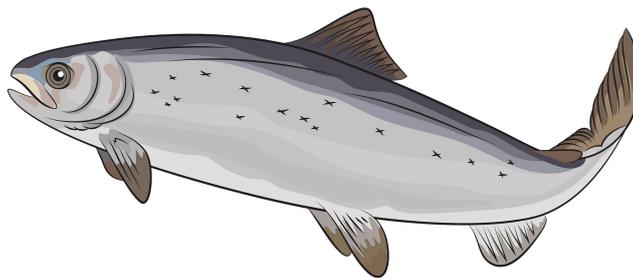




EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL SALMÓN DEL  
ATLÁNTICO (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) TRANSFERIDO AL AGUA DE  
MAR BAJO DOS ESTRATEGIAS DE ADAPTACIÓN Y DESAFIADO CON  
LA BACTERIA *Piscirickettsia salmonis* (Freidora, 1992).

Gabriela Alejandra González



**Director:** Dr. Alonso Medina

**Co-Directora:** Dra. Valentina M. Valenzuela

**Licenciatura en Biología Marina**

**Escuela Superior de Ciencias Marinas**

**Universidad Nacional del Comahue**

**2023**



EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL SALMÓN DEL  
ATLÁNTICO (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) TRANSFERIDO AL AGUA DE  
MAR BAJO DOS ESTRATEGIAS DE ADAPTACIÓN Y DESAFIADO CON  
LA BACTERIA *Piscirickettsia salmonis* (Freidora, 1992).

Gabriela Alejandra González

**Director:** Dr. Alonso Medina

**Co-Directora:** Dra. Valentina M. Valenzuela

**Licenciatura en Biología Marina**

**Escuela Superior de Ciencias Marinas-Universidad Nacional del Comahue**

**2023**

## *Agradecimientos*

*A mi familia mis papas, Hugo y Lidia por guiarme, ayudarme, aconsejarme y dejarme ser.*

*Por su apoyo condicional y amor. A mi hermana, Caro quien es mi fuerza, orgullo e inspiración. A mi abuela Isa, tia Silvia por cuidarme, amarme y malcriarme. A mi abuelo Miguel que cada vez que quería bajar los brazos nuestras ultima conversación venia a mi cabeza para darme fuerzas.*

*Al profesor Victor Fernandez, guro de vida por apoyarme durante toda mi carrera, motivarme a seguir adelante y no rendirme, por inspirarme a ser mejor.*

*A todos mis amigos, quienes estuvieron desde el momento cero Chiqui, Abril, Tebi y a quienes fui conociendo durante este camino Day, May, Giu por su amistad incondicional, comprensión y soportarme hasta en los peores momentos. A los acuaponicos por convertirse en mi familia San antoniense, gracias por todo el trabajo, risas y sábados acuponicos compartidos.*

*A mis hermanas de otra mama, Vicky, Nati, Pau por crecer juntas, alentarnos y mimarnos a pesar de la distancia.*

*A mi director Alonso y co-directora Valentina, por formarme y guiarme. Por toda la paciencia, por los conocimientos transmitidos.*

*Al Centro de Investigación Aplicada y Transferencia Tecnológica en Recursos Marinos  
“Almirante Storni” (CIMAS) por permitirme crecer tanto profesional como personalmente allí.*

*Al Centro Interdisciplinario de Investigaciones Acuícolas (INCAR) y al Laboratorio de  
Biotecnología y Genómica Acuática (LBGA) de la Universidad de Concepción (CB-UdeC) por el  
financiamiento para la realización de esta tesis. A toda su gente por hacerme sentir como en casa,  
por todos los conocimientos brindas, ayuda y consejos..*

*Y por su puesto que le voy a agradecer a mis perritos, mis hijos peludos de cuatro  
patitas, Didi, Blocky, Chicho, Leia.*

*Es muy difícil transitar la etapa universitaria si no se tiene buena gente apoyando, aconsejando y  
levantote luego de cada caída. Yo tuve la suerte de tenerlos a todos ustedes quitando las piedras  
del camino para que lo pudiera atravesar. Un placer hoy poder agradecerles de corazón por su  
amor y tiempo invertido en mi vida.*

*Gracias... TOTALES !*

## Índice

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1. Inicios y crecimiento de la acuicultura en el mundo .....	3
1.2. Acuicultura en Chile .....	4
1.3. Acuicultura en Argentina .....	5
1.4. Clasificación taxonómica, morfología y ciclo de vida de <i>Salmo salar</i> .....	9
1.5. Clasificación taxonómica, morfología y ciclo de vida de <i>Piscirickettsia salmonis</i> ...	14
1.6. Piscirickettsiosis en Salmones .....	15
1.7. Genes asociados al Sistema Inmune: TLR (receptores tipo Toll), MHCII (complejo mayor de histocompatibilidad II) y IL1 $\beta$ (interleucina 1 $\beta$ ) .....	17
1.8. Genes asociados al Estrés Oxidativo (ROS): Superóxido dimutasa (SOD) y Catalasa (CAT) .....	20
1.9. Genes asociados al transporte de hierro: Ferritina-M y Haptoglobina .....	22
1.10. Técnicas para el estudio genético: PCR convencional y PCR en tiempo real .....	24
2. OBJETIVO GENERAL .....	26
2.1. Objetivos específicos .....	26
3. HIPÓTESIS .....	27
4. PREDICCIONES .....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
5.1. Obtención y preservación de las muestras .....	28
5.2. Análisis de expresión génica .....	29
Extracción, cuantificación y determinación de ácido ribonucleico (ARN) .....	29
Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) .....	30
PCR convencional tiempo final .....	31
RT-qPCR .....	31
5.3. Análisis de datos .....	33
6. RESULTADOS .....	34
6.1. RT-qPCR de los genes TLR22_3, MHCII y IL1 $\beta$ de <i>S. salar</i> expuestos a distintas estrategias de transferencia a mar (shock salino y cambio gradual de salinidad) .....	34
6.2. RT-qPCR de los genes TLR22_3, Ss_MHCII y IL1 $\beta$ de <i>S. salar</i> infectados con <i>P. salmonis</i> en agua de mar .....	40
6.3. RT-qPCR de genes asociados a estrés oxidativo (SOD y CAT) y transporte de hierro (Ferritina-M y Haptoglobina) de <i>S. salar</i> infectados con <i>P. salmonis</i> en agua de mar .....	45
7. DISCUSIÓN .....	52
8. CONCLUSIÓN .....	57
9. BIBLIOGRAFÍA .....	59
10 ANEXOS .....	72
10.1. ANEXO I .....	72
10.2. ANEXO II .....	73
10.3. ANEXO III .....	74
10.4. ANEXO IV .....	75

## RESUMEN

Estudios previos sugieren una relación biológica entre dos de las principales causas de mortalidad en la acuicultura chilena: las enfermedades infecciosas y la etapa de esmoltificación. *Piscirickettsia salmonis* representa un problema para la acuicultura por su impacto económico e influencia en la sostenibilidad del ambiente acuático. *S. salar* representa el 50 % del cultivo total de peces en Chile, por lo que es esencial abordar esta problemática. Nuestro objetivo fue evaluar la respuesta inmunológica de ejemplares de *Salmo salar* transferidos a agua de mar mediante un cambio gradual de salinidad y un shock salino; y que posteriormente fueron inoculados con *Piscirickettsia salmonis*. Se tomaron muestras de riñón anterior, antes y después de la transferencia, así como luego de la exposición a *P. salmonis* para evaluar mediante RT-qPCR los cambios transcripcionales de genes asociados a la respuesta inmune, estrés oxidativo y transporte de hierro. Los resultados obtenidos durante el paso a agua de mar muestran una modificación en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune entre CGS y SS con respecto a AD para MHCII e IL1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ) y entre CGS y AD para TLR22\_3 ( $p < 0,05$ ). Además, se observó una diferencia significativa en la expresión de los genes SOD, CAT y Ferritina-M entre CGS y CGS25DPI ( $p < 0,05$ ), y la expresión de haptoglobina se vio modificada en todos los peces ( $p < 0,05$ ) infectados luego de la transferencia al agua de mar. Lo cual indica que, el método utilizado para la transferencia al agua de mar, interviene en la forma en que los peces responden a una infección bacteriana. El grupo más “robusto” inmunológicamente hablando fue el expuesto a un cambio gradual de salinidad debido a que no carga con la desregulación previa del shock salino. Esto podría significar una gran ventaja en la susceptibilidad a patógenos y supervivencia en mar de los salmónidos de cultivo.

Palabras claves: *Salmo salar*, *Piscirickettsia salmonis*, esmoltificación, variación transcripcional.

## ABSTRACT

Previous studies suggest a biological link between two of the main causes of mortality in Chilean aquaculture: Infectious diseases and the smoltification stage. *Piscirickettsia salmonis* is a problem for aquaculture due to its economic impact and influence on the sustainability of the aquatic environment. *S. salar* represents 50% of the total fish culture in Chile, so it is important to address this issue. Our objective was to evaluate the immune response of *Salmo salar* transferred to seawater by a gradual change in salinity and salt shock and subsequently challenge with *Piscirickettsia salmonis*. Samples of the head kidneys were collected before and after the transfer and after exposure to *P. salmonis* to investigate by RT-qPCR the transcriptional changes of genes related to the immune response, oxidative stress, and iron transport. Results obtained during transfer to seawater showed a change in the expression of genes related to immune response between CGS and SS concerning AD for MHCII and IL1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ) and between CGS and AD for TLR22\_3 ( $p < 0,05$ ). In addition, a significant difference was observed in the expression of the SOD, CAT, and Ferritin-M genes between CGS and CGS25DPI ( $p < 0,05$ ), and the expression of haptoglobin was modified in all study cases ( $p < 0,05$ ) of infected fish after transfer to seawater. This indicates that the method used for transfer to seawater intervenes in the way in which fish respond to a bacterial infection. The immunologically most “robust” group was exposed to a gradual change in salinity because it did not carry the previous deregulation of salt shock. This could be a major advantage for pathogen susceptibility and marine survival of farmed salmonids.

Keywords: *Salmo salar*, *Piscirickettsia salmonis*, smoltification, transcriptional variation.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Inicios y crecimiento de la acuicultura en el mundo

La cría de organismos acuáticos a pequeña escala tiene una larga historia desde tiempos remotos (Pillay y Kutty 2004). Tal como resalta la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], esta actividad que data de hace miles de años ha ido evolucionando sobre la base del conocimiento tradicional. Sus adelantos se han logrado gracias a las necesidades, las experiencias positivas y los errores de los acuicultores, en conjunto con los avances científicos logrados principalmente en los siglos XX y XXI (FAO 2023). En el último siglo, la acuicultura a nivel mundial, ha experimentado un crecimiento significativo y se ha consolidado como un desarrollo de gran relevancia.

La acuicultura se define como la actividad de cultivo y producción de organismos acuáticos (vegetales y animales) con ciclo de vida total o parcial desarrollado en el agua sea dulce, salobre o marina (Ley Argentina de Acuicultura N° 27.231 Art.5). Esta actividad surgió de la captura y mantenimiento en cautiverio tanto de peces silvestres como también de otros organismos acuáticos. Los primeros esbozos de la acuicultura, se observan en China durante el neolítico temprano en Jiahu, provincia de Henan (Costa-Pierce 2022). Nakajima et al. (2019) tras encontrar evidencia de espinas de peces, remarcan los inicios de la acuicultura alrededor del 6000 a.n.e. Diversos registros históricos, a mediados del 5000 a.n.e describen la cría de carpa común (*Cyprinus carpio*) en arrozales. Hay reportes de sistemas de estanques rudimentarios durante el año 2600 a.n.e. y se han hallado registros plasmados en cerámica donde se muestran ilustraciones de cría de carpa en estanques alrededor del año 1140 a.n.e. (Costa-Pierce 2022). Por tanto, a partir de los descubrimientos arqueológicos, podemos concluir que esta actividad comenzó hace alrededor de 8000 años.

El almacenamiento de peces en aguas salobres, “maricultura”, se remonta a la época medieval, cuando se establecieron por primera vez lagunas y estanques costeros para retener

los peces arrastrados por las mareas. Zeuner (1963) describe que en Agrigentum Sicilia, sobre el mar Mediterráneo se construyeron estanques de agua salada para el almacenamiento de peces (Costa-Pierce 2022). En el área donde hoy se encuentran Canadá y Estados Unidos se reportaron hallazgos de lo que serían las primeras mariculturas de almeja, en terrazas intermareales con paredes de roca, en las cuales se practicaban técnicas de cultivo de moluscos. Además, al norte de la isla de Quadra, Canadá, se determinaron algunos jardines de cultivo de almejas que tienen más de 3.500 años de antigüedad (Costa-pierce 2022).

En Bolivia, los peces eran capturados y atrapados en estanques rudimentarios lo suficientemente grandes como para que pudieran ser almacenados vivos. A lo largo de toda Sudamérica se practicaba una acuicultura rudimentaria de tipo extensiva, la cual se comenzó a complejizar con la introducción de salmónidos para la pesca deportiva y comercialización a finales del siglo XIX y principios del XX principalmente en Argentina y Chile (Barros y Gonzo 2004; Blatrix et al. 2018).

## **1.2. Acuicultura en Chile**

Carrera (2020) distingue tres períodos en el desarrollo y evolución de la acuicultura en Chile. Entre 1856 y 1920, se estableció un período de “gestión privada” influenciado por los mercados internacionales, marcando así el primer periodo. En 1905, el Estado Chileno comenzó a manifestar interés por la piscicultura e ingreso al país una pequeña camada de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) compradas en Hamburgo, Alemania. Debido a su avanzado estado de desarrollo, fueron desembarcadas en Buenos Aires, Argentina y transportadas por tren a Mendoza para luego, a caballo, atravesar la cordillera de los Andes hasta llegar a la piscicultura de río Blanco, en la provincia de Los Andes, Chile. Allí se produjo la primera eclosión de salmónidos en Chile dando inicio al cultivo en estanques y a su introducción en ríos y lagos. Once años más tarde, en la piscicultura ubicada a orillas del río Cautín, se desovó la primera camada de truchas arcoíris y

salmón del Atlántico, transformándose en la segunda piscicultura y en la cuna del desarrollo de la pesca deportiva en Chile (Carrera 2020).

El segundo periodo se enmarca entre 1921 y 1970, la “gestión estatal”, se impulsa el poblamiento de cuerpos de agua con peces a través de las investigaciones de la División de Caza y Pesca; el gobierno estableció los organismos dedicados a la investigación en acuicultura. Por último, entre 1971 y los 2000, la “gestión industrial” impulsa un nuevo periodo tras la instalación de pisciculturas con nuevas tecnologías. La acuicultura comercial se puso en marcha en la década de los 80’ con la política económica nacional que incentivó la actividad privada y la apertura al comercio internacional (FAO 2023). Desde entonces, la producción comenzó un constante aumento con una tasa promedio de crecimiento anual de la acuicultura entre 1997 y 2004 del 10,5 % (FAO 2023). En el año 2009, el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) fue el recurso más cultivado en Chile con una cosecha total de 204.013 t (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura [SERNAPESCA] 2009).

En los últimos años, el cultivo del salmón del Atlántico representó alrededor del 50 % del cultivo total de peces en Chile (año 2019: 49,19 %; año 2020: 51,49 %). Durante el año 2019 la producción total de *S. salar* fue de 1.227.459,57 t mientras que en el año 2020 fue de 1.375.743,70 t (SERNAPESCA 2021).

### **1.3. Acuicultura en Argentina**

La introducción de salmónidos en Sudamérica comenzó a principios del siglo XX, teniendo lugar en la Patagonia Argentina a partir de 1904 en simultáneo con las primeras reproducciones y siembras de pejerrey en diversos cuerpos de agua nacionales (Tulian 1908; Ministerio de agricultura, ganadería y pesca Argentina [MAGyP] 2022). La zona utilizada para la siembra de los primeros salmónidos fue el área de la cordillera Patagónica en las provincias de Río Negro y Neuquén (Lagos Nahuel Huapi, Traful, Gutiérrez y Correntoso).

La primera importación de ovas se concretó desde Nueva York en el verano de 1904 y

estuvo conformada por ovas embrionadas de pez blanco o corégono de lago (*Coregonus chupeaformis*), trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), trucha de lago (*Salvelinus namaycush*) y salmón encerrado (*Salmo salar sebago*) los cuales fueron sembrados en el criadero de Nahuel Huapi, construido para tal efecto. Entre los años 1904 y 1910 ocurrió una gran actividad de importación de ovas de diferentes especies ícticas para sus siembras (Tabla 1), pero principalmente de salmones del género *Oncorhynchus* y en menor medida, de especies no anádromas (Tulian 1908; Baigun 2001). En la provincia de Santa Cruz se construyó una piscicultura para favorecer la distribución de salmónidos en la Patagonia con fines de pesca deportiva. Esta instalación se mantuvo en funcionamiento hasta 1913 y se ingresaron aproximadamente 9 especies (Tulian 1908).

Con la inauguración del Centro de Piscicultura del Cerro Catedral en Bariloche durante el año 1932 (Actual Centro de Salmonicultura Bariloche) se renueva la cría de salmónidos, pero ya de manera selectiva, optando por aquellas especies que evidenciaron mejores resultados (Wegrzyn et al. 1997). Con el tiempo, se comprobó que solamente prosperaron cinco especies: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), trucha marrón (*Salmo trutta*), trucha de lago (*Salvelinus namaycush*), salmón encerrado (*Salmo salar sebago*) y trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) (Baigun y Quirós 1985; Navas 1987).

**Tabla 1.** Resumen de las especies ícticas introducidas en Argentina y su origen. El resultado de establecimiento de poblaciones/cría, se muestra con un signo + si el desarrollo fue óptimo y con un signo - en los casos que no evidenciaron buenos resultados. Tomado de Baigun y Quirós (1985).

Familia	Nombre Científico	Nombre Común	Año de Introducción	Origen	Resultado
Salmonidae	<i>Coregonus clupeaformis</i> (Mitchill)	Pez blanco	1904	USA	-
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum)	Trucha arco iris	1904	USA	+
	<i>Salmo salar</i> Linnaeus	Salmón del atlántico	1906	Inglaterra	-
	<i>Salmo salar</i> Linnaeus	Salmón encerrado	1904	USA	+
	<i>Salmo trutta</i> Linnaeus	Trucha marrón	1904	Inglaterra	+
	<i>Salvelinus fontinalis</i> (Mitchill)	Trucha de arroyo	1904	USA	+
	<i>Salvelinus namaycush</i> (Walbaum)	Trucha de lago	1904	USA	+
Cyprinidae	<i>Carassius auratus</i> (Linnaeus)	Carasius	?	?	+
	<i>Ctenopharygodon idella</i> (Valenciennes)	Carpa herbívora	1970	Japón	-
	<i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus	Carpa	?	?	+
Salmonidae	<i>Oncorhynchus kisutch</i> (Walbaum)	Salmón plateado	1906	USA	-
	<i>Oncorhynchus nerka</i> (Walbaum)	Salmón de lomo azul	1905	USA	-
	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (Walbaum)	Salmón quinnat	1905	USA	-
Centrarchidae	<i>Micropterus salmoides</i> (Lacepède)	"Black bass"	1959	USA	-
Poeciliidae	<i>Gambusia affinis</i> (Baird y Girard)	Madrecita	1943	?	+

A finales de los años 60' se instalan los primeros cultivos de salmónidos (trucha arcoíris) en tierra, con producciones que hasta la década de 1990 no superaron las 300 t. En esa época se concesionaron sitios para cultivo en jaulas en el embalse de Alicurá (Prov. de Río Negro - Neuquén) dando un salto productivo que alcanzó las 1000 tn a finales de dicha década (MAGyP 2022).

De acuerdo al reporte de la Dirección Nacional de acuicultura, el crecimiento de la acuicultura en el país se produjo de forma lenta y escalonada en los últimos 20 años. Hasta el año 2015, la producción total de acuicultura en el país fue de 4000 t, valor que fue reduciéndose gradualmente en los años posteriores entre 2015 y 2019, hasta las 2.123,20 toneladas producidas en el 2020, por un valor de primera venta estimado en \$ 771.889.170.

Este nivel de producción histórica puede atribuirse a diferentes factores, desde económicos y mercado, variables climáticas, problemas de disponibilidad de semilla, hasta el desconocimiento de la actividad y un bajo nivel de consumo de carne de pescado por parte de la sociedad argentina en sus hábitos (MAGyP 2022). Esta caída en el número total de producción acuícola, se debe a una disminución sostenida en la producción de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) en el norte de nuestro país, que pasó de 2000 t anuales a 900 t. Recién en 2021 el pacú tuvo una recuperación llegando a 1.200 t anuales. Por otro lado, la producción de trucha arcoíris pasó de 1.200 t en 2013 a 2.200 t en 2021, reemplazando las toneladas perdidas de pacú (Carciofi y Rossi 2021). Otras especies, como la carpa (*Cyprinus carpio*) y la tilapia (*Oreochromis sp.*), también sufrieron una baja en la producción, pero los volúmenes que se manejan son muy bajos: en ningún caso llegan a superar las 200 t (Revista Puerto 2022).

En cuanto a la maricultura, Argentina es uno de los pocos países latinoamericanos que no ha desarrollado los cultivos marinos a gran escala productiva (MAGyP s/f). Aunque es una práctica que se inició a comienzos del siglo XX, se está consolidando lentamente ya que las

potenciales innovaciones tecnológicas no se han desarrollado a la velocidad necesaria del contexto mundial de forma tal que se pueda posicionar al país competitivamente en el mercado (Burguener y Baron 2016). En el caso de la mitilicultura y ostricultura los primeros ensayos de cultivo de mejillón en el país, fueron realizados en forma experimental hacia fines de la década del 70' en la provincia del Chubut y posteriormente en Santa Cruz. En 1979 se comenzaron los ensayos en el Golfo San Matías, Río Negro, que culminaron en una producción comercial inicial de 2,5 t en los años 1987-1988. A principio de los años 2000 se realizó una cosecha de 15 t en Río Negro (MAGyP s/f). En el año 2021, Argentina experimentó un notorio incremento en la producción, alcanzando volúmenes de 68 t (Revista Puerto 2022).

En el caso de las especies ícticas, el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) mediante su programa de Maricultura y Biología Experimental (MARI) desarrolla tecnologías de cultivo de especies marinas autóctonas con importancia comercial tales como: besugo (*Pagrus pagrus*), lenguado (*Paralichthys orbignyanus*) y pez limón (*Seriola lalandi*) (MAGyP 2020; Spinedi s/f), con el fin de desarrollar tecnología sostenible desde el punto de vista de los ejes sociales, ambientales y económicos para la producción de organismos marinos.

El desarrollo de la maricultura en Argentina tiene el potencial de beneficiar a la economía, el medio ambiente y las comunidades locales, al mismo tiempo que contribuye a la seguridad alimentaria. Es importante que se lleve a cabo de manera sostenible, con un enfoque en la conservación de los recursos marinos y la protección de los ecosistemas costeros.

#### **1.4. Clasificación taxonómica, morfología y ciclo de vida de *Salmo salar***

La familia Salmonidae engloba dos subfamilias: Thymallinae, Thymallus, con solo 1 género restringido al agua dulce y a la subfamilia Salmoninae con formas potamódromas y

diadromas (Sanford 1990). La subfamilia Salmoninae cuenta actualmente con siete géneros. Hucho: Incluye el taimén (*Hucho taimen*), un salmón gigante que se encuentra en algunas regiones de Asia y Europa. Parahucho: Incluye el lenok (*Parahucho perryi*), que se encuentra en Asia. Brachymystax: Incluye el esturión siberiano (*Brachymystax lenok*), que también se encuentra en Asia. Salvelinus: Incluye truchas de agua fría, como la trucha de lago (*Salvelinus namaycush*) y la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*). Salvethymus, con una única especie (*Salvethymus svetovidovi*). Oncorhynchus: Incluye trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmones del Pacífico, como el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*). Y Salmo: donde encontramos al Salmon del Atlántico *Salmo salar*, Linnaeus 1758 (Tabla 2) (Caballero-Javierre 2013; National Library of Medicine [NLM] 2023).

El salmón del Atlántico, al igual que todos los salmónidos, se caracteriza por poseer una pequeña aleta delante de la aleta caudal, conocida como aleta adiposa debido a su estructura lipídica. Su cuerpo es hidrodinámico, plateado brillante (durante su estadía en el mar) y con el pedúnculo caudal delgado. Se diferencia de las truchas por poseer la cabeza más pequeña y manchas ovaladas en los flancos. Su peso y talla luego de un año en el mar pueden llegar a 8 kg. y 105 cm promedio (Astudillo-Maturana 2004; Caballero-Javierre 2013). En su etapa reproductiva presenta un marcado dimorfismo sexual, el cual se manifiesta en diferencias de coloración, los machos adquieren una tonalidad roja o rosada intensa en su cuerpo y cabeza, las hembras mantienen su coloración en tonos plateados. Los machos tienden a ser más grandes que las hembras en términos de longitud y masa corporal. La morfología de la mandíbula inferior en los machos cambia, tienden a alargarse y curvarse hacia arriba (“mandíbulas de gancho”) y desarrollan una quilla dorsal pronunciada, que es una estructura ósea en la parte superior de la cabeza que les otorga un aspecto más prominente. Estas diferencias son adaptaciones evolutivas que les permiten a ambos sexos cumplir sus respectivos roles en el proceso de reproducción y aumentar las probabilidades de éxito

reproductivo (Fig. 1) (Revenga 2020). Al ser una especie diádroma del tipo anádroma, el salmón del Atlántico atraviesa sus primeras fases de vida en agua dulce (AD) para luego migrar al mar en su vida adulta. Su ciclo vital se inicia con la reproducción a finales del otoño e inicios del invierno. Los huevos fertilizados se desarrollan durante el invierno y eclosionan al inicio de la primavera. Su primera fuente de alimento, es la reserva de su saco vitelino. Una vez consumido, el alevín, comienza con la alimentación exógena en agua dulce y continúa su desarrollo hasta llegar a juvenil “parr” momento en el cual se aprecia la aparición de las características manchas ovaladas en los flancos. Luego de un año o más, comienza el proceso de smoltificación (Fig. 2) (McCormick et al. 2011; Revenga 2020).

Para esta migración, la smoltificación engloba uno de los procesos biológicos más importante del ciclo de vida; se ven involucrados cambios fisiológicos, morfológicos, endocrinos y comportamentales (Astudillo-Maturana 2004). A los peces que se encuentran atravesando esta fase se los denomina “smolts”, término que deriva del escocés Smelt (un tipo de pez).

Los smolt, tienen escamas muy delicadas, las cuales pueden ser fácilmente desprendidas durante la transferencia al agua de mar (AM), lo que conlleva a que sean susceptibles a infecciones y estrés osmótico (Astudillo-Maturana 2004), ya que las primeras barreras de defensa inmunológica están compuesta por la piel y las branquias recubiertas por mucus (Magnadóttir 2010).

Debido a esto, es que la esmoltificación, representa un momento crítico para la industria de las pisciculturas. Una mala adaptación de los peces al agua de mar puede conducir a un aumento de la mortalidad. Si la transferencia de los peces de AD a AM se realiza en el momento incorrecto puede reducir la tasa de crecimiento y/o aumentar la susceptibilidad a patógenos y enfermedades (Muñoz-Jara 2010). Actualmente, la industria salmonera intenta llevar a los peces a un estado de post-smolt en sistemas de recirculación

acuícola (SRA) para luego continuar su cultivo en AM (Stefansson et al. 2008; Blancheton et al. 2013; Valenzuela-Muñoz et al. 2021). La implementación de los SRA en la etapa post-*smolt* busca acortar el ciclo productivo en agua de mar, para aminorar los desafíos sanitarios en los centros de cultivo y así reducir la mortalidad y la cantidad de tratamientos farmacológicos, lo cual es muy importante desde el punto de vista de la sostenibilidad (Appel 2023).

Aun que la smoltificación es ampliamente conocido por la comunidad científica, aún falta profundizar sobre el impacto de esta etapa del ciclo de vida del salmón en su sistema inmunológico. El conocimiento que tenemos sobre el genoma de *S. salar* facilita la exploración de la genómica en una amplia gama de entornos entre ellos la smoltificación (Lien et al. 2016). Estudios previos realizados en smolts y post-smolts (peces que se migraron al mar) produjeron evidencia de que la inmunidad se ve debilitada y se ha comenzado a demostrar que existe una asociación entre el aumento de enfermedades infecciosas que se producen tras el paso al agua de mar con una alteración de la respuesta inmune durante la esmoltificación (Álvarez et al. 2016; Domínguez-Marchán 2016; Vargas-Lagos et al. 2018). Esto abre la posibilidad de una relación biológica entre dos de las causas más importantes de muerte en la salmonicultura Chilena, las enfermedades infecciosas y la etapa de smoltificación, lo que denota la necesidad de más investigación científica sobre la relación entre estos dos campos de estudio (Morera et al. 2021).

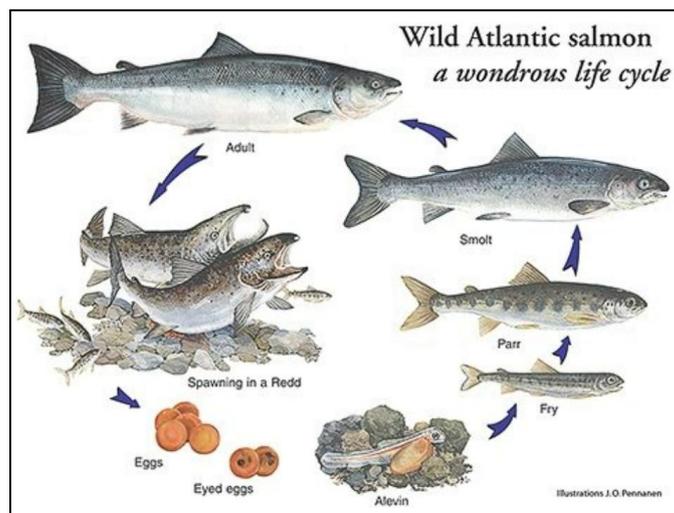
**Tabla 2.** Categorías taxonómica principales de *Salmo salar*.

Taxonomía	
Phylum	Chordata
Clase	Actinopterygii
Infracase	Teleostei
Superorden	Protacanthopterygii
Orden	Salmoniformes
Familia	Salmonidae
Subfamilia	Salmoninae
Genero	<i>Salmo</i>
Especie	<i>S. salar</i>
Linnaeus, 1758	

Fuente: WoRMS Editorial Board 2023.



**Figura 1.** Ilustración de cambios morfológicos de *Salmo salar* según su etapa de vida. A: adulto macho/hembra de vida marina. B: macho en etapa reproductiva, dulceacuicola. C: hembra en etapa reproductiva, dulceacuicola. D: alevín parr, dulceacuicola. Tomado de: Robin (s/f).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Salmo salar*, con su etapa adulta en agua de mar y su etapa reproductiva y juvenil en agua dulce. Tomado de Atlantic Salmon Federation [ASF] (s/f).

### 1.5. Clasificación taxonómica, morfología y ciclo de vida de *Piscirickettsia salmonis*

*Piscirickettsia salmonis* (Tabla 3) se clasifica taxonómicamente dentro de la clase Gammaproteobacteria, familia Piscirickettsiaceae, la cual comprende a un grupo de bacterias intracelulares que crecen en el citoplasma y ocasionalmente en el núcleo de células eucariontes. Son Gram-negativas, aeróbicas, pleomórfica (cocoides, en forma de barra o espiral) y comúnmente aisladas desde ambientes marinos. Esta familia contiene 5 géneros: *Piscirickettsia*, *Cycloclasticus*, *Hydrogenovibrio*, *Methylophaga* y *Thiomicrospir*, siendo *Piscirickettsia salmonis* integrante del género *Piscirickettsia* (Toledo-Pizarro 2008; Tacchi et al. 2011; Valenzuela-Yáñez 2014).

Este patógeno posee una amplia distribución geográfica la cual abarca el Pacífico noroeste, sureste y los océanos Atlántico nororiental y noroccidental. Se caracteriza por poseer una naturaleza intracelular facultativa, ser inmóvil y no capsulada (Gómez et al. 2009). Aunque son pleomórficas, preferentemente posee forma de bacilos cortos o cocos y se encuentra en forma esparcida, de a pares o en agrupaciones que le dan el aspecto de mórula; su tamaño varía entre 0,2 y 1,5  $\mu\text{m}$  de diámetro; y se reproduce por fisión binaria en vesículas

citoplasmáticas en las células hospedadoras (Mauel y Miller 2002; Fryer y Hedrick 2003; Valenzuela-Yáñez 2014).

La transmisión de este microorganismo es de forma horizontal, los peces infectados excretan la bacteria a través de la bilis, las heces y la orina, e ingresa a otro pez a través de la piel, las branquias y por vía oral sin requerir un vector (Quintanilla et al. 2021). La infección de *Salmo salar* por parte de *P. salmonis* se ve favorecida por el estrés ambiental y la alta densidad poblacional (Fryer y Hedrick 2003; Jara-Vidal 2011; Valenzuela-Yáñez 2014). *P. salmonis* es la responsable de causar la septicemia rickettsial salmonídea (SRS), más conocida como “Piscirickettsiosis”, la cual es probablemente una de las enfermedades más importantes que afecta a la industria del salmón en Chile (Almendras y Fuentealba 1997).

**Tabla 3.** Categorías taxonómicas principales de *Piscirickettsia salmonis*.

Taxonomía	
Reino	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Thiotrichales
Familia	Piscirickettsiaceae
Género	<i>Piscirickettsia</i>
Especie	<i>P. salmonis</i>
	Freidora 1992
Fuente: WoRMS Editorial Board 2023.	

### 1.6. Piscirickettsiosis en Salmones

La Piscirickettsiosis causada por *P. salmonis* afecta a los salmónidos durante su etapa en el mar en los cultivos chilenos. El mayor pico de infección se ve en otoño y comienzos del invierno (marzo-agosto), típicamente entre los 12 y 16 °C. Un segundo pico, más leve que el anterior, puede presentarse a fines de la primavera (Valenzuela-Yáñez 2014). El ingreso de la

bacteria es a través de la piel, pero también se ha descrito el ingreso por las branquias, llegando finalmente al parénquima de distintos órganos (Cáceres-Cruz 2018).

Los signos clínicos de la piscirickettsiosis son múltiples e inespecíficos: generalmente los peces expresan un comportamiento aletargado, se ubican en las esquinas de las jaulas de cultivo y la superficie del agua (Valenzuela-Yáñez 2014). Externamente se pueden evidenciar lesiones macroscópicas tales como: descamación, palidez branquial, hemorragias en la base de las aletas, nódulos y úlceras en la piel de hasta 2 cm de diámetro, anorexia, exoftalmia (ojos saltones) y oscurecimiento de la piel (Larenas et al. 2000). Internamente, los hospedadores de este patógeno, sufren de esplenomegalia (bazo aumentado de tamaño) con presencia de nódulos de color cremoso amarillento, además de un aumento de tamaño en el riñón y corazón. También existe un aumento en el volumen del líquido cefalorraquídeo; además el tubo digestivo se encuentra sin contenido y presentan pequeñas manchas de color rojo vivo denominadas petequias (Valenzuela-Yáñez 2014).

La Piscirickettsiosis es una enfermedad de difícil tratamiento por lo que lo mejor es tomar medidas generales de prevención temprana y control de infecciones bacterianas, tales como: una reducción del estrés de los peces, trabajar con bajas densidades, reducir al mínimo las manipulaciones, extraer constantemente los peces muertos, moribundos o anómalos. Otras medidas adicionales, como el uso de antibióticos y vacunas, han sido empleadas para la prevención y en algunos casos para el tratamiento de esta enfermedad (Valenzuela-Yáñez 2014).

Los métodos que nos permiten diagnosticar y confirmar esta enfermedad en peces, se basan en signos y síntomas generales además de hallazgos histológicos usando técnicas histoquímicas para la detección del patógeno en frotis o secciones de tejido. Estas técnicas son rápidas y ampliamente utilizadas, pero no son específicas (Almendras y Fuentealba 1997). Es por ello que actualmente se comenzó a emplear la reacción en cadena de la polimerasa (PCR,

por sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*) la cual es una herramienta rápida, altamente sensible y específica, que permite la detección de ADN genómico. El PCR es útil para la detección de este patógeno en las primeras etapas de la infección lo que permite la prevención de un brote y la implementación de medidas profilácticas (Marshall et al. 1998; Valenzuela-Yáñez 2014).

### **1.7. Genes asociados al Sistema Inmune: TLR (receptores tipo Toll), MHCII (complejo mayor de histocompatibilidad II) y IL1 $\beta$ (interleucina 1 $\beta$ )**

El sistema inmune protege a los organismos contra enfermedades mediante la identificación y eliminación de patógenos. Todos los vertebrados poseen el sistema inmune innato (SII) y el sistema inmune adquirido o adaptativo (SIA). Los peces, hablando en términos evolutivos, son los primeros gnatostomados en desarrollar los elementos clave para la adquisición del SIA (Olabeuena 2000).

La respuesta humoral, es una parte del sistema inmune adquirido y se refiere a la respuesta mediada por moléculas solubles en la sangre, como anticuerpos. Los peces producen anticuerpos (inmunoglobulinas) que pueden neutralizar patógenos. La producción de anticuerpos es llevada a cabo principalmente por los linfocitos B en respuesta a la exposición a antígenos (Olabeuena 2000).

Es decir, el SIA es responsable de proporcionar inmunidad a patógenos específicos y está basado en la acción coordinada de células inmunes especializadas. Su mecanismo de acción consiste en una inmunidad mediada por células, especialmente linfocitos T que intervienen en la defensa contra patógenos intracelulares. Los linfocitos T pueden reconocer y eliminar las células infectadas gracias a los T-receptores que poseen en su superficie. Para generar una diversidad suficiente de receptores, los linfocitos T realizan un proceso llamado reordenamiento génico (Nakanishi et al. 2015). Por otro lado, en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés, *major histocompatibility complex*) se

encuentran las células presentadoras de antígenos. Su función es precisamente presentar fragmentos de antígenos a los linfocitos T. Cuando una célula presentadora de antígenos detecta un patógeno, lo fagocita, lo descompone en fragmentos más pequeños y luego presenta estos fragmentos en su superficie en asociación con las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (López-Martínez et al. 2005).

Es decir, los linfocitos T son responsables de identificar antígenos, y esta identificación se lleva a cabo mediante la activación del MHC, un proceso que está mediado por citoquinas (Nakanishi et al. 2015; Rozas-Serri 2022). Las citoquinas son proteínas y glucoproteínas producidas por células que actúan como reguladores de las respuestas inmunitaria e inflamatoria. Desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio que es definido por el balance entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Filella et al. 2002). Se ha reportado la capacidad de *P. salmonis* de modular la expresión de genes como IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, entre otros, responsable de codificar las proteínas precursoras de las citoquinas (Rozas-Serri et al. 2018; Oliver et al. 2023).

Se debe tener en cuenta que existen dos clases de MHC: MHCI que se encuentran en todas las células nucleadas y MHCII: presentes en linfocitos B y macrófagos (López-Martínez et al. 2005). Se sabe que *P. salmonis* tiene la capacidad de inhibir la vía MHCI pero activa la vía MHCII, por lo que su estrategia es evadir la respuesta inmune mediada por células T (Rozas-Serri 2022). En el caso de patógenos como *P. salmonis*, al ser bacterias que se replican dentro de las células huésped, son inaccesible para los anticuerpos que se encuentran en la matriz extracelular, por lo que la inmunidad mediada por células desempeña un papel clave (Rozas-Serri 2022).

Cabe resaltar que el SIA, es esencial para una inmunidad duradera pero a la hora de ejercer una respuesta inmediata suele retrasarse su activación (Magnadóttir 2010). Por lo que los peces dependen fuertemente del SII, el cual proporciona la primera línea de defensa

inmunitaria frente a la presencia de organismos patógenos (Álvarez-Pellitero 2008; Lizárraga-Velázquez et al. 2018).

El SII se divide en tres mecanismos de defensa: físicos (barrera de mucus en la piel y branquias), celulares (células NK, agranulares; besofilos; monocitos, macrófagos; eosinófilos y granulocitos neutrófilos, ambos presentan “explosión respiratoria” y formación de ROS) y humorales (crean un complejo de ataque a la membrana y la lisis celular del patógeno) (Magnadóttir 2010). Los patógenos intracelulares, como *P. salmonis*, plantean desafíos especiales para el sistema inmunológico ya que los factores humorales, como los anticuerpos no pueden contactarlos directamente (Rozas-Serri 2022).

El inicio de respuesta del sistema inmune está dado por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos por parte de receptores reconocedores de patrones (PRR) entre ellos los receptores tipo Toll (TLR, por su sigla en inglés, *Toll-like receptor*) (Álvarez-Pellitero 2008; Oliver et al. 2023). Las señales iniciadas por la interacción de los TLR en conjunto con patrones microbianos específicos activan una respuesta inflamatoria, por lo tanto, representan un componente clave ante una infección microbiana (Lien y Ingalls 2002).

En peces, los TLR, se han diversificado debido a varios mecanismos evolutivos, mostrando una notable especificidad reconociendo patrones conservados en los microorganismos. Han sido identificados alrededor de 20 TLR en varias especies como: el pez cebra (*Danio rerio*), pez dorado (*Carassius auratus*), pez globo (*Tetraodontidae*), lenguado (*Paralichthys dentatus*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Magnadóttir 2010; Rauta et al. 2014). En *S. salar* infectados con *P. salmonis* se ha descrito cómo los TLR reconocen e inducen la expresión de genes implicados en una rápida respuesta inflamatoria (Oliver et al. 2023).

Los patógenos intracelulares, como *P. salmonis* pueden modificar las células huésped para promover su crecimiento, manipulando las vías de señalización e induciendo la apoptosis

en macrófagos y células similares a monocitos (Zúñiga et al. 2020; Oliver et al. 2023). Sin embargo el SII de los peces puede responder a los agentes infecciosos activando varios mecanismos antimicrobianos, incluidas cascadas de señalización que activan mecanismos defensivos como la secreción de citoquinas proinflamatorias (Rozas-Serri et al. 2018; Oliver et al. 2023). Los diferentes patrones de expresión de genes relacionados con la inmunidad en riñón de salmón del Atlántico infectado con *P. salmonis* confirman la activación de la respuesta inmune innata y la inhibición de la respuesta inmune adaptativa (Rozas-Serri et al. 2018).

### **1.8. Genes asociados al Estrés Oxidativo (ROS): Superóxido dimutasa (SOD) y Catalasa (CAT)**

Los organismos superiores poseen un mecanismo de defensa antioxidante, que se inmuno regula ante la presencia de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*). Las ROS son moléculas altamente reactivas debido a un electrón no apareado en el último orbital, radical libre (Carvajal-Carvajal 2015). Cuando se produce un desequilibrio entre dichas especies y los sistemas de defensa antioxidante, se produce el denominado estrés oxidativo a nivel celular. Esto conlleva a modificaciones de macromoléculas como lo son los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Coronado et al. 2015; Valladares-Morales et al. 2018). Es decir, el estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad del organismo para neutralizar y eliminar estas moléculas dañinas. Se debe tener en consideración que son productos naturales del metabolismo celular, pero en exceso provocan un desbalance causando un daño al organismo. Dicho desbalance se asocia con el desarrollo de diversas enfermedades. Tacchi et al. (2011) expone que, ante una infección bacteriana, los macrófagos de los peces responden reduciendo el oxígeno a anión superóxido ( $O_2^-$ ); estos radicales libres crean un entorno intracelular tóxico que protege al huésped contra los microbios invasores (Tacchi et al. 2011).

El mecanismo de defensa antioxidante está constituido en primer lugar por enzimas, como la superóxido dismutasa (SOD) la cual posee la función de captar el radical superóxido por medio de una dismutación y convertirlo en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), posteriormente la acción de otras enzimas como la catalasa (CAT) lo neutralizan y lo convierten en agua, la cual ya no representa un peligro para el organismo (Pérez y Pérez de Alejo 2000). En peces se ha observado cómo el mecanismo de respuesta inmune innata incrementa los niveles de expresión de los genes SOD y CAT asociados el estrés oxidativo en respuesta a factores de estrés (Valenzuela-Muñoz 2018).

Durante una infección bacteriana, los macrófagos de los peces son activados y responden reduciendo el oxígeno a anión superóxido, el cual sufre una serie de reacciones redox que conducen a la formación de radicales libres que crean un ambiente intracelular tóxico para proteger al huésped de microorganismos invasores (Venketaraman et al. 2003). Es decir, los peces pueden combatir patógenos aumentando la producción ROS y activando el sistema antioxidante en paralelo (Birnie-Gauvin et al. 2017).

Pedro et al. (2019) en su estudio realizado sobre *S. salar* infectado con *P. salmonis* encontraron que en hígado y músculo se produce una activación transcripcional de genes implicados en el estrés oxidativo con perfiles de expresión específicos de cada tejido dependiendo del tiempo de infección, observando un aumento en la expresión relativa de SOD y CAT como respuesta a esta infección, con un aumento de hasta nueve veces en la expresión de catalasa en el hígado a los 21 días pos-infección, que posteriormente cayó a niveles basales. En cambio, en músculo se observó un aumento al día 2 pos-infección. Esto indica que el  $H_2O_2$  generado por la SOD en el hígado y el músculo de los salmones en respuesta a la infección por *P. salmonis* sería transformado en productos no tóxicos para la célula por la CAT (Pedro et al. 2019).

Esto concuerda con lo reportado por otros estudios, donde al día 2 y 14 pos-infección con *P. salmonis* hay una sobre expresión en hígado, músculo y riñón anterior de *Salmo salar* de genes implicados en la respuesta antioxidante (Rise et al. 2004; Tacchi et al. 2011). Por otro lado, en otros estudios se observó una regulación al azar de la catalasa; lo que eventualmente conlleva a la muerte celular y necrosis, dicho efecto se observa en diversos tejidos de peces moribundos infectados por *P. salmonis* (Tacchi et al. 2011). Rozas-Serri (2022) encontró que *P. salmonis* induce una inhibición significativa de la respuesta antioxidante que promovería la generación de un nicho oxidativo.

Es decir, según la información ya existente se puede sugerir que los peces podrían emplear un mecanismo efectivo para inhibir la infección por *P. salmonis* al conservar la capacidad de neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto se lograría mediante la activación de enzimas antioxidantes y la regulación positiva de la respuesta antioxidante.

### **1.9. Genes asociados al transporte de hierro: Ferritina-M y Haptoglobina**

La regulación de los niveles intracelulares de metales es una necesidad común a todos los organismos vivos para satisfacer sus requerimientos fisiológicos. Uno de estos elementos vitales es el hierro (Fe), que desempeña un papel crucial en numerosos procesos biológicos. En bacterias, el Fe es un co-factor de muchas enzimas y como tal desempeña un papel crucial en diversos procesos fisiológicos, como la replicación del ADN, la transcripción y el metabolismo central (Andreini et al. 2008). Esta característica ha sido utilizada por organismos hospedadores para hacer frente a diversos patógenos, desarrollando una estrategia defensiva basada en la esencialidad de estos iones (Hood y Skaar 2012). Este tipo de estrategia de defensa es conocida como inmunidad nutricional y se basa en la limitación de nutrientes, creándose una lucha entre el hospedador y el patógeno por la disponibilidad limitada de los mismos (Hood y Skaar 2012; Valenzuela-Miranda 2019). La restricción del hierro juega un papel fundamental debido a su participación en múltiples procesos

fisiológicos como los antes mencionados (Ganz 2007; Valenzuela-Muñoz et al. 2017; Valenzuela-Muñoz 2018). Los patógenos deben obtener este componente nutricional del huésped, por otra parte el hospedador debe restringir el acceso de los patógenos al hierro para fortalecer sus defensas y limitar el desarrollo de los invasores (Weinberg 2009; Valenzuela-Muñoz y Gallardo-Escárte 2017). En los vertebrados, el exceso de hierro está controlado por proteínas como la haptoglobina, ferritina, transferrina y hepcidina las cuales toman una relevancia significativa en condiciones patológicas (Anderson y Vulpe 2009; Valenzuela-Muñoz et al. 2020).

El hierro es clave para las bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo este elemento esencial para la multiplicación bacteriana dentro de los organismos huéspedes, es por ello que para *P. salmonis* representa un nutriente esencial de su crecimiento y se han descrito varias vías mediante las cuales lo adquieren de los salmones del Atlántico (Calquín et al. 2017). Los cambios en la expresión de genes relacionados con el agotamiento celular del hierro, así como el bajo contenido de hierro y carga bacteriana en el riñón anterior de *S. Salar* infectado con *P. salmonis* sugieren que la privación de este elemento es un mecanismo de defensa de inmunidad innata (Pulgar et al. 2015).

En salmónidos infectados con *P. salmonis* se produce un aumento de la expresión de genes asociados con la privación de hierro por la hepcidina y haptoglobina. Lo que sugiere una acumulación de hierro en las células del huésped, lo cual sería un sistema de defensa por parte del salmón del Atlántico para limitar la disponibilidad de hierro a *P. salmonis*. Es decir, *S. salar* acumula el hierro, limitando su disponibilidad a *P. salmonis* (Wandersman y Stojiljkovic 2000; Valenzuela-Miranda y Gallardo-Escárte 2016). Esta haptoglobina se une a la hemoglobina libre evitando la actividad oxidativa del hospedador y la adquisición de hierro de la hemoglobina por parte del patógeno (Andreini et al. 2008; Hood y Skaar 2012). A través de esta vía de inmunidad innata los salmones del Atlántico puede limitar el hierro disponible

para *P. salmonis* inhibiendo su proliferación, aunque se sabe que no todos los individuos de *S. salar* presentan la misma capacidad para realizar esta restricción (Valenzuela-Miranda 2019; Caruffo et al. 2020).

Pulgar et al. (2015) demostró cómo disminuye el contenido de hierro en *S. salar* después de 14 días de ser infectado con *P. salmonis*, lo que indica una correlación entre la carga bacteriana y el contenido de hierro en el riñón anterior después de la infección. Esto es un aspecto relevante porque se ha demostrado que el agotamiento de hierro limita el crecimiento de esta bacteria intracelular. La disminución de la abundancia relativa de transcripciones que codifican proteínas implicadas en la unión intracelular del hierro no hemático sugiere que la infección por *P. salmonis* induce cambios en el metabolismo del hierro de los salmones del Atlántico (Pulgar et al. 2015).

#### **1.10. Técnicas para el estudio genético: PCR convencional y PCR en tiempo real**

La PCR es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Es una potente herramienta de biología molecular que puede ser usada para la identificación de especies y cepas de diversos microorganismos. Esta técnica tiene por objetivo generar una gran cantidad de un ADN de interés, es decir amplificar una secuencia de ADN particular a partir de una pequeña cantidad de ADN molde. Los primeros en utilizar esta técnica fueron Mullis y colaboradores en 1983, usaron ADN polimerasa I de *Escherichia coli*. Luego en 1976, se aisló la ADN polimerasa termoestable y termoactiva conocida como *Taq* polimerasa, a partir de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en ambientes acuáticos con temperaturas cercanas a los 100 °C. Esta nueva enzima permitió la simplificación y automatización de la PCR, sin necesidad de adicionar polimerasa en cada uno de los ciclos (Mullis y Faloona 1987; Saiki et al. 1988). La PCR consiste en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. Se comienza con una sucesión de ciclos de amplificación en los que el ácido nucleico molde se desnaturaliza, se híbrida con cebadores

específicos (primers) y por último se extiende para generar una cadena complementaria utilizando una polimerasa de ADN termoestable (Taq ADN polimerasa) (Jiménez y Collada 2000).

Si se emplea como ácido nucleico molde el ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, por el contrario, si se utiliza ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés, *Reverse Transcription-PCR*). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa controlada por la enzima *transcriptasa reversa*, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. Utilizar ADNc es útil cuando queremos analizar la expresión del ARNm de algún gen de interés (Tamay de Dios et al. 2013; Cornejo-Romero et al. 2014; Álvarez-Gómez 2016).

Al finalizar la PCR, se debe corroborar si se amplificó la secuencia blanco. Para ello, los productos de la PCR son analizados mediante electroforesis en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Reynoso et al. 2022).

Si bien la PCR es una de las técnicas más usadas, presenta algunas limitaciones, como la dificultad de cuantificar el producto y el riesgo de provocar contaminación en el laboratorio durante la electroforesis. Para hacer frente a estas desventajas, es que se ha desarrollado la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) (Vinueza-Burgos 2009).

Tanto la PCR como la qPCR son dos técnicas que parten de un principio similar, pero que son metodológicamente diferentes: la primera genera resultados cualitativos mientras la segunda, cuantitativos (Tamay de Dios et al. 2013). Los análisis basados en qPCR combinan la PCR convencional con tecnologías de detección fluorescente para registrar las amplificaciones en tiempo real durante cada ciclo de la PCR (Smith y Osborn 2009). Es decir,

esta técnica amplifica al mismo tiempo que cuantifica las moléculas de ADN (qPCR) o ADNc (RT-qPCR).

Este proceso se monitorea en cada ciclo, en tiempo real gracias a un indicador fluorescente. El aumento de la fluorescencia se representa frente al número de ciclo para generar una curva de amplificación a partir de la cual se pueden determinar los valores del umbral del ciclo (CT, por sus siglas en inglés, *cycle threshold*), el cual indica el ciclo a partir del que se comienza a detectar la amplificación de ADN de manera confiable (Postollec et al. 2011). En esta prueba, el producto se mide al final de cada ciclo y los datos pueden ser analizados mediante un software calculando la expresión génica relativa de varias muestras (Heid et al. 1996). La cuantificación relativa se utiliza cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Estos cambios se basan en los niveles del ARNm del gen blanco comparados con un gen de referencia (gen *housekeeping*) que no cambia su expresión a pesar de los cambios fisiológicos que pudieran ocurrir por diversas causas, ej. una infección bacteriana. Los datos son expresados como relativos al gen de referencia (Tamay de Dios et al. 2013).

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la respuesta inmunológica de *smolts* de *Salmo salar* transferidos a agua de mar mediante cambio gradual de salinidad y shock salino e inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### **2.1. Objetivos específicos**

**O.E 1:** Evaluar mediante RT-qPCR los cambios transcripcionales de los genes TLR22\_3, MHCII y IL1 $\beta$  asociados a la respuesta inmune de *S. salar* expuestos a distintas estrategias de transferencia a mar (shock salino y cambio gradual de salinidad).

**O.E 2:** Evaluar mediante RT-qPCR los cambios transcripcionales de los genes TLR22\_3, MHCII y IL1 $\beta$  asociados a la respuesta inmune de *S. salar* expuestos a distintas estrategias de transferencia a agua de mar (shock salino y cambio gradual de salinidad) luego de ser inoculados con *P. salmonis*.

**O.E 3:** Evaluar mediante RT-qPCR cambios transcripcionales de genes asociados a estrés oxidativo (SOD y CAT) y transporte de hierro (Ferritina-M y Haptoglobina) en *S. salar* ante dos estrategias de transferencia a agua de mar (shock salino y cambio gradual de salinidad) luego de ser inoculados con *P. salmonis*.

### 3. HIPÓTESIS

El proceso de transferencia a agua mar de *smolts* de salmón Atlántico genera un impacto negativo en su respuesta inmune.

### 4. PREDICCIONES

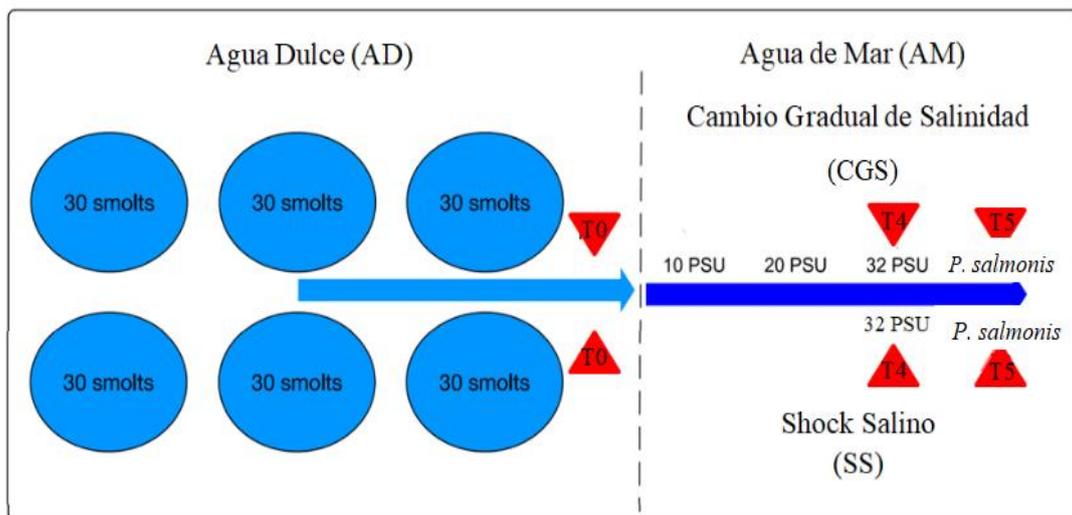
- ✓ Los *smolts* de *S. salar* expuestos a shock salino y cambio gradual de salinidad van a presentar una desregulación en su sistema inmune con respecto a *smolt* en agua dulce.
- ✓ Los *smolts* transferidos a agua de mar en forma de shock salino tendrán una menor capacidad de hacer frente a patógenos en comparación de los *smolt* transferidos mediante un cambio gradual de salinidad.

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los análisis de laboratorio fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola (LBGA), ubicado en el Centro de Biotecnología - Universidad de Concepción, Chile. Perteneciente al Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR). El diseño experimental y las muestras utilizadas para este estudio son parte de un proyecto FONDECYT postdoctoral desarrollado en el LBGA.

## 5.1. Obtención y preservación de las muestras

Se utilizaron muestras de riñón anterior de smolt de *Salmo salar* brindadas por el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola, Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, las cuales se encuentran fijadas en RNAlater (Thermofisher, Waltham, MA, EE.UU.) y almacenadas a -80 °C para su aislamiento de ácido ribonucleico (ARN). Los smolt de *S. salar*, fueron transferidos a agua de mar mediante cambio gradual de salinidad (GSC) aumentando 10 PSU por semana hasta llegar a 32 PSU, y otro grupo transferido mediante un shock salino (SS), directamente de agua dulce (AD) a 32 PSU (Fig. 3). Luego de dos semanas de la transferencia a AM los peces fueron inoculados con *P. salmonis*, mediante inyección intraperitoneal con una concentración de bacterias de  $10^8$  cel/ml. En ambos casos se tomaron muestras antes (T4) y después de ser inoculados con *P. salmonis* (T5). Además de muestras de un grupo control el cual se mantuvo en AD sin infectar (T0).



**Figura 3.** Diagrama de diseño experimental que muestra las condiciones CGS y SS para el salmón del Atlántico *smolts* (n=30 peces/tanque). Los puntos de muestra se indican con una flecha roja. T0 indica la toma de muestras del grupo en agua dulce sin infectar (AD). Para ambos grupos de salmón del Atlántico en agua de mar (CGS y SS), T4 corresponde a la toma de muestra después de la transferencia a agua de mar a 32 PSU previo a la infección con *P. salmonis*, T5 para ambos grupos, corresponde a la toma de muestra 25 días pos-infección con *P. salmonis* (CGS25DPI y SS25DPI).

## **5.2. Análisis de expresión génica**

### **Extracción, cuantificación y determinación de ácido ribonucleico (ARN)**

Para la extracción de ARN, se utilizó el protocolo establecido por el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola - UdeC (Anexo I). Se tomaron 3 muestras de riñón al azar por cada tratamiento y se las cortó en una placa de vidrio sobre hielo, tomando de 50 a 100 mg de tejido y añadiéndolo a los tubos Eppendorf de 2 mL con 1 mL de trizol y una esfera de cerámica autoclavada. A continuación, se homogeneizó y trituró la muestra usando TissueLyser® a una frecuencia de 24/s durante 5-10 minutos.

Luego, se agregó 200 µL de cloroformo, se incubó en hielo durante 3 minutos y se procedió a centrifugar a 12,000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo de 1,5 mL, en el cual se añadió 500 µL de isopropanol y se incubó nuevamente durante 20 minutos a -20 °C. Después se centrifugó a 12,000 g durante 10 minutos a 4 °C para obtener la formación del pellet. El pellet se lavó con 1 mL de etanol al 75 %, homogeneizándolo suavemente con una micropipeta. Posteriormente, se centrifugó a 7,500 g durante 5 minutos a 4 °C. Se secó la muestra durante 5 minutos y se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas, homogeneizándola con una micropipeta. Finalmente, se cuantificó mediante un espectrofotómetro Thermo Scientific® NanoDrop® One evaluando la concentración y las razones 260/280 y 260/230 (Tabla 4). Además, se determinó la integridad mediante electroforesis en gel MOPS (ácido 3-(N-Morfolino)-propanesulfónico) al 1,2 %. Las imágenes de los geles fueron capturadas utilizando el sistema iBright® 1500 (Imaging System de Invitrogen®).

**Tabla 4.** Relación 260/280 y 260/230 arrojada por Thermo Scientific® NanoDrop® One

Muestra	A260/A280	A260/A230
AD	2,05	2,39
AD	1,82	1,92
AD	2,11	2,32
CGS	2,13	2,36
CGS	2,1	2,12
CGS	2,03	2,18
SS	2,09	2,26
SS	2,12	2,29
SS	2,12	2,23
CGS25DPI	2,1	2,32
CGS25DPI	2,08	2,31
CGS25DPI	2,06	2,29
SS25DPI	2,01	1,77
SS25DPI	1,94	2,32
SS25DPI	2,06	2,3

#### **Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)**

Se utilizaron las muestras previamente almacenadas a -80 °C que cumplieron con los criterios integridad y pureza, a una concentración de 200 ng/μl de ARN cada uno. Siguiendo el protocolo establecido por el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola - UdeC (Anexo II), en un tubo estéril de 200 μl por cada grupo a analizar, se agregaron 9 μl de Máster Mix (kit “RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis” marca Thermo Scientific®), 1 μl de ARN (200 ng/μL) y se homogeneizó. Luego se colocaron los tubos en un termociclador (Esco Swift Maxi®) con programa 25 °C - 5 min; 42 °C - 60 min; 70 °C - 5min. Para verificar la correcta síntesis de cDNA se realizó PCR en tiempo final con un set de partidores de control endógeno factor de elongación, Om\_EF1a-F2/R2 (cebador hacia adelante F y cebador reverso R) previamente estandarizado a Tm 58 °C. Posteriormente, su integridad fue determinada mediante electroforesis en gel TBE de agarosa al 1,5 %.

### **PCR convencional tiempo final**

Para la realización del PCR en tiempo final se siguió el protocolo establecido por el Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola - UdeC (Anexo III). Se utilizaron pools de ADNc de los cinco grupos a analizar (AD, CGS, SS, CGS25DPI y SS25DPI) almacenados a -80°C, a los cuales se les adicionó la mezcla de reacción de PCR compuesta por (Master Mix 1x12,5 µl): Buffer 10X 1,25 µl, BSA 10 ug/ul 0,25 µl, dNtPS 10 mM 0,25 µl, MgCl<sub>2</sub> 25 mM 0,75µl, agua libre de nucleasas 7,6 µl, Taq ADN polimerasa 0,15 ug/ml (Thermo Scientific®), genes a analizar que se muestran en la Tabla 5 Primer F 0,625 µl y R 0,625 µl, ADNc 10,625 µl. Además se evaluó un set de cebadores de *housekeeping* previamente estandarizados (Om\_EF1a) con concentración de 10 µM. T<sub>m</sub> 60 °C; por 35 ciclos. La amplificación de ADNc se realizó en un termociclador (Thermal Cycler Veriti96-Wel Applied Biosystems®) con un programa estándar: 95 °C 1 min; 95 °C 30 seg; T<sub>m</sub> según primer 30 seg; 72 °C 30 seg; 72 °C 30 seg x 35 ciclos; 72 °C 7 min. Luego se visualizaron los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

### **RT-qPCR**

La realización del PCR en tiempo real se hizo según protocolo del Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola – UdeC (Anexo IV). Se utilizaron las muestras de ADNc almacenadas a -80°C, se descongelaron en hielo. En un tubo estéril de 1,5 mL se preparó el Mix de la reacción (1 x 10 µL) compuesto por: kit de qPCR PowerUP SYBR Green Master mix 2x 5 µl; agua libre de nucleasas 2,75 µL; genes a analizar (Tabla 5) F 0,625 µL y R 0,625 µl y ADNc 1 µL. Se cargó la placa evitando la formación de burbujas y homogeneizando con la pipeta. Se selló la placa con film óptico y se colocó en un termociclador (Quant Studio® 3 Real- Time PCR System) siguiendo el programa térmico establecido por Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola.

**Tabla 5.** Lista de genes analizados, cebadores, secuencia (5'-3'), Tm, su implicancia en el organismo y referencia bibliográfica de su uso en otros estudios.

Marcador	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm	Implicancia en el organismo	Referencia bibliográfica
Catalasa	Om_CAT_F1	GGTTCAGAC CCTACTCAAC AA	60	Estrés oxidativo: Eliminación de peróxido de hidrógeno	Vera- Bizama et al. 2015, Valenzuela- Muñoz 2018
	Om_CAT_R1	GGTGGAAAGT TAAGGCATC AC			
Superóxido dismutasa	Om_SOD_F1	CCGTATTCTT TGAGCAGGA G	54	Estrés oxidativo: Dismutación de radicales superóxidos	Vera- Bizama et al. 2015, Valenzuela- Muñoz 2018
	Om_SOD_R1	AGCCGTTGGT GTTGTCTC			
Ferritin M	SS_FerritinM_F1	TATCACCACG ATTGCGAAG C	60	Transporte de hierro	Vera- Bizama et al. 2015, Valenzuela- Muñoz et al. 2017
	SS_FerritinM_R1	CTCGTCGCTG TTCTCCTTGA			
Haptoglobina	Ss_haptogloblin_F1	GGCATGTAG GCAGAGAGC TT	58	Transporte de hierro	Valenzuela- Muñoz et al. 2020
	Ss_haptogloblin_R1	GGAGAATGT GTGCTTTGGG G			
Receptor tipo toll	Ok_TLR2_2_3_F	TGCCTTCTAA CCCTCTCCCT CGCTGCTCTC	61	Sistema inmune: Receptor reconocedor de patrones	Valenzuela- Muñoz et al. 2020
	Ok_TLR2_2_3_R	AGACAGGAA G			
Complejo mayor de histocompatibi- lidad II	Ss_MHCI_I_F	CTCCTCAAAG GACCTGCAG G	60	Sistema inmune: Reconocedor de antígenos	Valenzuela- Miranda & Gallardo- Escárate 2016
	Ss_MHCI_I_R	TCAGGACCTT TGTTCAGGC			
Interleucina-1 $\beta$	Om_IL1B_F6	GATCTGGAG GTATCCCATC A	60	Sistema inmune: Generador de respuestas pro- inflamatorias	Valenzuela- Muñoz et al. 2020
	Om_IL1B_R6	CACAGCACTCT CCAGCAAGA			

### 5.3. Análisis de datos

A partir de la RT-qPCR se tomaron los datos del umbral térmico (CT, por sus siglas en inglés, *cycle threshold*), el cual denota el ciclo a partir del cual se comienza a detectar fluorescencia. Es decir, es el ciclo en el que la amplificación de ADN es detectable de manera confiable. Se cuantificó la expresión relativa de cada gen mediante el cálculo  $\Delta\Delta C_t$ , utilizando el control endógeno Om\_EF1a F1 y R2. Se realizó el cálculo de  $\Delta\Delta C_t$ , según la ecuación 1:

$$\begin{aligned}CT &= CT \text{ gen "x"} - CT \text{ factor de elongación} \\ \Delta\Delta C_t &= CT - \text{mínimo valor de CT obtenido para el gen "x"}\end{aligned}$$

**Ecuación 1.** Cálculo de  $\Delta\Delta C_t$  a partir de los valor de CT arrojados por la RT-qPCR.

Posteriormente, para evaluar las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales los resultados fueron procesados utilizando el Software *Statistica* (Versión 13.0). Se evaluó el supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk - Test W y de homocedasticidad utilizando el test de Levene. Luego se empleo la prueba paramétrica ANOVA de una vía y prueba de Tukey como test *post-hoc* en los casos en que se identificaron diferencias significativas. El test Kruskal-Wallis no paramétrico, se utilizó en los casos en los que los supuestos de normalidad y homosedasticidad no fueron cumplidos. El nivel de significancia para todos los test estadísticos fue de  $P < 0,05$ .

Todos los test estadísticos fueron realizados con los valores de  $\Delta\Delta C_t$  obtenidos mediante la ecuación 1. En las tablas y figuras a continuación el  $\Delta\Delta C_t$  de cada gen se denota como: CT acompañado por el nombre del gen analizado.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. RT-qPCR de los genes TLR22\_3, MHCII y IL1 $\beta$ de *S. salar* expuestos a distintas estrategias de transferencia a mar (shock salino y cambio gradual de salinidad)

Se evaluó la diferencia en la expresión de los genes TLR22\_3, MHCII y IL1 $\beta$ , asociados con la respuesta inmune utilizando los marcadores Ok\_TLR22\_3, Ss\_MHCII y Om\_IL1 $\beta$  respectivamente en salmones del Atlántico (*S. salar*) expuesto a dos estrategias diferentes de transferencia a agua de mar, cambio gradual de salinidad (CGS) y shock salino (SS) además del grupo control que se mantuvo en agua dulce (AD).

Antes de realizar los test estadísticos se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad con los test de Shapiro-Wilk - Test W y el Test de Levene respectivamente. Para los tres marcadores analizados no se rechaza el supuesto de normalidad ( $P > 0,05$ ) y el supuesto de homocedasticidad ( $P > 0,05$ ) (Tabla 6). Se realizó ANOVA de una vía para establecer las diferencias significativas y Tukey como análisis *post-hoc* para encontrar adonde se establecían las diferencias significativas.

Para los tres genes se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en su expresión durante la transferencia a agua de mar bajo dos estrategias diferentes, cambio gradual de salinidad y shock salino (Tabla 7).

La expresión del marcador Ok\_TLR22\_3 varió significativamente entre los peces que se transfirieron a agua de mar mediante shock salino y los que se mantuvieron en agua dulce. No se encontraron diferencias en la expresión entre los otros tratamientos, aunque se observa una tendencia de aumento en la expresión de los genes durante la transferencia a agua de mar (CGS y SS) con respecto a los de AD (Fig. 4).

En la expresión del marcador Om\_IL1 $\beta$ , se observó una diferencia significativa entre el grupo de agua dulce (AD) y los dos grupos de peces bajo el tratamiento de transferencia a

agua de mar. Ambos se expresaron menos que en AD. No se vio diferencia significativa entre el CGS y SS (Fig. 5).

La expresión del marcador Ss\_MHCII fue significativamente diferente en todos los tratamientos. En los peces que se transfirieron a agua de mar se ve un aumento de la expresión de este gen con respecto a los que se mantuvieron en agua dulce (Fig. 6).

Para Ss\_MHCII y Ok\_TLR22\_3, se observó una mayor expresión relativa durante la transferencia a agua de mar mediante shock salino y cambio gradual de salinidad en comparación a la expresión de los salmones que se mantuvieron en agua dulce. Por el contrario, Om\_IL1B disminuyó su expresión en los peces que atravesaron por el proceso de transferencia a agua de mar en comparación con los que no lo hicieron (Fig. 7).

**Tabla 6.** Test de normalidad Shapiro-Wilk - Test W y Test de Levene .

CT Gen	Test normalidad			Test homocedasticidad			
	N	W	P	MS Effect	MS error	F	P
CT Om_IL1B	9	0,9058	0,2873	0,0127	0,0034	3,7828	0,0865
CT Ss_MHCII	9	0,8583	0,0919	0,0034	0,0012	2,8576	0,1343
CT Ok_TLR22_03	9	0,9694	0,8899	0,0018	0,0031	0,5869	0,5851

**Tabla 7.** ANOVA de una vía.

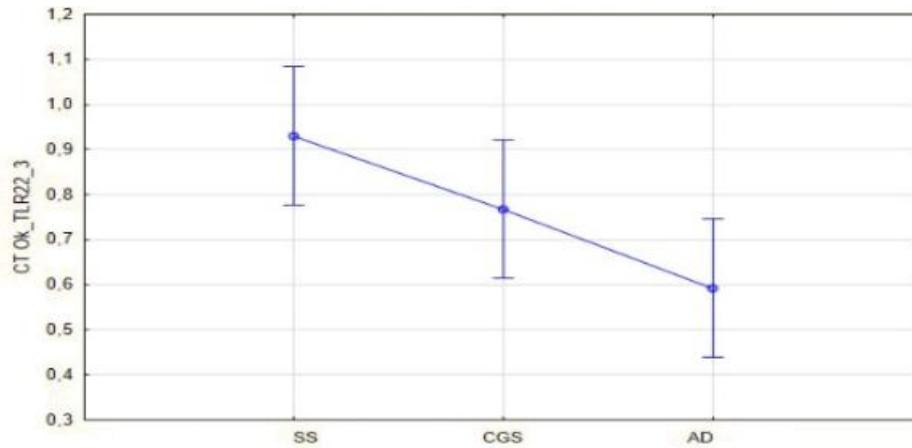
ANOVA de una vía - CT Om_IL1B					
Efecto	SS	gl.	MS	F	P
Inter	2,6639	1	2,6639	209,1886	0,000007
Intra	0,4154	2	0,2077	16,3103	0,00375
Error	0,0764	6	0,0127		

ANOVA de una vía - CT Ok_TLR22_03					
Efecto	SS	gl.	MS	F	P
Inter	5,2442	1	5,2442	447,5309	0,000001
Intra	0,1718	2	0,0859	7,3317	0,024482
Error	0,0703	6	0,0117		

ANOVA de una vía - CT Ss_MHCII					
Effect	SS	gl.	MS	F	P
Intercept	1,630758	1	1,630758	462,6387	0,000001
Trat	0,325436	2	0,162718	46,1623	0,000227
Error	0,021149	6	0,003525		



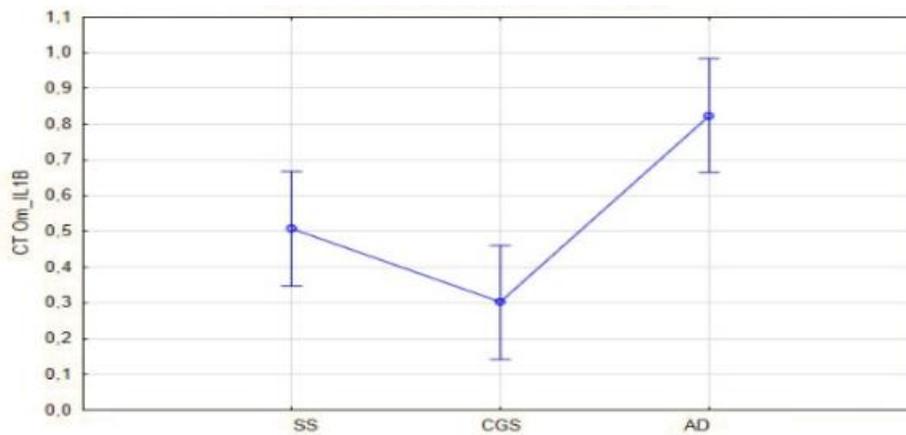
Prueba de diferencia significativa de Tukey

$\Delta\Delta$  CT marcador Ok\_TLR22\_3

Error: entre MS= 0,1172, df= 6,0000

Tratamiento	SS	CGS	AD
SS	0,93047	0,234706	<b>0,020418</b>
CGS	0,234706		0,196917
AD	<b>0,020418</b>	0,196917	

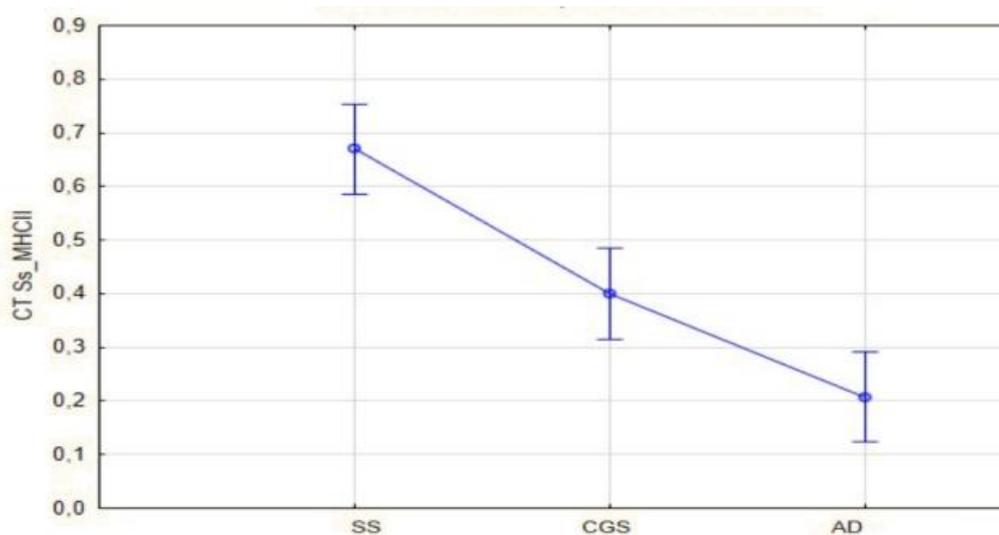
**Figura 4.** Análisis *post-hoc* Tukey, prueba de la diferencia honestamente significativa con intervalos de confianza de 95% para  $\Delta\Delta$ CT Ok\_TLR22\_3. SS: shock salino, CGS: cambio gradual de salinidad, AD: agua dulce.



Prueba de diferencia significativa de Tukey  
 $\Delta\Delta$  CT marcador Om\_IL1 $\beta$   
 Error: entre MS= 0,1273,  $df= 6,0000$

Tratamiento	SS	CGS	AD
SS	0,50738	0,142777	0,032322
CGS	0,142777	0,30119	0,003285
AD	0,032322	0,003285	0,82359

**Figura 5.** Análisis *post-hoc* Tukey, prueba de la diferencia honestamente significativa con intervalos de confianza de 95% para  $\Delta\Delta$ CT Om\_IL1 $\beta$ . SS: shock salino, CGS: cambio gradual de salinidad, AD: agua dulce.

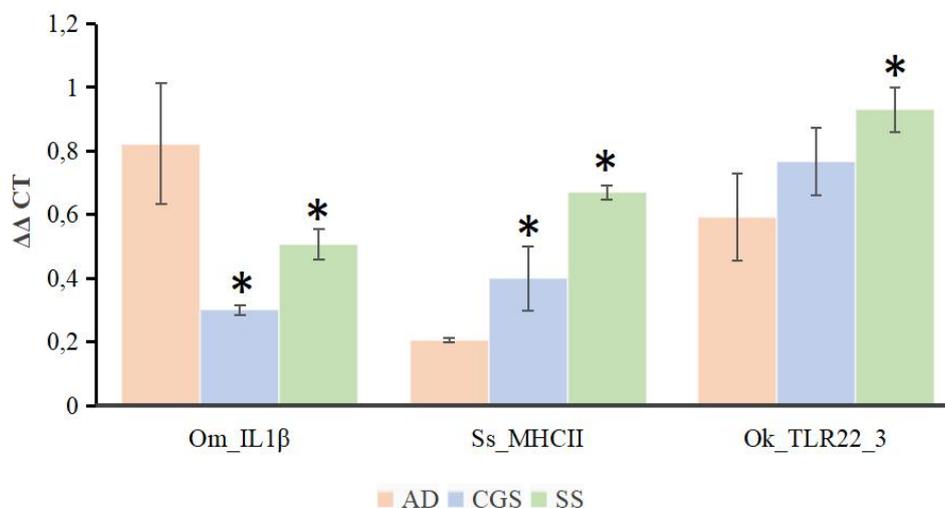


Prueba de diferencia significativa de Tukey  
 $\Delta\Delta$  CT marcador Ss\_MHCII  
 Error: entre MS= 0,00352, df= 6,0000

Tratamiento	SS	CGS	AD
	0,67043	0,39977	0,20681
SS		0,003537	0,000384
CGS	0,003537		0,01723
AD	0,000384	0,01723	

**Figura 6.** Análisis *post-hoc* Tukey, prueba de la diferencia honestamente significativa con intervalos de confianza de 95% para  $\Delta\Delta$ CT Ss\_MHCII. SS: shock salino, CGS: cambio gradual de salinidad, AD: agua dulce.

## Genes asociados a la Respuesta Inmune



**Figura 7.** La gráfica muestra los valores promedios y la barra el desvió estándar de la expresión relativa cada gen analizado. Ok\_TLR22\_3 AD:  $0,59\pm 0,14$ ; CGS:  $0,77\pm 0,11$ ; SS:  $0,93\pm 0,07$ . Ss\_MHCII AD:  $0,21\pm 0,01$ ; CGS:  $0,40\pm 0,10$ ; SS:  $0,67\pm 0,02$ . Om\_IL1β AD:  $0,82\pm 0,19$ ; CGS:  $0,3\pm 0,02$ ; SS:  $0,51\pm 0,05$ . Con un \* se indica P-valor < 0.05 en comparación con AD. SS: shock salino, CGS: cambio gradual de salinidad, AD: agua dulce.

### 6.2. RT-qPCR de los genes TLR22\_3, Ss\_MHCII y IL1β de *S. salar* infectados con *P.*

#### *salmonis* en agua de mar

Se evaluó la diferencia en la expresión de los genes TLR22\_3, MHCII y IL1β, asociados con la respuesta inmune utilizando los marcadores Ok\_TLR22\_3, Ss\_MHCII y Om\_IL1β respectivamente en salmón del Atlántico (*S. salar*) expuesto a dos estrategias diferentes de transferencia a agua de mar, cambio gradual de salinidad (CGS) y shock salino (SS) y luego de 25 días de ser inyectados con la bacteria intracelular *P. salmonis*, denominados CGS25DPI y SS25DPI, respectivamente.

Antes de realizar los test estadísticos se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad con los test de Shapiro-Wilk - Test W y el Test de Levene, respectivamente. Para el marcador Ss\_MHCII no se rechaza el supuesto de normalidad ( $P > 0,05$ ), para Om\_IL1β y Ok\_TLR22\_3 no se cumplen con los supuestos de normalidad ( $P < 0,05$ ). El

supuesto de homoscedasticidad no se rechaza en ninguno de los tres casos analizados ( $P > 0,05$ ) (Tabla 8).

Se realizó ANOVA de una vía (Tabla 9) para establecer las diferencias significativas y tukey como análisis *post-hoc* para establecer a donde se encontraban las diferencias en el marcador que cumple todos los supuestos (Fig. 8). Para los dos marcadores que no cumplieron los supuestos se utilizó el test estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis.

Se identificaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la expresión de los tres genes analizados en peces infectados con *P. salmonis* en comparación con los no infectados en SS.

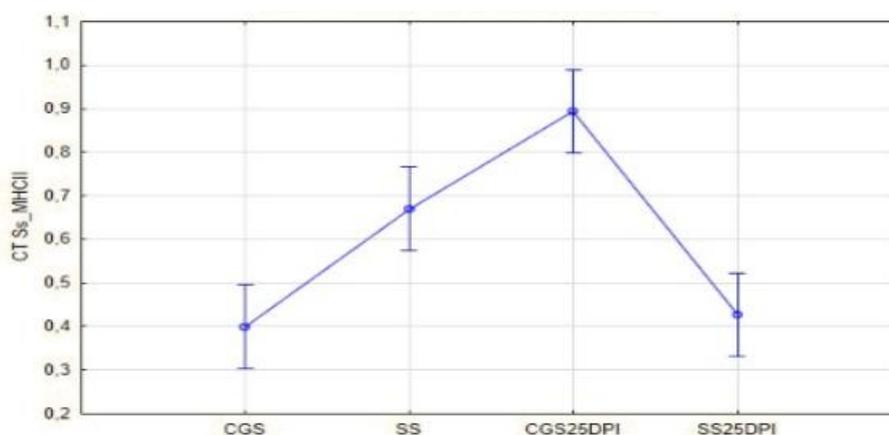
En relación al marcador Ss\_MHCII, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los peces infectados en agua de mar y los no infectados, independientemente de la estrategia de transferencia utilizada. Respecto al marcador Om\_IL1 $\beta$ , se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los peces no infectados e infectados transferidos al agua de mar mediante shock salino, mientras que no hubo diferencias significativas en aquellos transferidos mediante cambio gradual de salinidad (Fig. 9). El marcador Ok\_TLR22\_3 mostró un patrón similar al de Om\_IL1 $\beta$ , con diferencias significativas en la expresión entre peces no infectados e infectados transferidos mediante shock salino (Fig. 10). Se evidenció una mayor expresión de Ok\_TLR22\_3 y Om\_IL1 $\beta$  en los peces en SS, mientras que el marcador Ss\_MHCII presentó una mayor expresión en CGS25DPI (Fig. 11).

**Tabla 8.** Test de normalidad Shapiro-Wilk - Test W y Test de homocedasticidad de Levene.

CT marcador	Test normalidad			Test homocedasticidad			
	N	W	P	MS Effect	MS error	F	P
CT Om_IL1B	12	0,8225	0,0171	0,0005	0,0002	2,2752	0,1569
CT Ss_MHCII	12	0,9425	0,5313	0,0023	0,0012	1,8663	0,2136
CT Ok_TLR22_03	12	0,8536	0,0407	0,0024	0,0011	2,2352	0,1615

**Tabla 9.** Test ANOVA de una vía

ANOVA de una vía - CT Ss_MHCII					
Efecto	SS	gl.	MS	F	P
Inter	4,2876	1	4,2876	821,6432	0
Intra	0,4825	3	0,1608	30,8187	0,000096
Error	0,0417	8	0,0052		



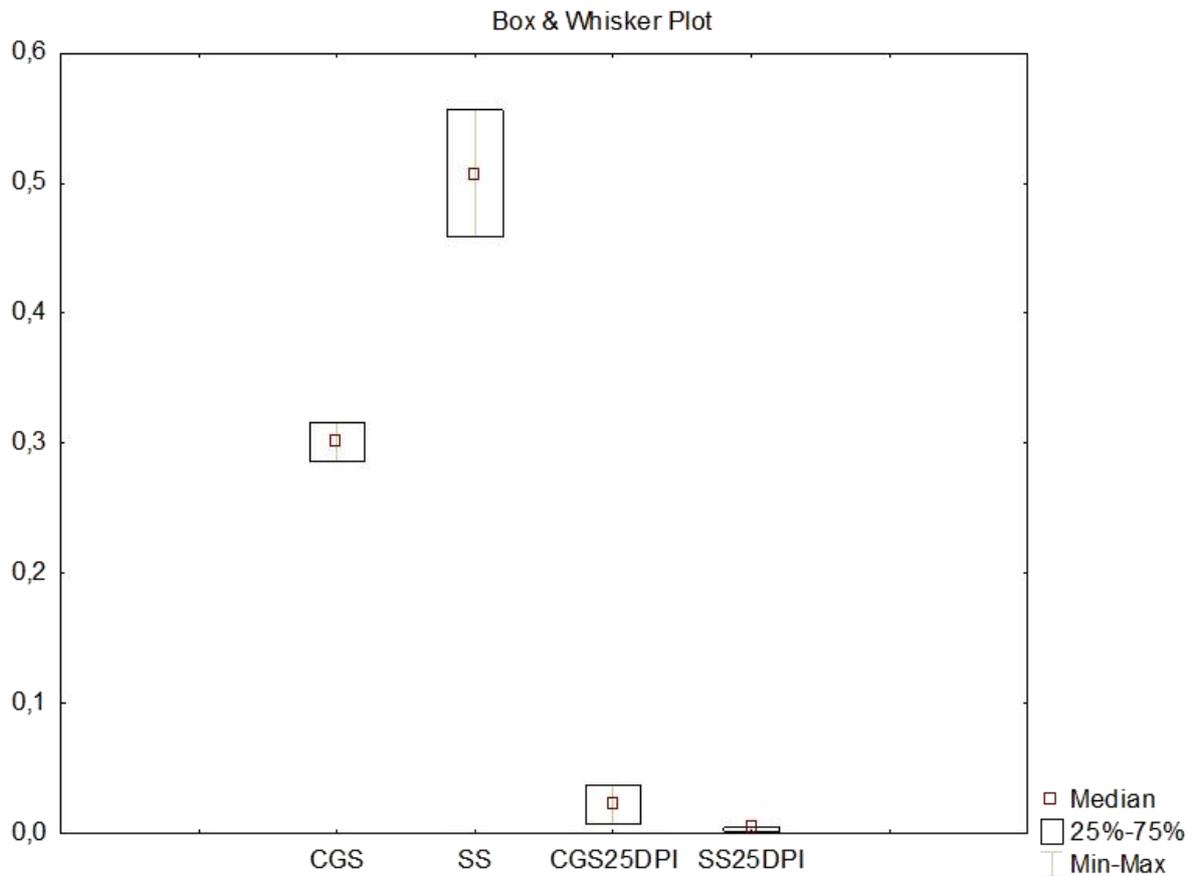
Prueba de diferencia significativa de Tukey

$\Delta\Delta$  CT marcador Ss\_MHCII

Error: entre MS= 0,00522, df= 8,0000

Tratamiento	CGS 0,39977	SS 0,6743	CGS25DPI 0,89330	SS25DPI 0,42748
CGS		0,007839	0,000341	0,963718
SS	0,007839		0,022586	0,014332
CGS25DPI	0,000341	0,022586		0,000407
SS25DPI	0,963718	0,014332	0,000407	

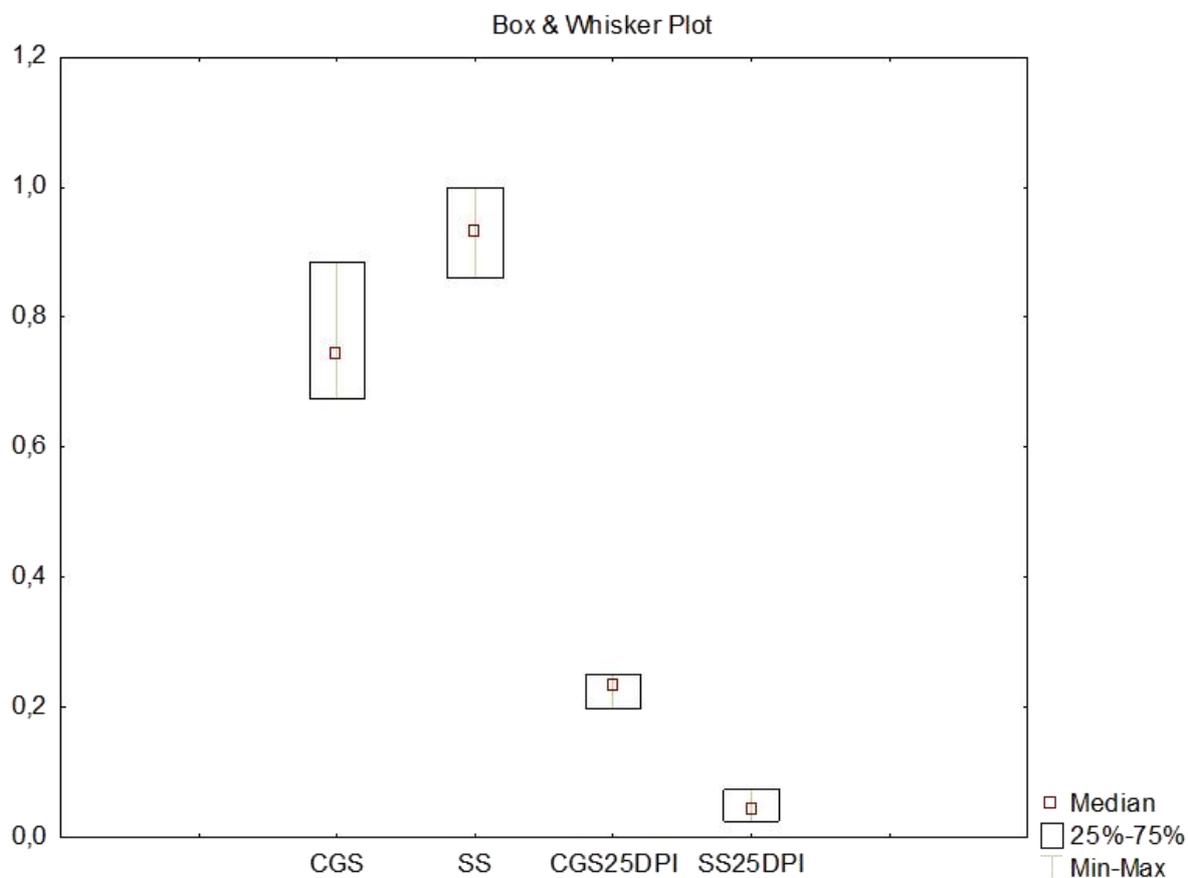
**Figura 8.** Análisis *post-hoc* Tukey, prueba de la diferencia honestamente significativa con intervalos de confianza de 95% para  $\Delta\Delta$ CT Ss\_MHCII. SS: shock salino; CGS: cambio gradual de salinidad; SS25DPI: shock salino 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*; CGS25DPI: cambio gradual de salinidad 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*.



Test Kruskal-Wallis; Comparación múltiple p valor  
 $\Delta\Delta$  CT marcador Om\_IL1 $\beta$   
 Test H (3, N=12) = 10,42105 p=0,0153

Tratamiento	CGS R:8,000	SS R:11,000	CGS25DPI R:5,0000	SS25DPI R:2,0000
CGS		1,000000	1,000000	0,249240
SS	1,000000		0,249240	<b>0,013407</b>
CGS25DPI	1,000000	0,249240		0,249240
SS25DPI	0,249240	<b>0,013407</b>	1,000000	

**Figura 9.** Test no paramétrico Kruskal-Wallis y diagrama de caja para  $\Delta\Delta$ Om\_IL1 $\beta$ . El punto central representa la mediana, las cajas delimitan los cuartiles y las barras los extremos máximo y mínimo. SS: shock salino; CGS: cambio gradual de salinidad; SS25DPI: shock salino 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*; CGS25DPI: cambio gradual de salinidad 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*.

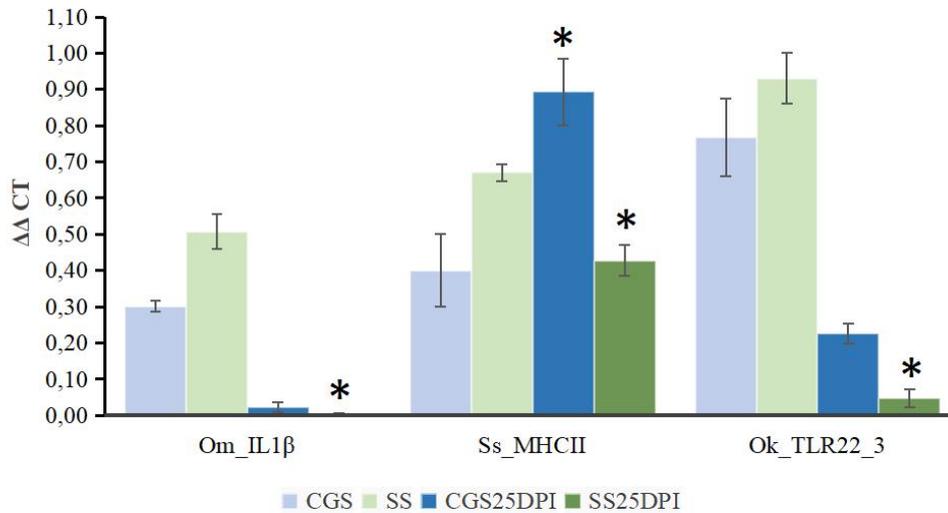


Test Kruskal-Wallis; Comparación múltiple p valor  
 $\Delta\Delta$  CT marcador Ok\_TLR22\_3  
 Test H (3, N=12) =9,974359 p=0,0188

Tratamiento	CGS R:8,333	SS R:10,667	CGS25DPI R:5,0000	SS25DPI R:2,0000
CGS		1,000000	1,000000	0,188703
SS	1,000000		0,325473	<b>0,019445</b>
CGS25DPI	1,000000	0,325473		1,000000
SS25DPI	0,188703	<b>0,019445</b>	1,000000	

**Figura 10.** Test no paramétrico Kruskal-Wallis y diagrama de caja para Ok\_TLR22\_3. El punto central representa la mediana, las cajas delimitan los cuartiles y las barras los extremos máximo y mínimo. SS: shock salino; CGS: cambio gradual de salinidad; SS25DPI: shock salino 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*; CGS25DPI: cambio gradual de salinidad 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*.

## Genes asociados a la Respuesta Inmune



**Figura 11.** La gráfica muestra los valores promedios y la barra el desvió estándar de la expresión relativa cada gen analizado. Ok\_TLR22\_3 CGS:  $0,77\pm 0,11$ ; SS:  $0,93\pm 0,07$ ; CGS25DPI:  $0,23\pm 0,03$ ; SS25DPI:  $0,05\pm 0,02$ . Ss\_MHCII CGS:  $0,40\pm 0,10$ ; SS:  $0,67\pm 0,02$ ; CGS25DPI:  $0,89\pm 0,09$ ; SS25DPI:  $0,43\pm 0,04$ . Om\_IL1β CGS:  $0,3\pm 0,02$ ; SS:  $0,51\pm 0,05$ ; CGS25DPI:  $0,02\pm 0,01$ ; SS25DPI:  $0,004\pm 0,002$ . Con un \* se indica P-valor < 0.05 en comparación con los tratamientos no infectados, CGS y SS, CGS25DPI y SS25DPI respectivamente. CGS: Cambio gradual de salinidad; SS: shock salino; CGS25DPI: cambio gradual de salinidad 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*; SS25DPI: shock salino 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*.

### 6.3. RT-qPCR de genes asociados a estrés oxidativo (SOD y CAT) y transporte de hierro (Ferritina-M y Haptoglobina) de *S. salar* infectados con *P. salmonis* en agua de mar

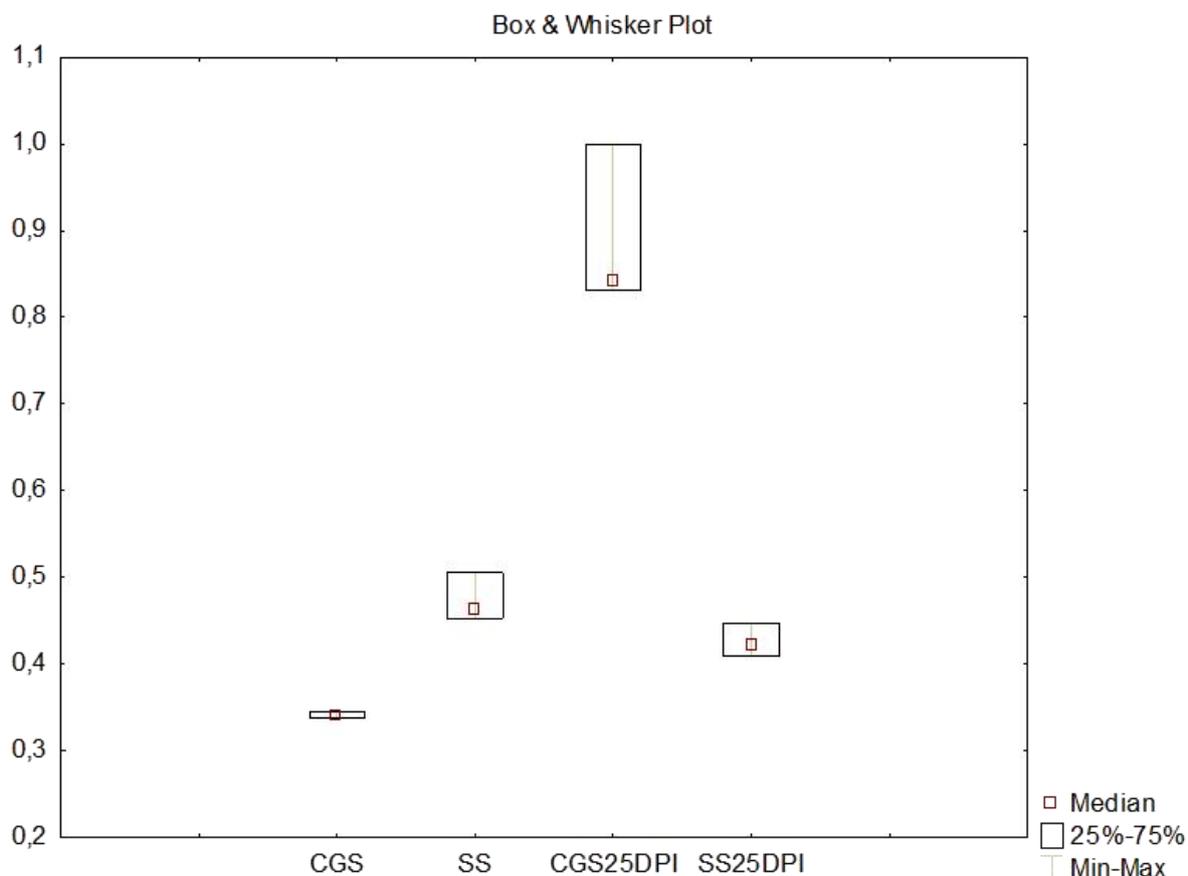
Se evaluó la diferencia en la expresión de los genes SOD y CAT mediante los marcadores Om\_SOD y Om\_CAT, respectivamente asociados al estrés oxidativo y mediante los marcadores Ss\_FerritinM y Ss\_Haptoglobin se evaluó la expresión de los genes Ferritin-M y Haptoglobina asociados al transporte de hierro, en los salmones del Atlántico (*S. salar*) expuestos a dos estrategias diferentes de esmoltificación, cambio gradual de salinidad y shock salino antes y después de 25 días de ser inyectados con la bacteria intracelular *P. salmonis*. Se establecieron dos tratamientos, cambio gradual de salinidad y shock salino con dos niveles cada uno: sin infectar (CGS y SS) y 25 días pos-infección (CGS25DPI y SS25DPI).

Antes de realizar los test estadísticos se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad con los test de Shapiro-Wilk - Test W y el Test de Levene respectivamente. El supuesto de normalidad se cumplen para Om\_SOD, Ss\_FerritinM y Ss\_Haptoglobina ( $P > 0,05$ ). Mientras que Om\_CAT no lo cumplen ( $P < 0,05$ ). El supuesto de homocedasticidad en Ss\_FerritinM y Ss\_Haptoglobina se cumple ( $P > 0,05$ ). Para Om\_SOD y Om\_CAT no cumple el supuesto de homocedasticidad ( $P < 0,05$ ) (Tabla 10). Se realizó ANOVA de una vía para establecer las diferencias significativas y tukey como análisis *post-hoc* para establecer a donde se encontraban las diferencias en los dos genes que cumplen todos los supuestos. Para los dos genes que no cumplieron los supuestos se utilizó el test estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis.

**Tabla 10.** Test de normalidad Shapiro-Wilk - Test W y el test de homocedasticidad de Levene.

CT Gen	Test normalidad			Test homocedasticidad			
	N	W	P	MS Effect	MS error	F	P
CT Ss_ferritinM	12	0,9266	0,3459	0,0013	0,0004	3,3317	0,0770
CT Ss_haptoglobin	12	0,8796	0,0866	0,0003	0,0003	0,9500	0,4612
CT Om_SOD	12	0,8720	0,0692	0,0028	0,0003	9,3642	0,0054
CT Om_CAT	12	0,7844	0,0063	0,0039	0,0008	5,0185	0,0303

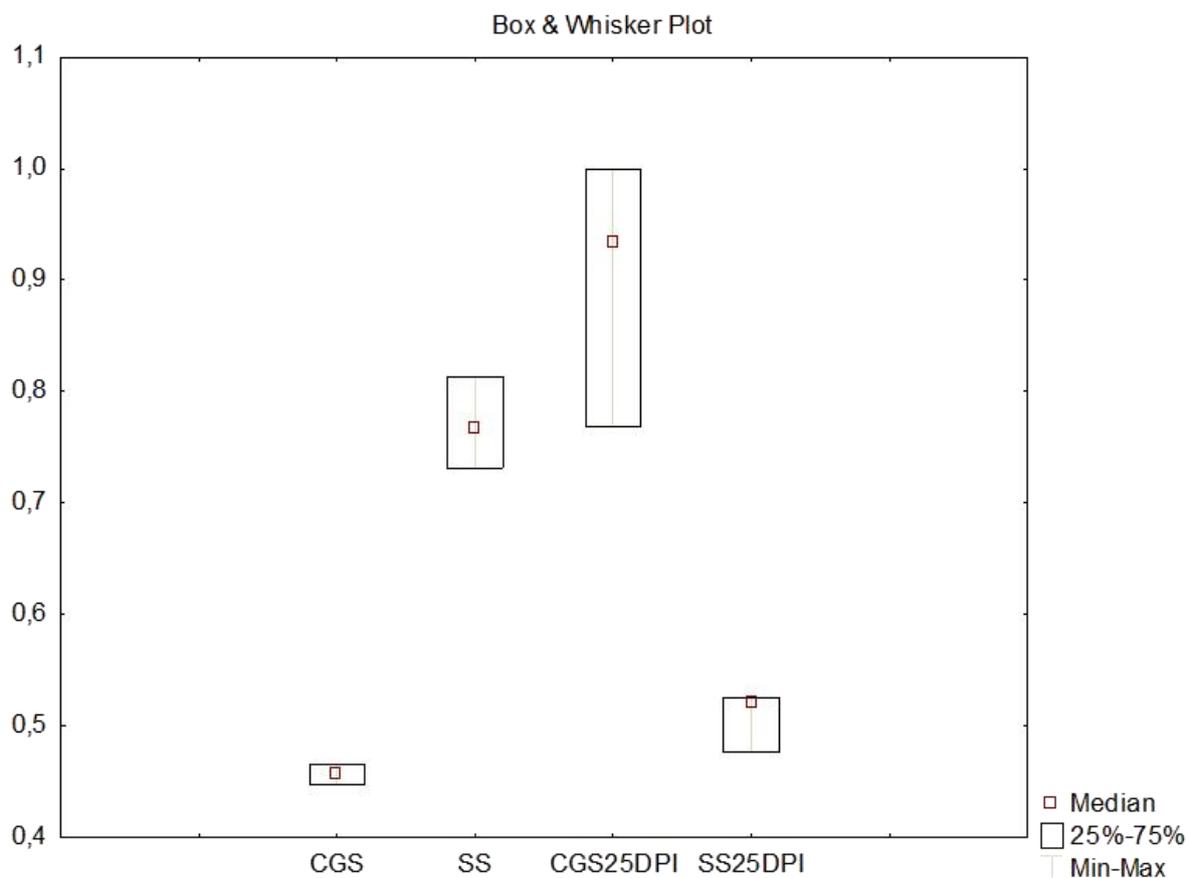
En cuanto a la expresión de los genes asociados al estrés oxidativo, se encontró que para ambos genes hay diferencias significativa entre los tratamientos CGS y CGS25DPI ( $P < 0,05$ ) (Fig. 12 y Fig. 13).



Test Kruskal-Wallis; Comparación múltiple p valor  
 $\Delta\Delta$  CT marcador Om\_SOD  
 Test H (3, N=12) = 10,38462 p=0,0156

Tratamiento	CGS R:2,0000	SS R:8,0000	CGS25DPI R:11,000	SS25DPI R:5,0000
CGS		0,249240	<b>0,013407</b>	1,000000
SS	0,249240		1,000000	1,000000
CGS25DPI	<b>0,013407</b>	1,000000		0,249240
SS25DPI	1,000000	1,000000	0,249240	

**Figura 12.** Test Kruskal-Wallis y diagrama de caja para  $\Delta\Delta$ CT Om\_SOD. El punto central representa la mediana, las cajas delimitan los cuartiles y las barras los extremos máximo y mínimo. CGS: cambio gradual de salinidad, SS: shock salino; CGS25DPI: cambio gradual de salinidad 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*; SS25DPI: shock salino 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*.



Test Kruskal-Wallis; Comparación múltiple p valor  
 $\Delta\Delta$  CT marcador Om\_CAT  
 Test H (3, N=12) = 9,974359 p=0,0188

Tratamiento	CGS R:2,0000	SS R:8,3333	CGS25DPI R:10,667	SS25DPI R:5,0000
CGS		0,188703	<b>0,019445</b>	1,000000
SS	0,188703		1,000000	1,000000
CGS25DPI	<b>0,019445</b>	1,000000		0,325473
SS25DPI	1,000000	1,000000	0,325473	

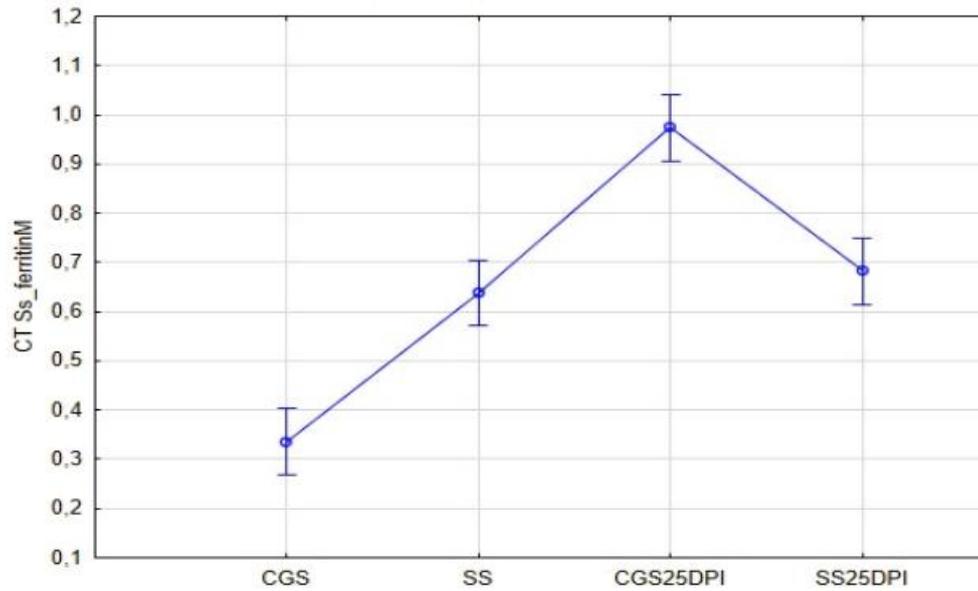
**Figura 13.** Test Kruskal-Wallis y diagrama de caja para  $\Delta\Delta$ CT Om\_CAT. El punto central representa la mediana, las cajas delimitan los cuartiles y las barras los extremos máximo y mínimo. CGS: cambio gradual de salinidad, SS: shock salino; CGS25DPI: cambio gradual de salinidad 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*; SS25DPI: shock salino 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*.

En cuanto a la expresión de los genes asociados al transporte de hierro, se encontraron diferencias significativas para ambos casos analizados (ANOVA,  $P < 0,05$ ) (Tabla 11). Para

Ss\_FerritinM, entre los peces transferidos mediante shock salino, no se encontraron diferencias significativas antes y después de ser infectados, SS y SS25DPI respectivamente (Tukey  $P>0,05$ ). Por el contrario entre todos los otros tratamientos analizados para este gen si se encontraron diferencias significativas (Tukey  $P<0,05$ ) (Fig. 14). Para Ss\_haptoglobina se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen entre todos los tratamientos analizados (Tukey  $P<0,05$ ) (Fig. 15).

**Tabla 11.** Test ANOVA de una vía

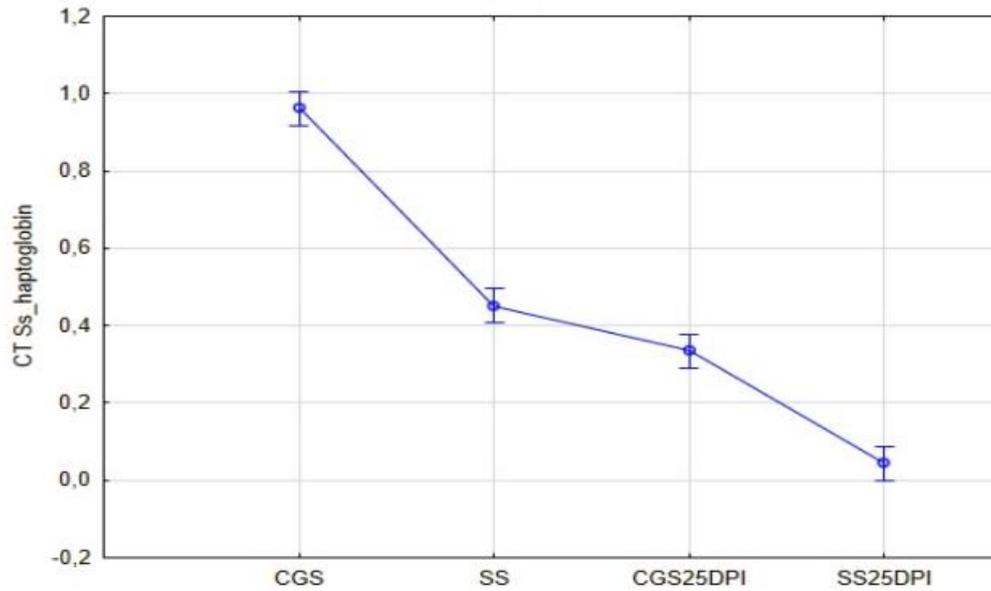
ANOVA de una vía - CT Ss_ferritinM					
Efecto	SS	gl.	MS	F	P
Inter	5,1870	1	5,1870	2023,719	0
Intra	0,6127	3	0,2042	79,676	0,000003
Error	0,0205	8	0,0026		
ANOVA de una vía - CT Ss_haptoglobina					
Efecto	SS	gl.	MS	F	P
Inter	2,4106	1	2,4106	2235,275	0
Intra	1,3175	3	0,4392	407,228	0
Error	0,0086	8	0,0011		



Prueba de diferencia significativa de Tukey  
 $\Delta\Delta$  CT marcador Ss\_ferritinM  
 Error: entre MS= 0,00256, df= 8,0000

Tratamiento	CGS	SS	CGS25DPI	SS25DPI
CGS	0,33573	0,63808	0,97320	0,68283
SS	0,000559		0,000374	0,709212
CGS25DPI	0,000231	0,000374		0,00068
SS25DPI	0,000338	0,709212	0,00068	

**Figura 14.** Análisis *post-hoc* tukey, prueba de la diferencia honestamente significativa con intervalos de confianza de 95% para  $\Delta\Delta$ CT Ss\_FerritinM. CGS: cambio gradual de salinidad, SS: shock salino; CGS25DPI: cambio gradual de salinidad 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*; SS25DPI: shock salino 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*.

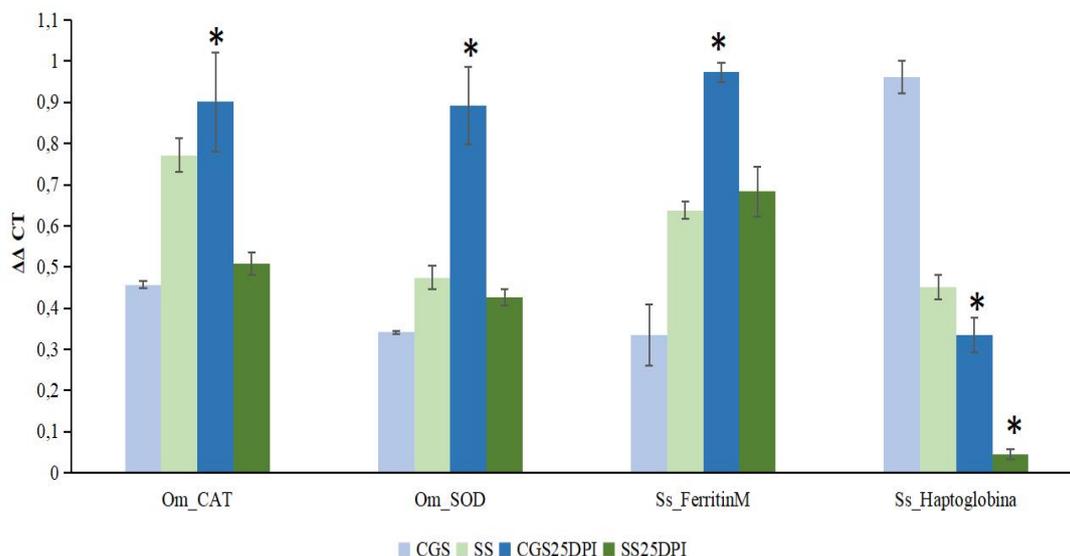


Prueba de diferencia significativa de Tukey  
 $\Delta\Delta$  CT marcador Ss\_haptoglobina  
 Error: entre MS= 0,00108, df= 8,0000

Tratamiento	CGS	SS	CGS25DPI	SS25DPI
	0,96142	0,45216	0,33455	0,4467
CGS		0,000231	0,000231	0,000231
SS	0,000231		0,010144	0,000231
CGS25DPI	0,000231	0,010144		0,000238
SS25DPI	0,000231	0,000231	0,000238	

**Figura 15.** Análisis *post-hoc* tukey, prueba de la diferencia honestamente significativa con intervalos de confianza de 95% para  $\Delta\Delta$ CT Ss\_Haptoglobina. CGS: cambio gradual de salinidad; SS: shock salino; CGS25DPI: cambio gradual de salinidad 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*; SS25DPI: shock salino 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*.

## Genes asociados a ROS y Transporte de Hierro



**Figura 16.** La gráfica muestra los valores promedios y la barra el desvió estándar de la expresión relativa cada gen analizado. Om\_CAT CGS: 0,46±0,01; SS: 0,77±0,04;CGS25DPI:0,90±0,12; SS25DPI:0,51±0,03. Om\_SOD CGS: 0,34±0,004; SS: 0,47±0,03;CGS25DPI:0,89±0,09; SS25DPI:0,43±0,02. Ss\_FerritinM CGS: 0,34±0,07; SS: 0,64±0,02;CGS25DPI:0,97±0,02; SS25DPI:0,68±0,06. Ss\_Haptoglobina CGS: 0,96±0,04; SS: 0,45±0,03;CGS25DPI:0,34±0,04; SS25DPI:0,04±0,01. Con un \* se indica P-valor < 0.05 en comparación con los tratamientos no infectados, CGS y SS, CGS25DPI y SS25DPI respectivamente. CGS: Cambio gradual de salinidad; SS: shock salino; CGS25DPI: cambio gradual de salinidad 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*; SS25DPI: shock salino 25 días después de ser infectados con *P. salmonis*.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Genes TLR22\_3, MHCII y IL1β de *S. salar* expuestos a distintas estrategias de transferencia a mar (shock salino y cambio gradual de salinidad)

Durante la esmoltificación, los salmones experimentan una serie de cambios fisiológicos importantes. Estos cambios son críticos para su supervivencia en el mar y son fundamentales para la adaptación a un ambiente de agua salada. Un aspecto crucial de esta adaptación es la respuesta inmune (Boeuf 1993).

Los resultados de nuestra investigación revelan que el proceso de transferencia a agua de mar induce modificaciones en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune y que los salmones del Atlántico (*S. salar*) enfrentan de manera diferente este proceso según el

método de transferencia utilizado (cambio gradual de salinidad o shock salino). No obstante, ambos métodos resultan en un impacto negativo en la respuesta inmune. En los tres genes evaluados con relación a la respuesta inmune (TLR22\_3, MHCII y IL1 $\beta$ ) se observó una diferencia significativa con respecto a los peces que se mantuvieron en agua dulce. La activación del gen TLR22 (Toll-like receptor) durante la esmoltificación desencadena una respuesta inflamatoria, lo que podría generar daños en el pez (Aliprantis et al. 1999). Lo cual se vio reflejado en nuestros resultados con una mayor expresión de TRL22 en los peces que se transfirieron a agua de mar en comparación con los que se mantuvieron en agua dulce; el grupo SS mostró la mayor expresión de este gen, lo que se podría traducirse a una mayor respuesta inflamatoria, lo que podría causar graves daños en el pez. Esto concuerda con un estudio realizado en esmoltificación de *S. salar* donde se encontró que ante un shock salino se expresan varios genes TLR de la vía de inmunidad innata generando una respuesta en relación con la ruta de la apoptosis (García-Opazo 2023).

Por otro lado, el gen IL-1 $\beta$ , que controla una citoquina proinflamatoria clave en la respuesta inmune innata, se expresó más en los peces que permanecieron en agua dulce que en aquellos transferidos al agua de mar. Esta observación sugiere que los peces en agua de mar pueden no ser capaces de regular completamente su sistema inmune innato, generando una respuesta inflamatoria desregulada. Se debe tener en cuenta que, el equilibrio en la producción y la regulación de estas citoquinas es fundamental para mantener una respuesta inmune efectiva y evitar daños excesivos en los tejidos (Abbas et al. 2018).

En cuanto a la respuesta inmune adaptativa, los genes del MHCII son activos en células presentadoras de antígenos, como los linfocitos B y los macrófagos. Estas células desempeñan un papel clave en la presentación de antígenos de origen bacteriano, y en el mantenimiento del entorno extracelular (Yáñez y Martínez 2010). A partir de los resultados que obtuvimos en este trabajo observamos una mayor expresión de genes del complejo mayor de

histocompatibilidad de tipo II (MHCII) en el agua de mar. Esto podría deberse a la necesidad de reajustar el sistema inmune adaptativo al cambiar de medio, mientras que los salmones en agua dulce mantienen una baja expresión de estos genes, ya que están en un ambiente “reconocido” por su sistema inmune adaptativo. No se debe dejar de lado que las desregulaciones o variaciones del sistema inmune depende tanto de factores bióticos, como abióticos a los que están expuestos los peces y que el estrés mismo puede generar variaciones en la expresión de ciertos genes.

## **7.2. Genes TLR22\_3, MHCII, IL1 $\beta$ , SOD, CAT, Ferritina-M y Haptoglobina de *S. salar* infectados con *P. salmonis* en agua de mar**

En el presente estudio, se investigó la variación en la expresión de genes relacionados con el transporte de hierro en el riñón anterior de *Salmo salar* infectados con *Piscirickettsia salmonis*, utilizando dos métodos de transferencia a agua de mar: CGS y SS. Los hallazgos en este estudio se contextualizan en investigaciones previas que han observado un aumento en la expresión de genes asociados con la privación de hierro en salmónidos infectados con *P. salmonis*, lo que sugiere una acumulación de hierro en las células del huésped (Pulgar et al. 2015; Valenzuela-Miranda y Gallardo-Escárate 2016). Es decir, *Salmo salar* utiliza una variedad de mecanismos inmunológicos para limitar la disponibilidad de hierro y privar a *P. salmonis* de este recurso esencial. Esta competencia por el hierro es un aspecto clave en la interacción patógeno-huésped y refleja una estrategia del sistema inmunológico para combatir las infecciones bacterianas. El secuestro de hierro por el hospedero se lleva a cabo mediante la producción de proteínas que se unen al hierro de manera específica, reduciendo así la cantidad de hierro libre en el entorno circundante. El aumento de la producción de proteínas de unión al hierro, como la ferritina, hacen que se almacene el hierro en una forma no disponible para

las bacterias. Es decir, la ferritina se une al hierro y lo almacena en una forma que no es fácilmente accesible para *P. salmonis*.

En el análisis de los resultados, se observó un aumento en la expresión de FerritinaM en los peces que se transfirieron al agua de mar mediante cambio gradual de salinidad e infectados en comparación con los no infectados (CGS25DPI y CGS, respectivamente). Esto podría indicar que *S. salar* está almacenando hierro en su citoplasma en respuesta a la infección para privar a *P. salmonis* del mismos. Pero por otra parte, se encontró una disminución en la expresión del marcador Ss\_haptoglobina en el grupo CGS25DPI, lo que podría sugerir que *S. salar* no está evadiendo eficazmente al patógeno y que *P. salmonis* finalmente si estaría logrando obtener el hierro de su hospedador.

Por otro lado, el aumento en la expresión de los genes SOD y CAT en CGS25DPI sugiere una posible modificación en su sistema inmunológico para hacer frente al estrés oxidativo y al patógeno. En contraste, en los salmones transferidos al agua de mar mediante SS, no se observaron diferencias entre los peces infectados y no infectados. Esto indicaría que los diferentes procesos de transferencia al agua de mar, podría afectar la respuesta de los peces ante una infección bacteriana. Investigaciones previas han informado un aumento en la expresión de CAT en el contexto de infección por *P. salmonis* (Pedro et al. 2019), pero también se ha observado una regulación al alza de la catalasa en diversos tejidos de peces moribundos infectados por *P. salmonis* que puede llevar a la muerte celular y necrosis (Tacchi et al. 2011). Además, se ha señalado que *P. salmonis* induce una inhibición significativa de la respuesta antioxidante (Rozas-Serri 2022), lo que podría explicar la falta de aumento en la expresión de CAT en el grupo SS25DPI con respecto a SS.

Por otra parte, si observamos los genes que están directamente relacionados con la respuesta del sistema inmune de *S. salar* (IL1 $\beta$ , MCHII y TLR22), se observó una disminución en la expresión del gen IL1 $\beta$ , que codifica proteínas precursoras de la citocina

interleucina1 $\beta$ . Esto sugiere que *P. salmonis* podría estar inactivando esta vía del sistema inmunológico. Rozas-Serri et al. (2018) describe que *S. salar*, al infectarse con esta bacteria, activa su sistema inmune innato, lo cual no fue lo que nosotros observamos en las muestras de riñón analizadas, ya que no solo se encontró una disminución en la expresión del marcador IL1 $\beta$ , si no también de TLR22\_3 en ambas estrategias de transferencia al agua de mar después de la infección. Se debe tener en cuenta que el autor antes mencionado describe el aumento en el riñón de salmón del Atlántico pero de TLR5, no de TLR22. El TLR5 reconoce específicamente proteínas flagelares bacterianas (Yang et al. 2022), mientras que TLR22 se relaciona con la detección de ácidos nucleicos de patógenos (Wang et al. 2017).

Salazar et al. (2015) describen la interacción entre la modulación en la expresión de IL1 $\beta$  y la vía de TLR. La disminución en la expresión de TLR22 y IL1 $\beta$  observada en este estudio podría tener una explicación común, ya que *P. salmonis* contiene componentes en su membrana que pueden ser reconocidos por TLR1 y TLR22. Además, este patógeno tiene la capacidad de modular la expresión de TLR para su beneficio, lo que respalda la observación de cómo *P. salmonis* puede replicarse y evadir el sistema inmunológico del huésped (McCarthy et al. 2008; Salazar et al. 2015) tal como se observó en nuestro estudio.

Por último, la activación de MCHII en los salmones del Atlántico por parte de *P. salmonis* se ha descrito en varios trabajos (Van der Wal et al. 2021; Rozas-Serri 2022), y los resultados del presente estudio coinciden con los hallazgos previos en los salmones transferidos mediante CGS y luego infectados (CGS25DPI), pero no en los expuestos a SS y luego infectados. El tratamiento SS25DPI fue el que presentó la menor expresión de todos los genes relacionados con la respuesta inmune, por lo que sería interesante profundizar en este análisis y evaluar la expresión de otros genes relacionados, tales como el MCHI, para esta condición.

## 8. CONCLUSIÓN

Las modificaciones en el sistema inmune de los salmones durante la esmoltificación tienen un impacto significativo en su respuesta a patógenos en el mar. En este estudio se evaluó la respuesta de *Salmo salar* ante una infección por *Piscirickettsia salmonis* y la influencia de diferentes métodos de transferencia a agua de mar. De acuerdo con nuestros resultados, los dos métodos de transferencia utilizados (cambio gradual de salinidad y shock salino) afectan la respuesta inmune de manera diferente. En general, el grupo de salmones expuestos a un cambio gradual de salinidad parece ser más “robusto” desde el punto de vista inmunológico. Esto se debe a que no experimentan la desregulación previa asociada con el shock salino. Esta observación sugiere que los salmones sometidos al cambio gradual de salinidad pueden tener una ventaja en cuanto a su susceptibilidad a patógenos y su supervivencia en el entorno marino. Se observaron diferencias significativas en la expresión de genes relacionados con el transporte de hierro y la respuesta inmunológica. La acumulación de hierro en las células del huésped y la modulación de genes como SOD y CAT sugieren una respuesta adaptativa de los peces transferidos mediante cambio gradual de salinidad para hacer frente al estrés oxidativo y al patógeno. Los resultados indican una posible inactivación de la vía del sistema inmunológico innato, marcada por la disminución en la expresión de IL1 $\beta$  y TLR22, aunque esto contrasta con investigaciones previas que han reportado la activación del sistema inmunológico innato en respuesta a la infección por *P. salmonis*. La capacidad de *P. salmonis* para modular la expresión de TLR y evadir el sistema inmunológico del huésped se destaca como un mecanismo importante en la infección.

El proceso de esmoltificación en salmones implica cambios significativos en su sistema inmune, lo que puede tener consecuencias cruciales para su adaptación al agua de mar. Nuestros hallazgos respaldan la importancia de comprender estos cambios y considerar cuidadosamente los métodos de transferencia al agua de mar en la acuicultura de salmones,

con implicaciones significativas para la salud y la supervivencia. Este estudio proporciona información relevante sobre la respuesta de *S. salar* a la infección por *P. salmonis* y subraya la importancia de considerar el método de transferencia a agua de mar según la interpretación de los resultados. Se necesitan investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos subyacentes a estas respuestas y su relevancia en la patogénesis de *P. salmonis* en los salmones del Atlántico.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

**Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2018)** Inmunología celular y molecular. Elsevier Health Sciences 9na edn. España.

**Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B et al. (1999)** Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science New York* 285 (5428): 736–739.

**Almendras FE, Fuentealba CI (1997)** Salmonid rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 137 - 144.

**Álvarez CA, Gómez FA, Mercado L, Ramírez 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).

**Álvarez-Gómez E (2016)** ¿Cómo funciona la PCR?. <https://www.empireo.es/como-funciona-pcr/>. Revisado 06/06/2023.

**Álvarez-Pellitero P (2008)** Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary immunology and immunopathology* 126 (3-4): 171–198.

**Anderson GJ, Vulpe CD (2009)** Mammalian iron transport. *Cell mol life sciences* 66: 32 - 41.

**Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM (2008)** Iones metálicos en catálisis biológica: de bases de datos enzimáticas a principios generales. *Revista de química biológica inorgánica* 13: 1205 - 1218.

**Appel L (2023)** La importancia de la tecnología RAS para la nueva tendencia de producción post-smolt. <https://www.salmonexpert.cl/biomar-post-smolt-ras/la-importancia->

de-la-tecnologia-ras-para-la-nueva-tendencia-de-produccion-post-smolt/1454585. Revisado 16/09/2023.

**Astudillo-Maturana CH (2004)** Evaluación de la Ventana de Esmoltificación en la Producción de Smolt SO de Salmón del Atlántico (*Salmo salar L.*). Universidad Nacional Andrés Bello. Facultad de Ecología y Recursos Naturales. Escuela de Ciencias del Mar. Tesis de grado Ingeniero en Acuicultura.

**Atlantic Salmon Federation [ASF] (s/f)** Wild Atlantic salmon – a natural wonder. <https://www.asf.ca/about-atlantic-salmon/life-story#>. Recuperado: 25/07/23.

**Baigun CRM (2001)** Ecología pesquera de lagos y embalses patagónicos (Argentina). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Tesis doctoral.

**Baigun CRM, Quirós R (1985)** Introducción de peces exóticos en la república argentina. instituto nacional de investigación y desarrollo pesquero departamento de aguas continentales INIDEP. Informe técnico n°2.

**Barros SE y Gonzo G (2004)** Poblaciones naturalizadas de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en la Puna de Argentina: bases ecológicas para su manejo. Memorias: manejo de fauna silverstre en Amazonía y Latinoamérica 2 (4400): 125-135.

**Birnie-Gauvin K, Costantini D, Cooke SJ, Willmore WG (2017)** A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. Fish and Fisheries 18 (5): 928–942.

**Blancheton JP, Attramadad KJK, Michaud L, D’Orbcastel ER, Vadstein O (2013)** Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. Aquacultural Engineering 53: 30-39.

**Blatrix R, Roux B, Béarez P, Prestes-Carneiro G, Amaya M, et al. (2018)** The unique functioning of a pre-Columbian Amazonian floodplain fishery. Scientific Reports. 16; 8 (1): 5998.

**Boeuf G (1993)** Seawater adaptation strategies in salmonids. pp: 61-80 In: E. Kristensen, R. R. Haese and J. E. Kostka (Ed). Coastal and estuarine studies. American Geophysical Union. Washington, DC, USA.

**Burguener M, Baron PJ (2016)** Prospectiva Tecnológica en Maricultura: Argentina en Contexto Global: I. Vigilancia Tecnológica; Editorial Académica Española 1: 173.

**Caballero-Javierre P (2013)** Biología y ecología del Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y el reo o trucha de mar (*Salmo trutta*) en Galicia. Servicio de Conservación de la Naturaleza. Xunta de Galicia. Pontevedra. España. MOL 12.

**Cáceres-Cruz GP (2018)** Caracterización del perfil bioquímico del salmón del atlántico “*Salmo salar*” sanos, y serovariación ante desafío con virus isa y *Piscirickettsia salmonis*. Tesis Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias. Santiago, Chile.

**Calquín P, Ruiz P, Oliver C, Sánchez P, Haro R, et al. (2017)** Physiological evidence that *Piscirickettsia salmonis* produces siderophores and uses iron from different sources. Journal of Fish Diseases 41 (3): 553–558

**Carciofi I y Rossi L (2021)** Acuicultura en Argentina: red de actores, procesos de producción y espacios para el agregado de valor. En búsqueda del impulso exportador para los productos acuícolas. Documentos de Trabajo del CCE N° 13. Consejo para el Cambio Estructural - Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación.

**Carrera NI (2020)** Breve historia de la acuicultura y salmonicultura en el sur de Chile (1856-2000). Revista Territorios y Regionalismos 3: 36 - 49.

**Caruffo M, Mandakovic D, Mejías M, Chávez-Báez I, Salgado P, et al. (2020)** Pharmacological iron-chelation as an assisted nutritional immunity strategy against *Piscirickettsia salmonis* infection. Veterinary Research 51(1).

**Carvajal-carvajal C (2015)** reactive oxygen species: training, function and oxidative stress. Revista medicina legal de Costa Rica 36 (1).

**Cornejo-Romero A, Serrato-Diaz A, Rendon-Aguilar B, Rocha-Munive MG (2014)** Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) Ciudad de Mexico D.F.

**Coronado M, Vega y León S, Gutiérrez R, Vásquez M, Radilla C (2015)** Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Revista Chilena de Nutrición, 42 (2): 206-212.

**Costa-Pierce BA (2022)** The Anthropology of Aquaculture. Frontiers in Sustainable Food Systems 6: 843 - 743.

**Domínguez-Marchán FJ (2016)** Comparación de la expresión de genes asociados al metabolismo del calcio durante la esmoltificación de *Salmo salar*. Tesis de grado. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. Valdivia- Chile.

**FAO -Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-(2023)** Chile. Texto de Norambuena, R. y González, L.. División de Pesca y Acuicultura Roma. Recuperado de <https://www.fao.org/fishery/es/countrysector/cl/es> 23/04/23.

**Filella X, Molina R, Ballesta AM (2002)** Estructura y función de las citocinas. Servicio de Bioquímica Clínica Barcelona. Elsevier 39 (2): 47-88.

**Fryer JL, Hedrick RP (2003)** *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. Journal of Fish Diseases (26): 251-262.

**Ganz T (2007)** Molecular control of iron transport. Journal of the American Society of Nephrology 18 (2): 394-400.

**García-Opazo AC (2023)** Evaluación de la modulación transcripcional de la ruta de apoptosis en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) durante la esmoltificación. Tesis de grado Bióloga Marina. Universidad de Concepcion, Chile.

**Gómez G, Henríquez V, Marshall SH (2009)** Additional evidence of the facultative

intracellular nature of the fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. Archivos de medicina veterinaria 41(3): 261-267.

**Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996)** Real time quantitative PCR. Genome Research 6: 986 - 994.

**Hood MI, Skaar EP (2012)** Inmunidad nutricional: metales de transición en la interfaz patógeno-huésped. Nature Reviews Microbiology 10 (8): 525–537.

**Jara-Vidal IA (2011)** Análisis de la resistencia genética a *Piscirickettsia salmonis* en salmón del atlántico (*Salmo salar*) mediante un modelo umbral. Tesis para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Departamento Fomento de la Producción Animal. Santiago, Chile.

**Jiménez P, Collada C (2000)** Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación . Invest. Agr.: Sist. Recur. For.: Fuera de Serie n.º 2.

**Larenas J, Contreras J, Smith P (2000)** Piscirickettsiosis: Uno de los principales problemas en cultivos de salmones en Chile. TECNO VET: Año 6 N° 2.

Ley Argentina de Acuicultura N°27231 Capítulo II: De las definiciones. Artículo 5. Promulgación: 29 de diciembre de 2015.

**Lien E, Ingalls RR (2002)** Toll-like receptors. Critical care medicine, 30 (1): 1–11.

**Lien S, Koop BF, Sandve SR, Miller JR, Kent MP et al. (2016)** The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. Nature 533: 200–205.

**Lizárraga-Velázquez CE, Hernández C, González-Aguilar GA, Basilio-Heredia J (2018)** Propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de polifenoles en peces carnívoros de cultivo. Biotecnología y ciencias agropecuarias. Ciencia UAT 12 (2).

**López-Martínez A, Chávez-Muñoz C, Granados J (2005)** Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad. Revista de investigación clínica 57 (2): 132-141.

**Magnadóttir B (2010)** Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology* 12 (4): 361-379.

**MAGyP -Ministerio de agricultura, ganadería y pesca Argentina- (2022)** Análisis del sector acuícola Argentino. Dirección nacional de acuicultura.

**MAGyP -Ministerio de agricultura, ganadería y pesca Argentina- (2020)** Producción de acuicultura destinada al consumo humano en Argentina durante el año 2019. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

**MAGyP-Ministerio de agricultura, ganadería y pesca Argentina- (s/f)**  
[https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/cultivos/\\_archivos//000000\\_Acuicultura%20marina/000001El%20Cultivo%20de%20los%20moluscos%20bivalvos%20marinos%20en%20Argentina.php](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/cultivos/_archivos//000000_Acuicultura%20marina/000001El%20Cultivo%20de%20los%20moluscos%20bivalvos%20marinos%20en%20Argentina.php). Revisado 13/09/2023.

**Marshall S, Heath S, Henríquez V, Orrego C (1998)** Minimally invasive detection of *Piscirickettsia salmonis* in cultivated salmonids via the PCR. *Applied and environmental microbiology* 64 (8): 3066-3069.

**Mauel MJ y Miller DL (2002)** Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: a review. *Veterinary microbiology* 87 (4): 279–289.

**McCarthy U, Bron J, Brown L, Pourahmad F, Bricknell I, et al. (2008)** Survival and replication of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout head kidney macrophages. *Fish and Shellfish Immunology* 25: 477 - 484.

**McCormick SD, Hansen LP, Quinn TP, Saunders RL (2011)** Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55 (S1): 77-92.

**Morera FJ, Castro-Guarda M, Nualart D, Espinosa G, Muñoz JL, Vargas-Chacoff L (2021)** The biological basis of smoltification in Atlantic salmon. *Austral journal of veterinary sciences* 53 (1): 73-82.

**Mullis K, Faloona F (1987)** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335 - 350.

**Muñoz-Jara GS (2010)** Análisis de pruebas de adaptación en el salmón del atlántico (*salmo salar*) para determinar el peso de referencia mínimo que garantice un bajo porcentaje de mortalidad post ingreso al mar. Tesis de grado ingeniero en acuicultura. Puerto Montt, Chile.

**Nakajima T, Hudson MJ, Uchiyama J, Makibayashi K, Juzhong Zhang K (2019)** Common carp aquaculture in Neolithic China dates back 8,000 years. *Nature Ecology & Evolution* 3 (10): 1415-1418.

**Nakanishi T, Shibasaki Y, Matsuura Y (2015)** T Cells in Fish. *Biology* 4 (4): 640–663.

**National Library of Medicine [NLM] (2023)** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=8015>. Revisado 17/09/2023.

**Navas JR (1987)** Los vertebrados exóticos introducidos en la argentina. *Zoología* Tomo XIV, N° 2.

**Olabuenaga SE (2000)** Fish immune system. *Gayana*, 64 (2): 205-215.

**Oliver C, Coronado JL, Martínez D, Kashulin-Bekkelund A, Lagos LX, et al. (2023)** Outer membrane vesicles from *Piscirickettsia salmonis* induce the expression of inflammatory genes and production of IgM in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Fish and Shellfish Immunology* 139: 108887.

**Pedro AVF, Martínez D, Pontigo JP, Vargas-Lagos C, Hawes C (2019)** Activación transcripcional de genes implicados en el estrés oxidativo en *Salmo salar* desafiado con *Piscirickettsia salmonis*. Bioquímica y fisiología comparadas, Parte B: Bioquímica y biología molecular 229: 18 - 25.

**Pérez GPL, Pérez de Alejo JL (2000)** Métodos para medir el daño oxidativo. Revista Cubana de Medicina Militar 29 (3): 192-198.

**Pillay TVR, Kutty MN (2004)** Aquaculture: principles and practices. 2da edn. Published by Blackwell Publishing Ltd.

**Postollec F, Falentin H, Pavan S, Combrisson J, Sohier D (2011)** Recent advances in quantitative PCR (qPCR) application in food microbiology. Food Microbiology 28 (5) 848-861.

**Pulgar R, Hödar C, Travisany D, Zuñiga A, Domínguez C, et al. (2015)** Transcriptional response of Atlantic salmon families to *Piscirickettsia salmonis* infection highlights the relevance of the iron-deprivation defence system. BMC genomics 16: 1 - 21.

**Quintanilla JC, González MP, García JP, Olmos P, Contreras-Lynch S (2021)** Horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* from the wild sub-Antarctic notothenioid fish *Eleginops maclovinus* to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under experimental conditions. Journal of Fish Diseases 44 (7): 993–1004.

**Rauta PR, Samanta M, Dash HR, Nayak B, Das S (2014)** Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses. Immunology Letters 158 (1-2): 14–24.

**Revenga JE (2020)** Apuntes de salmonicultura. 2a ed. Neuquén: EDUCO - Universidad Nacional del Comahue. Libro digital, PDF.

**Revista Puerto (2022)** El “mágico” crecimiento de la acuicultura argentina.  
<https://revistapuerto.com.ar/2022/09/el-magico-crecimiento-de-la-acuicultura-argentina/>.

Recuperado: 10/07/2023.

**Reynoso E, Dieser S, Moliva M (2022)** Manual de herramientas moleculares: conceptos básicos y técnicas empleadas en el estudio de la genética microbiana- 1ra ed. Universidad Nacional de Río Cuarto.

**Rise ML, Jones SR, Brown GD, von Schalburg KR, Davidson WS, et al. (2004)** Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Physiological genomics*, 20 (1): 21–35.

**Robin A (s/f)** Scandinavian Fishing Year Book. Oxford, England

**Rozas-Serri M (2022)** Why Does *Piscirickettsia salmonis* Break the Immunological Paradigm in Farmed Salmon? Biological Context to Understand the Relative Control of *Piscirickettsiosis*. *Frontiers in immunology* 13: 856 - 896.

**Rozas-Serri M, Peña A, Maldonado L. (2018)** Transcriptomic profiles of post-smolt Atlantic salmon challenged with *Piscirickettsia salmonis* reveal a strategy to evade the adaptive immune response and modify cell-autonomous immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 81: 348 – 362.

**Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, et al (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487 - 91.

**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. *Journal of Fish Diseases* 39 (2): 239–248.

**Sanford CPJ (1990)** The phylogenetic relationships of salmonid fishes. Bulletin of the British Museum. Natural History Zool 56: 145 - 153.

**SERNAPESCA -Servicio Nacional de Pesca y acuicultura- (2009)** Anuario Estadístico de Pesca. Servicio Nacional de Pesca. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, Chile.

**SERNAPESCA -Servicio Nacional de Pesca y acuicultura- (2021)** Informe sanitario con información sanitaria de agua dulce y marino. Departamento de salud animal, Subdirección de acuicultura.

**Smith CJ, Osborn MA (2009)** Advantages and limitation of quantitative PCR (q-PCR) based approaches in microbial ecology. FEMS microbiology ecology 67 (1): 6-20.

**Spinedi M (s/f) Maricultura** <https://www.argentina.gob.ar/inidep/investigacion-cientifica/direccion-de-informacion-operacion-y-tecnologia/maricultura>. Recuperado: 10/07/2023.

**Stefansson SO, Björnsson BT, Ebbesson LOE, McCormick SD (2008)** Smoltification. Fish Larval Physiology 1: 639 - 681.

**Tacchi L, Bron JE, Taggart JB, Secombes CJ, Bickerdike R, et al. (2011)** Multiple tissue transcriptomic responses to *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Physiol Genomics 43: 1241 - 1254.

**Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C (2013)** Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en Discapacidad 2: 2.

**Toledo-Pizarro NA (2008)** Caracterización de la interacción de *Piscirickettsia salmonis* con ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sometidas a tratamientos con proteasas Santiago, Chile. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario Departamento de Patología Animal.

**Tulian EA (1908)** Acclimatization of American fishes in Argentina. Ministerio de acuicultura, Argentina. Paper presented before the Fourth International Fishery Congress held at Washington, U.S.A.

**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 y shellfish immunology* 59: 427 – 438.

**Valenzuela-Miranda DA (2019)** Dinámica de la respuesta codificante/no-codificante y su rol en la interacción entre el salmón Atlántico (*Salmo salar*) y *Piscirickettsia salmonis*. Tesis doctoral Ciencias con mención en Manejo de Recursos Acuáticos Renovables. Concepción, Chile.

**Valenzuela-Muñoz V, Boltaña S, Gallardo-Escárate C (2017)** Uncovering iron regulation with species-specific transcriptome patterns in Atlantic and coho salmon during a *Caligus rogercresseyi* infestation. *Journal of Fish Diseases* 40 (9): 1169–1184.

**Valenzuela-Muñoz V, Gallardo-Escárate C (2017)** Iron metabolism modulation in Atlantic salmon infested with the sea lice *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus rogercresseyi*: A matter of nutritional immunity?. *Fish y Shellfish Immunology* 60: 97 – 102.

**Valenzuela-Muñoz V, Váldez JA, Gallardo-Escárate C (2021)** Transcriptome Profiling of Long Non-coding RNAs During the Atlantic Salmon Smoltification Process. *Marine Biotechnology* 23: 308 - 320.

**Valenzuela-Muñoz V, Valenzuela-Miranda D, Gonçalves AT, Novoa B, Figueras A, Gallardo-Escárate C (2020)** Induced-iron overdose modulate the immune response in Atlantic salmon increasing the susceptibility to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Aquaculture* 521: 735058.

**Valenzuela-Muñoz VM (2018)** Interacción transcriptómica ectoparásito-hospedero: Modulación de la expresión génica durante la infestación de *Caligus rogercresseyi* sobre

*Salmo salar*. Tesis Doctoral en Ciencias con Mención en Manejo de Recursos Acuáticos Renovables. Concepción, Chile.

**Valenzuela-Yáñez P (2014)** Inducción de genes de resistencia de la familia RND en la cepa de *Piscirickettsia salmonis* Austral 005 por exposición al antibiótico florfenicol. Tesis de Grado Título de Químico Farmacéutico. Valdivia, Chile.

**Valladares-Morales AN, Loera Mendoza I, León Galván MF (2018)** Identificación de genes antioxidantes a partir de semilla de moringa (*Moringa oleífera*). Jóvenes en la ciencia 4 (1): 28–32.

**Van der Wal YA, Jenberie S, Nordli H, Greiner-Tollersrud L, Kool J, et al. (2021)** The importance of the Atlantic salmon peritoneal cavity B cell response: Local IgM secreting cells are predominant upon *Piscirickettsia salmonis* infection. Developmental & Comparative Immunology 123: 104 - 125.

**Vargas-Lagos C, Pontigo JP, Oyarzún R, Soto-Dávila M, Morera FJ, et al. (2018)** Intestinal incomplete process on the osmoregulation system during *Salmo salar* smoltification in a productive conditions. Aquaculture 491: 121 - 127.

**Venketaraman V, Dayaram YK, Amin AG, Ngo R, Green RM, et al. (2003)** Role of Glutathione in Macrophage Control of Mycobacteria. Infection and Immunity 71 (4): 1864–1871.

**Vinueza-Burgos C (2009)** PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria 10 (2): 1-13.

**Wandersman C, Stojiljkovic I (2000)** Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. Current opinion in microbiology 3 (2): 215-220.

**Wang RH, Li W, Fan YD, Liu QL, Zeng LB, et al. (2017)** TLR22 structure and expression characteristic of barbel chub, *Squaliobarbus curriculus* provides insights into

antiviral immunity against infection with grass carp reovirus. *Fish & Shellfish Immunology* (66): 120-128.

**Weinberg ED (2009)** Iron availability and infection. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790 (7): 600-605.

**Wegrzyn D, Ortubay S, Esteve J (1997)** Pesca deportiva y manejo de salmónidos en la Patagonia. Recopilación de las conferencias dadas en el marco de los Congresos | y II de Pesca Deportiva y Manejo de Salmónidos realizados en noviembre de 1995 y octubre de 1996. Organizados por la Dirección de Pesca de Río Negro y la Fundación Chahuaco.

**WoRMS Editorial Board (2023)** World Register of Marine Species. Available from <https://www.marinespecies.org> at VLIZ. Recuperado: 26/05/23.

**Yang S, Leng S, Li Y, Wang X, Zhang Y, et al. (2022)** Identification and functional characteristics of two TLR5 subtypes in *S. grahami*. *Fish & Shellfish Immunology* 131: 707 - 717.

**Yáñez JM, Martínez V (2010)** Genetic factors involved in resistance to infectious diseases in salmonids and their application in breeding programmes. *Archivos de Medicina Veterinaria* 42 (2): 1-13.

**Zúñiga A, Aravena P, Pulgar R, Travisany D, Ortiz-Severín J, et al. (2020)** Transcriptomic changes of *Piscirickettsia salmonis* during intracellular growth in a salmon macrophage-like cell line. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9: 426.

## 10 ANEXOS

### 10.1. ANEXO I

#### Extracción de ARN



- (Bajo cámara de extracción) Preparar 1mL de trizol en un tubo eppendorf de 2mL y agregar una esfera de cerámica autoclavada.
- Cortar el tejido en una placa de vidrio sobre hielo y agregar 50-100mg de tejido a los tubos preparados anteriormente y rotular.
- Homogeneizar y triturar la muestra según el tipo de tejido: Tysulaser: Frecuencia 24/s por 5 – 10min.
- Agregar 200µL de cloroformo, mezclar invirtiendo e incubar en hielo por 3min.
- Centrifugar a 12.000g por 15min a 4°C.
- Recuperar la fase acuosa y traspasar a un tubo de 1.5mL. *Si no es transparente repetir el paso 5.*
- Agregar 500 µL de isopropanol, mezclar invirtiendo las fases (sin vortex) e incubar por mínimo 20 min a -20 o -80°C (se puede dejar precipitando indefinidamente).
- Centrifugar a 12.000g por 10 min a 4°C (En este punto se observa un pellet).
- Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 1mL de etanol al 75% y homogeneizar suavemente con micropipeta, sin realizar vortex.
- Centrifugar a 7.500g por 5 min a 4°C.
- Repetir el lavado.
- Descartar el sobrenadante y eliminar el excedente con micropipeta.

- Puede dejar secar boca arriba por 5 minutos.
- Resuspender en 50  $\mu\text{L}$  de agua DEPC o agua libre de nucleasas. Homogeneizar con micropipeta evitando la formación de burbujas.
- Cuantificar en Nanodrop (Concentración; Razón 260/280; Razón 260/230) y determinar la integridad mediante electroforesis en gel MOPS 1.2%. Se recomienda sembrar 400ng de muestra por pocillo para una mejor visualización.

---

Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola  
 lbgaincar@gmail.com; +56-412203996, +56-412204402

## 10.2. ANEXO II

Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario  
 (ADNc)



- *Mezcla de reacción*

Reactivo	Reacción 1X (10 $\mu\text{L}$ )
Random Primer/ oligo (dT) <sub>18</sub>	0.5 $\mu\text{L}$
Reaction Buffer 5X	2 $\mu\text{L}$
agua DEPC	4.5 $\mu\text{L}$
RiboLock (20U/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
dNTP mix.	1 $\mu\text{L}$
RevertAid H Minus (200U/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$

- En un tubo estéril de 0.2mL agregar los 9  $\mu\text{L}$  correspondientes al Máster Mix de cada reacción individual, y 1  $\mu\text{L}$  de RNA (200ng/ $\mu\text{L}$ ) en la tapa del tubo según corresponda.
- Homogeneizar suavemente y realice spin de ser necesario.

- Ubicar tubos en termociclador y continuar con el siguiente programa según corresponda (Para random hexamer primer):

	Temperatura	Tiempo
Incubación	25 °C	5 min
	42 °C	60 min
	70 °C	5 min

- Se recomienda almacenar muestras a -20°C por menos de 1 semana, para almacenamiento mayor se recomienda -80°C.
- Para verificar la correcta síntesis de cDNA realizar PCR en tiempo final con un set de partidores de housekeeping previamente estandarizado, y posteriormente visualizar el resultado mediante electroforesis.

---

Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola  
 lbgaincar@gmail.com; +56-412203996, +56-412204402

### 10.3. ANEXO III

#### PCR convencional tiempo final

- Mezcla de reacción



Reactivo	1x (12,5 µL)
Buffer reacción 10x	1,25 µL
BSA (10 µg/ µL)	0,25 µL
dNTPs (10 mM)	0,25 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,75µL
Primer F (10 µM)	0,625µL
Primer R (10 µM)	0,625 µL
Taq DNA polymerase	0,15 µL

H2O	7,6 $\mu$ L
DNAc (50 ng)	1 $\mu$ L

- Programa térmico

Temperatura	Tiempo	ciclos
95°C	1 min	
95°C	30 seg	35 ciclos
T <sup>M</sup> según primer	30 seg	
72°C	30 seg	
72°C	7 min	
4 °C	--	

- Verificación de amplificación en gel de Agarosa (Buffer TBE) al 1,5%

---

Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola  
 lbgaincar@gmail.com; +56-412203996, +56-412204402

#### 10.4. ANEXO IV

##### qPCR SYBR Green



- Antes de empezar: Verificar disponibilidad de hielo; Descongelar reactivos (preferentemente sobre hielo); Descongelar muestras de DNA/cDNA en hielo, tener preparadas las diluciones con las que se va a trabajar; Preparar estación de trabajo, revisar que estén todos los implementos necesarios (puntas, micropipetas, placa para termociclador, film óptico, guantes, agua, gradillas, lápiz) y poner UV; Encender el computador y luego el termociclador QuantStudio 3. Programar el Instrumento (QuantStudio Software) antes de partir.

- En un tubo estéril de 1.5mL preparar el Mix de Trabajo de la reacción:

Reactivo	Reacción 1X (10 $\mu$ L)
PowerUp SYBR Green Master Mix (2X)	5 $\mu$ L
Primer Forward	0,625 $\mu$ L
Primer Reverse	0,625 $\mu$ L
Agua grado B.M.	2,75 $\mu$ L
Volumen final	9 $\mu$ L
DNA/cDNA	1 $\mu$ L

- En cada pocillo de la placa, cargar 8-9  $\mu$ L del mix de trabajo recién preparado. Evitar la formación de burbujas. **IMPORTANTE: LA PLACA SE CARGA EN FUNCIÓN DE LO PROGRAMADO EN EL INSTRUMENTO.**
- Cargar la muestra con puntas con filtro y cambiar la punta en cada pocillo. Resuspender la muestra en el mix de trabajo, y al terminar botar el último tope en la pared del pocillo.
- La cantidad de ADN es variable según la muestra. Debería estar entre los 1-40 ng de ADN. Para cDNA, la cantidad de  $\mu$ L dependerá de la cantidad de RNA con la que se preparó el cDNA: Si se agregó 200 ng de RNA, agregar 2  $\mu$ L de cDNA; si se agregaron 400 ng de RNA, 1  $\mu$ L de cDNA.
- Sellar la placa con film óptico y dar spin. Procurar que no queden burbujas.
- Ubicar placa en termociclador y continuar con el siguiente programa térmico:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
50 °C	2 min	Hold
95 °C	2-10 min	1 ciclo
95 °C	15 seg	40 ciclos

T <sub>m</sub> ≥ 60°C	1 min	40 ciclos
Para curva de melting, utilizar valores por defecto		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
50 °C	2 min	Hold
95 °C	2-10 min	1 ciclo
95 °C	15 seg	40 ciclos
T <sub>m</sub> 55-60°C	15 seg	40 ciclos
72°C	1 min	40 ciclos
Para curva de melting, utilizar valores por defecto		

---

Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuicola  
lbgaincar@gmail.com; +56-412203996, +56-412204402