



**LOS PLÁSMIDOS DE *Piscirickettsia salmonis*:  
DESARROLLO DE UN MODELO ALTERNATIVO  
PARA EL ESTUDIO COMPARATIVO DE SUS  
FACTORES DE VIRULENCIA Y LA RESPUESTA DEL  
HOSPEDERO A LA INFECCIÓN**

Tesis  
Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De

**Doctor en Ciencias con mención en Microbiología**

Facultad De Ciencias  
Por

**Javiera Rocío Ortiz Severín**

Agosto, 2018

Director de Tesis  
Dr. Francisco P. Chávez

Co-directora de Tesis  
Dra. Verónica Cambiazo



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

**Javiera Rocío Ortiz Severín**

ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias mención Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 14 de junio del año 2018.

**Director de Tesis:**

Dr. Francisco P. Chávez .....

**Co-Directora de Tesis**

Dra. Verónica Cambiazo .....

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dr. Miguel Allende .....

Dra. Cecilia Toro .....

Dr. Sergio Álvarez .....

Dr. Omar Orellana .....

A mi familia, a toda ella. A mi abuela (nuevamente), a laNati, a María Teresa, a la Maru, a la Maca, a todas las que me inspiraron y a todas aquellas científicas que se abrieron paso y me allanaron el camino.



Nací un 4 de mayo de 1987 en Santiago, Chile. Estudié toda la vida en esa ciudad, enseñanza básica, media y superior. Al egresar de Licenciatura en Biología, en la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, trabajé un año con los Dres. Patricio Iturriaga y Miguel Reyes, en farmacología en la misma Universidad. Posteriormente, ingresé al Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (nuevamente), y trabajé con los Dres. Francisco P. Chávez y Nicolás Guiliani, quienes dirigieron mi tesis, relacionada con la virulencia de la bacteria oportunista, *Pseudomonas aeruginosa*. Gracias a colaboraciones en el marco de mi tesis, pude trabajar también con la Dra. Andrea Calixto y el laboratorio del Dr. Miguel Allende. Antes de obtener el título, ingresé al Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología en la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, en conjunto con la USACH. Gracias a la obtención de la Beca CONICYT de Doctorado Nacional, pude cursar los estudios de doctorado y desarrollar mi tesis junto al Dr. Francisco P. Chávez y la Dra. Verónica Cambiazo, en el INTA. El tema elegido fue el estudio de los factores de virulencia de *Piscirickettsia salmonis* y el uso de modelos alternativos de infección, un tema nuevo para mí. En el marco de mis estudios de doctorado, tuve la fortuna de participar, a veces muy brevemente, en varios laboratorios y grupos de trabajo, los cuales generosamente me mostraron sus áreas de investigación y enseñaron sus técnicas y protocolos. Destaco enormemente la pasantía realizada en la Universidad de Oslo, con la Dra. Hanne Winter-Larsen, ya que no sólo me permitió terminar los últimos objetivos de la tesis, sino que me mostró cómo es el quehacer científico en otras latitudes. Cinco años después de haber ingresado al mejor programa de Doctorado en Microbiología de la mejor Universidad de Chile, egreso con al fin con la convicción de que este largo camino ha sido enriquecedor, y extrañamente amplio y multicultural, todo desde este último rincón del planeta, en la ciudad de Santiago.

## Agradecimientos

Una tesis tan gigantesca, de un tanto más de cuatro (o cinco) años, no podría haber sido realizada sin la ayuda material, de tiempo y espacio de muchos colegas y amigos. Destaco a los laboratorios que, de forma muy generosa y desinteresada, me enseñaron técnicas y protocolos, y convidaron materiales, reactivos y equipos sin los cuales no habría sido posible hacer experimentos indispensables (y dispensables también) de mi tesis, especialmente cuando los fondos son limitados y escasean. Agradezco al laboratorio de mis tutores, el Dr. Francisco Chávez y la Dra. Verónica Cambiazo, y a todos los estudiantes e investigadores que pasaron por ellos. Agradezco especialmente a Macarena Varas, que todo el tiempo fue mi compañera y sin ella no habría entrado al Doctorado; a Javiera Álvarez por haber sido mi primera estudiante, y enseñarme a enseñar (lo siento Habibi), y a todas las que vinieron después. Nico, Coni, Pai, Gloria-Catalina, Panchito, Chiki... el laboratorio los forma la gente que lo compone y ustedes lo hicieron el mejor. Agradezco también al LBEG del INTA, a todos sus alumnos e investigadores, donde aprendí a trabajar con *P. salmonis* y cultivos celular, y otras tantas cosas. Agradezco también la participación del Dr. Alejandro Maas y su grupo de trabajo, especialmente el aporte de Dante Travisany y de Jonathan Maldonado (LBEG) con la parte bioinformática de la tesis.

Muchos son los laboratorios donde fui a hacer algún experimento, o aprender alguna técnica. Agradezco la ayuda de años que me han brindado en el laboratorio del Dr. Miguel Allende, todos son muy generosos con su tiempo y laboratorio, y me enseñaron todo lo que se del pez cebra. También al laboratorio del Dr. Nicolás Guiliani y sus alumnos, agradezco mucho la colaboración ustedes y el buen recibimiento, aunque pasé hace ya varios años por ahí. También en la Facultad de Ciencias, el laboratorio de la Dra. Rosalba Lagos y del Dr. Andrés Marcoleta. En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas al laboratorio del Dr. Sergio Álvarez. Agradezco también a mis compañeros de Doctorado, con quienes compartí todo el preceso y nos acompañamos en los momentos complicados. Muy importante fue también el Laboratory of Microbial Dynamics, en la Escuela de Farmacia de la Universidad de Oslo, Noruega. Fue casi al final de mi tesis cuando me acogieron en su laboratorio para realizar una pasantía. Trabajar en su

laboratorio fue una excelente experiencia, aprendí muchísimo y fue una aventura maravillosa. Escencialmente, agradezco a toda la gente con la que me topé durante el desarrollo de mi tesis y tuvo tiempo para escuchar, acompañar y opinar. Quiero agradecer la visión de ciencia colaborativa de la gente con la que trabajé y aportó a mi trabajo y formación, visión que, a mi entender, es fundamental para el desarrollo del quehacer científico.

Por último agradezco las fuentes de financiamiento de este trabajo:

- Beca de Doctorado Nacional CONICYT año 2013, número 21130717, Becas complementarias Pasantía en el Extranjero, y beneficios adicionales de Gastos Operacionales y Extensión de Beca.
- Proyecto Fondecyt 1120209 a cargo del Dr. Francisco P. Chávez.
- Proyecto Fondecyt 1160802 a cargo de la Dra. Verónica Cambiazo.
- FONDAP 15090007, Centro de Regulación del Genoma (CRG).

# Índice de materias

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de materias.....	v
Lista de tablas.....	viii
Lista de figuras.....	x
Lista de abreviaturas.....	xiii
Lista de símbolos y unidades de medida.....	xiv
Resumen en español.....	xv
Resumen en inglés.....	xvi
1. Introducción.....	1
1.1    Ciclo infeccioso y virulencia de <i>P. salmonis</i> .....	2
1.2    Elementos genéticos móviles y virulencia.....	2
1.3    Modelos biológicos para el estudio de la virulencia bacteriana en <i>P. salmonis</i> ...	5
1.4    Hipótesis.....	6
1.5    Objetivo general .....	7
1.6    Objetivos específicos .....	7
2. Materiales y métodos .....	8
2.1    Cepas bacterianas y condiciones de cultivo .....	8
2.2    Extracción, purificación y secuenciación de los plásmidos .....	9
2.3    Secuenciación y anotación de los plásmidos, e identificación de posibles factores de virulencia.....	9
2.4    Alineamiento de secuencias plasmidiales de <i>P. salmonis</i> .....	10
2.5    Síntesis de oligonucleótidos marcados con digoxigenina para <i>southernblot</i> de los plásmidos.....	10
2.6    Análisis de los plásmidos por <i>Southern blot</i> .....	12
2.7    Cuidado y mantenimiento de peces cebras .....	13

2.8	Desarrollo de un modelo de infección con <i>P. salmonis</i> en larvas de pez cebra	13
2.9	Fijación y permeabilización de larvas para inmunofluorescencia	14
2.10	Cultivos primarios de riñón (CPR) de pez cebra adulto	15
2.11	Cultivo de líneas celulares e infecciones con <i>P. salmonis</i>	16
2.12	Estandarización de los ensayos de viabilidad en líneas celulares y cultivos primarios infectados con <i>P. salmonis</i>	16
2.13	Inmunofluorescencia y microscopía confocal en los cultivos celulares	20
2.14	Proteómica cuantitativa de bacterias en estado infectivo	21
2.15	Extracción de ARN para RT-qPCR	22
2.16	Cuantificación de transcritos por PCR cuantitativo	23
3.	Resultados	27
3.1	Descripción de los plásmidos de <i>P. salmonis</i> , cepa LF-89	27
3.2	Comparación de los plásmidos presentes en las cepas PSCGR01, PSCGR02 y LF-89 de <i>P. salmonis</i>	39
3.3	Comparación entre cepas disponibles en NCBI en base a su secuencia génica	46
3.4	Desarrollo y estandarización de las condiciones de infección de <i>P. salmonis</i> en distintos modelos de cultivo celular	52
3.5	Comparación de la infección de <i>P. salmonis</i> en los distintos modelos	56
3.6	Desarrollo de un modelo de infección <i>in vivo</i> de <i>P. salmonis</i> en larvas de pez cebra	64
3.7	Análisis de la expresión global del proteoma de la infección de <i>P. salmonis</i> en cultivos de macrófagos de salmón	71
3.8	Identificación de probables genes de virulencia que se expresan diferencialmente en la infección <i>in vitro</i>	82
3.9	Comparación de la expresión de posibles factores de virulencia en los tres cultivos celulares utilizados como modelos de infección	87
3.10	Comparación de la respuesta de los distintos hospederos frente a la infección con <i>P. salmonis</i>	93
4.	Discusión	96
4.1	Los plásmidos de <i>P. salmonis</i> LF-89	96
4.2	Conservación de secuencias plasmidiales en las cepas de <i>P. salmonis</i>	99

4.3	Factores de virulencia plasmidiales de <i>P. salmonis</i> .....	102
4.4	Respuesta global de <i>P. salmonis</i> durante la infección .....	104
4.5	Factores de virulencia de <i>P. salmonis</i> identificados en la infección de cultivos celulares .....	107
4.6	Infección de <i>P. salmonis</i> en tres tipos celulares distintos .....	112
4.7	Efecto de <i>P. salmonis</i> sobre las poblaciones de neutrófilos en el pez cebra..	115
4.8	Respuesta de los cultivos celulares enfrentados a <i>P. salmonis</i> .....	116
5.	Conclusiones .....	123
6.	Bibliografía .....	126
7.	Anexos .....	132

## Lista de tablas

Tabla 1. Secuencia de partidores y características de las sondas utilizadas para detectar los plásmidos identificados en la cepa LF-89 de <i>P. salmonis</i> .....	11
Tabla 2. Listado de partidores de <i>S. salar</i> y <i>D. rerio</i> utilizados para PCR cuantitativo en tiempo real, con los cultivos celulares SHK-1, ASK y CPR de pez cebra.....	23 y 24
Tabla 3. Listado de partidores diseñados para <i>P. salmonis</i> utilizados para PCR cuantitativo en tiempo real, en el equipo AriaMx (Agilent) con el kit Takyon™ (Eurogentec).....	25 y 26
Tabla 4. Listado y características de los plásmidos secuenciados desde la cepa de referencia LF-89 (ATCC VR-1361) de <i>P. salmonis</i> .....	28
Tabla 5. Profagos encontrados en la secuencia del plásmido <u>pPSLF89-1</u> de <i>P. salmonis</i> LF-89.....	29
Tabla 6. Profago identificado en la secuencia del plásmido <u>pPSLF89-2</u> de <i>P. salmonis</i> LF-89.....	31
Tabla 7. Profago identificado en la secuencia del plásmido <u>pPSLF89-3</u> de <i>P. salmonis</i> LF-89.....	33
Tabla 8. Profago incompleto identificado en la secuencia del plásmido <u>pPSLF89-4</u> de <i>P. salmonis</i> LF-89.....	35
Tabla 9. Listado y características genómicas de los plásmidos secuenciados en los aislados ambientales PSCGR01 y PSCGR02 de <i>P. salmonis</i> .....	39
Tabla 10. Secuencia de partidores y características de las sondas utilizadas para detectar los plásmidos identificados en la cepa LF-89 de <i>P. salmonis</i> .....	40
Tabla 11. Listado de factores de virulencia plasmidiales de la cepa LF-89 identificados en las otras 18 cepas de <i>P. salmonis</i> .....	49
Tabla 12. Número de proteínas de <i>S. salar</i> identificadas y cuantificadas por proteómica cuantitativa durante la infección de <i>P. salmonis</i> en células SHK-1.....	75

Tabla 13. Listado de proteínas plasmidiales identificadas por proteómica cuantitativa.....	85 y 86
Tabla 14. Cuantificación de transcritos bacterianos durante la infección en tres modelos de cultivo celular.....	91 y 92
Tabla 15. Cuantificación de transcritos de genes relacionados con la respuesta inmune del hospedero durante la infección con <i>P. salmonis</i> .....	94

## Lista de figuras

Figura 1. Estandarización de las condiciones para el ensayo de viabilidad celular con alamarBlue.....	18
Figura 2. Esquema de las muestras analizadas por proteómica.....	21
Figura 3. Representación circular del plásmido <u>pPSLF89-1</u> de <i>P. salmonis</i> LF-89.....	30
Figura 4. Representación circular del plásmido <u>pPSLF89-2</u> de <i>P. salmonis</i> LF-89.....	32
Figura 5. Representación circular del plásmido <u>pPSLF89-3</u> de <i>P. salmonis</i> LF-89.....	34
Figura 6. Representación circular del plásmido <u>pPSLF89-4</u> de <i>P. salmonis</i> LF-89.....	36
Figura 7. Categorías COG de las proteínas identificadas en los plásmidos de <i>P. salmonis</i> LF-89.....	37
Figura 8. Representación circular de los plásmidos de <i>P. salmonis</i> LF-89 con la ubicación de las sondas diseñadas.....	41
Figura 9. <i>Southern blot</i> con la sonda sP1_34 específica para el plásmido <u>pPSLF89-1</u> de <i>P. salmonis</i> .....	42
Figura 10. <i>Southern blot</i> con la sonda sP2_32 específica para el plásmido <u>pPSLF89-2</u> de <i>P. salmonis</i> .....	43
Figura 11. <i>Southern blot</i> con la sonda sP3_52 específica para el plásmido <u>pPSLF89-3</u> de <i>P. salmonis</i> .....	44
Figura 12. <i>Southern blot</i> con la sonda sP4_02 específica para el plásmido <u>pPSLF89-4</u> de <i>P. salmonis</i> .....	45
Figura 13. Clasificación de los genomas de las cepas de <i>P. salmonis</i> secuenciadas y depositadas en NCBI.....	46
Figura 14. Árbol de máxima similitud de los plásmidos de las cepas secuenciadas de <i>P.</i>	

<i>salmonis</i> depositadas en NCBI.....	48
Figura 15. Representación circular del plásmido pPSLF89-1 de <i>P. salmonis</i> LF-89 con la ubicación de los FdeV y las cepas que los contienen.....	50
Figura 16. Representación circular de los plásmidos pPSLF89-3 y pPSLF89-4 de <i>P. salmonis</i> LF-89 con la ubicación de los FdeV y las cepas que los contienen.....	51
Figura 17. Crecimiento de <i>P. salmonis</i> y progresión de la infección en cultivos celulares SHK-1.....	53
Figura 18. Imágenes representativas de la progresión de la infección de <i>P. salmonis</i> en cultivos celulares SHK-1.....	54
Figura 19. Viabilidad celular en el tiempo cuantificada por alamarBlue.....	57
Figura 20. Infecciones de <i>P. salmonis</i> en cultivos celulares derivados de salmón atlántico.....	58
Figura 21. Infecciones de <i>P. salmonis</i> en cultivos primarios de riñón de peces cebra adultos.....	59
Figura 22. Expresión de marcadores de neutrófilos y macrófagos durante la infección en cultivos primarios de riñón de pez cebra.....	60
Figura 23. Inmunofluorescencia de cultivos celulares de salmón atlántico expuestos a <i>P. salmonis</i> .....	61
Figura 24. Inmunofluorescencia de cultivos primarios de riñón de pez cebra infectados con <i>P. salmonis</i> .....	62
Figura 25. Aumento de la carga bacteriana durante la infección de <i>P. salmonis</i> en los distintos cultivos celulares.....	64
Figura 26. Ensayos de inyección de <i>P. salmonis</i> LF-89 en el pez cebra.....	65
Figura 27. Inyecciones de <i>P. salmonis</i> en la circulación de larvas de pez cebra <i>Tg(mpeg-1:Dendra2)</i> .....	67
Figura 28. Inyecciones de <i>P. salmonis</i> en la circulación de larvas de pez cebra <i>....Tg(mpx:EGFP)</i> .....	68
Figura 29. Curso temporal de los fenotipos observados luego de la infección con <i>P.</i>	

..... <i>salmonis</i> LF-89.....	69
Figura 30. Inmunofluorescencia de larvas <i>mpx:EGFP</i> de pez cebra inyectadas con <i>P.</i> ..... <i>salmonis</i> LF-89 o con solución salina como control.....	70
Figura 31. Diagrama de flujo del análisis de la proteómica cuantitativa.....	72
Figura 32. Resumen de resultados de las proteínas de <i>S. salar</i> identificadas por proteómica cuantitativa.....	74
Figura 33. Resumen de resultados de las proteínas de <i>P. salmonis</i> identificadas por proteómica cuantitativa.....	76
Figura 34. Categorías COG de las muestras de <i>P. salmonis</i> analizadas por proteómica...77	
Figura 35. Análisis de enriquecimiento de las proteínas bacterianas encontradas en fase exponencial de crecimiento en cultivo líquido (muestra control).....	78
Figura 36. Análisis de enriquecimiento de las proteínas bacterianas encontradas en SHK-1 infectadas en estado de vacuolización.....	80
Figura 37. Análisis de enriquecimiento de las proteínas bacterianas encontradas en SHK-1 infectadas en estado de propagación.....	81
Figura 38. Familias de factores de virulencia identificadas por proteómica cuantitativa en cultivos infectados y no infectados de SHK-1.....	83
Figura 39. Resumen de los transcritos de <i>P. salmonis</i> cuantificados por RT-qPCR en los tres cultivos celulares infectados.....	88
Figura 40. Resumen del estado celular de <i>P. salmonis</i> y las células SHK-1 durante la infección en estado de vacuolización o propagación.....	111
Figura 41. Resumen comparativo de los efectos de la infección generada por <i>P. salmonis</i> en tres cultivos celulares.....	122

## Lista de abreviaturas

ADN:	Ácido desoxiribonucleico
ADNc:	ADN complementario
ARN:	Ácido ribonucleico
ASK:	Línea celular <i>Anterior Salmon Kidney</i> , ATCC CRL-2747™
CPR:	Cultivo primario de riñón
Dig:	Digoxigenina
dpf:	Días post-fecundación
dpi:	Días post-infección, días post-inyección
FdeV:	Factor de virulencia
hpf:	horas post-fecundación
ICE:	Elemento integrativo conjugativo
Locus tag:	Identificador de una secuencia expresada o marcador genético
MOI:	Multiplicidad de infección
ORF:	Marco de lectura abierto ( <i>Open Reading Frame</i> )
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA:	Paraformaldehído
qPCR:	PCR cuantitativo en tiempo real
RFLP:	Polimorfismo del largo de fragmentos de restricción
rpm:	Revoluciones por minuto
RT-qPCR:	Retrotranscripción acoplada a qPCR
SHK-1:	Línea celular <i>Salmon Head Kidney-1</i> , <i>General Cell Collection</i> n° 97111106
SFB:	Suero fetal bovino
SRS:	Septicemia rickettsial de salmónidos
SSTIV:	Sistema de secreción tipo 4
Tg:	Transgénico
UV:	Ultravioleta

## Lista de símbolos y unidades de medida

°C:	Grados celsius
DO <sub>600</sub> :	Densidad óptica a 600 nm
G:	Gauge
g:	gramo
<i>g</i> :	9,8 m/s <sup>2</sup> , aceleración de la gravedad
mg:	Milígramo
µg:	Micrógramo
hr:	Hora
kb:	Kilobase, 1.000 pares de bases
Mb:	Megabase, 1.000 kb
min:	Minuto
M:	Molar
mM:	Milimolar
µM:	Micromolar
nM:	Nanomolar
m:	Metro
cm:	Centímetro
mm:	Milímetro
µm:	Micrómetro
nm:	Nanómetro
Tm:	Temperatura de fusión de una secuencia de ADN
U:	Unidades
UA:	Unidades arbitrarias

## Resumen en español

*Piscirickettsia salmonis* es una bacteria patógena intracelular facultativa que causa la Septicemia Rickettsial de Salmónidos (SRS). Esta bacteria coloniza diversos tejidos y órganos, lo que culmina con la septicemia y muerte del animal. Es capaz de sobrevivir al interior de macrófagos, y se multiplica en ellos al interior de vacuolas replicativas unidas a la membrana celular. Esta forma de replicación es similar a la observada en bacterias relacionadas filogenéticamente, como las del género *Francisella*, *Coxiella* y *Legionella*. Los patógenos de estos géneros además comparten la presencia de plásmidos que se relacionan con la virulencia de la cepa que los posee, y codifican factores de virulencia (FdeV) como el sistema de secreción Dot/Icm, el cual ha sido descrito en *P. salmonis*. Mediante secuenciación, se han identificado de plásmidos en *P. salmonis*, cuya función no ha sido estudiada. En este trabajo se analizaron las secuencias codificantes contenidas en 4 plásmidos de *P. salmonis* LF-89, se identificaron genes de replicación y mantención, profagos, sistemas toxina-antitoxina, y FdeV. Estos probables FdeV tienen homólogos en todas las cepas secuenciadas de *P. salmonis* y se expresan en condiciones de infección en cultivos celulares SHK-1 y ASK derivados de *Salmo salar* y en cultivos primarios de riñón (CPR) de pez cebra (*Danio rerio*), utilizado como un modelo alternativo de infección. En todos ellos *P. salmonis* fue capaz de infectar, disminuyó la viabilidad celular y permaneció por al menos 12 días al interior de las líneas celulares, y 5 días en los CPR, según se observó por inmunofluorescencia. En las células de salmón, la bacteria causó un aumento en la expresión de *il8*, *il10* e *il12*, y una disminución en los transcritos de *ifn-γ*, generando un ambiente antiinflamatorio. En los CPR infectados, generó un ambiente proinflamatorio producto de un aumento de la expresión de *il6*, *ifn-γ* y *nos2a*, aunque también se observó replicación de *P. salmonis* en ellos. Esto sugiere que los cultivos celulares responden de forma distinta a la infección por esta bacteria. En *P. salmonis* aumentó la expresión de genes relacionados sistemas de secreción (Dot/Icm y posiblemente la maquinaria del flagelo), toxinas y proteínas secretadas y genes plasmidiales, lo que indica que los plásmidos cumplen un rol en la infección bacteriana. Destacó la sobreexpresión de 3 copias *pipB2*, y la expresión diferencial de *ficD*, que aumentó significativamente sólo en células SHK-1, lo que se correlaciona con la formación de grandes vacuolas citoplasmáticas sólo en este tipo celular.

## Resumen en inglés

*Piscirickettsia salmonis* is a facultative intracellular pathogen, and the etiological agent of Salmonid Rickettsial Septicemia (SRS). This bacterium colonizes fish tissues and organs, causing septicemia and death of the animal. *P. salmonis* is able to survive inside the macrophages, and replicates in cytoplasmic vacuoles attached to the cell membrane. This form of replication is similar to that observed in phylogenetically related bacteria, such as *Francisella*, *Coxiella* and *Legionella*. Pathogens of these genera also contains plasmids that are implicated in the virulence of the strain. These plasmids encode virulence factors (VF) such as the Dot / Icm secretion system, which has been also described in *P. salmonis*. After long read sequencing of *P. salmonis* genome, four distinct plasmid sequences were predicted in *P. salmonis* LF-89 strain, but their function is unknown. In this work, we analyzed the coding sequences of *P. salmonis* LF-89 plasmids and identified replication and maintenance genes, profagos, toxin-antitoxin systems, and VFs. Homologous genes were identified in all *P. salmonis* sequenced strains and the putative VFs were expressed in infected salmon cells (SHK-1 and ASK cultures), and in infected primary cell cultures derived from zebrafish kidney (ZFPCC), used as an alternative infection model. In those cultured cell types, *P. salmonis* was able to infect, decreased cell viability and remained inside the cells for at least 12 days for the cell lines, and 5 days for the ZFPCC, as observed by immunofluorescence assays. In salmon cells, the bacterium caused an increase expression of *il8*, *il10* and *il12*, and a down-regulation of *ifn-γ*, generating an anti-inflammatory environment. Although bacterial replication occurred in the infected ZFPCC, *P. salmonis* generated a proinflammatory environment, as a result of the up-regulation of *il6*, *ifn-γ* and *nos2a*. This suggests that cell cultures respond in different ways to *P. salmonis* infection. During infection, genes related to secretion systems (Dot / Icm and possibly the flagellum structure), toxins and secreted proteins and plasmid genes were overexpressed in the bacteria. These results suggests that *P. salmonis* plasmids have an important role in bacterial infection. In particular, the overexpression of three *pipB2* gene copies, and the differential expression of *ficD*, which increased significantly only in SHK-1 cells, correlates with the formation of large cytoplasmic vacuoles that took place only in this cell type.

## 1. Introducción

La bacteria *Piscirickettsia salmonis* es el agente etiológico de la piscirickettsiosis o Septicemia Rickettsial de Salmónidos (SRS), enfermedad que afecta a diversos salmónidos en el mundo. Se tienen reportes de enfermedades rickettsiales desde 1939, sin embargo, no fue hasta 1989 que se describió la enfermedad y pudo aislarse la bacteria causante luego de un brote masivo en Puerto Montt, Chile. Esta bacteria causó la muerte de hasta un 90% de salmones coho (*Oncorhynchus kysutch*) luego de ser trasladados de agua dulce a salada (19). Los síntomas clínicos de la enfermedad, aunque variados, suelen ser letargia, inapetencia y nado errático por la superficie o bordes de la jaula. Los signos externos más consistentemente observados son múltiples úlceras cutáneas difusas, branquias pálidas debido al bajo nivel de hematocrito producto de anemia severa, inflamación abdominal y hemorragias petequiales en la base de las aletas y en las zonas perianales y perioculares (19, 31, 45, 104). Internamente, la infección se disemina sistémicamente causando ascitis serosanguínea e inflamación en el hígado, bazo y riñón, lo que finalmente resulta en septicemia y muerte (2, 19). Durante la infección, *P. salmonis* puede encontrarse en diversos tipos celulares, incluyendo los macrófagos de la circulación, lo que se cree contribuye a la diseminación sistémica de la bacteria.

*P. salmonis* ha sido descrita como una bacteria pequeña de entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, no móvil, aeróbica, sin cápsula y pleomórfica, pero normalmente cocoide que puede encontrarse en agrupaciones o estructuras con forma de anillo (103), y crece en un rango de temperatura entre 15°C y 20°C (45). A pesar de haber sido descrita originalmente como una bacteria del tipo rickettsial, estudios filogenéticos en base a la secuencia de los genes ribosomales 16S, 23 S y los ITS (*internal transcribed spacer*) determinaron que *P. salmonis* es una bacteria Gram negativa perteneciente al grupo de las gama-Proteobacterias (46, 77). Numerosas cepas de *P. salmonis* han sido estudiadas, pero la diversidad observada en estos marcadores genéticos no ha sido suficiente para separarlas en distintas especies. Los géneros filogenéticamente más relacionados a *Piscirickettsia* son *Francisella*, *Legionella* y *Coxiella*, los cuales se caracterizan por ser patógenos intracelulares (77).

## **1.1 Ciclo infeccioso y virulencia de *P. salmonis***

Todas las especies de salmónidos que se cultivan en Chile en agua de mar son susceptibles de ser infectadas por *P. salmonis*. Se ha descrito que esta bacteria puede mantenerse infectiva hasta por 30 días en medios salinos y en agua de mar a bajas temperaturas (15°C), sin embargo, no es capaz de sobrevivir en agua dulce (67).

Una vez establecida la infección, la bacteria es capaz de replicarse activamente en macrófagos, dentro de vacuolas citoplasmáticas de variado tamaño que se encuentran unidas a la membrana (31). Esta forma de replicación, junto con los mecanismos moleculares involucrados en la evasión de la vía de degradación lisosomal han sido estudiados en las bacterias filogenéticamente relacionadas [*Francisella*, *Legionella*, *Coxiella* (28, 40, 84)], pero poco se sabe en *P. salmonis*. Gracias a diversos esfuerzos para secuenciar el genoma de esta bacteria, y debido a su similitud con ortólogos en otras bacterias relacionadas, se han logrado predecir algunos factores de virulencia que podrían estar involucrados en la sobrevivencia al interior de macrófagos y la replicación en vacuolas. Este es el caso del sistema de Secreción Tipo IV-B (SSTIV-B), homólogo al sistema Dot/Icm, que se expresa en condiciones ácidas (50), como las encontradas al interior de los fagosomas, y que podría prevenir la fusión de ellos con el lisosoma. Este mecanismo de evasión de la vía lisosomal es compartido por numerosos patógenos intracelulares, entre ellos los pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *Francisella*, *Legionella* y *Coxiella* (23, 50, 136).

## **1.2 Elementos genéticos móviles y virulencia**

Los elementos genéticos móviles son segmentos de ADN que codifican, entre otras, las proteínas que median el movimiento de este ADN entre genomas (movilidad intracelular) o entre bacterias (movilidad intercelular). En procariontes ocurren principalmente tres tipos de elementos genéticos móviles que se transfieren horizontalmente: plásmidos, bacteriófagos o fagos, y elementos integrativos conjugativos (ICEs). Ellos difieren tanto en la cantidad de material genético que pueden transferir de una célula a otra, como en el mecanismo y las estrategias que utilizan para ello (37, 44, 63). La estructura de estos elementos es relativamente compleja, usualmente codifican mecanismos regulatorios y

estructurales que permiten su replicación y movilidad, además de genes con funciones accesorias. Adicionalmente, existen segmentos de ADN más pequeños y simples que pueden movilizarse de forma autónoma, o acoplados a otros elementos móviles, como son las islas genómicas, las secuencias de inserción, los integrones y los transposones (revisado en (34)). En conjunto, ellos facilitan rearrreglos cromosómicos, duplicaciones o deleciones, y captura de nuevos genes. De esta forma, los elementos genéticos móviles conforman un “metagenoma accesorio”, un reservorio transmisible de genes que promueven la evolución y la adaptación de comunidades bacterianas. Algunas de las funciones que estos elementos pueden conferir a las bacterias receptoras, es el catabolismo de metabolitos o compuestos orgánicos, resistencia a metales, detoxificación, resistencia a antibióticos, capacidad de colonizar ciertos tejidos y virulencia (revisado en (44, 61, 125)). Estas funciones corresponden principalmente a adaptaciones frente a las condiciones ambientales que encuentran las bacterias en un lugar y tiempo determinados.

Las bacterias con forma de vida intracelular facultativa, cuya replicación no ocurre exclusivamente al interior de células hospederas, tienden a ser organismos patógenos con tamaños de genoma variable, y con una proporción de ADN móvil en un rango comparable a la de organismos de vida libre. Ellos son un factor importante en la adquisición de genes que permiten a la bacteria adaptarse a un ambiente determinado, y en este sentido destaca la adquisición de virulencia. Por ejemplo, la bacteria marina *Vibrio anguillarum* es parte de la microbiota normal de hábitats acuáticos. Sin embargo, el serotipo O1 puede causar septicemias hemorrágicas fatales en peces de agua dulce cuando incorpora el plásmido pJM1, el cual codifica la maquinaria necesaria para la síntesis y transporte de anguibactina, un sideróforo esencial en la virulencia de este serotipo (83). Los plásmidos pueden contener otros elementos móviles, los cuales también ayudan a la virulencia de las bacterias patógenas. Diversos serovares de la bacteria *Salmonella enterica* causan enfermedades intestinales a mamíferos y otros vertebrados. Ellas contienen plásmidos del grupo de incompatibilidad IncA/C, algunos de los cuales a su vez contienen en su secuencia islas genómicas, o islas de patogenicidad, con *cassetes* de resistencia a múltiples antibióticos. Estas islas de patogenicidad pueden movilizarse a otros plásmidos, a otros sectores del genoma de la bacteria, a otras bacterias y a su descendencia, propagando así la resistencia (36). En relación con la virulencia otorgada por bacteriófagos, se conocen ejemplos desde hace más

de medio siglo. En 1953 se describió por primera vez la conversión de *Corynebacterium diphtheriae*, una bacteria avirulenta, al agente causante de la difteria, cuando se encontraba asociada a un bacteriófago particular que codifica la enterotoxina *tox*, y que es responsable de los síntomas y la letalidad asociada a esta enfermedad (43, 90). Esto implica que la toxicidad de las distintas cepas de *C. diphtheriae* depende directamente de la presencia de un corynefago en estado lisogénico.

Lo anteriormente expuesto ejemplifica la importancia de la movilidad y transferencia génica en la adaptabilidad de los organismos patógenos a su hospedero. La ecología de los patógenos es también importante de considerar, ya que las bacterias pueden adquirir una gran diversidad de estos genes directamente desde su ambiente. En ese sentido, *P. salmonis* podría estar expuesta a la transferencia génica tanto al interior de su hospedero, como en el ambiente marino. Al respecto, se estima que entre 24% y 52% de las bacterias encontradas en ambientes marinos contienen uno o más plásmidos (revisado en (116)), y se encuentran entre  $10^4$  a más de  $10^8$  virus por cada mililitro de agua de mar, superando en 15 veces la cantidad de bacterias presentes (revisado en (139, 142)). Gracias a estudios de secuenciación masiva de metagenomas de muestras ambientales, incluyendo plásmidos y viromas, se pudieron realizar análisis de los elementos genéticos móviles. Estos estudios concluyeron que son los plásmidos, y no los virus, los factores primordiales en la transferencia génica horizontal entre genomas bacterianos (53), mayormente debido a la existencia de plásmidos de amplio rango de hospedero que permiten el intercambio génico entre organismos poco emparentados. Sumado a ello, la presencia de plásmidos en géneros filogenéticamente cercanos a *P. salmonis*, como son *Legionella*, *Coxiella* y *Francisella*, se ha asociado a la virulencia de los aislados que lo poseen. A la fecha de inicio de este proyecto no existían plásmidos descritos en *P. salmonis* (143). La aparente transversalidad de la presencia de plásmidos en las bacterias emparentadas con *P. salmonis* sugiere que este patógeno también podría poseer este tipo de elemento genético extracromosomal, y que, al igual que en las otras bacterias, podría estar implicado en la virulencia bacteriana. Posteriormente, gracias a la secuenciación y anotación completa del genoma de la cepa de referencia LF-89 de *P. salmonis*, se identificaron tres secuencias circulares de ADN extracromosomal con características de plásmidos (95). Poco tiempo después, dos nuevas cepas (PM32597B1 y PM15972A1) fueron secuenciadas, anotadas y depositadas en NCBI,

donde informaron la presencia de cuatro plásmidos en ellas. Esto permitió a su vez la identificación de un cuarto plásmido en la cepa de referencia LF-89. Para enero de 2017, 19 cepas de *P. salmonis* se secuenciaron y anotaron, y en todas ellas se reportó la presencia de al menos dos plásmidos. A pesar de esto, la función de estos elementos genéticos es aún desconocida.

### **1.3 Modelos biológicos para el estudio de la virulencia bacteriana en *P. salmonis***

Los primeros estudios realizados sobre el agente etiológico de la piscirickettsiosis describían a *P. salmonis* como un patógeno intracelular obligado que sólo podía reproducirse al interior de tejido o células de salmón (31). Estudios posteriores determinaron que esta bacteria puede reproducirse al interior de numerosas líneas celulares, entre las que se encuentran cultivos embrionarios y de tejidos diferenciados (incluyendo células inmunes) de salmón y trucha (31, 46), y en tejido de insectos (15). Recientemente, se han descrito medios de cultivo líquidos y sólidos que permiten el crecimiento de la bacteria *in vitro* en ausencia de sangre (55, 81, 144), lo que ha permitido clasificar a *P. salmonis* como un patógeno intracelular facultativo. Esto ha simplificado notablemente el manejo de esta bacteria en el laboratorio.

Desde que *P. salmonis* fue aislada por primera vez, los estudios de infección se han centrado en la sobrevivencia de distintos salmónidos (salmón coho, salmón del atlántico y trucha) expuestos a desafíos con esta bacteria. De esta forma, se evalúa la supervivencia acumulativa de los peces luego de la inoculación de la bacteria por distintas vías: inyecciones intraperitoneales, inoculaciones dérmicas, en branquias o intestinales, o ensayos de cohabitación. Estos ensayos son costosos y difíciles de realizar, ya que se necesitan piscinas de acuicultura con las condiciones apropiadas para el manejo de salmones en agua salada. Estas dificultades han sido superadas en estudios con patógenos de otras especies mediante el uso de modelos animales de experimentación, como son los ratones, las ratas, ranas, moscas o el pez cebra. Este último tiene la ventaja de estar más emparentado con los salmones que los otros animales mencionados, además de ser transparente en su estado

larval lo que permite el uso de transgénicos que expresen marcadores como proteínas fluorescentes, además de otras técnicas moleculares como microarreglos de ADN, morfolinos y líneas mutantes. Por estas razones, y sumado a la facilidad de mantención en laboratorio y su amplia progenie, el pez cebra (*Danio rerio*) ha sido utilizado como modelo para el estudio de diversas enfermedades bacterianas, entre las que se encuentran patógenos de humanos como *S. enterica* (129), *Pseudomonas aeruginosa* (27), y *Escherichia coli* (85), entre otras, pero también se han establecido infecciones exitosas con otros patógenos de peces, como *Edwardsiella tarda* (133), *Mycobacterium marinum* (131), *V. anguillarum* (86) y *Francisella noatunensis* (20), entre otros. Los estudios realizados en distintas especies de *Francisella* demostraron que variando la especie bacteriana, y algunas condiciones como la temperatura o el lugar de inyección de la bacteria, pueden observarse distintos tipos de infecciones, desde la formación de granulomas no letales, hasta infecciones altamente letales en poco tiempo (20). Tomando en consideración estos factores, y la alta similitud entre *P. salmonis* y bacterias del género *Francisella*, es que esperamos poder implementar el pez cebra como un modelo animal para realizar infecciones con *P. salmonis*.

## 1.4 Hipótesis

Los plásmidos de *P. salmonis* codifican factores de virulencia que se expresan en condiciones de infección, tanto en modelos alternativos como en cultivos celulares.

La capacidad de *P. salmonis* de infectar cultivos celulares de salmónidos y el modelo alternativo de infección, *Danio rerio*, permite estudiar y comparar la expresión de factores de virulencia y la respuesta del hospedero a la infección.

## **1.5 Objetivo general**

Predecir posibles factores de virulencia presentes en los plásmidos de *P. salmonis*. Desarrollar un modelo alternativo de infección en el pez cebra (*D. rerio*) que permita identificar posibles factores de virulencia bacterianos, y comparar su expresión en este modelo alternativo y en modelos clásicos de infección en células de salmón, así como la respuesta de distintos hospederos frente a la infección por *P. salmonis*.

## **1.6 Objetivos específicos**

1.6.1 Aislar y caracterizar los plásmidos de la cepa de referencia LF-89 de *P. salmonis*, y compararlos con otras cepas.

1.6.2 Desarrollar y estandarizar la infección de *P. salmonis* en distintos modelos, tanto *in vitro* con cultivos celulares de salmónidos y de pez cebra, como *in vivo* en larvas de pez cebra.

1.6.3 Identificar mediante proteómica probables factores de virulencia presentes en los plásmidos que se expresen diferencialmente en condiciones de infección en cultivos celulares de macrófagos de salmón.

1.6.4 Evaluar la expresión de los posibles factores de virulencia identificados en el objetivo anterior en cultivos celulares derivados de salmón, y en cultivo primario de pez cebra utilizado como modelo alternativo.

1.6.5 Comparar la respuesta de los distintos hospederos frente a la infección con *P. salmonis*.

## 2. Materiales y métodos

El enfoque experimental de este trabajo busca estandarizar las condiciones para el cultivo e infección de líneas celulares SHK-1 y ASK de salmónidos, utilizadas anteriormente para estudios con la bacteria *P. salmonis*, y establecer infecciones en el pez cebra que permitan estudiar los factores de virulencia bacterianos. Para ello, se utilizaron dos aproximaciones: primero, se buscó establecer infecciones en larvas de pez cebra debido a sus múltiples ventajas de uso, especialmente su transparencia y disponibilidad de transgénicos que permiten seguir la infección en vivo, y a la gran cantidad de estudios que respaldan su uso para la infección con múltiples patógenos; y segundo, ya que no existen disponibles cultivos celulares de pez cebra homologables con las líneas celulares de salmónidos utilizadas para generar infecciones con *P. salmonis*, se desarrollaron cultivos primarios derivados de riñón de peces cebra adultos.

Una vez establecidas las distintas condiciones de cultivo e infección, se evaluó la expresión génica de la bacteria y del hospedero, con el objetivo de identificar, por una parte, posibles factores de virulencia plasmidiales que se expresen en los distintos modelos de infección, y por otra, comparar la respuesta de los diferentes hospederos frente a una infección con este patógeno.

### 2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para este estudio se utilizó la cepa de referencia LF-89 de *P. salmonis* (ATCC VR-1361), y dos aislados ambientales obtenidos desde salmones enfermos en la X Región de Chile, una cepa aislada desde el riñón de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) denominada PSCGR01, y otra aislada del hígado de un salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) llamada PSCGR02. Todas las bacterias fueron cultivadas en el medio líquido libre de sangre AUSTRAL-SRS [30 g/L de caldo CASO (Merck), 15 g/L NaCl, 10 mg/L FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 g/L L-cisteína, 2,5% suero fetal bovino inactivado.(144)], a 18°C y agitación moderada (140 rpm). Las bacterias crecidas en cultivo líquido fueron sometidas a análisis de posibles contaminantes. Para ello, se tomaron alícuotas de los cultivos para realizar tinciones de Gram (Gram stain kit, BD), y RFLP

(polimorfismo del largo de fragmentos de restricción), según se ha descrito anteriormente (73). Brevemente, a partir de 5 µL de cultivo se amplificó por PCR utilizando la enzima GoTaq® (Promega), un fragmento de gen ribosomal 16S con los partidores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3') con las siguientes condiciones: 2 min a 95°C, seguido de 30 ciclos con 30 s a 95°C, 1 min a 62°C y 1 min a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C. El producto de PCR fue digerido con la enzima de restricción PmlI (*FastDigest*, Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante, los fragmentos separados en un gel de agarosa al 1%, y la migración de estas se comparó con un control puro de *P. salmonis* LF-89.

Para estimar la fase de crecimiento y la cantidad de bacterias de los cultivos, se midió la densidad óptica de estos a 600nm (DO<sub>600nm</sub>) y se contaron las células en cámaras de recuento Neubauer *improved* o Petroff-Hausser, según las indicaciones del fabricante.

## **2.2 Extracción, purificación y secuenciación de los plásmidos**

Cultivos de la cepa LF-89 de *P. salmonis* fueron crecidos en a 18°C con agitación hasta la fase exponencial de crecimiento (4 días). Debido al tamaño predicho de los plásmidos (mayor a 30kb), se utilizó el protocolo de extracción de megaplásmidos descrito por Anderson y McKay (5), el cual ha sido optimizado para obtener mayores concentraciones de ADN plasmidial con menor cantidad de ADN cromosómico, pero con menos pureza, por lo que el producto de la extracción fue secuenciado en conjunto con una purificación obtenida con un kit comercial (*Plasmid Midi Kit*, Qiagen®). La integridad y pureza de las muestras se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, y fue cuantificada por absorbancia en un NanoQuant (Tecan), y por fluorescencia con Qubit (Life Technologies).

## **2.3 Secuenciación y anotación de los plásmidos, e identificación de posibles factores de virulencia**

La construcción de la librería de ADN plasmidial de *P. salmonis* y su secuenciación se realizó en la empresa MacroGen (Corea). El ensamble de las secuencias PacBio se realizó

utilizando HGAP3 (26) o WGS-Assemblies 8.2 (82) y fueron corregidos con una librería Illumina utilizando el software bwa-aligner (68), según se realizó anteriormente (95). Una vez identificados los posibles marcos de lectura abiertos (ORFs, *Open Reading Frames*) presentes en los plásmidos, se utilizaron las herramientas bioinformáticas PROSITE, InterPro y MOTIF para identificar dominios eucariontes, o dominios presentes en factores de virulencia de otras bacterias, en conjunto con la base de datos de factores de virulencia (*Virulence Factor Database*, VFDB), con el fin de identificar posibles factores de virulencia.

## **2.4 Alineamiento de secuencias plasmidiales de *P. salmonis***

Las secuencias de los genomas anotados de 19 cepas de *P. salmonis* fueron descargados de la base de datos de NCBI (*National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 10-01-17). Las secuencias plasmidiales de cada cepa se unieron en un “pseudo-genoma”, correspondiente a la secuencia concatenada de todos los plásmidos de una cepa dada. Utilizando el *software* progressiveMAUVE (Darling, 2010) en la plataforma CyVerse ([www.cyverse.org](http://www.cyverse.org)) con parámetros estándar, se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias genómicas y plasmidiales de las 19 cepas de *P. salmonis*, utilizando la LF-89 como referencia.

Por otro lado, se realizó un alineamiento para buscar regiones de similitud entre los genes predichos como factores de virulencia en la cepa LF-89, y los distintos plásmidos de las 19 cepas de *P. salmonis*, con la herramienta en línea BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* (3)). El análisis se realizó con la secuencia nucleotídica completa de cada marco de lectura abierto en formato FASTA, utilizando como corte una cobertura de secuencia superior a 90%, con una identidad de secuencia superior al 80%.

## **2.5 Síntesis de oligonucleótidos marcados con digoxigenina para *southernblot* de los plásmidos**

Como una forma de verificar experimentalmente la predicción bioinformática de la secuencia de los plásmidos, así como su presencia en otras cepas de *P. salmonis*, se diseñaron

sondas de ADN en base a los resultados de la secuenciación de los plásmidos de la cepa LF-89. Las sondas fueron marcadas con digoxigenina y diseñadas para hibridar con una zona específica y única en cada plásmido. El ADN plasmidial purificado fue utilizado como templado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los plásmidos listados en la Tabla 1. La PCR fue realizada con la enzima de alta fidelidad KOD polimerasa (*KOD Hot Start DNA polymerase*, Merck), según las instrucciones del fabricante, en las siguientes condiciones: 2 min a 94°C, seguido de 30 ciclos con 30 s a 94°C, 30 s a 53,4 o 55,5°C (dependiendo del partidor) y 2 min a 72°C, con una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se fraccionaron en un gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1mM, pH 7,6), que se corrió a 100 voltios por 20 minutos. Las bandas correspondientes a cada sonda fueron cortadas del gel, y purificadas con un kit de purificación de ADN desde gel (*Gel Extraction Kit*, Omega Biotek). Las sondas purificadas se sometieron a una segunda PCR en las mismas condiciones anteriores, pero incorporando los nucleótidos marcados con digoxigenina (DIG), usando el *DIG DNA Labeling Mix* (Roche Diagnostics GmbH), según las instrucciones del fabricante (35). Los productos de PCR correspondientes a las sondas fueron nuevamente purificados desde un gel de agarosa al 0,8%, y cuantificados por absorbancia con un Nanofotómetro (LabelGuard™ Microliter, *dsDNA mode*, Nanophotometer™ IMPLN 2.1).

Tabla 1. Secuencia de partidores y características de las sondas utilizadas para detectar los plásmidos identificados en la cepa LF-89 de *P. salmonis*.

Sonda	Plásmido	Partidor	Secuencia del partidor	Tm (°C)	Amplicón (pb)
sP1_34	pPSLF89-1	sP1_34F	AAGTGCGCCTACTCTTGCTT	58,4	1578
		sP1_34R	ACGCTGTAGCTTGCCAAATC	58,4	
sP2_32	pPSLF89-2	sP2_32F	TGCTTAGCACTCCATGGCTC	60,5	1033
		sP2_32R	TCGACTTCGCCTGTTTTTGC	58,4	
sP3_52	pPSLF89-3	sP3_52F	GGCAACAATCGGTTCTTTAGTT	58,4	2012
		sP3_52R	TGGTGACCACATCTGCACTG	60,5	
sP4_02	pPSLF89-4	sP4_02F	TGTTGGTATCGCTGTCCGAT	58,4	1102
		SP4_02R	ATCAACCCAAAAGCCAGCCT	58,4	

## 2.6 Análisis de los plásmidos por *Southern blot*

Las sondas marcadas con DIG fueron probadas en un ensayo de *dot-blot* para evaluar la eficiencia de detección y marcaje de sus secuencias blanco. Diluciones seriadas de la sonda fueron puestas en gotas directamente en una membrana de nylon con carga positiva, y visualizadas con el procedimiento estándar de detección de DIG (35).

Los plásmidos purificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0,6% en buffer TBE 0,5X (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) a 50 voltios por 4 horas. El gel fue incubado en HCl 0,25 M por 30 min, lavado tres veces con agua destilada (dH<sub>2</sub>O), y el ADN desnaturado con una solución de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M por 20 min (dos lavados con esta solución). Antes de hacer la transferencia, el gel se lavó dos veces por 20 min con una solución neutralizante (NaCl 1,5M, Tris, 05 M, EDTA 10 mM, pH 7,2). El ADN del gel fue transferido a una membrana de nylon con carga positiva, dejándola incubar toda la noche con papeles filtro Whatman 3MM sumergidos en buffer de transferencia SSC 10X (NaCl 1,5 M y citrato de trisodio 150 mM, pH 7). Luego de la transferencia, la membrana se lavó con buffer 2X SSC (NaCl 300 mM y citrato de trisodio 30 mM, pH 7), el ADN fue unido a la membrana covalentemente por calor (2 horas a 80°C), e hibridado con las distintas sondas marcadas con DIG. Los procedimientos de hibridación y revelado fueron realizados según lo indicado en los protocolos (35). Brevemente, las membranas unidas al ADN fueron lavadas con buffer 2X SSC y luego dH<sub>2</sub>O, antes de incubar con el buffer DIG *Easy Hyb* (Roche Diagnostics GmbH) a 42°C. Las sondas marcadas con DIG fueron desnaturadas a 95°C por 5 min, y luego co-incubadas con las membranas en buffer DIG *Easy Hyb* a 42°C toda la noche. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron dos veces con buffer SSC 0,1X + SDS 0,1% por 10 min a 68°C. Luego de enjuagar las membranas con buffer de ácido maleico (ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), fueron bloqueadas con el reactivo de bloqueo (ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, 5% leche descremada, pH 7,5) por 30 min. Las sondas marcadas con DIG unidas a las membranas, fueron detectadas con el anticuerpo anti-digoxigenina diluido en buffer de ácido maleico, y reveladas con anti-Digoxigenina-AP (NaCl 100 mM, Tris 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 9,5), NBT y BCIP (Sigma-Aldrich). Las membranas teñidas se lavaron con dH<sub>2</sub>O y fotografiaron para su posterior análisis.

## 2.7 Cuidado y mantención de peces cebra

En este trabajo se utilizaron larvas y adultos de peces cebra (*Danio rerio*) para distintos fines. Larvas silvestres y transgénicas fueron utilizadas para ensayos de infección por inyección sistémica, mientras los adultos se utilizaron para el desarrollo de cultivos primarios a partir de riñón. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas y estándares aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Chile.

Las larvas se obtuvieron por cruce de peces cebra adultos Tab5 silvestres, o transgénicos Tg(*mpx:eGFP*)(97) y Tg(*mpeg1:Dendra2*)(38), y fueron mantenidas a 28°C en medio embrionario E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,33 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,3 mM) con 0,1% de azul de metileno hasta las 48 horas post-fecundación (hpf). En este estado las larvas fueron decorionadas manualmente y transferidas a medio fresco sin azul de metileno.

Los peces adultos silvestres AB fueron obtenidos de las instalaciones del *Aleström Zebrafish Lab*, en la Escuela Noruega de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Oslo. Previo a la disección, los peces fueron sacrificados con una dosis letal de triclaína en frío.

## 2.8 Desarrollo de un modelo de infección con *P. salmonis* en larvas de pez cebra

Las infecciones se realizaron en embriones de pez cebra de 2 días post-fecundación (dpf) mediante microinyección de suspensiones bacterianas, a 22°C, según lo descrito por Brudal y colaboradores para bacterias del género *Francisella* (20). Embriones silvestres de peces Tab5 de 48 hpf fueron decorionados, y anestesiados con triclaína (aproximadamente 170 µg/mL de triclaína metanosulfonato MS-22 a pH 7,4) por un par de minutos, y colocados en camas de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en medio E3 antes de la inyección. Los embriones fueron inyectados en la vesícula ótica, músculo de la cola y circulación sistémica, además se microinyectaron huevos fecundados en estado de 8-células. Las microinyecciones se realizaron con un micromanipulador Narishige Inc, utilizando agujas de borosilicato cargadas con una suspensión bacteriana de aproximadamente 20.000 bacterias por embrión, en solución salina PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM), e incubados a 22°C. Los peces inyectados se monitorearon diariamente hasta los 12

días post-infección (dpi) y se contabilizaron las muertes, con lo cual se construyeron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. La inflamación generada en respuesta a la bacteria se siguió en el tiempo mediante la observación del reclutamiento y migración de macrófagos o neutrófilos a la zona infectada en las líneas transgénicas, las que se visualizaron con una lupa estereoscópica de fluorescencia Olympus MVX10. Las imágenes fueron procesadas con el programa *ImageJ*.

## **2.9 Fijación y permeabilización de larvas para inmunofluorescencia**

Las larvas inyectadas se seleccionaron y sacrificaron con una sobredosis de triclaína en hielo. Fueron sumergidas en una solución de fijación (para-formaldehído al 4% en PBS) y se incubaron por 60 min a temperatura ambiente con agitación leve. Posteriormente se lavaron con metanol, solución en la que se guardaron a -20°C hasta su uso. Antes de la inmunofluorescencia doble, las larvas se despigmentaron con agua oxigenada. Para ello, fueron lavadas con PBST (PBS+ 1% Tween 20) dos veces por 15 min en agitación constante y suave. Se reemplazó el PBST por una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y KOH al 1% en dH<sub>2</sub>O, y se incubaron en oscuridad por 20 min, y se lavaron tres veces con PBST por 5 min en agitación suave. La digestión se llevó a cabo con Proteinasa K en PBST (30 µg/mL para larvas de 72 hpf, y 80 µg/mL para 4 dpf en adelante) por 20 min, luego de lo cual se lavó 4 veces con PBS por 5 min en agitación, y 1 hr en dH<sub>2</sub>O y agitación. Se incubó con acetona fría por 7 min y se lavó con PBST 4 veces por 5 min en agitación. El bloqueo se realizó con NCS-PBST (0,1% de suero de cordero y 0,01% de DMSO en PBST) por 2 h a temperatura ambiente. Se agregaron los anticuerpos primarios diluidos 1:250 en NCS-PBST (anti-GFP en conejo (Thermo Fischer Scientific) y anti-*P. salmonis* en ratón (Grupo Bios)), y se incubó toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente. Se lavó el anticuerpo primario con PBST 4 veces por 20 min en agitación constante. Los anticuerpos secundarios (anti-conejo acoplado a Alexa Flúor 594®, y anti-ratón acoplado a Alexa Flúor 488®, Thermo Fischer Scientific), diluidos 1:250 en PBST se incubaron con las larvas por 3 hrs a temperatura ambiente y oscuridad. Se lavaron con PBST 4 veces por 20 min en agitación constante y oscuridad, y permanecieron a 4°C en PBST hasta su uso.

## 2.10 Cultivos primarios de riñón (CPR) de pez cebra adulto

La metodología de extracción de tejidos y de generación de cultivos primarios a partir de ellos, fue realizada en base a lo descrito anteriormente(6). Los peces sacrificados se adosaron a una bandeja de plumavit para proceder a la disección. Con un corte longitudinal desde la apertura urogenital hacia boca del pez, se abrió la cavidad abdominal y se colectó el riñón con pinzas. El órgano se sumergió inmediatamente en medio L15+5% de SFB, suplementado con una mezcla de antibióticos para cultivo celular PenStrep (*Penicillin-Streptomycin* 5.000 U/mL, Thermo Fisher Scientific). Un total de 10 riñones por tubo se procesaron para formar un cultivo primario de riñón de pez cebra adulto (CPR) en un frasco T25. Para ello, el tejido se disgregó mecánicamente al pasarlo por un filtro (Corning® *sterile cell strainer* 40 µm Nylon, Sigma-Aldrich), se homogenizó con pipeta y se contabilizaron las células en cámaras de conteo Bürker antes de sembrar. A cada frasco T25 se adicionaron 800.000 células, medio L15 fresco con 5% de SFB y antibióticos (PenStrep con Gentamicina a 50 µg/mL), y se incubó a 20°C por 24 horas para dejar adherir a las células. Luego de este periodo, se colectó el sobrenadante de los cultivos con células no adheridas, los frascos se lavaron suavemente con PBS, y se agregó medio fresco L15 + 5% SFB sin antibióticos. Las células del sobrenadante descartado fueron contabilizadas en una cámara Bürker, y con ello se estimó la cantidad de células adheridas para calcular la multiplicidad de infección (MOI).

Las infecciones se realizaron con cultivos de *P. salmonis* LF-89 en fase estacionaria de crecimiento en cultivo líquido (10-14 días) a un MOI=100. Los cultivos primarios se co-incubaron con las bacterias (o con medio AUSTRAL-SRS como control) por 24 horas a 20°C. Luego de esto, los cultivos se lavaron con PBS estéril y se incubaron 6 h con medio L15 + 5% SFB suplementado con 50 µg/mL de Gentamicina. Este momento, luego de incubar con Gentamicina, fue denominado tiempo cero (0 dpi). Para la visualización con microscopio confocal y para la inmunohistoquímica, las células fueron sembradas en cámaras de 8-pocillos tratadas para cultivo (*Lab-TekII Chamber slide with cover RS Glass slide sterile*, Thermo Fisher Scientific). 200.000 células fueron sembradas en cada pocillo de la cámara. El protocolo de infección y mantención de los cultivos primarios en las cámaras de 8 pocillos fue el mismo utilizado para los frascos T25.

## **2.11 Cultivo de líneas celulares e infecciones con *P. salmonis***

En este trabajo se utilizaron dos líneas celulares de salmónidos: células SHK-1 (*Salmon Head Kidney-1, General Cell Collection* n° 97111106), derivadas de riñón anterior de salmón atlántico (*Salmo salar*) con características de macrófago, y células ASK (*Anterior Salmon Kidney, ATCC CRL-2747™*), también derivadas de riñón anterior de salmón atlántico, pero con características epiteliales. Ambos tipos celulares fueron cultivados y expandidos a 20°C en frascos de cultivo T25 o T75 estériles, en medio L-15 de Leibovitz (Gibco®, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB, Hyclone™, EE. UU.), 40 µM de β-mercaptoetanol, y una mezcla de antibióticos para cultivo celular PenStrep (*Penicillin-Streptomycin* 5.000 U/mL, Thermo Fisher Scientific).

Las infecciones con *P. salmonis* se realizaron a 80-90% de confluencia, para lo cual el número de células fue determinado contando en una cámara Neubauer. Los cultivos se lavaron tres veces con PBS para eliminar los antibióticos, y el medio se reemplazó por medio L-15 fresco, suplementado con 5% de SFB. Las células se levantaron con tripsina (tripsina 0,25%, Hyclone™), la cual se inactivó con SFB. Una alícuota de esto fue diluida 10 veces en azul tripán, y sólo las células blancas (vivas) se contabilizaron. Las bacterias fueron crecidas en medio líquido hasta la fase estacionaria de crecimiento (10-14 días), y se contaron en una cámara Petroff-Hausser para determinar la multiplicidad de infección (MOI). Las bacterias, o el mismo volumen de medio AUSTRAL-SRS estéril a modo de control, se inocularon en los cultivos celulares y se incubaron 16°C por tres días, y se incubaron 4-6 h con Gentamicina, luego de lo cual fueron lavadas con PBS estéril y posteriormente se incubaron con medio L15 + 5% de SFB a 16°C. Las infecciones se monitorearon diariamente por inspección visual, utilizando un microscopio invertido con aumento 100X.

## **2.12 Estandarización de los ensayos de viabilidad en líneas celulares y cultivos primarios infectados con *P. salmonis***

Para cuantificar el efecto de la infección por *P. salmonis* en los cultivos celulares, se utilizó un ensayo de viabilidad celular con alamarBlue® (alamarBlue *Cell Viability Reagent*, Thermo Fisher Scientific), el cual fue diseñado para medir cuantitativamente la proliferación celular

(33) y la citotoxicidad de diversos agentes (89). Por esta razón, se realizaron algunas modificaciones para su uso en infecciones con bacterias intracelulares.

El reactivo alamarBlue es una tinción indicadora de color azul levemente fluorescente, que cambia de color a un rosado con alta fluorescencia en respuesta a una reducción química irreversible, como resultado de la actividad metabólica celular en células viables. Con este método es posible cuantificar absorbancia y fluorescencia, sin embargo, se utilizó la medición de fluorescencia ya que es más sensible y por tanto más apropiada para realizar ensayos en células de peces a temperaturas menores que las recomendadas para cultivos de células de mamíferos (16-20°C en peces versus 37°C en mamíferos). Para monitorear la reducción del reactivo, se realizaron curvas calibración de la fluorescencia emitida por los distintos tipos celulares. Se realizaron diluciones seriadas (de dos en dos) de cada cultivo celular, las cuales se incubaron con alamarBlue a distintos tiempos. Las células fueron sembradas en placas blancas de 96 pocillos (Nunc™, Thermo Fisher Scientific). Para cada ensayo se sembraron 6 pocillos por condición. Las líneas celulares SHK-1 y ASK se sembraron con medio L15+10% de SFB, mientras el CPR de pez cebra fue sembrado con L15+5% de SFB y mezcla de antibióticos PenStrep. Todas las células se dejaron adherir a las placas por 18-24 hrs a 20°C. Posterior a esto, el medio fue reemplazado por la solución de alamarBlue en medio L15+5% SFB, y se incubó por 4, 6, 8, 24 y 48 hrs a 16°C para las células SHK-1 y ASK, y a 20°C para el CPR de pez cebra, antes de realizar las mediciones.

La fluorescencia fue cuantificada luego de la incubación, excitando a 530-550 nm y midiendo la emisión a 600 nm. Los resultados de estas estandarizaciones se muestran en la Figura 1. La fluorescencia fue exitosamente cuantificada en todos los tipos celulares, y su intensidad fue dependiente tanto de la cantidad de células como del tiempo de incubación, y del tipo celular. En los cultivos SHK-1, la fluorescencia superó el límite de detección del equipo al incubar  $\geq 15.000$  por 48 hrs, lo que no ocurrió con los otros tipos celulares.

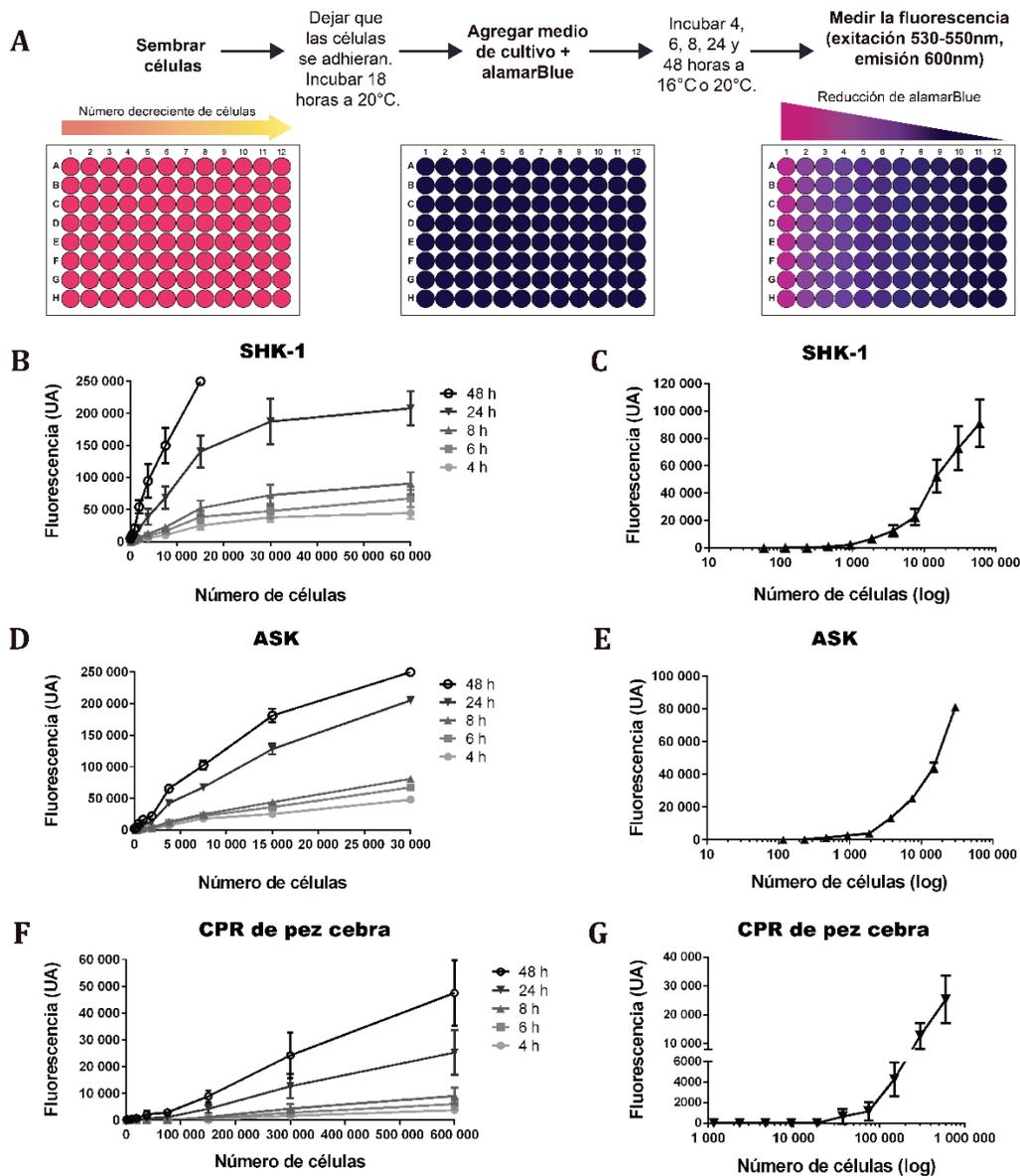


Figura 1. Estandarización de las condiciones para el ensayo de viabilidad celular con alamarBlue. A, esquema del protocolo de alamarBlue adaptado para células de peces. Medición de la fluorescencia (unidades arbitrarias, UA) emitida por la reducción de alamarBlue en distinta cantidad de células, luego de incubar por 4, 6, 8, 24 y 48 horas (promedio  $\pm$  desvest, n=6). B, medición de la fluorescencia emitida por cultivos celulares SHK-1. Se muestran diluciones seriadas (1:2) desde 60.000 hasta 58 células. C, gráfico en escala logarítmica del número de células SHK-1 incubadas con alamarBlue por 8 horas. D, medición de la fluorescencia emitida por cultivos celulares ASK. Se muestran diluciones seriadas (1:2) desde 30.000 hasta 58 células. E, gráfico en escala logarítmica del número de células ASK incubadas con alamarBlue por 8 horas. F, medición de la fluorescencia emitida por cultivos primarios de riñón (CPR) de pez cebra. Se muestran diluciones seriadas (1:2) desde 600.000 hasta 1.100 células. G, gráfico en escala logarítmica del número de células de CPR de pez cebra incubadas con alamarBlue por 24 horas.

Tanto para las células SHK-1 como para las ASK, el rango lineal de detección de células viables se encontró entre 15.000 y menos de 500 células sembradas, con 8 horas de incubación (Figura 1B y 1D). Este tiempo de incubación fue insuficiente para los CPR de pez cebra. La mejor curva para este cultivo se observó incubando por 24 horas con alamarBlue, donde se detectaron más de 30.000 células por pocillo (Figura 1G), lo que corresponde a un 10% de lo sembrado. Para las líneas celulares, se pudo detectar menos de 500 células por pocillo (Figuras 1C y 1E) lo que corresponde al 5% de lo sembrado en este ensayo. Considerando esto, el protocolo para los ensayos de infección fue establecido con 10.000 células SHK-1 o ASK por pocillo incubadas por 8 hrs con alamarBlue, ya que se encuentra en el rango lineal de medición (Figura 1B y 1D) y 20 veces sobre el límite de detección del compuesto. Para CPR de pez cebra se decidió utilizar 300.000 células sembradas por pocillo, cantidad que se encuentra en el rango lineal de la curva al incubar 24 horas con alamarBlue (Figura 1F) y es 10 veces superior al número de células de cultivo primario detectadas en este ensayo. Estos rangos de número de células permiten detectar disminuciones en la viabilidad celular, lo que se espera producto de la infección por *P. salmonis*.

Los ensayos de infección se realizaron según el procedimiento establecido anteriormente. Se sembraron 6 pocillos de SHK-1 y ASK por condición (controles y células infectadas), con 4 y 3 réplicas biológicas respectivamente. Se siguió la viabilidad celular en el tiempo, midiendo la fluorescencia a tiempo cero, 4, 8, 12, 16 y 20 días post-infección (dpi). Se midió la fluorescencia de los cultivos luego de incubar 8 horas con la solución de alamarBlue y antibióticos (dilución 1:10 del reactivo alamarBlue® en medio L15+5%SFB, suplementado con la mezcla PenStrep y 50 µg/mL de Gentamicina), para eliminar las bacterias intra y extracelulares. Las mediciones de fluorescencia se estandarizaron al tiempo cero (día 0 post-infección, luego de lavar las células con antibióticos) y se graficó el porcentaje de viabilidad para hacer comparables los resultados de distintos tipos celulares. Las infecciones en CPR de pez cebra se realizaron con MOI=100, incubación de 24 hrs a 20°C. Se sembraron 5 pocillos por condición, con 3 réplicas biológicas. Se siguió la viabilidad celular en el tiempo, midiendo la fluorescencia a tiempo cero, 2, 4, 6, 8 y 12 dpi. Luego, se lavaron las células con medio fresco con 50 µg/mL de Gentamicina, definiendo en este punto el tiempo cero, antes de incubar por 24 horas con la solución de alamarBlue y antibióticos. La fluorescencia fue cuantificada con los mismos parámetros de la curva de calibración.

## 2.13 Inmunofluorescencia y microscopía confocal en los cultivos celulares

Cultivos de células SHK-1, ASK y CPR de pez cebra fueron sembrados en cámaras de 8 pocillos para microscopía (*Lab-TekII Chamber slide with cover RS Glass slide sterile*, Thermo Fisher Scientific), y se infectaron con *P. salmonis* a un MOI=100. Para las líneas celulares SHK-1 y ASK, se sembraron 40.000 células en cada pocillo, y se infectaron a 16°C por 3 días. Al tercer día, las células se lavaron con PBS, se trató con Gentamicina (50 µg/mL) por 6 h y se agregó medio fresco. A los 6 y 12 dpi, las células se lavaron con PBS y se fijaron por 30 min con PFA al 4% en PBS. De forma similar, pero con algunas modificaciones, se fijaron las células de CPR de pez cebra. Se sembraron 200.000 células en cada pocillo de la cámara. Se lavaron las células no adheridas y se reemplazó el medio por L15 fresco sin antibióticos. Luego de la infección, las células fueron lavadas con PBS y tratadas con Gentamicina por 6 hrs antes de dejarlas con medio L15+5% de SFB sin antibióticos. Estos cultivos fueron fijados a 1 y 5dpi con PFA 4%. Todas las células fijadas se guardaron a 4°C en PBS frío hasta su uso.

El protocolo de inmunofluorescencia fue el mismo para todos los tipos celulares fijados. Luego de lavar las células con PBS, se permeabilizaron por 10 min con 0,5% de Tritón X-100 en PBS. Al remover la solución de permeabilización, se agregó la solución de bloqueo (5% de suero normal de cabra en PBS) y se incubó por 2 h. Las células se lavaron con PBS y se agregó el anticuerpo primario (anti-*P. salmonis* en conejo) diluido 1:50 para las células SHK-1 y ASK, y 1:200 para los CPR de pez cebra, en solución de bloqueo. Esto se incubó toda la noche en oscuridad y agitación suave. Posteriormente, se removió el anticuerpo primario y se hicieron tres lavados con PBS, antes de incubar con el anticuerpo secundario (cabra anti-conejo acoplado a Alexa Flúor 594®) diluido 1:500 (1:1000 para los CPR de pez cebra) en solución de bloqueo. Luego de incubar por 2 hrs protegido de la luz, se removió el anticuerpo secundario y se lavaron las células 3 veces con PBS. Adicionalmente, se realizó una tinción de actina incubando 30 min con 100 nM de faloidina:Alexa Flúor 488® en solución de bloqueo. Posterior a esto, se tiñó el núcleo celular con una solución de DAPI con producto anti-decoloración para montar directamente las células (*ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI*, Life Technologies). Las células teñidas se guardaron en oscuridad a 4°C y se visualizaron en un microscopio confocal Olympus FV1000.

## 2.14 Proteómica cuantitativa de bacterias en estado infectivo

Se determinaron tres etapas características de la infección por *P. salmonis* en las células SHK-1. De éstas, se utilizó una etapa de infección temprana (vacuolización) y una más avanzada (propagación), para analizar por proteómica cuantitativa. Como control, se tomaron cultivos líquidos en fase exponencial de crecimiento para comparar con las bacterias intracelulares provenientes desde infecciones, como se señala en la Figura 2. Las muestras se enviaron a analizar a Bioproximity (Chantilly, Virginia, EE. UU.), mediante proteómica de alto rendimiento *Q-exactive*, basado en espectrometría de masas con espectrómetro de cuadrupolo *Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer*. Esta técnica permite analizar muestras sin procesar, con una baja cantidad de proteínas.

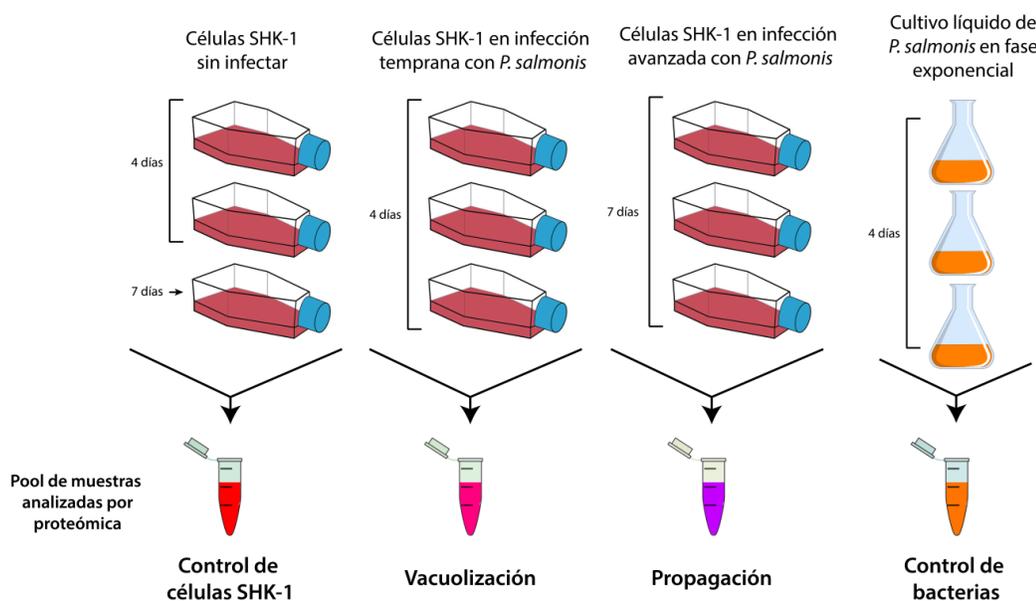


Figura 2. Esquema de las muestras analizadas por proteómica. Cada muestra se compone de un *pool* de tres réplicas biológicas. Cultivos de células SHK-1 en frascos T25 fueron inoculadas con bacterias (muestras vacuolización y propagación), o con el mismo volumen de medio AUSTRAL-SRS (muestra control de células SHK-1). La muestra de vacuolización se coincubó con las bacterias por tres días, se lavaron las bacterias y al cuarto día post-infección se colectaron las células y congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La muestra de propagación fue infectada al igual que la de vacuolización, y al día 7 post-infección las células se colectaron para congelarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La muestra control se compone de un duplicado biológico de células cultivadas por 4 días luego de agregarles medio de cultivo bacteriano, y una réplica de 7 días. En cada muestra se concentraron  $7,07 \times 10^5 \pm 6,7 \times 10^4$  células SHK-1, un total de  $7,2 \times 10^5$  bacterias en vacuolización, y  $9,06 \times 10^7$  bacterias en propagación. Para el control de bacterias en cultivo líquido, se juntaron tres cultivos con  $\text{DO}_{600} \sim 0,5$  y un total de  $9,06 \times 10^7$  bacterias fueron centrifugadas, lavadas y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

El análisis de datos fue realizado para cada muestra, pero de forma separada para las proteínas bacterianas y de salmón. Las proteínas conocidas de todas las muestras fueron identificadas con la base de datos UNIPROT. Para las proteínas bacterianas desconocidas, se realizó una búsqueda con las bases de datos NCBI, GenDB, VFDB, y se realizaron predicciones de la función con ProtFun Server 2.2 y SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*). Se compararon las distintas muestras en base a la presencia o ausencia de cada proteína. Debido a que el genoma de *P. salmonis* se encuentra anotado, se hicieron análisis de enriquecimiento de las proteínas bacterianas con el programa Blast2GO.

## 2.15 Extracción de ARN para RT-qPCR

Se cuantificaron transcritos de bacterias desde cultivos líquidos en medio AUSTRAL-SRS, de bacterias al interior de cultivos celulares, de cultivos celulares SHK-1 y ASK, y de CPR de pez cebra. Se utilizaron 3 réplicas biológicas de cada cultivo celular y bacteriológico. La extracción de ARN desde bacterias de cultivo líquido se realizó con 1 mL de cultivo de 3 días en fase exponencial de crecimiento. Las células se sedimentaron centrifugando a  $8.000 \times g$  por 5 min. Se lavaron con PBS y centrifugaron nuevamente, para luego resuspender en buffer RLT (RNeasy® Mini Kit, Qiagen). Las bacterias se disgregaron y homogenizaron con una jeringa de 27G. Posteriormente, se siguió el protocolo recomendado por el fabricante.

Para cultivos SHK-1 y ASK, se colectaron células infectadas con *P. salmonis* de 6 y 12 dpi, y esos mismos días sin infectar como controles. En los CPR de pez cebra, se colectaron células infectadas y no infectadas (como controles) de 1 y 5 dpi. En todos los casos, se recuperaron las bacterias de sobrenadante al centrifugar el medio de los cultivos a  $6.000 \times g$  por 20 min en una centrífuga Hettich Rotina 420R (v01.11 *swing out rotor* 4723). Las células SHK-1 y ASK se desprendieron con tripsina por 5 min, y esta se neutralizó con medio L15+10% SFB. Las células infectadas y controles fueron colectadas centrifugando 15 min a 4500 rpm. Se descartó el sobrenadante de las células SHK-1 y ASK, y cada muestra se juntó con el sobrenadante de medio de incubación obtenido en el paso anterior. Las células con y sin bacterias, fueron disgregadas y homogenizadas en buffer RLT (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) con una jeringa de 27G. Posteriormente, se siguió el protocolo de purificación de ARN desde cultivos celulares, según las recomendaciones del fabricante.

Las muestras de ARN purificado fueron cuantificadas por absorbancia (Picodrop V2.07 microliter UV/VIS spectrophotometer). La misma cantidad de ARN de cada muestra fue utilizada para la retrotranscripción. Se utilizó un kit comercial de alta sensibilidad (*High Capacity RNA-to-cDNA kit*, Applied Biosystems) para obtener el ADNc. El ADNc resultante fue diluido 200 veces para todas las muestras, antes de cuantificar los transcritos.

## 2.16 Cuantificación de transcritos por PCR cuantitativo

Los transcritos celulares de cada muestra fueron cuantificados por PCR cuantitativo luego de la retrotranscripción (RT-qPCR). Para los cultivos celulares (SHK-1, ASK y CPR de pez cebra) se utilizó un kit con *SYBR Green* (Power™ SYBR™Green Master Mix, Applied Biosystems) según las indicaciones del fabricante, y el equipo LightCycler® 480 (Roche). Los partidores utilizados para estos tipos celulares se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Listado de partidores de *S. salar* y *D. rerio* utilizados para PCR cuantitativo en tiempo real, con los cultivos celulares SHK-1, ASK y CPR de pez cebra. Los PCR fueron realizados en el equipo LightCycler® 480 (Roche), con el *master mix SYBR Green*. Se muestra el nombre de cada gen y entre paréntesis su abreviación.

Especie	Nombre del gen	Nombre del partidor	Secuencia del partidor	Número de acceso
<i>S. salar</i>	18S RNA (18S)	ss18S_F	TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT	AJ427629.1
		ss18S_R	GCAAATGCTTCGCTTTTCG	
<i>S. salar</i>	Factor de elongación 1 alfa ( <i>ef1a</i> )	ssEF1A_F	CACCACCGCCATCTGATCTACAA	AF321836
		ssEF1A_R	TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC	
<i>S. salar</i>	Interferón alfa ( <i>ifna</i> )	ssIFNa_F	CCTGCCATGAAACCTGAGAAGA	XM_014192435.1
		ssIFNa_R	TTTCTGATGAGCTCCCATGC	
<i>S. salar</i>	Interferón gama ( <i>ifng</i> )	ssIFNg_F	TTCAGGAGACCCAGAAACTAC	AY795563
		ssIFNg_R	TAATGAACTCGGACAGAGCCTTC	
<i>S. salar</i>	Interleucina 1, beta ( <i>il-1b</i> )	ssIL1b_F	GGAGAGGTTAAAGGGTGGCG	AY617117
		ssIL1b_R	TCCTTGAACCTCGGTTCCCAT	
<i>S. salar</i>	Interleucina 6 ( <i>il6</i> )	ssil6-F	CAGCTTCTTCTTCAGCACGTTAA	HF913655
		ssil6-R	CGTAGACACCTCACCCAGAAC	
<i>S. salar</i>	Interleucina 8 ( <i>il8</i> )	ssIL8_F	AGCGGCAGATTCAAACCTCAC	BT046706
		ssIL8_R	GTTGTTGGCCAGCATCTTCT	
<i>S. salar</i>	Interleucina 10 ( <i>il10</i> )	ssIL10_F	GAACCTCCGACATCCTTCTC	EF165029
		ssIL10_R	CGTTGATGTCAAACGGTTTCT	

<i>S. salar</i>	Interleucina 12 ( <i>il12</i> )	ssIL12_F	CTGAATGAGGTGGACTGGTATG	BT049114
		ssIL12_R	ATCGTCCTGTTCTCCG	
<i>S. salar</i>	Proteína 1 de unión a guanilato inducible por interferón ( <i>gbp1</i> )	GBP1-F	CGTCAATCAGCTGTCAGAGAACCA	-
		GBP1-R	TCGGAGGCATCCTTGTCTGTTT	
<i>D. rerio</i>	18S rRNA ( <i>18S</i> )	zf18S_F	GCCTGCGGCTTAATTTGACT	NM_001098396
		zf18S_R	ACCACCCACAGAATCGAGAAA	
<i>D. rerio</i>	Factor de elongación de traducción eucarionte 1 alfa 1, tipo 1 ( <i>eef1a11</i> )	zfeef1a11_F	CTTCTCAGGCTGACTGTGC	NM_131263.1
		zfeef1a11_R	CCGCTAGCATTACCTCC	
<i>D. rerio</i>	Interferón gama variante 1 ( <i>ifng1-1</i> )	zflFNg1-1	QuantiTect Primer Assay Dr_ifng1-1_1_SG, Qiagen	NM_001020793
<i>D. rerio</i>	Interferón gama variante 2 ( <i>ifng2-1</i> )	zflFNg1-2	QuantiTect Primer Assay Dr_ifng1-2_1_SG, Qiagen	NM_212864
<i>D. rerio</i>	Interferón Phi 1 ( <i>inphi1</i> )	zfinphi1	QuantiTect Primer Assay Dr_ifnphi2_1_SG, Qiagen	NM_207640
<i>D. rerio</i>	Interferón Phi 2 ( <i>inphi2</i> )	zfinphi2	QuantiTect Primer Assay Dr_ifnphi1_1_SG, Qiagen	NM_001111082
<i>D. rerio</i>	Interferón Phi 3 ( <i>inphi3</i> )	zfinphi3	QuantiTect Primer Assay Dr_ifnphi3_1_SG, Qiagen	NM_001111083
<i>D. rerio</i>	Interleucina 1, beta ( <i>il-1b</i> )	zflL1b_F	QuantiTect Primer Assay Dr_il1b_1_SG, Qiagen	NM_212844
<i>D. rerio</i>	Interleucina 6 ( <i>il6</i> )	zflL6_F	TCAACTTCTCCAGCGTGATG	NM_001114318
		zflL6_R	TCT TTC CCT CTT TTC CTC CTG	
<i>D. rerio</i>	Interleucina 8 ( <i>il8</i> )	zflL8	QuantiTect Primer Assay Dr_il8_1_SG, Qiagen	XM_001342570
<i>D. rerio</i>	Interleucina 10 ( <i>il10</i> )	zflL10	QuantiTect Primer Assay Dr_il10_1_SG, Qiagen	NM_001020785
<i>D. rerio</i>	Interleucina 12 ( <i>il12</i> )	zflL12a	QuantiTect Primer Assay Dr_il12a_1_SG, Qiagen	NM_001007107
<i>D. rerio</i>	iNOS, sintetasa inducible de óxido nítrico tipo 2 a ( <i>nos2a</i> )	zfnos2a	QuantiTect Primer Assay Dr_nos2a_1_SG, Qiagen	NM_001104937
<i>D. rerio</i>	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>tnfa</i> )	zfnTNFa	QuantiTect Primer Assay Dr_tnfa_1_SG, Qiagen	NM_212859
<i>D. rerio</i>	Mieloperoxidasa ( <i>mpx</i> )	zfmPX_F	TGATGTTTGTTAGGAGGTG	NM_212779
		zfmPX_R	GAGCTGTTTCTGTTTGGTG	
<i>D. rerio</i>	Gen 1 expresado en macrófagos ( <i>mpeg-1</i> )	zfmPEG1_F	TACAGCACGGGTTCAAGTCCGT	NM_212737
		zfmPEG1_R	ACTTGTGATGACATGGGTGCCG	
<i>D. rerio</i>	GBP1	gbp1 1SG	Dr_gbp1_1_SG QuantiTect Primer Assay, Qiagen	NM_001002343

Para los transcritos bacterianos, se diseñaron partidores específicos para los ORFs identificados bioinformáticamente. Los partidores diseñados se muestran en la Tabla 3. Los PCR cuantitativos en tiempo real fueron realizados con el equipo AriaMx *Real-Time PCR System* (Agilent) y el kit Takyon™ *qPCR Master-Mix* (Eurogentec), según las indicaciones del fabricante.

Tabla 3. Listado de partidores diseñados para *P. salmonis* utilizados para PCR cuantitativo en tiempo real, en el equipo AriaMx (Agilent) con el kit Takyon™ (Eurogentec). Se muestra el identificador del gen (*locus tag*), la ubicación y descripción del gen, la secuencia del partidor sentido (dirección 5'→3') y del antisentido (dirección 3'→5'), y para qué se utilizó o cuál fue el interés en este estudio (FdeV corresponde a factor de virulencia, TA sistema toxina-antitoxina y hk a gen *housekeeping*).

Locus tag	Ubicación	Descripción	Partidor sentido	Partidor antisentido	Interés en el estudio
PSLF89_2050	cromosoma	RpoS - factor sigma	CGCGAGATTTG TCTCAATCA	GCCACAGGAT CTGCCATATT	estrés celular
PSLF89_2849	cromosoma	SpoT - (p)pppGpp sintasa/hidrolasa	ATGCTGGACG CGGTATTATC	GACATTCCAC ACGAACACG	
PSLF89_1027	cromosoma	PykA (hk)	AGCCATGTGG GTGATGACAG	TCACCACCGA CAACCCTTC	<i>housekeeping</i>
PSLF89_185	cromosoma	Rho (hk)	GCCAAGCGTTT GGTTGAACA	CTGAAGTGG TGCGACCGTA	
PSLF89_2875	cromosoma	GlyA (hk)	GACTCGCGTA CCATTGCAGA	GCACACGCGG ACTCGTATAA	
PSLF89_3	cromosoma	RecF (hk)	CGCCTTCAAGC CAATTGTGG	GCAAGCTTTTC ACCTTGCCA	
PSLF89_1160	cromosoma	Pgi - fosfoglucoasa isomerasa	CGGCACAAATC AATCATCAC	ACCCAGTCCC ACATTGGTAA	verificar la proteómica (control)
PSLF89_2576	cromosoma	MprA – regulador transcripcional	GAGAGCGAGC CTGTCAATCT	CAACCGTAGA GGGATTGCAT	
PSLF89_05390	cromosoma	IcmV - proteína de multiplicación intracelular	CATTGATGACG GCAATTATAGG	CAAGCTGGCC GACTTTAATC	verificar la proteómica (propagación)
PSLF89_1873	cromosoma	DotB - defecto en el tráfico de organelos, proteína DotB	CAGTCGTGAG CCAAAGTGAA	ATAACCGCCTC AAGTGTGG	
PSLF89_2644	cromosoma	OspD3 - enterotoxina	AGCGGCTTATA TCCATGGTG	AATAGTTTCT GCCGCTTGA	
PSLF89_3032	cromosoma	WaaE - glicosiltransferasa de síntesis de LPS	GTGAAGGTTTC GGCGTATGT	CCAGAATCCG CGACAATAAT	
PSLF89_3087	cromosoma	Mce2B - entrada a célula de mamífero	CGTCCGTTAGA ATTGCTGGT	TGCTTGCCGA ACTATCATCA	
PSLF89_3295	cromosoma	Wzb - proteína tirosina fosfatasa	TTAGCGCTGAG CTGATCAAA	CTTCATTACGC CACCTACCC	
PSLF89_615	cromosoma	IcmJ/dotN	TGATGATCGCA ATGGCTAAA	ACCAGAAACC CGACTCAATG	
PSLF89_912	cromosoma	SspA - proteína A de respuesta a estrés por nutrientes	TTTACGCTGGT TGATTGCAG	TGCATCACGA GAAAACAAGC	
PSLF89_3p22	pPSLF89-3	Proteína hipotética, de superficie celular	GGAAGACATG GAAGCACACA	TCGTTCCCAT TTGATTGGT	
PSLF89_07415	cromosoma	IcmV - proteína de multiplicación intracelular	GACAGCAATTG TTGGTGCTG	CATTCCCAAAT AACCGCACT	
PSLF89_1710	cromosoma	FliC - proteína con dominio flagelina	CACTGATCGC GCAAATCTAA	ATTGCGCTGC CTGTAATACC	
PSLF89_1884	cromosoma	icmL/dotI	ATGGCTGGGA GCAGTATTTG	TTTGAGTATCT CGCGAAGCA	
PSLF89_1989	cromosoma	FhuF-like - proteína de biosíntesis de sideróforos	TGGCCATCAG GTTCAATCTT	AACTGGCTTG GGTATTGACG	
PSLF89_2215	cromosoma	LpxK - tetraacetildisacárido 4'-quinasa	CACGAGGTTAT GGCGCTAAT	GGCACACCCG TTAGTTGTTT	

PSLF89_604	chromosoma	lcmE/dotG	CGCTTAAGTGC ACAGGATCA	TATCCCAATCA CCCACCATT	verificar la proteómica (vacuolización)
PSLF89_768	chromosoma	PipB2 - proteína exportada	ATAACCCACAG GAAGCGATG	CGCTGCTGAT GAGTGGATAA	
PSLF89_143	chromosoma	Pbp1A - proteína de unión a penicilina 1A	CTAAGCGCAC CCAAGAACTC	GACGGTGGTG ACAACATCTG	verificar la proteómica (vacuolización y propagación)
PSLF89_1546	chromosoma	RelA - (p)ppGpp sintetasa I, proteína RelA de respuesta a estrés nutricional	TGCGTATTATG GTCGGTGAA	ACCATTTTCTT TTGGCGTTG	
PSLF89_2108	chromosoma	lap/cwhA - proteína lap asociada a la invasión	GGTATGACGG ACGCTTTGAT	ATAGGCTGCTA AGGCAAGCA	
PSLF89_08265	pPSLF89-1	RelE - toxina de sistema TA	TAAGAGCGCTC GGTTATCGT	AGCTGAATTGT GCCTGGAAT	sistema TA_1.3 de plásmido
PSLF89_1p80	pPSLF89-1	Antitoxina de sistema TA	ACGCACAACA GTCGGTAACA	GTACGCCGCA GGAACATTAT	
PSLF89_1p100	pPSLF89-1	Proteína hipotética de cobertura de esporas	TGCACTTGGCA GAGAAAGTG	TGGATTTGCAA GCTCATCAC	verificar la proteómica (propagación)F deV plasmial
PSLF89_1p169	pPSLF89-1	Ymt - toxina murina	ATGTGCAATGG CTATGCTGA	ATCAGGCCAA CTTTCCAATG	
PSLF89_1p194	pPSLF89-1	Proteína hipotética con dominio autotransportador beta	GGCGTTGGAA CTAACGGTAA	GCCTGTTGTA GAGCCACCAT	verificar la proteómica (propagación) plásmido
PSLF89_1p23	pPSLF89-1	Proteína hipotética, familia de reguladores transcripcionales	TTGATGAAGCA AAAGCGATG	GGCCATATCG ACAGGAACAT	
PSLF89_1p174	pPSLF89-1	Proteína Fic de filamentación celular inducida por cAMP	CAGCCTCGTAT GATTGACCA	GGCCATTACC ATCAGCAAAT	verificar la proteómica (control), FdeV plasmial
PSLF89_1p224	pPSLF89-1	PipB2 - proteína hipotética	GCGATGCCAC ACCTAAATCT	TTCTTGTGGCA AATGAGCAG	
PSLF89_1p227	pPSLF89-1	PipB2 - proteína con repetidos de pentapéptido	TGGGTGGAAT CTTGAAGGAG	TTTTTCGCAAC AGTGCCTAA	FdeV plasmial
PSLF89_1p229	pPSLF89-1	PepO - endopeptidasa O	TGAAGACCGT GGATACACACA	GGGAAGAGGT TGAAGAGTCG	
PSLF89_2p14	pPSLF89-2	Proteína HicB de ensamble de pili, toxina de sistema TA	TGCCACTATCG AAGAGCGTA	AGCGCTGAGC TGTTCTTTCT	verificar la proteómica (propagación), toxina de sistema TA_2.2 de plásmido
PSLF89_3p51	pPSLF89-3	PipB2 - proteína con repetidos de pentapéptido	GCGATGCCAC ACCTAAATCT	TTCTTGTGGCA AATGAGCAG	FdeV plasmial
PSLF89_3p54	pPSLF89-3	MoeB - proteína de biosíntesis de molibdopterina	GGAGTGGATC TGGACCTGTG	AGGCTTGCTG GTCTTGTTGT	verificar la proteómica (vacuolización), plásmido
PSLF89_09045	pPSLF89-4	Antitoxina de unión a ADN, de sistema TA	AGCAGAAGAC GTGACCGAGT	TGACTATGCAG GCCAAAATG	sistema TA_4.1 de plásmido
PSLF89_09235	pPSLF89-4	HemL, glutamato-1-semialdehído aminotransferasa	TGGTGCCTCC TGATCTTTG	CAACAGGCAT ACCTCCACCT	FdeV plasmial

### 3. Resultados

Hasta el año 2015 no se encontraba disponible la secuencia del genoma completo *P. salmonis*. De los ocho proyectos de secuenciación disponibles en NCBI, la mitad de ellos correspondía a la cepa de referencia LF-89 (ATCC VR-1361), y la otra mitad a aislados ambientales. Sin embargo, todos ellos estaban depositados como genomas incompletos con número de “contigs” (segmentos superpuestos de ADN que representan una región consenso de ADN) variables entre 227 y 534. Esta configuración de las secuencias de ADN impide hacer inferencias acerca de la presencia y cantidad de elementos genéticos móviles, como plásmidos. Posteriormente, la publicación del genoma completo de *P. salmonis* LF-89 permitió predecir la presencia de tres posibles plásmidos en esta cepa, ya que se encontraron tres “contigs” autocircularizables (95). Otros proyectos de secuenciación posteriores reportaron genomas circulares y plásmidos en nuevas cepas de *P. salmonis*. Por ejemplo, se reportó la presencia de cuatro plásmidos en la cepa PM32597B1 de *P. salmonis* (BioProject PRJNA259745). Debido a que esto corresponde a una predicción bioinformática, se propuso en este trabajo secuenciar el ADN de una extracción enriquecida en la fracción plasmidial, de la cepa de referencia LF-89 y dos aislados ambientales (PSCGR01 y PSCGR02), para verificar la existencia de plásmidos y evaluar su ubicuidad. Las cepas evaluadas en este estudio fueron aisladas desde peces enfermos en el sur de Chile.

#### 3.1 Descripción de los plásmidos de *P. salmonis*, cepa LF-89

Los probables plásmidos de la cepa LF-89 de *P. salmonis* fueron aislados y purificados mediante una extracción manual por medio de solventes orgánicos (5), y mediante un kit comercial (*Plasmid Midi Kit*, Qiagen®). El resultado de esta purificación, más una purificación de ADN genómico, fueron secuenciados por dos técnicas: una para fragmentos largos con baja precisión (PacBio RSII), y otra para fragmentos cortos con alta precisión (Illumina GAIIx). Esto permitió circularizar los fragmentos que presentaban secuencias de inserción, secuencias repetidas (repetidos invertidos y directos) y transposasas, y posteriormente corregir la secuencia con las lecturas de Illumina. El ensamble final de ambas

secuenciaciones (Illumina y PacBio) generó un cromosoma circular de 3.184.851 pb y tres secuencias circulares de 180.124 pb, 33.516 pb y 51.573 pb, según estaba reportado (BioProject PRJNA173790, números de acceso CP011849-CP011852) (95), más un cuarto plásmido de 57.445 pb (Tabla 4, actualmente en NCBI con número de acceso CP013669.1). Estos plásmidos difieren no sólo en tamaño, sino también en cantidad de genes y proteínas, por lo que se realizaron búsquedas bioinformáticas para comparar la identidad de ellos. Se identificaron las probables secuencias codificantes de cada plásmido con los programas Glimmer 3.02, GeneMarkS, RNAmmer 1.2 y tRNAscan-SE 1.21. La anotación funcional de las secuencias codificantes se realizó con Metanor de GenDB. Para la predicción de la función de genes hipotéticos se utilizó ProtFun Server 2.0, y SMART para la búsqueda de dominios funcionales. Finalmente, la búsqueda de probables factores de virulencia se realizó con la base de datos de VFDB (*Virulence Factor Data Base*).

Tabla 4. Listado y características de los plásmidos secuenciados desde la cepa de referencia LF-89 (ATCC VR-1361) de *P. salmonis*.

LF-89					
Plásmido	Tamaño (pb)	%GC	Proteínas	Genes	Pseudogenes
pPSLF89-1	180.124	38,90	197	211	14
pPSLF89-2	33.516	40,61	38	44	6
pPSLF89-3	51.573	39,06	53	57	4
pPSLF89-4	57.445	37,28	60	63	3

Para cada plásmido se utilizaron los parámetros de predicción de NCBI, donde la definición de gen corresponde a una secuencia nucleotídica que comienza con un codón de inicio y uno de término, y la de un pseudogen es una secuencia predicha como gen, interrumpida por otra secuencia o un codón de término, antes de su codón de término predicho. Para visualizar la estructura y el orden de los elementos plasmidiales, se realizaron esquemas para cada plásmido con algunos genes de interés en base a la información de las predicciones bioinformáticas, utilizando la herramienta *DNAPlotter* (Sanger Institute) (22). Se dio importancia a genes que codifican proteínas relacionadas con la replicación y mantención del plásmido en la célula, proteínas posiblemente relacionadas con la virulencia de la bacteria, y proteínas de bacteriófagos. Estas últimas se identificaron mediante la herramienta en línea PHASTER (7, 148), la cual busca regiones nucleotídicas con alta

similitud de secuencia con profagos (bacteriófagos en forma de latencia insertos en el ADN bacteriano). En base a la cantidad de secuencias codificantes presentes que permiten formar un fago infeccioso (como proteínas de la cápside, de la cola, proteasas, integrasas, etcétera), el programa determina si la región corresponde a un fago completo o incompleto. A muchas de las secuencias codificantes presentes en los plásmidos no se les pudo asignar una función, por lo que se indicaron como proteínas hipotéticas o de función desconocida.

### pPSLF89-1

Con más de 180 kb, es el plásmido de mayor tamaño en la cepa LF-89. Dentro de su secuencia se cuentan 211 genes que codifican para 197 proteínas, y 14 pseudogenes. Como se indicó anteriormente, a estas proteínas se les asignó una anotación o función en base a su similitud con ortólogos de otras bacterias. Se identificaron 5 probables profagos, los que en conjunto comprenden el 79% de la secuencia total del plásmido.

Tabla 5. Profagos encontrados en la secuencia del plásmido pPSLF89-1 de *P. salmonis* LF-89. Los bacteriófagos fueron identificados con el programa bioinformático en línea PHASTER. Se muestran las regiones correspondientes a los profagos completos identificados, su tamaño, la posición de inicio y término en el plásmido. El linaje consenso fue asignado en base al mayor número de proteínas para cada linaje. Se muestran las familias con mayor número de representantes.

Región	Tamaño (Kb)	Posición	% GC	% de proteínas del profago	% de proteínas hipotéticas	Número de especies	Linaje de virus (consenso)
1	36,4	6.546-42.955	37,89	63,3	36,7	9	ADN de doble hebra; sin etapa de ARN; Caudovirales; Siphoviridae/Myoviridae
2	30,8	25.095-55.982	39,1	65,4	34,6	7	ADN de doble hebra; sin etapa de ARN; Caudovirales; Siphoviridae/Myoviridae
3	28,1	68.521-96.644	39,58	83,3	16,7	6	ADN de doble hebra; sin etapa de ARN; Caudovirales; Siphoviridae/Myoviridae
4	28,5	105.452-134.001	38,38	46,4	53,6	3	ADN de doble hebra; sin etapa de ARN; Caudovirales; Siphoviridae/Myoviridae
5	18,2	159.247-177.535	38,29	61,9	38,1	4	ADN de doble hebra; sin etapa de ARN; Caudovirales; Siphoviridae/Myoviridae /Podoviridae

Las proteínas virales identificadas son de fagos del tipo cabeza-cola, orden *Caudovirales*, y se encontraron proteínas virales presentes en al menos dos de las tres familias de este orden (Tabla 5). Además de esto, 99 proteínas fueron identificadas como transposasas o integrasas, tanto dentro como fuera de las regiones de profagos. De las 5 regiones de profagos encontradas en este plásmido, las dos primeras se superponen entre sí. No es claro con esta aproximación si ambas regiones pueden conformar un solo profago. En ambas regiones se identificó un sitio de anclaje o fijación del fago y tienen %GC similares, sin embargo, esto también se observó en las regiones 3, 4 y 5.

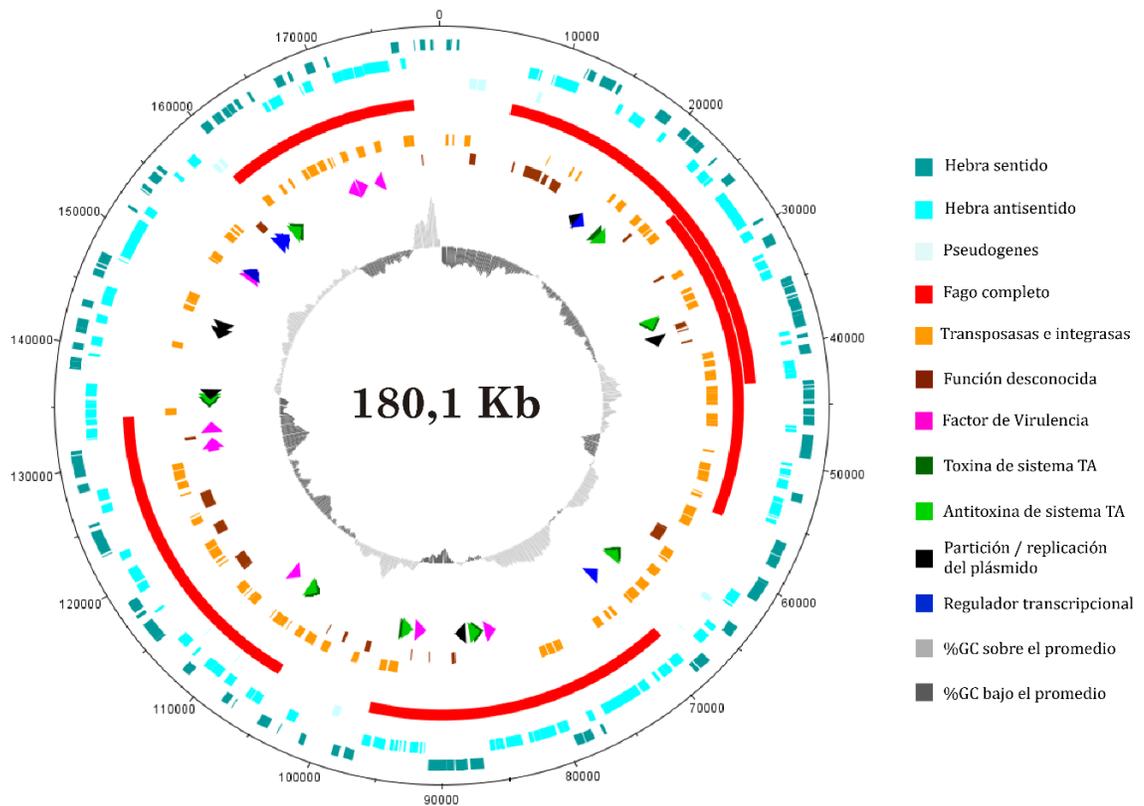


Figura 3. Representación circular del plásmido pPSLF89-1 de *P. salmonis* LF-89. El plásmido fue secuenciado por Illumina y PacBio y los ORFs predichos anotados con GenDB, ProtFun 2.0, SMART y VFDB. El círculo central representa el %GC, en gris claro sobre el promedio y gris oscuro bajo el promedio. Los genes con funciones predichas fueron agrupados en categorías, y la dirección en que se encuentran codificados los genes de interés se indica con flechas. La presencia de fagos fue predicha con PHASTER. En este plásmido se encuentran genes asignados a las categorías de Transposasas e integrasas, Sistema toxina-antitoxina, Partición/replicación del plásmido, Regulador transcripcional, Factor de virulencia y Función desconocida.

Proteínas importantes para la mantención del plásmido dentro de la célula se identificaron tanto dentro como fuera de las secuencias de profagos. Dentro de ellas, destacan dos proteínas de partición, es decir que tienen dominios ParB/RepB/Spo0J o dominios CobQ/CobB/MinD/ParA los cuales se han descrito con esta función en otras bacterias, y cuatro proteínas con funciones de replicación plasmidial (Figura 3, flechas negras). Otro mecanismo descrito en plásmidos que permiten su mantención, son los sistemas toxina-antitoxina (TA). Mediante la herramienta en línea *TA finder* (113) se pudieron identificar ocho distintos sistemas TA de tipo II (Figura 3, flechas verdes). Sumado a esto, se identificaron cinco probables factores de transcripción (Figura 3, flechas azules), nueve probables factores de virulencia (Figura 3, flechas fucsias), y veintinueve proteínas hipotéticas o de función desconocida (Figura 3, rectángulos cafés).

#### pPSLF89-2

Este plásmido es el de menor tamaño de la cepa LF-89, y corresponde casi en su totalidad a un bacteriófago. De los 33,5 kb de plásmidos, un 73,1% de su secuencia (24,5 Kb y 31 proteínas) pertenecen a un profago completo de ADN de doble hebra, con similitud a fagos del orden Caudovirales, familia Siphoviridae (Tabla 6).

Tabla 6. Profago identificado en la secuencia del plásmido pPSLF89-2 de *P. salmonis* LF-89. El bacteriófago fue identificado con el programa bioinformático en línea PHASTER. Se muestra la región correspondiente al profago intacto identificado. El linaje consenso fue asignado en base al mayor número de proteínas de cada linaje.

Región	Tamaño (Kb)	Posición	% GC	% de proteínas de profago	% de proteínas hipotéticas	Número de especies	Linaje de virus (consenso)
1	24,5	1.476 – 25.982	40,56	62,9	37,1	14	ADN de doble hebra; sin etapa de ARN; Caudovirales; Siphoviridae

Dentro del fago, se encontraron proteínas relacionadas con la mantención del plásmido, dos de ellas con proteínas de partición, una con dominios ParB/RepB/Spo0J y otra con dominios CobQ/CobB/MinD/ParA (Figura 4, flechas negras), y dos sistemas TA (Figura 4, flechas verdes). En este profago no se identificó el sitio de fijación, aunque se pudo clasificar

como un fago completo. Otra característica notable es la cantidad de especies virales con proteínas similares a la región 1, un total de 14. Casi la totalidad de esas especies pertenecen a la familia Siphoviridae, orden Caudovirales, pero también se encontraron proteínas con similitud a representantes de la familia Myoviridae, del mismo orden, e interesantemente, se identificaron de forma minoritaria representantes de la familia Inoviridae, cuyos miembros poseen un genoma de ADN de hebra simple, a diferencia de las familias anteriores. Esta familia es poco conocida, y no se le ha asignado orden.

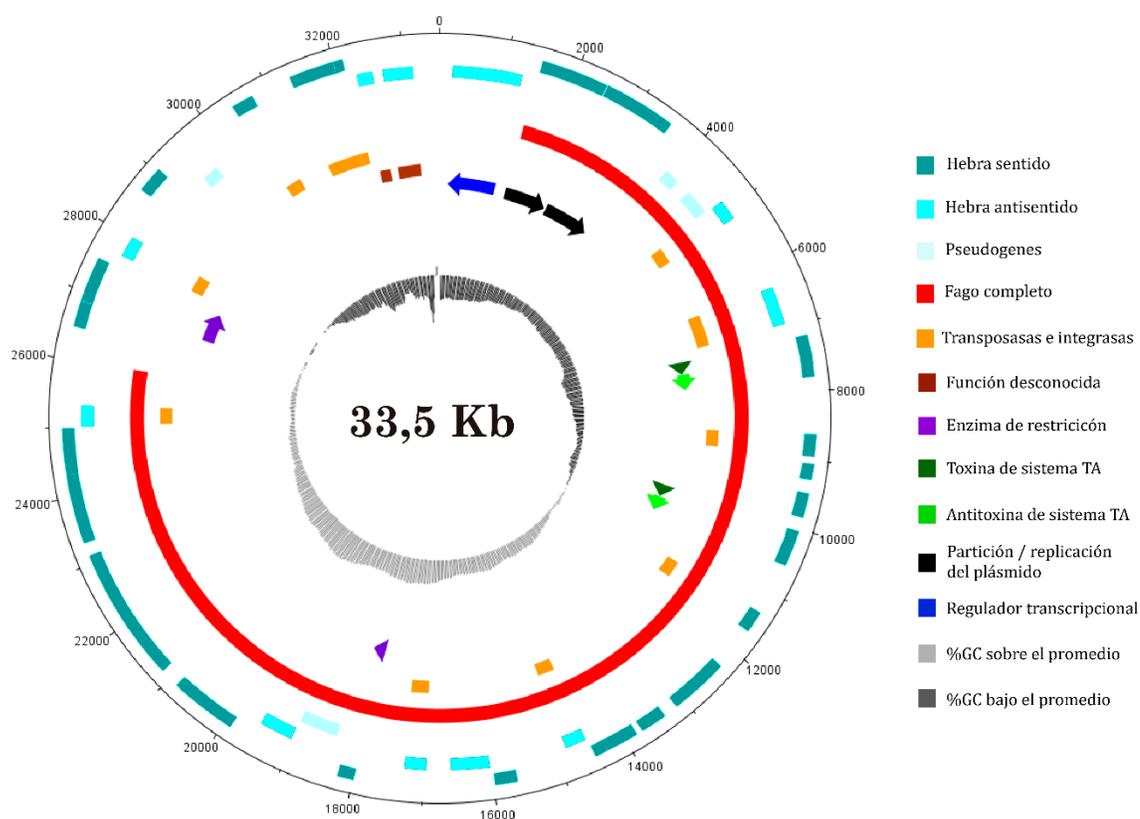


Figura 4. Representación circular del plásmido pPSLF89-2 de *P. salmonis* LF-89. El plásmido fue secuenciado por Illumina y PacBio y los ORFs predichos anotados con GenDB, ProtFun 2.0, SMART y VFDB. Los genes con funciones predichas fueron agrupados en categorías, y la dirección en que se encuentran codificados los genes de interés se indica con flechas. La presencia de fagos fue predicha con PHASTER. En este plásmido se encuentran genes asignados a las categorías de Transposasas e integrasas, Enzima de restricción, Sistema toxina-antitoxina, Partición/replicación del plásmido, Regulador transcripcional y Función desconocida.

Una característica particular de este plásmido es la presencia de dos genes que codifican enzimas de restricción (Figura 4, flechas moradas), una dentro y otra fuera del fago. Además, se identificó un probable regulador transcripcional fuera de la secuencia del fago (Figura 4, flecha azul). En este plásmido no se encontraron proteínas con posible función de factor de virulencia, aunque se identificaron tres proteínas hipotéticas de función desconocida (Figura 4, rectángulos cafés).

### pPSLF89-3

El tercer plásmido de la cepa LF-89 tiene un tamaño intermedio (51,5 kb), y contiene en su secuencia un bacteriófago completo. Con 20,6 kb, este profago corresponde sólo al 40% de la secuencia del plásmido, y se clasificó como un virus de doble hebra de ADN, con similitud a fagos del orden Caudovirales, familia Siphoviridae (Tabla 7), al igual que el observado en el profago del pPSLF89-2. Las proteínas virales en la región tienen similitud de secuencia con 11 especies de fagos conocidos del orden Caudovirales. La región de este profago se describió como un fago completo, aunque no se identificó el sitio de anclaje o fijación. Se identificaron proteínas con función de transposasa, proteínas de la cápside, la cabeza y la cola del fago.

Tabla 7. Profago identificado en la secuencia del plásmido pPSLF89-3 de *P. salmonis* LF-89. El bacteriófago fue identificado con el programa bioinformático en línea PHASTER. Se muestran la región correspondiente al profago. El linaje consenso fue asignado en base al mayor número de proteínas de cada linaje.

Región	Tamaño (Kb)	Posición	% GC	% de proteínas de profago	% de proteínas hipotéticas	Número de especies	Linaje de virus (consenso)
1	20,6	609 – 21.232	41,2	65,4	34,6	11	ADN de doble hebra; sin etapa de ARN; Caudovirales; Siphoviridae

De los 57 genes predichos en este plásmido, 4 son pseudogenes y 53 codifican proteínas. Además de las proteínas estructurales y de movilidad del fago, en su secuencia se encontró

una probable proteína de partición del plásmido (Figura 5, flecha negra), similar a la proteína Soj de *Bacillus halodurans* C-125, y dos proteínas de función desconocida (Figura 5, rectángulos cafés). Fuera del profago, se encontró un probable sistema toxina-antitoxina (Figura 5, flechas verdes), y tres probables factores de virulencia (Figura 5, flechas fucsias). Por otro lado, se identificaron proteínas relacionadas con otras funciones celulares, como un transportador de membrana predicho como una permeasa de arabinosa (*locus tag PSLF89\_3p38*), la proteína MoeB de síntesis del cofactor molibdopterina (*locus tag PSLF89\_3p54*), y seis proteínas hipotéticas de función desconocida (Figura 5, rectángulos cafés).

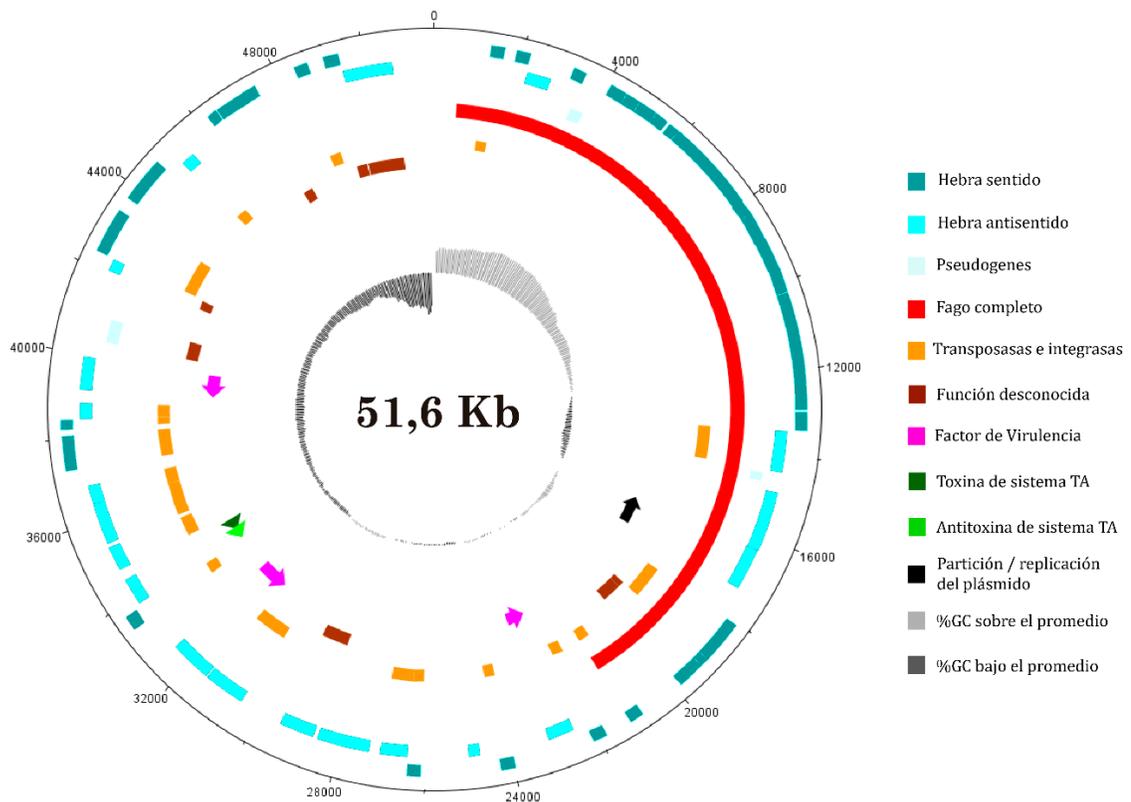


Figura 5. Representación circular del plásmido pPSLF89-3 de *P. salmonis* LF-89. El plásmido fue secuenciado por Illumina y PacBio y los ORFs predichos anotados con GenDB, ProtFun 2.0, SMART y VFDB. Los genes con funciones predichas fueron agrupados en categorías, y la dirección en que se encuentran codificados los genes de interés se indica con flechas. La presencia de fagos fue predicha con PHASTER. En este plásmido se encuentran genes asignados a las categorías de Transposasas e integrasas, Sistema toxina-antitoxina, Partición/replicación del plásmido, Factor de virulencia y Función desconocida.

#### pPSLF89-4

Según la predicción bioinformática, este plásmido corresponde un plásmido conjugativo. Es el único de los plásmidos de la cepa LF-89 que contiene un fago incompleto en su secuencia, además de proteínas relacionadas con la transferencia de ADN y la conjugación plasmidial. La región del fago incompleto encontrado es de sólo 12,9 kb (22,6% del plásmido) y no posee proteínas estructurales esenciales para la formación del fago (cápside, cola, portal, proteínas de cobertura, etc.), y para la invasión de las células como el sitio de adherencia, por lo que no es capaz de formar progenie.

Tabla 8. Profago incompleto identificado en la secuencia del plásmido pPSLF89-4 de *P. salmonis* LF-89. La región del fago incompleto fue identificada con el programa bioinformático en línea PHASTER. El linaje consenso fue asignado en base al mayor número de proteínas de cada linaje.

Región	Tamaño (Kb)	Posición	% GC	% de proteínas de profago	% de proteínas hipotéticas	Número de especies	Linaje de virus (consenso)
1	12,9	6733 – 19700	39,6	52,2	47,8	11	ADN de doble hebra; sin etapa de ARN; Caudovirales; Siphoviridae

Las proteínas identificadas dentro de la región del profago corresponden principalmente a recombinasas, integrasas y proteínas hipotéticas de fagos, pero no se identificaron en esta región proteínas estructurales, de lisis o proteasas virales. Todas estas proteínas identificadas tienen similitud de secuencia con 11 especies distintas de fagos del orden Caudovirales (Tabla 8).

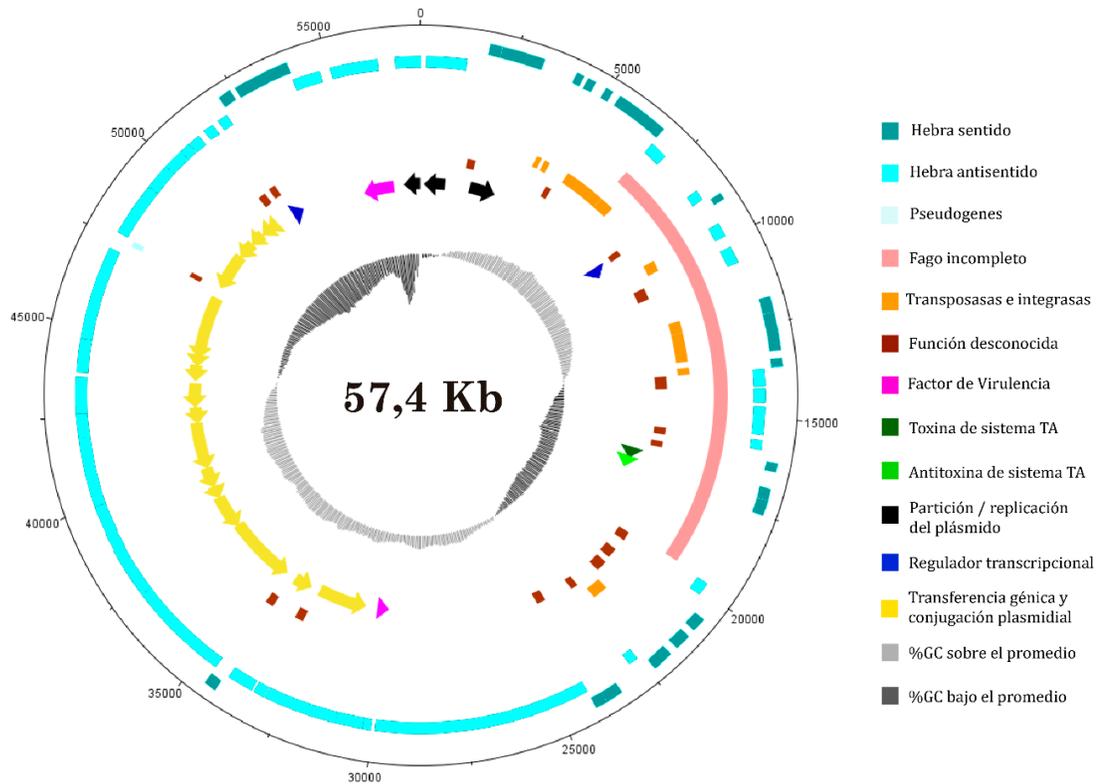


Figura 6. Representación circular del plásmido pPSLF89-4 de *P. salmonis* LF-89. El plásmido fue secuenciado por Illumina y PacBio y los ORFs predichos anotados con GenDB, ProtFun 2.0, SMART y VFDB. Los genes con funciones predichas fueron agrupados en categorías, y la dirección en que se encuentran codificados los genes de interés se indica con flechas. La presencia de fagos fue predicha con PHASTER. En este plásmido se encuentran genes asignados a las categorías de Transposasas e integrasas, Sistema toxina-antitoxina, Partición/replicación del plásmido, Transferencia génica y conjugación plasmidial, Regulador transcripcional, Factor de virulencia y Función desconocida.

Luego de identificar las proteínas presentes en los plásmidos de la cepa LF-89 y hacer una predicción de su función, éstas se catalogaron según el COG asignado. La base de datos de COG (*Cluster of Orthologous Groups*) agrupa proteínas ortólogas en base a su secuencia (122, 123), lo que permite hacer la anotación funcional de las proteínas desconocidas presentes en los plásmidos de *P. salmonis*. En base a esta secuencia se puede predecir la posible función de la proteína desconocida y asignarle una categoría funcional. Esto se realizó para cada plásmido de la cepa LF-89, y se calculó el porcentaje de proteínas pertenecientes a cada COG. Los resultados de los COG representados por al menos una proteína de cada plásmido se muestran en la Figura 7.

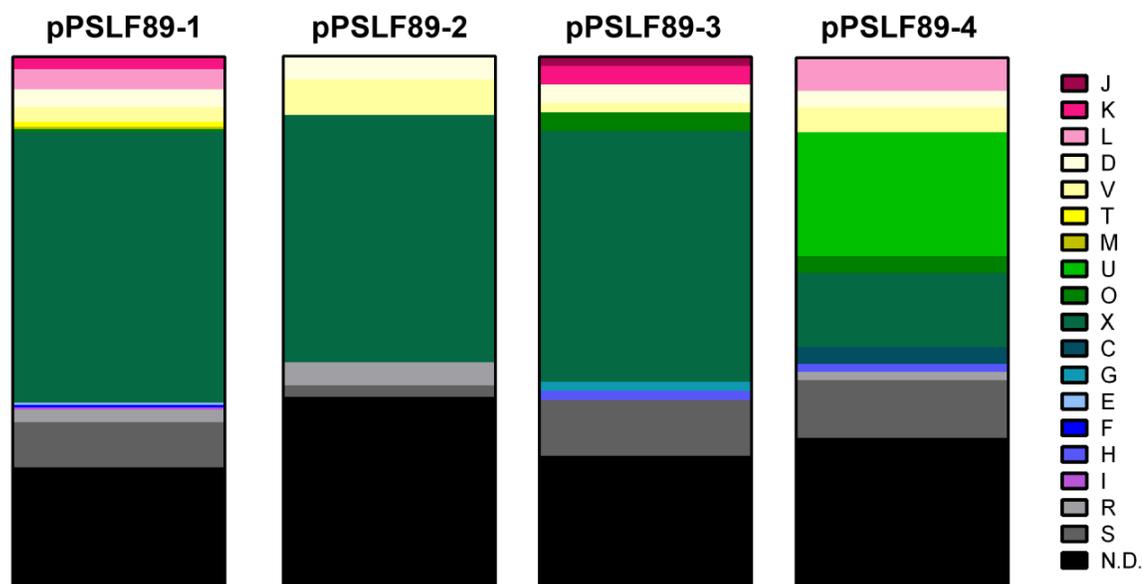


Figura 7. Categorías COG de las proteínas identificadas en los plásmidos de *P. salmonis* LF-89. Porcentaje de proteínas pertenecientes a las categorías COG (*Cluster of orthologous groups*) para cada plásmido. El porcentaje se refiere al número de proteínas perteneciente a una categoría COG, en relación al número total de proteínas del plásmido, para cada plásmido. El código de color muestra las categorías COG encontradas en alguno de los 4 plásmidos: Traducción, estructura y biogénesis de ribosomas (J), Transcripción (K), Replicación, recombinación y reparación (L), Control del ciclo celular, división celular, partición de cromosomas (D), Mecanismos de defensa (V), Mecanismos de transducción de señales (T), Pared celular/membrana/biogénesis de la envoltura (M), Tráfico intracelular, secreción y transporte de vesículas (U), Modificaciones post-traduccionales, recambio de proteínas, chaperonas (O), Moviloma, profagos y transposones (X), Producción y conversión energética (C), Transporte y metabolismo de carbohidratos (G), Transporte y metabolismo de aminoácidos (E), Transporte y metabolismo de nucleótidos (F), Transporte y metabolismo de coenzimas (H), Transporte y metabolismo de lípidos (I), Sólo función general predicha (R), Función desconocida (S), No determinado (N.D.).

En la Figura 7 se observa que los plásmidos presentan categorías COG en común. Se destaca la gran cantidad de proteínas no categorizadas (N.D.), lo que implica que no se conocen ortólogos de éstas. Estas corresponden al 22% de las proteínas del pPSLF89-1, al 35,6% del pPSLF89-2, al 24,6% del pPSLF89-3 y al 28,1% del pPSLF89-4. En todos ellos también se encontraron proteínas en las categorías sin función conocida asignada (R y S en el gráfico). Dentro de las proteínas con función asignada, destaca el COG de Moviloma, profagos y transposones (X), lo que se corresponde con lo observado en las Figuras 4, 5 y 6. Un alto porcentaje de la secuencia de los plásmidos corresponde a profagos, transposasas e integrasas, y al observar la cantidad de proteínas asignadas a la categoría X, esto se condice

con la información anterior. Cabe destacar que la categoría X es predominante en los plásmidos pPSLF89-1, pPSLF89-2, y pPSLF89-3 (51%, 46,7% y 47,4% del total de proteínas, respectivamente). Estos plásmidos contienen al menos un profago completo e intacto en su secuencia, mientras que el plásmido pPSLF89-4 contiene un profago incompleto, y la cantidad de proteínas de la categoría X alcanza sólo un 14,1% del total de proteínas del plásmido. En relación con esto, más el 73% de la secuencia de plásmido pPSLF89-2 corresponde a un profago, lo que se traduce en una menor variedad de COGs de las proteínas que lo constituyen. Las proteínas pertenecientes a las categorías D y V (las otras categorías encontradas en este plásmido) corresponden a proteínas de sistemas TA, enzimas de restricción y de replicación o partición del plásmido.

Los plásmidos pPSLF89-1 y pPSLF89-3, que también tienen un alto porcentaje de proteínas de la categoría X, presentan una mayor variedad de COGs. Al igual que en el pPSLF89-2, las categorías D y V se relacionan con proteínas de replicación o partición del plásmido, y sistemas TA, respectivamente. Sin embargo, destacan proteínas de la categoría T en el pPSLF89-1, que no se encuentran en otros plásmidos, y que corresponden a proteínas de sistemas de dos componentes. En estos plásmidos también se encontraron proteínas relacionadas con la regulación de la transcripción, la traducción y replicación, que se agruparon en las categorías K y L en el pPSLF89-1, y J y K en el pPSLF89-3. De forma minoritaria, se identificaron proteínas en categorías relacionadas con el metabolismo y transporte de carbohidratos (G) y de coenzimas (H) en el pPSLF89-3, mientras proteínas relacionadas con el metabolismo y transporte de aminoácidos (E), de nucleótidos (F) y de lípidos (I), sólo se observaron en el pPSLF89-1. Cabe mencionar que las categorías L y H también están presentes en el pPSLF89-4. En este plásmido la mayoría de las proteínas con función asignada, un 23,4% del total, corresponden a la categoría U (secreción y transporte de vesículas). Estas proteínas se encuentran agrupadas y son parte del sistema de conjugación del plásmido, el sistema de secreción tipo IV-A. Los plásmidos pPSLF89-1, pPSLF89-3 y pPSLF89-4 tienen en común que contienen factores de virulencia. Sin embargo, estos no se catalogan en un solo COG, sino que en su mayoría no tienen COG asignado (N.D.), o tiene función desconocida (S). De los restantes, uno del pPSLF89-1 pertenece a I y uno a K, uno del pPSLF89-3 pertenece a una categoría distinta, la O, y uno del pPSLF89-4 pertenece a la categoría H.

### 3.2 Comparación de los plásmidos presentes en las cepas PSCGR01, PSCGR02 y LF-89 de *P. salmonis*

Una vez estudiados estos plásmidos se quiso saber si éstos eran únicos de la cepa LF-89, o si, por el contrario, son una característica de la especie *P. salmonis*. Para ello, al igual que lo realizado con la cepa LF-89, se secuenciaron otros dos aislados obtenidos desde peces infectados en el sur de Chile: PSCGR01 y PSCGR02.

Tabla 9. Listado y características de los genomas secuenciados en los aislados ambientales PSCGR01 y PSCGR02 de *P. salmonis*.

PSCGR01					
Replicón	Tamaño (pb)	%GC	Proteínas	Genes	Pseudogenes
cromosoma	3.167.361	39,7	2.830	3.166	346
pPSCGR01-1	179.831	38,88	193	211	18
pPSCGR01-2	33.556	40,60	38	45	7
pPSCGR01-3	51.569	39,05	54	58	4
pPSCGR01-4	57.427	37,27	60	63	3
PSCGR02					
Replicón	Tamaño (pb)	%GC	Proteínas	Genes	Pseudogenes
cromosoma	3.205.229	39,7	2.877	3.107	314
pPSCGR02-1	115.926	39,00	131	144	13
pPSCGR02-2	33.498	40,61	38	43	5
pPSCGR02-4	68.882	37,34	67	71	4

La cepa de referencia LF-89 fue aislada originalmente desde un salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) con SRS (31), la cepa PSCGR01 se aisló desde trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en la X región, Chile, año 2010, y la cepa PSCGR02 desde salmón del atlántico (*Salmo salar*) en la X región, Chile, año 2013. Para la cepa PSCGR01, el resultado del ensamblaje fue un cromosoma de 3,17 Mb (número de acceso CP013944.1) y cuatro plásmidos, y para la cepa PSCGR02 un cromosoma de 3,2 Mb (número de acceso CP013975.1) y tres plásmidos, resultados que se resumen en la Tabla 9.

La obtención de estas secuencias permitió diseñar sondas específicas para cada plásmido (Tabla 10), usando como base la secuencia de la cepa LF-89. Se buscaron secuencias únicas de 1-3 kb, que estuvieran presentes en un solo plásmido, y no en los otros ni en el cromosoma bacteriano. Dependiendo del plásmido, estas secuencias corresponden a fragmentos de una secuencia codificante, secuencia no codificante, o pseudogen, como se muestra en la Figura 8.

Tabla 10. Secuencia de partidores y características de las sondas utilizadas para detectar los plásmidos identificados en la cepa LF-89 de *P. salmonis*.

Nombre de la sonda	Plásmido	Secuencia del partidor sentido	Secuencia del partidor antisentido	Tamaño de sonda (pb)
sP1_34	pPSLF89-1	CGGATCGTTACGGCATCTCA	CGGCAGTAAGGTTAAGCCCA	2.967
sP2_32	pPSLF89-2	TGCTTAGCACTCCATGGCTC	TCGACTTCGCCTGTTTTTGC	1.033
sP3_52	pPSLF89-3	TGGCTTTACGCGATGACTATCA	GCTTGAAGTGCTAACTGCCG	1.276
pP4_02	pPSLF89-4	TGTTGGTATCGCTGTCCGAT	ATCAACCCAAAAGCCAGCCT	1.102

En el caso del pPSLF89-1, la sonda se encuentra dentro del profago de la región 1, y corresponde a parte de la secuencia parcial de una transposasa, y a un gen estructural del fago (Figura 8A). La sonda del plásmido pPSLF89-2 también se localiza en un profago, y corresponde a parte de la secuencia de la proteína de la cola del fago (Figura 8B). Distinto es el caso de la sonda del pPSLF89-3, ya que esta se encuentra entre parte de la secuencia de un posible pseudogen y de un gen, ambos de función desconocida (Figura 8C). Por último, la sonda del pPSLF89-4 es parte de un gen del sistema de conjugación de este plásmido, específicamente de la proteína TraB (Figura 8D).

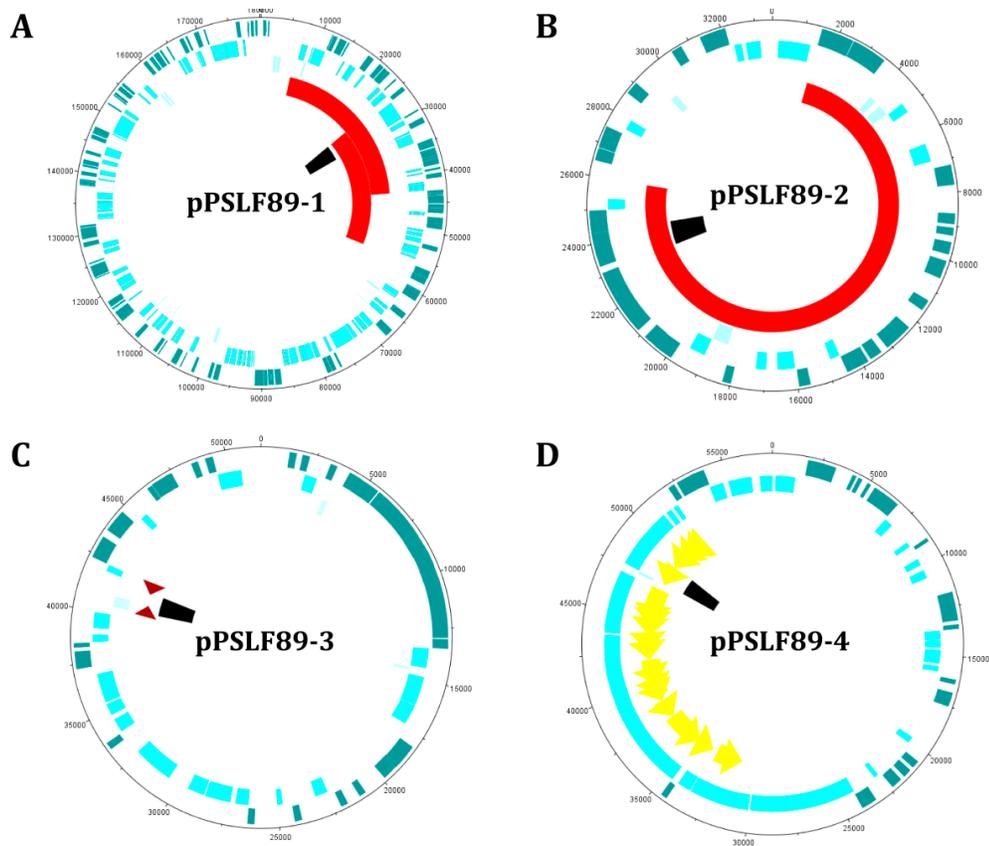


Figura 8. Representación circular de los plásmidos de *P. salmonis* LF-89 con la ubicación de las sondas diseñadas. Desde la parte más externa a la más interna del diagrama, se muestran las secuencias codificantes en la hebra sentido en color celeste oscuro, las secuencias codificantes en la hebra antisentido en color calipso, mientras que los pseudogenes se ven en color celeste agua. Las sondas se muestran como un rectángulo negro. A, pPSLF89-1, la región 1 y 2 de profagos se muestra en rojo. B, pPSLF89-2 la región del profago se muestra en rojo. C, pPSLF89-3, la flecha café en dirección antisentido muestra la región de un gen con función desconocida, la flecha café en dirección sentido muestra la región del pseudogen con función desconocida, y se indica la sonda ubicada entre las dos secuencias. D, pPSLF89-4, en amarillo se muestran los genes pertenecientes al probable SSTIV-A del plásmido conjugativo, y la sonda ubicada en esta región.

En base a estas secuencias únicas se diseñaron sondas específicas para cada plásmido, estas se marcaron con digoxigenina (DIG, Roche), y se utilizaron para identificar las bandas pertenecientes a cada plásmido en las tres cepas de *P. salmonis*. Para observar su patrón de migración, se realizaron purificaciones plasmidiales con un kit comercial (*Plasmid Midiprep kit*, Qiagen®). Parte de la extracción fue digerida parcialmente con la enzima nucleasa S1 con el fin de linealizar los plásmidos e identificar su patrón de migración, según se ha descrito anteriormente (138). Así, se pudo visualizar el patrón de migración de los plásmidos correspondiente a cada cepa bacteriana, y compararlos.

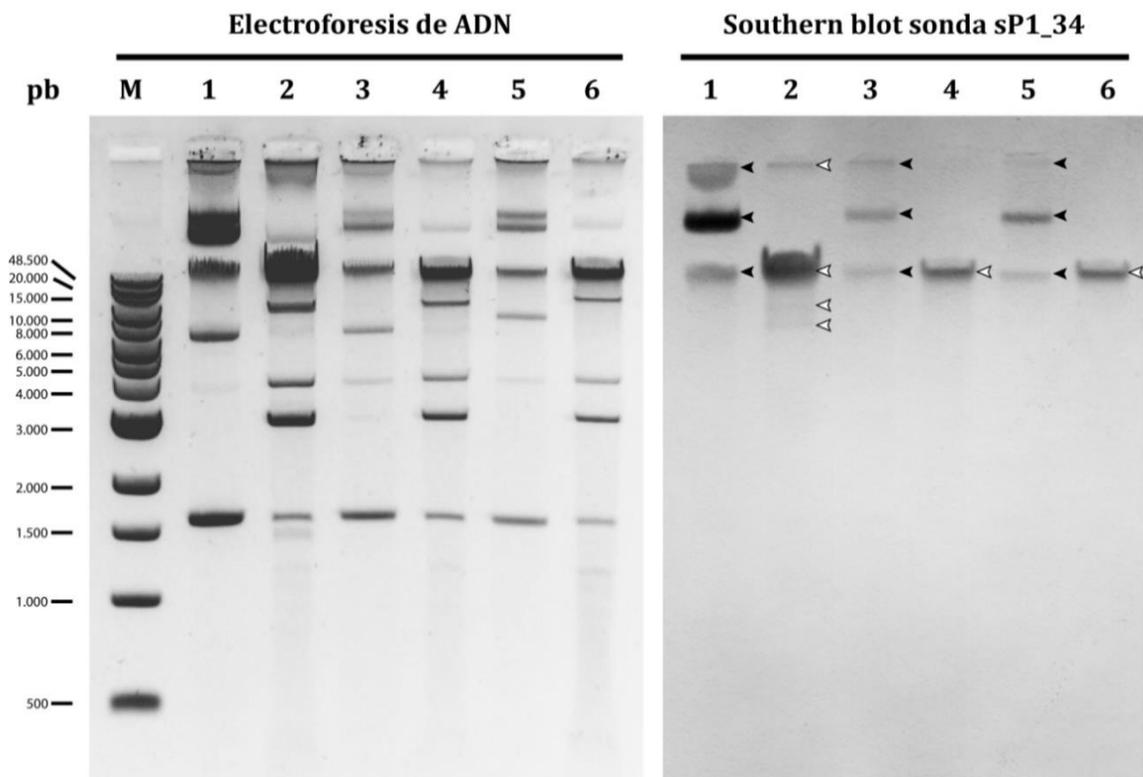


Figura 9. *Southern blot* con la sonda sP1\_34 específica para el plásmido pPSLF89-1 de *P. salmonis*. *Southern blot* de purificaciones de plásmidos de distintas cepas de *P. salmonis* luego de una electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,6%. Panel izquierdo, gel de agarosa al 0,6%, panel derecho *southern blot*. Carril M: estándar de peso molecular de ADN de doble hebra lineal. Carril 1: plásmidos de LF-89 sin digerir. Carril 2: plásmidos de LF-89 digeridos con nucleasa S1. Carril 3: plásmidos de PSCGR01 sin digerir. Carril 4: plásmidos de PSCGR01 digeridos con nucleasa S1. Carril 5: plásmidos de PSCGR02 sin digerir. Carril 6: plásmidos de PSCGR02 digeridos con nucleasa S1. Las flechas negras en el panel derecho indican las bandas identificadas por la sonda antes de la digestión con nucleasa S1, y las flechas blancas indican las bandas luego de la digestión.

En la Figura 9 se muestran las bandas identificadas con la sonda sP1\_34, diseñadas para el plásmido pPSLF89-1. Con esta sonda fue posible detectar bandas en las tres cepas estudiadas. En todas ellas se observó un patrón de bandas distinto luego de la digestión con nucleasa S1, destacándose una banda principal a la altura del peso molecular de 48,5 kb. En la cepa LF-89 se observaron 3 bandas luego de la digestión, y una en las cepas PSCGR01 y PSCGR02. Por tanto, fue posible identificar una banda en las tres cepas a la altura de 48,5 kb luego de digerir con nucleasa S1.

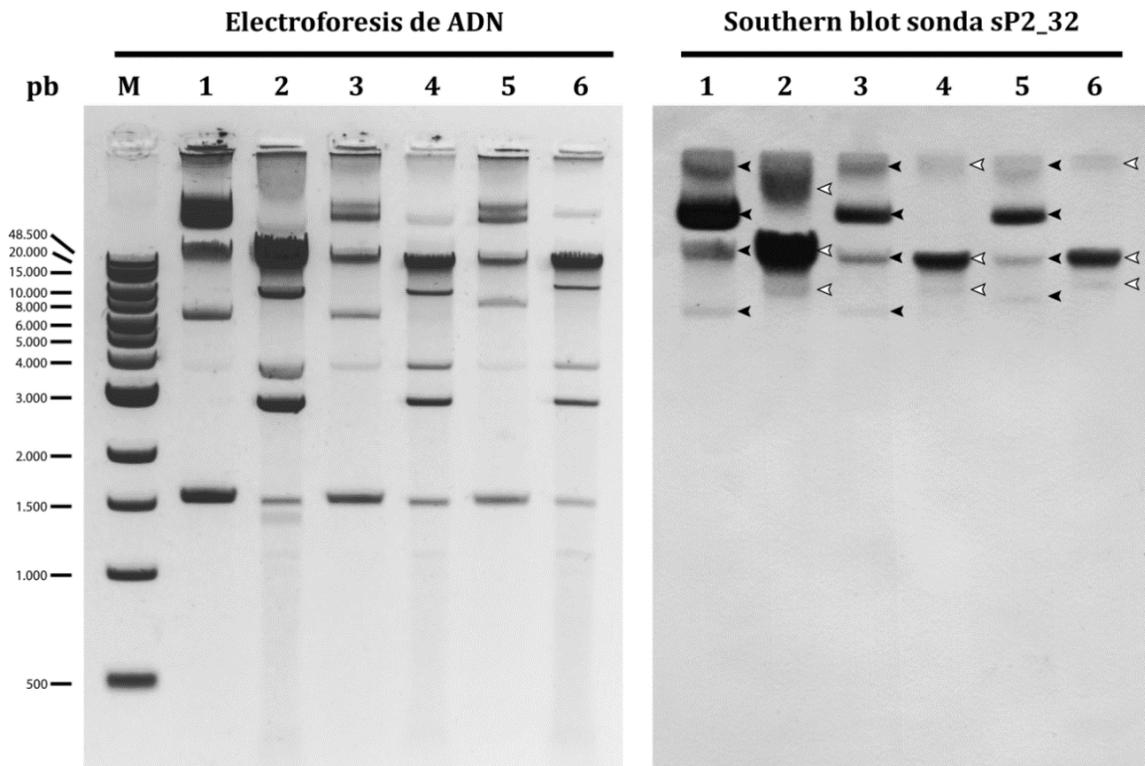


Figura 10. *Southern blot* con la sonda sP2\_32 específica para el plásmido pPSLF89-2 de *P. salmonis*. *Southern blot* de purificaciones de plásmidos de distintas cepas de *P. salmonis* luego de una electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,6%. Panel izquierdo, gel de agarosa al 0,6%, panel derecho *southern blot*. Carril M: estándar de peso molecular de ADN de doble hebra lineal. Carril 1: plásmidos de LF-89 sin digerir. Carril 2: plásmidos de LF-89 digeridos con nucleasa S1. Carril 3: plásmidos de PSCGR01 sin digerir. Carril 4: plásmidos de PSCGR01 digeridos con nucleasa S1. Carril 4: plásmidos de PSCGR02 sin digerir. Carril 6: plásmidos de PSCGR02 digeridos con nucleasa S1. Las flechas negras en el panel derecho indican las bandas identificadas por la sonda antes de la digestión con nucleasa S1, y las flechas blancas indican las bandas luego de la digestión.

Al utilizar la sonda sP2\_32 también fue posible observar bandas en las tres cepas evaluadas (Figura 10), las cuales presentaron un patrón de migración similar luego de la digestión con nucleasa S1. En las tres cepas, de 4 bandas observables se identifican sólo 3 luego de la digestión, aunque la posición de éstas difiere entre ellas. En la cepa LF-89, cambia la posición de la primera y tercera banda, mientras el patrón de bandeo en las cepas PSCGR01 y PSCGR02 es similar. Particularmente, la tercera banda se observó más arriba en la cepa PSCGR02, y la primera banda más abajo en la LF-89, lo que podría permitir diferenciar entre los plásmidos de estas cepas con la sonda sP2\_32.

Con la sonda sP3\_52 se identificaron bandas en las tres cepas, las cuales cambiaron su patrón de bandeo luego de la digestión con nucleasa S1 (Figura 11), similar a lo observado con las sondas anteriores. Antes de digerir, 3 bandas fueron observadas en la cepa LF-89 y 4 bandas en las cepas PSCGR01 y PSCGR02 con la sonda sP3\_52. Luego de la digestión, en las tres cepas se identificaron con esta sonda 2 bandas ubicadas en una posición similar.

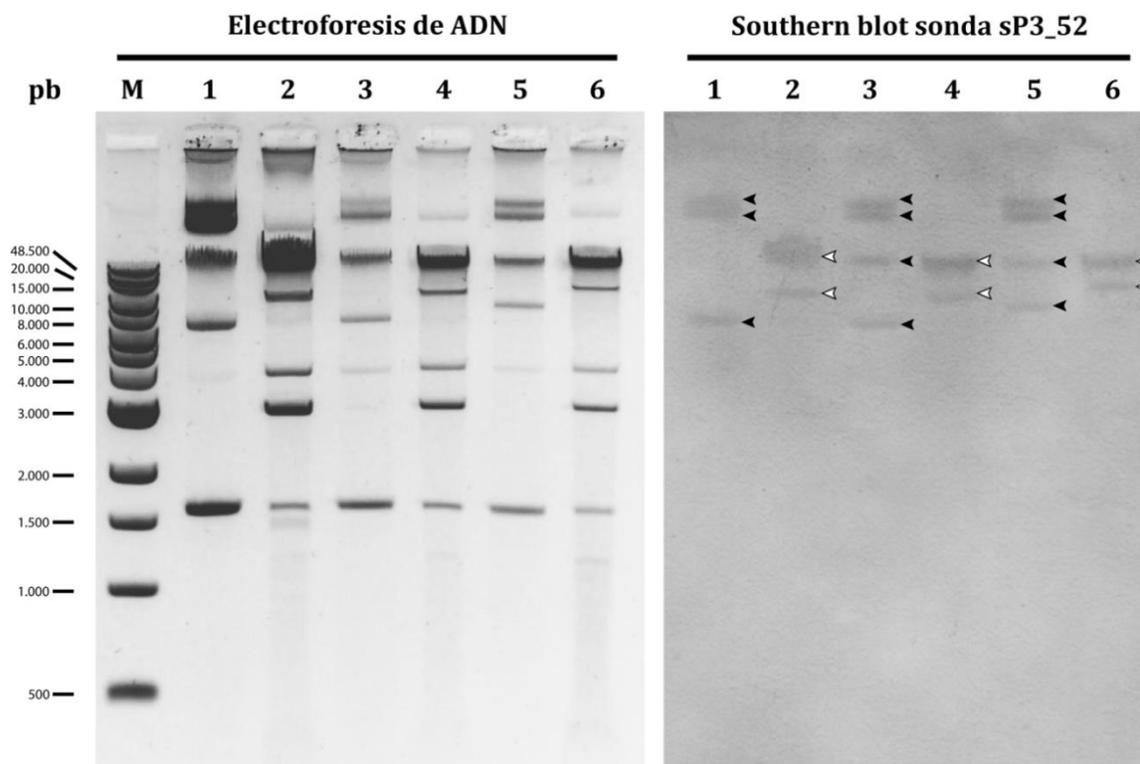


Figura 11. *Southern blot* con la sonda sP3\_52 específica para el plásmido pPSLF89-3 de *P. salmonis*. *Southern blot* de purificaciones de plásmidos de distintas cepas de *P. salmonis* luego de una electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,6%. Panel izquierdo, gel de agarosa al 0,6%, panel derecho *southern blot*. Carril M: estándar de peso molecular de ADN de doble hebra lineal. Carril 1: plásmidos de LF-89 sin digerir. Carril 2: plásmidos de LF-89 digeridos con nucleasa S1. Carril 3: plásmidos de PSCGR01 sin digerir. Carril 4: plásmidos de PSCGR01 digeridos con nucleasa S1. Carril 5: plásmidos de PSCGR02 sin digerir. Carril 6: plásmidos de PSCGR02 digeridos con nucleasa S1. Las flechas negras en el panel derecho indican las bandas identificadas por la sonda antes de la digestión con nucleasa S1, y las flechas blancas indican las bandas luego de la digestión.

Por último, con la sonda sP4\_02 se identificaron bandas en las tres cepas, detectando la presencia del plásmido pPSLF89-4 en la banda con mayor migración (similar a la migración de 1,5 kb en el estándar de peso molecular), banda que no había sido detectada con las sondas anteriores (Figura 12).

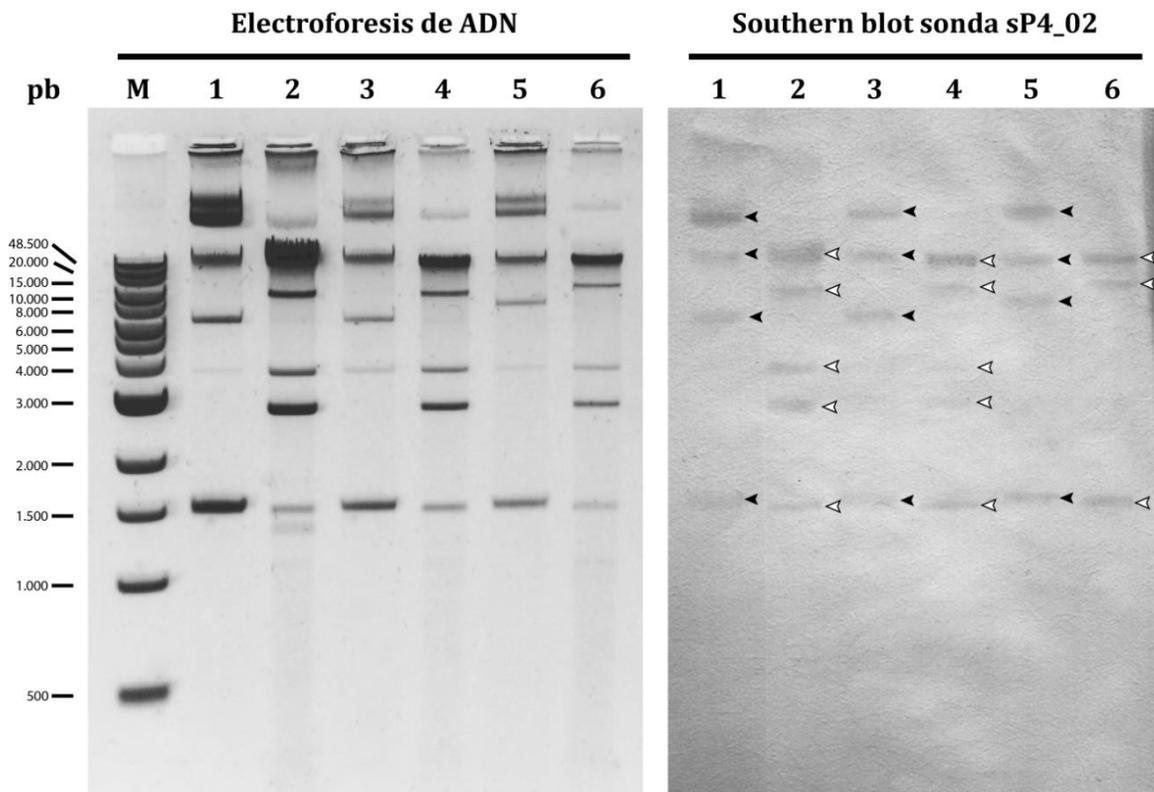


Figura 12. *Southern blot* con la sonda sP4\_02 específica para el plásmido pPSLF89-4 de *P. salmonis*. *Southern blot* de purificaciones de plásmidos de distintas cepas de *P. salmonis* luego de una electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0,6%. izquierdo, gel de agarosa al 0,6%, panel derecho *southern blot*. Carril M: estándar de peso molecular de ADN de doble hebra lineal. Carril 1: plásmidos de LF-89 sin digerir. Carril 2: plásmidos de LF-89 digeridos con nucleasa S1. Carril 3: plásmidos de PSCGR01 sin digerir. Carril 4: plásmidos de PSCGR01 digeridos con nucleasa S1. Carril 4: plásmidos de PSCGR02 sin digerir. Carril 6: plásmidos de PSCGR02 digeridos con nucleasa S1. Las flechas negras en el panel derecho indican las bandas identificadas por la sonda antes de la digestión con nucleasa S1, y las flechas blancas indican las bandas luego de la digestión.

En las cepas LF-89 y PSCGR01 se identificaron 4 bandas antes de la digestión con nucleasa S1. Luego de la digestión cambió la migración de las bandas, y se observó una banda más. Por otro lado, en la cepa PSCGR02 se detectaron sólo 3 bandas luego de la digestión con nucleasa, aunque con el mismo patrón de migración de las cepas LF-89 y PSCGR01.

### 3.3 Comparación entre cepas disponibles en NCBI en base a su secuencia génica

Entre los años 2015 y 2017, la secuencia y la anotación de 16 nuevas cepas de *P. salmonis* fueron depositadas en NCBI. Con estas secuencias disponibles, se realizó una recopilación de los plásmidos de todas las cepas conocidas de *P. salmonis*, con el fin de evaluar la similitud de secuencias entre ellos y poder inferir relaciones entre las cepas en base a los elementos genéticos móviles que comparten.

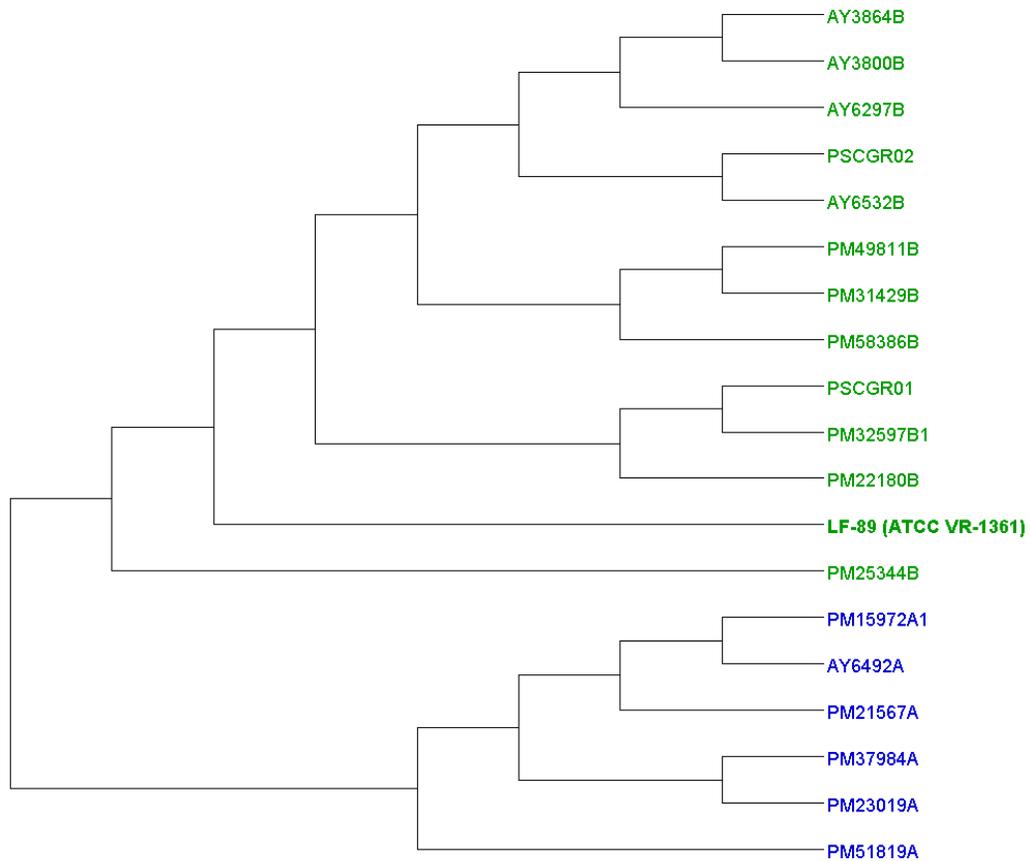


Figura 13. Clasificación de los genomas de las cepas de *P. salmonis*. Árbol de máxima similitud de las cepas de *P. salmonis* secuenciadas y anotadas en NCBI. Cladograma inferido con la herramienta MAUVE (*Darling lab*) en base a la similitud de secuencias nucleotídicas luego de alineamientos múltiples del cromosoma de las distintas cepas. En azul se muestran las cepas pertenecientes al genogrupo A (tipo EM-90) y en verde al genogrupo B (tipo LF-89). En negrita se destaca la cepa de referencia LF-89 (ATCC VR-1361).

Se construyó un cladograma en base a la secuencia genómica de las 19 cepas anotadas y depositadas en NCBI. Esto se realizó en base a la secuencia nucleotídica de todos los genomas disponibles (Figura 13), con parámetros que permiten alinear genomas relacionados con alto nivel de rearrreglos, mediante el programa bioinformático MAUVE, el cual permite construir alineamientos múltiples en base a eventos evolutivos a gran escala, como reordenamientos o grandes reorganizaciones de segmentos génicos. En base a sus genomas, estas cepas se separan en dos grupos, los cuales han sido denominados como genogrupo A, con características similares a la cepa EM-90 (primera cepa conocida de este grupo, aislada en 1990 y secuenciada hasta el nivel de “contig”), y el genogrupo B, con características genómicas concordantes con las cepa LF-89 (17, 73). En el árbol filogenético de la Figura 13, podemos observar que 13 de las 19 cepas secuenciadas y anotadas pertenecen al genogrupo B, y sólo 6 cepas al genogrupo A. De esta forma, la mayor proporción de cepas pertenecen al genogrupo B, representando un 68% de todas las cepas secuenciadas y anotadas, y un 65% de las cepas secuenciadas de forma incompleta, disponible en NCBI. Las cepas de cada genogrupo forman agrupaciones definidas y discretas que son fácilmente distinguibles. Además, las tres cepas secuenciadas en este estudio pertenecen al genogrupo B.

Posteriormente, se buscó establecer si esta separación de genogrupos observada en base a las secuencias genómicas, ocurría de igual forma al comparar la secuencia de los plásmidos. Para ello, se concatenaron las secuencias de todos los plásmidos de una cepa, formando un pseudogenoma, y se realizaron alineamientos múltiples de estas secuencias con el programa MAUVE. Con ello, se construyó un árbol de máxima similitud que organiza los distintos plásmidos de las 19 cepas secuenciadas y anotadas. Se observó que los plásmidos de las cepas pertenecientes al genogrupo A (en azul) y las cepas del genogrupo B (en verde), se agrupan entre sí, pero de forma menos estricta que al comparar sólo los genomas, como se muestra en la Figura 14. Se observaron cuatro principales agrupaciones de plásmidos. Desde la parte superior a la inferior del dendograma, se observa un grupo discreto con cuatro cepas del genogrupo A, le siguen las cepas que agrupan con el plásmido pPSLF89-4, las que agrupan con los plásmidos pPSLF89-1 y pPSLF89-3, y finalmente las que agrupan con el plásmido pPSLF89-2. En los últimos tres grupos se encuentran representantes de ambos genogrupos, pero como se mencionó anteriormente, dentro de cada grupo los genogrupos A y B no se mezclaron, sino que agrupan juntos.

La amplia distribución de plásmidos en todas las cepas conocidas de *P. salmonis* (las cuales provienen de peces enfermos y por tanto son capaces de generar infección en su hospedero) sugiere un rol de este elemento genético móvil en la supervivencia o mantención de esta bacteria en su nicho biológico. Para probar esto, se buscaron de forma individual los genes cuya secuencia o función pudiera catalogarlos como factor de virulencia (FdeV). Esto se realizó con la base de datos VFDB, tal como se mencionó anteriormente.

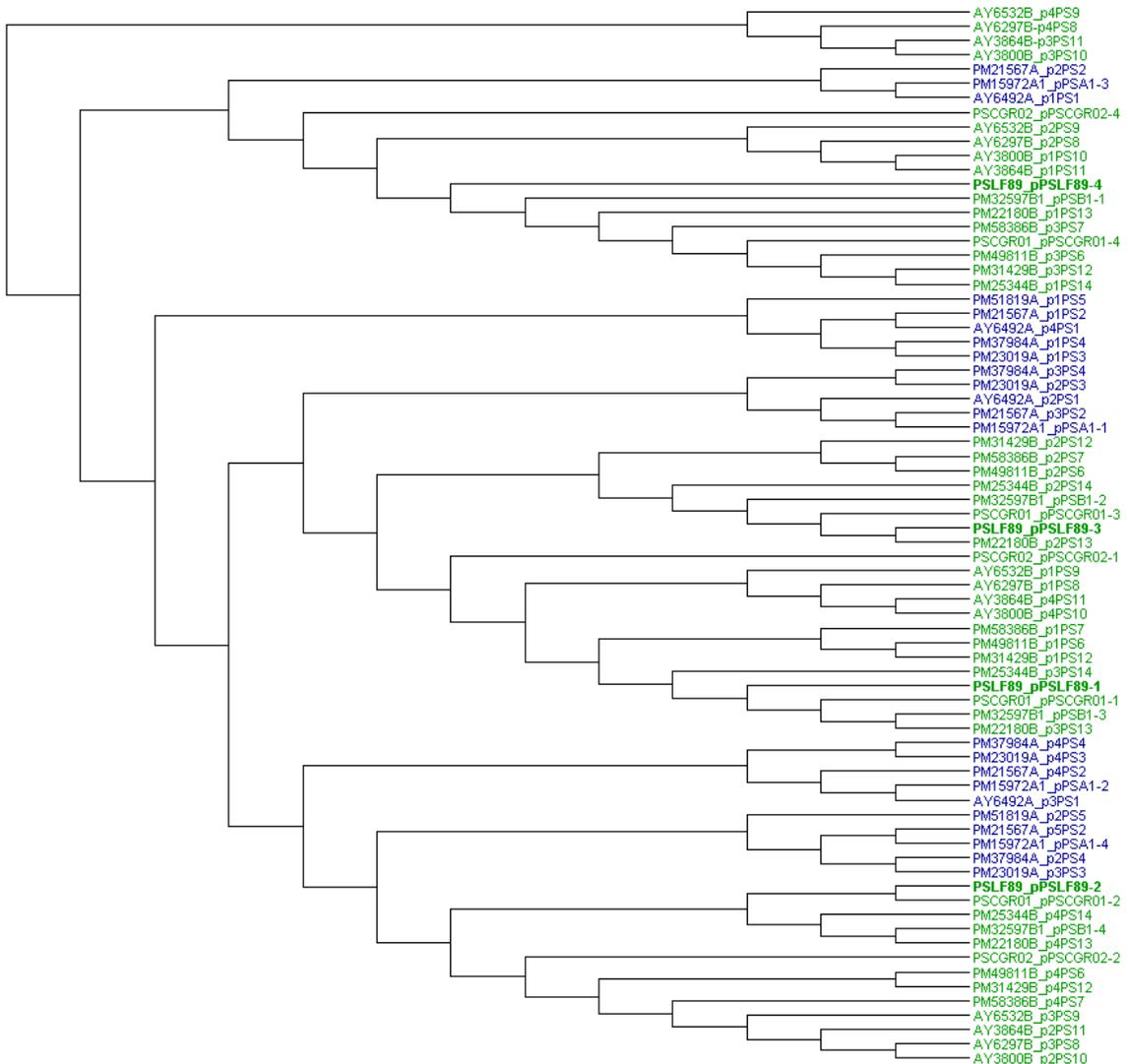


Figura 14. Árbol de máxima similitud de los plásmidos de las cepas secuenciadas de *P. salmonis* depositadas en NCBI. Dendrograma basado en alineamientos múltiples de las secuencias de todos los plásmidos de las distintas cepas de *P. salmonis*, con MAUVE (“Darling lab”). Se muestran los plásmidos de cepas pertenecientes al genogrupo A en color azul, y al genogrupo B en color verde, y se destacan en negrita los plásmidos de la cepa LF-89 (pPSLF89-1, pPSLF89-2, pPSLF89-3 y pPSLF89-4).

Una vez identificados los FdeV plasmidiales de la cepa LF-89, se utilizó su secuencia nucleotídica para buscar secuencias similares en todas las demás cepas anotadas de *P. salmonis*, mediante la herramienta en línea BLAST (*Basic Logical Alignment Search Tool*). Muchos de estos genes tenían similitud de secuencia con otros genes plasmidiales y algunos cromosómicos, por lo que se utilizaron parámetros estrictos para identificarlos como homólogos: un porcentaje de cobertura de la secuencia superior a un 90%, con identidad de secuencia mayor al 82%. Los resultados se resumen en la Tabla 11. Todos los FdeV plasmidiales predichos en la cepa LF-89 fueron encontrados en otras cepas de *P. salmonis*, bajo los parámetros especificados. Algunos, como PepO o Ymt del plásmido pPSLF89-1, se identificaron en todas las cepas secuenciadas, mientras algunos se encontraron en menos del 40% de las cepas, como un probable transportador de hierro del pPSLF89-1 (PSLF89\_1p143) que sólo se encontró en 4 de las otras 18 cepas, o una proteína de la familia Ras del pPSLF89-3 (PSLF89\_3p41) que fue identificada en 7 de las 18 cepas.

Tabla 11. Listado de factores de virulencia plasmidiales de la cepa LF-89 identificados en otras cepas de *P. salmonis*. Las secuencias nucleotídicas de los FdeV fueron alineadas con BLAST a las secuencias de las 18 cepas restantes de *P. salmonis*. Secuencias con cobertura >90% e identidad de secuencia >82% se identificaron como FdeV homólogos a la LF-89. Se muestra el porcentaje de cepas en las cuales se identificó un homólogo de cada FdeV de la LF-89, tanto en los plásmidos como en el genoma, y el total de cepas que contienen ese FdeV.

Plásmido	Posible Factor de Virulencia	Cepas con el FdeV en plásmidos	Cepas con el FdeV en el genoma	Total de cepas con el FdeV
pPSLF89-1	Proteína con dominio TIR	66,7% (12/18)	33,3% (6/18)	100%
pPSLF89-1	Toxina murina Ymt	66,7% (12/18)	33,3% (6/18)	100%
pPSLF89-1	Endopeptidasa O (PepO)	100% (18/18)	0% (0/18)	100%
pPSLF89-1	Proteína de la familia fic/DOC	83,3% (15/18)	0% (0/18)	83,3%
pPSLF89-1	Transportador tipo ABC de drogas	38,9% (7/18)	33,3% (6/18)	72,2%
pPSLF89-4	Proteína con dominio phd	72,2% (13/18)	0% (0/18)	72,2%
pPSLF89-1	Proteína de cobertura de esporas	66,7% (12/18)	0% (0/18)	66,7%
pPSLF89-1	PipB2	66,7% (12/18)	0% (0/18)	66,7%
pPSLF89-1	Proteína con repeticiones de pentapéptidos, PipB2	66,7% (12/18)	0% (0/18)	66,7%
pPSLF89-3	PipB2	66,7% (12/18)	0% (0/18)	66,7%
pPSLF89-4	HemL	66,7% (12/18)	0% (0/18)	66,7%
pPSLF89-3	Proteína con motivo TPR	44,4% (8/18)	16,7% (3/18)	44,4%
pPSLF89-3	Proteína de la familia Ras	38,9% (7/18)	0% (0/18)	38,9%
pPSLF89-1	Transportador de hierro	22,2% (4/18)	0% (0/18)	22%

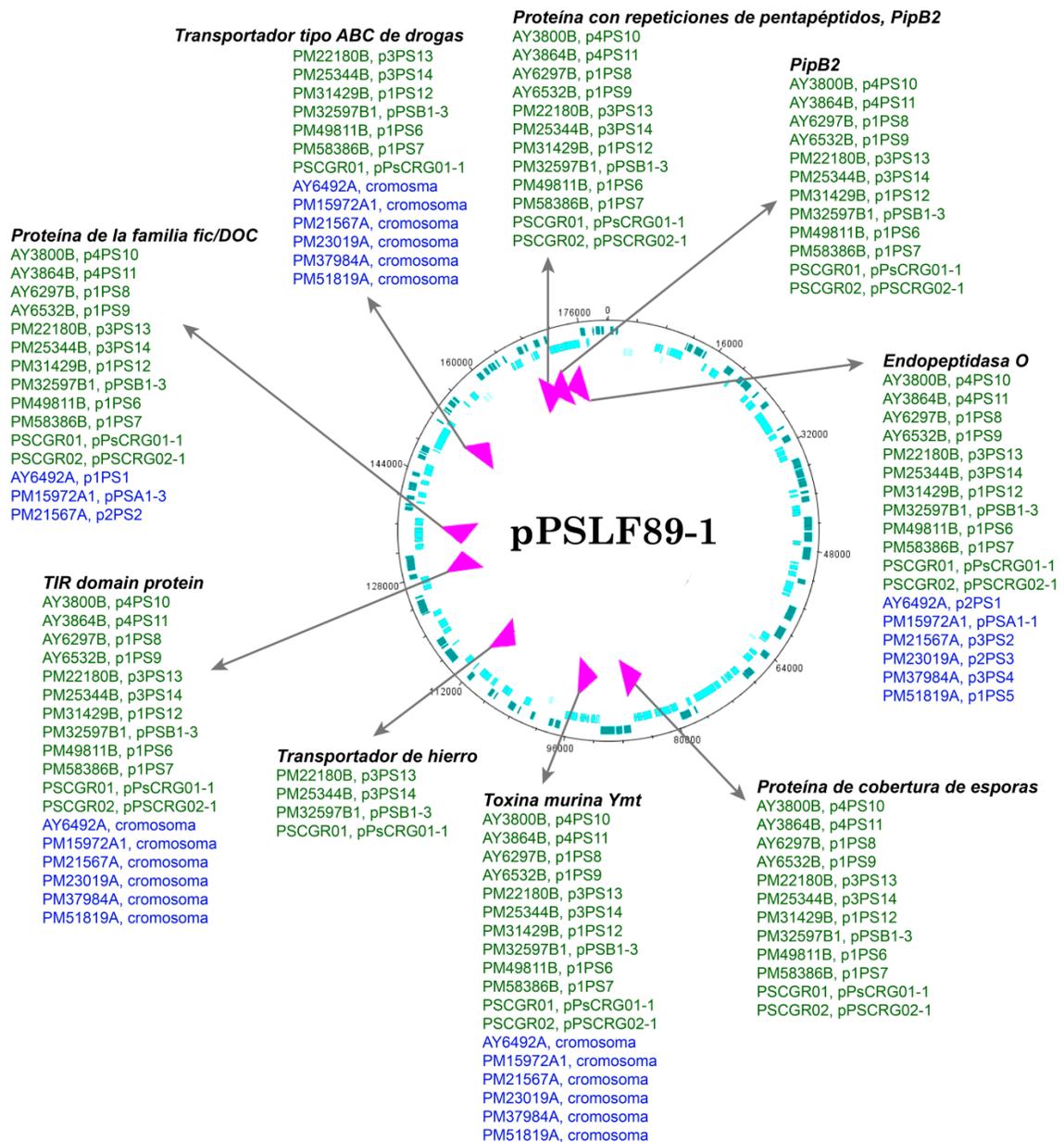


Figura 15. Representación circular del plásmido pPSLF89-1 de *P. salmonis* LF-89 con la ubicación de los FdeV y las cepas que los contienen. Desde la parte más externa a la más interna, se muestran las secuencias codificantes en la hebra sentido en color celeste oscuro, en la hebra antisentido en color calipso, y los pseudogenes se ven en color celeste agua. Los posibles FdeV se muestran en fucsia como una cabeza de flecha, y el sentido de la flecha indica su dirección (en sentido horario, hebra sentido; en sentido antihorario, hebra antisentido). Para cada FdeV la flecha gris indica la predicción de función o nombre del FdeV y las cepas que lo codifican. Las cepas en verde pertenecen al genogrupo B, y las en azul al genogrupo A. Se indica si el FdeV fue encontrado en un plásmido o en el cromosoma de la cepa (nombre de cepa, nombre de plásmido; nombre de cepa, cromosoma).

También es destacable que 4 genes plasmidiales predichos como FdeV en la cepa LF-89, fueron identificados en otras cepas de *P. salmonis*, pero codificados en su cromosoma. De ellos, los genes que codifican una proteína con dominio TIR, la toxina Ymt y el transportador ABD de drogas se encuentran en el pPSLF89-1, el gen que codifica una proteína con motivo TIR en el pPSLF89-3, y ninguno con estas características fue identificado en el plásmido conjugativo (pPSLF89-4).

Para visualizar mejor estos resultados, los posibles FdeV presentes en los plásmidos se ubicaron en los diagramas de los plásmidos de la cepa de referencia. El plásmido con mayor número de posibles FdeV en la cepa LF-89, el pPSLF89-1, se muestra en la Figura 15, y los plásmidos pPSLF89-3 y pPSLF89-4 (los otros dos de la cepa LF-89 con posibles FdeV) se muestran en la Figura 16.

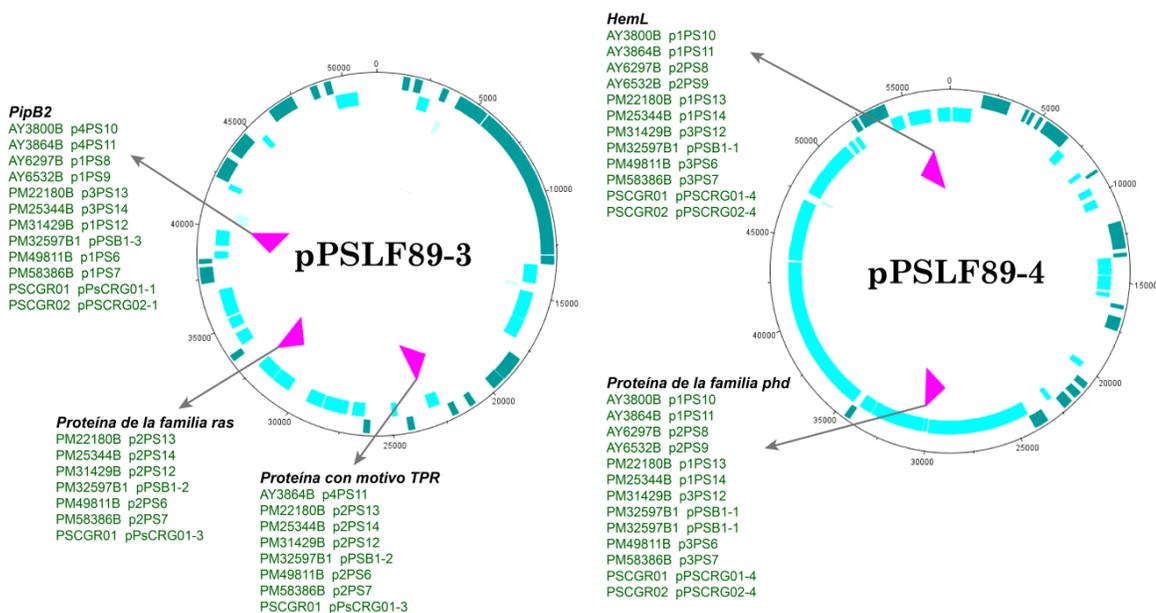


Figura 16. Representación circular de los plásmidos pPSLF89-3 y pPSLF89-4 de *P. salmonis* LF-89 con la ubicación de los FdeV y las cepas que los contienen. Desde la parte más externa a la más interna, se muestran las secuencias codificantes en la hebra sentido en color celeste oscuro, en la hebra antisentido en color calipso, y los pseudogenes en color celeste agua. Los posibles FdeV se muestran en fucsia como una cabeza de flecha, y el sentido de la flecha indica su dirección. Para cada FdeV la flecha gris indica la predicción de función o nombre del FdeV y las cepas que lo codifican. Al lado izquierdo se muestra el plásmido pPSLF89-3 y los tres FdeV que codifica, y al lado derecho el pPSLF89-4 y sus dos FdeV. Las cepas escritas en verde pertenecen al genogrupo B (nombre de cepa, nombre de plásmido).

### **3.4 Desarrollo y estandarización de las condiciones de infección de *P. salmonis* en distintos modelos de cultivo celular.**

Con el fin de examinar la expresión de los candidatos a factores de virulencia de *P. salmonis*, se establecieron infecciones en distintos modelos celulares para evaluar si los FdeV se expresan diferencialmente según el hospedero. Se ha establecido que durante su ciclo infectivo en peces *P. salmonis* coloniza e infecta tejidos hematopoyéticos, como el riñón anterior. Por ello, se propuso evaluar la infección de esta bacteria en distintos modelos celulares derivados de riñón de peces que han sido utilizados exitosamente para la propagación de *P. salmonis* en condiciones de laboratorio. Dentro de ellos, destacan las líneas celulares derivadas de linajes de células inmunes, con propiedades de monocitos o macrófagos, debido a su relevancia en el ciclo infectivo de la bacteria en salmónidos (100). Para este trabajo, se seleccionaron dos líneas celulares derivadas de riñón anterior de salmón atlántico, la línea SHK-1 (como linaje de células inmunes con características de macrófagos) y la ASK (línea celular de epitelio de riñón). Además, como modelo alternativo se utilizó el cultivo primario de riñón de pez cebra, un pez tropical de agua dulce lejanamente emparentado con salmónidos (14).

#### Cultivos SHK-1

Se utilizó como estándar de infección de *P. salmonis* la línea celular SHK-1. Para realizar los ensayos de infección en estos cultivos se replicaron los protocolos establecidos (60), con la diferencia que la cepa LF-89 de *P. salmonis* fue crecida en medio líquido. Con el fin de estandarizar las condiciones de infección, se probaron distintas multiplicidades de infección (MOI) y condiciones de crecimiento de la bacteria. Primero, se evaluó el crecimiento en medio de cultivo líquido a distintas temperaturas (Figura 17A), incluyendo la temperatura estándar de crecimiento bacteriano (18°C), y las temperaturas de propagación e infección de células SHK-1 (20°C y 16°C respectivamente). Se observó que la bacteria crece desde los 16°C a los 23°C con un tiempo generacional similar (21,3 horas a 16°C, 20 horas a 18°C, 23,7 horas a 20°C y 23,5 horas a 23°C), sin embargo, a 16°C aumentó la fase *lag*, y a 23°C el decaimiento bacteriano fue mayor y más rápido al llegar a fase estacionaria. Entre los 16 y 20°C la DO a 600nm se mantuvo relativamente constante durante la fase estacionaria hasta los 12 días de crecimiento.

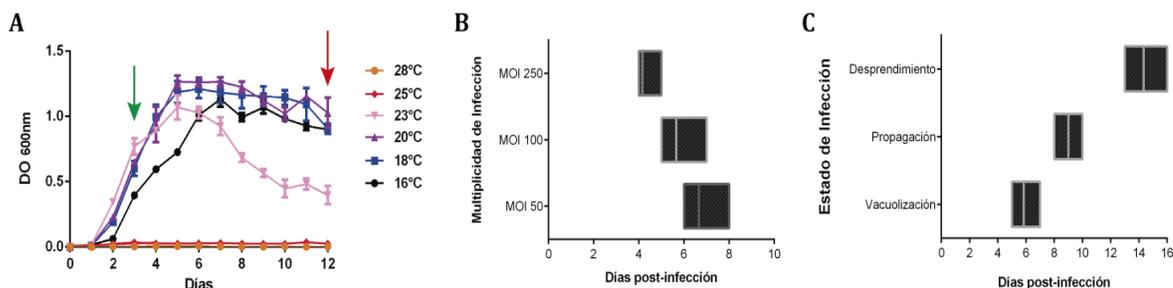


Figura 17. Crecimiento de *P. salmonis* y progresión de la infección en cultivos celulares SHK-1. A, crecimiento de *P. salmonis* en medio líquido de cultivo AUSTRAL-SRS a distintas temperaturas. Se muestran tres réplicas independientes para cada temperatura. La flecha verde indica la fase exponencial de crecimiento utilizada para el control de la proteómica; la flecha roja indica la fase estacionaria de crecimiento utilizada para infectar cultivos celulares SHK-1. B, día de aparición de efecto citopático en células SHK-1 luego de la infección con *P. salmonis* a distintas multiplicidades de infección (MOI). C, día de ocurrencia de la infección en estado de vacuolización, de propagación o de desprendimiento, luego de la infección con *P. salmonis*, MOI=100. Para B y C, se muestra el valor mínimo y máximo de 6 réplicas, y la barra central indica la media.

No se observó crecimiento bacteriano superior a los 23°C en las condiciones estudiadas. Para realizar la infección se utilizaron bacterias desde cultivos líquidos en fase estacionaria de crecimiento, y una temperatura de 16 °C. En estas condiciones, se observaron diferencias de dos días en la aparición de efectos citopáticos en células SHK-1 infectadas con distintos MOI (Figura 17B). Por ello, se decidió utilizar una cantidad intermedia de bacterias para realizar todos los siguientes ensayos, es decir un MOI=100. Para determinar las etapas de la infección con las condiciones establecidas, se evaluó directamente al microscopio la aparición de efectos citopáticos en el tiempo. En base a esto, se distinguieron tres etapas de infección:

- 1) vacuolización, caracterizada por la aparición de vacuolas intracelulares. Se observan de uno a tres focos de vacuolas por campo al microscopio con aumento 100X.
- 2) propagación, estado de infección en el cual las vacuolas citoplasmáticas se fusionan, formando grandes vacuolas a lo largo de todo el cultivo celular. Se observa la presencia de vacuolas en grupos de células vecinas, en todos los campos al microscopio con aumento 100X.
- 3) desprendimiento, estado final de la infección donde hay disrupción de la monocapa celular y lisis de las células, en todos los campos observados al microscopio con aumento 100X.

Los efectos citopáticos mencionados pueden observarse en las imágenes de la Figura 18. En ella se indica la aparición de vacuolas citoplasmáticas, o agrupaciones de vacuolas de diverso tamaño, con flechas de color rojo en las etapas de vacuolización y propagación. El desprendimiento de células se indica en la Figura 18D como una zona libre de células (flecha negra), mientras el debris celular, producto del rompimiento y lisis de la monocapa, se muestra con una flecha azul. La aparición del estado de vacuolización en las condiciones especificadas ocurrió alrededor de los 6 días post-infección (dpi), la propagación a los 9 dpi y el desprendimiento luego de 2 semanas de infección.

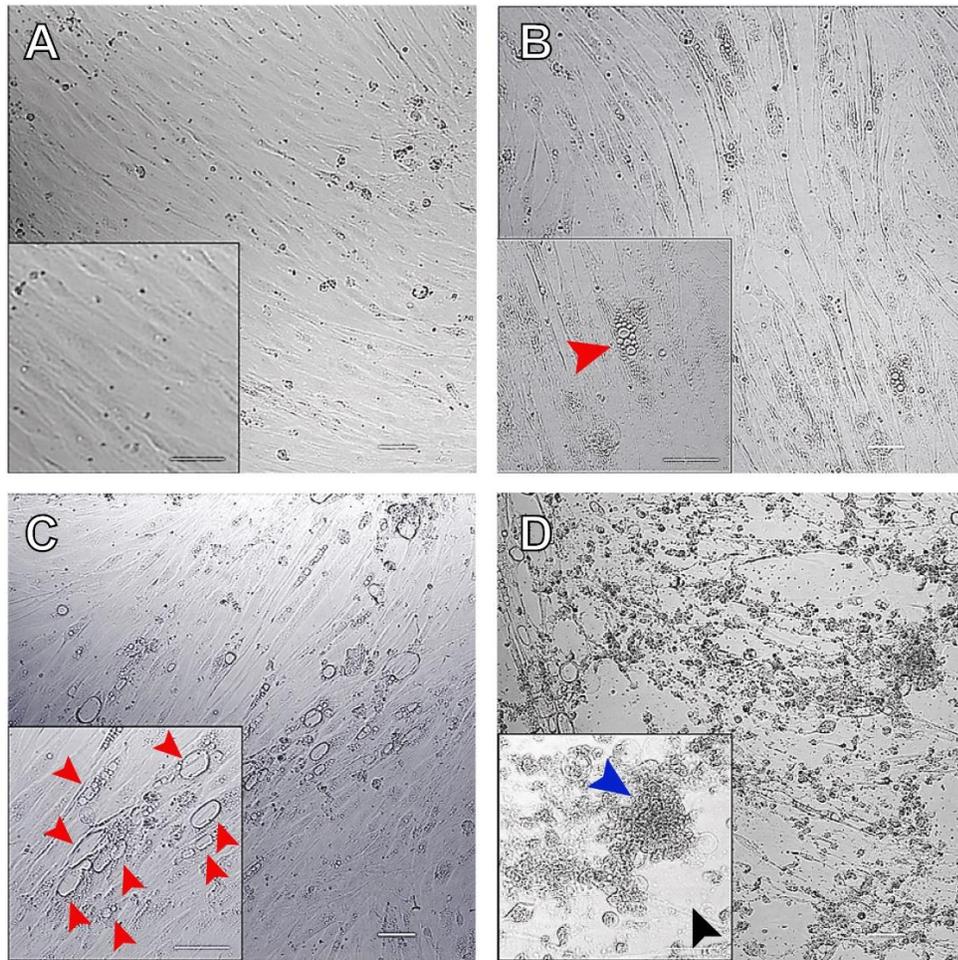


Figura 18. Imágenes representativas de la progresión de la infección de *P. salmonis* en cultivos celulares SHK-1. Microscopía en campo claro de cultivos celulares SHK-1 infectados con *P. salmonis* con un MOI=100, en estado de infección de vacuolización (B), propagación (C) y desprendimiento (D). En A se muestran cultivos celulares sin infectar (control). El recuadro pequeño muestra una magnificación del mismo campo a 300X, las puntas de flecha rojas indican vacuolas o agrupaciones de vacuolas en la monocapa celular, la punta de flecha negra indica una zona de desprendimiento celular, y la azul un cúmulo de debris producto de la lisis de células. Barra = 100 μm.

### Cultivos ASK

Esta es una línea de células adherentes con características epiteliales, que también ha sido utilizada anteriormente para comparar la infección del virus ISA (101). Sumado a esto, recientemente se describió que *P. salmonis* es capaz de infectar esta línea celular, generar efectos citopáticos similares a los observados en la línea SHK-1 (formación de vacuolas y disrupción de la monocapa) e infecciones productivas (115), por lo que las células ASK también pueden utilizarse como un modelo complementario para estudios de infección por esta bacteria.

Las mismas condiciones de infección establecidas para los cultivos SHK-1 fueron utilizadas con las células ASK y *P. salmonis*. En este cultivo, sin embargo, no se observaron las mismas etapas de infección observadas en los cultivos SHK-1, aunque sí se observó la aparición de vacuolas en el tiempo.

### Cultivos primarios de riñón (CPR) de pez cebra

En peces cebra adultos, el riñón anterior es el principal órgano hematopoyético, lugar de producción de células progenitoras, eritroides, linfoides y mieloides, incluyendo a los neutrófilos y los macrófagos (13, 69, 118, 141). La extracción aséptica de este órgano permite generar cultivos primarios, capaces de sobrevivir varios días en medio de cultivo celular (6). Estos cultivos están compuestos por diversos tipos celulares, entre ellos se han identificado células linfoides, mieloides, eritroides, precursoras y estromales (117).

Luego de generar los cultivos primarios, estos fueron infectados con *P. salmonis* de forma similar a lo realizado con las líneas celulares de salmón, con algunas variaciones. Al igual que en las líneas celulares, se utilizaron bacterias desde un cultivo líquido en fase estacionaria de crecimiento, con un MOI=100. *P. salmonis* tiene una temperatura óptima de crecimiento a 18°C, pero debido a que el pez cebra es un pez tropical, sólo pudo bajarse la temperatura hasta los 20°C sin perjudicar la viabilidad del cultivo primario. Luego infectar con la bacteria, no se observaron las etapas de infección descritas para SHK-1, y, debido a las características propias del cultivo primario (diversidad celular en tamaño y adherencia), no se observó vacuolización de las células ni desprendimiento del cultivo. Por ello, se buscaron formas más cuantitativas de evaluar la infección por *P. salmonis*.

### **3.5 Comparación de la infección de *P. salmonis* en los distintos modelos**

Con el fin de establecer el cultivo primario de riñón como un modelo para el estudio de la infección generada por *P. salmonis*, y comparar la infección de esta bacteria en cultivo primario con la infección en líneas celulares, buscamos parámetros cuantificables que luego pudieran ser comparados entre los tipos celulares de interés (SHK-1, ASK y CPR de pez cebra). Un método que ha sido utilizado efectivamente para cuantificar la viabilidad celular en el tiempo es el alamarBlue. Este compuesto no es tóxico para las células y ha sido utilizado anteriormente para evaluar la viabilidad celular de una forma no invasiva, en cultivo primarios de trucha arcoíris (109), lo que hace al alamarBlue un buen candidato para nuestro estudio. De esta forma, realizamos los ensayos según lo descrito por el fabricante con las modificaciones necesarias para los tipos celulares de este estudio, como se detalla en los materiales y métodos (Figura 1).

Debido a que los CPR de pez cebra no se propagan en las condiciones de nuestro ensayo (117), como sí ocurre con las líneas celulares SHK-1 y ASK, antes de hacer las infecciones buscamos evaluar la viabilidad celular a lo largo del tiempo. Como era esperado, la viabilidad de las líneas celulares SHK-1 y ASK se mantuvieron relativamente constantes hasta los 20 días luego de sembrarlas (Figura 19A). Para evaluar la viabilidad en el tiempo del cultivo primario, se sembraron 30 veces más células por pocillo que para las líneas celulares, debido a las diferencias en el nivel de detección por alamarBlue, según se detalla en la sección de materiales y métodos. En los primeros días luego de sembrar el cultivo primario, se observó una mayor variabilidad en las mediciones de fluorescencia al comparar con las líneas SHK-1 y ASK, lo que era esperable debido a la naturaleza del cultivo. Además, luego de sembrar el cultivo la viabilidad celular disminuyó rápidamente hasta el día 6 (Figura 19B). A pesar del gran porcentaje de pérdida de viabilidad del CPR con relación al inicio del ensayo (día 0), se mantuvo una emisión de fluorescencia detectable y relativamente estable entre los días 6 y 12 luego de sembrar las células (Figura 19B). Esto otorga una ventana de tiempo suficiente para realizar ensayos de infección. Todos los siguientes ensayos de infección con *P. salmonis* se realizaron según el procedimiento establecido anteriormente.

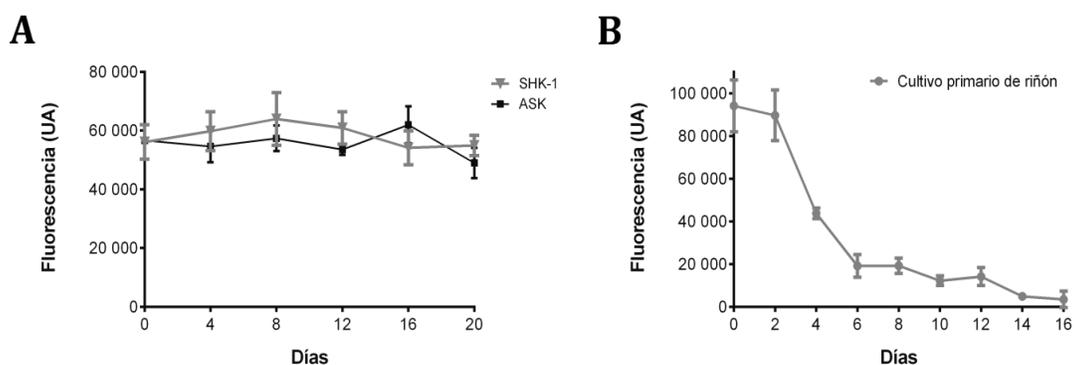


Figura 19. Viabilidad celular en el tiempo cuantificada por alamarBlue. A, viabilidad de cultivos celulares SHK-1 y ASK. Se cuantificó la fluorescencia de 10.000 células sembradas en pocillos incubadas 8 horas con alamarBlue en los días indicados. Se muestra el promedio de 6 réplicas para SHK-1 y 5 para ASK con su respectiva desviación estándar. B, viabilidad de CPR de pez cebra en el tiempo. Se cuantificó la fluorescencia de 300.000 células sembradas en pocillos, incubadas por 24 horas con alamarBlue. Se muestra el promedio de 6 réplicas con su respectiva desviación estándar.

Se midió la fluorescencia de los cultivos luego de incubar 8 o 24 horas con una solución de alamarBlue y antibióticos, para eliminar así las bacterias intra y extracelulares y no añadir artificialmente fluorescencia producto de la reducción del compuesto por las bacterias. Las mediciones de fluorescencia se estandarizaron al tiempo cero (día 0) y se graficó el porcentaje de viabilidad para hacer comparables los resultados de distintos tipos celulares.

En los cultivos de células SHK-1 se observó una disminución en la viabilidad celular a partir de los 8 días post-exposición a *P. salmonis* (8 dpe), llegando a un 70% de la viabilidad observada el día 0 al final del ensayo (Figura 20B). La exposición a *P. salmonis* además generó efectos citopático en el cultivo celular, caracterizada por la aparición de vacuolas citoplasmáticas de diverso tamaño (Figura 20C), similar a lo visto en ensayos anteriores. A los 20 dpe no se observó la disrupción de la monocapa celular, ni el fenotipo denominado desprendimiento. Esto puede explicar la alta viabilidad celular observada a los 20 dpe, y podría deberse a la diferencia en las condiciones en que se realizó el ensayo. En el cultivo ASK se observó una marcada disminución en la viabilidad celular al incubar con *P. salmonis*, mayor a la ocurrida con SHK-1, llegando a menos de un 30% de la viabilidad celular inicial luego de 20 dpe (Figura 20B y D). La viabilidad de los cultivos ASK tuvo una alta variabilidad, tanto en los controles como en las infecciones. Sin embargo, a partir de los 12 dpe, la disminución en la viabilidad celular en los cultivos infectados con *P. salmonis* fue significativamente distinta a la del control (Figura 20D).

Con respecto al efecto citopático, la aparición de vacuolas en los cultivos ASK en las condiciones evaluadas fue menor y más esporádica que la observada en cultivos SHK-1 (Figura 20C y E), y al momento del fin del experimento (20 dpe) no ocurrió el desprendimiento de la monocapa.

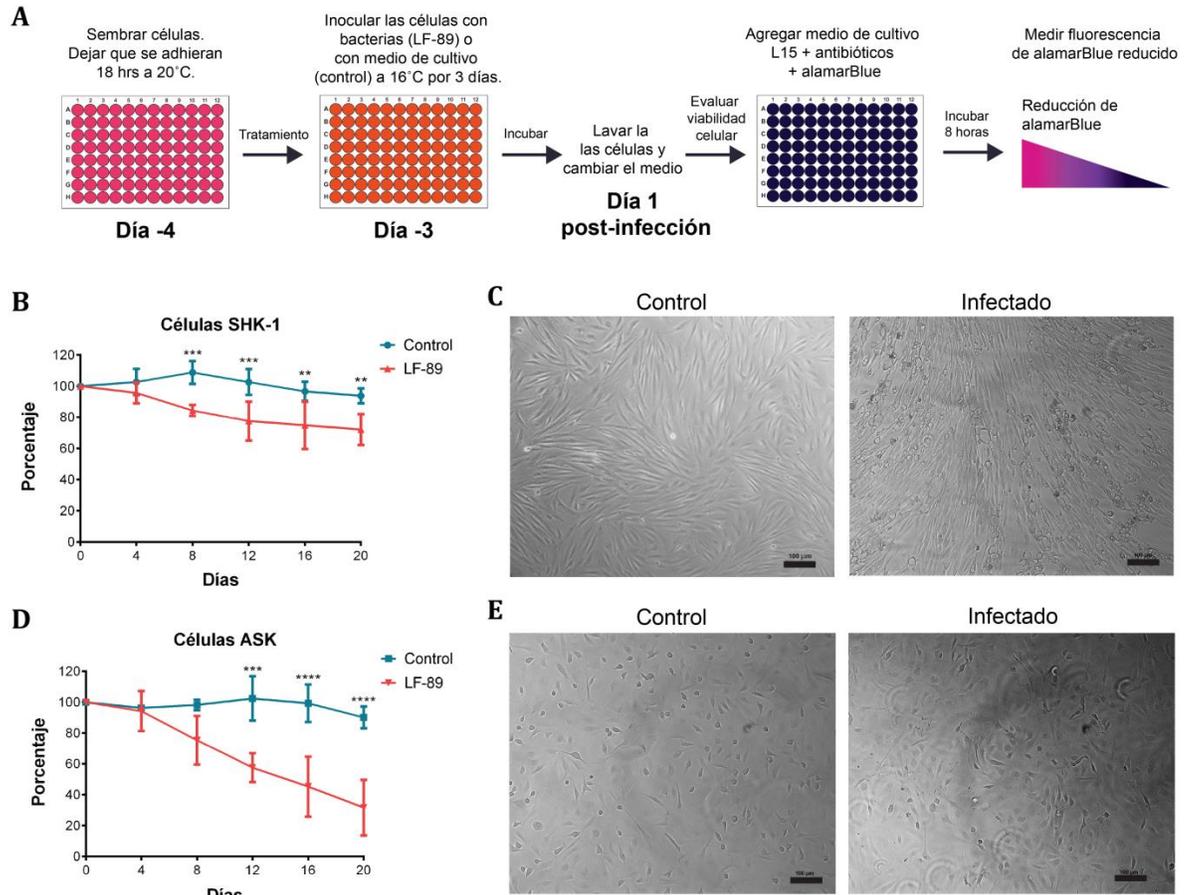


Figura 20. Infecciones de *P. salmonis* en cultivos celulares derivados de salmón atlántico. A, esquema del procedimiento de infección y evaluación de la viabilidad celular con alamarBlue. Para los cultivos celulares SHK-1 y ASK, el porcentaje indicado corresponde a la medición de la fluorescencia obtenida con respecto al día 0 (antes de infectar). Se muestra el promedio de 4 y 3 ensayos ( $\pm$ desvest) respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas (ANOVA de dos vías, \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  y \*\*\*\* $P < 0,0001$ ) para cada día entre el control y la infección. Las imágenes muestran fotografías representativas tomadas en campo claro luego de 12 días post-inoculación con *P. salmonis* LF-89. Amplificación 100x, la barra negra corresponde a 100  $\mu$ m. B, curva de viabilidad en cultivo celular SHK-1 con alamarBlue. C, fotografía de cultivos celulares SHK-1 sin infectar (control) e infectado. D, curva de viabilidad en cultivo celular ASK con alamarBlue. E, fotografía de cultivos celulares ASK sin infectar (control) e infectado.

Las infecciones en cultivos primarios se realizaron según el protocolo de infección en SHK-1, pero con una mayor cantidad de células sembradas y una incubación de sólo un día con las bacterias en vez de 3, considerando la menor duración del cultivo primario en el tiempo. A pesar de que la viabilidad de este cultivo disminuyó rápidamente con los días, esta disminución fue mayor en los cultivos incubados con *P. salmonis*. Los días 4 y 6 post-exposición mostraron diferencias significativas en la viabilidad de los cultivos con la bacteria, comparados con los controles (Figura 21B). Esta tendencia se mantuvo hasta el fin del experimento, aunque de forma no significativa.

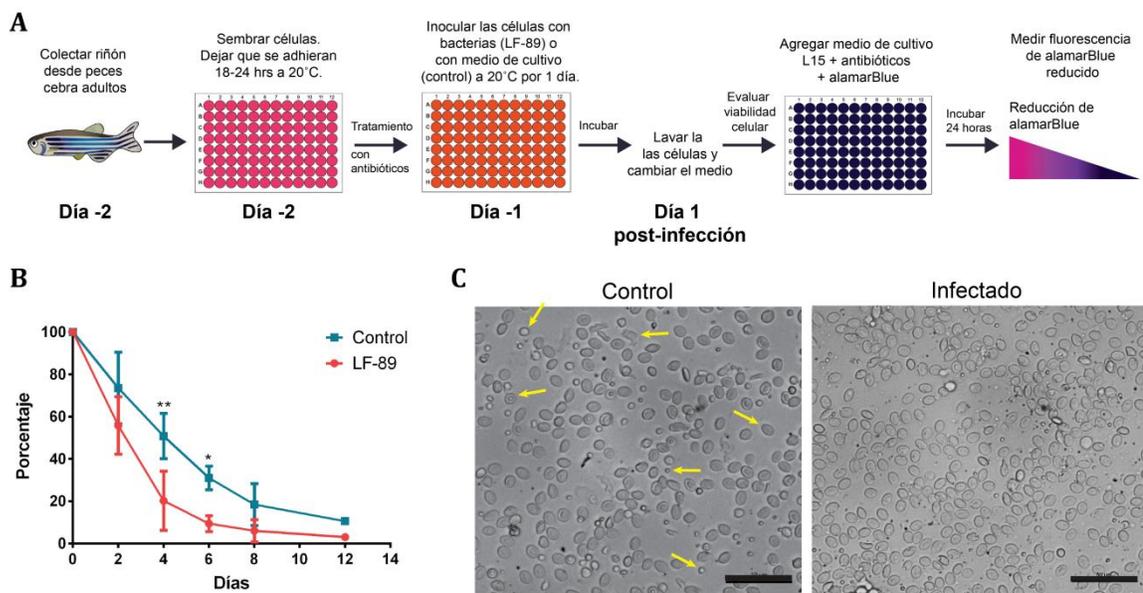


Figura 21. Infecciones de *P. salmonis* en cultivos primarios de riñón de peces cebra adultos. A, esquema del procedimiento de infección y evaluación de la viabilidad en cultivo primario con alamarBlue. B, curva de viabilidad celular. El porcentaje indicado corresponde a la medición de la fluorescencia obtenida normalizada con respecto al día cero (antes de infectar). Se muestra el promedio de 3 ensayos ( $\pm$ desvest). Los asteriscos indican diferencias significativas (ANOVA de dos vías, \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$ ) para cada día entre el control y la infección (LF-89). C, microfotografías de cultivo primario de riñón de pez cebra adulto sin infectar (control) e infectado con *P. salmonis*, luego de 4 días post-inoculación. Imagen tomada con amplificación 400x, la barra corresponde a 50  $\mu$ m. Las flechas amarillas indican distintas morfologías celulares presentes en el cultivo primario.

Anteriormente, se ha descrito que el cultivo primario de riñón de pez cebra se compone de una variedad de tipos celulares (117, 126) que no son fáciles de observar sin las tinciones apropiadas. A pesar de ello, mediante microfotografías se pudo observar más de una morfología celular sin necesidad de tinciones, pero sin poder clasificarlas (Figura 21C).

Con el fin de conocer algunos tipos celulares presentes, se analizó el nivel de ARN mensajero de genes expresados únicamente en células inmunes: mieloperoxidasa (*mpx*) para neutrófilos y el gen 1 expresado en macrófagos (*mpeg-1*) para macrófagos (38, 69). La expresión de estos genes fue cuantificada en cultivos primarios sin infectar, e infectados con *P. salmonis* luego de 1 o 5 días. Lo primero que se observó fue una diferencia en los niveles de expresión del marcador de neutrófilos con respecto al de macrófagos. En los cultivos sin infectar, la expresión del gen *mpx* fue mayor al *mpeg-1* en los dos tiempos evaluados. A los 5 dpe, la expresión de *mpeg-1* no varió de forma significativa, mientras que la de *mpx* disminuyó con el tiempo.

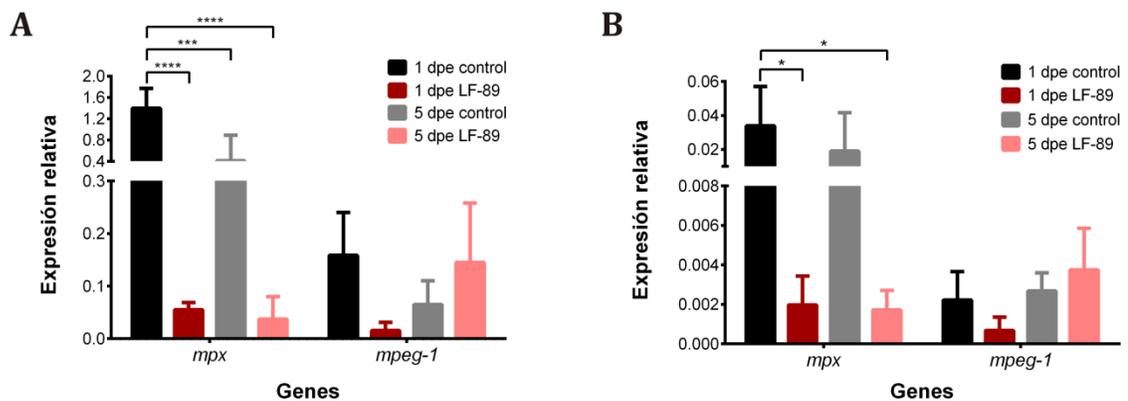


Figura 22. Expresión de marcadores de neutrófilos o de macrófagos durante la infección en cultivos primarios de riñón de pez cebra. Identificación células inmunes en el cultivo primario luego de 1 y 5 días post-exposición (dpe) a *P. salmonis* LF-89 o en el medio de cultivo (control), mediante la cuantificación de un gen de expresión única en neutrófilos (*mpx*) o en macrófagos (*mpeg-1*) de peces. El nivel de expresión se muestra relativo al gen *ef1a* (A) y al gen ribosomal 18S (B). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (ANOVA de dos vías con post-test de Tukey para comparaciones múltiples, \*P<0,05, \*\*\*P<0,001, \*\*\*\*P<0,0001).

Por otro lado, sí se observaron cambios al infectar los cultivos primarios con *P. salmonis*. La expresión del marcador *mpx* disminuyó en un orden de magnitud y de forma significativa luego de solo 1 dpe, y se mantuvo en los mismos niveles a los 5 dpe, siendo significativamente menor que la observada en el control (Figura 22). Al comparar la expresión de *mpeg-1* en cultivos infectados, se observó una tendencia a disminuir en comparación al control al 1 dpe, sin embargo, esta diferencia no es significativa, y los niveles de expresión se normalizaron luego de 5 dpe. De esta forma, la presencia de la bacteria en los cultivos primarios afectó las poblaciones de células inmunes, disminuyendo significativamente la población de neutrófilos del cultivo primario.

Luego, se buscó evaluar si ocurría infección mediante la identificación de la bacteria al interior de las células de los distintos cultivos celulares, y posteriormente la replicación de la bacteria en ellas. Se utilizaron anticuerpos específicos para *P. salmonis*, y mediante microscopía de fluorescencia se pudo detectar a la bacteria en los cultivos celulares SHK-1 y ASK (Figura 23), y en el CPR de pez cebra (Figura 24).

Las células de SHK-1 y ASK fueron sembradas y fijadas a los 6 y 12 dpe, para observar una etapa temprana y otra tardía. Luego de fijar las células, estas se permeabilizaron e incubaron con un anticuerpo primario policlonal contra *P. salmonis*, y un secundario acoplado a fluorescencia roja (Alexa Flúor 594®). Posteriormente, se marcó el citoesqueleto de actina en verde con faloidina (Alexa Flúor 488®) y el ADN en azul con DAPI (Figura 23).

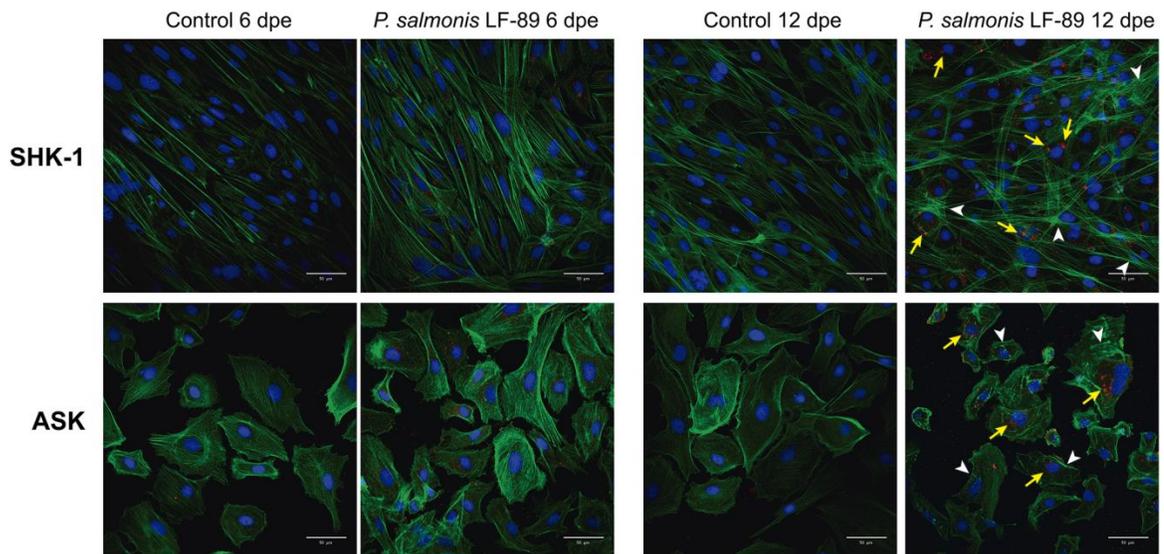


Figura 23. Inmunofluorescencia de cultivos celulares expuestos a *P. salmonis*. Células SHK-1 y ASK se fijaron luego de 6 o 12 días (días post-exposición, dpe) con la bacteria o con medio de cultivo bacteriano (control). El núcleo fue marcado en azul con DAPI y la actina en verde con faloidina Alexa Flúor 488®. Para la bacteria se utilizó un anticuerpo policlonal anti-*P. salmonis* y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Flúor 594® (rojo). Flechas amarillas indican agrupaciones de bacterias cerca del núcleo, y las blancas zonas de alteración en la organización de la actina. Barra, 50  $\mu$ m.

En la Figura 23 se muestran imágenes representativas de las células marcadas luego de los tiempos indicados. Se observó una marca asociada a la presencia de bacterias en los cultivos SHK-1 y ASK, por sobre la tinción inespecífica de los controles. En el panel izquierdo, correspondiente al tiempo menor de incubación, la marca de *P. salmonis* se encontró dispersa y asociada a las células, aunque no se distingue claramente si están dentro de ellas.

En el caso de los cultivos ASK (panel inferior izquierdo), algunas bacterias se encontraron formando agrupaciones, pero mayormente dispersas. Luego de 12 dpe esta disposición cambió y, tanto en los cultivos SHK-1 como en los ASK, se observaron cúmulos de bacterias agrupadas en la cercanía del núcleo celular (Figura 23, flechas amarillas). Fueron visibles varias agrupaciones de bacterias por célula, cercanas al núcleo y en zonas distantes asociadas al esqueleto de actina. La disposición de ambos tipos celulares también se vio alterada, las células perdieron en parte su organización en monocapa y se alteró la integridad de la actina, al compararlas con las células control (Figura 23, puntas de flechas blancas). Esta diferencia en la distribución y ubicación de *P. salmonis* asociada a células ASK y SHK-1 en tiempos tardíos de infección, no pudo observarse en los CPR de pez cebra. En ellos, como tiempo de exposición temprano se tomó el primer día luego de la exposición a la bacteria, luego del lavado y tratamiento con antibióticos (1 dpe), debido a que a los 2 dpe ya se encontraba menos de un 60% de la viabilidad celular inicial al exponer a las células a *P. salmonis* (Figura 19B). Para tiempo de exposición tardía se utilizó el día 5, ya que a los 6 dpe la viabilidad de las células expuestas a *P. salmonis* disminuyó cerca de un 90% respecto al control (Figura 19B). Mediante la inmunofluorescencia, se observó la marca de la bacteria en los cultivos inoculados con *P. salmonis*, asociada a células (Figura 24, cerca de los núcleos celulares en azul) y a restos celulares (marca roja no asociada a núcleos en la Figura 24).

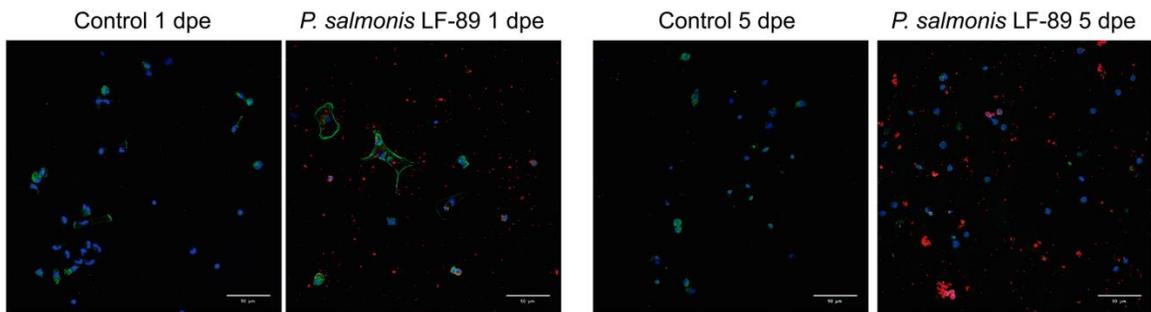


Figura 24. Inmunofluorescencia de cultivos primarios de riñón de pez cebra infectados con *P. salmonis*. Las células se fijaron luego de coincubar 1 o 5 días (días post-exposición, dpe) con la bacteria o con medio de cultivo bacteriano (control). El núcleo celular fue marcado en azul con DAPI y la actina en verde con faloidina Alexa Flúor 488®. Para la bacteria se utilizó un anticuerpo policlonal anti-*P. salmonis*, y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Flúor 594® (rojo). Barra, 50  $\mu$ m.

A pesar del uso de vidrios tratados, la adhesión de las células del CPR fue débil y estas fueron fácilmente lavadas por los sucesivos pasos de los protocolos de tinción, por lo cual no

fue posible observar interrupciones en la distribución del cultivo primario, o diferencias en la cantidad de células observadas. Por otro lado, el menor tamaño de células de CPR en comparación a las líneas celulares, dificultó evaluar la distribución de la bacteria en las células, o cambios en la misma. Sin embargo, con la inmunofluorescencia (Figura 24) fue posible ver la superposición de señales de tinciones celulares (actina en verde y núcleo en azul) con la marca de la bacteria (rojo), lo que sugiere la presencia de agrupaciones de bacterias al interior de las células. En los cultivos primarios expuestos a la bacteria, las células que presentaron marca de la bacteria parecen contener agrupaciones más que bacterias individuales, debido a la intensidad y tamaño de la marca (Figura 24).

Por último, para comprobar que la bacteria se encontraba replicándose al interior de los cultivos celulares, se cuantificó la expresión de los genes *housekeeping* de la bacteria, *recF* y *rho*, por PCR cuantitativo. Se utilizó una curva estándar de expresión de estos genes en distintas cantidades de bacterias, contabilizadas en cámaras de conteo de Petroff-Hauser. En base a esto, se determinó el número de bacterias presentes en los cultivos en los dos tiempos de exposición a *P. salmonis* determinados anteriormente, una fase temprana (6 dpe para las líneas celulares SHK-1 y ASK, y 1 dpe para los CPR de pez cebra) y otra tardía (12 dpe para las líneas celulares SHK-1 y ASK, y 5 dpe para los CPR de pez cebra). Se calculó además las veces de cambio en la cantidad de bacterias en cada cultivo, como el aumento de la expresión de los genes *housekeeping* bacterianos en el tiempo de infección tardía con respecto a la infección temprana, relativo a la expresión de los genes *housekeeping* celulares de los distintos hospederos.

En la tabla de la Figura 25 se muestra cuánto aumentó el número total de bacterias en la fase tardía versus la fase temprana de exposición, y en el gráfico se indica el aumento de bacterias de forma relativa a la cantidad de células del hospedero. En los tres cultivos evaluados se observó un aumento en la cantidad de bacterias al avanzar el tiempo. Al tiempo final, se calculó cantidad de bacterias superior a las  $10^7$  en los cultivos ASK, y superior a  $10^8$  para los cultivos SHK-1 y CPR de pez cebra. Considerando que las bacterias inoculadas en los cultivos fueron removidas por sucesivos lavados o tratamientos con antibióticos, se puede concluir que *P. salmonis* es capaz de multiplicarse al interior de los cultivos celulares evaluados, y por lo tanto puede infectar estas células.

Al comparar el aumento en la cantidad de bacterias expresado como veces de cambio en cada cultivo celular, se observó un mayor aumento en el número de células en el cultivo SHK-1, entre la fase temprana y tardía de infección (Figura 25, gráfico). Esto es relevante ya que la bacteria se replica de forma intracelular, y se observó un aumento de la cantidad de bacterias relativo al número de células presentes en el cultivo en cada fase de infección.

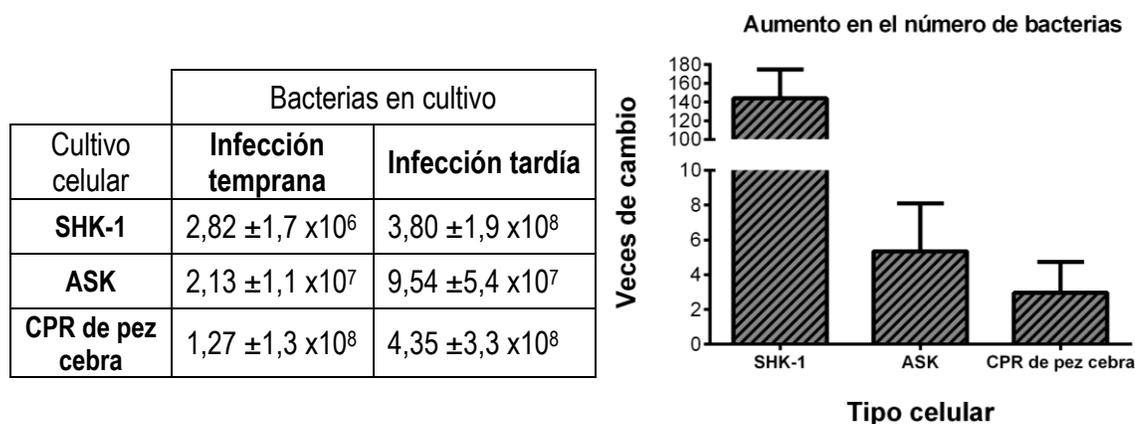


Figura 25. Aumento de la carga bacteriana durante la infección de *P. salmonis* en los distintos cultivos celulares. Cuantificación por RT-qPCR de la expresión de los genes *housekeeping* bacterianos *recF* y *rho* en cultivos celulares de SHK-1, ASK y CPR de pez cebra infectados con *P. salmonis* en MOI=100. Se muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes. Izquierda, tabla donde se muestra la cantidad de bacterias en la fase temprana de infección (6 dpe para cultivos SHK-1 y ASK, y 1 dpe en CPR), y en la fase tardía de infección (12 dpe en los cultivos SHK-1 y ASK, y 5 dpe en CPR), calculado como el promedio de los valores obtenidos con los dos *housekeepings*. Derecha, gráfico del aumento en la cantidad de bacterias en la infección tardía con respecto a la infección temprana en cada cultivo, calculado como las veces de cambio en la expresión de los genes *housekeeping* bacterianos, de forma relativa a la expresión de los *housekeeping* del hospedero (*ef1a* y *18S*).

### 3.6 Desarrollo de un modelo de infección *in vivo* de *P. salmonis* en larvas de pez cebra

Una vez establecidas las infecciones en distintos cultivos celulares, y observado que *P. salmonis* se replica en un modelo de infección de pez cebra, como el cultivo primario de riñón de pez adulto, se buscó establecer infecciones en el pez vivo. Para lograr este objetivo, se utilizaron larvas de peces cebra, tanto silvestres como transgénicas, debido a las múltiples ventajas que tiene para desarrollar modelos bacterianos de infección como modelo alternativo al hospedero natural.

Las larvas de pez cebra han sido utilizadas como modelo alternativo para evaluar la infección de bacterias que crecen en un rango amplio de temperaturas, como es el caso de subespecies de *Francisella noatunensis*. Para ello se realizaron inyecciones en un rango inferior y superior a la temperatura óptima de desarrollo del pez cebra (de 22 a 32°C) con buenos resultados (20), por lo que nos basamos en ese protocolo para realizar inyecciones con *P. salmonis* en larvas de pez cebra de 48 horas post-fecundación (hpf) a 22°C (Figura 26). Se realizaron numerosas pruebas y cambios en las condiciones de infección, debido a las diferencias entre este modelo y el hospedero natural de *P. salmonis*. La temperatura óptima para el desarrollo del pez cebra son 28°C, sin embargo, la bacteria *P. salmonis* no crece más allá de los 23°C (Figura 17).

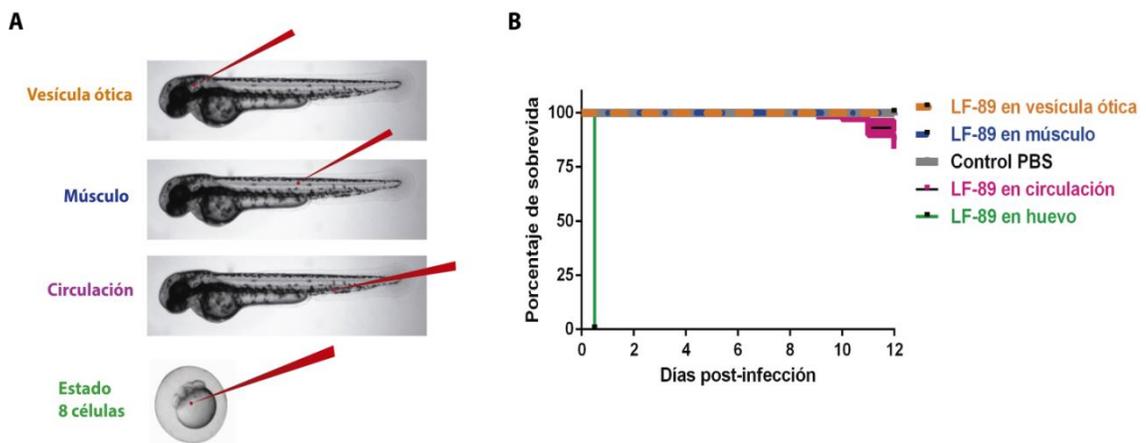


Figura 26. Ensayos de inyección de *P. salmonis* LF-89 en el pez cebra. A, esquema de las zonas de inyección de la bacteria en los distintos estado de desarrollo. Se utilizaron larvas de 2 días post-fecundación (2 dpf) para las inyecciones en la vesícula ótica, en músculo y en la circulación; la inyección en embrión en estado de 8 células se realizó en el vitelo cerca del cigoto. B, curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de supervivencia de los embriones o larvas de pez cebra Tab5 en el tiempo, luego de la inyección localizada (vesícula ótica y músculo) o sistémica (circulación o estado de 8 células).

Con el objetivo de generar una infección en la larva, se realizaron inyecciones de *P. salmonis* desde un cultivo líquido en fase estacionaria de crecimiento. Anteriormente, observamos que las bacterias en esta fase eran capaces de establecer infecciones productivas en diversos cultivos celulares, por lo que se hizo lo mismo para las larvas. Debido a que no se conoce el comportamiento de la bacteria en este hospedero alternativo, buscamos establecer infecciones localizadas y sistémicas mediante la inyección de *P. salmonis* en la vesícula ótica y músculo (localizada), y en la circulación sanguínea

(inyectando en la arteria caudal) y en el vitelo de un cigoto en estado de 8-células (sistémica), según se ha reportado anteriormente (12). Para ello, embriones silvestres de peces Tab5 de 48 hpf crecidos a 28°C desde la postura, y huevos fecundados con cigotos en estado de 8-células fueron microinyectados con una suspensión bacteriana ( $\pm 20.000$  bacterias por embrión) e incubados a 22°C. Un esquema de la zona de inyección y la etapa de desarrollo del pez inyectado se muestra en la Figura 26A. Los peces inyectados se monitorearon diariamente hasta los 12 días post-infección (dpi) y se contabilizaron las muertes, con lo cual se construyeron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Figura 26B).

La temperatura y el estado de desarrollo del pez resultaron ser los más determinantes para el éxito de los ensayos. La inyección con *P. salmonis* en huevos generó la muerte del 100% de estos durante el primer día. Contrariamente, al inyectar la bacteria de forma localizada en larvas de 48 hpf todos los individuos sobrevivieron hasta el final de experimento, al igual que los inyectados con solución salina (PBS) como control. Luego de los 12 días, de un total de 70 larvas inyectadas con *P. salmonis* en la circulación, sobrevivió un 87%. Este nivel de mortalidad fue relativamente constante en distintos experimentos, y estadísticamente distinto de los controles inyectados con PBS (test de comparaciones múltiples de Gehan-Breslow-Wilcoxon,  $P < 0,01$ ). Además del resultado de muerte, la inyección de la bacteria en la circulación generó edemas en la zona cardiaca en algunos de los peces (menos del 20%), lo que no fue observado al inyectar la bacteria en otras zonas. Finalmente, se logró establecer exitosamente condiciones que permitieron observar efectos patofisiológicos en el pez cebra luego de la inoculación de la bacteria.

En salmones, esta bacteria es recuperada en grandes títulos desde el riñón anterior, donde ocurre la hematopoyesis en peces teleósteos (revisado en (147)), y además es capaz de reproducirse en células inmunes como macrófagos. Por ello, decidimos realizar las inyecciones de bacterias en peces transgénicos que expresan proteínas fluorescentes en macrófagos *Tg (mpeg-1:Dendra2)* o en neutrófilos *Tg (mpx:EGFP)*. Esto además permite ver si hay reclutamiento de células del sistema inmune en zonas específicas, y de visualizar el proceso inflamatorio producto de la inyección. La inoculación de la bacteria se realizó con las mismas condiciones utilizadas para las larvas silvestres Tab5, es decir, larvas de 2 dpf, bacterias en fase estacionaria e incubación a 22°C.

Con la primera línea transgénica (macrófagos marcados) las larvas inyectadas fueron fotografiadas luego de 1, 4 y 7 dpi. Al comparar las larvas inyectadas con *P. salmonis* con las larvas controles, no se observó un fenotipo particular reconocible y que permaneciera en el tiempo (Figura 27). Entre los días 1 y 4 post-inyección se observó una gran variación en la fluorescencia de distintas larvas de la misma condición de inyección, inclusive las larvas control, por lo que no fue posible identificar diferencias producto de la infección.

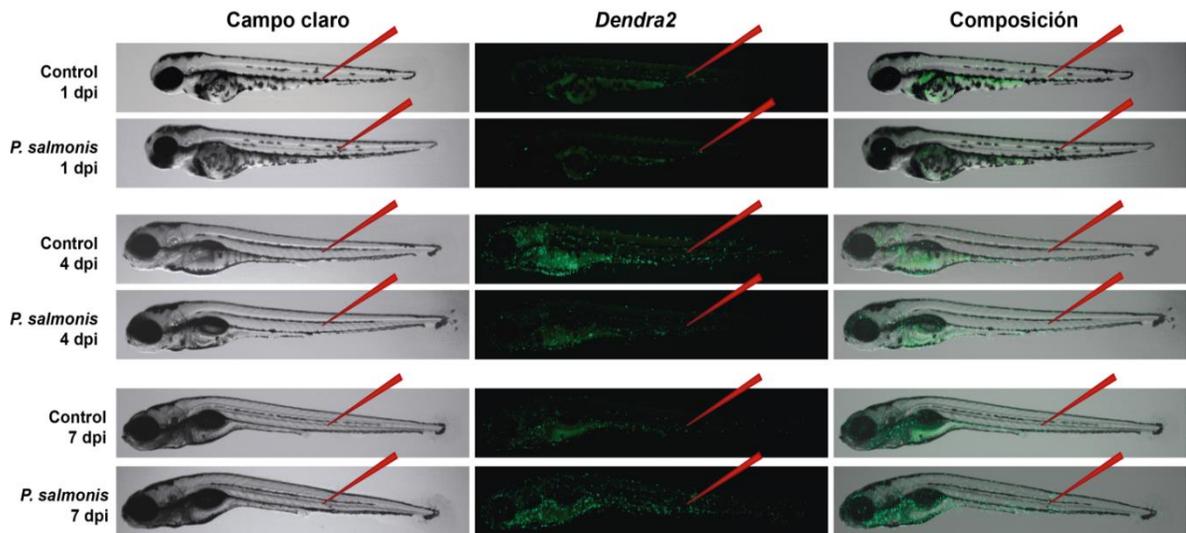


Figura 27. Inyecciones de *P. salmonis* en la circulación de larvas de pez cebra *Tg(mpeg-1:Dendra2)*. Imágenes representativas de larvas de pez cebra de 2dpf con macrófagos marcados con *Dendra2* (verde), inyectadas con solución salina (Control) o con ~20.000 bacterias en la circulación caudal, luego de 1, 4 o 7 días post-inyección (dpi). La punta de flecha roja indica la zona de la inyección. Imágenes tomadas en lupa de fluorescencia con un aumento 16x.

Distinto fue lo observado con las larvas *Tg(mpx:EGFP)* con neutrófilos marcados en verde. Luego de la inyección, se observó un reclutamiento de neutrófilos en la zona de la inyección tanto en las larvas control como en las inyectadas con *P. salmonis*. Esto se pudo observar hasta 1 dpi en las larvas inyectadas con *P. salmonis* (Figura 28). Posteriormente, se observó una distribución y cantidad de neutrófilos distinta en las larvas inyectadas con *P. salmonis*, con respecto a las larvas control, similar a lo que se observa durante la granulopoyesis de emergencia con otras bacterias (59). Esta respuesta de los neutrófilos fue catalogada en dos grupos: algunas larvas presentaron una aparente mayor cantidad de células marcadas fluorescentemente tanto en la circulación como en tejidos del pez, lo que se denominó como inflamación general (Figura 28, *P. salmonis* 4 dpi (a) y 7 dpi (a)); en otras larvas, los

neutrófilos se concentraron en la región ventral del pez a lo largo del eje antero posterior, desde la zona hematopoyética caudal hasta aproximadamente la vejiga natatoria, lo cual fue llamado reclutamiento ventral de neutrófilos (Figura 28, *P. salmonis* 4 dpi (b) y 7 dpi (b)). Estos fenotipos no fueron observados en las larvas control inyectadas con PBS (Figura 28, arriba). Ambos fenotipos fueron observados a partir del tercer día luego de la inyección, y se mantuvieron hasta el final del experimento (Figura 29).

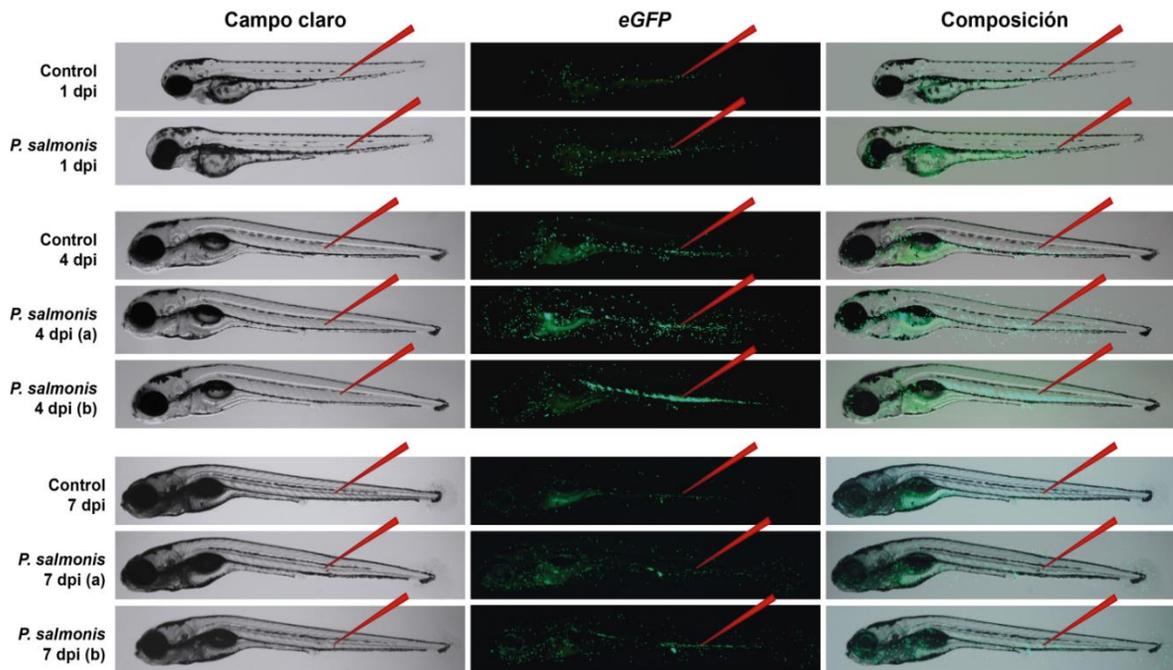


Figura 28. Inyecciones de *P. salmonis* en la circulación de larvas de pez cebra *Tg(mpx:EGFP)*. Imágenes representativas de larvas de pez cebra con neutrófilos marcados con *eGFP* (verde) de 2 dpf, inyectadas con solución salina (Control) o con ~20.000 bacterias en la circulación caudal, luego 1, 4 o 7 días post-inyección (dpi). La punta de flecha roja indica la zona de la inyección. A los 4 y 7 dpi se muestran los dos fenotipos de distribución de neutrófilos observados al inyectar la bacteria; (a) es llamada inflamación general, mientras que (b) el reclutamiento ventral de neutrófilos. Imágenes tomadas en lupa de fluorescencia con un aumento 16x.

Los fenotipos observados en respuesta a la inyección con *P. salmonis*, el edema cardiaco, la inflamación general y el reclutamiento ventral de neutrófilos, fueron contabilizados diariamente en las larvas *Tg(mpx:EGFP)*. Estos fenotipos se contabilizaron separadamente, por lo que los individuos con más de un fenotipo fueron cuantificados en todas las categorías correspondientes. Los resultados se muestran como el porcentaje de larvas que presentó el fenotipo, con respecto al total de larvas vivas (Figura 29).

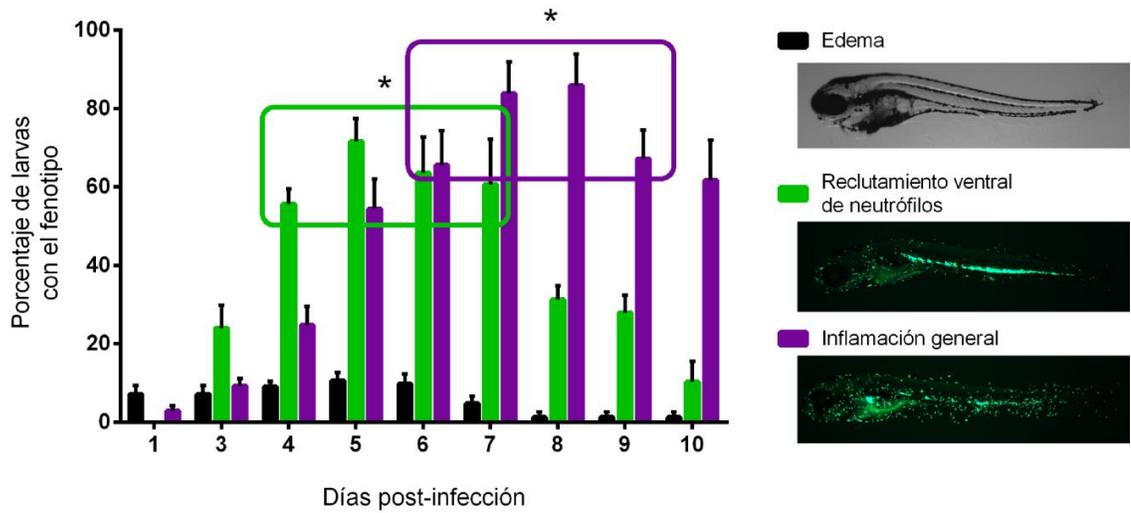


Figura 29. Curso temporal de los fenotipos observados luego de la infección con *P. salmonis* LF-89. Se monitorearon 30 larvas *Tg(mpx:EGFP)* de 2dpf inyectadas en la circulación con ~20.000 bacterias o solución salina como control, por 12 días. Los fenotipos de edema, reclutamiento de neutrófilos e inflamación general se contabilizaron diariamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$  con un ANOVA de dos vías) entre los días enmarcados con un rectángulo y los demás tiempos evaluados.

Un bajo pero significativo porcentaje de los peces (>10%) presentó edema cardiaco con acumulación de líquido en el pericardio, fenotipo que se mantuvo en los peces hasta el final del experimento o la muerte. Entre un 24% y un 71% de los peces mostró un fenotipo claro de reclutamiento de neutrófilos en la zona ventral, a lo largo de la línea hematopoyética caudal extendiéndose hacia anterior de las larvas. Este fenotipo tuvo un máximo de ocurrencia en las larvas entre los días 4 y 7 post-infección (ANOVA de dos vías con post-test de Tukey,  $P < 0,001$ ), luego de lo cual disminuyó el número de individuos con este fenotipo. El fenotipo de inflamación general aparece un poco después que el anterior y tuvo un máximo entre los días 6 y 9 post-inyección (ANOVA de dos vías con post-test de Tukey,  $P < 0,0001$ ), con un 65-85% de larvas que presentaron este fenotipo.

Para comprobar que estos fenotipos se correlacionaban con la presencia de *P. salmonis* se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos anti-*P. salmonis* y anti-EGFP presente en los neutrófilos del pez (Figura 30). De esta forma se pudo detectar la bacteria en pequeños agregados a lo largo de la línea hematopoyética caudal, los cuales no se observaron en superposición a la marca de los neutrófilos. Esto sugiere que la bacteria permaneció en el pez al menos hasta los 7 dpi, se establece en una zona específica y que ésta no corresponde

a neutrófilos ni se encuentra dentro de ellos. Cabe señalar que, a nuestro conocimiento, el comportamiento denominado reclutamiento ventral de neutrófilos no ha sido descrito como una respuesta del pez cebra frente a otros patógenos bacterianos, por lo que podría corresponder a un fenotipo particular asociado específicamente a *P. salmonis*.

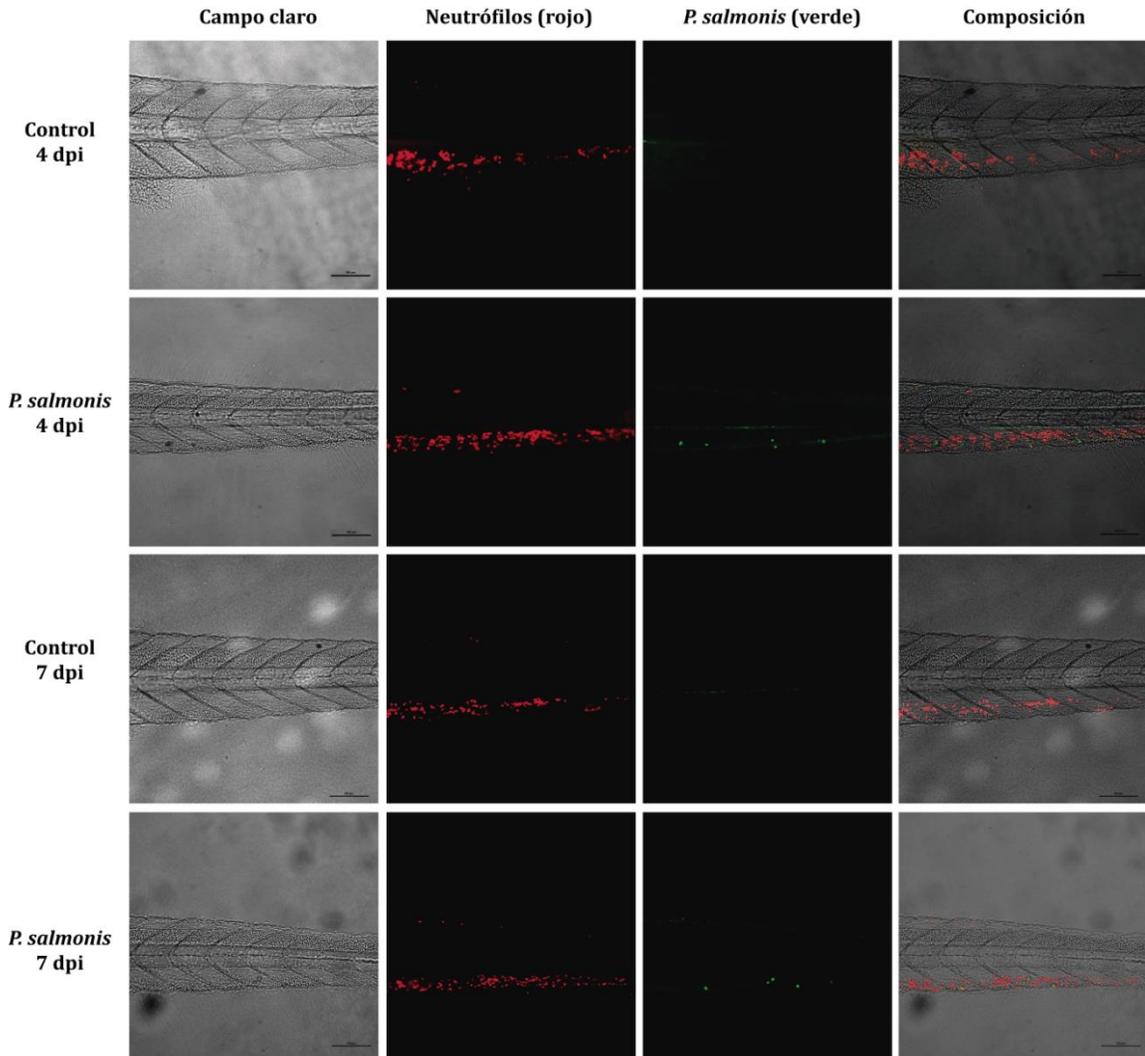


Figura 30. Inmunofluorescencia de larvas *mpx:EGFP* de pez cebra inyectadas con *P. salmonis* LF-89 o con solución salina como control. Larvas con los neutrófilos marcados (*mpx:eGFP*) de 2 dpf fueron inyectadas en la circulación con ~12.000 bacterias o solución salina como control. Luego de 4 o 7 días post-inyección (dpi) las larvas se fijaron, despigmentaron y marcaron los neutrófilos en rojo (anticuerpo primario anti-*EGFP* y secundario acoplado a Alexa Flúor 594®) y las bacterias en verde (primario anti-*P. salmonis* y secundario acoplado a Alexa Flúor 488®). Imágenes de microscopía confocal con aumento 400X, la barra corresponde a 100  $\mu$ m.

Alternativamente a la inmunofluorescencia, se cuantificó la cantidad de bacterias presentes en las larvas inyectadas mediante PCR cuantitativo, con partidores específicos para genes de *P. salmonis*. Lamentablemente, los genes bacterianos no se detectaron en forma cuantitativa y estable a lo largo de los días del ensayo, probablemente por la mayor cantidad de material génico del pez cebrá con relación al bacteriano. Debido a que no pudimos cuantificar a las bacterias al interior de las larvas, y que el PCR cuantitativo no tuvo resultados concluyentes en las condiciones ensayadas, decidimos evaluar la expresión de genes relacionados con la virulencia de *P. salmonis* en infecciones en cultivos celulares.

### **3.7 Análisis de la expresión global del proteoma de la infección de *P. salmonis* en cultivos de macrófagos de salmón**

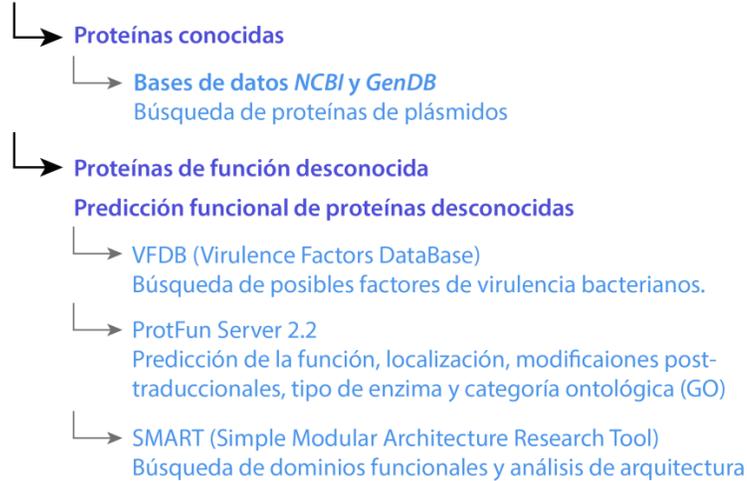
Para identificar los potenciales factores de virulencia de *P. salmonis*, se realizó una búsqueda de genes cuya expresión fuera alterada durante la infección en cultivos celulares SHK-1, con respecto a cultivos bacteriológicos. Para ello se tomó una aproximación de gran escala, analizando el proteoma total de las células SHK-1 infectadas con *P. salmonis* en distintas etapas de infección, según se definió anteriormente (Figura 18). De las tres etapas descritas, la vacuolización y la propagación fueron seleccionadas para realizar los estudios proteómicos. En estas etapas, las bacterias se encontraron mayoritariamente dentro de las células, ya que aún no ocurre la ruptura de la monocapa celular. La expresión de los posibles FdeV fue comparada con la de bacterias provenientes de cultivo líquido en estado exponencial de crecimiento a 18°C como control (indicado con una flecha verde en la Figura 17A). Se eligió esta etapa de crecimiento para evitar comparar la proteómica de las bacterias durante la infección, con bacterias en estado de estrés. La preparación y el análisis de las muestras se detalla en la sección de materiales y métodos, Figura 2.

Las muestras de infección en estado de vacuolización y propagación, y el control de medio de cultivo bacteriológico se analizaron mediante la técnica de proteómica de alto rendimiento “Q-exactive”, basado en espectrometría de masas con un espectrómetro de cuadrupolo “Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer”. El análisis de las muestras arrojó un listado de proteínas presentes en las distintas condiciones.

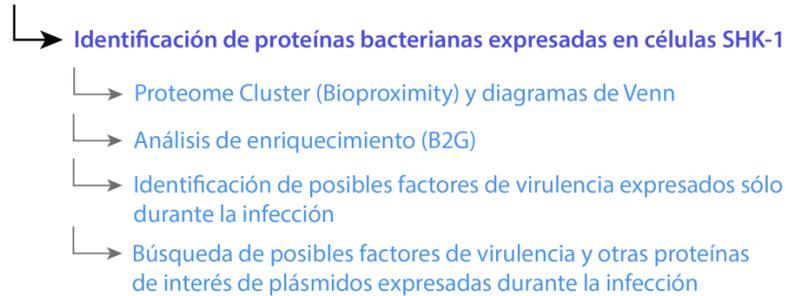
## Proteómica cuantitativa

### Proteínas del patógeno

#### Identificación de proteínas bacterianas (UNIPROT)



#### Determinación de proteínas presentes durante la infección



### Proteínas del hospedero

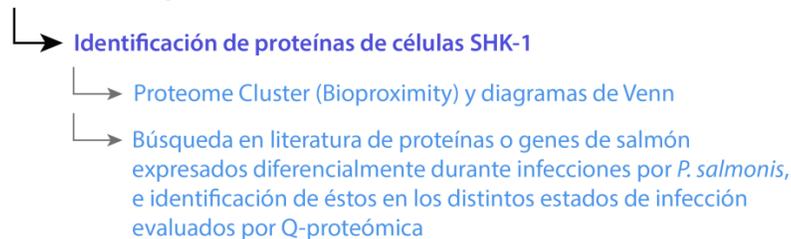


Figura 31. Diagrama de flujo del análisis de la proteómica cuantitativa. Esquema del análisis realizado para la proteómica cuantitativa de cultivos celulares de SHK-1 sin infectar, infectados con *P. salmonis* en estado de vacuolización y propagación, y bacterias en cultivo bacteriológico.

En la muestra de células en vacuolización se identificaron 1.101 proteínas totales, 758 de ellas de *S. salar* y 343 de *P. salmonis*. De las 1.174 proteínas identificadas en estado de propagación, 796 corresponden a proteínas de *S. salar* y 378 a *P. salmonis*. En la muestra control de células SHK-1, que corresponden a células no infectadas, se identificaron 742

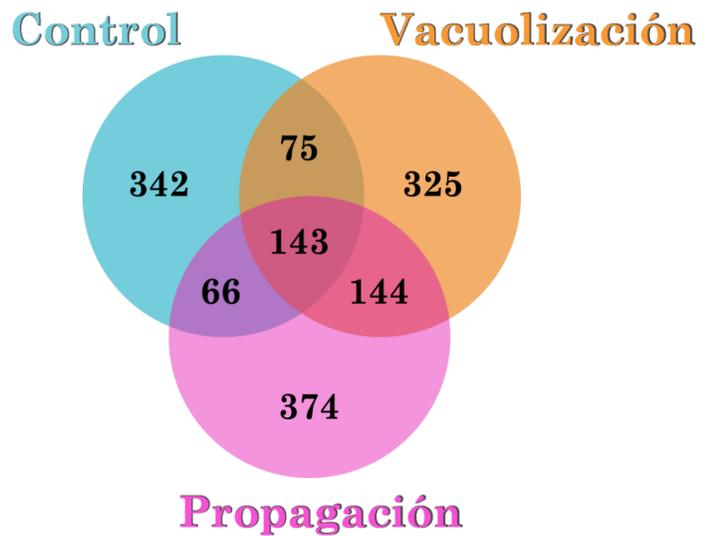
proteínas de *S. salar*. Estas muestras contenían la misma cantidad de células SHK-1, por lo que las proteínas de *S. salar* pudieron cuantificarse y compararse, para determinar si existió una expresión diferencial entre las muestras. La muestra “control de bacterias” (bacterias en fase exponencial, cultivo bacteriológico) fue obtenida de forma distinta. Las bacterias se colectaron desde un cultivo puro, por lo que la cantidad (y proporción) de proteínas de esta muestra no pudo ser comparada cuantitativamente con las proteínas bacterianas obtenidas desde células infectadas. Por tanto, el tratamiento de la proteómica de *P. salmonis* fue distinto al realizado con *S. salar* (Figura 31). A pesar de esto, se identificaron 390 proteínas, una cantidad similar a la obtenida en las otras muestras.

Una vez obtenido el listado de proteínas identificadas para cada muestra, estas se ordenaron, categorizaron y se les asignó una posible función a las proteínas desconocidas. Esto se realizó mediante análisis bioinformáticos de predicción de funciones y dominios proteicos; además basándose en la homología de secuencias con la base de datos VFDB, se identificaron probables factores de virulencia presentes en estas listas de proteínas identificadas en las muestras de infección. El proceso de análisis de los resultados, y la asignación de funciones de proteínas desconocidas se detalla en el diagrama de la Figura 31. El genoma del salmón se encuentra secuenciado, pero no anotado, por lo que se pudieron hacer menos análisis de su proteoma, en relación a *P. salmonis*.

#### Proteínas de *S. salar* (células SHK-1)

En base a la secuencia aminoacídica de las proteínas identificadas, se les asignó un código Uniprot, asociado a la información funcional proteica. De esta forma, se obtuvo un listado de proteínas en cada muestra (control sin infectar, células infectadas en estado de vacuolización y de propagación). Un total de 1.469 proteínas de *S. salar* fueron identificadas en las muestras infectadas y sin infectar. De ellas, 143 proteínas fueron comunes para las tres muestras, 75 sólo para el control y la vacuolización, y 66 sólo para el control y la propagación (Figura 32). Sólo las proteínas presentes en más de una muestra permitieron realizar comparaciones cuantitativas, para así identificar qué proteínas se sobre expresaron en cada condición.

Figura 32. Resumen de resultados de las proteínas de *S. salar* identificadas por proteómica cuantitativa. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en las células SHK-1 sin infectar (control), durante la infección con *P. salmonis* en estado de vacuolización, y en estado de propagación.



Como se detalla en la Figura 31, se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes que se han encontrado sobre-expresados o reprimidos durante la infección con *P. salmonis*, mediante la secuenciación del transcriptoma de la infección, por microarreglos, o la cuantificación de la expresión de genes particulares por RT-qPCR. Se encontraron publicaciones donde realizaron infecciones con las características mencionadas, en las líneas celulares derivadas de salmón SHK-1 (106) y de trucha RTS11 (4); varios de ellos correspondían a ensayos directamente en salmones (*S. salar*), donde se analizó el tejido de órganos blanco de *P. salmonis* como el hígado (120) y el riñón anterior (94, 98, 120, 128). Se identificaron genes del hospedero con expresión diferencial en el contexto de la infección por *P. salmonis*, y ellos fueron agrupados en categorías que estuvieran presentes en más de un estudio, y con más de un representante: apoptosis, respuesta inmune, organización y regulación del citoesqueleto, componente del fagosoma y endocitosis mediada por clatrina. En base a esto, en este trabajo se buscaron proteínas que pertenecieran a estas categorías, o cuyo gen se haya identificado en estudios anteriores. Las proteínas expresadas durante la infección se compararon con aquellas del control sin infectar, tanto en la muestra de vacuolización como en la de propagación (Tabla 12), y los detalles se muestran en los Anexos 2 y 3. En las tablas indicadas se muestran el número de proteínas en cada categoría, y las veces de cambio de la expresión de cada proteína en infección, comparada con el control. Las proteínas con mayor expresión en células infectadas se muestran en rojo, al igual que si sólo se identificaron en la muestra infectada, mientras las proteínas con mayor expresión o únicas del control, se muestran en verde.

Tabla 12. Número de proteínas de *S. salar* identificadas y cuantificadas por proteómica cuantitativa durante la infección de *P. salmonis* en células SHK-1. Se muestra la cantidad de proteínas de salmón identificadas y categorizadas, que se encontraron presentes en cada muestra dentro de la comparación vacuolización versus el control, o propagación versus su control. En rojo se indican las proteínas identificadas en el estado de infección indicado, o sobre-expresadas en el mismo, mientras en verde se indican las proteínas identificadas o sobre-expresadas en los controles.

Categoría	Vacuolización vs. Control		Propagación vs. Control	
	Vacuolización	Control	Propagación	Control
Apoptosis	5	2	2	2
Proteínas de respuesta inmune	27	11	29	11
Organización y regulación del citoesqueleto	17	23	15	26
Componente de fagosoma	2	2	3	1
Endocitosis mediada por clatrina	5	5	9	8

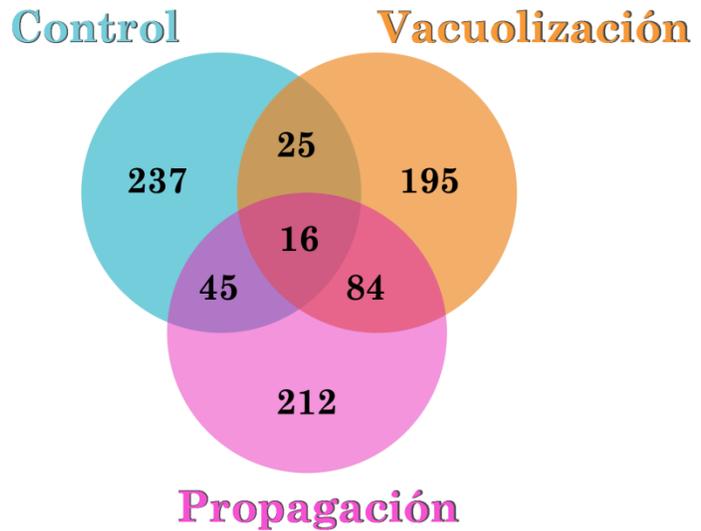
Entre las proteínas relacionadas con la respuesta inmune del hospedero, y encontradas sólo en las células durante la infección o sobre-expresadas en ella, destacan aquellas relacionadas con citocinas o receptores de citocinas (70,4% en la vacuolización y 31% en la propagación), supresores de la vía de señalización de citocinas (7,4% en vacuolización), receptores tipo Toll (22,2% en la vacuolización 31% en la propagación) y el complemento (7,4% en vacuolización). Se encontraron aumentados los receptores de IL-6 e IL-12, mientras los de IL-17 e IL-31 sólo se encontraron en el control. Destaca que la interleucina proinflamatoria IL-1 $\beta$  también fue encontrada sólo en la muestra control, y en ninguno de los estados de infección. Por otro lado, se encontraron diferencias en la expresión de diversas proteínas relacionadas con la estructura y dinámica del citoesqueleto celular. Durante la infección se encontraron aumentadas la actina, la miosina y tropomiosina, mientras se observó una disminución de las cadenas alfa y beta de la tubulina, aunque, de forma general, se identificaron más proteínas relacionadas al citoesqueleto en la condición control. Por último, las categorías relacionadas con fagosoma y endocitosis mediada por clatrina fueron identificadas tanto en células infectadas como en controles.

#### Proteínas de *P. salmonis*

Las proteínas bacterianas identificadas con código Uniprot fueron cotejadas con la anotación del genoma de *P. salmonis* LF-89, transformándola a una notación NCBI. De esta forma, se detectaron 237 proteínas únicas para la muestra control (bacterias desde cultivo

líquido en fase exponencial de crecimiento), 195 únicas de la infección en estado de vacuolización y 212 en propagación. Se encontró un total de 16 proteínas comunes entre las tres muestras, y 84 proteínas comunes para los dos estados de infección. Esto da un total de 491 proteínas bacterianas identificadas exclusivamente durante la infección (Figura 33).

Figura 33. Resumen de resultados de las proteínas de *P. salmonis* identificadas por proteómica cuantitativa. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en las bacterias crecidas en cultivo líquido en fase exponencial de crecimiento (control), durante la infección en células SHK-1 en estado de vacuolización, y en estado de propagación.



En base a la anotación del genoma, se calculó el porcentaje de proteínas identificadas pertenecientes a cada categoría COG (*Cluster of Orthologous Groups*, (47, 122)) y se graficó el porcentaje de proteínas presentes en cada categoría encontrada (Figura 16). En la muestra control destacan las categorías relacionadas con el metabolismo celular, como producción y conversión energética (C), transporte y metabolismo de aminoácidos (E) y nucleótidos (F), traducción, estructura y biogénesis de ribosomas (J, categoría con el mayor número de representantes en esta muestra), y también modificaciones post-traduccionales, recambio de proteínas y chaperonas (O).

Por otro lado, durante la infección se destacan las categorías de mecanismo de transducción de señales (T), la motilidad celular (N), estructuras extracelulares (W), y moviloma, profagos y transposones (X), tres categorías que no presentaron representantes en la muestra control. Proteínas relacionadas con el transporte y metabolismo de coenzimas (H) y tráfico intracelular (U), se encontraron en mayor proporción durante la infección en estado de propagación, mientras en vacuolización destacó el transporte y metabolismo de lípidos (I) por sobre las otras muestras.

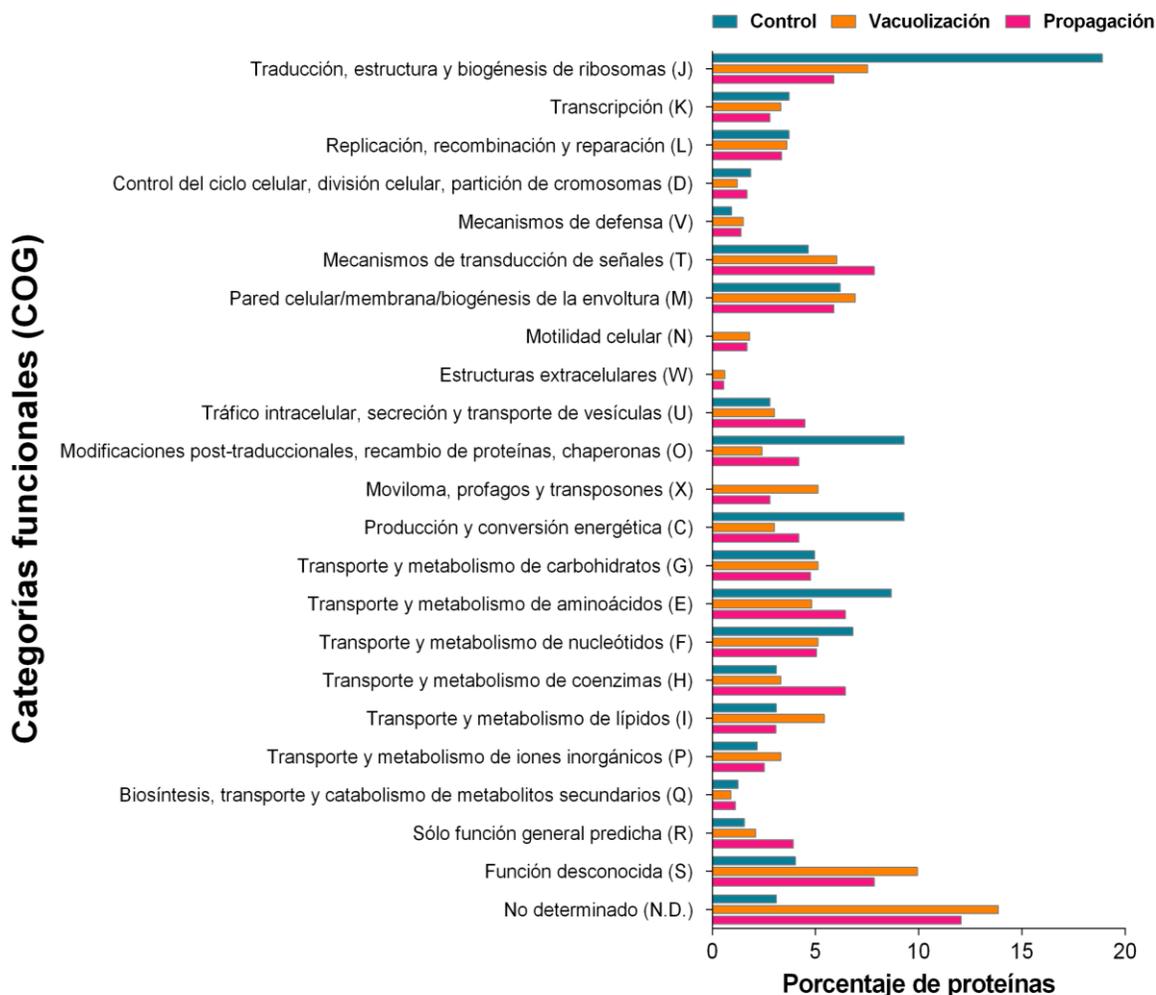


Figura 34. Categorías COG de las muestras de *P. salmonis* analizadas por proteómica. Porcentaje de proteínas pertenecientes a las categorías COG (*Cluster of orthologous groups*) indicadas, con respecto al número total de proteínas bacterianas identificadas por proteómica cuantitativa para las muestras control (bacterias crecidas en fase exponencial en cultivo líquido) y las muestras de infecciones en cultivos SHK-1 (estado de vacuolización y propagación).

#### Análisis de enriquecimiento en *P. salmonis*

Debido a que el genoma de esta bacteria se encuentra secuenciado y anotado, fue posible realizar un análisis de enriquecimiento de las categorías ontológicas en base a los términos GO (*Gene ontology terms*), utilizando la plataforma bioinformática Blast2GO (51). Este análisis fue realizado para cada muestra, indicando qué término GO se encontró sobre-representado en base a las proteínas identificadas por sobre lo observado en el genoma de *P. salmonis* (utilizado como referencia).

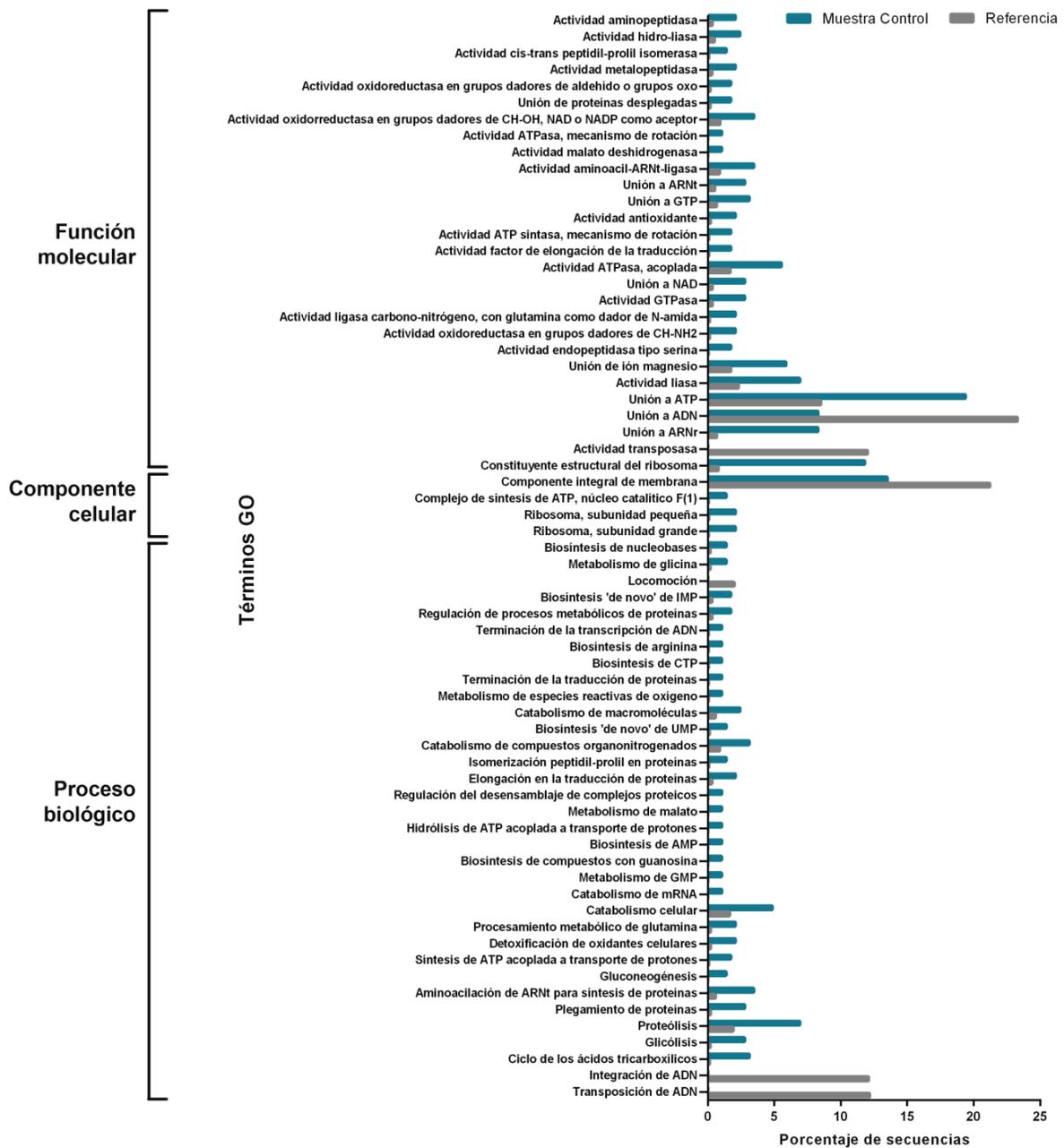


Figura 35. Análisis de enriquecimiento de las proteínas bacterianas encontradas en fase exponencial de crecimiento en cultivo líquido (muestra control). Análisis realizado con el programa Blast2GO en base a las categorías ontológicas o términos GO (*Gene Ontology terms*), asignados a las proteínas bacterianas identificadas por proteómica cuantitativa en el control (bacterias en fase exponencial de crecimiento en cultivo líquido). Se muestran los términos GO que se encontraron sobre o sub-representados en la muestra control con respecto al genoma de referencia (LF-89 ATCC VR-1361), con un FDR<0,05.

En la muestra control (Figura 35), los términos que se encontraron enriquecidos en los procesos biológicos y funciones moleculares corresponden principalmente a GO relacionados con el metabolismo energético y catabolismo celular. Entre ellos, destacó la unión a ATP, GTP y NAD, la síntesis de ATP y la actividad ATPasa, y otros relacionados a la traducción y ribosomas, como unión a ARNt y actividad aminoacil-ARNt ligasa, aminoacilación de ARNt y constituyentes de ribosomas, catabolismo celular y de macromoléculas, ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), gluconeogénesis y glicólisis. La función molecular de actividad transposasa se vio marcadamente subrepresentada en esta muestra.

Dentro de los componentes celulares, los términos GO relacionados ribosomas y complejos de síntesis de ATP se encontraron sobre-representados en la muestra control, mientras que componentes integrales de membrana se encontró subrepresentado. Esto se suma a la baja representatividad de proteínas pertenecientes a los GO de procesos biológicos de unión, integración y transposición de ADN.

El mismo análisis se realizó para las proteínas bacterianas identificadas en la infección. En la muestra correspondiente a la infección en estado de vacuolización, se encontraron menos términos GO con diferencias significativas en su enriquecimiento (Figura 36). Las funciones moleculares enriquecidas corresponden a unión de metales y ATP, actividad trifosfatasa y actividad serina-treonina quinasa. Dentro de los procesos biológicos enriquecidos, destacaron la fosforilación de proteínas, y procesos relacionados con la biosíntesis de distintos compuestos (aromáticos, nitrogenados, organonitrogenados, carbohidratos derivados).

En el estado de infección más tardío, la propagación, los términos GO que se encontraron enriquecidos fueron similares a los observados en vacuolización. Dentro de las funciones moleculares, la actividad proteína quinasa, la unión de proteínas y la actividad de transducción de señales se encontraron enriquecidas (Figura 37), y dan cuenta del aumento en las proteínas relacionadas con el sistema de dos componentes, observado también en las categorías funcionales (Figura 34).

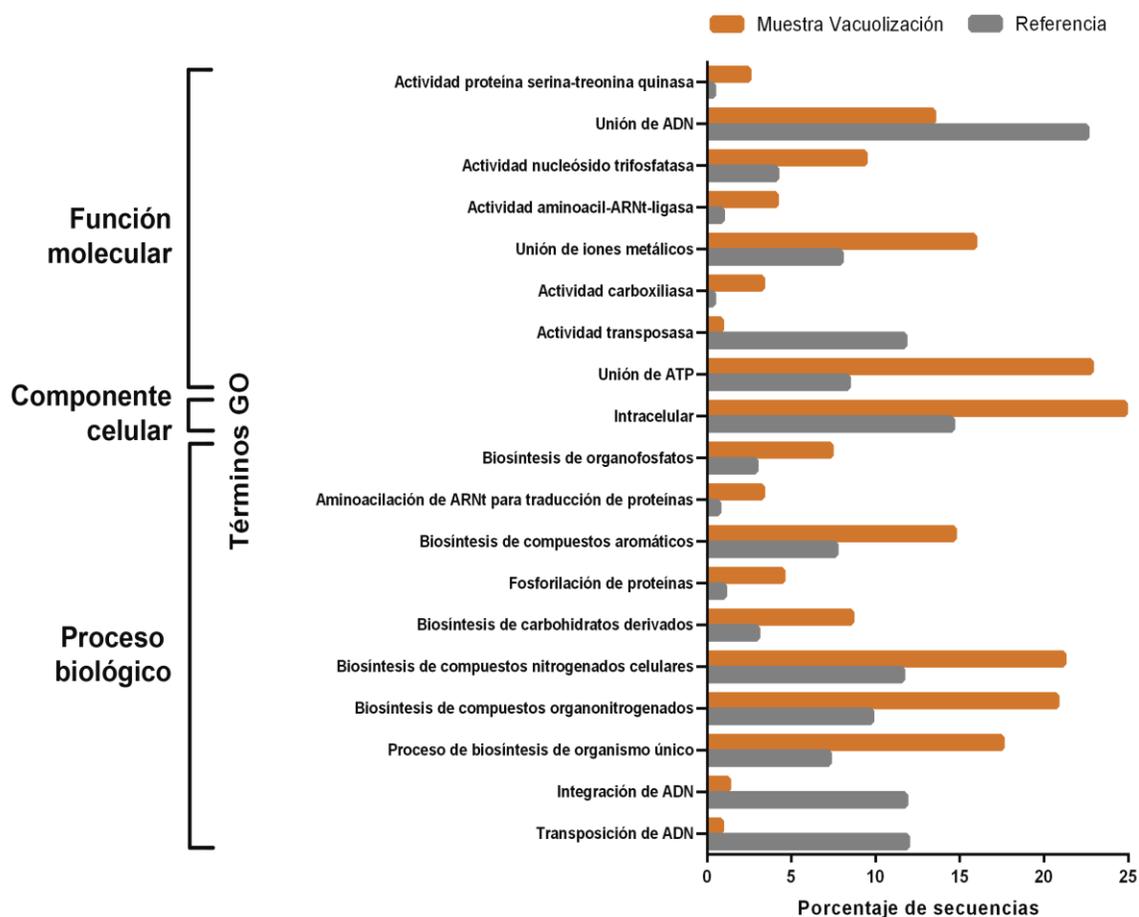


Figura 36. Análisis de enriquecimiento de las proteínas bacterianas encontradas en SHK-1 infectadas en estado de vacuolización. Análisis realizado con el programa Blast2GO en base a las categorías ontológicas o términos GO (*Gene Ontology terms*), asignados a las proteínas bacterianas identificadas por proteómica cuantitativa al interior de células SHK-1 durante la infección en estado de vacuolización. Se muestran los términos GO que se encontraron sobre o sub-representados en la muestra de vacuolización con respecto al genoma de referencia (LF-89 ATCC VR-1361), con un FDR<0,05.

En cuanto a los procesos biológicos, al igual que en la vacuolización, se observó un enriquecimiento en la biosíntesis y el catabolismo de compuestos (Figura 37). Aunque los términos GO de movilidad génica se encontraron subrepresentados en las muestras de infección con relación al genoma, se identificaron proteínas relacionadas con estos GO, a diferencia de lo ocurrido en el control. Esto también se observó con relación a las categorías funcionales COG (Figura 34).

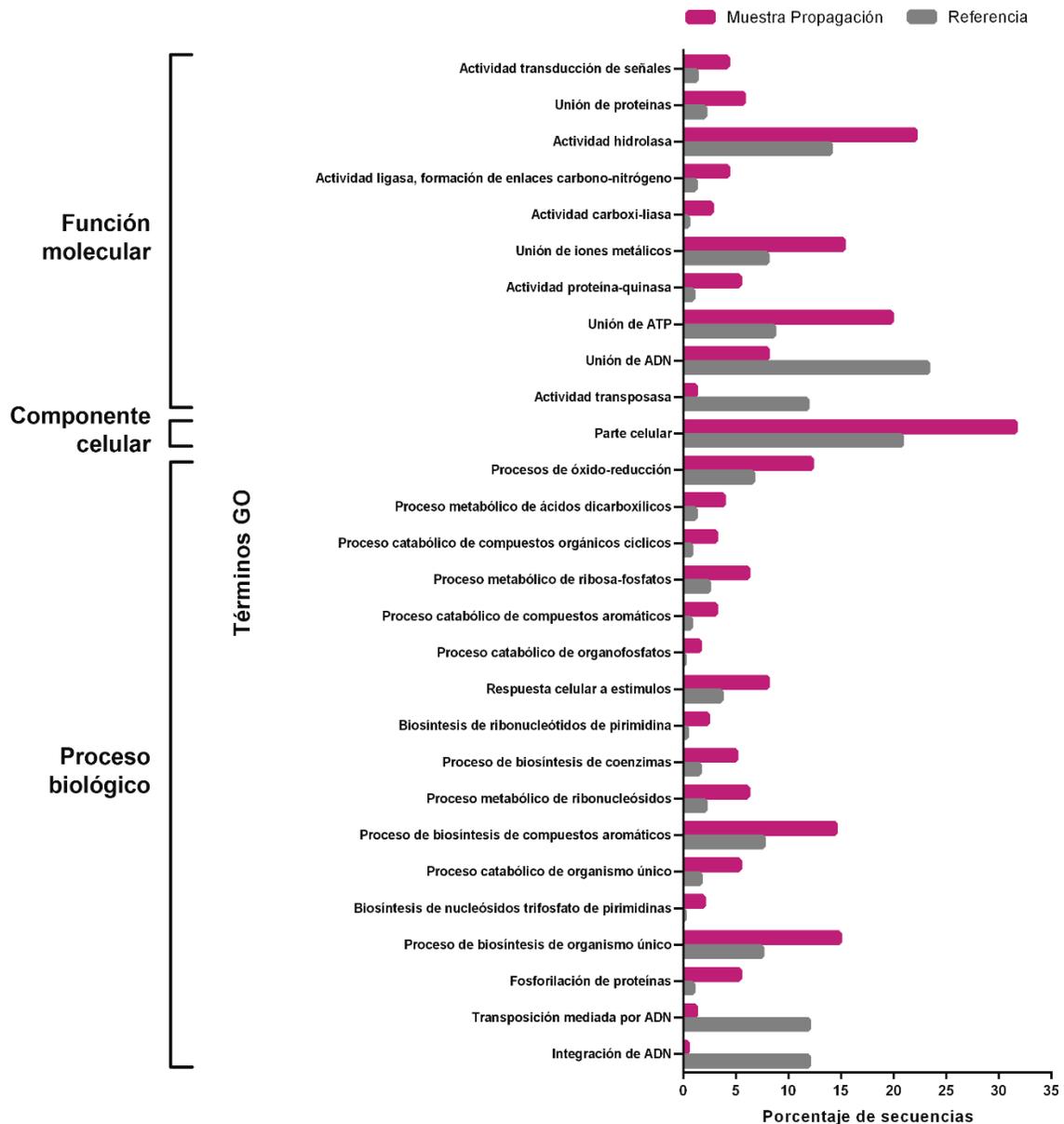


Figura 37. Análisis de enriquecimiento de las proteínas bacterianas encontradas en SHK-1 infectadas en estado de propagación. Análisis realizado con el programa Blast2GO en base a las categorías ontológicas o términos GO (*Gene Ontology terms*), asignados a las proteínas bacterianas identificadas por proteómica cuantitativa al interior de células SHK-1 durante la infección en estado de propagación. Se muestran los términos GO que se encontraron sobre o sub-representados en la muestra de propagación con respecto al genoma de referencia (LF-89 ATCC VR-1361), con un FDR < 0,05.

### **3.8 Identificación de probables genes de virulencia que se expresan diferencialmente en la infección *in vitro*.**

#### Posibles factores de virulencia bacterianos

Como se mencionó anteriormente, de las 814 proteínas bacterianas identificadas en las tres muestras analizadas por proteómica cuantitativa, 237 proteínas fueron identificadas exclusivamente en el control, y 491 proteínas fueron identificadas en la bacteria durante la infección (Figura 33). Por medio de distintas plataformas bioinformáticas (Figura 31), se identificaron y seleccionaron proteínas con la potencialidad de ser factores de virulencia bacterianos. El listado completo de las proteínas predichas como posibles factores de virulencia, y la muestra en que fue identificada, se detallan en el Anexo 4.

Para agrupar las distintas proteínas de *P. salmonis* identificadas por proteómica cuantitativa en cada muestra, se utilizó la clasificación de familias de factores de virulencia, indicados en la base de datos de factores de virulencia (VFDB). Algunas proteínas fueron identificadas en sólo una muestra, mientras otras en dos o más. Esto nos llevó a agrupar las familias de los factores de virulencia en base a la muestra, como se indica en los gráficos de torta de la Figura 38. En ellos se muestra el porcentaje de proteínas de cada familia de factor de virulencia, encontradas en muestras exclusivamente de infección (Figura 38B) o en muestras control junto a muestras de infección (Figura 38A). Proteínas pertenecientes a sólo 3 categorías de factores de virulencia, fueron compartidas por las muestras de infección y el control (Figura 38A, círculo central). A pesar de esto, varias familias de factores de virulencia se identificaron en todas las muestras evaluadas, como por ejemplo el transporte de metales y adquisición de grupos hemo, adhesinas, adherencia y proteínas relacionadas, y toxinas. Sin embargo, hay familias que destacan o se encontraron mayoritariamente en las muestras control, como son el metabolismo de lípidos, proteasas y regulación; mientras que familias destacadas en las muestras de infección corresponden a quimiotaxis, componentes de superficie celular, endotoxina y sistemas de secreción. Por otro lado, proteínas pertenecientes a las familias de proteasa, adaptación al estrés, regulación, actividad antimicrobiana, metabolismo de aminoácidos, exoenzimas, factores anti apoptóticos, LPS, invasión y sistema de glicosilación, fueron identificadas únicamente en la muestra control.

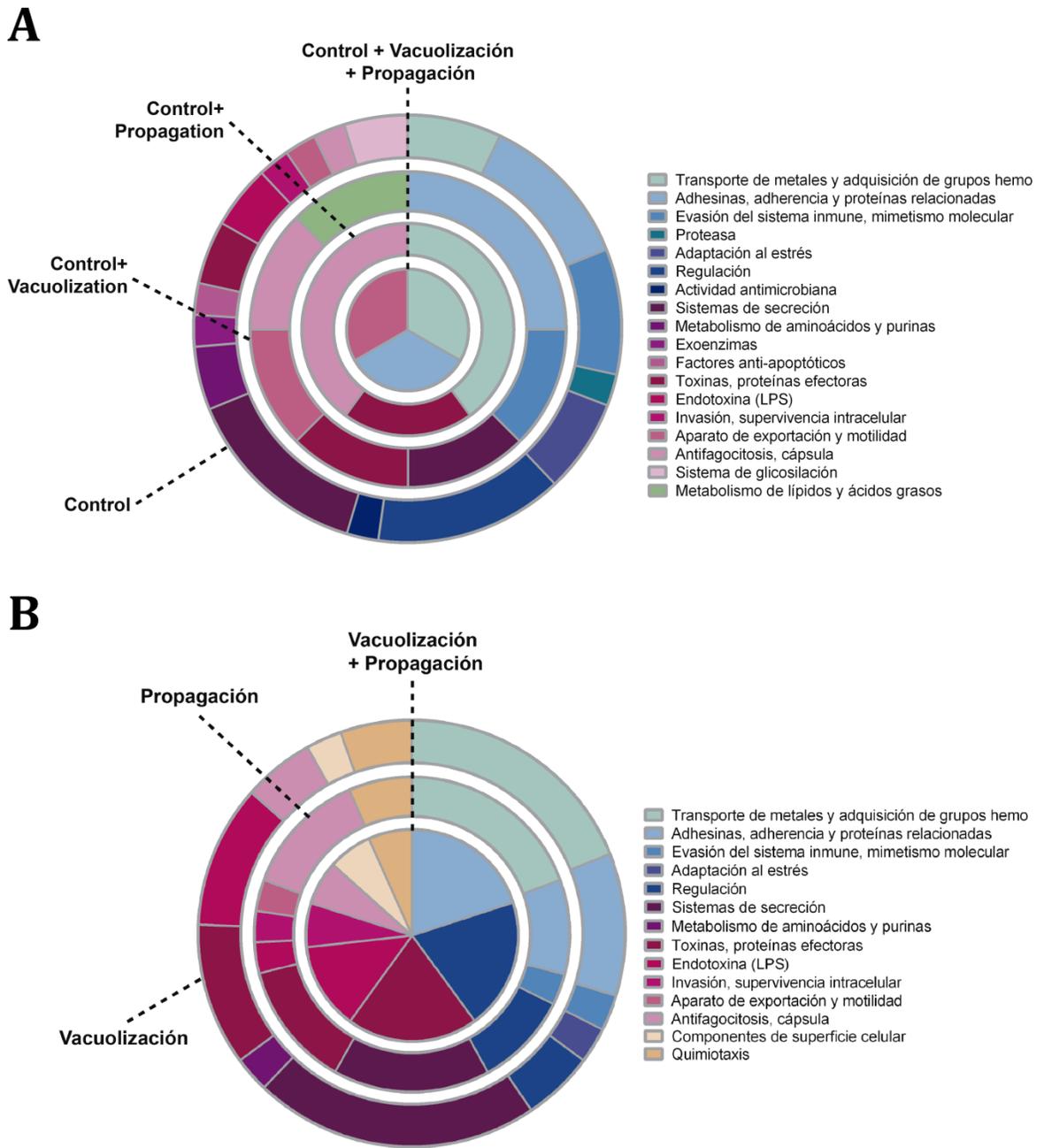


Figura 38. Familias de factores de virulencia identificadas por proteómica cuantitativa en cultivos SHK-1 infectados, y la muestra control de bacterias. A, clasificación de las proteínas de *P. salmonis* identificadas en muestras control, control y vacuolización, control y propagación o las tres muestras, según las familias de factores de virulencia depositadas en la base de datos VFDB. B, clasificación en familias de factores de virulencia de las proteínas de *P. salmonis* identificadas según VFDB, sólo en las muestras de infección (vacuolización y/o propagación).

A pesar de la mayor variedad de familias de posibles factores de virulencia identificados en la muestra control que en las exclusivas de infección, son pocas las familias comunes entre todas las muestras (Figura 38A). En las muestras de infección (Figura 38B) se observó mayor similitud en las familias identificadas, con excepción de metabolismo de aminoácidos y purinas, y adaptación al estrés, que aparece sólo en la etapa temprana de infección, y la familia de sistemas de secreción que fue única para propagación. En ambas muestras de infección, es destacable la aparición de proteínas de las familias de quimiotaxis y componentes de superficie celular, la cuales fueron únicas de la infección y por tanto no se observaron en las muestras controles.

### Proteínas plasmidiales

De todas las proteínas que codifica *P. salmonis*, el 10,18% corresponde a proteínas plasmidiales. En la proteómica, el 3,1% de las proteínas identificadas en la muestra control pertenecen a alguno de los cuatro plásmidos; durante la infección, el 4,5% de las proteínas identificadas en la muestra de vacuolización son de plásmidos, mientras en la propagación alcanzan el 6,7%. Es decir, el porcentaje de proteínas plasmidiales identificadas durante la propagación fue más del doble que en el control.

En las tres muestras, la mayor cantidad de proteínas identificadas pertenecen al plásmido pPSLF89-1, el de mayor tamaño en la célula. Además, gran proporción de ellas está codificada dentro de las regiones de fagos, aunque no todas son proteínas estructurales de ellos (Tabla 13). Por ejemplo, se identificaron proteínas de tres sistemas toxina-antitoxina (TA), dos pertenecientes al pPSLF89-1 y una al pPSLF89-2, y dos de ellos se encuentran en fagos. También dentro de la secuencia de fagos se encontraron proteínas relacionadas con la partición y mantención del plásmido en la célula, además de aquellas de sistemas TA. Otro ejemplo que se puede ver en la Tabla 13, son algunas proteínas identificadas como factores de virulencia codificadas dentro de fagos, como la probable toxina murina Ymt (PSLF89\_1p169), la proteína PipB2 (PSLF89\_1p224) o una proteína Fic de filamentación celular (PSLF89\_1p174).

Proteínas identificadas como posibles factores de virulencia plasmidiales, fueron identificadas en las muestras de propagación (PSLF89\_1p100 y PSLF89\_1p169) y en el control (PSLF89\_1p174 y PSLF89\_1p224), como se indica en la Tabla 13. Es destacable

también que proteínas del plásmido conjugativo pPSLF89-4 se identificaron en la bacteria durante la fase exponencial de crecimiento (muestra control), no en la vacuolización, y sólo se identificó una proteína de este plásmido en la propagación. De esta forma, además de identificar proteínas plasmidiales en las muestras de proteómica durante la infección, fue posible detectar algunos potenciales factores de virulencia expresados en ellas.

Tabla 13. Listado de proteínas plasmidiales identificadas por proteómica cuantitativa. Proteínas bacterianas presentes en los plásmidos identificadas en las muestras control, infección en células SHK-1 en estado de vacuolización y de propagación. Se muestran también las proteínas plasmidiales identificadas en más de una muestra (control-vacuolización, control-propagación y vacuolización-propagación). Descripción se refiere a la predicción de función o identidad de la proteína, según la base de datos GenBank, y predicción se refiere a la predicción consenso de VFDB, ProtFun 2.2 y SMART.

Muestra	Locus tag	Plásmido	Descripción	Predicción
Vacuolización	PSLF89_1p28	pPSLF89-1	Proteína resolvasa	Antitoxina de sistema TA_3. Fago
	PSLF89_1p57		Proteína hipotética	Función desconocida. Fago
	PSLF89_2p12	pPSLF89-2	Proteína hipotética, purina u otra fosforilasa de familia 1	Proteína de fago
	PSLF89_2p22		Proteína mayor de la cápside de fago, familia HK97	Proteína estructural de fago
	PSLF89_2p8		Proteína hipotética, proteína de familia de integrasas de fagos	Integrasa de fago
	PSLF89_08895	pPSLF89-3	Transposasa	Transposasa
	PSLF89_3p13		Proteína hipotética, proteína menor de la cola de fagos	Proteína estructural de fago
	PSLF89_3p39		Proteína hipotética	Función desconocida
	PSLF89_3p54		Proteína hipotética, proteína de biosíntesis de molibdopterina MoeB	Proteína de biosíntesis de molibdopterina MoeB
	PSLF89_3p7		Proteína de la familia de unión cabeza-cola de fago	Proteína estructural de fago
Propagación	PSLF89_08170	pPSLF89-1	Proteína hipotética	Proteína de fago
	PSLF89_1p100		Proteína hipotética	Proteína de familia de la cubierta de esporas. Fago
	PSLF89_1p14		Proteína hipotética	Función desconocida. Fago
	PSLF89_1p151		Proteína hipotética	Función desconocida. Fago
	PSLF89_1p169		Proteína con dominio PLD	Factor de virulencia, toxina murina Ymt. Fago.
	PSLF89_1p179		Proteína hipotética	Proteína de replicación
	PSLF89_1p194		Proteína hipotética	Función desconocida
	PSLF89_1p205		Proteína hipotética	Función desconocida
	PSLF89_1p23		Proteína hipotética, familia de reguladores transcripcionales	Regulador transcripcional. Fago
	PSLF89_1p41		Proteína hipotética	Función desconocida. Fago

Propagación	PSLF89_1p63	pPSLF89-1	Proteína hipotética, proteína portal de fago, familia HK97	Proteína estructural de fago
	PSLF89_1p80		Antitoxina	Antitoxina de sistema TA_3
	PSLF89_2p14	pPSLF89-2	Proteína hipotética, proteína HicB de ensamble de pili	Toxina de sistema TA_2. Fago
	PSLF89_2p18		Proteína hipotética	Proteína de fago
	PSLF89_08790	pPSLF89-3	Proteína de la familia de cola menor de fagos	Proteína estructural de fago
	PSLF89_08855		Proteína hipotética, transposasa	Transposasa
	PSLF89_3p11		Proteína hipotética	Función desconocida. Fago
	PSLF89_3p18		Proteína hipotética, proteína de la familia de cola de fagos	Proteína estructural de fago
	PSLF89_3p22		Proteína hipotética, superficie celular	Proteína de fago
Vacuolización, propagación	PSLF89_08050	pPSLF89-1	Proteína hipotética	Función desconocida
	PSLF89_3p23	pPSLF89-3	Proteína hipotética, dominio nucleotidil- transferasa	Proteína de partición tipo Soj. Fago
	PSLF89_3p26		Proteína hipotética	Función desconocida. Fago
	PSLF89_3p3		Proteína mayor de la cápside de fagos, familia HK97	Proteína estructural de fago
Control, vacuolización	PSLF89_09225	pPSLF89-4	Proteína hipotética, fosfoglicolato fosfatasa	Proteína hipotética, fosfoglicolato fosfatasa
Control, propagación	PSLF89_1p174	pPSLF89-1	Proteína Fic de filamentación celular inducida por cAMP	Proteína de familia fic/DOC. Fago
Control	PSLF89_08585	pPSLF89-1	Proteína hipotética	Regulador transcripcional, familia Crp/Fnr. Fago
	PSLF89_1p119		N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	Biosíntesis de peptidoglicano
	PSLF89_1p22		Proteína hipotética, proteína de unión a nucleótidos tipo cobQ/CobB/MinD/ParA	Proteína de partición de plásmido. Fago
	PSLF89_1p224		Proteína hipotética	Factor de virulencia, pipB2. Fago
	PSLF89_2p2	pPSLF89-2	Proteína hipotética, proteína con dominio de unión a nucleótidos tipo cobQ/CobB/MinD/ParA	Factor de virulencia, ATPasa FlhG, familia ParA. Fago.
	PSLF89_2p37		Proteína hipotética, subunidad S de endonucleasa de restricción	Enzima de restricción
	PSLF89_09050	pPSLF89-4	Recombinasa RecD; interrumpida	Recombinasa RecD
	PSLF89_09190		Proteína hipotética	Proteína de conjugación plasmidial

### 3.9 Comparación de la expresión de posibles factores de virulencia en los tres cultivos celulares utilizados como modelos de infección

En base a la secuencia nucleotídica de los factores de virulencia identificados en las muestras de proteómica, se diseñaron partidores para determinar su expresión mediante PCR cuantitativo (RT-qPCR). Para ello, también se tomaron en cuenta genes con funciones relevantes para el proceso infectivo, como reguladores transcripcionales, sistemas de dos componentes, proteínas de estrés celular, proteínas relacionadas con la síntesis o modificación de la pared celular, o alguna estructura de superficie, como se indica en el Anexo 4. En él, se indican los genes seleccionados para la cuantificación por RT-qPCR. Esta selección incluyó genes que codifican potenciales FdeV, de origen cromosómico o plasmidial, incluyendo genes que codifican proteínas identificadas en los análisis de proteómica.

Las infecciones con *P. salmonis* fueron realizadas en las líneas celulares SHK-1 y ASK, y en CPR de pez cebra, en las condiciones determinadas anteriormente. Se purificó el ARN total de la infección en el estado de infección temprana (6 dpi para las líneas celulares, similar al estado de vacuolización, y 1 dpi para el CPR de pez cebra), y el de infección tardía (12 dpi para las líneas celulares, similar estado de propagación, y 5 dpi para el CPR de pez cebra). Con ello, se realizó la cuantificación de transcritos de los genes seleccionados mediante RT-qPCR. La expresión de estos genes en cada muestra fue normalizada primero en base a los genes *housekeeping rho* y *recF* (previamente seleccionados como los genes que menos varían su expresión en distintas condiciones, en comparación con los *housekeeping glyA* y *pykA*), y esta razón a su vez se expresó de forma relativa al control, en base al método  $\Delta\Delta Ct$ . En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos con el *housekeeping recF*, mientras que los resultados con el gen *rho*, que muestran la misma tendencia que lo observado con *recF*, se encuentran en el Anexo 6. Los genes evaluados fueron agrupados en base a su función predicha, según las categorías de factores de virulencia de la base de datos VFDB, como se muestra en la Tabla 14. En ella se indica el nivel de expresión de los distintos genes relativo al control, y la muestra en la que se identificó por proteómica. Los datos de expresión se agruparon en cambios significativos, cambios no significativos, y sin cambios. Los primeros corresponden a valores de expresión  $>2$  o  $<0,5$  veces de cambio respecto al control, por

sobre su desviación estándar; los segundos a valores de expresión  $>2$  o  $<0,5$  veces de cambio, independiente de la desviación estándar; y los terceros a valores de expresión entre 2 y 0,5 veces de cambio. Esto puede observarse en los gráficos de la Figura 39. Los genes cuya expresión aumentó, incluyendo aquellos con cambios no significativos, se muestran en la parte superior de las líneas rojas punteadas en la Figura 39A, mientras que los que disminuyeron con respecto al control se muestran en la parte inferior a las líneas rojas punteadas de la Figura 39C. Los genes que cambiaron su expresión de forma significativa se agrupan en la parte superior e inferior a las líneas rojas en las Figuras 39B y 39D. Finalmente, los genes sin cambios se muestran entre las líneas rojas de las Figuras 39A y 39C.

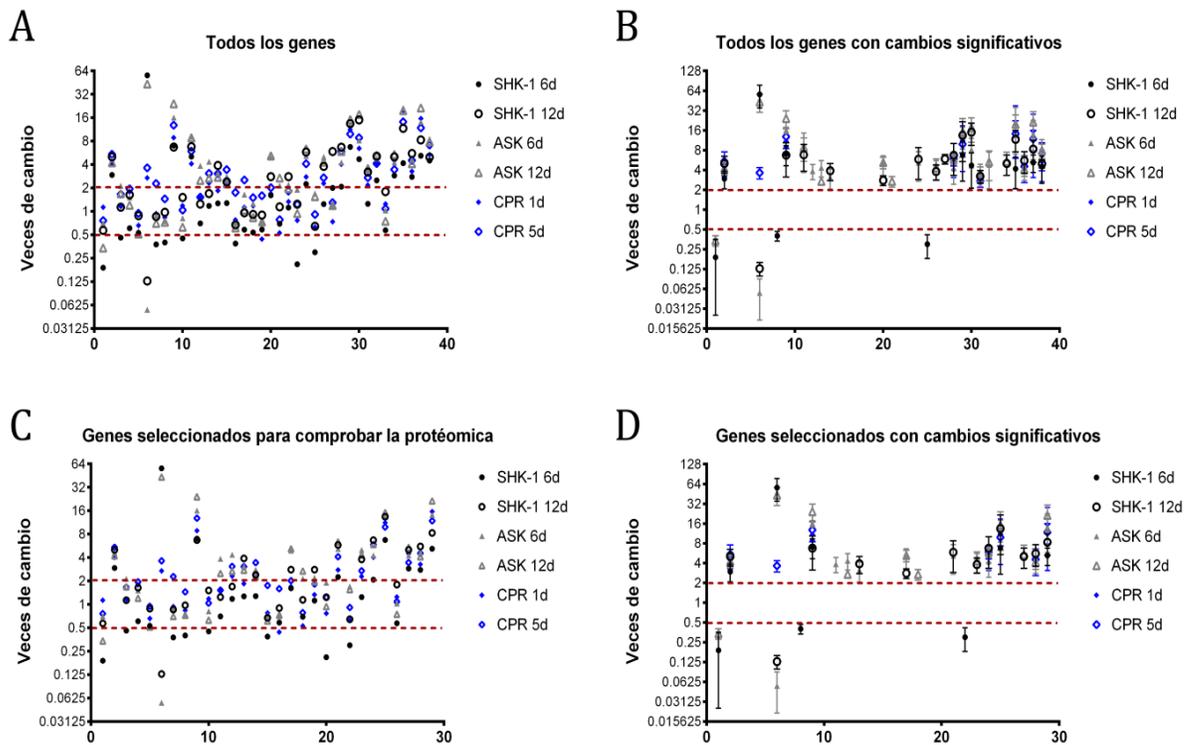


Figura 39. Resumen de los transcritos de *P. salmonis* cuantificados por RT-qPCR en los tres cultivos celulares infectados. En todos los gráficos se muestra el número de genes cuantificados (ordenados correlativamente del 1 al 38 en A y B, y del 1 al 29 en C y D) en el eje x, y en el eje y las veces de cambio respecto al control (bacterias cultivadas en fase exponencial de crecimiento), calculado como el  $\Delta\Delta Ct$ ,  $n=3$  para cada gen en cada cultivo. Las líneas rojas punteadas indican la zona de veces de cambio no significativa ( $\geq 0,5$  y  $\leq 2$ ). A, valor promedio de las veces de cambio todos los genes evaluados. B, valor promedio de las veces de cambio todos los genes evaluados, con cambios significativos por sobre su desviación estándar. C, genes seleccionados en base a los resultados de la proteómica, se muestra el valor promedio de sus veces de cambio. D, valor promedio de las veces de cambio todos los genes seleccionados en base a la proteómica, con cambios significativos por sobre su desviación estándar.

Como se mencionó anteriormente, debido a la distinta naturaleza de las muestras de bacterias (cultivo puro versus bacterias dentro de células eucariontes), sólo se pudieron identificar las proteínas presentes, pero no compararlas cuantitativamente. Por ello, mediante la cuantificación de los transcritos se buscó corroborar lo observado en proteómica. Es decir, si una proteína se identificó en una muestra determinada, se esperaba que los transcritos del gen de esa proteína se encontraran aumentados en aquella muestra por sobre las demás. De un total de 38 genes evaluados (Figura 39A), 29 fueron seleccionados por encontrarse sus proteínas en las muestras de proteómica (Figura 39C).

De forma general, se observó un grupo mayoritario de genes cuyos transcritos no cambiaron significativamente respecto al control (el 63,2% del total de genes de todos los cultivos y estados de infección), un segundo grupo menos representativo de genes (el 34,2% del total) que aumentaron su expresión con respecto al control, y un tercer grupo minoritario de genes (el 2,6% del total) cuya expresión disminuyó respecto al control (Figuras 39A y 39B). Esa tendencia se mantuvo al observar sólo los transcritos de los genes seleccionados para comprobar los resultados de la proteómica (Figuras 39C y 39D).

Al mirar los datos de las dos fases de infección, en las células SHK-1 el 56,6% de los genes de *P. salmonis* evaluados cambiaron de forma no significativa su expresión relativa al control, mientras un 38,2% lo hizo de forma significativa. El comportamiento en los cultivos ASK fue similar, con un 61,8% de los genes con cambios no significativos en su expresión relativa al control, y un 50% con cambios significativos. En los CPR de pez cebra, los cambios no significativos alcanzaron un 53,9% de los genes evaluados, mientras que los cambios significativos correspondieron a sólo un 21%. Esta diferencia entre los datos con y sin significancia, fue mayor en los cultivos primarios (diferencia de más de 32%) que en las líneas celulares (diferencia de un 18,4% en cultivos SHK-1 y de 11,8% en ASK). Por otro lado, también se observaron diferencias entre las muestras de infección temprana y tardía. En la fase de vacuolización en las células SHK-1 (o 6 dpi), del total de 38 genes evaluados sólo un 28,9% cambió su expresión relativa al control de forma significativa (Figura 39B, Tabla 15). Este valor bajó levemente a un 27,6% al considerar únicamente los genes seleccionados para comprobar la proteómica (Figura 39D, Tabla 15). En el caso de la propagación (12 dpi), el 47,4% de los genes cambió significativamente su expresión relativa al control. Esta cantidad disminuyó a un 41,3% al considerar sólo los genes seleccionados para comprobar la

proteómica. Un 44,8% de los 29 genes seleccionados mostraron un comportamiento similar a lo esperado según lo predicho por la proteómica de los cultivos SHK-1, en relación a sus niveles de expresión respecto al control. Los datos de expresión para cada gen y condición se muestran resumidos en la Tabla 14. De forma específica, en todos los cultivos y estados de infección, destacó la sobreexpresión de genes designados como toxinas y efectores, con la excepción del gen *pipB2* cromosomal y *ficD* en cultivos ASK y primarios de riñón. Junto con esto, en los sistemas toxina-antitoxina (TA) plasmidiales se observó un aumento en la expresión todos los componentes evaluados (toxina *relE* y antitoxina *PLF89\_1p80* del pPSLF89-1, toxina *hicB* del pPSLF89-2, y antitoxina *PSLF89\_09045* del pPSLF89-4).

Dentro de los genes con función de posibles factores de virulencia, se evaluó el componente flagelar *fliC*. En todos los cultivos se observó una tendencia a una disminución en la expresión del gen *fliC* durante la infección. En comparación con el control, esta disminución fue de más del doble en células SHK-1 de 6 dpi, y no significativa en SHK-1 de 12 dpi. Lo inverso ocurrió para las células ASK, y no se observaron cambios significativos en los cultivos primarios. Contrario a esto, los genes de las categorías “Antifagocitosis, cápsula” e “Invasión, supervivencia intracelular”, que también se relacionan con la virulencia bacteriana, presentaron el mismo comportamiento en los tres cultivos, sin cambios significativos en su expresión.

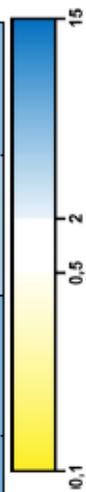
También relacionado con la virulencia, *P. salmonis* posee tres regiones en su genoma con genes reconocidos como pertenecientes al sistema de secreción tipo 4 o Dot/Icm. Mediante la proteómica se identificaron proteínas del sistema Dot/Icm codificadas dos de las regiones mencionadas. Por RT-qPCR se evaluó la expresión de tres genes correspondientes a la primera región (*icmE/dotG*, *icmJ/dotN* e *icmV*), y tres genes de la tercera región (*icmV*, *dotB* e *icmL/dotI*), mostrados en la categoría de “Sistemas de secreción” en la Tabla 14. Durante la infección en los tres cultivos celulares, en la primera región de Dot/Icm se observó un aumento en la expresión de *icmE/dotG* (significativa para SHK-1 y ASK), mientras que no se observaron cambios significativos en la expresión de *icmJ/dotN* (con excepción de una disminución significativa en SHK-1 de 6 dpi), ni de *icmV* (con la excepción de un aumento significativo en ASK de 12dpe). En la tercera región, se observó un aumento no significativo en cultivos SHK-1 y ASK del gen *dotB*, un aumento significativo en el gen *icmV* en cultivos SHK-1 y ASK, y no se observaron cambios significativos en el gen *icmL/dotI*.

Tabla 14. Cuantificación de transcritos bacterianos durante la infección en tres modelos de cultivo celular. Cuantificación de la expresión relativa de genes bacterianos, identificados durante la infección en los ensayos de proteómica, en cultivos celulares SHK-1 y ASK luego de 6 y 12 dpe, y en CPR de pez cebra a los 1 y 5 dpe. Se muestra la expresión de cada gen relativa al gen *housekeeping recF* ( $\pm$ desvest), y a la bacteria crecida hasta la fase exponencial control, por el método  $\Delta\Delta Ct$ . En color amarillo se muestran los genes con expresión  $<0,5$  veces la del control; en azul los genes con expresión  $>2$  el control, y en blanco los genes que no alteraron su expresión relativa al control, según se indica en el código de color al final de la tabla. En negrita se indican los genes cuya expresión es  $<0,5$  o  $>2$  por sobre su desviación estándar. "V+P" es vacuolización y propagación, "No" indica que no se identificó en ninguna muestra de proteómica.

Categoría	Proteómica	Gen	Locus tag	Ubicación	SHK-1 6d	SHK-1 12d	ASK 6d	ASK 12d	CPR 1d	CPR 5d
Adherencia y motilidad	Vacuolización	<i>flhC</i>	PSLF89_1710	chromosoma	<b>0,189 <math>\pm</math>0,16</b>	0,572 $\pm$ 0,27	0,705 $\pm$ 0,52	<b>0,340 <math>\pm</math>0,06</b>	1,134 $\pm$ 0,10	0,764 $\pm$ 0,26
	Propagación	<i>PSLF89_1p100</i>	PSLF89_1p100	pPSLF89-1	<b>2,95 <math>\pm</math>0,87</b>	<b>5,04 <math>\pm</math>1,5</b>	<b>4,64 <math>\pm</math>0,73</b>	<b>4,24 <math>\pm</math>0,87</b>	<b>4,03 <math>\pm</math>0,84</b>	<b>5,42 <math>\pm</math>2,1</b>
Antifagocitosis, cápsula	Propagación	<i>wzb</i>	PSLF89_3295	chromosoma	0,462 $\pm$ 0,10	1,13 $\pm$ 0,60	2,14 $\pm$ 0,88	1,69 $\pm$ 0,41	1,16 $\pm$ 0,23	1,67 $\pm$ 1,5
	V+P	<i>iap</i>	PSLF89_2108	chromosoma	0,609 $\pm$ 0,25	1,64 $\pm$ 0,39	1,51 $\pm$ 0,32	1,21 $\pm$ 0,09	1,79 $\pm$ 0,64	1,95 $\pm$ 0,70
Invasión, supervivencia intracelular	Propagación	<i>mce2B</i>	PSLF89_3087	chromosoma	0,530 $\pm$ 0,28	0,885 $\pm$ 0,34	0,554 $\pm$ 0,23	0,513 $\pm$ 0,14	0,662 $\pm$ 0,55	0,944 $\pm$ 0,56
	V+P	<i>ponA (pbp1A)</i>	PSLF89_143	chromosoma	<b>56,2 <math>\pm</math>21</b>	<b>0,128 <math>\pm</math>0,03</b>	<b>0,055 <math>\pm</math>0,03</b>	<b>43,4 <math>\pm</math>13</b>	2,70 $\pm$ 1,9	<b>3,64 <math>\pm</math>0,71</b>
Membrana, LPS, pared celular	Vacuolización	<i>lpxK</i>	PSLF89_2215	chromosoma	0,377 $\pm$ 0,20	0,863 $\pm$ 0,21	0,884 $\pm$ 0,23	0,703 $\pm$ 0,10	0,939 $\pm$ 0,38	2,29 $\pm$ 1,3
	Propagación	<i>waaE</i>	PSLF89_3032	chromosoma	<b>0,400 <math>\pm</math>0,07</b>	0,976 $\pm$ 0,48	0,752 $\pm$ 0,04	0,728 $\pm$ 0,09	0,840 $\pm$ 0,31	1,45 $\pm$ 0,43
	Propagación	<i>PSLF89_3p22</i>	PSLF89_3p22	pPSLF89-3	<b>7,02 <math>\pm</math>2,4</b>	<b>6,73 <math>\pm</math>3,6</b>	<b>16,1 <math>\pm</math>1,7</b>	<b>24,3 <math>\pm</math>7,4</b>	<b>8,90 <math>\pm</math>2,0</b>	<b>12,8 <math>\pm</math>4,4</b>
Metabolismo central	Control	<i>pgi</i>	PSLF89_1160	chromosoma	0,451 $\pm$ 0,09	1,51 $\pm$ 0,05	0,818 $\pm$ 0,16	0,629 $\pm$ 0,04	1,19 $\pm$ 0,12	1,04 $\pm$ 0,18
	No	<i>hemL</i>	PSLF89_09235	pPSLF89-4	5,07 $\pm$ 3,1	<b>6,81 <math>\pm</math>3,0</b>	<b>9,08 <math>\pm</math>5,4</b>	<b>8,85 <math>\pm</math>3,4</b>	4,11 $\pm$ 3,0	5,95 $\pm$ 4,7
Metabolismo de metales, ingreso de hierro y grupos hemo	Vacuolización	<i>thuf-like</i>	PSLF89_1989	chromosoma	0,703 $\pm$ 0,20	1,25 $\pm$ 0,36	<b>3,85 <math>\pm</math>1,0</b>	2,51 $\pm$ 0,96	1,55 $\pm$ 0,15	1,53 $\pm$ 0,37
	Vacuolización	<i>moeB</i>	PSLF89_3p54	pPSLF89-3	1,18 $\pm$ 0,50	1,70 $\pm$ 0,45	<b>4,35 <math>\pm</math>1,2</b>	<b>2,69 <math>\pm</math>0,20</b>	2,32 $\pm$ 1,3	3,08 $\pm$ 1,4
Regulador transcripcional	Propagación	<i>PSLF89_1p23</i>	PSLF89_1p23	pPSLF89-1	1,27 $\pm$ 0,69	<b>3,90 <math>\pm</math>1,1</b>	<b>3,10 <math>\pm</math>1,0</b>	2,76 $\pm$ 0,96	<b>1,85 <math>\pm</math>0,56</b>	<b>3,06 <math>\pm</math>1,8</b>
	Control	<i>mpvA</i>	PSLF89_2576	chromosoma	1,28 $\pm$ 0,57	2,41 $\pm$ 0,54	2,80 $\pm$ 1,0	2,28 $\pm$ 0,44	2,44 $\pm$ 0,97	3,45 $\pm$ 1,6
Respuesta a estrés	V+P	<i>relA</i>	PSLF89_1546	chromosoma	<b>0,388 <math>\pm</math>0,12</b>	0,673 $\pm$ 0,47	0,728 $\pm$ 0,05	0,615 $\pm$ 0,08	0,779 $\pm$ 0,48	1,75 $\pm$ 0,77
	No	<i>rpoS</i>	PSLF89_2050	chromosoma	0,585 $\pm$ 0,23	0,964 $\pm$ 0,62	1,644 $\pm$ 0,47	1,044 $\pm$ 0,11	1,132 $\pm$ 0,24	2,54 $\pm$ 0,57
	No	<i>spoT</i>	PSLF89_2849	chromosoma	0,538 $\pm$ 0,17	0,916 $\pm$ 0,37	1,259 $\pm$ 0,43	0,839 $\pm$ 0,23	1,179 $\pm$ 0,24	1,51 $\pm$ 0,52
	Propagación	<i>sspA</i>	PSLF89_912	chromosoma	0,585 $\pm$ 0,26	0,901 $\pm$ 0,30	0,702 $\pm$ 0,14	0,734 $\pm$ 0,18	<b>0,442 <math>\pm</math>0,35</b>	<b>1,59 <math>\pm</math>0,88</b>

Tabla 14... continuación.

Categoría	Proteómica	Gen	Locus tag	Ubicación	SHK-1 6d	SHK-1 12d	ASK 6d	ASK 12d	CPR 1d	CPR 5d
Sistema de secreción	Propagación	<i>icmV</i> (3ª región)	PSLF89_05390	cromosoma	1,62 ±0,25	2,80 ±0,47	4,92 ±1,7	5,20 ±1,0	1,69 ±0,52	2,02 ±1,01
	Propagación	<i>dotB</i> (3ª región)	PSLF89_1873	cromosoma	1,12 ±0,53	2,80 ±0,83	2,20 ±0,51	1,97 ±0,71	1,34 ±0,48	1,83 ±0,52
	Vacuolización	<i>icmL/dotI</i> (3ª región)	PSLF89_1894	cromosoma	0,210 ±0,36	1,24 ±0,94	1,91 ±0,47	0,943 ±0,25	0,770 ±0,51	1,24 ±0,11
	Vacuolización	<i>icmV</i> (1ª región)	PSLF89_07415	cromosoma	0,696 ±0,33	1,15 ±0,27	2,14 ±0,60	2,70 ±0,50	0,530 ±0,19	0,784 ±0,24
	Vacuolización	<i>icmE/dotG</i> (1ª región)	PSLF89_604	cromosoma	2,25 ±2,3	5,82 ±2,9	5,16 ±2,4	6,37 ±5,2	2,78 ±2,3	4,11 ±3,4
	Propagación	<i>icmJ/dotN</i> (1ª región)	PSLF89_615	cromosoma	0,299 ±0,12	0,646 ±0,47	1,70 ±0,37	1,56 ±0,21	0,629 ±0,45	0,916 ±0,09
	Propagación	<i>ymt</i>	PSLF89_1p169	pPSLF89-1	1,25 ±0,47	3,80 ±0,98	5,01 ±0,54	4,34 ±1,6	2,29 ±0,32	2,72 ±1,5
	No	<i>ficD</i>	PSLF89_1p174	pPSLF89-1	2,01 ±1,4	5,90 ±0,98	1,19 ±0,47	1,19 ±0,36	0,739 ±0,23	1,30 ±0,26
Toxinas y efectores	Propagación	<i>PSLF89_1p194</i>	PSLF89_1p194	pPSLF89-1	2,08 ±0,95	6,71 ±3,4	4,26 ±1,8	5,92 ±1,0	4,05 ±0,98	5,89 ±1,3
	Control	<i>pipB2</i>	PSLF89_1p224	pPSLF89-1	6,75 ±4,0	13,5 ±8,1	13,2 ±4,8	15,2 ±8,9	11,3 ±7,5	9,89 ±2,6
	No	<i>pipB2</i>	PSLF89_1p227	pPSLF89-1	4,70 ±2,6	15,0 ±5,6	8,17 ±3,9	17,6 ±7,1	6,46 ±5,7	8,85 ±7,9
	No	<i>pepO</i>	PSLF89_1p229	pPSLF89-1	1,25 ±0,66	3,21 ±0,71	3,57 ±1,32	3,58 ±0,89	2,18 ±0,57	2,73 ±0,55
	No	<i>pipB2</i>	PSLF89_3p51	pPSLF89-3	2,51 ±1,6	5,13 ±3,2	4,79 ±2,7	5,28 ±2,5	4,21 ±3,3	4,13 ±3,8
	Vacuolización	<i>pipB2</i>	PSLF89_768	cromosoma	0,574 ±0,18	1,80 ±0,15	1,03 ±0,09	0,750 ±0,20	1,25 ±0,20	1,09 ±0,33
	Propagación	<i>ospD3 p</i>	PSLF89_2644	cromosoma	2,90 ±2,3	5,03 ±1,7	4,26 ±3,6	5,41 ±2,1	4,52 ±4,5	3,46 ±2,3
	No	<i>relE</i>	PSLF89_08265	pPSLF89-1	4,18 ±2,1	11,7 ±4,2	21,2 ±14	19,9 ±7,4	19,9 ±18	14,2 ±8,2
Sistema toxina-antitoxina	Propagación	<i>PSLF89_1p80</i>	PSLF89_1p80	pPSLF89-1	2,78 ±1,6	5,56 ±2,0	4,71 ±1,9	4,12 ±0,91	3,28 ±2,3	4,54 ±2,0
	Propagación	<i>hicB</i>	PSLF89_2p14	pPSLF89-2	5,21 ±1,5	8,31 ±3,0	14,2 ±8,4	21,4 ±9,3	15,6 ±13	11,9 ±4,1
	No	<i>PSLF89_09045</i>	PSLF89_09045	pPSLF89-4	4,51 ±2,0	4,99 ±0,69	8,52 ±3,0	7,91 ±2,0	5,36 ±2,7	7,15 ±3,2



Con respecto a la categoría “Membrana, LPS, pared celular”, los genes evaluados se comportaron de forma similar en los tres cultivos, con excepción del gen *pbp1A*. Este último aumentó de forma significativa en la fase tardía de infección en los cultivos ASK y CPR, pero en la temprana de SHK-1, mientras que disminuyó significativamente en la fase temprana de infección en ASK, y en la tardía de SHK-1. De los demás genes de esta categoría, *lpxK* y *waaE* no alteraron su expresión en todas las condiciones evaluadas, excepto *waaE* en SHK-1 6d que disminuyó su expresión. El gen plasmidial *PSLF89\_3p22* aumentó su expresión en todas las condiciones y cultivos evaluados.

De los genes relacionados con el metabolismo, *pgi* no varió su expresión significativamente. Distinto es lo que ocurrió con aquellos relacionados con el metabolismo de metales. Los genes plasmidiales *hemL* y *moeB* aumentaron su expresión de forma significativa en las dos etapas de infección en células ASK. En estos cultivos también aumentó significativamente su expresión el gen *fhuF-like* a los 6 dpi.

### **3.10 Comparación de la respuesta de los distintos hospederos frente a la infección con *P. salmonis*.**

Luego de desarrollar un modelo alternativo de infección en cultivos primarios de riñón de pez cebra, se investigó si la respuesta de este cultivo a la presencia de *P. salmonis* era similar a aquella de las líneas celulares derivadas de salmón (SHK-1 y ASK). Para ello, al igual que en el objetivo anterior, el ARN total de los cultivos infectados y de controles sin infectar, fue purificado y convertido a ADNc para su evaluación por PCR cuantitativo. En base a estudios transcriptómicos de cultivos celulares infectados con *P. salmonis* realizados anteriormente (4, 94, 98, 106, 120), se decidió analizar la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune celular: interleucina-1 beta (*il1b*), interleucina-8 (*il8*), interleucina-10 (*il10*), interleucina-12 (*il12*), interferón alfa (*ifn $\alpha$* ) e interferón gama (*ifn $\gamma$* ). Para los CPR de pez cebra, se utilizaron los mismos genes con algunas modificaciones, debido a resultados obtenidos en peces cebra adultos infectados con *P. salmonis* (121), y a diferencias en el genoma de estos peces. En vez de *il1b* se evaluó la expresión de la *il6*, la expresión de los dos alelos de IFN- $\gamma$  (*ifn $\gamma$ 1-1* e *ifn $\gamma$ 1-2*), y de un gen antimicrobiano inducible en macrófagos, *nos2a* (sintasa de óxido nítrico 2). Al igual que lo efectuado en los RT-qPCR con genes de *P.*

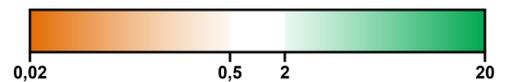
*salmonis*, se utilizaron los genes *housekeeping ef1a* y el *18S* para normalizar la expresión de los niveles de transcripción génica, y esto a su vez fue expresado de forma relativa al control sin infectar, por el método  $\Delta\Delta Ct$ . Los resultados normalizados con el gen *ef1a* se detallan en la Tabla 15, mientras los normalizados con el gen *18S* se encuentran en el Anexo 7.

Tabla 15. Cuantificación de transcritos de genes relacionados con la respuesta inmune del hospedero durante la infección con *P. salmonis*. Cuantificación de la expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune en cultivos SHK-1 y ASK luego de 6 y 12 dpi, y en CPR de pez cebra a los 1 y 5 dpi. Se muestra la expresión de cada gen relativa al gen *housekeeping ef1a* ( $\pm DE$ ), y al cultivo sin infectar como control, por el método  $\Delta\Delta Ct$ . En color naranja se muestran los genes con expresión  $<0,5$  veces la del control; en verde los genes con expresión  $>2$  el control, y en blanco los genes que no alteraron su expresión relativa al control, según se indica en el código de color al final de la tabla. En negrita se indican los genes cuya expresión fue  $<0,5$  o  $>2$  por sobre su desviación estándar.

Gen	SHK-1 6d	SHK-1 12d	ASK 6d	ASK 12d	CPR 1d	CPR 5d
<i>il1b</i>	0,119 $\pm$ 0,028	0,118 $\pm$ 0,018	0,0479 $\pm$ 0,011	0,204 $\pm$ 0,15	n.d.	n.d.
<i>il6</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,500 $\pm$ 0,23	6,10 $\pm$ 2,7
<i>il8</i>	2,27 $\pm$ 0,13	27,6 $\pm$ 2,4	2,08 $\pm$ 0,88	3,15 $\pm$ 2,0	0,535 $\pm$ 0,33	0,828 $\pm$ 0,32
<i>il10</i>	0,249 $\pm$ 0,037	71,2 $\pm$ 27,0	0,238 $\pm$ 0,069	2,38 $\pm$ 0,57	0,347 $\pm$ 0,33	1,41 $\pm$ 2,2
<i>il12</i>	23,9 $\pm$ 6,2	273 $\pm$ 35	145 $\pm$ 18	1717 $\pm$ 180	1,67 $\pm$ 0,61	1,20 $\pm$ 0,60
<i>ifn<math>\alpha</math></i>	0,586 $\pm$ 0,030	0,187 $\pm$ 0,024	2,32 $\pm$ 0,43	4,60 $\pm$ 1,7	n.d.	n.d.
<i>ifn<math>\gamma</math></i>	0,00222 $\pm$ 0,00023	0,0408 $\pm$ 0,035	0,0250 $\pm$ 0,0092	0,402 $\pm$ 0,20	n.d.	n.d.
<i>ifn<math>\gamma</math>1-1*</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,555 $\pm$ 0,31	6,6 $\pm$ 4,1
<i>ifn<math>\gamma</math>1-2*</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,89 $\pm$ 3,2	2,13 $\pm$ 0,98
<i>nos2a</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,245 $\pm$ 0,24	3,07 $\pm$ 1,3

n.d.: no determinado, gen no cuantificado en esa muestra.

\*: Alelos del mismo gen.



En cultivos SHK-1, *P. salmonis* generó una sobreexpresión de las interleucinas 8, 10 y 12 (con excepción de los 6 dpi donde la expresión de *il10* disminuyó significativamente) con relación a los controles sin infectar, y en una represión de la interleucina 1b y de los interferones evaluados (*ifn $\alpha$*  e *ifn $\gamma$* ), como se observa en la Tabla 15. Además de estos cambios en la expresión génica con respecto al control, se compararon las dos etapas de infección, 6 dpi (vacuolización) y 12 dpi (propagación). Se observó un aumento significativo en la expresión de los genes que codifican las interleucinas 8 (*il8*,  $P < 0,01$ , test de t de Student), la 10 (*il10*,  $P < 0,05$ , test de t de Student) y la 12 (*il12*,  $P < 0,01$ , test de t de Student),

luego de 12 dpi con relación a los 6 dpi. Contrariamente, la expresión de los interferones disminuyó con el tiempo, de forma no significativa para *infγ* y significativa para *ifnα*. La expresión de ambos se encontró reprimida en relación con la expresión observada en las células control (Tabla 15). Estos resultados se repitieron en la línea celular ASK, con algunas diferencias. La expresión de *il12* aumentó en mayor magnitud en comparación con el control sin infectar, tanto a las 6 dpi como a los 12 dpi, mientras que el aumento de *il8* fue menor que el observado en las células SHK-1 en ambos tiempos. Igual que para SHK-1, *il10* aumentó su expresión con relación al control sólo a los 12 dpi, pero su incremento en células ASK también fue menor al observado en células SHK-1. La expresión de *il1b* y de *infγ* disminuyó marcadamente en presencia de *P. salmonis*, al igual que en SHK-1, mientras la expresión de *ifnα* aumentó con relación al control a los 6 y 12 dpi, y no disminuyó a los 12 dpi con relación a los 6 dpi, como se observó en las células SHK-1. De esta forma, la expresión de *ifnα* es la respuesta celular más disímil observada entre los cultivos ASK y SHK-1.

En los cultivos primarios de pez cebra, el gen *il6*, los dos alelos de IFN-γ y la sintasa de óxido nítrico (*nos2a*) se encontraron sobre-expresadas luego de 5 dpi, con relación a los controles sin infectar (Tabla 15). La excepción fue el gen *nos2a*, cuyo aumento no fue significativo a los 5 dpi, y que también disminuyó significativamente su expresión en la etapa temprana de infección, y un alelo del interferón gama, el *ifnγ1-2*, el cual aumentó su expresión en ambos días evaluados, aunque de forma no significativa. Debido a la alta variación entre las réplicas de estos cultivos primarios, no se observaron diferencias significativas entre las etapas de infección en la expresión los genes evaluados ( $P > 0,05$  test de t de Student).

Entre los genes que se probaron tanto en las líneas celulares como en el cultivo primario (*il8*, *il10*, *il12* e *infγ*), hubo disparidad de resultados. En los CPR de pez cebra, *il8* no aumentó su expresión con respecto al control, como sí ocurrió en las líneas celulares, ni tampoco lo hizo la *il12*, que aumentó más de 100 veces su expresión en los otros cultivos. La expresión de los dos alelos de *ifnγ* aumentó en los CPR, mientras que el *infγ* de salmónidos se encontró reprimido en los cultivos SHK-1 y ASK. Por otro lado, al igual que lo observado en las líneas celulares, la expresión del gen *il10* en los cultivos primarios se vio reprimida significativamente con respecto al control en la fase temprana de infección. De esta forma, la respuesta inmune celular frente a la infección por *P. salmonis* tuvo particularidades en los tres cultivos celulares evaluados.

## 4. Discusión

### 4.1 Los plásmidos de *P. salmonis* LF-89

Distintos esfuerzos de secuenciación de *P. salmonis* permitieron ensamblar su genoma en el año 2015 (95). Como resultado se obtuvo no sólo la secuencia del cromosoma bacteriano, sino también de tres replicones circulares (a los que posteriormente se adicionó un cuarto) con características de plásmido. Para evaluar esta predicción, en este trabajo se logró purificar y secuenciar la fracción plasmidial de *P. salmonis*, de la que se obtuvieron 4 posibles plásmidos, cuya secuencia se anotó mediante programas bioinformáticos. Además de su carácter de ADN circular, estas secuencias extracromosomales contienen genes característicos de plásmidos, como aquellos utilizados para su replicación y mantención dentro de la célula. Entre éstos se encuentran las proteínas de partición y replicación de plásmidos ParA, ParB, MinD, CobB, CobQ, RepB y Spo0j (revisado en (18, 62, 92)). Esto apoya la predicción que estas secuencias circulares extracromosomales corresponden a plásmidos.

Además de codificar genes con función de partición y replicación de plásmidos, se encontraron posibles componentes de sistemas Toxina-Antitoxina (TA), que también han sido ampliamente descritos en plásmidos bacterianos, y que contribuyen en la heredabilidad de éstos a las células hijas (87). Estos sistemas consisten en un módulo potencialmente dañino para la célula, la toxina, la cual es contrarrestada por el segundo módulo del sistema, la antitoxina, un componente inestable con rol protector. La pérdida del plásmido inicialmente resulta en la pérdida del componente protector debido a su labilidad, lo que lleva a la activación de componente dañino y estable, y finalmente la destrucción de la célula. Según el mecanismo de acción de la antitoxina, y si es una proteína o un ácido nucleico, los sistemas TA se han clasificado en seis tipos (30). En este estudio, y debido a las herramientas informáticas disponibles, se identificaron 12 sistemas TA de tipo II codificados en los cuatro plásmidos de la cepa LF-89. La toxina siempre es una proteína, pero en estos sistemas TA de tipo II la antitoxina también lo es, y se caracterizan por ser codificados por dos genes en tándem (87, 132). Esto hace más fácil su predicción bioinformática, con menor ocurrencia de falsos positivos (113). Sin embargo, no se puede descartar que existan en *P. salmonis* otros módulos TA pertenecientes a los otros cinco tipos de sistemas conocidos.

Los sistemas TA predichos entregan información acerca de la persistencia de los plásmidos en la bacteria. En el pPSLF89-1 se identificó la mayor cantidad de sistemas TA de tipo II en *P. salmonis* LF-89, ocho en total. De ellos, seis se encontraron en regiones de profagos. En los demás plásmidos también se identificaron sistemas TA de tipo II: dos módulos en el pPSLF89-2, ambos en la región del profago; un módulo en el pPSLF89-3 ubicado en el esqueleto del plásmido; y un módulo también en el pPSLF89-4, ubicado en la región del fago incompleto. Lo anterior sugiere una interacción y función evolutiva entre la bacteria y los fagos que la parasitan. Esto puede ejemplificarse con el caso de *E. coli*. La cepa K-12 de esta bacteria contiene nueve profagos crípticos, y cada uno de ellos codifica módulos funcionales de sistemas TA (140). Algunos de ellos tienen como blanco la división celular vía unión a FtsZ, y tienen relación con un fenotipo particular de dormancia celular llamado persistencia (112), el cual confiere a las bacterias resistencia a antibióticos y la capacidad de evadir la respuesta inmune. En esta bacteria también se ha descrito la presencia de un plásmido llamado P1, el cual posee características de fago episomal de gran estabilidad ya que codifica distintos determinantes o módulos de adicción, como los sistemas de restricción-modificación (donde participan las enzimas de restricción), un sistema TA de tipo II llamado Phd-doc, el sistema TA *hos-Sok* regulado por un ARN antisentido, y un elemento ISI que regula la lisis celular (135). De esta forma, todos los componentes de los módulos de adicción, cuyo origen es viral y por tanto pueden describirse como elementos genéticos parasíticos persistentes, actúan en conjunto para dar estabilidad al plásmido bacteriano P1.

Como se mencionó, en todos los plásmidos se encontraron secuencias correspondientes a profagos. Cinco regiones de fagos completos fueron identificadas en el pPSLF89-1 (dos de ellas superpuestas, por lo que podrían conformar un fago de mayor tamaño), mientras en los plásmidos pPSLF89-2 y pPSLF89-3 sólo se encontró un fago completo, y en el plásmido conjugativo pPSLF89-4 un fago incompleto. Esto sugiere una gran conservación de la función del plásmido pPSLF89-4, probablemente debido a su carácter conjugativo, aunque más estudios son necesarios para probar esta posibilidad. Cabe destacar que el sistema TA se encuentra ubicado dentro de la secuencia de este fago incompleto, lo que probablemente determina su permanencia en la bacteria, si este sistema fuera funcional. También en la región del fago, se identificó una proteína perteneciente a la familia de integrasas de fagos, y una proteína con dominio integrasa. Debido a las características de este plásmido, podría

especularse que es un elemento integrativo conjugativo (ICE), sin embargo, la presencia de proteínas de partición de plásmidos codificadas en su secuencia (proteínas identificadas con dominios parB/RepB/Spo0 o cobQ/CobB/MinD/ParA), sumado a la baja representatividad de secuencias del pPSLF89-4 al secuenciar el genoma de *P. salmonis* (95), sugieren que éste tiene identidad de plásmido más que de ICE.

A pesar de haber identificado fagos completos en los plásmidos, es decir, con la potencialidad de formar progenie, no se observó la lisis de cultivos bacteriano durante este estudio, y sólo se ha reportado un caso de *P. salmonis* parasitadas con bacteriófagos anteriormente (146). Cabe la posibilidad de que el fago reportado haya sido altamente virulento y sin estado lisogénico, o que, si tuviese estado lisogénico, éste se insertara en una secuencia más grande del cromosoma. Con estos antecedentes, se realizaron búsquedas de profagos en el cromosoma de *P. salmonis* LF-89 con la herramienta PHASTER (7). Sólo una región dentro del cromosoma bacteriano fue identificada como un fago, con suficientes componentes virales para catalogarlo como un profago completo. Este profago, al igual que los observados en los plásmidos, corresponde a un virus de ADN de doble hebra sin estado de ARN, del orden Caudovirales. A pesar de que los posibles profagos identificados en el genoma de *P. salmonis* comparten numerosas similitudes, no es posible determinar si corresponden a diversos eventos de inserción del mismo fago, o son distintos fagos; algunos en estado de lisogenia, como fagos crípticos (sin capacidad de reiniciar el ciclo lítico), u otros como fagos episomales, ya que su identificación corresponde a una predicción bioinformática. A pesar de esto, es interesante notar que existen diversos genes dentro de las regiones de los posibles profagos plasmidiales que tienen función desconocida, o que no se corresponde con el ciclo de vida de un bacteriófago. Además de los mencionados sistemas TA, se encontraron genes con funciones de mantención y replicación del plásmido, reguladores transcripcionales, y, según lo planteado en la hipótesis de este trabajo, factores de virulencia. Un total de 14 genes, distribuidos en tres de los plásmidos de la cepa LF-89, fueron identificados como posibles factores de virulencia (FdeV). En el pPSLF89-1 se encontraron nueve posibles FdeV, y ocho de ellos ubicados dentro de regiones de profagos. Tres posibles FdeV se identificaron en el pPSLF89-3, todos codificados en el esqueleto del plásmido. Uno de esos genes (PSLF89\_3p51) fue anotado como *pipB2*, el cual codifica una proteína efectora en bacterias del género *Salmonella*, capaz de reclutar microtúbulos a la

vacuola que contiene la bacteria (64, 65). Dos homólogos a este gen fueron identificados en el pPSLF89-1, ambos ubicados en una región de fago, y un cuarto homólogo fue identificado en el cromosoma bacteriano, lo que sugiere que PipB2 tiene un rol en la infección de *P. salmonis*. Esto se relaciona con que esta bacteria, al igual que *Salmonella*, se ubica dentro de vacuolas citoplasmáticas durante su ciclo infectivo. Otros posibles FdeV interesantes en el pPSLF89-1 son un probable transportador de múltiples drogas, un transportador de hierro, y una toxina. Por otra parte, dos secuencias codificantes del pPSLF89-4 se identificaron como posibles FdeV, con función desconocida en *P. salmonis*. Por último, en el pPSLF89-2 no se identificaron FdeV, aunque sí dos probables enzimas de restricción las que, presumiblemente, confieren protección contra ADN exógeno y por tanto a la reinfección por nuevos virus (49). Todos los FdeV plasmidiales se resumen en el Anexo 1. Varios de ellos tienen sólo una función general predicha, pero, como se mencionó, algunos tienen ortólogos identificados en la base de datos VFDB con funciones específicas conocidas, que, como *pipB2*, pueden relacionarse con el ciclo infectivo de *P. salmonis*.

## **4.2 Conservación de secuencias plasmidiales en las cepas de *P. salmonis***

El conocimiento de la secuencia de los plásmidos de *P. salmonis*, permitió fabricar sondas específicas para cada plásmido de la cepa LF-89. En la Figura 9 se muestran las bandas identificadas con la sonda sP1\_34, diseñadas para el plásmido pPSLF89-1. Con esta sonda fue posible detectar bandas en las tres cepas estudiadas. En todas ellas se observó un patrón distinto luego de la digestión con nucleasa S1, destacándose una banda principal a la altura del peso molecular de 48,5 kb. En la cepa LF-89 se observaron 3 bandas luego de la digestión, y una en las cepas PSCGR01 y PSCGR02. Sin embargo, esto puede deberse a la diferencia en la cantidad de plásmido digerido. Por tanto, es posible identificar un plásmido tipo pPSLF89-1 en las tres cepas a la altura de 48,5 kb luego de digerir con nucleasa S1. Según la secuenciación, existe hasta 70 kb de diferencia en el tamaño del primer plásmido de las cepas, sin embargo, este tipo de gel no es resolutivo para este tamaño (mayor a 110 kb) por lo que la migración de las bandas correspondientes a este plásmido fue similar en los geles.

Con la sonda sP2\_32, se detectaron bandas de gran intensidad en las tres cepas estudiadas. Según se determinó por la secuenciación, el tamaño del segundo plásmido en las tres cepas fluctúa entre 33,4 y 33,6 kb. Esta diferencia de tamaño es pequeña para observar una distribución diferencial de las bandas identificadas luego de la digestión. A pesar de esto, se observaron bandas de migración similar en las tres cepas, lo que sugiere una conservación del tamaño, la conformación o la migración de estos plásmidos.

Con menor intensidad se detectaron las bandas asociadas a la sonda sP3\_52, sin embargo, con esta sonda también fue posible detectar secuencias en las tres cepas. Con esta sonda no fue posible distinguir entre las cepas luego de la digestión, lo que sugiere que los plásmidos detectados son similares entre las tres cepas. Curiosamente, mediante la secuenciación se identificó el tercer plásmido en la cepa LF-89 y PSCGR01, pero no en la PSCGR02. En esta última se encontraron sólo tres plásmidos, similares a los plásmidos pPSLF89-1, pPSLF89-2 y pPSLF89-4, por lo que esperábamos que no se detectaran bandas con la sonda sP3\_52. Sin embargo, la secuenciación es una predicción bioinformática. Esto implica que puede existir un plásmido similar al pPSLF89-3 en la cepa PSCGR02, o que la sonda sP3\_52 no sea específica para ese plásmido.

Así, las sondas diseñadas en base a secuenciación de la cepa LF-89 para cada plásmido, detectaron también los plásmidos presentes en las cepas PSCGR01 y PSCGR02. Esto sugiere una conservación de los plásmidos en *P. salmonis*, y, al menos, parte de su secuencia.

Para ahondar en la ubicuidad de los plásmidos, se tomaron las secuencias de todas las cepas depositadas en NCBI como genomas completos y anotados. 19 cepas en total cumplieron estas características, y con ellas se construyó un árbol de máxima similitud con las secuencias nucleotídicas cromosomales y plasmidiales. Esto se realizó con el fin de ver si existe divergencia entre estas cepas, descritas como cepas con alta similitud de secuencia, por lo que no pueden separarse en subespecies o especies distintas. Las cepas analizadas corresponden a aislados obtenidos desde diversos tejidos de peces enfermos, en distintos lugares y años. Si bien se ha descrito que existen dos genogrupos en la especie *P. salmonis* en base a la similitud de su gen ribosomal 16S (17, 73, 105), en este trabajo se quiso extender el análisis al genoma completo. Con el análisis de alineamientos múltiples realizado con el programa bioinformático MAUVE, según la secuencia del cromosoma bacteriano se

separaron las 19 cepas en los genogrupos A y B (Figura 13), correspondiente a lo descrito anteriormente. Es decir, en base a la secuencia nucleotídica de su cromosoma, las cepas del genogrupo A son más similares entre sí que con las cepas del genogrupo B, y viceversa. Como se mencionó en la sección de Resultados, de las 19 cepas evaluadas 6 corresponden al genogrupo A y 13 al B, sin embargo, esta diferencia en la cantidad de representantes de cada grupo es azarosa y depende exclusivamente de la cantidad de cepas que ha sido secuenciada, ya que se ha descrito que en los últimos años existe más prevalencia de cepas del genogrupo A en los brotes infecciosos del sur del país (88, 105). Cabe mencionar que no se realizaron inferencias filogenéticas en la distribución de secuencias de las cepas de *P. salmonis*, ya que no se utilizó un marcador o reloj molecular, por lo que sólo podemos hablar de similitud entre secuencias y no cuán cercanas o distantes evolutivamente se encuentran las cepas.

Una vez observada esta separación entre las cepas del genogrupo A y B en base a su secuencia cromosómica, se quiso ver si esto se repetía con la secuencia de sus plásmidos. Estos son elementos móviles que pueden ser altamente variables en secuencia, pero también transmisibles. Además, uno de los plásmidos fue predicho como conjugativo, por lo que, si las cepas se encontrasen cercanas o usando el mismo nicho, existe la posibilidad de intercambio de su material génico. Si fuera este el caso, se esperaba encontrar poca diferencia entre las secuencias de los plásmidos de cepas pertenecientes a distintos genogrupos. El resultado de los alineamientos múltiples fue un poco más intrincado, ya que se observó separación por genogrupo, pero también agrupación por tipo de plásmido. Al observar el árbol de máxima similitud generado (Figura 14), emergen tres grandes grupos de plásmidos: uno similar al pPSLF89-4, otro similar al pPSLF89-2 y por último uno que agrupa a todos los similares a los pPSLF89-3 y pPSLF89-1. En ellos se encuentran representantes de ambos genogrupos, pero como se mencionó anteriormente, dentro de cada grupo los genogrupos A y B no se mezclaron, sino que agrupan juntos. Esto sugiere primero que los plásmidos son una característica común de *P. salmonis*, ya que se encuentran en todas las cepas conocidas, independientemente del genogrupo al que pertenecen, por lo que podrían tener un origen común. Y segundo, a pesar de ser compartidos entre las cepas, los plásmidos poseen características específicas que los hacen más similares a los plásmidos de su genogrupo, por lo que podría haber alguna separación de nichos o de intercambio de material génico entre estas cepas.

### 4.3 Factores de virulencia plasmidiales de *P. salmonis*

Similitud de secuencias con factores de virulencia bacterianos conocidos y depositados en la VFDB, dominios de unión a proteínas eucariontes, familias de proteínas con dominios de proteínas eucariontes y función asignada similar a factores de virulencia conocidos, fueron los criterios utilizados para designar alguna proteína codificada en un plásmido como un posible factor de virulencia. Como se mencionó anteriormente, un total de 14 proteínas plasmidiales de la cepa LF-89 de *P. salmonis* fueron asignadas como posibles FdeV, 9 codificadas en el plásmido de mayor tamaño (pPSLF89-1), 3 en el pPSLF89-3 y 2 en el plásmido conjugativo (pPSLF89-4). Todas ellas presentaron homólogos en otras cepas secuenciadas de *P. salmonis*. Es interesante notar que algunos FdeV se encontraron codificados sólo en plásmidos, como todos los FdeV de los pPSLF89-3 y pPSLF89-4, mientras otros presentaron copias en el cromosoma bacteriano (Figuras 15 y 16). El gen que codifica un posible transportador de hierro (*locus tag* PSLF89\_1p143) fue el que se identificó en un menor número de cepas, 4 de las 19, mientras que los genes del plásmido pPSLF89-1 que codifican una proteína con dominio TIR (*locus tag* PSLF89\_08355), la toxina murina Ymt (*locus tag* PSLF89\_1p169) y la endopeptidasa PepO (*locus tag* PSLF89\_1p229) se encontraron en las 19 cepas (Tabla 11). De esas tres últimas, homólogos a PepO se encontraron codificadas únicamente en los plásmidos de las cepas (lo que también se observó en el gen con menos homólogos, PSLF89\_1p143), mientras que homólogos a los genes que codifican Ymt, y la proteína con dominio TIR, se encontraron en los plásmidos de 12 de las cepas, y en el cromosoma de 6 de las 19 cepas. Es notable que, en estos últimos, cuando estaban codificados en plásmidos, correspondieran a cepas del genogrupo B, mientras que, si se encontraron en el cromosoma, correspondían a cepas del genogrupo A. Esto ocurrió también con el transportador tipo ABC de drogas del pPSLF89-1.

Por otro lado, la mayoría de los FdeV predichos presentaron un mayor número de homólogos en cepas del genogrupo B, y, cuando se encontraron en cepas del genogrupo A, los FdeV podían encontrarse codificados en plásmidos o en el cromosoma bacteriano. Los genes presentes en varias cepas de distintos genogrupos corresponden además a genes dentro de regiones de profagos. Esto sugiere una alta movilidad de, al menos, estos genes entre las cepas de *P. salmonis*, y mayoritariamente entre cepas del mismo genogrupo. Considerando que en todos los plásmidos de la cepa LF-89 se identificó gran número de

transposasas e integrasas, además de profagos, posiblemente algunas secciones de los plásmidos, o algunos genes particulares, se han movilizado horizontalmente entre cepas del mismo genogrupo. Debido a que la transferencia génica horizontal requiere de contacto físico o al menos cercanía entre las células dadora y aceptora (además una incorporación y mantención en el tiempo del material génico en la célula aceptora), se sugiere una separación ecológica entre las cepas del genogrupo A y B. Esto ha sido planteado anteriormente, debido a la diferencia en la infectividad y prevalencia en terreno entre cepas de ambos genogrupos (88, 105). Sin embargo, con la información disponible no pueden descartarse otras explicaciones a estas diferencias, como la pérdida de algunos segmentos de ADN (plasmidial o genómico) en cepas de un genogrupo con relación al otro, o mutaciones o alteraciones genéticas que impidan la transferencia génica horizontal entre cepas de distinto genogrupo, aunque estas coexistan en el mismo hábitat.

Estudios realizados en otros patógenos de peces, también reportan alta variabilidad entre aislados y cepas de la misma especie bacteriana obtenidas de distintos orígenes. *Photobacterium damsela* es un patógeno emergente de la familia *Vibrionaceae* que afecta a peces de importancia en la acuicultura del hemisferio norte, y que comparte algunas características con *P. salmonis*. Es una  $\gamma$ -proteobacteria recientemente secuenciada, genera alta mortalidad en peces estresados, es recuperada de órganos internos como hígado y riñón de peces, y es capaz de replicarse dentro de macrófagos. Posee dos subespecies, una de las cuales (*Photobacterium damsela* subespecie *damsela*) es generalista, siendo capaz de infectar variedad de animales marinos entre ellos crustáceos y mamíferos, mientras la otra (*Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*) está limitada a peces marinos y es un patógeno intracelular facultativo. La subespecie *damsela* se caracteriza por una gran heterogeneidad en rasgos fenotípicos y de virulencia entre cepas. El año 2016, se secuenciaron 14 cepas obtenidas de lubinas del mar negro luego de una temporada con alta mortandad de peces. Mediante análisis filogenéticos de las cepas se encontró gran diversidad génica entre los aislados, por lo que sugirieron que el patógeno emergió por la proliferación de distintos clones de la bacteria, y no de un clon particular hipervirulento (124). De esta forma, la bacteria en esas condiciones podría corresponder a un patógeno oportunista cuya presencia en el ambiente marino y la deriva génica generó una alta variabilidad genética entre cepas. Por otro lado, al secuenciar dos cepas de la subespecie

*piscicida* de la misma bacteria, se encontró una masiva presencia de secuencias de inserción en los genomas, las que son responsables de la generación de pseudogenes y de pérdida de funciones biológicas en las cepas. Esto a su vez redundaba en diferencias fenotípicas y ecológicas entre las cepas. Los autores concluyen que existen dos configuraciones genómicas entre las cepas observadas (una asiática/americana y otra europea), y sugieren que el estilo de vida de las bacterias derivó en esta separación (9). Con estos antecedentes, es posible sugerir que *P. salmonis* en su ambiente también puede haber estado sujeta a procesos evolutivos que llevaran a la divergencia de las cepas en genogrupos con características genéticas distintas.

Notablemente, y en concordancia con la hipótesis, se lograron identificar posibles FdeV codificados en plásmidos, que son conservados en distintas cepas de *P. salmonis*. Estos FdeV presentaron un alto porcentaje de similitud de secuencia, por lo que podrían corresponder a un rasgo común a las cepas de *P. salmonis*, y por tanto un carácter ancestral o compartido entre ellas. Así, esta ubicuidad sugiere un rol en el ciclo de vida, y por tanto en la infección, de *P. salmonis*.

#### **4.4 Respuesta global de *P. salmonis* durante la infección**

El estado celular de *P. salmonis* durante la infección fue evaluado en este trabajo por dos métodos, uno global mediante proteómica, y uno más específico mediante la cuantificación de transcritos de genes relacionados con la virulencia bacteriana. Para lo primero, desde el proteoma de células SHK-1 infectadas se analizaron las proteínas bacterianas en búsqueda de proteínas únicas de la infección, y posibles factores de virulencia. Debido a la diferencia en la naturaleza de las muestras de *P. salmonis*, la proteómica fue analizada en base a la identidad de las proteínas presentes en cada muestra (infección en vacuolización, infección en propagación y control), pero no de forma cuantitativa.

Como primera aproximación, se comparó la cantidad de proteínas pertenecientes a cada categoría funcional COG, según se muestra en la Figura 34. Las categorías relacionadas con proteínas desconocidas -sólo función predicha (R), función desconocida (S), y proteínas sin categoría asociada- representaron un alto porcentaje de las proteínas identificadas en la infección. Esto último refleja el desconocimiento del proceso infectivo de la bacteria, y de las

proteínas asociadas a ello, a pesar de tener secuenciado su genoma. Comúnmente, los efectores de sistemas de secreción no se encuentran conservados entre bacterias, lo que dificulta su predicción bioinformática. Sumado a esto, la bacteria podría tener mecanismos de virulencia o efectores novedosos que no han sido descritos en otras bacterias. Dentro de las categorías con más representantes en las muestras de infección, destacan varias relacionadas con distintos aspectos de la virulencia bacteriana. Una mayor cantidad de proteínas de la categoría de mecanismos de transducción de señales (T), fueron identificadas en las muestras infectadas, principalmente debido al aumento en proteínas de sistemas de dos componentes. Las categorías N y W (motilidad celular y estructuras extracelulares), que tuvieron representantes sólo en las muestras de infección, tienen relación con las estructuras celulares del flagelo y el pili. Estas estructuras se caracterizan por otorgar motilidad a las bacterias, sin embargo, *P. salmonis* ha sido descrita como una bacteria no mótil. El pili en bacterias puede además tener funciones de adherencia a sustrato, como tejidos del hospedero, por ejemplo, al igual que las fimbrias, o de transferencia de ADN, como en el caso del pili conjugativo (48). Es interesante notar que en la etapa de vacuolización se encontraron proteínas de fimbrias, mientras en propagación de pili. El flagelo por otro lado, ha sido descrito como otro sistema de secreción de factores de virulencia en bacterias patógenas (145), función que podría estar cumpliendo en *P. salmonis*. Es destacable también que las categorías H (transporte y metabolismo de coenzimas) y U (tráfico intracelular, secreción y transporte de vesículas) obtuvieron un mayor porcentaje de proteínas en la infección en estado de propagación. Las proteínas pertenecientes a estas categorías fueron identificadas en su mayoría como factores de virulencia, relacionadas con la adquisición y metabolismo de hierro en la categoría H, y con sistemas de secreción (específicamente del SST4 o Dot/Icm) en la categoría U.

Finalmente, es notable la aparición de la categoría X (moviloma, profagos y transposones) sólo en las muestras de infección. Es decir, ninguna proteína relacionada con transferencia génica o con profagos fue identificada en la bacteria durante la fase de crecimiento exponencial (control). Esto sugiere fuertemente un rol del moviloma, o de proteínas provenientes de fagos, en la infección bacteriana. Muchas de estas proteínas se encuentran codificadas en los plásmidos, lo que apoya la hipótesis de la importancia de los plásmidos de *P. salmonis* en el proceso infectivo.

Además de la categorización de proteínas en COG, se hizo lo mismo para las categorías ontológicas (GO), y se analizó de forma cuantitativa la representatividad de cada GO con relación al genoma de la bacteria, mediante análisis de enriquecimiento (Figuras 35-37). De forma general, se observó algo similar a las categorías COG. En la muestra control las proteínas enriquecidas tenían relación con procesos metabólicos, visto en funciones moleculares de metabolismo energético y catabolismo celular, como la unión y síntesis de distintos nucleótidos, la traducción, actividad y constituyentes de ribosomas, glicólisis y ciclo TCA, entre otros. Por otro lado, se encontraron subrepresentados los términos GO relacionados con componentes integrales de membrana, unión, integración y transposición de ADN, lo que se condice con lo observado en las categorías funcionales (COG).

En las muestras de infección, las funciones moleculares enriquecidas correspondieron a unión de metales y ATP. Anteriormente se ha reportado la relevancia de la disponibilidad de metales, específicamente hierro, y su transporte activo en la célula para la infectividad de la bacteria en salmones (94). También, las funciones moleculares relacionadas con la transducción de señales y la fosforilación de proteínas, además de la actividad trifosfatasa y actividad serina-treonina quinasa, se encontraron enriquecidas en la vacuolización y la propagación. Esto tiene relación con familias de proteínas sensoras y de señalización de sistemas de dos componentes, que cumplen un rol en la virulencia bacteriana (21). Dentro de los procesos biológicos enriquecidos en las etapas de infección, aumentaron la fosforilación de proteínas, y procesos relacionados con la biosíntesis de distintos compuestos (aromáticos, ribonucleótidos, coenzimas nitrogenados, organonitrogenados, carbohidratos derivados), lo que indica que la bacteria estaría metabólicamente activa. En ambas muestras de infección, no se encontraron enriquecidos procesos biológicos y funciones moleculares relacionados con la categoría COG X, sin embargo, sí se identificaron proteínas relacionadas con estos GO (como transposición e integración de ADN y actividad transposasa), a diferencia de lo observado en la muestra control.

En resumen, tanto el análisis de las categorías COG como de los términos GO, indicó una predominancia en proteínas relacionadas con el metabolismo y la replicación celular en las bacterias control, mientras en las bacterias en estado de infección se observaron proteínas relacionadas con la superficie y adherencia celular, sistemas de secreción y de dos componentes, y la movilidad y transposición génica.

#### **4.5 Factores de virulencia de *P. salmonis* identificados en la infección de cultivos celulares**

De todas las proteínas bacterianas identificadas durante la infección en células SHK-1, el 20,4% fueron predichas como probables factores de virulencia. De esta fracción, un 82% (correspondiente al 16,7% del total de proteínas mencionadas) fueron probables FdeV exclusivos la infección, es decir, no se encontraron en la muestra control.

En la misma base de datos que se usó para predecir la función de estas proteínas, los FdeV se agrupan en familias según su función en la infección, o acción sobre el hospedero. En la muestra control se encontró una mayor cantidad de FdeV pertenecientes a familias relacionadas con metabolismo de aminoácidos, regulación génica y adherencia. Al observar las proteínas encontradas en las tres muestras, destacaron las familias de adherencia, el transporte de metales y grupos hemo, y aparato de exportación y motilidad (Figura 38A). Todos estos procesos, por tanto, son necesarios para el crecimiento normal de la bacteria, independiente de dónde se encuentre. Varias de las familias de FdeV compartidas entre la infección y la muestra control, también se repitieron al observar las proteínas únicas de la infección (Figura 38B), aunque cambió la proporción de ellas. Destacó por ejemplo una mayor cantidad de proteínas de familias de sistemas de secreción, familia de LPS, toxinas y proteínas efectoras, y regulación. Esta última es interesante ya que en el control también se encontró esta familia, pero ninguna de esas proteínas fue compartida, lo que sugiere una regulación génica diferencial entre el crecimiento en cultivo líquido, y la infección. Por otro lado, las familias de FdeV de quimiotaxis y componentes de superficie celular aparecieron sólo en la infección. Proteínas de estas familias, entonces, son relevantes en el proceso infeccioso de la bacteria, y son expresadas durante la infección en los cultivos SHK-1. De forma específica, también hubo diferencias entre las etapas de infección. En la vacuolización se identificaron proteínas de adaptación al estrés y de metabolismo de aminoácidos, mientras la familia de aparato de exportación y motilidad fue característica de la propagación. Por tanto, a pesar de alta similitud entre las etapas de infección estudiadas, existen procesos específicos para cada una de ellas, en base a la actividad de sus proteínas identificadas. De esta forma, se observaron diferencias globales entre las muestras de infección, y las de infección y el control, en las proteínas predichas como factores de virulencia.

De los resultados anteriores, se seleccionaron familias de FdeV identificados únicamente en las muestras de infección. Algunas proteínas de esas familias fueron utilizadas para cuantificar el nivel de expresión de sus genes codificantes, y compararlos entre los cultivos celulares SHK-1, ASK y CPR de pez cebra (Tabla 14 y Anexo 6).

De forma general, en la infección en cultivos ASK la bacteria presentó una expresión génica similar a los cultivos SHK-1 en los genes indicados, con alguna correspondencia con lo observado en los CPR de pez cebra. Dentro de los FdeV codificados en el cromosoma, destacan los genes de sistemas Dot/Icm, que en *P. salmonis* se encuentran codificados en tres regiones distintas. Aunque hubo discrepancias en la expresión de genes pertenecientes a la misma región, se observó un aumento significativo en genes de las dos regiones Dot/Icm del genoma evaluadas, con la excepción de *icmJ/dotN* e *icmL/dotI*, cuya expresión disminuyó en la vacuolización en células SHK-1, y no se alteró en ASK y CPR respecto al control. En los CPR de pez cebra, ningún gen evaluado cambió su expresión de forma significativa, mientras que sólo un gen de cada región codificante aumentó significativamente su expresión en las células SHK-1 y ASK. Esto no permite especular si estas regiones conforman un operón, o si son importantes durante la infección. Por otro lado, cada región Dot/Icm está formada por más de 15 genes, y además en *P. salmonis* existe una tercera región que codifica genes de este sistema, que podría ser relevante. Esto, sumado a que proteínas de estos sistemas de secreción fueron identificadas en el proteoma de vacuolización y propagación, sugiere que el sistema Dot/Icm es importante en la virulencia bacteria.

También ubicado en el cromosoma, el transcrito que codifica a la proteína OspD3 se observó aumentado durante la infección en células SHK-1, ASK y CPR, y fue catalogado dentro de la familia de toxinas y efectores. En *Shigella flexneri* es una enterotoxina secretada que participa en la inflamación generada por interleucina 8 (42). Por otro lado, entre los genes cromosomales evaluados de la familia de FdeV de membrana, LPS y pared celular, destacó la diferencia observada entre los tres cultivos celulares. Por un lado, la expresión de proteínas que sintetizan o modifican el LPS, como una lípido-A 4'-quinasa (*lpxK*) y una glicosiltransferasa de LPS (*waaE*), no cambiaron su expresión respecto del control en los cultivos ASK y de riñón de pez cebra, pero disminuyeron significativamente su expresión en la vacuolización en células SHK-1. Distinto es el caso de *ponA*, gen que codifica la proteína de unión a penicilina PBP1, el cual tuvo un comportamiento inverso en las células SHK-1 que

en las ASK, mientras no se vio alterada en los CPR respecto al control. También es destacable que, en las condiciones evaluadas, los genes de estrés *sspA*, *rpoS*, *relA* y *spoT* mostraron una expresión similar al control en las dos etapas de infección, en los tres cultivos evaluados. Esto sugiere que durante la infección la bacteria no se encontró en condiciones de estrés nutricional ni en condiciones similares a fase estacionaria de crecimiento, mayores a las observadas en el control, correspondiente a bacterias en fase exponencial de crecimiento.

Se ha reportado que para *P. salmonis* la homeostasis de hierro es fundamental durante el proceso infectivo en salmones, ya que la privación de hierro intracelular es utilizada como un mecanismo de defensa contra la bacteria, mientras que ésta induce la expresión de sistemas de transporte activo (71, 94). En las muestras de proteómica, se identificaron FdeV de familias de transporte de metales y adquisición de grupos hemo en las dos etapas de infección en células SHK-1. De los genes de esta familia de FdeV evaluados, sólo *hemL*, aumentó su expresión en los tres cultivos celulares. En *P. salmonis*, este gen está codificado en un plásmido y se ha reportado que en otras bacterias HemL tiene relación con la adquisición de hierro desde el hospedero (39). Los genes *fhuF* y *moeB*, relacionados con el metabolismo y transporte de metales, en las células SHK-1 no cambiaron significativamente su expresión con relación al control, *moeB* aumentó de forma no significativa en CPR, y en las células ASK ambos se sobre expresaron. Esto es otro ejemplo de FdeV que son expresados de forma diferencial en los cultivos, y por su expresión es hospedero-dependiente.

Los genes relacionados con la invasión, como *mce2b* e *iap*, no cambiaron su expresión con respecto al control, en ninguna de las condiciones de hospedero ni tiempo de infección evaluadas. *iap* es una proteína extracelular asociada a la invasión en *Listeria monocytogenes*, mientras que *mce2b* ha sido descrito en bacterias del género *Mycobacterium*, se encuentra dentro de operones denominados *mammalian cell entry* (*mce*) y participan en el ingreso y replicación de las bacterias en su hospedero (16). Esto sugiere que, en los tiempos de infección evaluados, la bacteria no se encontraba en un proceso de invasión celular y probablemente ya se había internalizado.

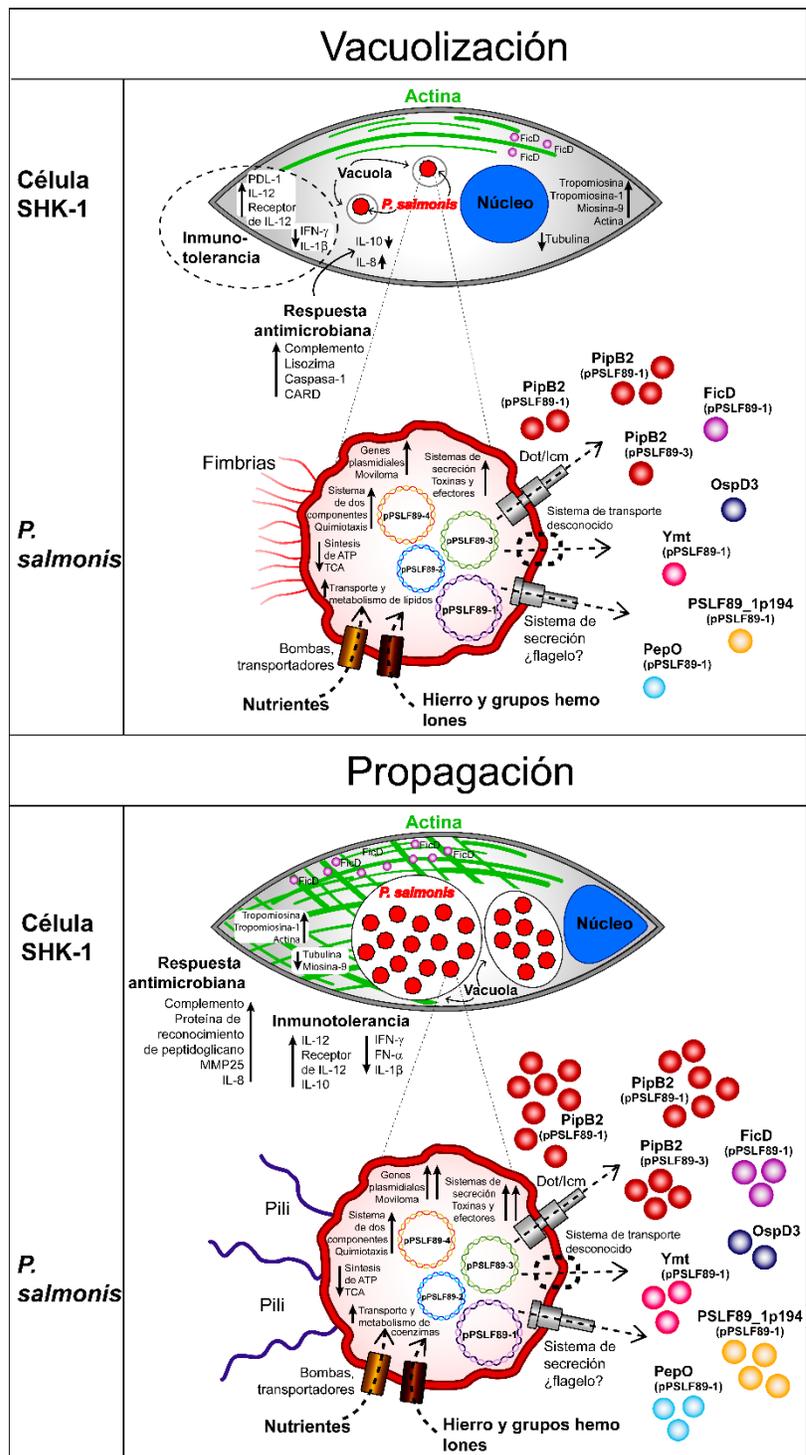
Entre todos los transcritos evaluados, en los tres cultivos destacó la sobreexpresión de genes codificados en los cuatro plásmidos de *P. salmonis*. Varios de ellos fueron designados como toxinas y efectores, como las tres copias de *pipB2*, *PSLF89\_1p194*, *ficD*, *ymt* y *pepO*. En

otras bacterias se ha descrito que estos FdeV tienen distintas funciones durante la infección. PipB2 es una proteína efectora secretada por la bacteria *S. enterica*, que es requerida para la reorganización y movimiento del endosoma tardío/lisosoma, mediante microtúbulos ricos en glicoproteínas llamados Sifs ("*Salmonella induced filaments*") (64, 65). Interesantemente, las tres copias plasmidiales de *pipB2* (dos de ellas del pPSLF89-1 y una del pPSLF89-3) fueron sobre-expresadas en los tres cultivos celulares, pero no así la copia cromosomal. Esto puede indicar una diferencia en la regulación o función de estos FdeV. Las proteínas Fic en bacterias patógenas son secretadas como toxinas que interfieren con el citoesqueleto, el tráfico, la secreción y la traducción (102). Cabe mencionar que el gen *ficD*, codificado en el pPSLF89-1, fue sobre-expresado sólo en células SHK-1, por lo que podría ser relevante en este tipo celular. Esto se condice con que fue el único tipo celular donde se observaron grandes vacuolas replicativas. Ymt es una proteína de la familia de las fosfolipasas D, que protege a la bacteria *Yersinia pestis* de ser digerida en el plasma de pulgas (57). Aunque su función es desconocida en *P. salmonis*, el gen *ymt*, también del pPSLF89-1, se encontró sobre-expresado en los tres tipos celulares. La endopeptidasa PepO es una proteína de unión a plasminógeno y fibronectina que facilita la evasión de la respuesta inmune en *Streptococcus pneumoniae* (1). Al igual que en el caso de *ymt*, *pepO* fue sobre-expresado en todos los tipos celulares. Esto sugiere un rol importante de estos FdeV en la infección de la bacteria, independiente del hospedero.

También codificados en plásmidos, los sistemas toxina-antitoxina (TA) se sobre-expresaron en los tres cultivos celulares. Se observó un aumento en la expresión de todos los componentes de sistemas TA evaluados (toxina *relE* y antitoxina *PLF89\_1p80* del pPSLSF89-1, toxina *hicB* del pPSLF89-2, y antitoxina *PSLF89\_09045* del pPSLF89-4). Esto sugiere que los sistemas TA evaluados se encuentran activos durante la infección bacteriana.

En las otras categorías evaluadas, también se observaron genes plasmidiales que aumentaron su expresión. Entre ellos se encuentran el regulador transcripcional *PSLF89\_1p23*, el gen *PSLF89\_1p194* clasificado con función de antifagocitosis o cápsula, ambos del plásmido pPSLF89-1, y el gen *PSLF89\_3p22* del pPSLF89-3, que codifica una proteína de superficie. Las diferencias en la expresión de factores de virulencia, y el estado celular de *P. salmonis* durante las etapas de infección evaluadas en células SHK-1 se resumen en la Figura 40.

Figura 40. Resumen del estado celular de *P. salmonis* y las células SHK-1 durante la infección en estado de vacuolización o propagación. Esquema realizado en base a los resultados de inmunofluorescencia, proteómica y RT-qPCR. Arriba, infección en estado de vacuolización. *P. salmonis* ingresa a las células SHK-1 en pequeñas vacuolas citoplasmáticas. Activa la respuesta inmune celular, y la altera generando inmunotolerancia. Se altera la dinámica del citoesqueleto celular, aumentando la tropomiosina-9, tropomiosina-1 y la actina. En *P. salmonis* aumenta la expresión de sistemas de secreción, genes plasmidiales y de toxinas y de fimbrias. Se favorecen los procesos celulares de ingreso de nutrientes, hierro y grupos hemo, el metabolismo y transporte de lípidos. Abajo, infección en estado de propagación. *P. salmonis* se replica al interior de las vacuolas citoplasmáticas. Altera la respuesta inmune celular generando inmunotolerancia. Se altera la dinámica del citoesqueleto, aumentando la tropomiosina, tropomiosina-1 y la actina.



En *P. salmonis* aparece el pili, aumenta en mayor medida la expresión de sistemas de secreción, genes plasmidiales y de toxinas. Se favorecen los procesos celulares de ingreso de nutrientes, hierro y grupos hemo, el metabolismo y transporte de coenzimas. Destaca el aumento de *ficD* en conjunto con el tamaño de las vacuolas, la reorganización de citoesqueleto de actina y la replicación intracelular de *P. salmonis* resultante del avance en el estado de infección.

#### 4.6 Infección de *P. salmonis* en tres tipos celulares distintos

*P. salmonis* ha sido descrita como un patógeno de salmónidos, aunque también se ha reportado que causa enfermedad en distintos peces de interés comercial, y no muy emparentados con salmónidos, como son la tilapia (78), la corvina (25), el lumpo o ciclóptero (75), y peces nativos del sur de Chile (29), entre otros. Sumado a esto, *P. salmonis* puede ingresar y replicarse al interior de una gran variedad de tipos celulares de peces, desde tejidos homogenizados (como riñón, hígado y sangre (45)) hasta líneas celulares como células embrionarias, epiteliales, hepáticas, gonadales, inclusive en células inmunes como macrófagos (45, 79, 99, 115). Tomando en cuenta que *P. salmonis* es capaz de ingresar a células del sistema inmune de peces y replicarse dentro de ellas, y además es recuperada desde tejidos hematopoyéticos como el riñón anterior de salmónidos infectados (31, 45, 98, 114), buscamos un modelo alternativo de infección que tuviera características similares a este tejido. En este contexto, se usó como animal modelo al pez cebrá. Como no se encuentran disponibles líneas celulares de este pez, establecimos cultivos primarios a partir del riñón (CPR) de peces cebrá adulto, donde también se localiza el tejido hematopoyético.

Además de desarrollar un método de infección en este modelo alternativo, se buscó comparar la infección generada por *P. salmonis* en los cultivos primarios, con la de otros tipos celulares utilizados para el estudio de su virulencia. Se seleccionó la línea celular ASK de origen epitelial, y la línea SHK-1 con propiedades de macrófagos, ambas de riñón anterior de salmón atlántico, y por tanto similares a los tipos celulares del CPR de pez cebrá. Para ello, primero se replicaron las condiciones de infección reportadas anteriormente (60, 115). Lo primero que se observó fue un cambio en el tiempo de aparición del efecto citopático en los cultivos SHK-1, en comparación con lo reportado. Al usar MOI=50 según se recomendaba, no obtuvimos efectos en los cultivos celulares, pero al modificar el protocolo incubando 3 días con la bacteria en vez de sólo horas, la aparición de vacuolas intracelulares ocurrió luego de una semana. En nuestras condiciones de infección, fue óptimo el uso de un MOI=100 y un mayor tiempo de incubación con la bacteria. También observamos diferencias entre nuestros resultados y otros reportes en el crecimiento bacteriano en cultivo bacteriológico, y en la temperatura máxima de crecimiento. Esto da cuenta de la alta variabilidad en resultados observada entre laboratorios, tanto en capacidad infectiva como de crecimiento, lo que ha sido reportado en una revisión de métodos de cultivo de *P. salmonis* (72).

Los característicos efectos citopáticos observados en la línea SHK-1 fueron cuantificados de modo que separamos la infección de *P. salmonis* en vacuolización (infección temprana), propagación (infección tardía) y desprendimiento, como se detalla en la Figura 18. Ninguna de estas etapas fue observada de igual forma en la línea celular ASK, ni en los cultivos de pez cebra, lo que sugiere que existen diferencias en la infección por *P. salmonis* en distintos tipos celulares. Para comparar la infección de forma cuantitativa, se utilizó el alamarBlue como un indicador del metabolismo celular. Este es reducido al interior de células metabólicamente activas, indicativo de células viables, y cambia su coloración a la vez que emite fluorescencia, lo que fue cuantificado en todos los cultivos en diversas condiciones, para hacer las infecciones comparables. De forma general, se pudo detectar eficientemente un amplio rango de número de células en todos los cultivos, aunque se detectaron 10 veces más células en las líneas ASK y SHK-1 que en los CPR de pez cebra. Debido a que el alamarBlue es reducido sólo por células metabólicamente activas, esta diferencia en el nivel de detección puede significar que una mayor proporción de las células del CPR se encuentran inactivas, o con un metabolismo más bajo que las de las líneas celulares, y por tanto no son detectables con este método. Cabe señalar que los ensayos se realizaron 20°C, una temperatura óptima para la infección por *P. salmonis*, la cual es inferior a la óptima para el pez cebra (28°C).

A pesar de las diferencias en detección, fue evidente la pérdida de viabilidad celular de los tres cultivos infectados con *P. salmonis* en comparación con los controles sin infectar (Figuras 20 y 21). Para evaluar si el efecto observado se debía a la acción directa de *P. salmonis* en las células, se buscó la presencia de la bacteria al interior de los cultivos celulares, y se evaluó su capacidad de replicarse en ellos. Lo primero fue comprobado por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra *P. salmonis*, los que detectaron a la bacteria en todos los cultivos (Figuras 23 y 24). Como la inmunofluorescencia fue realizada posterior a un tratamiento con el antibiótico gentamicina, la detección de la bacteria en los cultivos indica que éstas ingresaron a las células. Interesantemente, en los cultivos SHK-1 y ASK fueron visibles varias agrupaciones de bacterias por célula, cercanas al núcleo y en zonas distantes asociadas a reordenamientos del esqueleto de actina. La disposición de ambos tipos celulares también se vio alterada, las células perdieron en parte su organización en monocapa y se alteró la morfología de las fibras de estrés de actina, al compararlas con las células control. Esto se condice con estudios anteriores que reportan un rol importante

del citoesqueleto y los monómeros de actina en la internalización de la bacteria. Además, se ha reportado que *P. salmonis* es capaz de causar reordenamientos de este citoesqueleto, formando así las vacuolas replicativas (4, 96).

De esta forma, se pudo detectar a la bacteria luego de 12 días en las líneas celulares, y de 5 días en los cultivos primarios de riñón. En estos últimos se observaron agrupaciones de bacterias asociadas a células y también fuera de ellas, y en las líneas celulares se observaron agrupaciones de bacterias en las cercanías del núcleo celular.

El segundo requisito para decir que *P. salmonis* se encontraba infectando los cultivos celulares que disminuyeron su viabilidad en el tiempo, fue determinar un aumento en la cantidad de bacterias en esos cultivos. Mediante PCR cuantitativo en tiempo real, se cuantificaron los transcritos bacterianos en las etapas tempranas y tardías de infección determinadas para cada cultivo celular (Figura 25). Al igual que en la inmunofluorescencia, luego del periodo de incubación con la bacteria, los cultivos celulares fueron lavados y tratados con gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. En todos los tipos de cultivos, se observó alrededor de  $10^8$  bacterias en el mayor tiempo de infección, y un aumento en la cantidad de bacterias con respecto a la infección temprana. En los cultivos SHK-1, hubo un aumento de más de 140 veces en el número de bacterias cuantificadas en la etapa de infección tardía con respecto a la temprana, mientras que en las células ASK este aumento fue de 5 veces y en los CPR de 3 veces. Esto se corresponde con la observación de la viabilidad celular, ya que las células SHK-1, donde ocurrió el mayor aumento en la cantidad de bacterias entre etapas de infección, fueron las que se mantuvieron más viables en el tiempo, lo que posiblemente contribuyó a la replicación intracelular de la bacteria. Concordantemente, en las células ASK no se observaron grandes vacuolas con bacterias en su interior, su viabilidad disminuyó significativamente en el tiempo, y el aumento en el número de bacterias cuantificadas fue también menor. Los efectos observados durante la infección con *P. salmonis* en los distintos cultivos celulares se resumen en la Figura 41.

Por tanto, la bacteria fue capaz de ingresar a las células de los tres cultivos celulares evaluados, permanecer en ellas por al menos 12 días en las líneas celulares y 5 días en los CPR, replicarse al interior de ellas y disminuir su viabilidad, y por tanto concluimos que *P. salmonis* infecta las células SHK-1, ASK y CPR de pez cebra.

#### 4.7 Efecto de *P. salmonis* sobre las poblaciones de neutrófilos en el pez cebra

El desarrollo diferencial del sistema inmune del pez cebra ha sido una ventaja para estudiar las relaciones patógeno-hospedero, y para evaluar el potencial virulento de diversos patógenos, ya que puede estudiarse la respuesta inmune innata de forma separada de la adaptativa (80). Para ello, basta utilizar peces en distinta etapa del desarrollo: los primeros macrófagos primitivos con actividad fagocítica (*mpeg-1+*) aparecen en embriones desde un día post-fecundación (1 dpf); los neutrófilos con producción de mieloperoxidasa (*mpx+*) son detectados desde los 2 dpf; los precursores de células T (linfoblastos inmaduros) aparecen a los 5 dpf, y sólo entre la cuarta y sexta semana de vida aparece la respuesta inmune adaptativa, ya que en este periodo maduran las células B y T (66, 80, 118, 130).

De las opciones de infección evaluadas en este estudio, sólo se obtuvo resultados con larvas de 48 hpf inyectadas con *P. salmonis* en la circulación (Figura 26). Probablemente, otras formas de infección sistémica serían viables. Sin embargo, la utilizada en este estudio en huevos fecundados en estado de 8-células no funcionó, probablemente debido a la temperatura de incubación (22°C) que es muy baja para este estado de desarrollo.

A pesar de observar una baja letalidad en las larvas infectadas, ocurrieron otros cambios fenotípicos en ellas. Un porcentaje de larvas presentó edema cardiaco, lo que es indicativo de disfunción cardiovascular. Por otro lado, la población de neutrófilos aumentó en larvas infectadas, tanto en circulación como infiltradas en tejidos, según se observó en larvas transgénicas con los neutrófilos marcados fluorescentemente (Figuras 28 y 29). Además, se observó una gran cantidad de neutrófilos agrupados o reclutados en la zona hematopoyética caudal de la larva. La acumulación de neutrófilos en esta zona se correlacionó con la presencia de agrupaciones de bacterias, hasta al menos 7 días luego de la inyección de *P. salmonis*, como se observó por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos anti-*P. salmonis* (Figura 30). Este fenotipo es similar al observado durante la mielopoyesis o granulopoyesis de emergencia, fenómeno que ocurre cuando el sistema inmune se ve sobrepasado por la carga bacteriana. Se caracteriza por la muerte de granulocitos en los tejidos inflamados como consecuencia de sus funciones antibacterianas, seguido de una expansión de granulocitos vía la activación de sus progenitores (74). Se ha reportado este fenómeno en

larvas de pez cebra infectadas con altas dosis de *E. coli*, sin embargo para comprobar este fenotipo deben realizarse más análisis, como variaciones en la cantidad de células de diversos linajes celulares (depleción/expansión de neutrófilos), la aparición de precursores inmaduros en la sangre periférica, o la activación de progenitores hematopoyéticos (59).

Por otro lado, en los cultivos primarios de peces cebra adultos se pudo detectar la presencia de neutrófilos y macrófagos mediante PCR cuantitativo en tiempo real (Figura 22). En esos ensayos se cuantificó la expresión de los mismos genes utilizados como marcadores de neutrófilos (*mpx*) y macrófagos (*mpeg-1*) en las líneas transgénicas. La expresión de sus transcritos fue calculada de forma relativa a la expresión de los *housekeeping ef1a* y *18S* (Figura 22), y se observó una expresión relativa baja. Esto era esperable ya que los macrófagos y neutrófilos representan una subpoblación del cultivo primario. Según se ha descrito anteriormente, sólo el 24% de las células derivadas de la médula de riñón de pez cebra corresponde a mielomonocitos, dentro de los cuales se encuentran poblaciones de neutrófilos, macrófagos, monocitos y eosinófilos (126), lo que se condice con lo observado en nuestros ensayos. Sumado a esto, en nuestra cuantificación se observó una disminución significativa en la expresión del gen marcador de neutrófilos al infectar con la bacteria (Figura 22). Esto no ocurrió con la población de células que expresan el marcador *mpeg-1* de macrófagos. Esto es interesante debido a que, contrariamente, en los ensayos con larvas de pez cebra se observó un aparente aumento de neutrófilos luego de inyectar *P. salmonis*. Se debe tomar en cuenta que las células en cultivo primario probablemente no están replicándose, ya que se observa una marcada disminución en la viabilidad celular, mientras que si se encuentran en replicación en larvas de pez cebra en desarrollo. De esto se puede inferir entonces que, tanto en las larvas como en el cultivo primario de riñón, *P. salmonis* tiene un efecto sobre la población de neutrófilos, y no así en la de macrófagos.

#### **4.8 Respuesta de los cultivos celulares enfrentados a *P. salmonis***

El proteoma de células SHK-1 infectadas con *P. salmonis* en los estados de infección denominados vacuolización y propagación, fue comparado con el proteoma de células sin infectar, con el fin de identificar la respuesta celular frente al patógeno. Estudios anteriores habían analizado la respuesta a infección de líneas celulares y tejidos de salmón, pero

observando sus transcritos. En base a esto, se seleccionaron genes del hospedero que se expresaron diferencialmente en el contexto de una infección por *P. salmonis*, ellos se agruparon por categorías funcionales, y se buscaron proteínas pertenecientes a estas categorías en nuestros resultados proteómicos. De un total de 1.469 proteínas identificadas en las tres muestras analizadas, 428 proteínas fueron identificadas en dos o más muestras, y sólo 143 de ellas se encontraron en las tres muestras (Figura 32). Por esta razón, no se muestran resultados cuantitativos de aumento o disminución para todas las proteínas identificadas en las muestras de infección, en relación a controles sin infectar.

Del total de proteínas, un 12% (177) fueron clasificadas en alguna de las categorías mencionadas, siendo más representativas las categorías de “Proteínas de respuesta inmune” y “Organización y regulación del citoesqueleto”, como se muestra en la Tabla 12. Estudios anteriores reportaron que genes relacionados con apoptosis y la respuesta inmune adaptativa se encontraban reprimidos en infecciones con *P. salmonis*, mientras que genes de respuesta oxidativa y de inflamación, aumentaban (98, 120). En este trabajo, observamos durante la infección la presencia de proteínas relacionadas con apoptosis y la respuesta humoral. Proteínas de piroptosis y de activación del inflamosoma (como caspasa-1 y una proteína CARD respectivamente) se identificaron en la muestra de vacuolización. En el control además se identificó la proteína ASC, la cual ensambla el complejo del inflamosoma. Cabe mencionar que la caspasa-1 no fue identificada en propagación, sólo en la etapa más temprana de infección. A pesar de lo anterior, sólo fue posible identificar la IL-1 $\beta$  en el control, interleucina que es activada por la caspasa-1. Por otro lado, durante la vacuolización se encontró la proteína PD-L1, la cual es producida por macrófagos activados, o en respuesta IFN- $\gamma$ . En humanos, este ligando se une al receptor PD-1 en linfocitos T, lo que transmite señales inhibitorias que disminuyen la proliferación o la activación de las células T, generando así inmunotolerancia (24, 91). Tanto la ausencia de IL-1 $\beta$  en las muestras de infección, como la ausencia de proteínas de activación del inflamosoma y PD-1 en el estado de propagación, sugieren que la bacteria induce un estado de tolerancia celular a la infección.

A pesar de lo anterior, se identificaron proteínas de activación de la respuesta inmune frente al patógeno. Además de la respuesta humoral, en la propagación se identificó una metaloproteasa (MMP25), la cual degrada la matriz extracelular permitiendo así a las células inmunes migrar al sitio de daño, en respuesta a quimiocinas (11, 119).

Por otro lado, se encontraron diferencias en la expresión de diversas proteínas relacionadas con la estructura y dinámica del citoesqueleto celular. Durante la infección se encontraron aumentadas la actina, la miosina y tropomiosina, mientras se observó una disminución de las cadenas alfa y beta de la tubulina. Esto se condice con observaciones anteriores que reportan una reorganización del citoesqueleto de actina en la infección con *P. salmonis*, que permite la formación de las vacuolas replicativas (96). También se buscaron proteínas relacionadas con el fagosoma, estructura que *P. salmonis* debe evadir para formar vacuolas replicativas, y que se ha reportado que esta bacteria altera en células de salmón (4). Esta alteración es mediada por la proteína GBP1, la cual también fue identificada durante la etapa de vacuolización en este trabajo. Adicionalmente, la proteasa catepsina D, que es requerida para la lisis del patógeno dentro de los fagolisosomas, no pudo ser identificada en las células infectadas en vacuolización, pero si en propagación. Por último, la endocitosis mediada por clatrina ha sido implicada en la internalización de *P. salmonis* en las células (96, 128). Proteínas relacionadas con este proceso se identificaron tanto en células infectadas como en controles. Es posible que, durante estos estados de infección, la bacteria no se esté internalizando y por lo tanto no se vea afectado este proceso celular.

Algunos de los resultados de RT-qPCR se condicen con lo observado en los ensayos de proteómica cuantitativa. En ambos estados de infección se identificó por proteómica la cadena beta-2 del receptor de la IL-12 (proteína C0H8Y1), no así en el control sin infectar. Además, se identificó la interleucina-1 beta (proteína Q6IWH5) sólo en los controles sin infectar (Anexo 2 y 3), lo que se condice con la drástica disminución en la expresión del gen *il1b* a los 6 dpi y 12 dpi con *P. salmonis* (Tabla 15). Por otro lado, se ha reportado un aumento en los transcritos del gen *il8* en riñón anterior de salmón (120), y de los genes *il10* e *il12* en la línea celular de monocitos/macrófagos RTS11, derivada de trucha arcoíris (4). De esta forma, mediante proteómica y RT-qPCR hemos detectado alteraciones en la expresión de interleucinas (aumento en *il8*, *il10* e *il12*, y disminución en *il1b*) en la línea celular SHK-1 infectada con *P. salmonis*, lo que también se ha reportado en líneas celulares derivadas de trucha y en tejidos de salmones infectados con esta bacteria (4, 120). El efecto de estos cambios en la expresión de interleucinas durante la infección por *P. salmonis* es todavía elusivo. Se ha especulado que *P. salmonis* podría modular la respuesta inmune celular mediante la secreción de efectores del sistema Dot/Icm, permitiendo su replicación

intracelular (4, 50), aunque faltan estudios más específicos para comprobar esta hipótesis. Para muchas de las citoquinas de mamíferos, donde han sido descritas sus funciones con mayor profundidad, han sido identificados homólogos en peces teleósteos, incluyendo las citocinas evaluadas en este estudio. Específicamente, la IL-8 es una citocina quimioattractante producida por variedad de tejidos y células sanguíneas. Su principal función es el reclutamiento de leucocitos, particularmente neutrófilos, en respuesta a un proceso inflamatorio, y desencadena la migración y liberación de enzimas de gránulos, entre otras acciones (8). Normalmente, la IL-8 y la IL-1b tienen un patrón de expresión similar, y su aumentan conjuntamente en tiempos tempranos luego de la exposición a patógenos (56, 111). Sin embargo, en respuesta a *P. salmonis* se observó una marcada disminución de IL-1b (Anexo 2 y 3, Tabla 15). Esto sugiere que, a pesar de que las células están generando una respuesta canónica de IL-8 frente a patógenos, existe algún mecanismo propio de *P. salmonis*, o de la respuesta del hospedero frente a esta bacteria, que disminuye la IL-1b.

Por otro lado, la interleucina 12 es producida principalmente por células presentadoras de antígenos, como células B, dendríticas y macrófagos, luego de la detección de patógenos vía receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Cabe destacar que, en presencia de *P. salmonis*, se detectó por proteómica cuantitativa el receptor tipo Toll 5 de membrana y soluble, sólo durante la infección (vacuolización y propagación, Anexos 2 y 3). Este receptor reconoce específicamente la flagelina bacteriana, lo que desencadena una respuesta proinflamatoria en mamíferos (54). Diversos patógenos inducen la producción de IL-12, asociado a un aumento de otras interleucinas, como IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (127, 137). Sin embargo, se ha reportado que patógenos intracelulares como *Legionella pneumophila* regulan negativamente la producción de IL-12 en macrófagos murinos (76). Nuestros resultados indican un aumento de la producción de IL-12 en respuesta a *P. salmonis*, similar a lo observado con otros patógenos extracelulares, pero que es independiente de IFN- $\gamma$ .

Los interferones por su parte son producidos en respuesta a bacterias, virus y otros patógenos intracelulares. Tienen efectos en la producción y acción de otras citocinas, siendo parte integral de la respuesta inmune del hospedero. La producción de interferón, en conjunto con otras señales como citocinas y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), activa y polariza macrófagos, e induce la producción de especies radicales de oxígeno y nitrógenos

(ROS y NOS) y otros efectores que limitan la reproducción del patógeno, la traducción de sus proteínas y finalmente inducen su degradación (32, 52, 134). Los interferones fueron descritos originalmente como citocinas producidas por células infectadas por virus, los que inducen un estado antiviral en las células que limita su propagación. Posteriormente, se encontró que también cumplen un rol importante en la respuesta inmune celular contra bacterias, y que incluso bacterias intracelulares, al igual que los virus, pueden modular la producción de interferón y generar entonces infecciones productivas en el hospedero. Esto ocurre por mecanismos distintos, dependiendo del patógeno. Por ejemplo, el virus respiratorio sincicial impide la producción de los IFN- $\alpha/\beta$  y de IFN- $\gamma$  por vías distintas (110); mientras que la respuesta inmune frente a bacterias intracelulares como *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes* es dependiente de IFN- $\gamma$ , pero no de IFN- $\alpha$  (10, 70, 108). En los ensayos de infección en SHK-1 con *P. salmonis*, observamos una notoria disminución de la expresión de *infy* en ambos tiempos evaluados, al igual que en la etapa tardía de infección en células ASK. Esto sugiere una represión de la producción de interferón por parte de la bacteria, ya que se ha reportado que un aumento de IL-12 (cuyo gen se sobre-expresó marcadamente en ambos cultivos celulares) induce la producción de IFN- $\gamma$  (41), y en células SHK-1 y ASK se observó una disminución de *infy* en presencia de IL-12. En este sentido, también detectamos un aumento en la expresión de *il10*, interleucina de función antiinflamatoria. Por tanto, la disminución de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en células SHK-1, y de IFN- $\gamma$  en células ASK, sumada al aumento de IL-10, sugiere una modulación de la respuesta inmune por parte de la bacteria que permitiría su propagación en estas células.

Entre los cultivos de SHK-1 y ASK, hubo diferencias en la expresión de algunos genes evaluados, tanto en magnitudes como en significancia. Por ejemplo, el aumento en la expresión de *il8* no fue significativo en las células ASK, a diferencia de lo ocurrido en células SHK-1, lo que se repitió con la *il10* a los 12 días, y con la disminución en la expresión de *infy* en el mismo tiempo. Esta interleucina además disminuyó en menor magnitud en las células ASK que en las SHK-1, mientras que en ASK la expresión de *il12* fue mayor en células en las SHK-1. Estas diferencias menores pueden explicarse por las distintas propiedades de las líneas celulares, donde SHK-1 posee características de macrófagos, mientras que las células ASK son epiteliales. Sin embargo, el comportamiento de *infa* fue distinto en los dos tipos celulares, mientras aumentó en células ASK, disminuyó en SHK-1. Esta es una diferencia

mayor en la respuesta de los dos tipos celulares, lo que indica que parte de la respuesta inmune celular frente a *P. salmonis* es compartida, mientras otra es particular al tipo celular.

En el pez cebra, las principales citocinas proinflamatorias producidas por células fagocíticas son TNF $\alpha$ , IL-1a, IL-1b, IL-6 e IL-8 (130). Estudios de infección en peces cebra adultos con patógenos de peces, como *Edwardsiella tarda* (93) y *E. piscicida* (58), describen un aumento en los transcritos de TNF $\alpha$ , IL-10, IL-12 y de INF- $\gamma$  en peces infectados. En este trabajo también se evaluó la expresión de las interleucinas 6, 8 y 12 por RT-qPCR, luego de la infección de CPR de pez cebra adulto con *P. salmonis*. El gen *il6*, los dos alelos de IFN- $\gamma$ , la sintasa de óxido nítrico (*nos2a*) se encontraron sobre-expresados luego de 5 dpi, en relación con los controles sin infectar (Tabla 15). La excepción fue un alelo del IFN- $\gamma$ , el *ifn $\gamma$ 1-2*, el cual aumentó su expresión en ambos días evaluados, aunque no significativamente. Se ha reportado que peces cebra infectados con bacterias intracelulares aumentan la expresión de ambos interferones, lo que no ocurre con otros tipos de bacterias (130). Este aumento de *ifn- $\gamma$*  no ocurrió concomitantemente a un aumento en la expresión *il12*, por lo que, al igual que en las líneas celulares, estos dos genes parecen estar siendo regulados por vías distintas.

Al contrario de lo observado en las líneas celulares, la expresión de los genes, *il-8*, *il-10* e *il-12* en los cultivos primarios no se alteró respecto al control a los 5 días, y sólo *il10* se vio reprimido de forma significativa (al igual que en SHK-1 y ASK). En el pez cebra, un aumento en la IL12 por sobre los niveles de IL10, determina la activación de la respuesta Th1, la cual activa la acción bactericida de macrófagos (130). Al menos en el estado de infección temprana en pez cebra, la expresión de *il10* fue menor a la de *il12*. Esto sumado al aumento en la expresión de la citoquina proinflamatoria IL6 (pero no la IL8), y a *nos2a*, sugieren una respuesta inflamatoria de las células de riñón de pez cebra frente a *P. salmonis*.

Todo lo anterior sugiere que las líneas celulares de salmón tienen elementos comunes en su respuesta a la infección, como son la expresión de *il10* en etapas tempranas, pero presentan una respuesta celular distinta frente a *P. salmonis* que los cultivos derivados de pez cebra, al menos en relación con los niveles de expresión de las interleucinas e interferones evaluados. Sumado a esto, en *P. salmonis* se identificaron cambios en la expresión de genes con probable participación en la virulencia bacteriana, en los tres tipos de cultivos celulares. Varios de ellos, asignados como toxinas o proteínas secretadas,

aumentaron su expresión durante la infección. Y más aún, genes codificados en plásmidos se sobre-expresaron durante la infección en células SHK-1, ASK y CPR de pez cebra, lo que sugiere que pPSLF89-1, pPSLF89-3 y pPSLF89-4 poseen factores de virulencia que cumplen un rol importante durante la infección en distintos hospederos. El resumen de los resultados obtenidos en los cultivos celulares evaluados se muestra en la Figura 41.

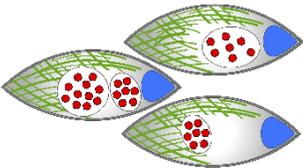
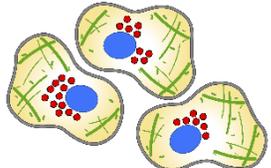
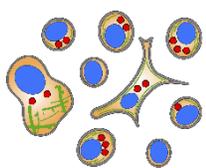
	Cultivo SHK-1	Cultivo ASK	Cultivo primario de riñón de pez cebra
Actina <i>P. salmonis</i> Núcleo			
Tipo celular	Células inmunes con características de macrófagos. Derivadas de riñón anterior de <i>Salmo salar</i> .	Células epiteliales. Derivadas de riñón anterior de <i>Salmo salar</i> .	Células linfoides, mieloides, eritroides, precursoras y estromales. Cultivadas desde riñón de pez cebra adulto.
Viabilidad celular luego de la infección con <i>P. salmonis</i>	-Disminución significativa de viabilidad celular producto de la infección desde los 8 días post-infección (>80%). -Mínimo de viabilidad celular a los 20 dpi, superior a 70% respecto al control.	-Disminución significativa de viabilidad celular producto de la infección desde los 12 días post-infección (<60%). -Mínimo de viabilidad celular a los 20 dpi, 35% de viabilidad respecto al control.	-Disminución significativa de viabilidad celular producto de la infección desde los 4 días post-infección (<40%). -Mínimo de viabilidad celular a los 6 dpi, 30% de viabilidad respecto al control.
Efectos celulares de la infección con <i>P. salmonis</i>	-Desorganización o ruptura de la monocapa celular luego de 12 dpi. -Formación de vacuolas citoplasmáticas con <i>P. salmonis</i> . -Vacuolas de diverso tamaño. -Alteración en el citoesqueleto de actina. -Agrupaciones de bacterias cerca del núcleo y de fibras de actina.	-Desorganización de la monocapa celular luego de 12 dpi. -Formación de pocas y pequeñas vacuolas citoplasmáticas luego de infección tardía, no se determinó si contienen <i>P. salmonis</i> . -Alteración en el citoesqueleto de actina. -Agrupaciones de bacterias cerca del núcleo y de fibras de actina.	-No se observaron vacuolas citoplasmáticas, con o sin <i>P. salmonis</i> . -No se observó alteración en el citoesqueleto de actina. -Agrupaciones de bacterias asociadas a células y fuera de ellas. -Alteración de la población de neutrófilos (disminución en el marcador <i>mpx</i> ).
Respuesta inmune celular a la infección con <i>P. salmonis</i>	Activación de respuesta antimicrobiana: -Aumento de IL-8, induce fagocitosis y migración de neutrófilos. Inmunotolerancia, generación de ambiente anti-inflamatorio por: -Disminución de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ e INF- $\alpha$ . -Aumento de IL-12 e IL-10 (sólo en etapa más tardía de infección).	Activación de respuesta antimicrobiana: -No aumenta IL-10 -Aumenta INF- $\alpha$ Inmunotolerancia, generación de ambiente anti-inflamatorio por: -Disminución de IL-1 $\beta$ e IFN- $\gamma$ -Aumento de IL-12. -No aumenta IL-8.	Ambiente inflamatorio: -Aumento de IFN- $\gamma$ y de citocina proinflamatoria IL-6 en infección tardía. -Aumento de <i>nos2a</i> en infección tardía. -Cantidad relativa de IL-12>IL-10 (activa respuesta Th1 en macrófagos) sólo en infección temprana, luego aumenta IL-10. Inmunotolerancia: -Aumento de IL-10 en infección tardía. -No aumenta IL-8.
Replicación intracelular de <i>P. salmonis</i>	Aumento de 140 veces en la cantidad de bacterias entre la infección temprana y tardía. 3,8 x10 <sup>8</sup> bacterias en infección tardía.	Aumento de 5 veces en la cantidad de bacterias entre la infección temprana y tardía. 9,5 x10 <sup>7</sup> bacterias en infección tardía.	Aumento de 3 veces en la cantidad de bacterias entre la infección temprana y tardía. 4,3 x10 <sup>8</sup> bacterias en infección tardía.
Genes de <i>P. salmonis</i> expresados durante la infección	Factores de Virulencia *Cromosomales: -adherencia y motilidad (disminuye <i>flhC</i> ) -membrana, LPS, pared celular (disminución de <i>lpxK</i> y <i>waaE</i> , aumento de <i>pbp1A</i> en infección temprana). -cápsula (disminución de <i>wzb</i> ) -sistemas de secreción ( <i>Dot/Icm</i> , probablemente estructura de flagelo). -Toxinas y efectores ( <i>ospD3</i> ). *Plasmidiales: -metabolismo de hierro ( <i>hemL</i> ) -toxinas y efectores ( <i>ymt</i> , <i>flcD</i> , <i>pipB2</i> (3 genes), <i>PSLF89_1p194</i> , <i>pepO</i> ). Otros genes o proteínas plasmidiales: -Fagos, transposasas, integrasas, sistemas Toxina-Antitoxina.	Factores de Virulencia *Cromosomales: -adherencia y motilidad (disminuye <i>flhC</i> ) -metabolismo de hierro ( <i>fhuF</i> ) -membrana, LPS, pared celular (disminución de <i>pbp1A</i> ). -sistemas de secreción ( <i>Dot/Icm</i> ). -Toxinas y efectores ( <i>ospD3</i> ). *Plasmidiales: -metabolismo de metales ( <i>hemL</i> , <i>moesB</i> ) -toxinas y efectores ( <i>ymt</i> , <i>pipB2</i> (3 genes), <i>PSLF89_1p194</i> , <i>pepO</i> ). Otros genes plasmidiales: -sistemas Toxina-Antitoxina.	Factores de Virulencia *Cromosomales: -membrana, LPS, pared celular ( <i>pbp1A</i> ). -sistemas de secreción ( <i>Dot/Icm</i> ). -Toxinas y efectores ( <i>ospD3</i> ). *Plasmidiales: -metabolismo de metales ( <i>hemL</i> , <i>moesB</i> ) -toxinas y efectores ( <i>ymt</i> , <i>pipB2</i> (3 genes), <i>PSLF89_1p194</i> , <i>pepO</i> ). Otros genes plasmidiales: -sistemas Toxina-Antitoxina.

Figura 41. Resumen comparativo de los efectos de la infección generada por *P. salmonis* en tres cultivos celulares. Esquema comparativo realizado en base a los resultados de viabilidad celular, inmunofluorescencia, y RT-qPCR, en las líneas celulares SHK-1 y ASK, y cultivos primarios derivados de riñón de peces cebra adultos.

## 5. Conclusiones

1. *P. salmonis* LF-89 posee cuatro plásmidos en su genoma, los cuales codifican genes con probable función de replicación, mantención y partición de estos, además de un sistema de conjugación plasmidial y profagos.
2. Tres de los cuatro plásmidos identificados codifican posibles factores de virulencia.
3. Los plásmidos identificados son purificables e identificables mediante sondas específicas para cada plásmido.
4. La presencia de plásmidos es una característica común en la especie *P. salmonis*. Los plásmidos de la cepa LF-89 son ubicuos, y se identificaron por homología de secuencias en 18 otras cepas secuenciadas de *P. salmonis*.
5. Existe mayor similitud entre los genomas y los plásmidos de cepas de un mismo genogrupo de *P. salmonis* que entre cepas de distintos genogrupos, lo que sugiere una separación de nichos, o disminución del intercambio génico entre cepas de genogrupos distintos.
6. Los posibles factores de virulencia plasmidiales de la cepa LF-89 fueron identificados por homología de secuencias en otras cepas de *P. salmonis*, pero no todas las cepas contenían la misma cantidad de ellos. Los FdeV de los plásmidos pPSLF89-1 fueron más comunes entre las cepas, mientras los FdeV de los pPSLF89-3 y pPSLF89-4 sólo se identificaron en cepas del genogrupo B.
7. *P. salmonis* es capaz de infectar distintos tipos celulares: cultivos derivados de riñón anterior de salmón con propiedades de macrófagos y epiteliales, y cultivos primarios de riñón de pez cebra. La bacteria disminuye la viabilidad celular de estos cultivos, permanece durante el transcurso de la infección y se replica en ellos.

8. *P. salmonis* genera efectos patofisiológicos en larvas de pez cebra al ser inyectada en la circulación del pez. La bacteria permanece en el pez hasta al menos 7dpi, donde produce inflamación y reclutamiento de neutrófilos.
9. En el pez cebra, *P. salmonis* afecta la cantidad y distribución de la población de neutrófilos, tanto en larvas como en CPR de peces adultos.
10. En respuesta a la infección por *P. salmonis*, las células SHK-1 alteran la expresión de proteínas relacionadas con citocinas y receptores de citocinas, apoptosis y modificación del citoesqueleto celular.
11. Durante la infección en cultivos SHK-1, se identificaron proteínas de *P. salmonis* relacionadas con las categorías de sistemas de dos componentes, transducción de señales, motilidad celular, estructuras extracelulares, moviloma, fagos y transposones.
12. *P. salmonis* causa alteraciones y reordenamientos del citoesqueleto celular, como se observó por inmunofluorescencia en células SHK-1 y ASK, y por alteraciones en proteínas relacionadas con la estructura y dinámica del citoesqueleto celular. Además, esto se complementa con aumentos en la expresión de genes como *pipB2* y *ficD*, que en otras bacterias patógenas modifican el citoesqueleto celular.
13. No se observaron diferencias en proteínas relacionadas con endocitosis mediada por clatrina en células SHK-1, ni aumentaron genes de invasión celular en *P. salmonis*, por lo que las etapas denominadas vacuolización y propagación pueden corresponder a pasos posteriores en el ciclo infectivo de la bacteria
14. Genes o proteínas predichos como factores de virulencia (específicamente toxinas, proteínas secretadas y parte del sistema de secreción Dot/Icm) fueron identificados durante la infección en células SHK-1.

15. En las líneas celulares SHK-1 y ASK, *P. salmonis* induce la expresión de interleucinas proinflamatorias como IL-8 e IL-12, pero también de una interleucina antiinflamatoria (IL-10) y suprime a *il1b* e *ifn $\gamma$* . La disminución del *ifn $\alpha$*  fue una respuesta exclusiva de las células SHK-1.
16. En cultivo primario de riñón de pez cebra, *P. salmonis* aumenta la expresión de la citocina proinflamatoria *il6*, y disminuye la de *il10* en la etapa temprana de infección, similar a lo observado en las líneas celulares. Sin embargo, y contrario a lo observado en las líneas celulares, no aumenta la *il10* en la etapa tardía de infección, no altera la de *il12*, y aumenta la expresión de *ifn $\gamma$* . De esta forma, *P. salmonis* genera respuestas celulares diferentes en los cultivos derivados de salmón y de pez cebra.
17. *P. salmonis* expresa genes predichos como factores de virulencia durante la infección en los tres cultivos celulares evaluados (SHK-1, ASK y riñón de pez cebra). Esto sugiere que la bacteria utiliza mecanismos similares para la infección de estos hospederos, sin embargo, ellos responden de forma distinta a la infección por esta bacteria.
18. En los tres cultivos celulares *P. salmonis* expresa genes plasmidiales, lo que indica que los plásmidos cumplen un rol en la infección bacteriana.

## 6. Bibliografía

1. Agarwal V, Kuchipudi A, Fulde M, Riesbeck K, Bergmann S, Blom AM. 2013. *Streptococcus pneumoniae* Endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen-and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells. *J. Biol. Chem.* 288(10):6849–63
2. Almendras FE, Fuentealba IC. 1997. Salmonid rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis* : a review. *Dis. Aquat. Organ.* 29:137–44
3. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3):403–10
4. Alvarez CA, Gomez FA, Mercado L, Ramirez R, Marshall SH. 2016. *Piscirickettsia salmonis* imbalances the innate immune response to succeed in a productive infection in a salmonid cell line model. *PLoS One.* 11(10):1–14
5. Anderson DG, Mckay LL. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic *Streptococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(3):549–52
6. Andreasen C, Ostoji J, Tell R, Roth J. 2007. Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *J. Immunol. Methods.* 319:87–97
7. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart D. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 44(May):1–6
8. Baggiolini M, Clark-Lewis I. 1992. Interleukin 8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 307(1):97–101
9. Balado M, Benzekri H, Labella AM, Claros MG, Machado M, Borrego J, Osorio C, Lemos M. 2017. Genomic analysis of the marine fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Insertion sequences proliferation is associated with chromosomal reorganisations and rampant gene decay. *Infect. Genet. Evol.* 54:221–29
10. Baldrige MT, King KY, Boles NC, Weksberg DC, Goodell MA. 2010. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN- $\gamma$  in response to chronic infection. *Nature.* 465(7299):793–97
11. Benard EL, Rougeot J, Racz PI, Spaink HP, Meijer AH. 2016. Transcriptomic approaches in the zebrafish model for tuberculosis-Insights into host and pathogen-specific determinants of the innate immune response, Vol. 95. Elsevier Ltd. 217-251 pp.
12. Benard EL, van der Sar AM, Ellett F, Lieschke GJ, Spaink HP, Meijer AH. 2012. Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. *J. Vis. Exp.*, p. e3781
13. Bennett CM, Kanki JP, Rhodes J, Liu TX, Paw BH, Kieran MW, David M, Delahaye-Brown A, Zon LI, Fleming MD, Look AT. 2001. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood.* 98(3):643–51
14. Betancur-R R, Wiley EO, Arratia G, Acero A, Bailly N, Miya M, Lecointre G, Ortí G. 2017. Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC Evol. Biol.* 17(1):162
15. Birkbeck TH, Griffen AA, Reid HI, Laidler LA, Wadsworth S. 2004. Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells. *Infect. Immun.* 72(6):3693–94
16. Blanco FC, Soria M, Gravisaco MJ, Bianco MV, Meikle V, Garbaccio S, Vagnoni L, Cataldi A, Bigi F. 2012. Assessment of the immune responses induced in cattle after inoculation of a *Mycobacterium bovis* strain deleted in two *mce2* genes. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:Article ID 258353
17. Bohle H, Henríquez P, Grothusen H, Navas E, Sandoval A, Bustamante F, Bustos P. 2014. Comparative genome analysis of two isolates of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis* from different hosts reveals major differences in virulence-associated secretion systems. *Genome Announc.* 2(6):e01219-14
18. Bouet J, Nordström K, Lane D. 2007. Plasmid partition and incompatibility-the focus shifts. *Mol. Microbiol.* 65(August):1405–14
19. Bravo S, Campos M. 1989. Coho salmon syndrome in Chile. *Am. Fish. Soc. Newsl.* 17:3
20. Brudal E, Ulanova L, Lampe E, Rishovd A, Griffiths G, Winther-Larsen H. 2014. Establishment of three *Francisella* infections in zebrafish embryos at different temperatures. *Infect. Immun.* 82(6):2180–94
21. Canova MJ, Molle V. 2014. Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. *J. Biol. Chem.* 289(14):9473–79
22. Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M, Parkhill J. 2009. DNAPlotter : circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics.* 25(1):119–20
23. Chandran V. 2013. Type IV secretion machinery: molecular architecture and function. *Biochem. Soc. Trans.* 41(1):17–28
24. Chemnitz JM, Parry R V., Nichols KE, June CH, Riley JL. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol.* 173(2):945–54

25. Chen MF, Yun S, Marty GD, McDowell TS, House ML, Appersen JA, Guenther TA, Arkush KD, Hedrick RP. 2000. A *Piscirickettsia salmonis*-like bacterium associated with mortality of white seabass *Atractoscion nobilis*. *Dis. Aquat. Organ.* 43(2):117–26
26. Chin C-S, Alexander DH, Marks P, Klammer A a, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler E, Turner S, Korlach J. 2013. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat. Methods.* 10:563–69
27. Clatworthy AE, Lee JSW, Leibman M, Kostun Z, Davidson AJ, Hung DT. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. *Infect. Immun.* 77:1293–1303
28. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. 2004. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect. Immun.* 72:3204–17
29. Contreras-Lynch S, Olmos P, Vargas A, Figueroa J, González-Stegmaier R, Enríquez R, Romero A. 2015. Identification and genetic characterization of *Piscirickettsia salmonis* in native fish from southern Chile. *Dis. Aquat. Organ.* 115(3):233–44
30. Coray D, Wheeler N, Heinemann J, Gardner P. 2017. Why so narrow: distribution of anti-sense regulated, type I toxin-antitoxin systems compared with type II and type III systems. *RNA Biol.* 14(3):275–80
31. Cvitanich J, Garate N, Smith C, Garate O, Smith C. 1991. The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J. Fish Dis.* 14:121–45
32. Czarniecki CW, Sonnenfeld G. 1993. Interferon-gamma and resistance to bacterial infections. *Apmis.* 101(1):1–17
33. Czekanska EM. 2011. Assesment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 740:127–40
34. Darmon E, Leach DRF. 2014. Bacterial genome instability. . 78(1):1–39
35. Diagnostics GmbH R. 2008. DIG Application manual for filter hybridization. Ed D Eisel, O Seth, S Grunewald-Janho, B Kruchen, B Ruger, pp. 1–204. Mannheim
36. Douard G, Praud K, Cloeckaert A, Doublet B. 2010. The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized in trans by the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *PLoS One.* 5(12):
37. Eberhard WG. 1990. Evolution in bacterial plasmids and levels of selection. *Q. Rev. Biol.* 65(1):3–22
38. Ellett F, Pase L, Hayman JW, Andrianopoulos A, Lieschke GJ. 2011. *mpeg-1* promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood.* 117(4):49–56
39. Elliott T, Avissar YJ, Rhie GE, Beale SI. 1990. Cloning and sequence of the *Salmonella typhimurium hemL* gene and identification of the missing enzyme in *hemL* mutants as glutamate-1-semialdehyde aminotransferase. *J. Bacteriol.* 172(12):7071–84
40. Erin J van Schaik, Chen Chen, Katja Mertens, Mary M Weber JES. 2014. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetti*. *Nat. Rev. Microbiol.* 11(8):561–73
41. Ethuin F, Gérard B, Benna JE, Boutten A, Gougereot-Pocidallo MA, Jacob L, Chollet-Martin S. 2004. Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Lab. Invest.* 84(10):1363–71
42. Farfán MJ, Toro CS, Barry EM, Nataro JP. 2011. *Shigella enterotoxin-2* is a type III effector that participates in *Shigella*-induced interleukin 8 secretion by epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 61(3):332–39
43. Freeman VJ. 1951. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* 61:675–88
44. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(9):722–32
45. Fryer JL, Lannan CN, Garces LH, Larenas JJ, Smith PA. 1990. Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol.* 25(2):107–14
46. Fryer JL, Lannan CN, Giovannoni SJ, Wood ND. 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42(1):120–26
47. Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin E V. 2015. Expanded Microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res.* 43(D1):D261–69
48. Gerlach RG, Hensel M. 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 297(6):401–15
49. Golais F, Holly J, Vítkovská J. 2013. Coevolution of bacteria and their viruses. , pp. 177–86
50. Gómez F, Tobar J, Henríquez V, Sola M, Altamirano C, Marshall SH. 2013. Evidence of the presence of a functional Dot/Icm type IV-B secretion system in the fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *PLoS One.* 8(1):e54934
51. Gotz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J,

- Conesa A. 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* 36(10):3420–35
52. Grayfer L, Hodgkinson JW, Belosevic M. 2013. Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 43(2):223–42
  53. Halary S, Leigh JW, Cheaib B, Lopez P, Baptiste E. 2010. Network analyses structure genetic diversity in independent genetic worlds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(1):127–32
  54. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 410(6832):1099–103.
  55. Henríquez M, González E, Marshall SH, Henríquez V, Gómez F, Altamirano C. 2013. A novel liquid medium for the efficient growth of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* and optimization of culture conditions. *PLoS One.* 8(9):e71830
  56. Herath HMLPB, Elvitigala DAS, Godahewa GI, Umasuthan N, Whang I, Noh J, Lee J. 2016. Molecular characterization and comparative expression analysis of two teleostean pro-inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and IL-8, from *Sebastes schlegeli*. *Gene.* 575(2):732–42
  57. Hinnebusch BJ. 2002. Role of yersinia murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science (80-. ).* 296(5568):733–35
  58. Hou M, Chen R, Yang D, Núñez G, Wang Z, Wang Q. 2016. Identification and functional characterization of EseH, a new effector of the type III secretion system of *Edwardsiella piscicida*. *Cell. Microbiol.* 19(July 2016):e12638
  59. Hou Y, Sheng Z, Mao X, Li C, Chen J, Zhang J, Huang H, Ruan H, Luo L, Li L. 2016. Systemic inoculation of *Escherichia coli* causes emergency myelopoiesis in zebrafish larval caudal hematopoietic tissue. *Sci. Rep.* 6(February):1–14
  60. Isla A, Hausmann D, Vera T, Kausel G, Figueroa J. 2014. Identification of the *clpB* and *bipA* genes and an evaluation of their expression as related to intracellular survival for the bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Vet. Microbiol.* 173(3–4):390–94
  61. Jackson RW, Vinatzer B, Arnold DL, Dorus S, Murillo J. 2011. The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mob. Genet. Elements.* 1(1):55–65
  62. Jameson KH, Wilkinson AJ. 2017. Control of Initiation of DNA replication in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Genes (Basel).* 8(1):22
  63. Johnson CM, Grossman AD. 2015. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What they do and how they work. *Annu Rev Genet.* 49:577–601
  64. Knodler LA, Steele-Mortimer O. 2005. The *Salmonella* effector PipB2 affects late endosome/lysosome distribution to mediate sif extension. *Mol. Biol. Cell.* 16:4108–23
  65. Knodler LA, Vallance BA, Hensel M, Jäckel D, Finlay BB, Steele-Mortimer O. 2003. *Salmonella* type III effectors PipB and PipB2 are targeted to detergent-resistant microdomains on internal host cell membranes. *Mol. Microbiol.* 49(3):685–704
  66. Lam S., Chua H., Gong Z, Lam T., Sin Y. 2004. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* 28(1):9–28
  67. Lannan CN, Fryer JL. 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. *J. Fish Dis.* 17(5):545–548
  68. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 25:1754–60
  69. Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE, Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC. 2001. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood.* 98(10):3087–96
  70. Ma F, Xu S, Liu X, Zhang Q, Xu X, Liu M, Hua M, Li N, Yao H, Cao X. 2011. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- $\gamma$ . *Nat. Immunol.* 12(9):861–69
  71. Machuca A, Martinez V. 2016. Transcriptome analysis of the intracellular facultative pathogen *Piscirickettsia salmonis*: Expression of putative groups of genes associated with virulence and iron metabolism. *PLoS One.* 11(12):1–17
  72. Makrinos DL, Bowden TJ. 2017. Growth characteristics of the intracellular pathogen, *Piscirickettsia salmonis*, in tissue culture and cell-free media. *J. Fish Dis.* 40(8):1115–27
  73. Mandakovic D, Glasner B, Maldonado J, Aravena P, Gonzalez M, Cambiazio V, Pular R. 2016. Genomic-based restriction enzyme selection for specific detection of *Piscirickettsia salmonis* by 16S rDNA PCR-RFLP. *Front. Microbiol.* 7:643
  74. Manz MG, Boettcher S. 2014. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* 14(5):302–14

75. Marcos-López M, Ruane NM, Scholz F, Bolton-Warberg M, Mitchell SO, Murphy O'Sullivan S, Irwin Moore A, Rodger HD. 2017. *Piscirickettsia salmonis* infection in cultured lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *J. Fish Dis.* 40(11):1625–34
76. Matsunaga K, Klein TW, Newton C, Friedman H, Yamamoto Y. 2001. *Legionella pneumophila* suppresses interleukin-12 production by macrophages. *Infect. Immun.* 69(3):1929–33
77. Mauel MJ, Giovannoni SJ, Fryer JL. 1999. Phylogenetic analysis of *Piscirickettsia salmonis* by 16S, internal transcribed spacer (ITS) and 23S ribosomal DNA sequencing. *Dis. Aquat. Organ.* 35(2):115–23
78. Mauel MJ, Miller DL, Frazier K, Liggett AD, Styer L, Montgomery-Brock D, Brock J. 2003. Characterization of a piscirickettsiosis-like disease in Hawaiian tilapia. *Dis. Aquat. Organ.* 53(3):249–55
79. McCarthy ÚM, Bron JE, Brown L, Pourahmad F, Bricknell IR, Thompson KD, Adams A, Ellis AE. 2008. Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 25(5):477–84
80. Meijer AH, Spaik HP. 2011. Host-Pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. *Curr. Drug Targets.* 12:1000–1017
81. Mikalsen J, Skjaervik O, Wiik-Nielsen J, Wasmuth M a, Colquhoun DJ. 2007. Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. *FEMS Microbiol. Lett.* 278(1):43–47
82. Myers EW, Sutton GG, Delcher AL, Dew IM, Fasulo DP, Flanigan MJ, Kravitz SA, Mobarry CM, Reinert KH, Remington KA, Anson EL, Bolanos RA, Chou HH, Jordan CM, Halpern AL, Lonardi S, Beasley EM, Brandon RC, Chen L, Dunn PJ, Lai Z, Liang Y, Nusskern DR, Zhan M, Zhang Q, Zheng X, Rubin GM, Adams MD, Venter JC. 2000. A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science.* 287:2196–2204
83. Naka H, López CS, Crosa JH. 2010. Role of the pJM1 plasmid-encoded transport proteins FatB, C and D in ferric anguibactin uptake in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Environ. Microbiol. Rep.* 2(1):104–11
84. Newton HJ, Ang DKY, Van Driel IR, Hartland EL. 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin. Microbiol. Rev.* 23(2):274–98
85. Nguyen-Chi M, Phan QT, Gonzalez C, Dubremetz J-F, Levraud J-P, Lutfalla G. 2014. Transient infection of the zebrafish notochord with *E. coli* induces chronic inflammation. *Dis. Model. Mech.* 7(7):871–82
86. O'Toole R, Von Hofsten J, Rosqvist R, Olsson PE, Wolf-Watz H. 2004. Visualisation of Zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microb. Pathog.* 37:41–46
87. Otsuka Y. 2016. Prokaryotic toxin – antitoxin systems : novel regulations of the toxins. *Curr. Genet.* 62(2):379–82
88. Otterlei A, Brevik ØJ, Jensen D, Duesund H, Sommerset I, Frost P, Mendoza J, McKenzie P, Nylund A, Apablaza P. 2016. Phenotypic and genetic characterization of *Piscirickettsia salmonis* from Chilean and Canadian salmonids. *BMC Vet. Res.* 12(1):1–11
89. Pagé B, Pagé M, Noel C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxic measurements in vitro. *Int. J. Oncol.* 3(3):473–76
90. Pappenheimer AM, Gill DM. 1973. Diphtheria: Recent studies have clarified the molecular mechanisms involved in its pathogenesis. *Science (80- ).* 128(4110):353–58
91. Park J, Omiya R, Matsumura Y, Sakoda Y, Kuramasu A, Augustine M, Yao S, Tsushima F, Narazaki H, Anand S, Liu Y, Strome E, Chen L, Tamada K. 2010. B7-H1 / CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood.* 116(8):1291–98
92. Pinto UM, Pappas KM, Winans SC. 2012. The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(11):755–65
93. Pressley ME, Phelan PE, Eckhard Witten P, Mellon MT, Kim CH. 2005. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* 29(6):501–13
94. Pulgar R, Hödar C, Travisany D, Zuñiga A, Domínguez C, Maass A, González M, Cambiazo V. 2015. Transcriptional response of Atlantic salmon families to *Piscirickettsia salmonis* infection highlights the relevance of the iron-deprivation defence system. *BMC Genomics.* 16(1):495
95. Pulgar R, Travisany D, Zuñiga A, Maass A, Cambiazo V. 2015. Complete genome sequence of *Piscirickettsia salmonis* LF-89 (ATCC VR-1361) a major pathogen of farmed salmonid fish. *J. Biotechnol.* 212:30–31
96. Ramírez R, Gómez F, Marshall S. 2015. The infection process of *Piscirickettsia salmonis* in fish macrophages is dependent upon interaction with host-cell clathrin and actin. *FEMS Microbiol. Lett.* 362(1):
97. Renshaw S, Loynes C, Trushell DM, Elworthy S, Ingham PW, Whyte MK. 2006. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood.* 108(13):3976–78
98. Rise MLM, Jones SSRM, Brown GD, von Schalburg KR, Davidson WS, Koop BF. 2004. Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney

- response to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Physiol. Genomics*. 20(1):21–35
99. Rojas V, Galanti N, Bols NC, Jiménez V, Paredes R, Marshall SH. 2010. *Piscirickettsia salmonis* induces apoptosis in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout. *J. Cell. Biochem*. 110(2):468–76
  100. Rojas V, Galanti N, Bols NC, Marshall SH. 2009. Productive infection of *Piscirickettsia salmonis* in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout, a possible survival strategy. *J. Cell. Biochem*. 108(3):631–37
  101. Rolland JB, Bouchard D, Coll J, Winton JR. 2005. Combined use of the ASK and SHK-1 cell lines to enhance the detection of infectious salmon anemia virus. *J. Vet. Diagn. Invest*. 17(2):151–57
  102. Roy CR, Cherfils J. 2015. Structure and function of Fic proteins. *Nat. Rev. Microbiol*. 13(10):631–40
  103. Rozas M, Enr R. 2014. Review Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish : a review. *J. Fish Dis*. 37(3):163–88
  104. Rozas M, Enríquez R. 2013. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *J. Fish Dis.*, pp. 1–26
  105. Saavedra J, Hernandez N, Osses A, Castillo A, Cancino A, Grothusen H, Navas E, Henriquez P, Bohle H, Bustamante F, Bustos P, Mancilla M. 2017. Prevalence, geographic distribution and phenotypic differences of *Piscirickettsia salmonis* EM-90-like isolates. *J. Fish Dis*. 40(8):1055–63
  106. Salazar C, Haussmann D, Kausel G, Figueroa J. 2015. Molecular cloning of *Salmo salar* Toll-like receptors (TLR1, TLR2, TLR5M and TLR5S) and expression analysis in SHK-1 cells during *Piscirickettsia salmonis* infection. *J. Fish Dis*. 39(2):239–48
  107. Sar AM Van Der, Spaink HP, Zakrzewska A, Bitter W, Meijer AH. 2009. Specificity of the zebrafish host transcriptome response to acute and chronic mycobacterial infection and the role of innate and adaptive immune components. *Mol. Immunol*. 46:2317–32
  108. Schoenborn JR, Wilson CB. 2007. Regulation of Interferon- $\gamma$  During Innate and Adaptive Immune Responses. *Adv. Immunol*. 96(07):41–101
  109. Schreer A, Tinson C, Sherry JP, Schirmer K. 2005. Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxyethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Anal. Biochem*. 344(1):76–85
  110. Senft AP, Taylor RH, Lei W, Campbell SA, Tipper JL, Martinez MJ, Witt TL, Clay CC, Harrod KS. 2010. Respiratory syncytial virus impairs macrophage IFN- $\alpha/\beta$ - and IFN- $\gamma$ -stimulated transcription by distinct mechanisms. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 42(4):404–14
  111. Seppola M, Larsen AN, Steiro K, Robertsen B, Jensen I. 2008. Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Mol. Immunol*. 45(4):887–97
  112. Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. 2006. Persisters: A distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol*. 6:1–9
  113. Shao Y, Harrison EM, Bi D, Tai C, He X, Ou H, Rajakumar K, Deng Z. 2011. TADB: A web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res*. 39(SUPPL. 1):606–11
  114. Smith P a, Rojas ME, Guajardo a, Contreras J, Morales M a, Larenas J. 2004. Experimental infection of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Organ*. 61(1–2):53–57
  115. Smith PA, Díaz FE, Rojas ME, Díaz S, Galleguillos M, Carbonero A. 2015. Effect of *Piscirickettsia salmonis* inoculation on the ASK continuous cell line. *J. Fish Dis*. 38(3):321–24
  116. Sobecky PA. 2002. Approaches to investigating the ecology of plasmids in marine bacterial communities. *Plasmid*. 48(3):213–21
  117. Stachura DL, Reyes JR, Bartunek P, Paw BH, Zon LI, Traver D. 2009. Zebrafish kidney stromal cell lines support multilineage hematopoiesis. *Blood*. 114(2):279–89
  118. Stachura DL, Traver D. 2011. Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis. Vol. 101. Elsevier Ltd. 75–110 pp. Third Edit ed.
  119. Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 17(1):463–516
  120. Tacchi L, Bron JE, Taggart JB, Secombes CJ, Bickerdike R, Adler MA, Takle H, Martin SAM. 2011. Multiple tissue transcriptomic responses to *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Physiol Genomics*. 43(21):1241–54
  121. Tandberg JI, Lagos LX, Langleite P, Berger E, Rishovd AL, Roos N, Varkey D, Paulsen IT, Winther-Larsen, HC. 2016. Comparative analysis of membrane vesicles from three *Piscirickettsia salmonis* isolates reveals differences in vesicle characteristics. *PLoS One*. 11(10):1–27
  122. Tatusov RL. 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res*. 28(1):33–36
  123. Tatusov RL. 2001. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from

- complete genomes. *Nucleic Acids Res.* 29(1):22–28
124. Terceti MS, Ogut H, Osorio R. 2016. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging fish pathogen in the black sea : evidence of a multiclonal origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(13):3736–45
  125. Thomas CM, Nielsen KM. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(9):711–21
  126. Traver D, Paw BH, Poss KD, Penberthy WT, Lin S, Zon LI. 2003. Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nat. Immunol.* 4(12):1238–46
  127. Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3(2):133–46
  128. Valenzuela-Miranda D, Gallardo-Escárate C. 2016. Novel insights into the response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to *Piscirickettsia salmonis*: Interplay of coding genes and lncRNAs during bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* 59:427–38
  129. van der Sar AM, Musters RJP, van Eeden FJM, Appelmek BJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Bitter W. 2003. Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella typhimurium* infections. *Cell. Microbiol.* 5(9):601–11
  130. van der Vaart M, Spaink HP, Meijer AH. 2012. Pathogen recognition and activation of the innate immune response in zebrafish. *Adv. Hematol.* 2012:159807
  131. van Leeuwen LM, van der Kuip M, Youssef SA, de Bruin A, Bitter W, van Furth AM, van der Sar AM. 2014. Modeling tuberculous meningitis in zebrafish using *Mycobacterium marinum*. *Dis. Model. Mech.* 7(9):1111–22
  132. Van Melder L, De Bast MS. 2009. Bacterial toxin-Antitoxin systems: More than selfish entities? *PLoS Genet.* 5(3):
  133. van Soest JJ, Stockhammer OW, Ordas A, Bloemberg G V, Spaink HP, Meijer AH. 2011. Comparison of static immersion and intravenous injection systems for exposure of zebrafish embryos to the natural pathogen *Edwardsiella tarda*. *BMC Immunology* (12):58
  134. Vandevienne P, Sadzot-Delvaux C, Piette J. 2010. Innate immune response and viral interference strategies developed by Human Herpesviruses. *Biochem. Pharmacol.* 80(12):1955–72
  135. Villarreal LP. 2009. Origin of group identity: viruses, addiction and cooperation. Springer US
  136. Voth DE, Heinzen RA. 2007. Lounging in a lysosome: The intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*
  137. Wang T, Husain M. 2014. The expanding repertoire of the IL-12 cytokine family in teleost fish: Identification of three paralogues each of the p35 and p40 genes in salmonids, and comparative analysis of their expression and modulation in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dev. Comp. Immunol.* 46(2):194–207
  138. Wang Y, Zhuang X, Zhong Y, Zhang C, Zhang Y, Zeng L. 2015. Distribution of plasmids in distinct *Leptospira* pathogenic species. , pp. 1–14
  139. Weinbauer MG. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(2):127–81
  140. Wen Z, Wang P, Sun C, Guo Y, Wang X. 2017. Interaction of type IV toxin/antitoxin systems in cryptic prophages of *Escherichia coli* K-12. *Toxins (Basel).* 9(3):1–14
  141. Willett CE, Cortes A, Zuasti A, Zapata AG. 1999. Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Dev. Dyn.* 214(4):323–36
  142. Wommack KE, Colwell RR. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(1):69–114
  143. Yañez AJ, Molina C, Haro RE, Sanchez P, Isla A, Mendoza J, Rojas-Herrera M, Trombert A, Silva AX, Cárcamo JG, Figueroa J, Polanco V, Manque P, Maracaja-Coutinho V, Olavarría H. 2014. Draft genome sequence of virulent strain AUSTRAL-005 of *Piscirickettsia salmonis*, the etiological agent of Piscirickettsiosis. *Genome Announc.* 2(5):e00990-14
  144. Yañez AJ, Valenzuela K, Silva H, Retamales J, Romero A, Enriquez R, Figueroa J, Claude A, Gonzalez J, Carcamo JG. 2012. Broth medium for the successful culture of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Organ.* 97(3):197–205
  145. Young GM, Schmiel DH, Miller VL. 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(11):6456–61
  146. Yuksel SA, Thompson KD, Ellis AE, Adams A. 2001. Purification of *Piscirickettsia salmonis* and associated phage particles. *Dis. Aquat. Organ.* 44(3):231–35
  147. Zapata AG, Torroba M, Vicente A, Varas A, Sacedon R, Jimenez E. 1995. The relevance of cell microenvironments for the appearance of lympho-haemopoietic tissues in primitive vertebrates
  148. Zhou Y, Liang Y, Lynch K, Dennis J, Wishart S. 2011. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 39:347–52

## 7. Anexos

Anexo 1. Secuencias codificantes identificadas como factores de virulencia o sistemas toxina-antitoxina (TA) en los plásmidos de *P. salmonis* LF-89. Mediante las bases de datos de *VFDB* y *TA finder*, se identificaron genes como posibles factores de virulencia bacterianos, o como pertenecientes a sistemas TA de tipo II, respectivamente. Se muestra la categoría del gen (factor de virulencia o sistema TA), el identificador (locus tag), a qué plásmido pertenece y su ubicación (dentro de la secuencia del plásmido o de una región predicha como profago, numeradas consecutivamente).

Categoría	Locus tag	Plásmido	Ubicación	Descripción
Factor de virulencia	PSLF89_08355	pPSLF89-1	fago, región 3	Proteína con dominio TIR
	PSLF89_08580	pPSLF89-1	plásmido	Permeasa de transportador ABC de multidrogas
	PSLF89_1p100	pPSLF89-1	fago, región 3	Proteína hipotética de cobertura de esporas
	PSLF89_1p143	pPSLF89-1	fago, región 4	Transportador de hierro
	PSLF89_1p169	pPSLF89-1	fago, región 4	ymt - toxina murina
	PSLF89_1p174	pPSLF89-1	fago, región 4	Proteína Fic de filamentación celular inducida por cAMP
	PSLF89_1p224	pPSLF89-1	fago, región 5	Proteína hipotética, PipB2
	PSLF89_1p227	pPSLF89-1	fago, región 5	pipB2, proteína con repetidos de pentapéptido
	PSLF89_1p229	pPSLF89-1	fago, región 5	Proteína HicB de ensamble de pili, toxina de sistema TA
	PSLF89_3p32	pPSLF89-3	plásmido	Proteína con dominio TPR
	PSLF89_3p41	pPSLF89-3	plásmido	Proteína de familia ras
	PSLF89_3p51	pPSLF89-3	plásmido	pipB2, proteína con repetidos de pentapéptido
	PSLF89_09095	pPSLF89-4	plásmido	Proteína con dominio phd
	PSLF89_09235	pPSLF89-4	plásmido	hemL, glutamato-1-semialdehído aminotransferasa
Sistema TA	PSLF89_1p27	pPSLF89-1	fago, región 1	Proteína Fic de filamentación celular, toxina de sistema TA_1.1
Sistema TA	PSLF89_1p28	pPSLF89-1	fago, región 1	resolvasa, antitoxina de sistema TA_1.1
Sistema TA	PSLF89_1p40	pPSLF89-1	fago, región 1 y 2	Proteína con dominio nucleotidiltransferasa, toxina de sistema TA_1.2
Sistema TA	PSLF89_08140	pPSLF89-1	fago, región 1 y 2	Proteína hipotética de la familia HI0074, antitoxina de sistema TA_1.2
Sistema TA	PSLF89_08265	pPSLF89-1	plásmido	RelE, toxina del sistema TA_1.3
Sistema TA	PSLF89_1p80	pPSLF89-1	plásmido	Antitoxina del sistema TA_1.3
Sistema TA	PSLF89_1p101	pPSLF89-1	fago, región 3	Proteína de motilidad tipo <i>twitching</i> PilT, toxina de sistema TA_1.4
Sistema TA	PSLF89_1p102	pPSLF89-1	fago, región 3	Proteína de familia MazE de reconocimiento de toxinas, antitoxina del sistema TA_1.4
Sistema TA	PSLF89_1p115	pPSLF89-1	fago, región 3	Módulo de adicción de toxinas RelE, toxina del sistema TA_1.5
Sistema TA	PSLF89_1p114	pPSLF89-1	fago, región 3	Antitoxina igA-2, del sistema TA_1.5
Sistema TA	PSLF89_08410	pPSLF89-1	fago, región 4	Módulo de adicción de la familia Txe/YoeB, toxina del sistema TA_1.6

Sistema TA	PSLF89_1p136	pPSLF89-1	fago, región 4	Proteína de la familia phd, antitoxina del sistema TA_1.6
Sistema TA	PSLF89_1p177	pPSLF89-1	plásmido	Proteína con dominio PIN, toxina del sistema TA_1.7
Sistema TA	PSLF89_1p178	pPSLF89-1	plásmido	Proteína de la familia phd, antitoxina del sistema TA_1.7
Sistema TA	PSLF89_1p211	pPSLF89-1	fago, región 5	Proteína hipotética, toxina del sistema TA_1.8
Sistema TA	PSLF89_1p210	pPSLF89-1	fago, región 5	Proteína hipotética, antitoxina del sistema TA_1.8
Sistema TA	PSLF89_2p9	pPSLF89-2	fago, región 1	Hexulosa-6-fosfato isomerasa, toxina del sistema TA_2.1
Sistema TA	PSLF89_2p10	pPSLF89-2	fago, región 1	Proteína de la familia hicB, antitoxina del sistema TA_2.1
Sistema TA	PSLF89_2p14	pPSLF89-2	fago, región 1	Proteína HicB de ensamblaje de pili, toxina de sistema TA_2.2
Sistema TA	PSLF89_2p15	pPSLF89-2	fago, región 1	Proteína de la familia hicB, antitoxina del sistema TA_2.2
Sistema TA	PSLF89_3p44	pPSLF89-3	plásmido	Toxina de sistema TA_3.1
Sistema TA	PSLF89_3p43	pPSLF89-3	plásmido	Regulador transcripcional, antitoxina de sistema TA_3.1
Sistema TA	PSLF89_09040	pPSLF89-4	fago incompleto, región 1	RelE, toxina de sistema TA_4.1
Sistema TA	PSLF89_09045	pPSLF89-4	fago incompleto, región 1	Proteína de unión a ADN, antitoxina de sistema TA_4.1

Anexo 2. Listado de proteínas de *S. salar* en estado de vacuolización identificadas por proteómica cuantitativa. Se muestra la comparación en los niveles de proteínas de salmón identificadas y cuantificadas por proteómica cuantitativa, durante la infección de *P. salmonis* en células SHK-1 en estado de vacuolización, o en controles sin infectar. “Veces de cambio” se refiere al logaritmo en base 2 de la razón entre vacuolización y control: si no aparece valor, la proteína se encuentra sólo en una muestra, en rojo se muestran las proteínas sobre-expresadas en vacuolización, y en verde sobre-expresadas en el control. “Referencia” indica si se ha reportado cambios en la expresión de la proteína en ensayos anteriores con *P. salmonis*. Las proteínas mostradas en negro fueron encontradas en ambos tiempos de infección (vacuolización y propagación).

Código UNIPROT	Descripción	Muestra	Veces de cambio	Valor-e	Referencia
Apoptosis					
B5XDE1	Proteína CARD que interactúa con Bcl10	sólo vacuolización		-4,41	
B5X8J4	Caspasa-1	sólo vacuolización		-4,24	
B5X8Y9	Homólogo de Diablo, mitocondrial	sólo vacuolización		-5,89	
B5XDX7	Muerte celular programada 1 ligando 1 (PD-L1)	sólo vacuolización		-4,42	
B5XCG1	Proteína nuclear 1 de timocitos	sólo vacuolización		-11,6	
B5DG91	Proteína ASC con dominio CARD (piroptosis)	sólo en control		-4,99	
B5XCG1	Proteína 5 de muerte celular programada	sólo en control		-4,05	

Proteínas de respuesta inmune				
<b>B5X3J8</b>	<b>SMAD4</b>	<b>sólo vacuolización</b>	<b>-6,04</b>	
C0HBS7	Subunidad B de subcomponente del complemento C1q	sólo vacuolización	-4,79	(120)
B5X7J5	Proteína 2 similar a C1q del complemento	sólo vacuolización	-6,35	
B5XAL9	Quimioquina 13, motivo C-C	sólo vacuolización	-4,02	(120)
B9EP15	Antígeno CD2 de superficie de células T	sólo vacuolización	-4,22	
B9ENV6	Ligando CD40	sólo vacuolización	-4,24	
<b>B9ENT4</b>	<b>CCAAT/enhancer-binding proteína delta</b>	<b>sólo vacuolización</b>	<b>-8,05</b>	<b>(120)</b>
<b>C0H8Y1</b>	<b>Receptor de interleucina-12, cadena beta-2</b>	<b>sólo vacuolización</b>	<b>-10,4</b>	
C0H9Y8	Subunidad alfa de receptor de interleucina-6	sólo vacuolización	-17,0	
<b>B5X366</b>	<b>Quinasa 4 asociada a receptor de interleucina-1</b>	<b>sólo vacuolización</b>	<b>-7,75</b>	
B5XA65	Lisozima	sólo vacuolización	-4,61	(94)
<b>Q5UT54</b>	<b>Proteína de tipo Toll con repetidos de leucina</b>	<b>sólo vacuolización</b>	<b>-5,83</b>	
A0A0F6QNL8	Receptor de tipo Toll 3	sólo vacuolización	-4,79	
<b>S0F1A6</b>	<b>Receptor de tipo Toll 8b1</b>	<b>sólo vacuolización</b>	<b>-4,89</b>	
B5XCC4	Miembro 11B de la superfamilia de receptor de factor de necrosis tumoral	sólo vacuolización	-4,29	
<b>B5X7I0</b>	<b>Factor 5 asociado a receptor TNF</b>	<b>sólo vacuolización</b>	<b>-5,62</b>	
<b>Q8HX42</b>	<b>MHC de clase I</b>	<b>sólo vacuolización</b>	<b>-20,9</b>	<b>(94)</b>
A4ZHU6	Proteína similar a CD4	sólo vacuolización	-4,08	
<b>F5B7Y2</b>	<b>Receptor de tipo Toll 5 de membrana</b>	<b>sólo vacuolización</b>	<b>-4,02</b>	
<b>F5B7Y3</b>	<b>Receptor de tipo Toll 5 soluble</b>	<b>sólo vacuolización</b>	<b>-5,83</b>	
M1ZMQ4	Receptor de tipo Toll 3	sólo vacuolización	-4,79	
Q5ILA0	CD8, variante beta	sólo vacuolización	-4,35	(120)
<b>B5X3L4</b>	<b>Homólogo 6, proteína de linfoma tipo B</b>	<b>sólo vacuolización</b>	<b>-19,0</b>	
C0H9W8	Factor 3 similar a receptor de citoquina	sólo vacuolización	-4,11	
C0H9S3	Factor 2 de citoplasma de neutrófilos	sólo vacuolización	-11,0	
V9Q6E2	Supresor de señalización de citoquina 2a	sólo vacuolización	-4,85	
V9Q4K1	Supresor de señalización de citoquina 2b	sólo vacuolización	-4,85	
<b>B5X1Q8</b>	<b>Inhibidor de elastasa de leucocitos</b>	<b>vacuolización, control</b>	<b>-1,24</b>	<b>-57,5</b>
<b>B5XAB6</b>	<b>Componente 1Q del complemento, subcomponente de unión, mitocondrial</b>	<b>sólo en control</b>	<b>-55,8</b>	<b>(120)</b>
<b>C0PUM0</b>	<b>Homólogo de antígeno CD166</b>	<b>sólo en control</b>	<b>-8,70</b>	
<b>B5X3Y9</b>	<b>Antígeno CD99</b>	<b>sólo en control</b>	<b>-8,16</b>	
<b>B5XEN8</b>	<b>Factor D del complemento</b>	<b>sólo en control</b>	<b>-5,63</b>	<b>(94)</b>
<b>C0H963</b>	<b>Receptor A de interleucina-17</b>	<b>sólo en control</b>	<b>-4,13</b>	
<b>C0HAA1</b>	<b>Receptor A de interleucina-31</b>	<b>sólo en control</b>	<b>-4,57</b>	
<b>B9ELT2</b>	<b>Lisozima g</b>	<b>sólo en control</b>	<b>-5,31</b>	
Q2QEY8	Antígeno de MHC de clase I alfa 1	sólo en control	-4,32	
<b>D0UGE1</b>	<b>Antígeno de MHC de clase I</b>	<b>sólo en control</b>	<b>-4,85</b>	

Q6IWH5	Interleucina-1 beta	sólo en control	-9,45	(106)
Organización y regulación del citoesqueleto				
B9EMY1	Tropomiosina-1, cadena alfa	vacuolización, control	5,15	-1134
B5X3R2	Subunidad 2 de dinactina	vacuolización, control	2,99	-45,1
B5X4C0	Tropmiosina, cadena alfa-3	vacuolización, control	2,92	-1180
B5X9P4	Chaperona A tubulina-específica TBCA	vacuolización, control	2,47	-39,2
C0PU50	Miosina-9	vacuolización, control	2,32	-506
B5X2S2	Tropomiosina, cadena alfa-4	vacuolización, control	2,29	-1313 (94)
Q78BU2	Alfa actina 1-1	vacuolización, control	2,10	-1098
B5DG40	Actina 2 miotomal de fibras musculares rápidas	vacuolización, control	2,10	-1109
B5XFZ3	Actina, músculo aductor	vacuolización, control	1,95	-476
B5X240	Actina, citoplasmática 1	vacuolización, control	1,42	-1906 (94)
B5XFE9	Tubulina, cadena alfa-1A	vacuolización, control	1,39	-263
B5DH02	Tubulina, alfa 8 similar a 3-2	vacuolización, control	1,24	-250
B5DH01	Tubulina, cadena alfa	vacuolización, control	1,19	-402
B5X2S3	Proteína 8 relacionada a actina	sólo vacuolización		-4,44
B5XG71	Proteína 6 relacionada a actina	sólo vacuolización		-7,41
C0HBJ2	Componente 4 de complejo gama-tubulina	sólo vacuolización		-5,44
A8WCK1	Miosina 1	sólo vacuolización		-4,12
C0PU25	Proteína de <i>capping</i> de F-actina, subunidad alfa-1	vacuolización, control	-14,7	-5,54
C0HBE5	Proteína 3 relacionada a actina	vacuolización, control	-11,3	-26,7
B5XFN3	Miosina, polipéptido liviano 6B	vacuolización, control	-4,86	-107
B5X3R3	F-actin-capping protein subunit beta	vacuolización, control	-3,77	-38,1
B5X3H7	Tubulina, cadena beta-3	vacuolización, control	-3,42	-105
C0HBL4	Tubulina, cadena beta-2A	vacuolización, control	-3,23	-124 (120)
B5XB79	Timosina beta-11	vacuolización, control	-2,62	-6,14
B5XAM0	Timosina beta-12	vacuolización, control	-2,44	-5,43 (94, 120)
B5DGE8	Tubulina, cadena alfa	vacuolización, control	-2,44	-168
B9EL16	Tubulina, cadena beta-2C	vacuolización, control	-2,37	-153,3
Q2ERI0	Beta-tubulina	vacuolización, control	-2,24	-105
B5DG56	Proteína de <i>capping</i> de filamento de actina, músculo Z línea alfa 2	vacuolización, control	-1,66	-22,3
C0PUH3	Proteína de <i>capping</i> de F-actina, subunidad alfa-2	vacuolización, control	-1,66	-22,3
B5X0U5	Tubulina, cadena beta	vacuolización, control	-1,60	-180
C0H808	Tubulina, cadena beta-1	vacuolización, control	-1,57	-212
C0PU76	Tubulina, cadena alfa-1C	vacuolización, control	-1,02	-265
C0H9H2	Proteína 2-A relacionada a actina	sólo en control		-70,3
C0PUH9	Proteína 2-B relacionada a actina	sólo en control		-8,24
Q7ZZN0	Miosina, cadena regulatoria liviana 2	sólo en control		-4,42

B5DGS9	Miosina, cadena liviana regulatoria 2, isoforma de músculo liso	sólo en control	-81,1	
B5XFD6	Miosina, polipéptido liviano 4	sólo en control	-45,2	(73)
B5DGT1	Miosina, polipéptido liviano 3-1	sólo en control	-45,2	
B5DH12	Miosina, cadena liviana 1-1	sólo en control	-45,2	
Componente de fagosoma				
C0HBD4	Proteína 1 de unión a guanilato inducida por interferón (GBP1)	sólo vacuolización	-4,91	(4)
B5RI38	Similar a catepsina I	sólo vacuolización	-5,63	
B5DFV6	Catepsina D	sólo en control	-12,4	(4, 120).
C0PUQ5	Catepsina Z	sólo en control	-5,82	
Endocitosis mediada por clatrina				
C0H8J4	Complejo AP-1 subunidad mu-2	sólo vacuolización	-15,8	
B5X152	Complejo AP-3 subunidad mu-1	sólo vacuolización	-4,36	
B5XFU5	NECP1	sólo vacuolización	-5,61	
C0H9C2	Fosfatidilinositol-5-fosfato 4-quinasa tipo-2 beta	sólo vacuolización	-4,72	
C0HA36	Endofilina-B2	sólo vacuolización	-4,38	
B5DFX7	Proteína de estrés por calor de 70 kDa (HSC70)	vacuolización, control	-2,13	-176
C0PUP3	Complejo AP-2 subunidad beta-1	sólo en control	-6,88	
B9EQ28	Clatrina, cadena liviana B	sólo en control	-13,1	
C0HAE8	Proteína de unión a fosfatidilinositol y ensamblaje de clatrina	sólo en control	-4,72	
B5XCZ5	Proteína de complejo 2/3 relacionada a actina, subunidad 5 (ARPC5)	sólo en control	-7,84	

Anexo 3. Listado de proteínas de *S. salar* en estado de propagación identificadas por proteómica cuantitativa. Se muestra la comparación en los niveles de proteínas de salmón identificadas y cuantificadas, durante la infección de *P. salmonis* en células SHK-1 en estado de propagación, o en el control sin infectar. “Veces de cambio” se refiere al  $\log_2$  de la razón entre propagación y control: si no aparece valor, la proteína se encuentra sólo en una muestra, en rojo se muestran las proteínas sobre-expresadas en propagación, y en verde sobre-expresadas en el control. “Referencia” indica si se ha reportado cambios en la expresión en ensayos anteriores con *P. salmonis*. Las proteínas mostradas en negro fueron encontradas en ambos tiempos de infección (vacuolización y propagación).

Código UNIPROT	Descripción	Muestra	Veces de cambio	Valor-e	Referencia
Apoptosis					
B5X8Y9	Homólogo de Diablo, mitocondrial	sólo propagación		-6,23	
B5XCG1	Proteína nuclear 1 de timocitos	sólo propagación		-8,67	
B5DG91	Proteína ASC con dominio CARD (piroptosis)	sólo en control		-4,99	

B5XCG1	Proteína 5 de muerte celular programada	sólo en control		-4,05	
Proteínas de respuesta inmune					
Q2QEY8	Antígeno de MHC de clase I alfa 1	propagación, control	23,3	-4,32	
<b>B5X1Q8</b>	<b>Inhibidor de elastasa de leucocitos</b>	<b>propagación, control</b>	<b>1,31</b>	<b>-58,6</b>	
B5X6D0	Proteína de translocación de células B-gen 1 (proteína antiproliferativa)	sólo propagación		-5,25	(120)
B5XBD0	Quimiocina 8, motivo C-C	sólo propagación		-5,73	(120)
B5X4P0	Receptor de quimiocina C-C tipo 9	sólo propagación		-15,0	(120)
<b>B9ENT4</b>	<b>CCAAT/enhancer-binding proteína delta</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-7,31</b>	(120)
V9NBH1	Antígeno de MHC de clase II	sólo propagación		-4,23	
<b>C0H8Y1</b>	<b>Receptor de interleucina-12, cadena beta-2</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-11,5</b>	
Q1A3D7	Interferón alfa 2	sólo propagación		-4,31	
A0A068Q876	Similar a interleucina-2	sólo propagación		-12,2	
C0H9Y8	Receptor de interleucina-6, subunidad alfa	sólo propagación		-4,72	
<b>B5X366</b>	<b>Quinasa 4 asociada a receptor de interleucina-1</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-4,48</b>	
A7KIK0	Antígeno de MHC de clase I	sólo propagación		-4,15	
<b>B5X3J8</b>	<b>SMAD4</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-4,82</b>	
<b>Q5UT54</b>	<b>Proteína de tipo Toll con repetidos de leucina</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-8,19</b>	
W8W3N9	Proteína TLR21	sólo propagación		-6,60	
W8W3S0	Proteína TLR20a	sólo propagación		-4,36	
Q2A132	Receptor de tipo Toll TLR22a	sólo propagación		-4,77	
B5BM14	Receptor de tipo Toll TLR22a2	sólo propagación		-9,11	
B5X405	Receptor de tipo Toll 22b	sólo propagación		-5,36	
<b>S0F1A6</b>	<b>Receptor de tipo Toll 8b1</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-5,80</b>	
<b>B5X7I0</b>	<b>Factor 5 asociado a receptor TNF</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-5,21</b>	
<b>Q8HX42</b>	<b>MHC de clase I</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-21,1</b>	(94)
<b>F5B7Y2</b>	<b>Receptor de tipo Toll 5 de membrana</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-12,9</b>	
<b>F5B7Y3</b>	<b>Receptor de tipo Toll 5 soluble</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-8,19</b>	
<b>B5X3L4</b>	<b>Homólogo 6, proteína de linfoma tipo B</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-15,3</b>	
B5X2W2	Receptor de factor de estimulación de colonias de granulocitos (CD114)	sólo propagación		-6,65	
C0HAP0	Antígeno de histocompatibilidad de clase I, cadena F10 alfa	sólo propagación		-4,15	
B5XFA3	Proteína de reconocimiento de peptidoglicano	sólo propagación		-14,2	
C0H9D7	Metaloproteinasa de matriz-25 (MMP25)	sólo propagación		-4,07	
<b>B5XAB6</b>	<b>Componente 1Q del complemento, subcomponente de unión, mitocondrial</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-55,8</b>	(120)
<b>C0PUM0</b>	<b>Homólogo de antígeno CD166</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-8,70</b>	
<b>B5X3Y9</b>	<b>Antígeno CD99</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-8,16</b>	
<b>B5XEN8</b>	<b>Factor D del complemento</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-5,63</b>	(94)
<b>C0H963</b>	<b>Receptor A de interleucina-17</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-4,13</b>	
<b>C0HAA1</b>	<b>Receptor A de interleucina-31</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-4,57</b>	

B5X2K6	Homólogo de factor 2 de unión a interleucina	sólo en control		-16,5	
B5X1E6	Homólogo de factor 3 de unión a interleucina	sólo en control		-25,7	
B9ELT2	Lisozima g	sólo en control		-5,31	
D0UGE1	Antígeno de MHC de clase I	sólo en control		-4,85	
Q6IWH5	Interleucina-1 beta	sólo en control		-9,45	(106)
Organización y regulación del citoesqueleto					
B9EMY1	Tropomiosina-1, cadena alfa	propagación, control	2,91	-764	
B5X4C0	Tropomiosina, cadena alfa-3	propagación, control	2,88	-1030	(94)
B5X2S2	Tropomiosina, cadena alfa-4	propagación, control	2,16	-1059	(94)
B5X9P4	Chaperona A tubulina-específica TBCA	propagación, control	2,02	-51,6	
Q78BU2	Alfa actina 1-1	propagación, control	1,96	-1335	
B5DG40	Actina 2 miotomal de fibras musculares rápidas	propagación, control	1,89	-1348	
B5X240	Actina, citoplasmática 1	propagación, control	1,43	-2464	(94)
B5DG56	Proteína de <i>capping</i> de filamento de actina, músculo Z línea alfa 2	propagación, control	1,21	-29,6	
B3TDC3	Miembro 6a de familia similar a tubulina tirosina quinasa	solo propagación		-4,54	
C0HBJ2	Componente 4 de complejo gama-tubulina	solo propagación		-4,21	
B9ENW6	Subunidad 2 del complejo tubulina poliglutamilasa	solo propagación		-5,10	
B5X299	Proteína 10 relacionada a actina	solo propagación		-6,31	
A8WCK1	Miosina 1	solo propagación		-5,12	
B5DG45	Proteína de unión a miosina tipo H	solo propagación		-6,85	
Q2HXU3	Miosina lenta, cadena pesada 1	solo propagación		-4,11	
B5DGE8	Tubulina, cadena alfa	propagación, control	-14,4	-168	
C0HBL4	Tubulina, cadena beta-2A	propagación, control	-9,22	-93,9	
Q2ERI0	Beta-tubulina	propagación, control	-8,67	-86,2	
C0H9H2	Proteína 2-A relacionada a actina	propagación, control	-7,01	-46,3	
B5X0U5	Tubulina, cadena beta	propagación, control	-6,14	-158	
B5DH12	Miosina, cadena liviana 1-1	propagación, control	-4,06	-45,2	
B5XGW1	Miosina, polipéptido liviano 6	propagación, control	-3,13	-107	
C0PU76	Tubulina, cadena alfa-1C	propagación, control	-2,99	-211	
B5DH01	Tubulina, cadena alfa	propagación, control	-2,93	-227	
B9EL16	Tubulina, cadena beta-2C	propagación, control	-2,81	-153	
B5DH02	Tubulina, alfa 8 similar a 3-2	propagación, control	-2,74	-206	
C0H808	Tubulina, cadena beta-1	propagación, control	-2,67	-170	
B5XFN3	Miosina, polipéptido liviano 6B	propagación, control	-2,64	-107	
B5XFE9	Tubulina, cadena alfa-1A	propagación, control	-2,49	-152	
B5X3H7	Tubulina, cadena beta-3	propagación, control	-2,42	-74,5	
B5XCE5	Proteína de <i>capping</i> de F-actina, subunidad beta	propagación, control	-1,85	-56,8	
C0PU50	Miosina-9	propagación, control	-1,48	-208	

<b>B5XFZ3</b>	<b>Actina, músculo aductor</b>	<b>propagación, control</b>	<b>-1,46</b>	<b>-373</b>	
<b>C0PUH9</b>	<b>Proteína 2-B relacionada a actina</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-8,24</b>	
<b>C0HBE5</b>	<b>Proteína 3 relacionada a actina</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-26,7</b>	
<b>C0PUH3</b>	<b>Proteína de <i>capping</i> de F-actina, subunidad alfa-2</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-16,3</b>	
<b>Q7ZZN0</b>	<b>Miosina, cadena regulatoria liviana 2</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-4,42</b>	
<b>B5DGS9</b>	<b>Miosina, cadena liviana regulatoria 2, isoforma de músculo liso</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-128</b>	
<b>B5XFD6</b>	<b>Miosina, polipéptido liviano 4</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-45,2</b>	(94)
<b>B5DGT1</b>	<b>Miosina, polipéptido liviano 3-1</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-45,2</b>	
<b>B5X3R2</b>	<b>Subunidad 2 de dinactina</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-25,1</b>	
Componente de fagosoma					
<b>B5DFV6</b>	<b>Catepsina D</b>	<b>sólo propagación</b>	<b>1,06</b>	<b>-12,4</b>	(4, 120)
<b>B5X7R9</b>	<b>Catepsina H</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-5,41</b>	
<b>C0PU99</b>	<b>Proteína 1 de unión a guanilato inducida por interferón (GBP1)</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-4,97</b>	(4)
<b>C0PUQ5</b>	<b>Catepsina Z</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-5,82</b>	
Endocitosis mediada por clatrina					
<b>C0HA23</b>	<b>ATP-binding cassette sub-family G member 2</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-4,74</b>	
<b>B5XAA0</b>	<b>Proteína de ensamblaje de clatrina AP180</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-4,61</b>	
<b>C0H8J4</b>	<b>Complejo AP-1 subunidad mu-2</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-5,02</b>	
<b>B5X7J0</b>	<b>Proteína de complejo 2/3 relacionada a actina, subunidad 2 (ARPC2)</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-4,13</b>	
<b>B5XGN2</b>	<b>Proteína de complejo 2/3 relacionada a actina, subunidad 4 (ARPC4)</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-42,1</b>	
<b>B5X191</b>	<b>DAB2</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-5,19</b>	
<b>C0H9C2</b>	<b>Fosfatidilinositol-5-fosfato 4-quinasa tipo-2 beta</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-12,0</b>	
<b>C0H8V5</b>	<b>Homólogo a proteína de síndrome Wiskott-Aldrich</b>	<b>sólo propagación</b>		<b>-6,83</b>	
<b>B5DFX7</b>	<b>Proteína de estrés por calor de 70 kDa HSC70</b>	<b>propagación, control</b>	<b>-1,14</b>	<b>-291</b>	
<b>C0PUP3</b>	<b>Complejo AP-2 subunidad beta-1</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-6,88</b>	
<b>C0HBR6</b>	<b>Proteína de complejo 2/3 relacionada a actina, subunidad 1B</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-11,3</b>	
<b>B5XCZ5</b>	<b>Proteína de complejo 2/3 relacionada a actina, subunidad 5 (ARPC5)</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-7,84</b>	
<b>B9EQ28</b>	<b>Clatrina, cadena liviana B</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-13,1</b>	
<b>C0HAE8</b>	<b>Proteína de unión a fosfatidilinositol y ensamblaje de clatrina</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-4,72</b>	
<b>B5X0Q1</b>	<b>Proteína Rab-5C relacionada con Ras</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-9,89</b>	
<b>B5X127</b>	<b>Proteína Rab-7a relacionada con Ras</b>	<b>sólo en control</b>		<b>-11,1</b>	

Anexo 4. Listado de proteínas predichas como factores de virulencia expresadas durante la infección en células SHK-1.

Muestra	Ubicación	Locus tag	Descripción	Criterio
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1989	acsA - lucA/lucC [Pseudomonas aeruginosa str. PA7]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_211	algC - fosfomanomutasa AlgC [Pseudomonas aeruginosa str. PAO1]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_708	bplF - proteína de biosíntesis de lipopolisacárido [Bordetella bronchiseptica str. RB50]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_2348	cheV - proteína de quimiotaxis CheV [Vibrio fischeri str. ES114 cromosoma I]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_2366	cheV - quimiotaxis CheV [Vibrio parahaemolyticus str. RIMD 2210633 cromosoma I]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1242	cpsA - undecaprenil difosfato sintasa [Enterococcus faecalis str. V583]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_587	ddrA - proteína DrrA de unión a ATP, resistencia a daunorrubicina [Mycobacterium avium str. 104]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1564	essC - proteína hipotética [Staphylococcus aureus str. MRSA252]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1985	fagC - componente de unión a ATP de transportador tipo ABC [Corynebacterium pseudotuberculosis str. FRC41]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_2468	fbpC - proteína FbpC de unión a ATP de importación de iones Fe (3+) [Neisseria gonorrhoeae str. NCCP11945]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_908	feoB - transportador B de ion ferroso [Legionella pneumophila str. Philadelphia 1]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1947	fimV - proteína hipotética [Pseudomonas entomophila str. L48]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_2552	flgH - proteína FlgH precursora del anillo flagelar-L [Pseudomonas aeruginosa str. PA7]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1710	fliC - proteína con dominio flagelina [Pseudomonas mendocina str. ymp]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_3380	fliI - ATP sintasa flagelo-específica [Helicobacter hepaticus str. ATCC 51449]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1714	fliS - proteína flagelar FliS [Pseudomonas mendocina str. ymp]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_3001	hemA - Glutamil-tARN reductasa [Haemophilus somnus str. 2336]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1367	htrB - lauroil acetiltransferasa, biosíntesis de lípido A [Haemophilus ducreyi str. 35000HP]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_617	icmB/dotO - IcmB (DotO) [Legionella pneumophila str. Corby]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_504	icmE/dotG - IcmE (DotG) [Legionella pneumophila str. Philadelphia 1]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_604	icmE/dotG - IcmE (DotG) [Legionella pneumophila str. Philadelphia 1]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_605	icmG/dotF - proteína hipotética [Legionella pneumophila str. Lens]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1884	icmL/dotI - IcmL (DotI) [Legionella pneumophila str. Philadelphia 1]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_07415	IcmV - proteína de multiplicación intracelular [Legionella pneumophila str. Paris]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_06000	ipaH2.5 - antígeno de invasión plasmidial, fragmento [Shigella dysenteriae str. 197 (serotipo 1) plásmido pSD1_197]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_3066	kasB - 3-oxoacetil-(proteína portadora de acetilo) sintasa II [Mycobacterium sp. str. JDM601]	VFDB

Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1254	lpxD - UDP-3-O-(3-hidroximiristoil) glucosamina N-acetiltransferasa [Haemophilus somnus str. 2336]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_2215	lpxK - tetraacetildisacárido 4'-quinasa (lípidos-A 4'-quinasa) [Haemophilus somnus str. 129PT]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_713	lysA - diaminopimelato descarboxilasa [Mycobacterium vanbaalenii str. PYR-1]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_856	mprB - probable proteína quinasa, sensor de sistema de dos componentes [Mycobacterium leprae str. TN]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_3191	mrsA/glmM - fosfoglucosamina mutasa [Haemophilus somnus str. 129PT]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1925	napA - proteína de activación de neutrófilos (napA) (bacterioferritina) [Helicobacter pylori str. Shi470]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1439	ospD3 - OspD3 [Shigella sonnei str. 046 plásmido pSS_046]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1767	pchA - isocorismato sintasa [Pseudomonas syringae str. 1448A (pv. phaseolicola)]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1422	pchH - transportador tipo ABC, permeasa/unión a ATP [Pseudomonas fluorescens str. Pf-5]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_3106	PFLU6020 - proteína hipotética [Pseudomonas fluorescens str. SBW25]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_768	pipB2 - proteína exportada [Salmonella enterica str. P125109 (serovar Enteritidis)]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_3282	PLES_19101 - wbpP [Pseudomonas aeruginosa str. LESB58]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_2407	Pmen_2323 - proteína de función desconocida DUF877 [Pseudomonas mendocina str. ymp]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_3050	prxA - proteína PrxA regulador transcripcional de sistema de dos componentes [Mycobacterium intracellulare str. MOTT 64]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1371	rtxB - proteína RtxB [Vibrio cholerae str. O395 cromosoma II]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_1289	sodCI - precursor de superóxido dismutasa [Salmonella typhimurium str. LT2]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_3286	SSU98_0579 - Glicosiltransferasas involucradas en biogénesis de pared celular [Streptococcus suis str. 98HAH33]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_348	tuf - factor de elongación Tu [Mycoplasma penetrans str. HF-2]	VFDB
Vacuolización	cromosoma	PSLF89_347	tuf (MS53_0667) - Factor de elongación Tu [Mycoplasma synoviae str. 53]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_3032	C8J_1075 - proteína hipotética [Campylobacter jejuni str. 81116 (NCTC11828)]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_3101	cheV - proteína de quimiotaxis CheV [Vibrio cholerae str. O395 cromosoma II]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_3124	cheY - proteína de quimiotaxis CheY [Vibrio fischeri str. ES114 cromosoma I]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_1827	ciuD - probable sistema de transporte de hierro de tipo ABC, proteína de unión a ATP [Corynebacterium jeikeium str. K411]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_398	CJJ81176_1418 - probable metiltransferasa [Campylobacter jejuni str. 81-176 (subsp. jejuni)]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_3143	CPF_0439 - proteína con dominio asociado a transportador CBS [Clostridium perfringens str. ATCC 13124]	VFDB

Propagación	cromosoma	PSLF89_1356	dhbA - proteína hipotética [Brucella suis str. ATCC 23445 cromosoma II]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_1873	dotB - defecto en el tráfico de organelos, proteína DotB (ATPasa) [Legionella pneumophila str. Lens]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_3164	fbpC - proteína FbpC de unión a ATP de importación de iones Fe (3+) [Neisseria gonorrhoeae str. NCCP11945]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_2179	filM - proteína interruptor de motor flagelar [Vibrio parahaemolyticus str. RIMD 2210633 cromosoma I]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_3077	fimV - proteína hipotética [Pseudomonas syringae str. B728a (pv. syringae)]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_2553	flgG - proteína FlgG del cuerpo basal del flagelo [Pseudomonas fluorescens str. Pf-5]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_2549	flgK - proteína FlgK asociada al gancho flagelar [Pseudomonas mendocina str. ymp]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_1991	fpvA - receptor ferricromo-hierro (ingreso de hidroxamato férrico) (receptor de hidroxamato férrico) [Pseudomonas aeruginosa str. PA7]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_1323	gacA - regulador transcripcional de sistema de dos componentes, familia LuxR [Pseudomonas putida str. W619]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_2213	hemH - ferroquelatasa [Haemophilus influenzae str. Rd KW20 (serotipo d)]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_3322	hemN - coproporfirinógeno III oxidasa [Haemophilus influenzae str. 86-028NP (no-tipificable)]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_2876	hmuV - probable sistema de transporte de hierro de tipo ABC, proteína de unión a ATP [Corynebacterium jeikeium str. K411]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_414	hopAJ2 - HopAJ2 efector tipo III [Pseudomonas syringae str. B728a (pv. syringae)]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_615	icmJ/dotN - proteína hipotética [Legionella pneumophila str. Paris]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_05390	lcmV - proteína de multiplicación intracelular [Legionella pneumophila str. Lens]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_3090	kpsF - arabinosa-5-fosfato isomerasa [Campylobacter jejuni str. RM1221]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_3087	mce2B - entrada a célula de mamífero [Mycobacterium sp. str. MCS]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_769	mgtB - proteína hipotética [Salmonella enterica str. RSK2980 (subsp. arizonae serovar 62:z4,z23:--)]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_2797	mprB - proteína quinasa MprB sensor de dos componentes [Mycobacterium abscessus str. ATCC 19977]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_1476	mucD - precursor de serina proteasa MucD [Pseudomonas aeruginosa str. PA7]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_719	oppF - transportador ABC de oligopéptidos, componente permeasa [Mycoplasma mycoides str. PG1]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_2644	ospD3 - enterotoxina [Shigella flexneri str. M90T (serotipo 5a) plásmido pWR501]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_2577	phoR - proteína histidina-quinasa de transducción de señales, sensor periplásmico [Mycobacterium sp. str. MCS]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_1088	pkn5 - probable proteína serina/treonina quinasa (proteína efectora del SSTT) [Chlamydia trachomatis str. UCH-1 (serovar L2b)]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_3113	Pmen_2319 - proteína hipotética [Pseudomonas mendocina str. ymp]	VFDB

Propagación	cromosoma	PSLF89_1161	ugd - UDP-glucosa 6-deshidrogenasa [ <i>Bacillus thuringiensis</i> str. Al Hakam]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_3295	wzb - proteína-tirosina-fosfatasa [ <i>Vibrio vulnificus</i> str. CMCP6 cromosoma I]	VFDB
Propagación	cromosoma	PSLF89_1202	YPK_3192 - proteína con dominio de unión-oxidoreductasa FAD/NAD(P) [ <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> str. YPIII (serotipo O:3)]	VFDB
Propagación	pPSLF89-1	PSLF89_1p174	proteína Fic de filamentación celular	GenDB, ProtFun 2.2
Propagación	pPSLF89-1	PSLF89_1p100	proteína hipotética	GenDB, ProtFun 2.2
Propagación	pPSLF89-1	PSLF89_1p169	ymt - toxina murina [ <i>Yersinia pestis</i> str. Z176003 plásmido pMT1]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_3081	cadF - proteína de unión a fibronectina, de membrana externa [ <i>Campylobacter fetus</i> str. 82-40 (subsp. fetus)]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_2776	cheV - proteína de quimiotaxis CheV [ <i>Vibrio cholerae</i> str. O395 cromosoma II]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_3280	cpsA - transferasa de azúcares involucrados en la síntesis de lipopolisacáridos [ <i>Vibrio vulnificus</i> str. CMCP6 cromosoma II]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_295	cylG - proteína CylG [ <i>Streptococcus agalactiae</i> str. A909 (serotipo Ia)]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_2548	flgL - proteína FlgL asociada al gancho flagelar [ <i>Pseudomonas putida</i> str. KT2440]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_1792	flhG - ATPasa, familia ParA [ <i>Campylobacter fetus</i> str. 82-40 (subsp. fetus)]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_1673	gacS - proteína sensora GacS [ <i>Pseudomonas fluorescens</i> str. Pf-5]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_79	hdtS - fosfolípido/glicerol acetiltransferasa [ <i>Pseudomonas mendocina</i> str. ymp]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_3305	hemE - uroporfirínógeno descarboxilasa [ <i>Haemophilus somnus</i> str. 2336]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_2108	iap/cwHA - proteína extracelular P60, proteína Iap asociada a la invasión [ <i>Listeria monocytogenes</i> str. EGD-e (serovar 1/2a)]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_3009	ML0130 - proteína hipotética [ <i>Mycobacterium leprae</i> str. TN]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_3321	orfM - probable desoxirribonucleótido trifosfato pirofosfatasa [ <i>Haemophilus influenzae</i> str. PittGG (no-tipificable)]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_335	pilB (lpp1479) - proteína PilB de ensamblaje de pili [ <i>Legionella pneumophila</i> str. Paris]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_2770	pkn5 - probable proteína serina/treonina quinasa (proteína efectora del SSTT) [ <i>Chlamydia trachomatis</i> str. UCH-1 (serovar L2b)]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_777	pkn5 - S/T proteína quinasa [ <i>Chlamydia pneumoniae</i> str. J138]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_1546	relA - GTP pirofosfoquinasa ((p)ppGpp sintetasa I) proteína RelA de respuesta a estrés nutricional [ <i>Legionella pneumophila</i> str. Corby]	VFDB
Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_470	rfaE - ADP-heptosa sintasa [ <i>Haemophilus somnus</i> str. 129PT]	VFDB

Vacuolización; propagación	cromosoma	PSLF89_203	tuf - factor de elongación de la traducción TU [Mycoplasma mycoides str. PG1]	VFDB
-------------------------------	-----------	------------	---	------

Anexo 5. Listado de proteínas identificadas por proteómica cuantitativa. Proteínas bacterianas predichas como factores de virulencia, o presentes en los plásmidos identificadas en las muestras control (cultivo líquido), infección en células SHK-1 en estado de vacuolización y de propagación elegidas para cuantificación por qPCR. Las categorías se muestran en distintos colores.

Muestra	Locus tag	Ubicación	Descripción	Predicción bioinformática	Categoría
Vacuolización	PSLF89_768	cromosoma	Proteína hipotética, familia de proteínas con pentapéptidos repetidos	Factor de virulencia pipB2, proteína exportada [ <i>Salmonella enterica</i> (serovar Enteritidis)]	Toxinas y proteínas secretadas
Vacuolización	PSLF89_07415	cromosoma	Proteína hipotética lcmV de sistema de secreción tipo IV	Factor de virulencia lcmV, proteína de multiplicación intracelular [ <i>Legionella pneumophila</i> str. Paris]	Sistema de secreción tipo IV (Dot/lcm)
Vacuolización	PSLF89_1884	cromosoma	Proteína hipotética lcmL de sistema de secreción tipo IV	Factor de virulencia lcmL/dotI, [ <i>Legionella pneumophila</i> str. Philadelphia 1]	
Vacuolización	PSLF89_604	cromosoma	Proteína lcmE de sistema de secreción tipo IV	Factor de virulencia lcmE/dotG [ <i>Legionella pneumophila</i> str. Philadelphia 1]	
Vacuolización	PSLF89_1710	cromosoma	Proteína hipotética, flagelina tipo B	Factor de virulencia fliC, proteína con dominio flagelina [ <i>Pseudomonas mendocina</i> ]	Componentes flagelares o de pili
Vacuolización	PSLF89_2215	cromosoma	Proteína hipotética, tetraacil-disacárido 4'-quinase	Factor de virulencia lpxK, lípido-A 4'-quinasa [ <i>Haemophilus somnus</i> 129PT]	Biogénesis y modificación de la pared celular
Vacuolización	PSLF89_1989	cromosoma	Reductasa de ión férrico familia de proteína tipo FhuF	Factor de virulencia acsA, lucA/lucC [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> str. PA7]	Metabolismo y transporte de metales
Vacuolización	PSLF89_3p54	pPSLF89-3	Proteína hipotética MoeB de biosíntesis de molibdopterina	Proteína de biosíntesis de molibdopterina MoeB	
Propagación	PSLF89_912	cromosoma	Proteína hipotética, familia glutarredoxinas	Proteína hipotética SspA, proteína de respuesta a estrés nutricional	Respuesta a estrés
Propagación	PSLF89_3032	cromosoma	alfa-L-glicerol-D-manoheptosa beta-1,4-glucosiltransferasa	Factor de virulencia C8J_1075 (WaaE), proteína hipotética [ <i>Campylobacter jejuni</i> ]	Biogénesis y modificación de la pared celular
Propagación	PSLF89_2644	cromosoma	Proteína con repetidos de ankirina	Factor de virulencia ospD3, enterotoxina [ <i>Shigella flexneri</i> str. M90T plásmido pWR501]	Toxinas y proteínas secretadas

Propagación	PSLF89_3087	cromosoma	Proteína hipotética de la familia mce	Factor de virulencia mce2B - entrada a célula de mamífero [ <i>Mycobacterium</i> sp. str. MCS]	
Propagación	PSLF89_1p169	pPSLF89-1	Proteína con dominio similar a PLD	Factor de virulencia ymt, toxina murina [ <i>Yersinia pestis</i> plásmido pMT1]	
Propagación	PSLF89_05390	cromosoma	Proteína hipotética lcmV de sistema de secreción tipo IV	Factor de virulencia lcmV, proteína de multiplicación intracelular [ <i>Legionella pneumophila</i> str. Lens]	Sistema de secreción tipo IV (Dot/lcm)
Propagación	PSLF89_1873	cromosoma	Proteína hipotética DotB de sistema de secreción tipo IV	Factor de virulencia dotB, defecto en el tráfico de organelos, ATPasa [ <i>Legionella pneumophila</i> str. Lens]	
Propagación	PSLF89_615	cromosoma	Proteína hipotética del sistema de secreción tipo IV lcmJ	Factor de virulencia icmJ/dotN, proteína hipotética [ <i>Legionella pneumophila</i> str. Paris]	
Propagación	PSLF89_1p80	pPSLF89-1	Antitoxina	Antitoxina de sistema TA_3	Sistema toxina-antitoxina (TA)
Propagación	PSLF89_2p14	pPSLF89-2	Proteína hipotética HicB ensamblaje de pili	Toxina de sistema TA_2	
Propagación	PSLF89_1p23	pPSLF89-1	Proteína hipotética, familia de reguladores transcripcionales	Proteína de familia de reguladores transcripcionales de fagos	Reguladores transcripcionales
Propagación	PSLF89_3295	cromosoma	Proteína tirosina fosfatasa	Factor de virulencia wzb, proteína tirosina fosfatasa [ <i>Vibrio vulnificus</i> ]	Exopolisacáridos, proteínas de superficie y adherencia
Propagación	PSLF89_1p100	pPSLF89-1	Proteína hipotética, proteína de cubierta de esporas	Proteína de cubierta celular	
Propagación	PSLF89_1p194	pPSLF89-1	Proteína con dominio beta-autotransportador	Proteína hipotética	Función desconocida
Vacuolización, propagación	PSLF89_1546	cromosoma	(p)ppGpp sintetasa	Factor de virulencia, GTP pirofosfoquinasa ((p)ppGpp sintetasa I) proteína RelA [ <i>Legionella pneumophila</i> ]	Respuesta a estrés
Vacuolización, propagación	PSLF89_2108	cromosoma	Proteína hipotética, proteína con dominio SafA de ensamblaje de la cubierta de esporas	Factor de virulencia iap/cwhA, proteína extracelular P60, proteína iap asociada a la invasión [ <i>Listeria monocytogenes</i> ]	Exopolisacáridos, proteínas de superficie y adherencia
Vacuolización, Propagación	PSLF89_143	cromosoma	Carboxipeptidasa de membrana, proteína de unión a penicilina	PBP1, proteína de unión a penicilina, familia 1A	Biogénesis y modificación de la pared celular
Control	PSLF89_1p224	pPSLF89-1	Proteína hipotética	Factor de virulencia pipB2 [ <i>Salmonella enterica</i> str. Ty2 (serovar Typhi)]	Toxinas y proteínas secretadas

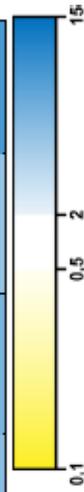
Control	PSLF89_2576	cromosoma	Proteína hipotética de regulación	Factor de virulencia mprA, regulador transcripcional MprA de sistema de dos componentes [ <i>Mycobacterium abscessus</i> ]	Reguladores transcripcionales
Control	PSLF89_1160	cromosoma	Proteína hipotética, familia fosfoglucoisomerasa	Factor de virulencia pgi, glucosa-6-fosfato isomerasa [ <i>Haemophilus somnus</i> 29PT]	Metabolismo energético
-	PSLF89_2050	cromosoma	Subunidad sigma S de la ARN polimerasa	Factor sigma RpoS (sigma 38)	Respuesta a estrés
-	PSLF89_2849	cromosoma	Proteína hipotética bifuncional (p)ppGpp sintasa/hidrolasa SpoT	SpoT, (p)ppGpp sintasa/hidrolasa	
-	PSLF89_1p174	pPSLF89-1	Proteína hipotética, familia fic/DOC	Adenosinamonofosfato transferasa, homóloga a FicD (inactiva Rho GTPasas)	Toxinas y proteínas secretadas
-	PSLF89_1p227	pPSLF89-1	Proteína hipotética, familia de proteínas con pentapéptidos repetidos	Factor de virulencia pipB2 [ <i>Salmonella enterica</i> (subsp. arizonae serovar 62:z4,z23:--)]	
-	PSLF89_1p229	pPSLF89-1	Proteína hipotética, endopeptidasa O	Endopeptidasa O, proteína de unión a plasminógeno y fibronectina	
-	PSLF89_3p51	pPSLF89-3	Proteína hipotética, familia de proteínas con pentapéptidos repetidos	Factor de virulencia pipB2 [ <i>Salmonella enterica</i> str. SPB7 (serovar Paratyphi B)]	
-	PSLF89_09235	pPSLF89-4	Glutamato-1-semialdehído aminotransferasa	Factor de virulencia hemL, glutamato-1-semialdehído aminotransferasa [ <i>Haemophilus somnus</i> 129PT]	
-	PSLF89_08265	pPSLF89-1	Toxina RelE	Toxina de sistema TA_3	
-	PSLF89_09045	pPSLF89-4	Proteína de unión a ADN	Antitoxina de sistema TA_1	Sistema toxina-antitoxina (TA)

Anexo 6. Cuantificación de transcritos bacterianos durante la infección en tres modelos de cultivo celular. Cuantificación de la expresión relativa de genes bacterianos, identificados durante la infección en los ensayos de proteómica, en cultivos celulares SHK-1 y ASK luego de 6 y 12 dpe, y en CPR de pez cebra a los 1 y 5 dpe. Se muestra la expresión de cada gen relativa al gen *housekeeping rho* ( $\pm$ desvest), y a la bacteria crecida hasta la fase exponencial control, por el método  $\Delta\Delta Ct$ . En color amarillo se muestran los genes con expresión  $<0,5$  veces la del control; en azul los genes con expresión  $>2$  el control, y en blanco los genes que no alteraron su expresión relativa al control, según se indica en el código de color al final de la tabla. En negrita se indican los genes cuya expresión es  $<0,5$  o  $>2$  por sobre su desviación estándar. "V+P" es vacuolización y propagación, "No" indica que no se identificó en ninguna muestra de proteómica.

Categoría	Proteómica	Gen	Locus tag	Ubicación	SHK-1 6d	SHK-1 12d	ASK 6d	ASK 12d	CPR 1d	CPR 5d
Adherencia y motilidad	Vacuolización	<i>flhC</i>	PSLF89_1710	cromosoma	0,25 $\pm$ 0,19	0,50 $\pm$ 0,22	0,57 $\pm$ 0,32	0,36 $\pm$ 0,09	1,75 $\pm$ 1,2	1,25 $\pm$ 0,64
	Propagación	<i>PSLF89_1p100</i>	PSLF89_1p100	pPSLF89-1	4,40 $\pm$ 1,4	4,52 $\pm$ 1,4	4,11 $\pm$ 1,1	4,46 $\pm$ 1,1	5,87 $\pm$ 3,5	8,82 $\pm$ 4,4
Antifagocitosis, cápsula	Propagación	<i>Wzb</i>	PSLF89_3295	cromosoma	0,68 $\pm$ 0,15	0,95 $\pm$ 0,21	1,80 $\pm$ 0,42	1,81 $\pm$ 0,63	1,76 $\pm$ 1,2	2,47 $\pm$ 1,9
	V+P	<i>lap</i>	PSLF89_2108	cromosoma	0,85 $\pm$ 0,13	1,45 $\pm$ 0,22	1,31 $\pm$ 0,26	1,26 $\pm$ 0,13	2,36 $\pm$ 0,83	3,06 $\pm$ 1,1
Invasión, supervivencia intracelular	Propagación	<i>mce2B</i>	PSLF89_3087	cromosoma	0,73 $\pm$ 0,17	0,77 $\pm$ 0,23	0,48 $\pm$ 0,22	0,55 $\pm$ 0,21	1,15 $\pm$ 1,1	1,41 $\pm$ 0,65
	V+P	<i>ponA (pbp1A)</i>	PSLF89_143	cromosoma	78,8 $\pm$ 9,2	0,12 $\pm$ 0,06	0,05 $\pm$ 0,02	44,4 $\pm$ 7,2	3,13 $\pm$ 0,96	5,87 $\pm$ 2,2
Membrana, LPS, pared celular	Vacuolización	<i>lpxK</i>	PSLF89_2215	cromosoma	0,52 $\pm$ 0,11	0,77 $\pm$ 0,18	0,78 $\pm$ 0,27	0,73 $\pm$ 0,10	1,19 $\pm$ 0,32	3,41 $\pm$ 1,5
	Propagación	<i>waaE</i>	PSLF89_3032	cromosoma	0,61 $\pm$ 0,19	0,83 $\pm$ 0,18	0,65 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,09	1,12 $\pm$ 0,45	2,26 $\pm$ 0,55
Metabolismo central	Propagación	<i>PSLF89_3p22</i>	PSLF89_3p22	pPSLF89-3	10,5 $\pm$ 3,7	5,60 $\pm$ 1,2	14,2 $\pm$ 3,5	26,1 $\pm$ 10,3	14,0 $\pm$ 10,3	20,9 $\pm$ 9,9
	Control	<i>pgi</i>	PSLF89_1160	cromosoma	0,67 $\pm$ 0,16	0,95 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,09	0,66 $\pm$ 0,05	1,84 $\pm$ 1,30	2,10 $\pm$ 0,33
Metabolismo de metales, ingreso de hierro y grupos hemo	No	<i>hemL</i>	PSLF89_09235	pPSLF89-4	6,48 $\pm$ 2,6	4,21 $\pm$ 1,7	7,61 $\pm$ 4,1	9,25 $\pm$ 3,8	4,43 $\pm$ 1,4	12,2 $\pm$ 8,7
	Vacuolización	<i>fluF-like</i>	PSLF89_1989	cromosoma	1,01 $\pm$ 0,14	1,09 $\pm$ 0,07	3,31 $\pm$ 0,74	2,57 $\pm$ 0,79	2,49 $\pm$ 1,9	2,41 $\pm$ 0,67
Regulador transcripcional	Vacuolización	<i>moeB</i>	PSLF89_3p54	pPSLF89-3	1,62 $\pm$ 0,08	1,53 $\pm$ 0,46	3,75 $\pm$ 0,99	2,81 $\pm$ 0,20	2,64 $\pm$ 0,25	4,79 $\pm$ 1,8
	Propagación	<i>PSLF89_1p23</i>	PSLF89_1p23	pPSLF89-1	1,67 $\pm$ 0,42	3,47 $\pm$ 0,94	2,65 $\pm$ 0,73	2,93 $\pm$ 1,3	2,51 $\pm$ 1,1	4,66 $\pm$ 2,2
Respuesta a estrés	Control	<i>mprA</i>	PSLF89_2576	cromosoma	1,74 $\pm$ 0,17	2,14 $\pm$ 0,25	2,36 $\pm$ 0,55	2,37 $\pm$ 0,33	3,14 $\pm$ 0,93	5,48 $\pm$ 2,7
	V+P	<i>relA</i>	PSLF89_1546	cromosoma	0,56 $\pm$ 0,08	0,55 $\pm$ 0,25	0,64 $\pm$ 0,11	0,65 $\pm$ 0,17	1,33 $\pm$ 1,2	2,66 $\pm$ 0,82
	No	<i>rpoS</i>	PSLF89_2050	cromosoma	0,85 $\pm$ 0,25	0,79 $\pm$ 0,25	1,40 $\pm$ 0,18	1,09 $\pm$ 0,03	1,63 $\pm$ 0,92	4,08 $\pm$ 1,5
	No	<i>spoT</i>	PSLF89_2849	cromosoma	0,77 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,14	1,07 $\pm$ 0,21	0,86 $\pm$ 0,17	1,70 $\pm$ 0,95	2,33 $\pm$ 0,60
Propagación	<i>sspA</i>	PSLF89_912	cromosoma	0,81 $\pm$ 0,10	0,78 $\pm$ 0,13	0,61 $\pm$ 0,11	0,78 $\pm$ 0,25	0,64 $\pm$ 0,46	2,42 $\pm$ 1,1	

Anexo 6... continuación.

Categoría	Proteómica	Gen	Locus tag	Ubicación	SHK-1 6d	SHK-1 12d	ASK 6d	ASK 12d	CPR 1d	CPR 5d
Sistema de secreción	Propagación	<i>icmV</i> (3ª región)	PSLF89_05390	chromosoma	2,51 ±0,99	1,74 ±0,24	4,17 ±0,87	5,38 ±0,54	2,34 ±1,1	4,04 ±1,8
	Propagación	<i>dotB</i> (3ª región)	PSLF89_1873	chromosoma	1,51 ±0,25	1,72 ±0,35	1,90 ±0,34	2,01 ±0,46	1,78 ±0,68	3,73 ±1,1
	Vacuolización	<i>icmL/dotI</i> (3ª región)	PSLF89_1884	chromosoma	0,26 ±0,46	0,74 ±0,54	1,70 ±0,59	0,98 ±0,25	0,98 ±0,44	2,53 ±0,50
	Vacuolización	<i>icmV</i> (1ª región)	PSLF89_07415	chromosoma	0,96 ±0,16	0,72 ±0,21	1,90 ±0,71	2,87 ±0,83	0,72 ±0,33	1,56 ±0,37
	Vacuolización	<i>icmE/dotG</i> (1ª región)	PSLF89_604	chromosoma	3,04 ±2,6	3,74 ±2,2	4,35 ±1,7	6,26 ±4,7	3,38 ±1,7	8,41 ±6,4
	Propagación	<i>icmJ/dotN</i> (1ª región)	PSLF89_615	chromosoma	0,43 ±0,09	0,39 ±0,27	1,51 ±0,49	1,62 ±0,02	0,70 ±0,21	1,91 ±0,60
	Propagación	<i>Ymt</i>	PSLF89_1p169	pPSLF89-1	1,74 ±0,09	2,38 ±0,65	4,34 ±0,32	4,50 ±1,6	3,83 ±3,3	5,14 ±2,3
	No	<i>ficD</i>	PSLF89_1p174	pPSLF89-1	2,60 ±1,0	3,71 ±0,88	1,03 ±0,44	1,27 ±0,51	1,04 ±0,55	2,63 ±0,54
	Propagación	<i>PSLF89_1p194</i>	PSLF89_1p194	pPSLF89-1	2,84 ±0,24	5,64 ±1,42	3,66 ±1,60	6,31 ±1,84	5,73 ±2,96	9,40 ±3,18
	Control	<i>pipB2</i>	PSLF89_1p224	pPSLF89-1	9,63 ±4,4	11,9 ±7,7	11,2 ±2,7	15,2 ±7,3	15,8 ±10	15,9 ±6,3
Toxinas y efectores	No	<i>pipB2</i>	PSLF89_1p227	pPSLF89-1	6,15 ±1,5	9,18 ±2,6	6,82 ±2,1	17,9 ±4,7	6,75 ±3,6	17,5 ±14
	No	<i>pepO</i>	PSLF89_1p229	pPSLF89-1	1,69 ±0,51	1,99 ±0,31	3,19 ±1,5	3,69 ±0,41	3,05 ±1,5	5,83 ±2,6
	No	<i>pipB2</i>	PSLF89_3p51	pPSLF89-3	3,22 ±1,4	3,13 ±1,7	4,02 ±2,1	5,39 ±2,1	4,45 ±1,8	8,27 ±6,9
	Vacuolización	<i>pipB2</i>	PSLF89_768	chromosoma	0,82 ±0,11	1,13 ±0,15	0,89 ±0,07	0,78 ±0,19	1,88 ±1,2	2,13 ±0,31
	Propagación	<i>ospD3</i>	PSLF89_2644	chromosoma	3,83 ±2,6	4,75 ±2,6	3,41 ±2,4	5,56 ±1,7	4,80 ±3,0	5,83 ±4,9
	No	<i>relE</i>	PSLF89_08265	pPSLF89-1	5,59 ±0,87	7,29 ±2,6	17,3 ±8,7	20,3 ±4,9	22,0 ±11	27,9 ±14
Sistema toxina-antitoxina	Propagación	<i>PSLF89_1p80</i>	PSLF89_1p80	pPSLF89-1	3,62 ±0,94	5,06 ±2,23	4,04 ±1,64	4,25 ±0,45	3,30 ±1,3	7,17 ±3,2
	Propagación	<i>hicB</i>	PSLF89_2p14	pPSLF89-2	7,71 ±2,2	7,57 ±3,5	11,7 ±5,0	21,7 ±6,2	16,8 ±7,0	19,2 ±9,2
	No	<i>PSLF89_09045</i>	PSLF89_09045	pPSLF89-4	6,15 ±0,50	4,58 ±1,25	7,29 ±2,30	8,15 ±0,94	6,60 ±1,6	11,0 ±3,9



Anexo 7. Cuantificación de transcritos de genes relacionados con la respuesta inmune del hospedero durante la infección con *P. salmonis*. Cuantificación de la expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune frente a patógenos en salmónidos (en cultivos SHK-1 y ASK) luego de 6 y 12 dpe, y en pez cebra (en CPR) a los 1 y 5 dpe. Se muestra la expresión de cada gen relativa al gen *housekeeping 18S* ( $\pm$ desvest), y al cultivo sin infectar como control, por el método  $\Delta\Delta$ Ct. En color naranja se muestran los genes con expresión  $<0,5$  veces la del control; en verde los genes con expresión  $>2$  el control, y en blanco los genes que no alteraron su expresión relativa al control, según se indica en el código de color al final de la tabla. En negrita se indican los genes cuya expresión es  $<0,5$  o  $>2$  por sobre su desviación estándar.

Gen	SHK-1 6d	SHK-1 12d	ASK 6d	ASK 12d	CPR 1d	CPR 5d
<i>il1b</i>	<b>0,315 <math>\pm</math>0,087</b>	<b>0,0825 <math>\pm</math>0,028</b>	<b>0,0791 <math>\pm</math>0,036</b>	<b>0,122 <math>\pm</math>0,089</b>	n.d.	n.d.
<i>il6</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,341 <math>\pm</math>0,18</b>	3,05 $\pm$ 1,2
<i>il8</i>	<b>6,10 <math>\pm</math>1,7</b>	<b>18,9 <math>\pm</math>3,0</b>	3,29 $\pm$ 1,7	1,90 $\pm$ 1,2	0,322 $\pm$ 0,18	0,444 $\pm$ 0,26
<i>il10</i>	0,655 $\pm$ 0,13	<b>49,1 <math>\pm</math>20</b>	0,400 $\pm$ 0,20	1,42 $\pm$ 0,35	<b>0,333 <math>\pm</math>0,42</b>	0,698 $\pm$ 1,0
<i>il12</i>	<b>64,5 <math>\pm</math>24</b>	<b>185 <math>\pm</math>16</b>	<b>227 <math>\pm</math>41</b>	<b>1024 <math>\pm</math>90</b>	1,09 $\pm$ 0,26	0,650 $\pm$ 0,43
<i>infa</i>	1,60 $\pm$ 0,60	<b>0,128 <math>\pm</math>0,021</b>	<b>3,77 <math>\pm</math>1,4</b>	2,82 $\pm$ 1,3	n.d.	n.d.
<i>infy</i>	<b>0,00609 <math>\pm</math>0,0024</b>	<b>0,0264 <math>\pm</math>0,022</b>	<b>0,0415 <math>\pm</math>0,024</b>	<b>0,231 <math>\pm</math>0,087</b>	n.d.	n.d.
<i>infy1-1*</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,515 $\pm$ 0,40	2,37 $\pm$ 0,55
<i>infy1-2*</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,94 $\pm$ 1,5	0,996 $\pm$ 0,85
<i>nos2a</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>0,191 <math>\pm</math>0,17</b>	<b>6,65 <math>\pm</math>6,9</b>

n.d.: no determinado, gen no cuantificado en esa muestra.

\*alelos del mismo gen.

