT

*P. salmonis* is the bacteria responsible of the disease called “piscirickettsiosis”, one of the main threats for aquaculture industry of salmons in Chile. The great mortality rate that the disease produces on the productive systems justifies the necessity of the understanding on how the agent is capable to spread and to persist in fishes. According to that, the molecular methods show one rapid way on the diagnosis using its different tools. Through the use of alignment tools of genetic sequences, we were able to identify the never before described sequence of the *sdhA* constitutive gene, broadly studied on several organisms and used as a molecular marker of bacterial and cellular viability. The present study, using qPCR, made the comparison of the expression of the *sdhA* gene on the hepatic, renal and splenic tissues and infected cellular culture, showing a significant greater expression on kidney and infected cellular culture, and for the other hand, families of fish *Salmo salar* with different susceptibility to the disease.

Key words: *P. salmonis*, *sdhA*, qPCR, viability, constitutive gene.

## INTRODUCCIÓN

La salmonicultura en Chile figura como una industria acuícola importante en el país. Según cifras del Banco Central de Chile, sólo en el primer trimestre del 2012, se exportó más del doble de toneladas de filete de salmón fresco o refrigerado respecto al año 2011 en la misma fecha (7.393 vs 16.548 toneladas), lo que manifiesta la tendencia del crecimiento en la industria de los últimos años. La importancia de lo anterior radica en que Chile se encontraría exportando nuevamente cifras similares en cuanto a las toneladas exportadas antes del brote del virus ISA (anemia infecciosa del salmón) que estancó a esta industria (FAO, 2012). Desde el año 2011 Chile es el segundo país a nivel mundial luego de Noruega en producir Salmón del Atlántico cultivado. Es en este marco donde se hace necesario un control acabado de aquellas enfermedades que impactan considerablemente a la industria, y atentan a su estabilidad. Una de las enfermedades con gran repercusión en la cadena productiva de los salmonídeos es la causada por la bacteria *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*), responsable del cuadro patológico denominado septicemia rickettsial salmonídea o piscirickettsiosis.

Según Woywood y Leal (2007), la piscirickettsiosis es la principal enfermedad responsable de la alta mortalidad de peces en período de engorda en el país, alcanzando cifras cercanas al 56%. Por lo señalado, es importante conocer los diferentes aspectos en los cuales la bacteria se desarrolla, se contagia, y mantiene su viabilidad dentro del hospedero. Para ello es posible utilizar herramientas moleculares que nos permiten conocer la expresión de genes relacionados al ciclo normal de vida de la bacteria y a su permanencia en el hospedero. Sin embargo, el conocimiento genético que se tiene sobre la bacteria, sobre los genes implicados en la mantención de su vida dentro del hospedador, y de aquellos que permiten inducir daño, es aún bastante limitado.

Existen genes descritos que son altamente conservados entre diversos géneros bacterianos, ya que desempeñan roles fundamentales en las vías metabólicas, y en la mantención de la vida de las mismas, denominados genes constitutivos. Estos genes normalmente tienen una expresión constante en el tiempo y son los más adecuados a elegir en ensayos de cuantificación de transcritos y en mediciones que ayudan a establecer viabilidad bacteriana.

Para poder realizar un estudio de expresión génica en tiempo real que permita determinar la viabilidad de *P. salmonis*, se ha escogido un gen constitutivo que según la literatura es apropiado para este tipo de ensayos en diversas bacterias, el gen *sdhA*. El gen *sdhA* codifica una proteína integral de la membrana citoplasmática de *P. salmonis*, parte del operón succinato deshidrogenasa y responsable de la respiración celular, la subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa. Por ello, se evaluará la expresión del gen *sdhA* como marcador molecular de viabilidad bacteriana en diferentes tejidos de peces desafiados y cultivos infectados.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La bacteria *Piscirickettsia salmonis* es la primera bacteria Gram negativa intracelular patógena aislada desde los peces, con un gran impacto sobre la mortalidad de los salmonídeos (Fryer y Hedrick, 2003). *P. salmonis* fue descrita por primera vez a nivel mundial en Chile en el año 1989 por Bravo y Campos (citado por Fryer y Hedrick, 2003) en salmones Coho (*Oncorhynchus kisutch*), cultivados en jaulas cerca de Puerto Montt, décima región de Los Lagos, Chile.

*P. salmonis* es el agente etiológico de la piscirickettsiosis, una enfermedad de carácter endémico, causante de pérdidas económicas significativas en la producción de salmones (Rozas y Enríquez., 2014). Los primeros signos de la enfermedad comienzan entre las seis a 12 semanas luego de que los peces son transferidos desde el agua dulce al agua salada con una mortalidad acumulativa entre un 30 a un 90% (Fryer y Hedrick, 2003). La principal característica de la enfermedad, corresponde a una anemia generada por la replicación intracelular y difusión sistémica de la bacteria (Fryer y Hedrick, 2003). La enfermedad se hace patente una vez que los peces son ingresados al agua salada, lo cual podría indicar que el vector biológico de la misma es de origen marino (Fryer y Hedrick, 2003). Los peces más afectados por la patología presentan diversos signos clínicos evidentes a la observación, como una piel más oscura, comportamiento letárgico, un desplazamiento cerca de la superficie o en los extremos de las jaulas que los contienen, mientras que aquellos que fueron afectados de una manera menos severa pueden incluso no presentar evidencia de la enfermedad (Fryer y Hedrick, 2003). A nivel de la piel aparecen pequeñas lesiones en forma de parche, las cuales progresan hasta llegar a convertirse en ulceraciones, aparecen agallas pálidas producto de la anemia asociada (el hematocrito baja de un rango normal de 35% - 50% a 2% - 18%) (Fryer y Hedrick, 2003). Por otra parte a la necropsia es posible evidenciar órganos afectados, riñones inflamados y pálidos, esplenomegalia, ascitis, hemorragias en la grasa visceral y estómago e incluso en la vejiga natatoria y músculo. Los hígados de aquellos peces que presentan una afección más severa se encuentran pálidos y presentan nódulos de color opaco (Fryer y Hedrick, 2003).

Inicialmente la bacteria no podía crecer en medios de cultivo, sin embargo, logró ser aislada por primera vez en la línea celular CHSE-214 por Fryer *et al.*, en 1990 (citado por Fryer y Hedrick, 2003).

Por todas las características señaladas, se hace de suma importancia el poder conocer la viabilidad de la bacteria dentro de su hospedador mediante las herramientas actualmente disponibles. Los métodos clásicos para determinar viabilidad bacteriana consumen demasiado tiempo, es así como han surgido los métodos moleculares para resolver aquel problema (Keer y Birch, 2003). Los métodos moleculares ofrecen velocidad, sensibilidad y especificidad al momento de medir viabilidad bacteriana. Un método que se ajusta a la descripción es el PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativo en tiempo real (qPCR) (Keer y Birch, 2003), el cual puede cuantificar la cantidad de transcritos midiendo de esta forma expresión génica.

El qPCR se ha convertido en uno de los métodos más ampliamente usados para la medición de viabilidad bacteriana mediante la cuantificación transcripcional de genes, ya que logra una gran sensibilidad, es altamente secuencia específico, y tiene poco procesamiento post amplificación (Wong y Medrano, 2005). Para poder utilizar la técnica es necesario utilizar genes modelo que permitan tanto calibrar la reacción, como medir la expresión relativa de otros genes en estudio (Wong y Medrano, 2005). Aquellos genes que cumplen con roles fundamentales en la bacteria, tales como el metabolismo basal de la misma, la homeostasis y mantención de estructuras básicas reciben el nombre de genes constitutivos (Viraj *et al.*, 2008). Aquellos genes son ideales para medir viabilidad bacteriana, ya que su expresión en el tiempo es sostenida, constante y son un buen indicador de la vida de la bacteria en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* (Viraj *et al.*, 2008). Actualmente no existen genes constitutivos descritos para ensayos de expresión génica en *P. salmonis*, sin embargo, es posible encontrar aquellos genes altamente conservados debido a su importancia en roles transversales metabólicos a muchas bacterias.

Por otra parte, los métodos moleculares basados en el secuenciamiento del gen *16rRNA* posicionan a *P. salmonis* dentro del subgénero de las Gammaproteobacterias, el cual incluye a los géneros *Francisella* (Bohle *et al.*, 2009) *Coxiella* y *Legionella* (Fryer y

Hedrick, 2003). Lo anterior permite asociar bacterias desde una perspectiva genética, existiendo la posibilidad de encontrar los mismos genes constitutivos en *P. salmonis*.

Se han descrito genes que se relacionan a la viabilidad de las bacterias emparentadas a *P. salmonis*, de los cuales uno muestra ser un buen candidato por su utilidad en ensayos de expresión en tiempo real.

El gen constitutivo *sdhA* se encarga de codificar la subunidad A del complejo transmembrana de la membrana citoplasmática, succinato deshidrogenasa, correspondiente a una flavoproteína hidrofílica fundamental para la respiración celular al participar en la cadena transportadora de electrones (Madigan *et al*, 2004). Debido a sus características, ha sido utilizado en estudios de viabilidad de múltiples microorganismos. Según Duodu y Colquhoun (2010), *sdhA* es un buen marcador molecular de viabilidad, y además, para la discriminación de *Francisella spp.* en muestras ambientales. Por otra parte, la expresión del gen *sdhA* es útil como marcador para identificar aquellas bacterias que pese a haber perdido su capacidad patogénica y de ser cultivadas, aún son viables (Duodu y Colquhoun, 2010).

Según un estudio hecho el año 2012 por Florindo *et al*, que buscaba encontrar los mejores genes de referencia para estudios de expresión génica en *Streptococcus agalactiae*, *sdhA* es un gen que presenta una expresión estable en condiciones de temperaturas cercanas a los 40° C en la cual se encuentra la bacteria. En *Legionella pneumophila* la proteína *sdhA* está involucrada en la evasión de la fagocitosis al estabilizar la vacuola contenedora de *Legionella* (VCL) durante la replicación intracelular de la bacteria. Este nicho vacuolar permite a *L. pneumophila* protegerse de factores citosólicos del hospedador que degradan a la bacteria e inician respuestas inmunes, condiciones similares a las que está sometida *P. salmonis* dentro del hospedero (Creasey e Isberg, 2012). Cabe destacar que el gen *sdhA* es parte de un operón sumamente conservado, no solamente en las bacterias, sino que además se puede encontrar en múltiples células eucariontes con metabolismo aeróbico. En un estudio que buscaba al mejor gen candidato como gen referencial para ensayos de expresión en tiempo real en reticulocitos, *sdhA* resultó ser el segundo gen con menor variación en su expresión (Silver *et al*, 2006), mientras que en otro estudio donde se buscaba al mejor gen candidato para estudios de expresión en tiempo real en macrófagos de

cerdos, el gen *sdhA* resultó ser el gen más idóneo para los tres algoritmos utilizados; geNorm, Normfinder y BestKeeper (Cinar *et al*, 2012).

En el organismo *Corynebacterium glutamicum* se ha descrito que el operón succinato deshidrogenasa *sdhCAB* está sometido a control transcripcional mediante el regulador dependiente de AMP cíclico GlxR reprimiendo la expresión, mientras que los reguladores del metabolismo del acetato RamA y RamB están involucrados en la activación de la expresión del operón (Bussman *et al*, 2009).

Mediante la presente memoria se establecerá un precedente clave para el estudio y comprensión de *P. salmonis* y su comportamiento dentro del hospedero, utilizando para ello al gen constitutivo *sdhA* como marcador molecular de la viabilidad del patógeno, midiendo su expresión en tejidos de animales infectados y cultivos celulares infectados.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar mediante genómica comparativa la secuencia candidata codificante del gen *sdhA* en *P. salmonis* cepa LF-89 y determinar su expresión relativa en diferentes condiciones *in vivo* e *in vitro*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar el gen *sdhA* en *P. salmonis* utilizando “software” de alineamientos de secuencias genéticas.
2. Medir la expresión del gen *sdhA* en peces infectados experimentalmente (salmones del atlántico) y en cultivo celular infectado mediante el uso de PCR cuantitativo.
3. Comparar la expresión relativa del gen *sdhA* en riñón, bazo e hígado de salmón del atlántico (*Salmo salar*) y en cultivo celular infectado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Identificación de la secuencia candidata para el gen *sdhA* en *P.salmonis*

Se alinearon múltiples secuencias del gen *sdhA* pertenecientes a bacterias filogenéticamente relacionadas a *P. salmonis* para establecer regiones consenso. De esta manera, se escogieron las secuencias disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> de subespecies y diferentes cepas de las siguientes Gammaproteobacterias; *Francisella tularensis* (secuencias con número de acceso: CP003049, NC\_009257 y NC\_009749) *Francisella noatunensis* (secuencia JQ027670), *Legionella pneumophila* (secuencias NC\_006369, NC\_009494, NC\_006368, NC\_002942 y NC\_014125) y *Coxiella burnetii* (secuencias NC\_002971, CP000890, NC\_011528, NC\_009727, NC\_011527). Los alineamientos fueron realizados mediante el software CLC Genomics Workbench 3.6.5© utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Tool) disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>. Una vez establecida la región conservada entre las secuencias se realizó un segundo alineamiento entre la secuencia conservada y todos los contigs de *P.salmonis* (número acceso GenBank: AMFF000000000.1) para determinar cuál de ellos presenta la mayor identidad en el alineamiento y establecerlo como la región candidata del gen *sdhA*.

### 2. Diseño de partidores

Una vez establecida la región consenso y el alineamiento de ella con el contig de mayor score *in silico*, se diseñaron seis juegos de partidores utilizando el software en línea Gene Fisher® (Bielefeld University Bioinformatics Server) disponible en <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/submission.html>. Se seleccionaron aquellos con características para ser utilizados en ensayos de q-PCR según Fraga *et al* 2008, características como: un largo de 18 a 22 nucleótidos, una temperatura de “melting” entre 50 a 60° C y un porcentaje de Guanina – Citosina entre 40 y 60 %, diferencias entre forward y reverse no superiores a 5°C. Luego de generados los partidores fueron evaluados mediante el software en línea NetPrimer® (Premier Biosoft International), disponible en <http://www.premierbiosoft.com/jsp/marketing/freetoollogin.jsp?pid=3#> para verificar la cantidad de horquillas, dímeros y otras estructuras secundarias que podrían afectar de manera negativa la reacción esperada.

### 3. Muestras

#### 3.1. Extracción del RNA en tejidos de peces desafiados

Las muestras de tejido se obtuvieron luego de un desafío experimental realizado con *P. salmonis* en salmones del Atlántico (*Salmo salar*), siguiendo el protocolo definido por Dettleff *et al* (2015), y cumpliendo con la certificación del comité de bioética de FAVET. Cien peces fueron anestesiados con 0.1 mg mL<sup>-1</sup> 12 MS-222 y desafiados por inyección intra peritoneal utilizando una dosis infectiva del 50% de células de tejido en cultivo (TCID<sub>50</sub>) conocida, de 0,2x10<sup>4.8</sup> TCID<sub>50</sub> mL<sup>-1</sup> de *P. salmonis* (cepa LF-89), en un volumen de inoculación de 0.1mL. Al día 22 y 24 post inoculación se tomaron las muestras desde cuatro familias de peces con signología clínica, grupo denominado como susceptibles. Las muestras de riñón, hígado y bazo fueron removidas y suspendidas en 1 ml de RNAlater (Sigma®) para evitar la rápida degradación. La extracción de RNA total se realizó mediante el kit Gene Purification (Fermentas®) a partir de 10 mg de tejido de bazo y 30 mg de hígado y riñón, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las extracciones se almacenaron -80° C.

#### 3.2. Extracción del RNA de cultivo celular infectado

El RNA se aisló desde cultivos celulares CHSE-214 infectados con *P. salmonis*. Las células infectadas fueron incubadas a 16° C en medio esencial mínimo (MEM), suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se obtuvo una alícuota de 1ml del sobrenadante de las placas infectadas que presentaron efecto citopático, las que se centrifugaron a 2500 rpm por cinco minutos a 4°C. Los pellets obtenidos se utilizaron para la extracción del RNA bacteriano mediante el uso del kit TRIzol® Reagent (Ambion®) según instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue almacenado a -80°C. Estas muestras fueron utilizadas como control positivo en los ensayos de q-PCR.

En ambos casos se midió la integridad del RNA extraído de las muestras mediante un gel denaturante en formaldehído (Thermo Scientific®). La concentración del RNA en cada muestra se midió con el fluorómetro Qubit Molecular Probes (Invitrogen®).

#### **4. Transcripción reversa**

Previo a la transcripción reversa, las muestras fueron tratadas con el kit *DNase I, RNase-free* (Thermo Scientific®) siguiendo las instrucciones del fabricante para el protocolo de remoción de DNA genómico a las muestras de RNA.

Se realizó transcripción reversa para obtener DNA complementario (DNAc) con el objetivo de realizar la reacción q-PCR. Para ello se utilizó el kit *SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®) usando hexámeros al azar con el siguiente protocolo: 200 ng de RNA total y hexámeros al azar (50 ng/ul) mezclados en un volumen total de 10 uL. La mezcla se calentó a 65° C por 5 min y luego se refrigeró en hielo. Las muestras fueron ajustadas con reactivos para obtener un volumen final de 20 uL conteniendo lo siguiente: 10x RT buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M DTT, 40 U RNaseOUT y 50 U SuperScript II transcriptasa reversa. La reacción se incubó a 42° C por 50 min, deteniendo la reacción por incubación a 70° C por 15 min. Se centrifugó brevemente y agregó 2 U de RNasa H, inmediatamente se incubó por 20 min a 37 °C. Luego de llevada a cabo la transcripción reversa, el ADNc fue almacenado a una temperatura de -20° C debido a la mayor estabilidad de este producto en relación al ARN. Una vez realizado el procedimiento, la concentración real del ADNc se midió mediante el fluorómetro *Qubit Molecular Probes* (Invitrogen®) utilizando el protocolo del fabricante.

#### **5. Eficiencia de PCR cuantitativo**

##### **5.1. Matriz de Partidores**

Antes de realizar el ensayo de PCR cuantitativo se estableció la concentración de partidores óptima para obtener el producto esperado sin amplificación inespecífica mediante una matriz de partidores. En ella se utilizó el DNAc proveniente de cultivo celular infectado con *P. salmonis* como templado en cada reacción.

Los partidores se reconstituyeron a 100 uM y posteriormente fueron diluídos en alícuotas de 10 uM para su uso. Los partidores, forward y reverse fueron evaluados en las concentraciones: 0.05 uM, 0.1 uM, 0.15 uM y 0.2 uM, (según las recomendaciones del

fabricante) en las dieciséis posibles combinaciones correspondientes. Cada una de las reacciones se realizó en duplicado para reducir el error técnico de los resultados.

El q-PCR se realizó por el sistema de dos pasos en el termociclador Eco<sup>TM</sup> Real-Time PCR System de Illumina<sup>®</sup>. Las condiciones de tiempo y temperatura durante cada ciclo del ensayo, se ajustaron a las recomendadas por el fabricante del kit utilizado, KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR Master Mix (2X) (Kapa Biosystems) siendo éstas: 3 minutos a 95 °C para la activación de la polimerasa, 3 segundos a 95 °C para la denaturación y 30 segundos a 60 °C para alineación y extensión. Las cantidades de solución de cada reacción fueron de 10 ul, según las cantidades indicadas por el fabricante. Se incluyeron tres controles negativos, que contienen todos los componentes del kit a excepción de los partidores y sustituyendo el volumen correspondiente con agua estéril.

La concentración óptima de partidores se definió como aquella combinación que obtuvo el menor valor de Ct (*threshold cycle*), menor desviación estándar entre repeticiones y un producto único concordante con el Tm esperado del amplicón.

## **5.2. Curva estándar**

Se determinó la eficiencia de amplificación de los partidores mediante una curva estándar. Utilizando como templado el DNA complementario de *P. salmonis* en cultivo celular, y el juego de partidores diseñado a la concentración óptima de reacción (punto 5.1), se realizó una curva estándar a ocho puntos con un factor de dilución de 2.5 de una concentración inicial de templado de 1ng por pocillo. Cada punto del ensayo fue hecho con tres réplicas técnicas para reducir el error de ensayo.

## **5.3. PCR en gradiente de temperatura**

Se realizó un PCR en gradiente de temperatura con la concentración de partidores determinada en el punto 3 para verificar la temperatura óptima de reacción, y de templado, DNAC de cultivo celular infectado. Utilizando el equipo MAXYGENE<sup>TM</sup> (Axygen<sup>®</sup>) se realizó un ensayo con el kit comercial *Taq DNA Polymerase, recombinant* (Invitrogen<sup>®</sup>) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando un gradiente de 1,5°C desde 57,5°C a 61,5°C. Utilizando un total de 6 uL, correspondientes a 5 uL de volumen de la reacción

(muestras amplificadas) más 1uL de buffer de carga 6X (Fermentas ®), se cargaron los pocillos en un gel de agarosa al 2%. Se utilizó un estándar de 50 pares de bases (4uL de GeneRuler 50bp DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific ®) para medir el producto y un blanco sin templado.

## 6. PCR cuantitativo

Se realizó un PCR cuantitativo utilizando las muestras tisulares correspondientes a las cuatro familias, y cultivo celular infectado. El ensayo se llevó a cabo mediante el mismo protocolo utilizado en el punto 5.1. Todas las muestras se corrieron con los partidores de los genes *sdhA* y *23s* en sus concentraciones óptimas de reacción. Los partidores utilizados de la subunidad de RNA ribosomal *23s* correspondieron a los descritos por Dettleff *et al* 2015, y su expresión, se utilizó como referencia para calibrar la reacción de qPCR, ya que la expresión del gen *23s* es constante dada su función metabólica y permite realizar una estimación de la viabilidad del microorganismo en estudio y/o la carga bacteriana de *P. salmonis* en cada tejido (Madigan *et al*, 2004). Cabe destacar que no existen otros genes de referencia descritos para ensayos de qPCR en *P. salmonis*.

Se utilizaron además controles negativos correspondientes al templado con agua destilada más mix de reacción pero sin los partidores, y controles positivos con cDNA de cultivo celular infectado. Cada reacción se realizó con dos réplicas técnicas para reducir el error del ensayo.

## 7. Análisis Estadístico.

Inicialmente los datos correspondientes a la expresión del gen *sdhA* serían analizados y normalizados con la expresión obtenida del gen *23s* mediante el método de Pfaffl (Pfaffl 2001), sin embargo, la inestabilidad en la expresión del gen *23s*, y la escasa información de otros genes constitutivos descritos para *P. salmonis* en estudios de expresión génica llevó a utilizar el método descrito por Livak y Schmittgen 2001, utilizando para ello solamente  $\Delta C_T$ , correspondiente a la diferencia del ciclo umbral del gen objetivo *sdhA* y el gen de referencia *23s* ( $C_{TX} - C_{TR}$ ).

Una vez normalizados, los resultados fueron enfrentados a un análisis de Shapiro-Wilks para verificar que los mismos provenían de una población con distribución normal, aplicando análisis de datos paramétricos. Finalmente, los tratamientos se analizaron en conjunto mediante ANOVA de una vía para detectar si existió expresión significativamente mayor en alguno de los tratamientos (tratamientos: riñón, hígado, bazo y cultivo celular infectado), utilizando una confianza del 95% ( $P < 0,05$ ). Para detectar en que tratamientos en específico el gen se expresó de manera significativa, se realizó un análisis *post hoc t-student* entre los distintos grupos. Todos los análisis se realizaron con el software Info Stat/E 2014.

## RESULTADOS

### 1. Identificación de la secuencia candidata para el gen *in silico*.

Utilizando el software CLC Genomics Workbench 3.6.5©, se obtuvo una zona de consenso entre las secuencias de 198 pares de bases (pb). Al realizar el BLAST de la secuencia consenso con los contigs disponibles de *P. salmonis* cepa LF-89 se logró un alineamiento con una identidad del 100%, un alto score con respecto a los demás alineamientos (score = 27) y un E value de  $2,88E-7$  (un menor E value indica que el alineamiento no fue producto del azar) el cual se encontraba ubicado en el contig 199 de *P. salmonis* LF-89.

Luego de realizado el alineamiento, se realizó uno nuevo, tomando el cuadro de lectura abierto completo en el cual se había encontrado el match, el que comprendía una secuencia de 1.767 pb (entre las bases 11.050 a 12.816 del contig 199) con todas las demás secuencias disponibles en GenBank. Todos los alineamientos coincidieron con la subunidad A de la enzima succinato deshidrogenasa en múltiples microorganismos. El cuadro de lectura abierto que codifica el gen *sdhA* se adjunta en el anexo 1.

## 2. Diseño de partidores

Se diseñaron 2 juegos de partidores, los que se pueden apreciar en la Tabla 1. Luego de diseñados ambos juegos de partidores se determinó cuál de ellos presentaba una amplificación específica y generaba el producto esperado.

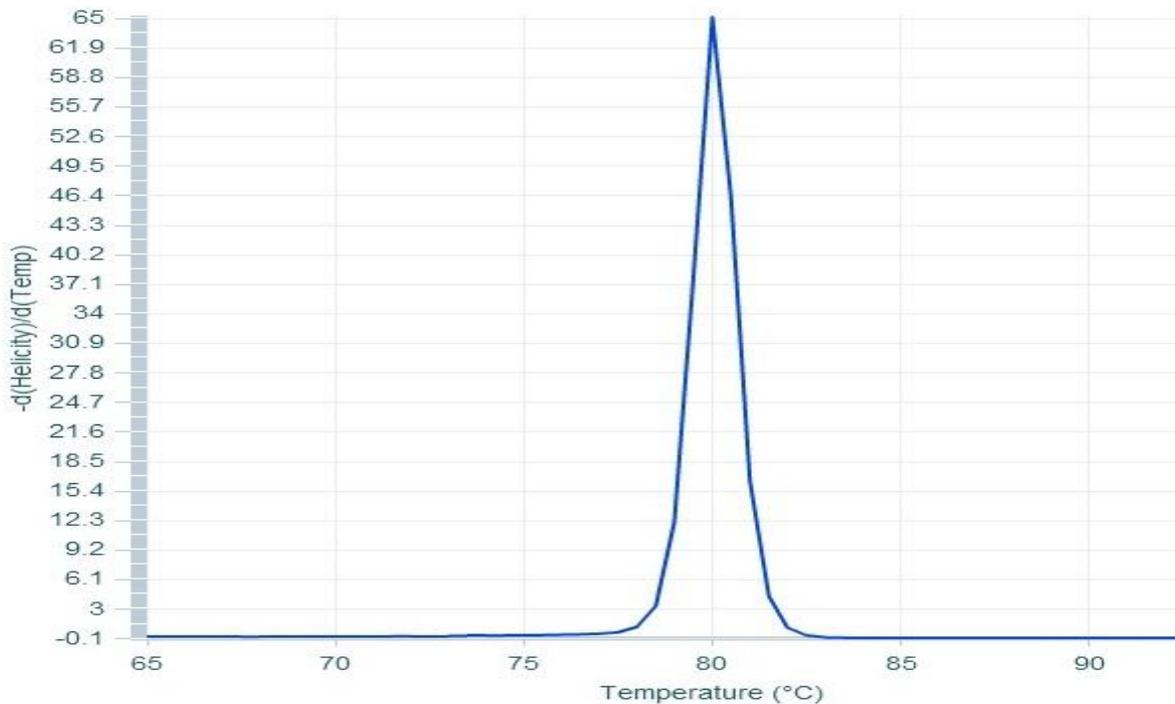
### 2.1. Secuencias de partidores

Gen	Partidor		Secuencia (5´-3´)
<i>sdhA</i>	sdha199-1	Forward:	TGTGCGTGTGTTTCTGTG
		Reverse:	TTTACCTGATGCCCCGACC
	sdha199-2	Forward:	TTGCTCTTGACGGAATACACCA
		Reverse:	ACGGGCGAGAGTTTTTCAGG

**Tabla 1.** Partidores diseñados para los ensayos de PCR cuantitativo en la secuencia del marco de lectura abierto del contig 199 (número de acceso GenBank: AMFF01000000).

### 2.2. Curva uMelt

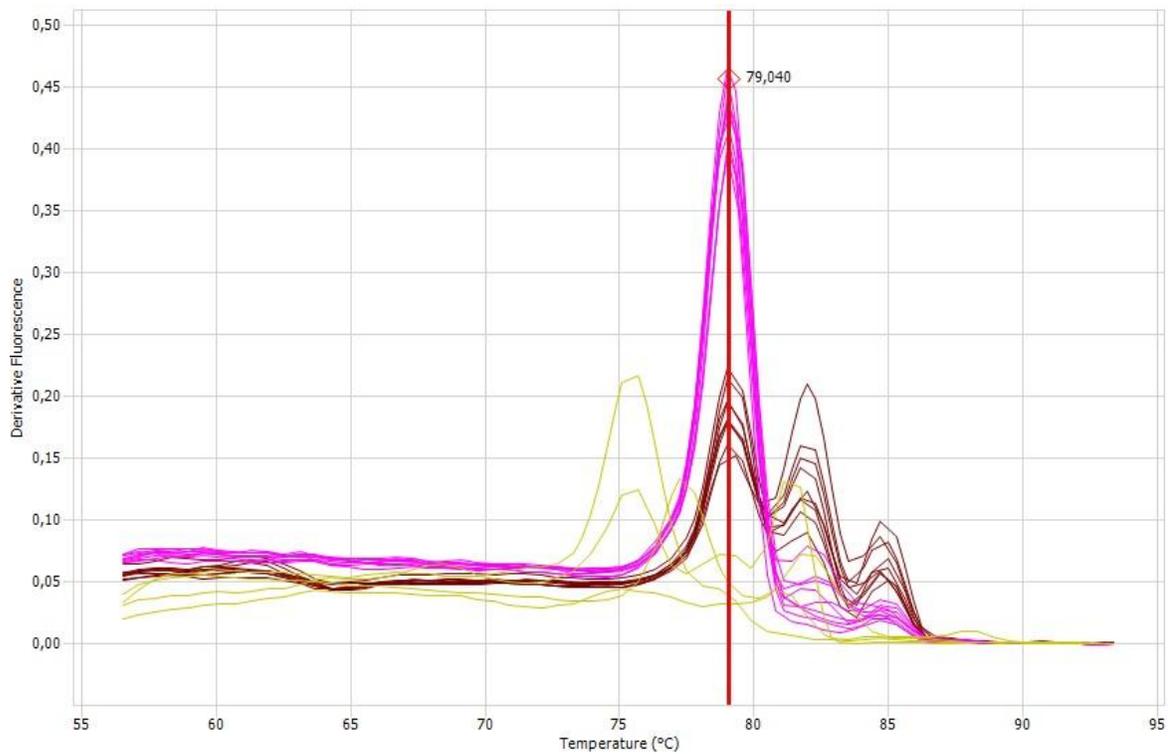
Se tomó el amplicón (producto esperado de la amplificación de los partidores) y se ingresó al software computacional uMelt (disponible en: <https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html>) para predecir cuál sería la temperatura de fusión (temperatura de melting) específica del mismo (Figura 1).



**Figura 1.** Temperatura de melting específica simulada para el producto esperado por el software uMelt. El peak se ubica en una temperatura cercana a los 80°C.

### 2.3. Prueba de partidores

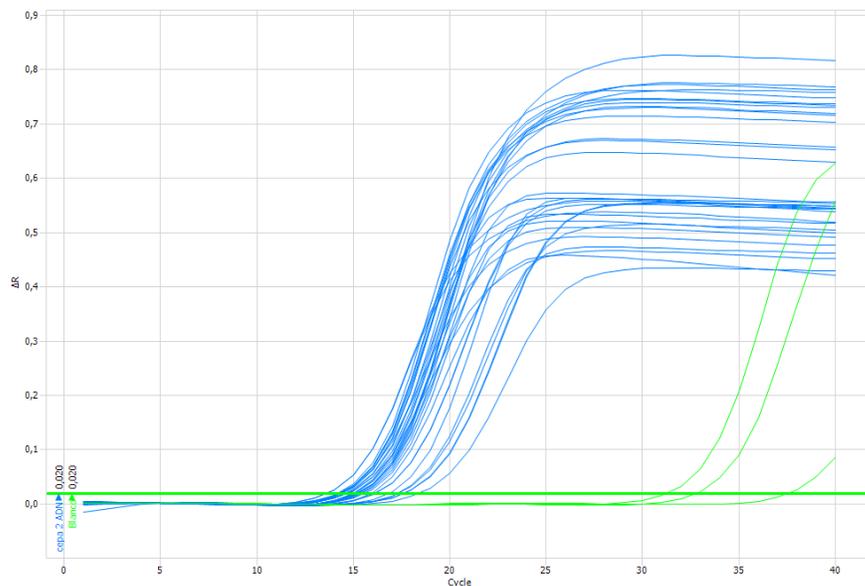
Los partidores se probaron en un templado de riñón de salmón con alta carga de *P. salmonis* en concentraciones óptimas según el kit KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) (Kapa Biosystems®). La prueba evidenció que el partidior sdha199-2 presentó un mejor comportamiento al demostrar un solo peak en su amplificación del producto esperado (Figura 2). En ella se advierte un peak único a los 79°C, temperatura predicha por el software uMelt, en las distintas amplificaciones realizadas con el partidior sdha 199-2 (línea de color lila). Por otra parte, la amplificación del partidior sdha 199-1 (línea color rojo) posee muchos picos, reflejando la posible formación de estructuras secundarias indeseables que interfieren en la reacción (formación de dímeros) que no alcanzan una altura deseable ni definida. La línea amarilla corresponde al control negativo, que si bien demuestra cierta contaminación, no comparte los peaks generados por los partidores (Figura 2).



**Figura 2.** Curva de amplificación derivada. La línea lila corresponde a la amplificación generada por el partidor sdha 199-2, la roja corresponde a la amplificación generada por el partidor sdha 199-1 y la amarilla al blanco sin partidores.

### 3. Matriz de Partidores

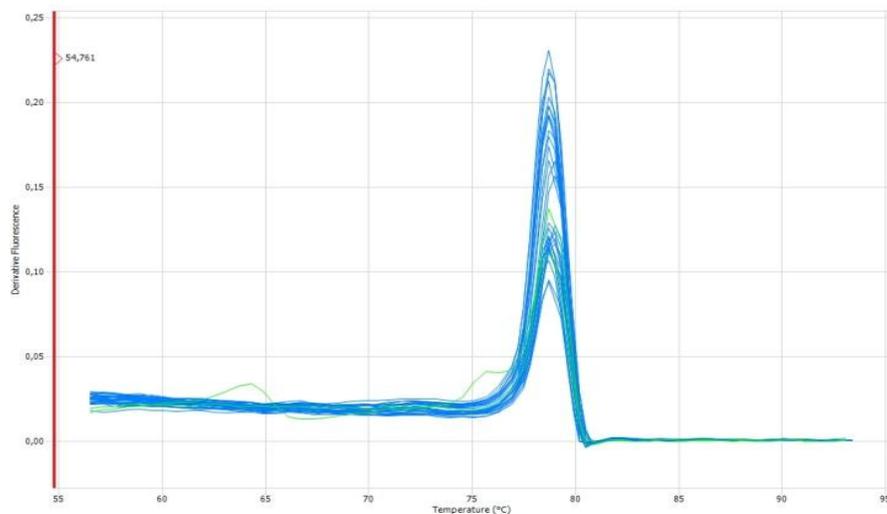
El templado utilizado correspondió a ADN de cultivo celular infectado con *P. salmonis* a una concentración total de 0,5ng por reacción. La concentración de partidores que mostró el Ct menor, el peak más alto y un producto único fue la combinación de 0,2uM de Forward y 0,2uM de Reverse (Figuras 3 y 4).



**Figura 3.** Curvas de amplificación correspondientes a las distintas combinaciones de concentraciones de partidores (azul). En verde, los controles negativos.

### 3.1. Derivada de la curva de melting

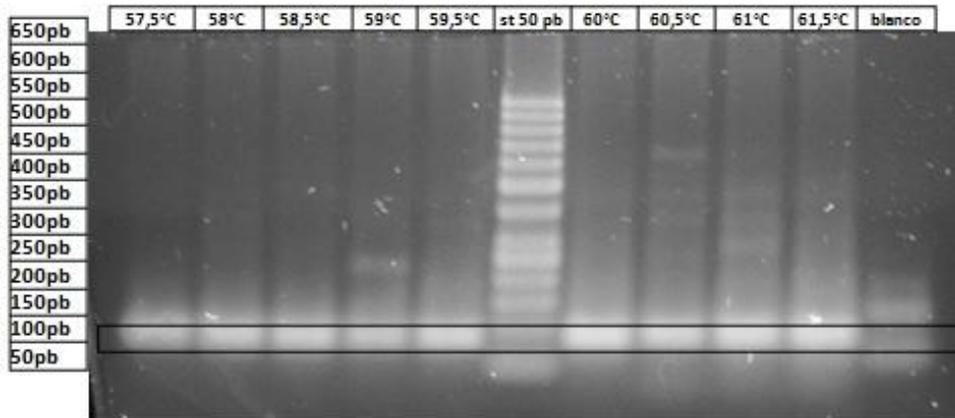
La derivada de la curva de melting refleja el peak a la temperatura del producto esperado (78,6-79°C) (Figura 4). En éste caso existió contaminación del blanco con templado, sin embargo, el mismo en su curva de amplificación logró su fase logarítmica en un ciclo muy tardío con respecto a las amplificaciones generadas por el partidor sdha 199-2 (Figura 3).



**Figura 4.** Derivada de curva de melting. Se refleja un único pico concordante con el producto esperado para las distintas concentraciones de partidores utilizados.

### 3.2. PCR en gradiente de temperatura

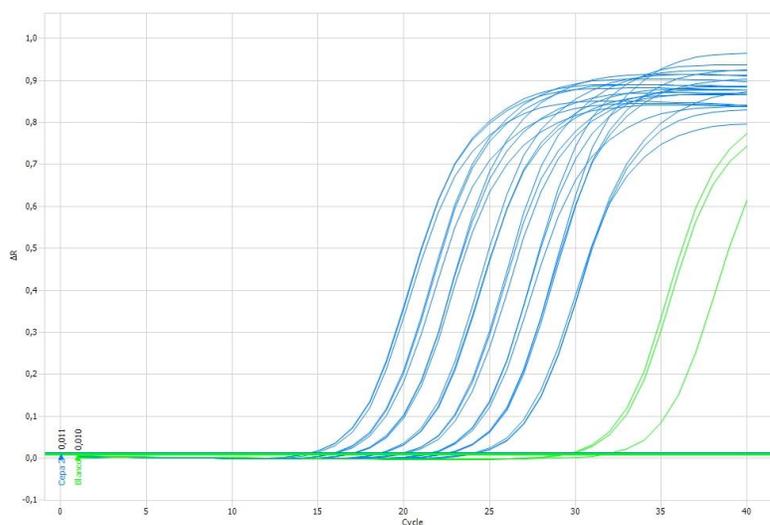
Se detectó una única banda intensa ubicada entre las 50 y 100pb confirmando entonces la amplificación específica del producto esperado de 83pb. La amplificación que generó menos productos secundarios fue la realizada a los 60°C, temperatura escogida para la reacción de qPCR. No existió amplificación específica en el blanco sin templado (Figura 5).



**Figura 5.** Producto generado por el partidor sdha 199-2 en gel de agarosa al 2%. Se observa una banda intensa ubicada entre las 50 y 100pb (estándar de 50pb).

### 4. Curva estándar

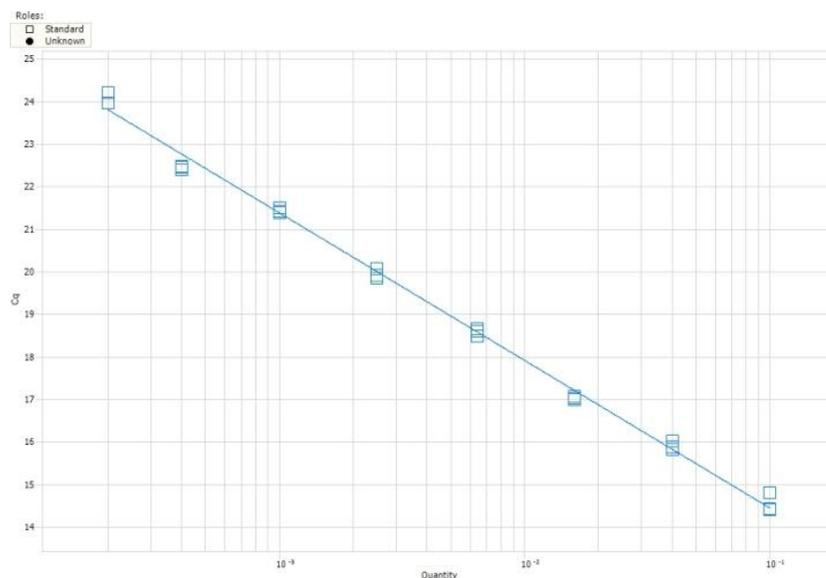
Los Ct obtenidos abarcaron un rango entre el ciclo 15 y el 24 (Promedios Ct: 14,56; 15,92; 17,04; 18,60; 19,95; 21,44; 22,45; 24,13) (Figura 6).



**Figura 6.** Curva estándar con factor de dilución 2,5. Refleja el aumento gradual de los Ct.

#### 4.1. Eficiencia de reacción

La curva estándar obtuvo una pendiente de -3,446, un intercepto en Y de 10,99 una eficiencia de 94,32% y un  $R^2$  de 0,996. La pendiente de la misma refleja una buena eficiencia de reacción (Figura 7).



**Figura 7.** Curva estándar a ocho puntos con un factor de dilución de 2,5. Su pendiente negativa muestra una buena eficiencia de reacción.

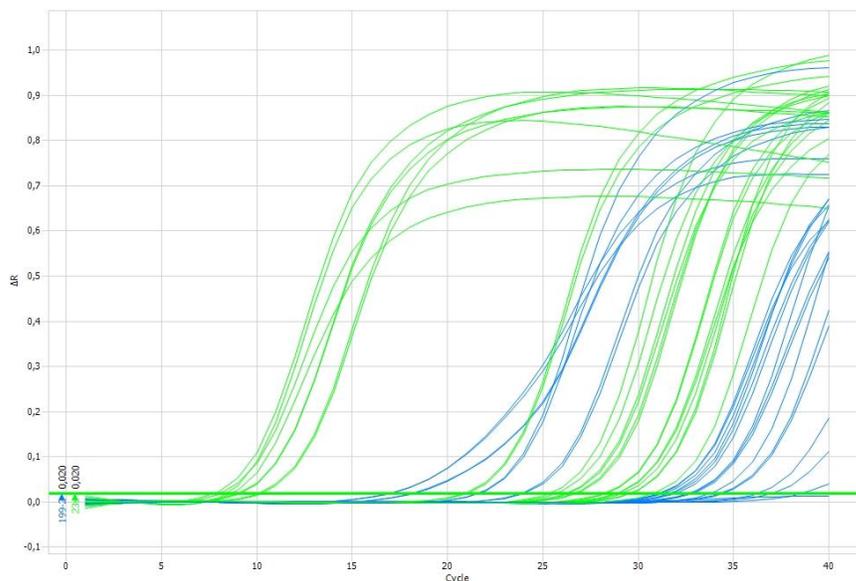
#### 5. Ensayo PCR cuantitativo de muestras desafiadas y cultivo celular infectado

El ensayo mostró expresión del gen *sdhA* en todas las muestras de tejido y cultivo celular infectado, sin embargo, los Ct de cada muestra presentaron gran variación. Las amplificaciones más tempranas en los tejidos correspondieron a las muestras de riñón 56 de la familia 61, riñón 47 de la familia 61, y riñón 32 de la familia 60. En el caso de cultivo celular infectado, ambas muestras presentaron un umbral de ciclo temprano respecto a los tejidos. Umbrales de ciclo entre 15 a 25 muestran una amplificación temprana en el caso del gen *sdhA*, mientras que en el caso del gen *23s* el rango va desde 7 a 10. Ambos rangos se determinaron según el ciclo de amplificación del control positivo (21,6 en el caso del gen *sdhA* y 8,36 en el caso de *23s*) (Tabla 2).

Desafíos	Muestra	<i>sdhA</i> Cq Medio	<i>23s</i> Cq Medio
	Riñón F61 - 56	17,04	8,06
	Riñón F61 - 47	18,21	9,07
	Riñón F32 - 60	23,96	10,13
	Riñón F32 - 61	36,17	20,94
	Bazo F8 - 7	32,44	25,49
	Bazo F8 - 6	31,92	26,26
	Bazo F36 - 5	32,8	26,66
	BazoF36 - 4	31,74	26,4
	Hígado F8 - 3	31,57	28,91
	Hígado F8 - 4	36,66	28,24
	Hígado F36 - 1	33,45	29,34
	Hígado F36 - 4	32,42	28,39
Cultivo celular infectado	Cultivo 1	15,01	7,29
	Cultivo 2	20,5	7,2

**Tabla 2.** Resultados del PCR cuantitativo.

Las curvas de amplificación del gen *sdhA* se presentaron con una gran similitud respecto al gen utilizado para normalizar la reacción, el gen *23s* (Figura 8).

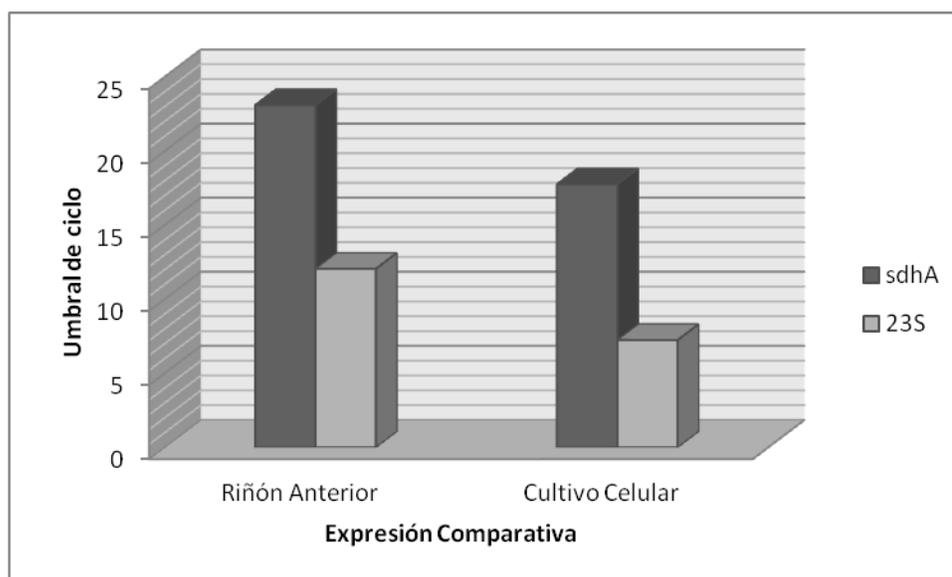


**Figura 8.** Curvas de amplificación del gen *sdhA* y *23s*. En verde se observan las curvas del gen *23s* y en azul las de *sdhA*. Se evidencia una gran similitud en el comportamiento de la amplificación para ambos genes.

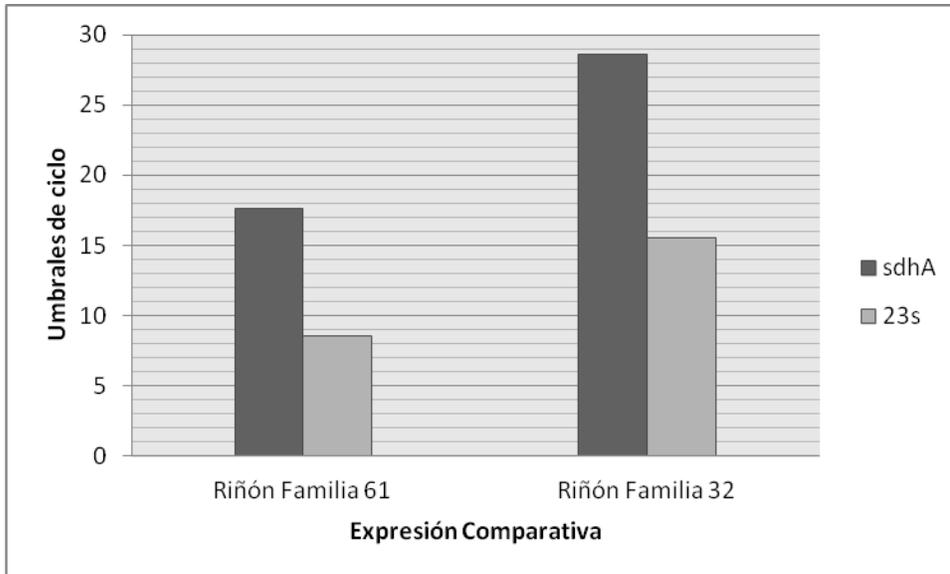
## 6. Análisis Estadístico

En el caso de los tratamientos hígado y bazo, los datos se analizaron utilizando el  $\Delta Ct$  promedio (a menor  $\Delta Ct$  mayor expresión del gen en estudio respecto al control), donde;  $\Delta Ct = Ct_{sdhA} - Ct_{23s}$  debido a que el comportamiento del gen  $23s$  para aquellas muestras fue constante y la cantidad de bacteria debiese de ser similar en ambos tratamientos.

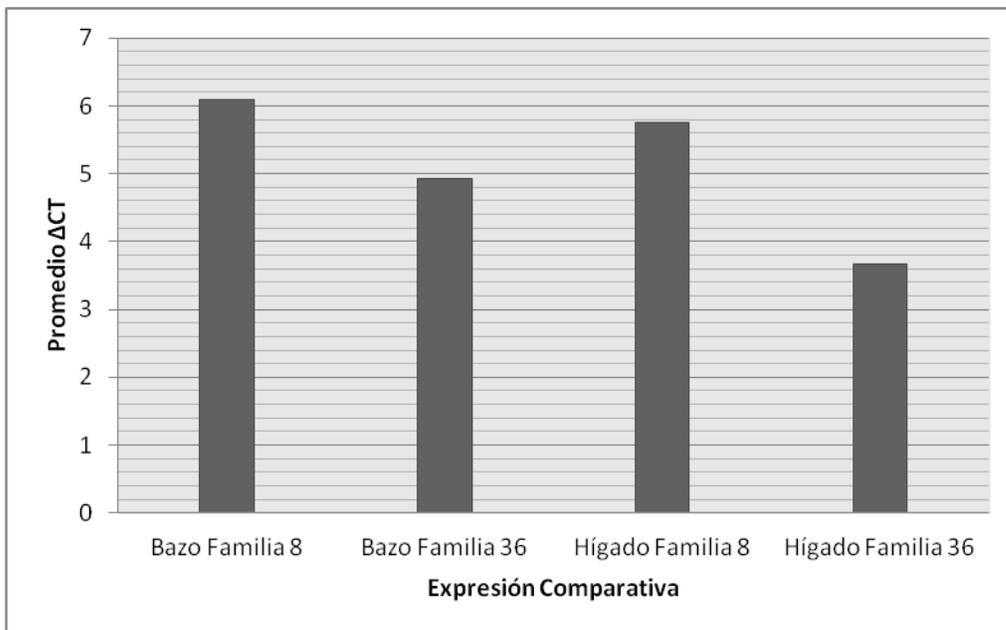
### 6.1. Expresión Comparativa



**Figura 9.** Expresión comparativa de los umbrales de ciclo en bruto para los genes *sdhA* y *23s* en riñón anterior y cultivo celular infectado. No existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos para los genes *sdhA* y *23s* ( $P < 0,05$ ).



**Figura 10.** Expresión comparativa del gen *sdhA* y *23s* en Riñón. Se observan umbrales de ciclo estadísticamente más tempranos de los genes *sdhA* y *23s* en la familia 61 respecto a la 32 ( $P < 0,05$ ).



**Figura 11.** Expresión comparativa de las familias y tratamientos según la fórmula  $\Delta Ct$ , donde  $\Delta Ct = Ct_{sdhA} - Ct_{23s}$  (utilizando el promedio de los umbrales de ciclo). No existen diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos bazo e hígado, ni entre las familias 8 y 36 para los tratamientos evaluados ( $P < 0,05$ )

## DISCUSIÓN

El presente estudio, identificó en primera instancia una zona del genoma aún no ensamblado de *P. salmonis* cepa LF-89 candidata a codificar el gen *sdhA* y su expresión en condiciones *in vivo* de susceptibilidad a piscirickettsiosis en salmónidos *Salmo salar* experimentalmente infectados con la bacteria y condiciones *in vitro* en cultivo celular infectado. Cabe destacar que el gen *sdhA* ha mostrado en múltiples estudios ser un marcador molecular confiable para medir la viabilidad bacteriana, así como también ser usado como gen de referencia en estudios de expresión génica de múltiples bacterias y células eucariontes (Silver *et al*, 2006; Cinar *et al*, 2012; Florindo *et al*, 2012; Stenico *et al*, 2014), no obstante, los resultados obtenidos de este estudio no permiten dilucidar de manera correcta su comportamiento en *P. salmonis* LF-89, debido a la poca estabilidad en la expresión del gen *23s* que calibra la reacción de qPCR. Según Radonic *et al* (2004), un buen gen de referencia no debe modificar su expresión según las condiciones experimentales. Lo anteriormente señalado evidencia la falta de estudios previos relacionados con la determinación de viabilidad de la bacteria *P. salmonis*, en el hospedador mediante qPCR.

El alineamiento de la secuencia consenso con múltiples secuencias del gen específico de bacterias filogenéticamente asociadas a *P. salmonis*, la amplificación del producto esperado por los partidores diseñados (Figura 2.), la visualización del producto mismo en el gel de agarosa (Figura 5.) y el comportamiento esperado de la amplificación del gen en los ensayos de qPCR realizados ante diferentes condiciones *in vivo* e *in vitro* (Figura 8), permiten dar fundamento a la correcta identificación y amplificación del gen.

Realizando el análisis estadístico ANOVA en los promedios de los umbrales de ciclo de las muestras se pudo verificar que existió diferencia significativa en la expresión del gen en los tratamientos; bazo (familias 8 y 36), hígado (familias 8 y 36), riñón (familias 61 y 32) y cultivo celular infectado. El resultado anteriormente señalado ratifica la heterogénea viabilidad que presenta la bacteria dentro del hospedero y en el ambiente (McCarthy, 2005). Al comparar los tratamientos, se pudo verificar que la expresión del gen *sdhA* fue estadísticamente mayor en riñón y cultivo celular respecto a bazo e hígado, presentando ambos además (riñón y cultivo celular), umbrales de ciclo brutos considerablemente más

tempranos. Lo anterior puede ser explicado debido a diversos factores como; la posibilidad de una carga bacteriana mayor en riñón respecto al hígado y el bazo, la persistencia comprobada del microorganismo dentro de los macrófagos (Rojas *et al*, 2009; McCarthy *et al*, 2008), capacidad de activar en ellos la apoptosis para persistir en el hospedador (Rojas *et al*, 2010) y la capacidad de evadir al sistema inmune en macrófagos alojados en riñón (McCarthy *et al*, 2008) mediante mecanismos complejos de regulación transcriptómica, descritos por Rise *et al*, (2004) y Tacchi *et al*, (2011) tanto en macrófagos como en tejidos del hospedero. Rise *et al*, (2004) mediante el uso de microarreglos verificaron la regulación positiva de 71 transcritos en macrófagos infectados y la regulación negativa de 31 transcritos. Según Rise *et al* (2004), los mecanismos de sobrevivencia en macrófagos están relacionados con la activación de 10 genes antioxidantes, incluyendo la Glutación S-Transferasa, Glutación reductasa, Glutación peroxidasa y citocromo b558 subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , sin embargo esta activación no ocurre en riñón hematopoyético, en el cual existe una regulación negativa de 39 transcritos relacionados con la respuesta inmune adaptativa, hecho que explicaría la mayor viabilidad, o amplificación temprana de los transcritos de las bacterias encontradas en el riñón anterior respecto a aquellos de hígado y bazo. Por otra parte, en un estudio realizado por Tacchi *et al* (2011), el cual trataba de dilucidar la regulación transcriptómica de *P. salmonis* en los tejidos de riñón, hígado y músculo esquelético, se comprobó que en los tres tejidos existió una modificación en la regulación de la expresión de transcritos relacionados con el sistema inmune, siendo el riñón el órgano que sufre la modificación de una mayor cantidad de transcritos relacionados a la respuesta inmune innata, regulándolos de manera negativa.

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos riñón y cultivo celular (Figura 9.), lo que nos permite inferir que es posible que las bacterias alojadas en riñón anterior sean igual de viables que aquellas en cultivo celular infectado y/o que se encuentren en una cantidad considerable respecto a los demás órganos evaluados. No existió una diferencia estadísticamente significativa en la expresión del gen *sdhA* entre los tratamientos bazo e hígado (Figura 11.).

El análisis de la susceptibilidad a *P. salmonis* de las distintas familias muestreadas en el estudio evidenció la existencia de individuos más resistentes que otros a la infección,

fenómeno ampliamente descrito ante diversos agentes etiológicos de *Salmo salar* (Gjedrem y GjØen, 1995; Langevin *et al*, 2012; Holm *et al*, 2015). Midiendo el grado de susceptibilidad en función a los umbrales de ciclo tempranos en el caso de ambos genes para cada tratamiento, la familia 32 resultó ser más susceptible a *P. salmonis* respecto a la familia 61, ambas medidas en riñón anterior (Figura 11.). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre las familias 8 y 36, ambas, evaluadas en hígado y bazo (Figura 12.), resultados que pueden ser explicados debido a una menor carga bacteriana en ambos tejidos respecto a riñón.

Según un estudio realizado por Dettleff *et al* (2015), existen patrones diferenciados de carga bacteriana en hospedadores según la susceptibilidad a la infección por *P. salmonis*. Es así, como se corroboró una carga bacteriana mayor en aquellos individuos con una mayor susceptibilidad a la patología, evidenciando una mayor presencia del patógeno precisamente en riñón anterior, lo cual genera el planteamiento sobre si los resultados se obtuvieron producto de una mayor expresión del gen en estudio, o si la mayor presencia de la bacteria definió el patrón de expresión para los genes *sdhA* y *23s*. Sería entonces provechoso para un estudio futuro, estimar en primer lugar la carga bacteriana que cada muestra posee, así como también el incorporar métodos más sofisticados para medir viabilidad bacteriana, como lo es la citometría de flujo en combinación a otras técnicas (Berney *et al*, 2007). La citometría de flujo es una de las herramientas más usadas para medir viabilidad celular tanto a nivel ambiental como a nivel de hospedero (Nebe-von Caron *et al* 1998; Boulos *et al*, 1999; Castillo, 2005; Berney *et al*, 2006; Berney *et al*, 2007), por lo que podría utilizarse para rectificar los resultados de la amplificación del qPCR y verificar si la expresión del gen *sdhA* en la bacteria *P. salmonis* puede establecerse como un marcador de viabilidad bacteriana válido. Cabe señalar que hasta el día de hoy, no existen genes descritos como constitutivos o marcadores de viabilidad bacteriana para *P. salmonis*, los cuales tienen una relevancia fundamental al momento de realizar estudios de expresión génica y comprender biológicamente a la bacteria y su persistencia en individuos infectados.

## CONCLUSIONES

El presente estudio logró identificar una zona del genoma aún no ensamblado de *P. salmonis* cepa LF-89 codificante del gen constitutivo *sdhA*, nunca antes descrito en la bacteria por la literatura existente. Se realizó la medición de la expresión del gen en cultivo celular infectado como un modelo de estudio *in vitro*, y la medición de la expresión del gen en tejidos de importancia como un modelo de estudio *in vivo*. Los resultados esperados se reflejaron en los obtenidos por el estudio, existiendo una expresión diferencial y mayor del gen en aquellos tejidos que por literatura, resultan más idóneos para la replicación de la bacteria, como lo es el riñón. El estudio también ratificó la susceptibilidad individual que tiene el hospedador ante el patógeno, mostrando una expresión diferencial en familias que resultaron ser más resistentes a la enfermedad. Cabe señalar que la imposibilidad de aplicar los métodos de cuantificación relativa propuestos por Pfaffl y Livak reflejan la falta de genes descritos en la literatura que ayuden a interpretar de manera correcta los resultados para este tipo de ensayos en *P. salmonis*. Es importante el continuar la búsqueda de genes de referencia que permitan calibrar la reacción de qPCR.

Los resultados y su interpretación indican una nueva aproximación en el entendimiento de *P. salmonis*, bacteria que al día de hoy se presenta como una gran amenaza para la industria acuícola a nivel nacional, y una gran oportunidad de desarrollo científico debido al escaso entendimiento del microorganismo aún a más de 25 años desde su detección en nuestro territorio nacional.

## BIBLIOGRAFÍA

**BERNEY, M.; HAMMES, F.; BOSSHARD, F.; WEILENMANN, H.U.; EGLI, T.** 2007. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol.* 10(73):3283-3290.

**BERNEY, M.; WEILENMANN, H.U.; EGLI, T.** 2006. Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS). *J. Microbiol.* 152:1719-1729.

**BOHLE, H.; TAPIA, E.; MARTINEZ, A.; ROZAS, M.; FIGUEROA, A.; BUSTOS, P.** 2009. *Francisella philomiragia*, bacteria asociada con altas mortalidades en salmones del Atlántico (*salmo salar*) cultivados en balsas-jaulas en el lago Llanquihue. *Arch. Med. Vet.* 41: 237-244.

**BOULOS, L.; PREVOST, M.; BARBEAU, B.; COALLIER, J.; DESJARDINS, R.** 1999. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods* 37:77-86.

**BUSSMAN, M.; EMER, D.; HASENBEIN, S.; DEGRAF, S.; EIKMANN, B.J.; BOTT, M.** 2009. Transcriptional control of the succinate dehydrogenase operon *sdhCAB* of *Corynebacterium glutamicum* by the cAMP-dependent regulator GlxR and the LuxR-type regulator RamA. *J. Biotechnol.* 143: 173-182.

**CASTILLO, J.L.** 2005. Citometría de flujo en la evaluación de potencial de membrana y viabilidad celular de *Helicobacter pylori*. Tesis para optar al grado de magíster en ciencias mención microbiología. Concepción, Chile. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción. 144 p.

**CINAR, M.U.; ISLAM, M.A.; UDDIN, M.J.; THOLEN, E.; TESFAYE, D.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.** 2012. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in porcine alveolar macrophages in response to LPS and LTA. *BMC Res. Not.* 5(107): 2-12.

**CREASEY, E.; ISBERG, R.** 2012. The protein SdhA maintains the integrity of the *Legionella*-containing vacuole. *PNAS.* 9(109):3481-3486.

**DETTLEFF, P.; BRAVO, C.; PATEL, A.; MARTINEZ, V.** 2015. Patterns of *Piscirickettsia salmonis* load in susceptible and resistant families of *Salmo salar*. *Fish Shellfish Immun.* 45: 65-71.

**DUODU, S.; COLQUHOUN, D.** 2010. Monitoring the survival of fish-pathogenic *Francisella* in water microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74:534-541.

**FAO.** 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. [en línea] <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf>> [consulta: 13-12-2012]

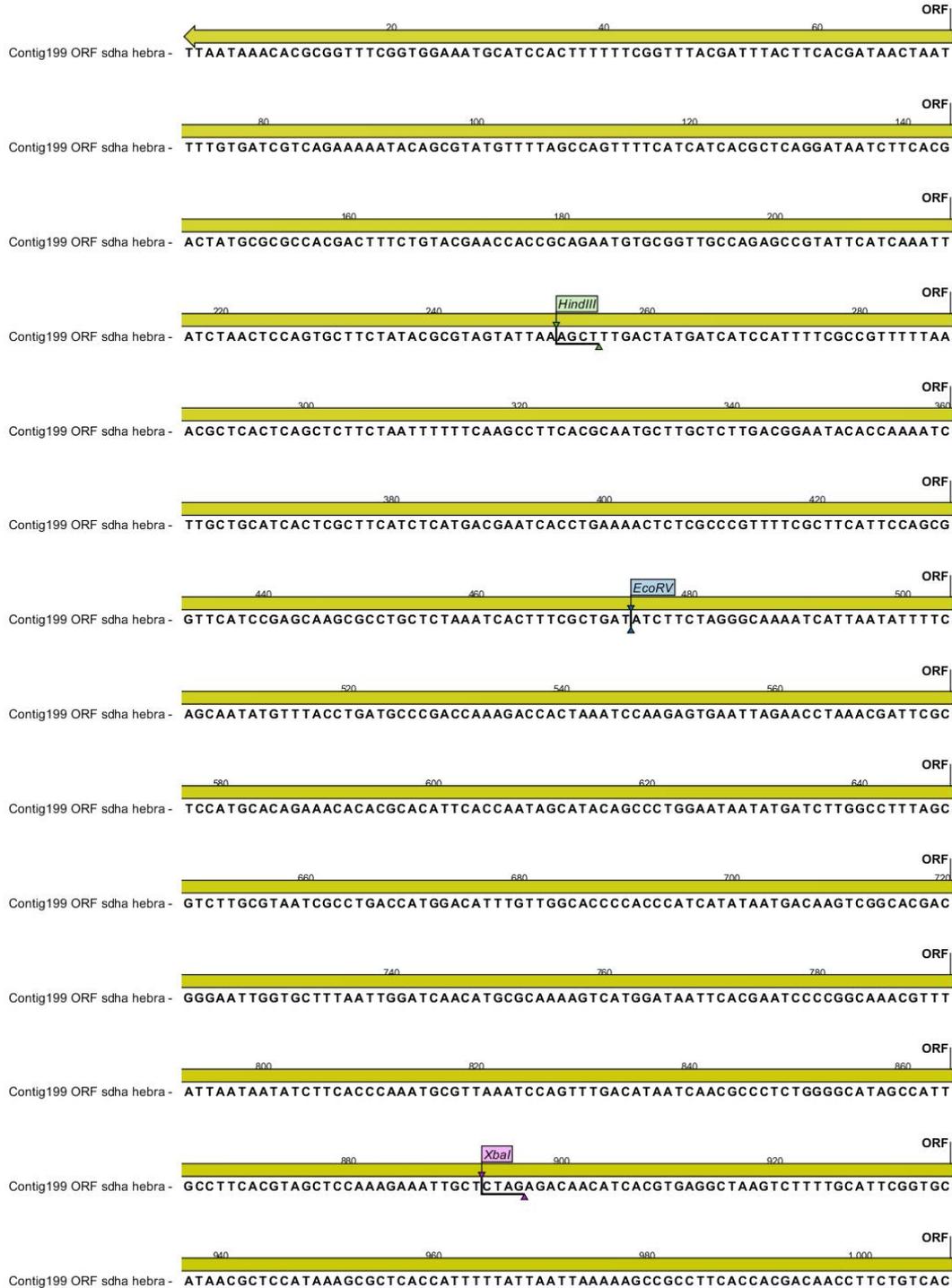
**FLORINDO, D.; FERREIRA, R.; BORGES, V.; SPELLERBERG, B.; GOMES, J.P.; BORREGO, M.J.** 2012. Selection of reference genes for real-time expression studies in *Streptococcus agalactiae*. *J. Microbiol. Meth.* 90:220-227.

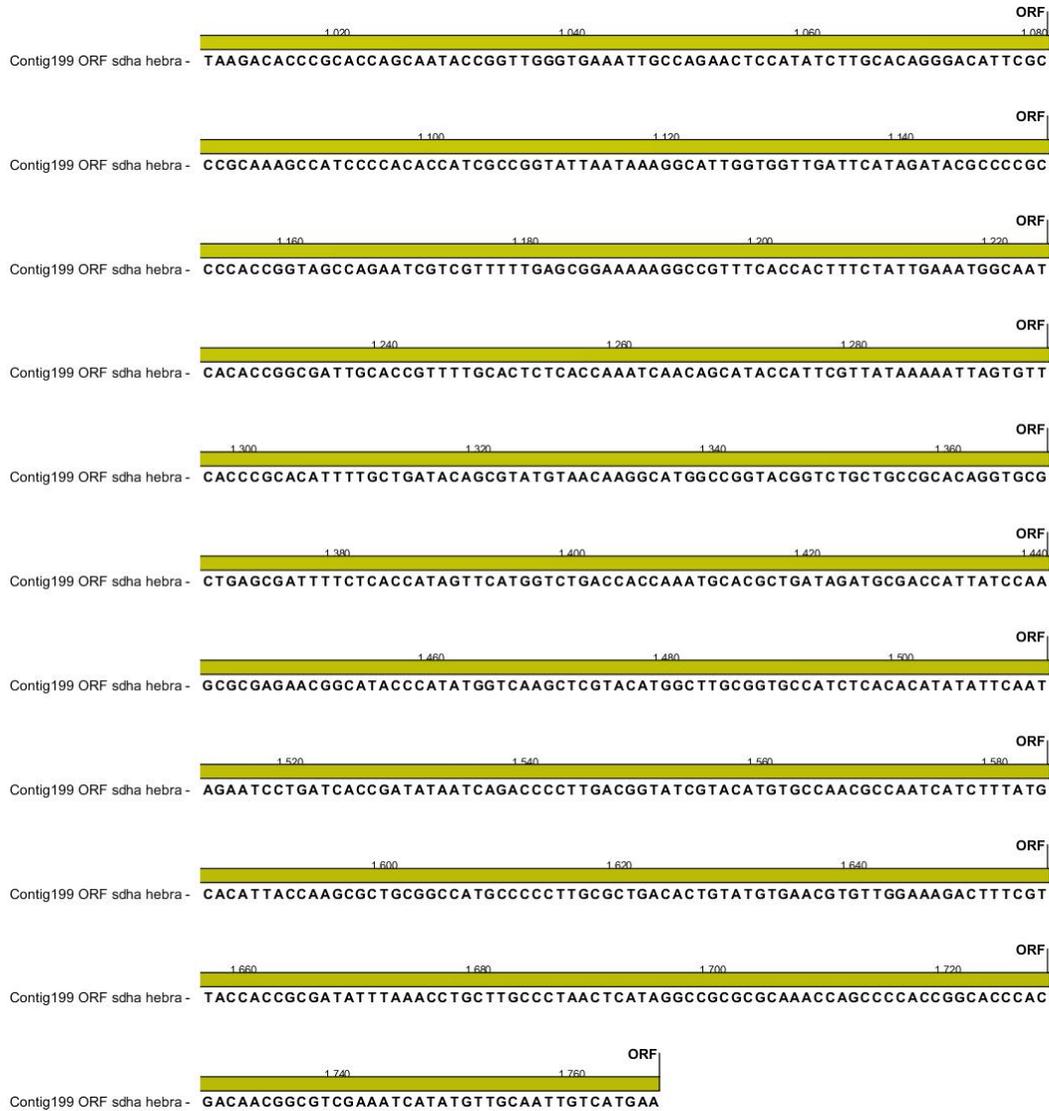
- FRAGA, D.; MEULIA, T.; FENSTER, S.** 2008. Real Time- PCR. [en línea]. <<http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/CPUnit/refId-et1003.html>> [consulta: 11-12-2013]
- FRYER, J.L.; HEDRICK, R.P.** 2003. *Piscirickettsia salmonis*: A gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. J. Fish. Dis. 26: 251-262.
- GJEDREM, T.; GJØEN, H. M.** 1995. Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to furunculosis, BKD and cold water vibriosis. Aquac. Res. 26 (2): 129-134.
- HOLM, H.; SANTI, N.; KJØGLUM, S.; PERISIC, N.; SKUGOR, S.; EVENSEN, Ø.** 2015. Difference in skin immune responses to infection with salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of families selected for resistance and susceptibility. Fish Shellfish Immun. 42(2): 384-394.
- KEER, J.T.; BIRCH, L. T.** 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. J. Microbiol. Meth. 53: 175-183.
- LANGEVIN, C.; BLANCO, M.; MARTIN, S. A.; JOUNEAU, L.; BERNARDET, J. F.; HOUEL, A.; LUNAZZI, A.; DUCHAUD, E.; MICHEL, C.; QUILLET, E.; BOUDINOT, P.** 2012. Transcriptional responses of resistant and susceptible fish clones to the bacterial pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. PloS one. 7(6): e39126.
- LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T.** 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. Methods. 25 (4):402-408.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J.** 2004. Brock Biología de los Microorganismos. 10<sup>a</sup> ed. Pearson Prentice Hall. Madrid, España. 1096p.
- MCCARTHY, U.** 2005. *Piscirickettsia salmonis*: characterisation, infection and immune response in salmonid fish. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Stirling, Scotland. Institute of Aquaculture University of Stirling. 279 p.
- MCCARTHY, U.; BRON, J.; BROWN, L.; POURAHMAD, F.; BRICKNELL, I.R.; THOMPSON, K.; ADAMS, A.; ELLIS, A.** 2008. Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout front head kidney macrophages. Fish Shellfish Immun. 25(5):477-484.
- NEBE-VON-CARON, G.; STEPHENS, P.; BADLEY, R.A.** 1998. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. Jour Appl Microbiol. 84:988-998.
- PFAFFL, M.W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. [en línea]. Nucl Acids Res. 29 (9). <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55695/>> [consulta: 03-12-2012]

- RADONIC, A.; THULKE, S.; MACKAY, I.; LANDT, O.; SIEGERT, W.; NITSCHKE, A.** 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 313: 856-862.
- RISE, M.; JONES, S.; BROWN, G.; VON SCHALBURG, K.; DAVIDSON, W.; KOOP, B.** 2004. Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Physiol Genomics.* 20: 21-35.
- ROJAS, V.; GALANTI, N.; BOLS, N.C.; JIMÉNEZ, V.; PAREDES, R.; MARSHALL, S. H.** 2010. *Piscirickettsia salmonis* induces apoptosis in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout. *J. Cell. Biochem.* 110: 468-476.
- ROJAS, V.; GALANTI, N.; BOLS, N.C.; MARSHALL, S.H.** 2009. Productive infection of *Piscirickettsia salmonis* in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout, a possible survival strategy. *J. Cel. Biochem.* 108: 631-637.
- ROZAS, M.; ENRÍQUEZ, R.** 2014. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *J. Fish. Dis.* 37: 163-188.
- SILVER, N.; BEST, B.; JIANG, J.; THEIN, L.S.** 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 7(33).
- STENICO, V.; BAFFONI, L.; GAGGIA, F.; BIAVATI, B.** 2014. Validation of candidate reference genes in *Bifidobacterium adolescentis* for gene expression normalization. *Anaerobe.* 27: 34-39.
- TACCHI, L.; BRON, J.E.; TAGGART, J.B.; SECOMBES, C.; BICKERDIKE, R.; ADLER, M.A.; TAKLE, H.; MARTIN, S.** 2011. Multiple tissue transcriptomic responses to *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Physiol. Genomics.* 43 (21): 1241-1254.
- VIRAJ, P.M.; MELISSA, A.H.; PHILIPPA, H.; NAVARRO, M.B. RABIN, R.L.** 2008. Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR Analysis. *J. Biomol. Tech.* 19: 342-347.
- WONG, M.L.; MEDRANO, J.F.** 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 39(1): 75-85.
- WOYWOOD, D.; LEAL, J.** 2007. Piscirickettsiosis en Chile: Avances y perspectivas para su control. *Salmo ciencia.* [en línea] <<http://www.salmonchile.cl/salmociencia/002/Paper1.pdf>> [consulta: 12- 06- 2012]

# ANEXOS

## 1. Anexo 1





Cuadro de lectura abierto codificante de gen *sdhA*. Imagen obtenida de CLC Genomics Workbench 3.6.5©.