

USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3580900198751



PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA
DE VALPARAISO



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

**Selección de alelos del Complejo Mayor de
Histocompatibilidad (MHC) de salmónidos como
indicadores de resistencia o susceptibilidad a
*Piscirickettsia salmonis***

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

U.T.F.S.M.
BIBLIOTECA CENTRAL

Alumna: Daniela Gómez Atria
Profesor Guía: Dr. Sergio Marshall González

MAYO, 2011

COMISIÓN EVALUADORA

La presente tesis ha sido revisada y aprobada por una comisión compuesta por:

Dr. James Robeson

Presidente de la comisión, PUCV



Dra. Claudia Altamirano

Profesora del Doctorado en Biotecnología, PUCV



Dra. María Rosa Bono

Profesora evaluador externo, U. Chile



Dra. Mónica Imarai

Profesora evaluador externo, USACH



Dr. Sergio Marshall

Director de Tesis, PUCV





*A los que creyeron en mí,
me apoyaron incondicionalmente
y me dieron ánimo para continuar.*

RESUMEN

La creciente industria salmonicultora nacional se ha visto constantemente amenazada, entre otros, por diversos patógenos que causan grandes pérdidas y debilitan, por ende, la capacidad exportadora nacional. Dentro de los patógenos presentes en nuestro país destaca especialmente la bacteria *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*), por ser una de las amenazas más antiguas y persistentes de la industria.

Aunque diversos grupos de investigación han elaborado formulaciones que ofrecen protección contra *P. salmonis*, aquellas vacunas comercializadas actualmente han demostrado baja efectividad a largo plazo, además de representar un evento estresante para el pez.

Una alternativa innovadora a la vacunación es la selección de individuos naturalmente resistentes a la enfermedad. En esto, el uso de marcadores genéticos que asistan en la selección de especímenes permite acelerar el proceso, y se ha visto que genes del sistema inmunológico del pez, como los del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), serían los más indicados, dado que están estrechamente ligados con la resistencia o susceptibilidad a enfermedades en diversos animales, incluyendo los peces salmónidos.

El MHC corresponde a una región de genes muy polimórficos cuyos productos están implicados en la generación de la respuesta inmune. Específicamente los productos de los genes de MHC clase I y II son los encargados de presentar en la superficie de algunas células fragmentos de los antígenos exógenos a los linfocitos T, participando directamente en la generación de la respuesta inmune adaptativa.

En salmónidos, los genes del MHC clase I y II presentan funciones y estructura similares a los humanos, con la diferencia distintiva de que en peces estos genes no forman un complejo, ya que carecen de ligadura entre ellos, lo que permite una mayor variabilidad génica. Estudios de polimorfismos del MHC de salmónidos han demostrado que se expresa principalmente una combinación singular de locus clásicos alfa y beta de MHC clase II: DAA y DAB, y un único locus clásico de MHC clase I: UBA.

Dado los antecedentes anteriores, en esta tesis se presenta la identificación y caracterización de alelos del MHC de clase I y II como marcadores inmunogenéticos de resistencia y/o susceptibilidad a *Piscirickettsia salmonis* en peces salmónidos de cultivo. Para lograrlo, se trabajó con las tres especies salmónidas mayormente cultivadas en Chile: *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Oncorhynchus kisutch*, utilizando muestras tanto de peces expuestos a brotes naturales de piscirickettsiosis en centros de cultivo del país, así como de peces provenientes de ensayos de desafío controlados con la bacteria. Para el estudio de la diversidad alélica del MHC se utilizaron principalmente técnicas de PCR, electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE) y secuenciación de DNA, combinado con diversos análisis de bioinformática, genética de poblaciones y de estadística.

Nuestros resultados indican que para el MHC clase I se encontró, junto a nuestro locus de interés UBA, la presencia de genes no-clásicos y pseudogenes, los que en conjunto dificultaron el análisis para determinar la eventual asociación de estos alelos con la resistencia y/o susceptibilidad a enfermedades. Sin embargo, para el MHC clase II se logró una caracterización específica de los locus deseados, encontrando un alto nivel de

diversidad alélica en las muestras estudiadas, muy similar al reportado para poblaciones naturales. Con estos datos se realizó un análisis evolutivo sobre los orígenes de la diversidad del MHC clase II alfa y beta en salmónidos, concluyendo que tanto la recombinación como la selección positiva son dos elementos importantes en la generación de diversidad de estas moléculas.

Finalmente, la comparación de individuos sobrevivientes versus las mortalidades a causa del patógeno, tanto en el escenario de centros de cultivo naturalmente infectados como en los ensayos de desafío controlado, nos permitieron definir alelos altamente asociados con resistencia y/o susceptibilidad a la bacteria *Piscirickettsia salmonis* para las tres especies analizadas. En este sentido, los resultados obtenidos proyectan el uso de estos alelos del MHC clase II, como potenciales marcadores de selección de reproductores salmónidos que generen progenies resistentes a la enfermedad.

ABSTRACT

The growing national salmon farming industry has been constantly threatened, among others, by several pathogens that cause large losses and weak the national export capacity. Between the pathogens currently present in our country particularly underlines the bacteria *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*), being one of the oldest and most persistent threats to the industry.

Although several research groups have developed formulations that provide protection against *P. salmonis*, those vaccines currently available in the market have shown limited effectiveness in the long term, besides of representing a stressful event for the fish.

An innovative alternative to vaccination is the selection of individuals naturally resistant to diseases. In this, the use of genetic markers to assist in the selection of specimens can accelerate the process. It has been found that genes of the immune system, such as those of the Major Histocompatibility Complex (MHC), are the most appropriate ones, because they are closely linked with resistance or susceptibility to disease in several animals, including salmonids.

The MHC is a region of highly polymorphic genes whose products are involved in generating the immune response. Specifically, the gene products of MHC class I and II are responsible of presenting at the surface of some cells fragments of exogenous antigens to T cells, participating directly in the generation of the adaptive immune response.

In salmonids, the genes of the MHC class I and II present functions and structure similar to humans. But distinctively in fish these genes do not form a complex, since they are not linked, allowing greater genetic variability. Studies about salmonids MHC polymorphisms have shown that a unique combination of MHC class II alpha and beta classical locus: DAA and DAB, and a single MHC class I classical locus: UBA, are mainly expressed.

Given the above background, this thesis presents the characterization and identification of MHC class I and II alleles as immunogenetic markers for resistance and/or susceptibility to *Piscirickettsia salmonis* on farmed salmonids. To achieve this, we worked with the three mainly salmonids species grown in Chile: *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* and *Oncorhynchus kisutch*, using samples of fish exposed to both natural outbreaks of piscirickettsiosis in the country's farms and fish from controlled challenge trials with the bacteria. To study the MHC allelic diversity we use several techniques as PCR, denaturing gradient gels electrophoresis (DGGE) and DNA sequencing, combined with bioinformatics analysis, population genetics and statistics.

At the MHC class I our target locus UBA, was amplified unspecifically together with other non-classical genes and pseudogenes, which hampered the total analysis to determine the possible association of these alleles with resistance or susceptibility to disease. However, at the MHC class II a specific characterization of the desired locus was achieved, founding a high level of allelic diversity in the studied samples, very similar to those reported for natural populations. With these data we performed an evolutionary analysis about the origins of diversity at the MHC class II alpha and beta in salmon, concluding that both recombination and positive selection are two important elements in generating diversity at these molecules.

Finally, the comparison of surviving individuals versus the mortalities due to the pathogen, both on naturally infected farms as in controlled challenge trials, allowed us to identify alleles strongly associated with resistance and/or susceptibility to bacteria *Piscirickettsia salmonis* for the three analyzed species. In this sense, our results promote the use these MHC class II alleles as potential markers for selection of breeding salmon to produce disease-resistant progeny.

AGRADECIMIENTOS

A mi pequeña Florencia por ser mi compañera y darme alegría y ánimo cada día.

A mi esposo Francisco por alentarme a realizar un doctorado, acompañarme, apoyarme y soportarme durante todos estos años.

A mis padres y hermanas por apoyarme siempre tanto en lo personal como en lo laboral, especialmente cuidando a Florencia.

A todos mis amigos y familia por creer en mí y darme ánimo siempre.

A mi tutor, Dr. Sergio Marshall, por guiarme y formarme en el camino de la investigación.

A la Dra. Sonia Consuegra, por recibirme en su laboratorio y darle valor agregado a mi tesis.

A la comisión evaluadora de mi tesis

A mis compañeros y amigos del laboratorio, especialmente a Andrea, Verónica, Claudia, Roxana, Paula, Fernanda, Luis M. Jorge, Edgar, Jöhrn y Carlos; por los almuerzos, convivencias, viajes, risas y el apoyo incondicional.

Y a todos aquellos que aportaron en mi formación doctoral, incluyendo los profesores del programa de doctorado, la comisión evaluadora de mi tesis, y aquellos que me ayudaron con labores experimentales o correcciones, especialmente: Constanza, Pablo, Vitalia, Fanny y Jorge O.

Muchísimas gracias y hasta siempre!!

ÍNDICE GENERAL

	Pág
DEDICATORIA.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	vi
INDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. La salmonicultura en Chile.....	3
2.2. Síndrome Rickettsial Salmónido: características y posibles soluciones.....	4
2.3. MHC como marcador genético de selección.....	8
2.4. Características generales del MHC.....	11
2.5. MHC en teleósteos: especificaciones en salmónidos.....	18
2.6. DGGE como herramienta de detección de diversidad alélica.....	22
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1. Diseño de partidores.....	26
4.2. Origen de las muestras.....	26
4.2.1. Muestras provenientes de centros de cultivo.....	27
4.2.2. Muestras provenientes de ensayos de desafío.....	27
4.3. Extracción de ADN.....	28
4.4. PCR en tiempo real.....	28
4.5. PCR.....	29
4.6. DGGE.....	29
4.7. Purificación de alelos y secuenciación.....	30
4.8. Edición de secuencias, análisis de diversidad y análisis filogenético.....	30
4.9. Análisis evolutivo.....	31
4.9.1. Análisis de recombinación / mutación.....	31
4.9.2. Análisis de selección.....	32
4.10. Prueba de equilibrio de Hardy Weinberg.....	33
4.11. Análisis de resistencia / susceptibilidad.....	33
4.11.1. Pruebas de diferenciación genética.....	34
4.11.2. Análisis de asociación.....	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36

5.1.	Parte I: Diversidad del MHC en salmónidos cultivados en Chile y evolución del MHC clase II.....	37
5.1.1.	Antecedentes Preliminares.....	37
5.1.2.	Resultados.....	38
5.1.2.1.	Selección de la región polimórfica a estudiar del MHC y diseño de partidores.....	38
5.1.2.2.	Amplificación de los genes MHC clase I y II.....	41
5.1.2.3.	Análisis preliminar de la variabilidad alélica del MHC por PCR en tiempo real.....	42
5.1.2.4.	Análisis de polimorfismo del MHC clase I.....	43
5.1.2.5.	Análisis de polimorfismo del MHC clase II.....	48
5.1.2.6.	Análisis evolutivo del MHC clase II.....	53
	a) Análisis de recombinación.....	53
	b) Análisis de selección.....	55
5.1.3.	Discusión.....	57
5.2.	Parte II: Asociación entre la diversidad del MHC clase II y la resistencia o susceptibilidad a <i>Piscirickettsia salmonis</i> en salmónidos cultivados en Chile.....	64
5.2.1.	Antecedentes Preliminares.....	64
5.2.2.	Resultados.....	65
5.2.2.1.	Análisis de diversidad del MHC clase II.....	65
5.2.2.2.	Análisis de equilibrio poblacional de Hardy-Weinberg.....	65
5.2.2.3.	Prueba de diferenciación poblacional.....	66
5.2.2.4.	Análisis de disimilitud alélica del MHC clase II.....	67
5.2.2.5.	Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas.....	68
5.2.3.	Discusión.....	70
5.3.	Parte III: Asociación de alelos del MHC clase II con resistencia o susceptibilidad a <i>Piscirickettsia salmonis</i> en ejemplares <i>Salmo salar</i> desafiados con la bacteria.....	73
5.3.1.	Antecedentes Preliminares.....	73
5.3.2.	Resultados.....	74
5.3.2.1.	Ensayo de desafío y análisis de diversidad del MHC clase II.....	74
5.3.2.2.	Análisis de equilibrio poblacional de Hardy-Weinberg.....	75
5.3.2.3.	Prueba de diferenciación poblacional.....	76
5.3.2.4.	Análisis de disimilitud alélica del MHC clase II.....	77
5.3.2.5.	Análisis de frecuencias alélicas y haplotípicas.....	77
5.3.3.	Discusión.....	81
6.	CONCLUSIONES FINALES.....	85
7.	PROYECCIÓN FUTURA Y RECOMENDACIONES.....	86
8.	NOMENCLATURA.....	88
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	92
	ANEXOS.....	107
	FINANCIAMIENTO.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 2.1. Principales exportaciones de salmónidos por especie y país destino para el Año 2006.....	3
Figura 2.2. Salmón del Atlántico infectado naturalmente con <i>P. salmonis</i>	6
Figura 2.3. <i>P. salmonis</i> al interior de una vacuola citoplasmática de la línea celular CHSE-214.....	7
Figura 2.4. Procesamiento y presentación antigénica por el MHC clase I y II.....	13
Figura 2.5. Presentación antigénica vía MHC y generación de la respuesta inmune celular y humoral.....	14
Figura 2.6. Mapa simplificado de la organización del MHC en humanos.....	15
Figura 2.7. Estructura de las moléculas MHC.....	16
Figura 2.8. Representación de mutaciones puntuales en el PBR del MHC clase II de <i>S. salar</i> respecto a humanos.....	17
Figura 2.9. Organización génica de las regiones IA y IB del MHC clase I de <i>S. salar</i>	20
Figura 2.10. Modalidades de DGGE.....	23
Figura 2.11. Caracterización de una población de <i>O. tshawytscha</i> mediante DGGE.....	24
Figura 4.1. Diseño experimental del ensayo de desafío de individuos <i>S. salar</i> con la bacteria <i>P. salmonis</i>	28
Figura 5.1. Selección de la región de estudio y diseño de partidores para el MHC.....	40
Figura 5.2. Simulación del perfil de fusión de una secuencia creado por el programa WinMelt de BioRad.....	41
Figura 5.3. Amplificación por PCR de los loci UBA, DAA y DAB del MHC clase I y II de <i>S. salar</i> , <i>O. mykiss</i> y <i>O. kisutch</i>	42
Figura 5.4. Análisis de la variabilidad alélica del MHC mediante PCR en tiempo real.....	43
Figura 5.5. Caracterización de los genes del MHC clase I presentes en individuos de las especies <i>S. salar</i> , <i>O. mykiss</i> y <i>O. kisutch</i> mediante DGGE.....	45
Figura 5.6. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas para el MHC Clase I.....	46
Figura 5.7. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas deducidas del MHC clase I.....	47

Figura 5.8. Caracterización alélica del MHC Clase II de <i>S. salar</i> , <i>O. mykiss</i> y <i>O. kisutch</i> mediante DGGE.....	48
Figura 5.9. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas para el MHC clase II de <i>O. kisutch</i> , <i>O. mykiss</i> , <i>S. salar</i> , y humano.....	51
Figura 5.10. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas deducidas del MHC clase II para <i>S. salar</i> , <i>O. mykiss</i> y <i>O. kisutch</i>	52
Figura 5.11 Diversidad nucleotídica no-sinónima promedio (Ka) para el MHC clase II de salmónidos naturalmente expuestos a <i>P. salmonis</i>	68
Figura 5.12. Frecuencias alélicas para el MHC Clase II en salmónidos naturalmente expuestas a <i>P. salmonis</i>	69
Figura 5.13. Caracterización alélica del MHC Clase II de <i>S. salar</i> mediante DGGE.....	75
Figura 5.14. Diversidad nucleotídica no-sinónima promedio (Ka) del MHC clase II de <i>S. salar</i> desafiados con <i>P. salmonis</i>	77
Figura 5.15. Frecuencias alélicas y haplotípicas totales para el MHC Clase II de <i>S. salar</i> por grupos experimentales del ensayo de desafío.....	78
Figura 5.16. Frecuencias alélicas y haplotípicas totales para el MHC Clase II de <i>S. salar</i> por subgrupos sobrevivientes y mortalidades del ensayo de desafío.....	79
Figura 5.17. Frecuencias alélicas y haplotípicas para el MHC Clase II de <i>S. salar</i> por grupo experimentales y estado de salud en el ensayo de desafío.....	80
Figura 5.18. Frecuencias alélicas para el MHC Clase II de <i>S. salar</i> por tanque experimental en el ensayo de desafío.....	81
Figura 7.1. Posibles metodologías a implementar en la identificación de individuos resistentes o susceptibles a <i>P. salmonis</i> utilizando el MHC como marcador.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 2.1. Estudios de asociación entre alelos del MHC y la resistencia a enfermedades en vertebrados.....	10
Tabla 2.2. Diversidad y ligamiento de los genes del MHC en diferentes especies.....	17
Tabla 5.1. Variabilidad del MHC clase II alfa y beta en <i>S. salar</i> , <i>O. mykiss</i> y <i>O. kisutch</i>	49
Tabla 5.2. Resultados del análisis de recombinación para los locus DAA y DAB del MHC clase II de salmónidos utilizando tres programas diferentes.....	54
Tabla 5.3. Modelos de sitios al azar estimados para los locus DAA y DAB del MHC clase II de salmónidos.....	56
Tabla 5.4. Sitios bajo selección positiva en los locus DAA y DAB del MHC clase II de salmónidos identificados utilizando tres diferentes métodos.....	56
Tabla 5.5. Prueba de Hardy-Weinberg para el MHC de salmónidos naturalmente expuestos a <i>P. salmonis</i>	66
Tabla 5.6. Pruebas FST y de diferenciación exacta entre los grupos de peces sanos y enfermos naturalmente expuestos a <i>P. salmonis</i>	67
Tabla 5.7. Valores de sobrevivencia y mortalidad para grupos <i>S. salar</i> desafiados con <i>P. salmonis</i>	74
Tabla 5.8. Variabilidad del locus DAA y DAB del MHC clase II en los grupos <i>S. salar</i> desafiados con <i>P. salmonis</i>	75
Tabla 5.9. Prueba de Hardy-Weinberg para el MHC de individuos <i>S. salar</i> desafiados con <i>P. salmonis</i>	76
Tabla 5.10. Prueba de diferenciación génica exacta entre los peces sobrevivientes y mortalidades de los grupos experimentales A y B desafiados con <i>P. salmonis</i>	76

1. INTRODUCCIÓN

Chile constituye el segundo mayor productor de salmónidos a nivel mundial, con cifras anuales que bordean las 400 mil toneladas y un nivel de exportación sobre los US\$ 2.000 millones FOB (Fuente: Sección Economía IFOP). Sin embargo, año tras año la proliferación de diversos agentes patógenos amenaza la industria produciendo pérdidas significativas.

Dichos patógenos se aprovechan de las limitaciones asociadas a cultivos confinados tales como el hacinamiento y las escasas medidas sanitarias, mientras que la importación de ovas también contribuye a la introducción de nuevos agentes infecciosos.

Entre los patógenos que están causando mayores problemas en nuestro país destacan, entre otros, los virus IPN e ISA; el parásito *Caligus rogercresseyi*; y múltiples bacterias, tales como las del género vibrio, *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum* y muy especialmente *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*) (Bravo y Midtlyng, 2007).

P. salmonis es el agente causal del síndrome rickettsial salmónido (SRS) y uno de los patógenos más agresivos y persistentes de la salmonicultura nacional (Fryer y Hedrick, 2003). Este organismo infecta a los peces en jaulas de mar, provocando daños irreversibles en la superficie de los mismos y necrosis en diferentes tejidos, lo que no solo dificulta la eventual comercialización de los sobrevivientes, sino que también genera altas tasas de mortalidad, siendo responsable de hasta un 80% de las pérdidas de la industria (Leal y Woywood, 2007).

Los actuales mecanismos de profilaxis, que incluyen principalmente vacunas y el uso de diferentes clases de antibióticos, no han sido eficientes en el control de la enfermedad; utilizándose actualmente en la salmonicultura nacional más de 100 toneladas métricas anuales de antibióticos (Cabello, 2006), con el 70 % de ellos destinado sólo al control del SRS (San Martín *et al.*, 2010). Por otro lado, las vacunas existentes (Smith *et al.*, 1995; Wilhelm *et al.*, 2006; Marshall *et al.*, 2007) sólo permiten reducir en un pequeño porcentaje las mortalidades (Bravo y Midtlyng, 2007) necesitándose en la mayoría de ellas una manipulación individual de los peces que los hace aún más susceptibles a la infección

debido a lesiones superficiales y al stress provocado durante el proceso; todo lo cual va en contra del bienestar animal requerido por organizaciones regulatorias internacionales (Midtlyng, 1997).

Teniendo estos antecedentes a la vista, resulta imperativo encontrar un método efectivo para tratar la enfermedad, que permita no sólo reducir las enormes pérdidas de la industria, sino también que sea inocuo para el ambiente y cumpla así con las regulaciones internacionales de comercialización de este valioso recurso. Así, dentro de todas las opciones del mercado actual: vacunas clásicas, vacunas orales, peces transgénicos, pisciculturas con recirculación y selección natural de peces resistentes (Aqua, 2007b); la más valida por ser más económica, amigable y la menos invasiva, pareciera ser la última de ellas, es decir la selección de peces reproductores resistentes a la enfermedad, que puedan transferir esta ventaja a sus progenies.

La selección al azar de peces resistentes es un proceso largo, tedioso y de muy baja eficiencia. Sin embargo, el proceso es facilitado cuando se utiliza un gen o un grupo de ellos como referente (Meuwissen y Sonesson, 2004). En este marco referencial, los genes del sistema inmunológico del pez, y específicamente aquellos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) aparecen como un muy buen candidato para la realización de esta selección. Ello se debe a que estos genes participan directamente en la presentación antigénica de los patógenos y por ende en la defensa inducida del pez (Klein, 1986). De hecho, se ha demostrado en peces salmónidos la existencia de alelos del MHC que confieren cierto nivel de resistencia tanto para virus como para bacterias patógenas; condición que ha permitido reducir significativamente los índices de infección y mortalidad (Langefors *et al.*, 2001; Lohm *et al.*, 2002; Grimholt *et al.*, 2003a; Kjøglum *et al.*, 2006; Kjøglum *et al.*, 2008).

Tomando en cuenta lo anterior, esta tesis pretende identificar alelos del MHC de clase I y II de peces salmónidos en cultivo de las tres especies mayormente cultivadas en Chile: *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Oncorhynchus kisutch*, que sirvan como marcadores inmunogenéticos de resistencia y/o de susceptibilidad a la bacteria *P. salmonis*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La salmonicultura en Chile

Los salmónidos son un tipo de pez teleósteo (peces de esqueleto óseo) de la familia *Salmonidae* oriundos del hemisferio Norte. Son peces en su mayoría con ciclo de vida anádroma, es decir nacen en agua dulce, migran al océano y vuelven al agua dulce para reproducirse, y muchos de ellos han sido domesticados para su cultivo. En Chile todas las especies cultivadas actualmente no son nativas, sino que han sido introducidas paulatinamente desde principios del siglo XX primero con fines deportivos y luego para su cultivo, habiéndose producido un crecimiento de hasta 100 veces en la producción nacional durante la década de los 90's (Muñoz Gomá, 2009).

Lo anterior ha provocado que la salmonicultura constituya una de las actividades económicas con mayor crecimiento en Chile durante las últimas dos décadas, posicionándonos como el segundo mayor productor de salmónes a nivel mundial con exportaciones que alcanzaron en el año 2006 (previo al inicio de esta tesis) las 378 mil toneladas, equivalentes a US\$ 2.207 millones FOB. Este valor exportado representó el 60% de la biomasa total de salmón producido, siendo las principales especies cultivadas el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*); con mercados de destino en Japón, Estados Unidos y la Unión Europea (Aqua, 2007a) (Figura 2.1).

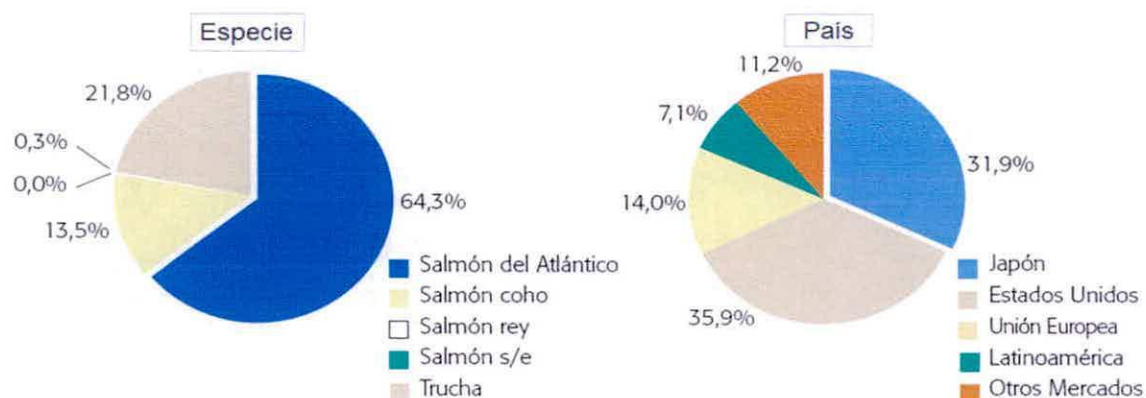


Figura 2.1. Principales exportaciones de salmónidos por especie y país destino para el Año 2006 (Aqua, 2007a). Fuente: Salmon Chile.

Durante los dos años posteriores la producción total de salmones se mantuvo en crecimiento llegando a un máximo de 530 mil toneladas en el año 2008, sin embargo, y debido principalmente a la aparición del virus ISA en el año 2007 (Godoy *et al.*, 2008) se produjo un descenso en la producción con valores que llegaron a las 352 mil toneladas en el 2010 (Fuente: Sección de economía IFOP). A pesar de ello, el valor del producto nacional se ha mantenido estable, fundamentalmente por la alta calidad del producto apetecido internacionalmente, la existencia de varias empresas dedicadas a la actividad que estabilizan su valor, y por el cultivo de variadas especies que diversifican la industria.

A partir de la crisis las autoridades se han visto obligadas a mejorar las normativas regulatorias de la industria salmonera nacional especialmente en el área sanitaria y ambiental, gracias a lo cual la producción ha comenzado a recuperarse (Galilea, 2011). Sin embargo, aún existe un alto número de patógenos que afecta a la salmonicultura nacional, para los cuales es necesario encontrar una solución, destacando particularmente la bacteria *Piscirickettsia salmonis* por ser el patógeno más persistente y agresivo desde hace ya dos décadas, y el responsable de hasta un 80% de las pérdidas totales de la producción (Leal y Woywood, 2007).

2.2. Síndrome Rickettsial Salmónido: características y posibles soluciones

El síndrome rickettsial salmónido (SRS) o piscirickettsiosis, es una agresiva enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*) (Cvitanich y Garate, 1991). Este patógeno fue aislado por primera vez en 1989 de un salmón coho moribundo en una salmonicultora del sur de Chile (Fryer *et al.*, 1990), y su infectividad ha sido demostrada posteriormente para todas las especies de salmones cultivados e incluso para especies no salmónidas (Mauel y Miller, 2002).

La enfermedad ha sido descrita tanto en agua de mar como de estuario (Bravo y Campos, 1989b; a; Fryer *et al.*, 1990; Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich y Garate, 1991) y muy ocasionalmente en agua dulce (Bravo, 1994; Gaggero *et al.*, 1995). Los brotes se presentan generalmente entre otoño y primavera, semanas después que los alevines son transferidos desde agua dulce al mar (Bravo y Campos, 1989b; Cvitanich y Garate, 1991) y

han sido asociados a fluctuaciones en la temperatura del agua, presencia de un brote de algas no-tóxicas y/o estrés relacionado con tormentas (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991).

La transmisión de la bacteria se produce tanto de forma horizontal como vertical. En la transmisión horizontal los peces infectados eliminan la bacteria por heces y orina (Almendras et al., 1997), y luego ésta sería capaz de penetrar las barreras superficiales de la piel y branquias (Smith et al., 1999). Se ha demostrado que este tipo de transmisión se ve favorecida por el contacto entre los peces y la alta densidad poblacional (Almendras et al., 1997; Salinas et al., 1997), y que otros agentes marinos como *Caligus sp.* debilitarían las defensas del pez actuando también como reservorio del patógeno (Smith et al., 1999). Además, si bien inicialmente se mostró una baja viabilidad *in vitro* de *P. salmonis* en agua dulce (Lannan y Fryer, 1994), estudios recientes han demostrado su sobrevivencia en forma libre hasta por 40 días en agua marina (Olivares y Marshall, 2010). Por otra parte, la transmisión vertical de progenitores a las ovas ha sido demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* y sus posibles mecanismos han sido propuestos (Larenas et al., 1996; Larenas et al., 2003).

Los primeros signos clínicos de SRS se manifiestan como nado errático y lento en la superficie, con orillamiento y choque contra las paredes de la jaula (Larenas et al., 1998). A nivel macroscópico se pueden observar lesiones externas como descamación, nódulos y úlceras en la piel, hemorragias en la base de las aletas, palidez branquial y una severa anemia. Internamente *P. salmonis* es capaz de colonizar distintos tejidos del pez incluyendo riñón, hígado, bazo, intestino e incluso cerebro (Skarmeta et al., 2000). Se observa hemorragia y necrosis en la mayoría de los tejidos, además de reno y esplenomegalia, nódulos amarillos en el hígado y mucus amarillento al interior del intestino (Figura 2.2) (Bravo y Campos, 1989b; a; Fryer et al., 1990; Schäfer et al., 1990; Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich y Garate, 1991; Larenas et al., 1995). Estas lesiones provocan que el pez muera o termine tan débil que se vea afectada su eventual comercialización.

P. salmonis ha sido descrita como una bacteria Gram-negativa no-móvil pleomórfica, con forma predominantemente cocoide y tamaño entre 0,5-1,5 μm (Fryer et al., 1992; Rojas et al., 2008). La filogenia de su rRNA 16S la localiza en una nueva familia *Piscirickettsiae* en la clase de γ -proteobacteria (Fryer et al., 1992; Mauel et al., 1999).

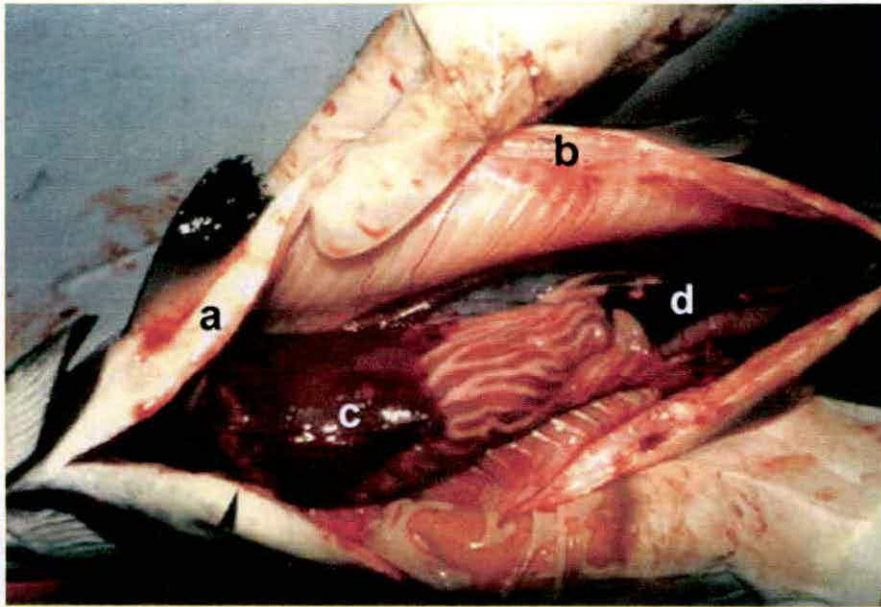


Figura 2.2. Salmón del Atlántico infectado naturalmente con *P. salmonis*. Se puede observar hemorragias en la base de las aletas (a) y en el tejido muscular de la pared abdominal (b). Además se aprecia el hígado de aspecto moteado (c) y esplenomegalia (d) (Larenas et al., 1998)

La bacteria fue descrita primeramente como intracelular obligado, replicándose por división binaria al interior de vacuolas citoplasmáticas rodeadas de membranas (Fryer *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1992; Fryer y Mael, 1997) (Figura 2.3). Tradicionalmente la bacteria es crecida *in vitro* en líneas de cultivos celulares como la derivada de riñón embrionario de salmón Chinook CHSE-214, donde es capaz de replicarse entre los 15 y 18 °C provocando un efecto citopático (Fryer *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1992). Sin embargo, se ha visto que también infecta otras líneas celulares, como por ejemplo la línea celular de insectos Sf21 (Birkbeck *et al.*, 2004); y la línea RTS11 de macrófagos/monocitos de trucha donde la bacteria es capaz de infectar, sobrevivir, replicarse y propagarse (Rojas *et al.*, 2009), induciendo apoptosis como una posible estrategia para modular el sistema inmune del huésped y establecer una infección productiva (Rojas *et al.*, 2010).

Recientemente se ha re-postulado a la bacteria como intracelular facultativo, debido a que distintos grupos de investigación han logrado crecerla en medio artificial libre de células (Mael *et al.*, 2008; Mikalsen *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2009).

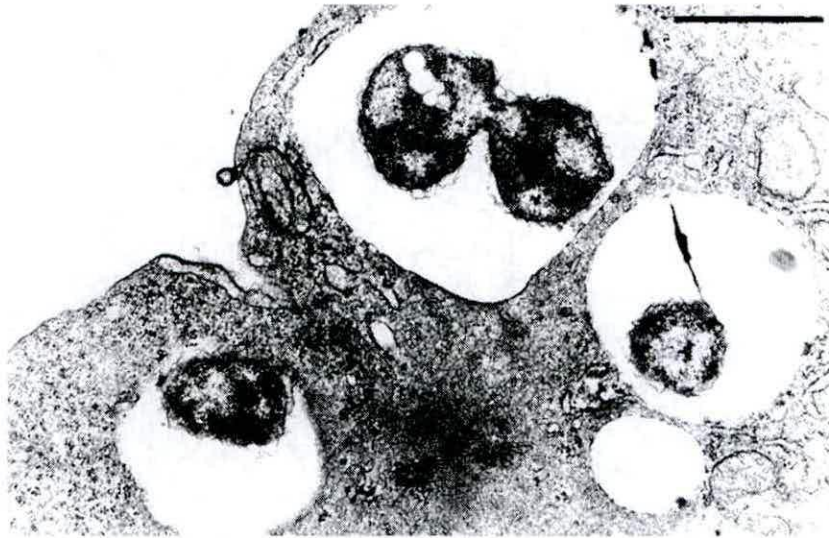


Figura 2.3. *P. salmonis* al interior de una vacuola citoplasmática de la línea celular CHSE-214. Células en división a los cuatro días post inoculación. Tinción Giemsa. Barra = 1 μ m (Fryer y Mauel, 1997).

Como se dijo en un principio, la enfermedad fue inicialmente reportada en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Fryer et al., 1990), pero pronto surgieron evidencias en otros salmónidos como *Salmo salar* (*S. salar*) y *Oncorhynchus mykiss* (*O. mykiss*), donde ha causado perjuicios tanto en el hemisferio norte como sur, en lugares como Noruega, Irlanda, Escocia, este de Canadá y sur de Chile (Brocklebank et al., 1993; Rodger y Drinan, 1993; Fryer y Lannan, 1996; Almendras et al., 1997; Olsen et al., 1997; Jones et al., 1998); registrándose últimamente su aparición en otras especies como el róbalo (*Atractoscion nobilis*) en California (Arkush et al., 2005).

En Chile particularmente, la infección por *P. salmonis* es la principal causa de mortalidad en salmónidos cultivados (hasta 80%) (Leal y Woywood, 2007), con pérdidas que se estiman en cerca de US\$150 millones (Wilhelm et al., 2006). Las medidas de profilaxis actuales incluyen principalmente el uso combinado de antibióticos (San Martín et al., 2010) y de vacunas clásicas (Somerset et al., 2005); sin embargo, y a pesar del enorme esfuerzo de farmacéuticas y de investigadores nacionales (Smith et al., 1995; Wilhelm et al., 2006; Marshall et al., 2007), aún no existe una medida de control 100% efectiva contra la enfermedad (Bravo y Midtlyng, 2007).

Debido a las estrictas legislaciones ambientales y sanitarias que empezarán a regir en Chile (Galilea, 2011) resulta imperativo encontrar una solución al SRS, que sea amigable con el

ambiente y permita sustentar y consolidar la capacidad salmonicultrora nacional. De este modo, entre las opciones mejor consideradas se presenta la selección de especímenes naturalmente resistentes a la enfermedad, la cual ofrece la ventaja de seleccionar una característica presente naturalmente en los peces, sin la necesidad de recurrir a otras técnicas como ingeniería genética o mutagénesis al azar (Olesen *et al.*, 2000). Si se dirige esta selección a un grupo de genes en particular esto se denomina selección asistida por marcadores o MAS.

2.3. MHC como marcador genético de selección

La selección asistida por marcadores (MAS) se presenta como una forma ventajosa de asegurar una progeie que tenga las características deseadas, permitiendo reducir el tiempo y costo de los programas de selección vigentes (Meuwissen y Sonesson, 2004). Esto ya que en la metodología tradicional de selección debe esperarse hasta que el pez alcance la adultez para observar sus características fenotípicas, lo que en salmónidos podría tomar décadas debido a su tiempo generacional promedio de 5 años (Hindar *et al.*, 2004). Actualmente existen estudios preliminares para seleccionar a los reproductores con mejor conversión alimenticia, mayor tamaño, tasa de crecimiento, resistencia a stress y a enfermedades, pero en general MAS ha sido raramente aplicada a la acuicultura comercial (Ferguson y Danzmann, 1999) .

Un marcador genético está definido como un fragmento de ADN que puede relacionarse con un rasgo genético. Estos marcadores de tipo polimórfico pueden ser genes únicos o una región completa (QTLs) que caracteriza una población, por lo que han sido ampliamente utilizados en la realización de mapas genéticos por ligamiento y en la selección de animales para un rasgo particular (Dekkers, 2004).

En el intento de establecer un marcador genético que pueda ser utilizado para la selección de resistencia a una enfermedad, los programas de mejoramiento genético de salmón del Atlántico y trucha en Noruega para resistencia a furunculosis, ISA e IPN; así como los programas Danés y Francés para VHS (Olesen *et al.*, 2000), han escogido genes relacionados con el sistema inmunológico del pez, siendo los del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) los más utilizados.

El MHC corresponde a una región de genes cuyos productos están implicados en la respuesta inmune. Sus genes de clase I y II codifican proteínas responsables del reconocimiento de péptidos propios y no-propios para presentarlos a los linfocitos T, desencadenando la respuesta inmune adquirida en los vertebrados (Klein, 1986). Dichos genes constituyen uno de los más polimórficos conocidos en la naturaleza (Trowsdale y Parham, 2004) y por ende han sido ampliamente estudiados.

La relación de los genes del MHC con la resistencia o susceptibilidad a enfermedades ha sido estudiada en diversos vertebrados (Tabla 2.1). Esto debido a que en teoría, aquellas moléculas del MHC que presenten gran afinidad por un péptido, permitirán crear resistencia al patógeno al cual pertenecen, mientras que aquellos péptidos que no puedan ser presentados por el MHC derivarán en una susceptibilidad al patógeno (Kjøglum *et al.*, 2005). El mejor ejemplo de esto son los resultados encontrados para la enfermedad de Marek en pollos donde un alelo particular (BG21) del MHC clase I es capaz de conferir resistencia total a un *herpesvirus* (Briles *et al.*, 1983). En salmónidos específicamente, destacan los trabajos para *S. salar* donde se han identificado combinaciones de alelos del MHC clase I y II que confieren cierto nivel de resistencia al virus ISA o a la bacteria *Aeromonas salmonicida* (*A. salmonicida*) (Langefors *et al.*, 2001; Lohm *et al.*, 2002; Grimholt *et al.*, 2003a; Kjøglum *et al.*, 2006; Kjøglum *et al.*, 2008). Y aunque algunos prefieren el uso de QTLs, por sobre un gen específico en la búsqueda de asociación de características, similares resultados se han obtenido por ejemplo, al intentar encontrar resistencia al virus IHN en trucha ya sea utilizando QTLs (Barroso *et al.*, 2008) o el MHC clase II como marcador (Palti *et al.*, 2001).

Además, a pesar de la pseudo-tetraploidía presente en el genoma de los salmones, es sabido que los genes clásicos del MHC clase I y II se comportan de manera diploide (Shum *et al.*, 2001), siendo una característica heredable, fácil de seguir en la progenie.

Tabla 2.1

Estudios de asociación entre alelos del MHC y la resistencia a enfermedades en vertebrados

Referencia	Especie	Enfermedad o patógeno	MHC
(Briles et al., 1983)	Pollo	Marek (<i>Herpesvirus</i>)	I
(Hill et al., 1991)	Humanos (África)	Malaria (<i>Plasmodium</i>)	I y II
(Vejbaesya et al., 1998)	Humanos (Tailandia)	Hepatitis C	I y II
(Flores-Villanueva et al., 2003)	Humanos (Francia)	SIDA (VIH)	I
(Medina y North, 1998)	Ratón	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	I
(Messaoudi et al., 2002)	Ratón	<i>Herpesvirus hominis</i>	I
(Paterson et al., 1998)	Oveja	Nemátodo intestinal	II
(Bonneaud et al., 2006)	Gorrión	Malaria	I
(Harf y Sommer, 2005)	<i>Gerbillurus paebe</i>	Helminfos	II
(Wegner et al., 2003)	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	15 patógenos diferentes	II
(Kurtz et al., 2004)	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	<i>S. solidus</i> + <i>G. anomala</i>	II
(Zhang et al., 2006)	<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	II
(Wedekind et al., 2004)	<i>Coregonus sp.</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	II
(Croisetière et al., 2008)	<i>Salvelinus fontinalis</i>	<i>A. salmonicida</i>	II
(Langefors et al., 2001)	<i>Salmo salar</i>	<i>A. salmonicida</i>	II
(Lohm et al., 2002)	<i>Salmo salar</i>	<i>A. salmonicida</i>	II
(Grimholt et al., 2003b)	<i>Salmo salar</i>	<i>A. salmonicida</i> + ISAV	I y II
(Miller et al., 2004a)	<i>Salmo salar</i>	IHNV	I y II
(Kjøglum et al., 2006)	<i>Salmo salar</i>	ISAV	I y II
(Kjøglum et al., 2007)	<i>Salmo salar</i>	<i>A. salmonicida</i>	I y II
(Wynne et al., 2007)	<i>Salmo salar</i>	Amoebic Gill Disease	I y II
(Consuegra y Garcia de Leaniz, 2008)	<i>Salmo salar</i>	<i>Anisakis sp.</i>	II
(Dionne et al., 2009)	<i>Salmo salar</i>	13 patógenos diferentes	II
(Palti et al., 2001)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	IHNV	II
(Barroso et al., 2008)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	IHNV	QTLs

Por todo lo anteriormente expuesto, los genes del MHC parecen ser un candidato perfecto como marcador de resistencia o susceptibilidad a *P. salmonis* en salmónidos. De este modo, si podemos caracterizar dentro de una población cuáles son los alelos que determinan que un pez sea resistente, podremos seleccionar reproductores e incluso ovas con dicho genotipo, creando de esta forma una población que sea naturalmente resistente a *P. salmonis*. Sin embargo, los estudios poblacionales pueden ser complicados debido a que es imposible estudiar una población completa y generalmente lo que se tiene es una muestra de ella. Por lo mismo, y específicamente al estudiar los genes del MHC en una población, se debe tener en cuenta lo siguiente:

- a) El principio de Hardy-Weinberg (HW) establece que en poblaciones naturales de gran tamaño y libre apareamiento, donde no existe selección, mutación o migración; las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes a través de las generaciones siguiendo una relación matemática conocida como equilibrio de HW (Guo y Thompson, 1992). Por lo que cualquier desvío de dicho equilibrio implica que alguna de las condiciones iniciales no se está cumpliendo.

- b) En la mantención de la diversidad del MHC tanto la selección natural como sexual desempeñan un papel importante (Bernatchez y Landry, 2003). La selección natural, dirigida por patógenos, puede estar impulsada por una ventaja heterocigótica o una ventaja de alelos raros. Según la primera hipótesis los individuos heterocigotos se benefician de tener diferentes moléculas de MHC por ser capaces de presentar una gama más amplia de agentes patógenos (Penn *et al.*, 2002). Mientras que la hipótesis de ventaja de los alelos raros supone que los agentes patógenos co-evolucionan con las moléculas MHC más comunes, y por ello los alelos raros representan una ventaja (Takahata y Nei, 1990).

De lo anteriormente expuesto se deduce que, primero, cuando hay selección no existe equilibrio de HW y segundo, que para que exista selección debiera existir un exceso de individuos heterocigotos o en su defecto alelos particulares que estén generando una ventaja adaptativa. Por ende, al intentar estudiar la asociación de los genes del MHC con la resistencia a *P. salmonis*, será fundamental analizar tanto las frecuencias alélicas como la proporción de individuos heterocigotos para los genes del MHC en las poblaciones en estudio.

2.4. Características generales del MHC

La mayor parte de la información sobre la estructura y función de los genes del MHC proviene de estudios en humanos (Hughes y Nei, 1988; 1989; Hughes *et al.*, 1994; Parham y Ohta, 1996; Consortium, 1999) y especies modelo como ratón, rata y pollo (Steinmetz y Hood, 1983; Bartl *et al.*, 1994; Kaufman *et al.*, 1999; Günther y Walter, 2001; Hurt *et al.*, 2004). Y aunque hace algunos años poco se conocía en vertebrados inferiores como peces, reptiles y anfibios, los estudios que existen a la fecha han demostrado tanto similitudes como

diferencias respecto a los vertebrados superiores, siendo los peces teleósteos, a los cuales pertenecen los salmónidos, uno de los más estudiados (revisado en Bernatchez y Landry, 2003). Esto debido a que: a) son utilizados para el cultivo a gran escala; b) algunas de sus especies son utilizadas como modelo de estudio (medaka y pez cebra); c) solo existen dos especies totalmente secuenciadas (*Takifugu rubripes* y *Danio rerio*); y d) representan uno de los vertebrados más primitivos en que los genes MHC han sido identificados.

Como se dijo anteriormente, el MHC corresponde a una región de genes cuyos productos están implicados en el reconocimiento y presentación de antígenos y en la generación de la respuesta inmune (Klein, 1986). En humanos el procesamiento y presentación antigénico se encuentra bien caracterizado, llevándose a cabo en células presentadoras de antígeno (APC) vía MHC (Figura 2.4). En términos generales, si hablamos de antígenos endógenos, propios o de origen viral, estos serán degradados por el proteosoma y los péptidos generados serán transportado al retículo endoplásmico (RE), donde se unirán a moléculas de MHC clase-I, para luego migrar a través de las vesículas de Golgi hasta la superficie celular y presentar sus péptidos. Por el contrario, si hablamos de antígenos extracelulares, por ejemplo de origen bacteriano, éstos serán endocitados al interior de la APC mediante vesículas que verterán su contenido en endosomas primarios donde los antígenos serán degradados a péptidos y unidos a moléculas MHC clase-II para su posterior exposición en la superficie celular. Generalmente este tipo de presentación ocurre en células APC profesionales de tipo célula dendrítica o macrófago, sin embargo, los antígenos proteicos pueden ser alternativamente reconocidos directa o indirectamente por los linfocitos B en sus receptores BCR; siendo capaces de internalizarlos, degradarlos y presentarlos también por la vía del MHC clase-II (Abbas et al., 2008).

los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos contra el patógeno en cuestión (Abbas et al., 2008).

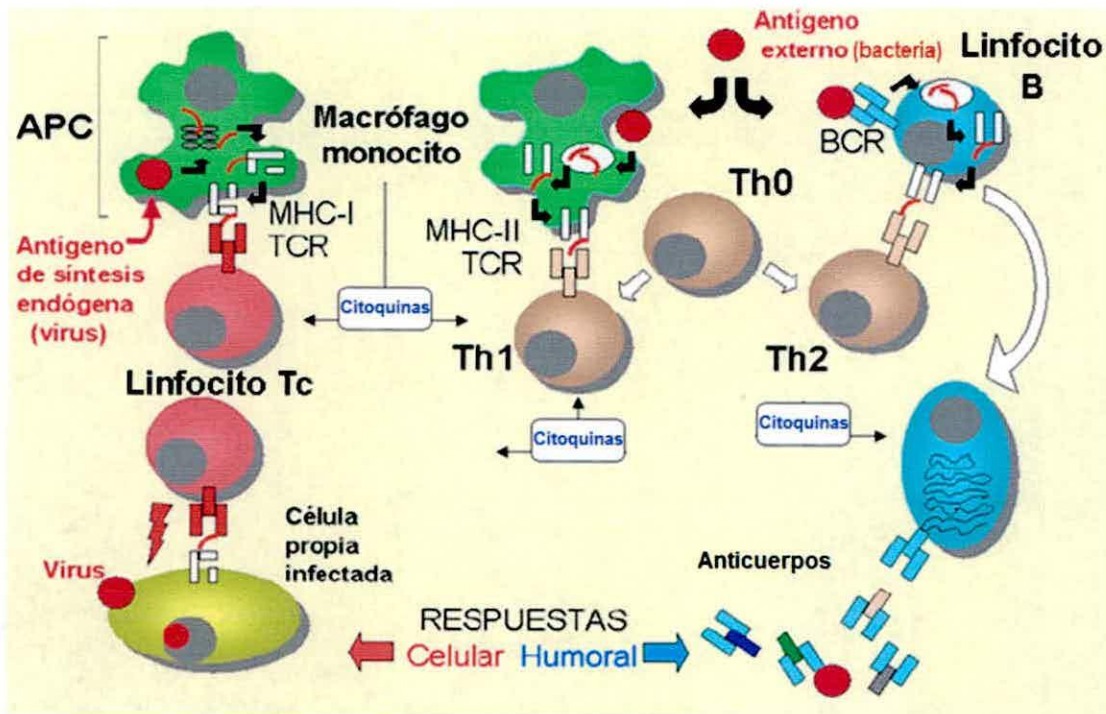


Figura 2.5. Presentación antigénica vía MHC y generación de la respuesta inmune celular y humoral. (Imagen modificada de: www.montpellier.com.ar).

En humanos el MHC comprende una región de alrededor de 4 millones de bases de alta densidad ubicados en el cromosoma 6, la cual generalmente es subdividida en tres regiones denominadas como clase I, II y III (Figura 2.6) (Consortium, 1999). Las regiones de clase I y II contienen los genes del MHC clase I y II respectivamente, además de los componentes del proteosoma y transportadores asociados al procesamiento de antígenos (TAP), todos participando en la presentación antigénica y estrechamente ligados (Hughes y Yeager, 1998). Mientras que la región de clase III (denominación poco utilizada) codifica para genes que no participan en la presentación de antígenos, como algunas citoquinas y proteínas del complemento (Abbas et al., 2008), los cuales son altamente conservados y también se encuentran presentes en peces teleósteos (Revisado en Tort et al., 2003).

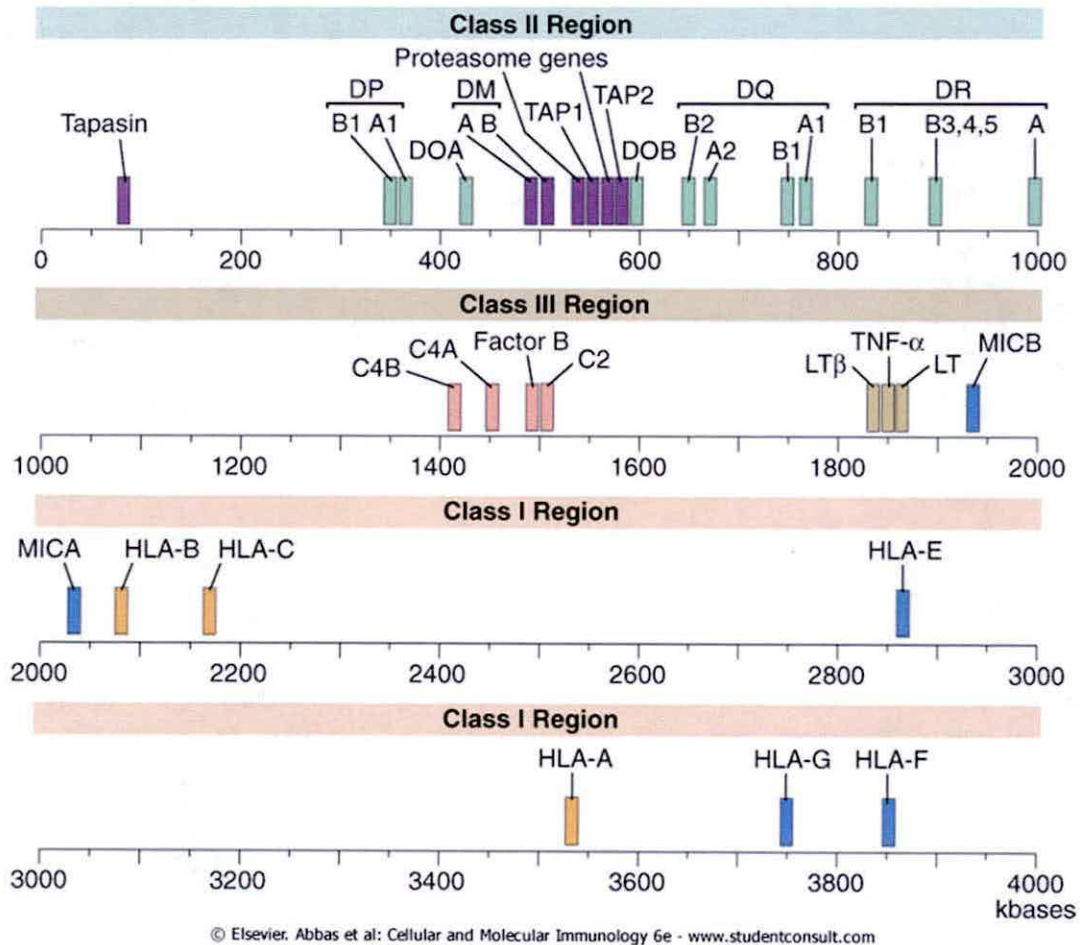


Figura 2.6. Mapa simplificado de la organización del MHC en humanos. Se excluyen genes de función desconocida y pseudogenes (Abbas et al., 2008).

La estructura del MHC en humanos ha sido predicha mediante estudios cristalográficos de las moléculas tanto de clase I como clase II (Bjorkman et al., 1987a; Brown et al., 1993; Stern et al., 1994), demostrando que ambas presentan estructuras funcionales muy similares. Las moléculas de clase I constan de dos cadenas polipeptídicas separadas: la cadena α , cuyo dominio amino terminal (alfa1 y alfa2) es el encargado de interactuar con el antígeno peptídico en el sitio de unión de péptidos o PBR (del inglés Peptide Binding Region), representando la zona más variable; y la cadena β , o β_2 microglobulina, no codificada dentro del MHC e invariable para la mayoría de las moléculas. Mientras que las moléculas de clase II están compuesta de 2 cadenas polipeptídicas (α y β) unidas covalentemente y similares en estructura, siendo ambas polimórficas en su dominio N-terminal (alfa1 y beta1) correspondiente al PBR (Figura 2.7) (Abbas et al., 2008). Aunque para peces no existe un modelo cristalográfico del MHC, la semejanza evolutiva del MHC de mamíferos y peces

permite asumir que el plegamiento global de la molécula debiera estar preservado (Stet *et al.*, 1996; Ruiz *et al.*, 2003). Así, un estudio bioinformático del modelo estructural para el MHC clase I y II de *S. salar* basado en las moléculas humanas y de ratón confirmó las semejanzas en la estructura global que forma el bolsillo de unión de péptidos, pero encontró diferencias puntuales en aquellos residuos participando directamente en el reconocimiento del antígeno, tanto entre mamíferos y peces, como entre diferentes alelos para la especie (Cárdenas *et al.*, 2010) (Figura 2.8).

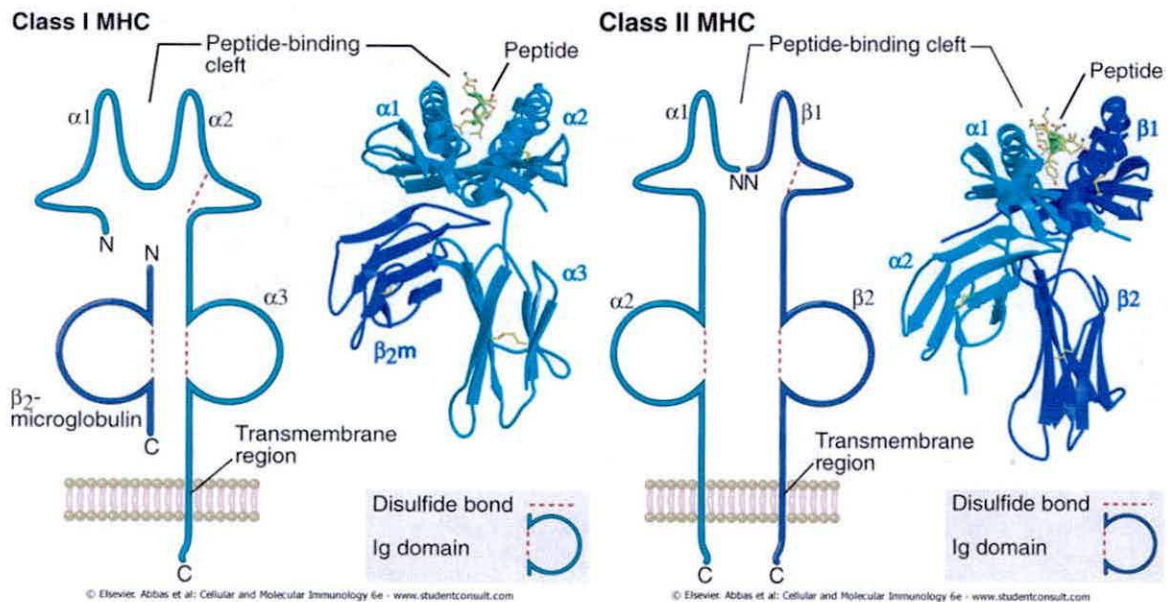


Figura 2.7. Estructura de las moléculas MHC. Se muestra el MHC Clase I a la izquierda y el MHC Clase II a la derecha, indicando el sitio de unión de péptidos (peptide binding cleft) (Abbas *et al.*, 2008).

La mayor parte del polimorfismo de los genes MHC en humanos se concentra en los aminoácidos responsables de la presentación de antígenos (PBR) (Hughes y Nei, 1988; 1989), siendo esta variabilidad generada principalmente por mutación puntual en conjunto con recombinación y conversión génica (Belich *et al.*, 1992; Watkins *et al.*, 1992; Parham y Ohta, 1996; Martinsohn *et al.*, 1999), y mantenida por selección balanceada (Edwards y Hedrick, 1998; Hedrick, 2002; Penn *et al.*, 2002). Y aunque los productos de ambos MHC, clase I y clase II, son altamente polimórficos en la mayoría de las especies (Bernatchez y Landry, 2003; Horton *et al.*, 2004; Piertney y Oliver, 2006), los genes de clase II α pueden mostrar niveles muy diferentes de variabilidad entre especies (Bontrop *et al.*, 1999; Stet *et al.*, 2003) (Tabla 2.2).

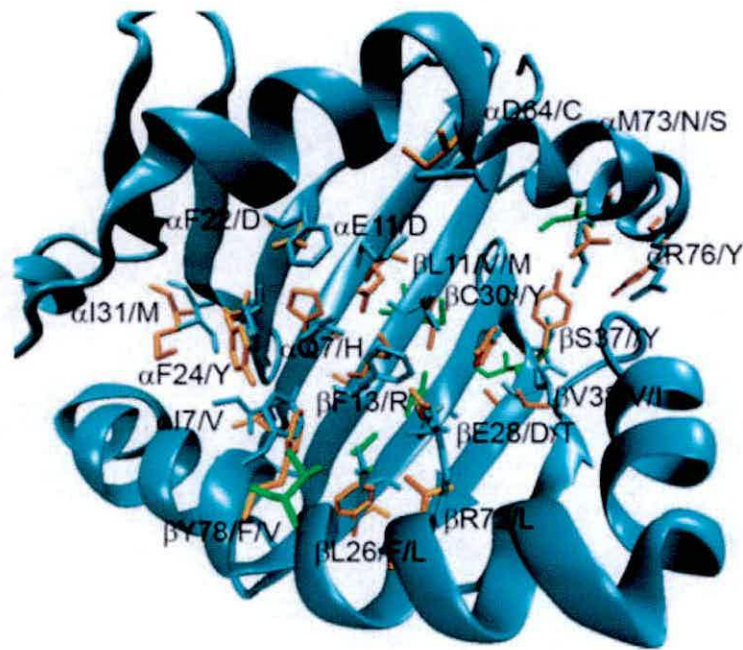


Figura 2.8. Representación de mutaciones puntuales en el PBR del MHC clase II de *S. salar* respecto a humanos, según el modelo tridimensional propuesto por Cárdenas *et al.* (2010). Las etiquetas se refieren a los residuos en la molécula HLA-DRB humana, seguido del aminoácido en la molécula de salmón.

Tabla 2.2

Diversidad y ligamiento de los genes del MHC en diferentes especies. Se muestra el número de locus clásicos (LC), no-clásicos (LNC), de alelos por locus clásico y ligamiento entre locus clásicos.

Organismo	MHC-I			MHC-II α			MHC-II β			Ligamiento
	LNC	LC	Alelos/LC	LNC	LC	Alelos/LC	LNC	LC	Alelos/LC	LC
Humano ^a	3	3	3134	2	3	66	2	3	1100	I-II α -II β
Pollo ^b	V	2	24	0	1	2	V	2	29	I-II β
Pez zebra ^c	2	1	ND	3?	1	ND	5	1	ND	II α -II β
Salvelinus ^d	ND	ND	ND	ND	1	47	ND	1	59	ND
Salmón Atlántico ^e	8	1	33	3	1	30	1	1	42	II α -II β
Trucha arcoíris ^f	8	1	35	3	1	3	1	1	19	ND
Salmón coho ^g	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1?	1	21	ND

ND= No disponible; ?=Incerteza

^a (Reche y Reinherz, 2003); Base de datos EBI: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>

^b (Kaufman *et al.*, 1999; Salomonsen *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2004b)

^c (Sültmann *et al.*, 1994; Graser *et al.*, 1996; Bingulac-Popovic *et al.*, 1997; Sambrook *et al.*, 2005)

^d Incluye *S. alpinus*, *S. Malma* y *S. namagush*. Refs: (Dorschner *et al.*, 2000; Noakes *et al.*, 2003; Conejeros *et al.*, 2008; Kekäläinen *et al.*, 2009); Base de datos nucleotídica NCBI.

^{e,f} (Miller *et al.*, 2006; Harstad *et al.*, 2008); Base de datos nucleotídica NCBI.

^g (Miller y Withler, 1996)

Actualmente la mayoría de las conclusiones sobre la evolución del MHC se basan en especies modelo como humanos o ratón, en los cuales: a) los genes del MHC I y II están estrechamente ligados (Hughes y Yeager, 1998), y b) la totalidad o la mayor parte del polimorfismo de la clase II se concentra en el gen de la cadena beta (Kaufman *et al.*, 1999; Reche y Reinherz, 2003; Salomonsen *et al.*, 2003) (Tabla 2.2). Sin embargo, estudios recientes en especies no-modelo han aportado interesantes conocimientos sobre la evolución del MHC (revisado en Bernatchez y Landry, 2003), resultando muy atractivo estudiar lo que ocurre en el primitivo MHC presente en los peces teleósteos, quienes excepcionalmente presentan genes MHC de clase I y clase II no ligados físicamente (Hansen *et al.*, 1999; Grimholt *et al.*, 2002).

2.5. MHC en teleósteos: especificaciones en salmónidos

Los peces teleósteos al igual que todos los vertebrados cuentan con un sistema inmune tanto innato como adquirido (Watts *et al.*, 2001). En vertebrados inferiores la respuesta inmune innata posee gran relevancia como primer mecanismo de defensa del organismo, debido a que la respuesta inmune adquirida o específica, se desarrolla lentamente tras una infección (Tort *et al.*, 2003). Sin embargo, en peces se ha comprobado la existencia de respuesta inmune adquirida tanto de tipo celular como humoral, y es en este tipo de respuesta donde el MHC juega un rol fundamental (Tort *et al.*, 2003).

Como se pudo apreciar en la sección anterior, la presentación antigénica vía MHC es bastante conocida en humanos (Figuras 2.4 y 2.5), y aunque en peces los estudios funcionales son escasos, existe una similitud de procesos, tipos celulares y componentes génicos que hacen presumir que el proceso es bien preservado (Vallejo *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1998).

En teleósteos está corroborada la existencia de células presentadoras de antígeno (APC) de tipo macrófago-monocito (Vallejo *et al.*, 1992), y aunque se desconoce si existen células dendríticas similares a las de mamífero, recientemente se ha clonado en peces el marcador CD83 característico de células dendríticas activas (Ohta *et al.*, 2004). Sus linfocitos B son morfológicamente similares a los humanos, pero con la capacidad de producir diferentes tipos de inmunoglobulinas (Ig); existiendo un repertorio circulante capaz de producir IgM y un sub-repertorio capaz de producir una IgT con función especializada en mucosa intestinal

(Zhang et al., 2010), teniendo excepcionalmente ambos tipos de linfocitos B, IgM⁺ e IgT⁺, capacidad fagocítica (Li et al., 2006). Respecto a los linfocitos T existe clara evidencia de su existencia y actividad en teleósteos, y aunque sólo existen marcadores celulares disponibles para róbalo y carpa, los genes para los co-receptores CD8 y CD4 ya han sido clonados en diversas especies teleósteas incluyendo trucha, carpa, fugu y salmón (Revisado en Randelli et al., 2008). Adicionalmente se ha comprobado la existencia de memoria inmunológica, fundamental en los procesos de vacunación (Arkoosh y Kaattari, 1991), siendo esta susceptible a múltiples factores tanto fisiológicos como ambientales.

Respecto a los genes del MHC, los genes clásicos de MHC clase I y II han sido descrito para todas las especies teleósteas estudiadas (Tabla 2.2), y aquellas proteínas accesorias como TAP y componentes del proteosoma también han encontrado su símil en teleósteos (Grimholt, 1997; Takami et al., 1997).

La organización génica del MHC en teleósteos es diferente a la de humanos, y posee características que han sido atribuidas a dos procesos de duplicación durante la evolución, el primero ocurrido por un proceso de autoploidización que tiene como consecuencia que dentro del genoma humano existan tres regiones parálogas al MHC en los cromosomas 1, 9 y 19 (Kasahara, 1997), y un segundo proceso de duplicación que permite separar a los peces cartilagosos de los de hueso (teleósteos).

La mayor diferencia del MHC de los teleósteos respecto a los mamíferos es la carencia de ligadura entre los genes de clase I y clase II (Hansen *et al.*, 1999; Grimholt *et al.*, 2002), siendo conocidos simplemente como los genes MH (Stet et al., 2003). En teleósteos, al igual que en otros vertebrados inferiores, sólo se ha encontrado ligamiento entre genes de clase I y otros que participan en la carga del péptido como subunidades del proteosoma (PsmB, LMP) y transportadores (TAP2) (Kulski et al., 2002); habiéndose sugerido recientemente un ligamiento entre un linaje de genes "L" de clase I y clase II (Dijkstra et al., 2007), y entre el MHC clase II alfa y beta de *Salmo salar* (Stet et al., 2002). Aunque aún faltan evidencias que avalen dichos resultados.

Para el MHC de clase I existen dos regiones en el genoma de los salmónidos debido a los eventos de duplicación génica: la región IA ubicada en el cromosoma 18 de *O. mykiss* y en el 27 de *S. salar*; y la región duplicada IB ubicada en el cromosoma 14 de ambas especies

(Shiina *et al.*, 2005; Lukacs *et al.*, 2007). En *O. mykiss* la región IA contiene el locus clásico *UBA*, mientras que la región IB contiene los locus no-clásicos *UCA*, *UDA* y *UEA* y el pseudogen *UFA* (Shiina *et al.*, 2005). En *S. salar* el número y distribución de los genes cambia, con la región IA conteniendo el gen clásico *UBA* y el gen no-clásico *ULA*; y la región IB conteniendo un gene similar a *Onmy-UCA* pero que resultó en pseudogen (Figura 2.9) (Lukacs *et al.*, 2007). Para ambas especies los estudios de diversidad han demostrado un alto polimorfismo en el locus clásico *UBA* (Grimholt *et al.*, 2002).

La mayoría de las moléculas del MHC clase-I reportadas en salmónidos y de las cuales se habló anteriormente pertenecen al denominado linaje "U", conteniendo al locus clásico *UBA* y otras moléculas MHC no-clásicas (Grimholt *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2006). Sin embargo existen otros 2 linajes de clase I denominados "Z" y "L" encontrados en diversos teleósteos (Stet *et al.*, 2003). Los linajes tipo "Z", "ZE" y "TC-16" corresponden a locus clásicos singulares para diferentes especies, carentes de ligadura, pero que no han sido encontrados en salmónidos (Hashimoto *et al.*, 1990; Van Erp *et al.*, 1996; Kruiswijk *et al.*, 2002). Mientras que el linaje de tipo "L", única evidencia de ligadura entre genes de clase I y clase II, ha sido encontrado en salmónidos y ciprínidos, presentando en *O. mykiss* genes con características típicas de MHC Clase I (*Onmy-LAA*), y otros que son procesados y carecen la mayoría de sus intrones (*Onmy-LBA like*) (Dijkstra *et al.*, 2007).

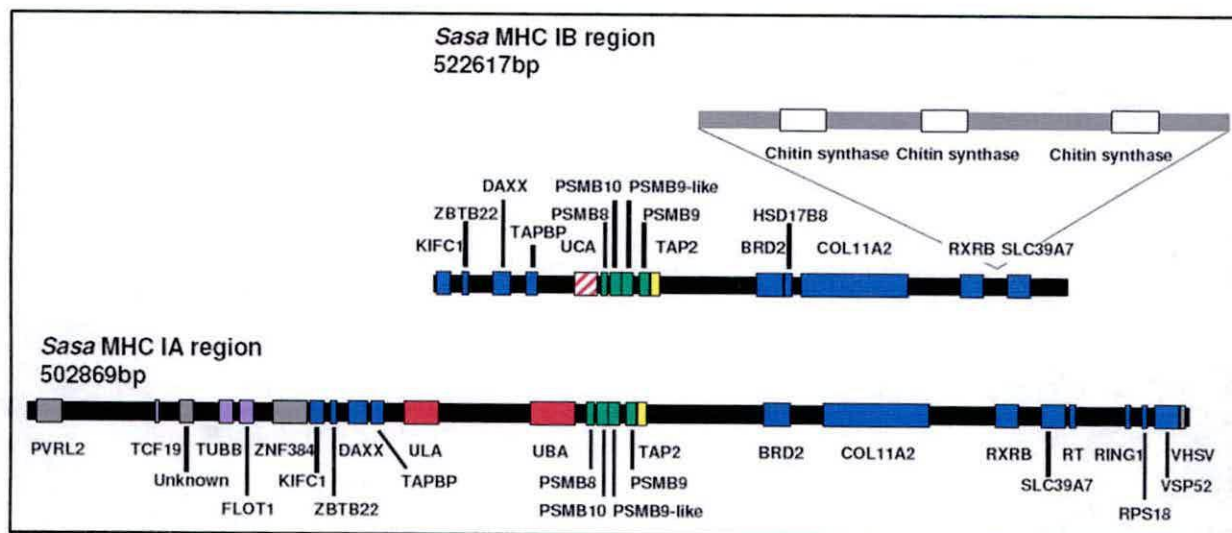


Figura 2.9. Organización génica de las regiones IA y IB del MHC clase I de *S. salar*. La designación de los locus se basa en homología con bases de datos y se utiliza la nomenclatura del MHC humano (Modificado de Lukacs *et al.*, 2007).

Para el MHC clase II se ha demostrado que los salmónidos de los géneros *Salvelinus* (Conejeros et al., 2008; Croisetière et al., 2008), *Salmo* (Grimholt et al., 2000; Stet et al., 2002) y *Oncorhynchus* (Grimholt et al., 2000) responden a los patógenos expresando un set único de genes clásicos de clase II, contrario a lo que ocurre en mamíferos, aves y otros peces como “sticklebacks” (Reusch et al., 2001) que expresan varios genes de clase II. Estos genes, codificando para las cadenas α y β de las moléculas de clase II se encuentran en salmónidos en los denominados locus clásicos *DAA* y *DAB*, los cuales han demostrado un alto nivel de polimorfismo en *O. mykiss* (Aguilar y Garza, 2006), *Salvelinus alpinus* (Conejeros et al., 2008) y *S. salar* (Landry y Bernatchez, 2001; Stet et al., 2002; Consuegra et al., 2005a).

Estudios iniciales con especies del género *Oncorhynchus* habían sugerido la existencia de más de un locus de MHC clase II-beta en algunas especies al encontrarse 3 o más alelos en un individuo (Miller y Withler, 1996). Consecuentemente, un estudio reciente en *S. salar* reveló la existencia de una nueva región de clase II, no ligada a las anteriores, conteniendo 3 genes no-clásicos de tipo II-alfa denominados *Sasa-DBA*, *DCA* y *DDA*; y un gen no-clásico de tipo II-beta denominado *Sasa-DBB*. Dos de estas secuencias (*DCA* y *DDA*) también fueron encontradas en *O. mykiss*, y nuevamente su patrón de expresión y la carencia de polimorfismo de todas ellas las clasificó como genes no-clásicos (Harstad et al., 2008). Por lo tanto, está establecido en salmónidos la existencia de un solo locus clásico para cada MHC clase II alfa y beta.

Debido a que la respuesta inmune adaptativa depende principalmente de la capacidad del MHC para unir péptidos patogénicos, estas moléculas han co-evolucionado con los patógenos convirtiéndose en una de las más polimórfica de la naturaleza, aumentando así la posibilidad de sobrevivencia frente a una infección (Grimholt et al., 2003a; Reche y Reinherz, 2003). Dicho patrón de polimorfismo se encuentra establecido en la especie como un todo, con cada individuo portando un conjunto único de alelos MHC responsables de conferirle resistencia o susceptibilidad frente a un patógeno particular. Dado lo anterior, nosotros proponemos que el estudio del polimorfismo del MHC en una población expuesta a un patógeno, nos llevará al conocimiento de aquellos alelos asociados con la resistencia o susceptibilidad a dicho agente.

2.6. DGGE como herramienta de detección de diversidad alélica

Dentro de todas las metodologías existentes para la detección de mutaciones o variantes alélicas acopladas a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la más conveniente hasta el momento es el DGGE, ya que permite analizar un gran número de muestras al mismo tiempo, es bastante sensible, relativamente rápido, y bastante más económico que su competidor más directo: la secuenciación a gran escala.

La técnica de Electroforesis en Geles de Gradiente Denaturante (DGGE) fue descrita inicialmente por Fischer y Lerman en 1983, y corresponde a una metodología de rastreo molecular que permite separar dos fragmentos de ADN de similar longitud, pero diferente secuencia en función de sus propiedades de fusión (Myers *et al.*, 1987).

La propiedad de fusión del ADN permite que las dos hebras de una cadena puedan ser separadas por medios físicos, como temperatura, o químicos, como un agente denaturante. La desnaturalización de la hebra se produce al alcanzar su temperatura de fusión (T_m) o la concentración correspondiente de agente denaturante, la cual dependerá del tamaño del fragmento y de su composición GC.

En la técnica de DGGE se utiliza un gradiente de denaturante en conjunto a una temperatura base, emulando así diferentes temperaturas de fusión, a modo de provocar un retraso en la migración de un fragmento cuando éste alcanza su T_m . Esto se observa experimentalmente en las dos modalidades en que se utiliza el DGGE, la primera denominada "DGGE perpendicular" crea un gradiente de denaturante en dirección perpendicular a la de corrida del gel, permitiendo visualizar el perfil de fusión de la secuencia y determinar el rango de concentración de denaturante entre los que se produce la desnaturalización (Figura 2.10-A). La segunda modalidad, denominada "DGGE paralelo" utiliza un gradiente de denaturante en la misma dirección de la electroforesis, permitiendo observar tanto las formas de doble hebra como de cadena simple a diferentes alturas de migración para fragmentos de igual tamaño, y es la que tradicionalmente se conoce como DGGE (Figura 2.10-B) (Knapp, 2005).

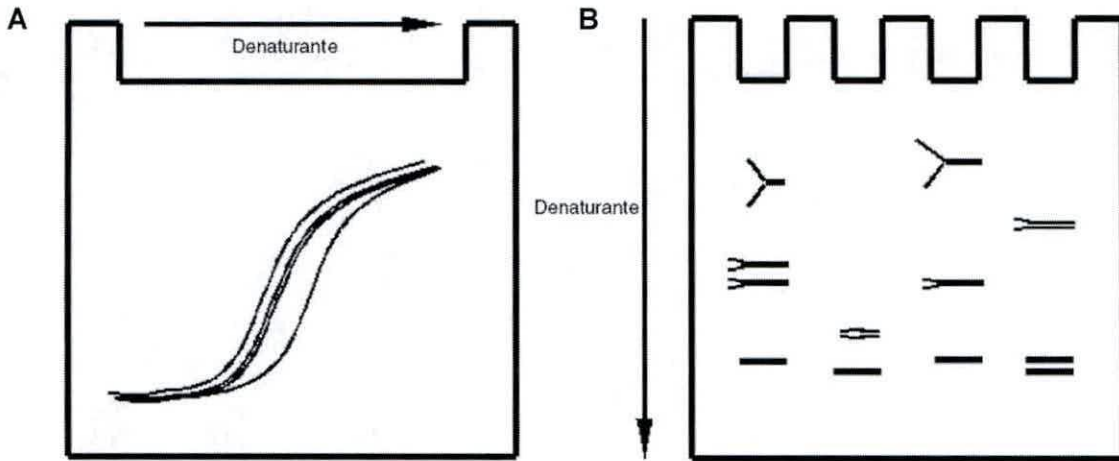


Figura 2.10. Modalidades de DGGE. Se esquematiza **A.** DGGE perpendicular, con gradiente de denaturante horizontal, **B.** DGGE paralelo, con gradiente vertical de denaturante. En ambas figuras cada línea representa un alelo particular (Modificado de Knapp, 2005).

Para realizar el muestreo de una población de individuos suelen diseñarse partidores específicos que amplifiquen una zona variable de la secuencia de un largo entre 50 y 500 pb. Estos fragmentos son amplificados por PCR y luego corridos en un gel DGGE consiguiendo detectar el o los alelos que contiene el individuo en ese locus particular (Miller y Withler, 1998).

Tradicionalmente solo 50% de los cambios de base en una secuencia son detectables por DGGE, ya que las secuencias suelen presentar uno o más dominios de fusión y esta técnica no separa fragmentos de ADN con diferencias de base en el dominio de alta T_m . Sin embargo, se descubrió que creando un dominio alto de fusión y bajando la T_m del resto de la secuencia mediante la adición de una secuencia rica en GC, llamada cola-GC, de unos 30-40 pb a uno de los partidores, se puede detectar hasta un 100% de las mutaciones en una secuencia (Sheffield et al., 1989).

Varios grupos han utilizado la técnica DGGE para detectar polimorfismos en el MHC de diversas especies, describiéndolo como un método rápido y sensible para la detección de variaciones nucleotídicas en muestreos poblacionales masivos (Miller *et al.*, 1999), y apreciando su gran utilidad en el rastreo de mutaciones a través de todo un exón o varios de ellos, y no sólo en un lugar particular del ADN (Knapp, 2005). Adicionalmente, análisis comparativos con las técnicas de secuenciación y RFLPs en el análisis de la diversidad del MHC de *S. salar* demostraron que aunque la técnica de RFLPs es capaz de analizar

secuencias de mayor longitud, ella solo lo fue capaz de diferenciar el 88% de los haplotipos presentes en la población, mientras DGGE logró identificar el 94% de ellos (Langefors et al., 2000). Y aunque la metodología requiere de varias técnicas anexas como PCR y secuenciación, si se pone cuidado en cada etapa, los resultados debieran ser 100% confiables

Algunos ejemplos del uso de DGGE en la caracterización del MHC es la tipificación del HLA-DRB y el HLA-B en humanos (Knapp, 2005), y la asociación de alelos del MHC Clase II con resistencia o susceptibilidad a *A. salmonicida* en la especie *S. salar* (Langefors et al., 2001; Lohm et al., 2002). Además, el grupo de Miller ha utilizado esta técnica para identificar el número y distribución de alelos del MHC Clase IA en poblaciones de *Oncorhynchus tshawytscha* (*O. tshawytscha*) (Miller et al., 1999), y para rastrear variaciones en la distribución geográfica de esta especie y de *O. kisutch* (Miller et al., 1997) (Figura 2.11).

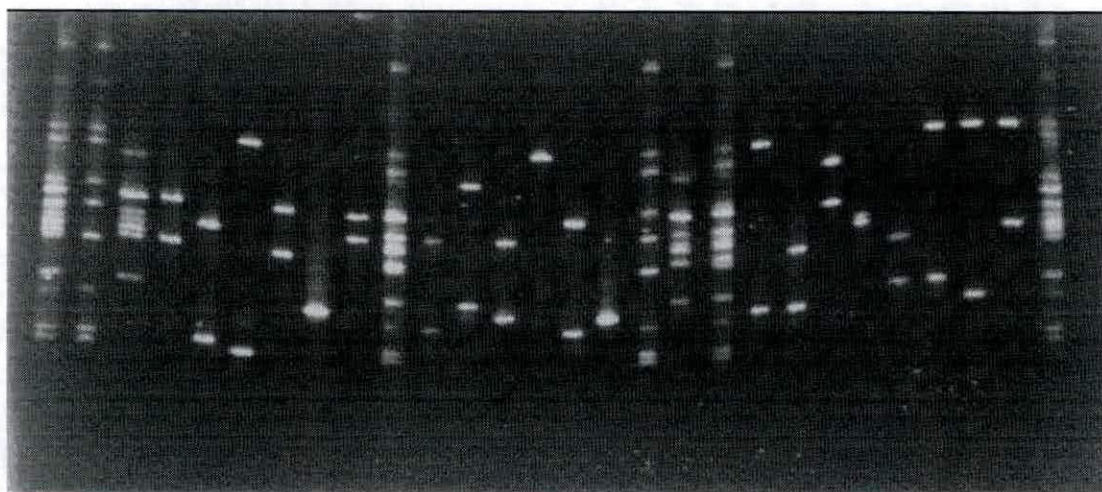


Figura 2.11. Caracterización de una población de *O. tshawytscha* mediante DGGE. Fotografía de un gel teñido con Bromuro de Etidio, mostrando 20 individuos. Los carriles con múltiples bandas corresponden a controles conteniendo todos los alelos conocidos (Miller et al., 1997).

Por lo anteriormente expuesto, creemos que DGGE constituye la herramienta ideal para analizar la diversidad del MHC en poblaciones de peces salmónidos expuestos al patógeno *P. salmonis* con el fin de encontrar alelos posiblemente asociados a resistencia o susceptibilidad a esta bacteria.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La caracterización del polimorfismo de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en salmónidos expuestos a *Piscirickettsia salmonis*, permitirá identificar alelos que constituyan marcadores de selección de resistencia y/o susceptibilidad a este patógeno.

OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar y seleccionar alelos del MHC, principalmente de clase II, como eventuales marcadores de resistencia y susceptibilidad a *Piscirickettsia salmonis* en salmónidos en cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el polimorfismo del MHC clase I y II en las especies en cultivo *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Oncorhynchus kisutch*.
2. Caracterizar y definir los alelos del MHC clase II asociados a resistencia y/o susceptibilidad a *Piscirickettsia salmonis*.
3. Corroborar la asociación de resistencia o susceptibilidad a *Piscirickettsia salmonis* mediante ensayos de desafío.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño de partidores

Secuencias de la región $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del MHC clase I (locus *UBA*) y de la región $\alpha 1$ y $\beta 1$ del MHC clase II (locus *DAA* y *DAB*) para las especies *Salmo salar* (*S. salar*) y *Oncorhynchus mykiss* (*O. mykiss*) provenientes de la Base de Datos de Polimorfismos Inmunológicos del EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) fueron utilizadas para el diseño de partidores. Las secuencias correspondientes al segundo o tercer exón de estos genes fueron alineadas utilizando la herramienta ClustalW del EB (<http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2/>) y partidores que amplificaran estas regiones altamente polimórficas fueron diseñados en las zonas conservadas del inicio o final del exón (Tabla A.1, Anexo I). En cada caso una cola-GC de 30 pb (5'-GCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCC-3') fue agregada al partidore sentido o al anti-sentido para mejorar su resolución mediante DGGE (Sheffield et al., 1989). El criterio de adición de esta cola-GC se basó en la estabilización de los perfiles de fusión de las secuencias, simuladas mediante el programa WinMelt (Bio Rad Laboratories, CA, US).

Los partidores utilizados para amplificar los genes MHC de *S. salar* comprendían una región de 246 pb para el locus *UBA*, 303 pb para el locus *DAA* y 311 pb para el locus *DAB*. Mientras que para las especies *Oncorhynchus kisutch* (*O. kisutch*) y *O. mykiss* un mismo juego de partidores pudo ser utilizado para cada locus, abarcándose regiones de 249, 213 y 241 pb para los locus *UBA*, *DAA* y *DAB*, respectivamente (Tabla A.1, Anexo I).

4.2. Origen de las muestras

Las muestras utilizadas durante este trabajo corresponden a salmónidos provenientes de dos orígenes diferentes. Para las dos primeras etapas del trabajo se utilizó muestras de las especies *S. salar*, *O. mykiss* y *O. kisutch* provenientes de centros de cultivos expuestos naturalmente a *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*); mientras que para la tercera etapa se utilizó sólo muestras de individuos *S. salar* desafiados con la bacteria en condiciones controladas.

4.2.1. Muestras provenientes de centros de cultivo

Juveniles de tres especies salmónidas fueron colectados al azar desde diferentes centros de cultivos expuestos a epizootias de *P. salmonis* entre la X y XI región de Chile durante los años 2008-2010. Se esperaba coleccionar un total de 150 individuos para la especie *S. salar* y 50 individuos para cada una de las otras dos especies; sin embargo, debido a los brotes del virus ISA que afectaron a *S. salar* a partir del año 2007 (Godoy *et al.*, 2008), fue imposible conseguir el número de muestras propuesto inicialmente. Finalmente, un total de 57 individuos *S. salar*, 44 individuos *O. mykiss* y 88 individuos *O. kisutch* provenientes de 5, 3 y 9 centros de cultivo respectivamente, fueron analizados.

Los individuos fueron clasificados como sanos o enfermos basándose en sus síntomas clínicos y mediante confirmación de la presencia del patógeno. Cortes de tejido de riñón, hígado y cerebro fueron utilizados para la identificación del patógeno en la empresa ADL Diagnostics (Puerto Montt, Chile) mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) utilizando un anticuerpo monoclonal específico contra *P. salmonis* y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato (FITC) (Bios Chile I.G.S.A., Chile) (Ferguson y Danzmann, 1999; Grimholt *et al.*, 2003a). Los tejidos de hígado, bazo o músculo colectados desde los peces fueron mantenidos en etanol 95% a -20 °C hasta su utilización.

4.2.2. Muestras provenientes de ensayos de desafío

Ensayos de desafío controlados fueron llevados a cabo en la empresa SGS Chile Ltda. (Puerto Varas, Chile). 200 peces de la especie *S. salar* pertenecientes a dos grupos experimentales A y B (Fanad Yagan 3w y AGASAGN208) permanecieron en aclimatación durante 14 días, presentando una buena respuesta. Los individuos de cada grupo fueron marcados con un corte en la aleta caudal superior (grupo A) o en la aleta dorsal (grupo B). Cada individuo fue inyectado vía intraperitoneal con una dosis de 0,2 ml de una dilución de 1:100 de inóculo de *P. salmonis*. Posteriormente cada grupo experimental (A y B) fue dividido en dos subgrupos, de 50 peces cada uno, y colocados en dos tanques (1 y 2) para permitir la convivencia entre los grupos iniciales (Figura 4.1).

Las mortalidades fueron registradas diariamente, y muestras de branquia y músculo fueron tomadas de cada individuo tras su muerte o sobrevivencia posterior al ensayo. Los tejidos fueron preservados en etanol 95% a -20 °C hasta su utilización.

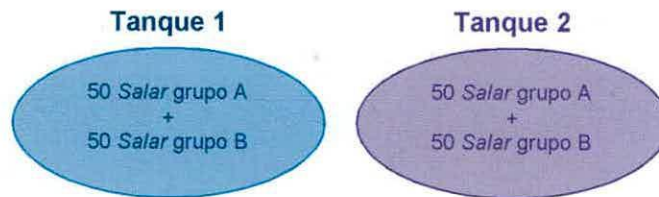


Figura 4.1. Diseño experimental del ensayo de desafío de individuos *S. salar* con la bacteria *P. salmonis*.

4.3. Extracción de ADN

Las muestras de tejido preservadas en etanol fueron colocadas durante 1 hora en agua estéril a 4 °C para eliminar el exceso de etanol. Luego se procedió a la extracción del ADN utilizando la resina Chelex 100 (Bio Rad Laboratories, CA, USA). Para ello se agregó 200 µL de Chelex 7% a aproximadamente 30 mg de tejido, se maceró con varilla pellet pestle y se hirvió las muestras a 100 °C durante 15 min. Se centrifugó la muestra a 14.000 rpm durante 10 min y se traspasó el sobrenadante a un tubo limpio. El ADN fue almacenado a 4 °C hasta su posterior uso.

4.4. PCR en tiempo real

Un análisis inicial de las curvas de fusión de los genes del MHC de algunas muestras fue realizado mediante PCR en tiempo real. Cada reacción contenía: 1X tampón de PCR, 2 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTPs, 0,1 µM de cada partidor sin cola-GC, 3 U de Taq polimerasa (Invitrogen, CA, US), 0,1X de SYBR-green y 20-30 ng de ADN, para un volumen final de 30 µL.

El PCR se llevó a cabo en un equipo MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Massachusetts, USA) con una denaturación inicial a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de: denaturación a 95 °C por 30 seg, unión del partidor a la temperatura de "annealing"

correspondiente (Tabla A.1, Anexo I) por 30 seg, extensión a 72 °C por 45 seg y medición de fluorescencia a 74 °C por 2 min. Al finalizar el último ciclo se analizó la curva de fusión de las muestras entre 70 y 95 °C mediante un incremento de temperatura de 0,2 °C cada 5 seg, y monitoreo continuo de la fluorescencia.

Los productos de PCR fueron corridos en un gel de Agarosa 2% junto a un marcador de peso molecular de ADN 100 pb (Winkler Ltda, Santiago, Chile) para comprobar su amplificación y tamaños.

4.5. PCR

La amplificación de las regiones variables de los alelos de interés se llevó a cabo mediante PCR utilizando los partidores previamente diseñados en la sección 4.1 (Tabla A.1, Anexo I). Para ello cada reacción contenía: 1X tampón de PCR GoTaq® Flexi, 2 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTPs, 0,1 µM de cada partidor con Cola-GC, 2 U de GoTaq® Flexi DNA Polimerasa (Promega Corporation, Madison, US) y 400 ng de ADN, para un volumen final de 40 µL.

Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial a 94 °C durante 5 min; 30 ciclos de: denaturación a 94 °C por 30 seg, unión del partidor a la temperatura de “annealing” (Tabla A.1, Anexo I) por 30 seg y extensión a 72 °C por 45 seg; seguido de una extensión final a 72 °C por 8 min (Tabla A.2, Anexo I).

Los productos de PCR fueron corridos en un gel de Agarosa 2% junto a un marcador de peso molecular de ADN 100 pb (Winkler Ltda, Santiago, Chile) para comprobar su amplificación y tamaños.

4.6. DGGE

Los fragmentos de PCR con la cola-GC adicionada, correspondientes a los alelos MHC clase I y II de cada muestra, fueron resueltos mediante una electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE) utilizando el equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad laboratorios, CA, US). Para ello 35-40 µL de cada reacción de PCR junto a 7 µL de

tampón de carga 6X fueron cargados en un gel 8% acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1) en tampón TAE 1X con un rango denaturante urea-formamida específico para cada locus y especie (Tabla A.2, Anexo I) (Myers et al., 1987). Posteriormente el gel fue corrido en tampón TAE 1X a 150 V y 65 °C durante aproximadamente 2 horas o hasta que el frente de migración cayera.

La visualización de las bandas se realizó mediante tinción del gel en solución TAE 1X-Bromuro de Etidio (50 µg/mL) durante 10 min o tinción en solución TAE 1X-Gel Red™ 3X (Biotium Inc., CA, USA) durante 30 minutos, y posterior captura fotográfica en un equipo transiluminador UV.

4.7. Purificación de alelos y secuenciación

Bandas características del patrón de migración de cada individuo en el DGGE fueron cortadas del gel, molidas en 100 µL de agua libre de nucleasas con varilla pellet pestle y dejadas a 4 °C por 15 horas para la extracción del ADN. Estas muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 5 min, y 10 µL del sobrenadante fueron utilizados como templado para 40 µL de reacción de re-amplificación por PCR en las condiciones descritas en el punto 4.5 de esta sección. El tamaño del fragmento amplificado fue corroborado mediante su análisis en gel de agarosa 2%.

La purificación del producto de PCR re-amplificado se llevó a cabo mediante el kit MSB PCRapase (Invitek, Berlín, Alemania) o el kit Gel/PCR DNA Fragments Extraction (Geneaid Biotech Ltda., Taiwan) según instrucciones del fabricante, obteniéndose una concentración final de 40-50 ng/uL de ADN por muestra. Finalmente estos productos fueron secuenciados por la empresa Macrogen Corporation (Seúl, Corea), utilizando los partidores específicos para cada locus, tanto en el sentido “forward” como “reverse”.

4.8. Edición de secuencias, análisis de diversidad y análisis filogenético

Las secuencias obtenidas para el MHC clase I y II fueron alineadas y editadas manualmente utilizando ClustalW, sub-rutina del programa Bioedit (Hall, 1999). La región correspondiente a

los partidores no fue considerada en los análisis y sólo aquellos cambios nucleotídicos presentes en más de un individuo fueron tomados en cuenta. Tal como en estudios anteriores (Consuegra et al., 2005b) los alelos fueron definidos en base a su secuencia aminoacídica, y todas las secuencias fueron subidas a la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) (Anexo II).

El análisis de polimorfismo y diversidad alélica en la población fue realizado mediante los programas MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) y DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009). Para cada locus y especie se calculó el número de sitios segregantes (S), la diversidad nucleotídica (π), la diversidad aminoacídica (AD), y la distancia promedio de cambios sinónimos y no-sinónimos entre alelos (dS y dN) (Nei y Gojobori, 1986).

Los árboles filogenéticos para cada locus fueron realizados mediante el programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) utilizando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) con distancia-p incluyendo todos los aminoácidos. La fiabilidad del árbol fue calculada con la prueba de bootstrap (Felsenstein, 1985) utilizando 1000 iteraciones; y sólo aquellas ramas presentando valores mayores a 50% fueron consideradas correctas.

4.9. Análisis evolutivo

4.9.1. Análisis de recombinación / mutación

Para buscar evidencias de recombinación en nuestras secuencias se utilizó primeramente el método GARD (Genetic Algorithm Recombination Detection) contenido en el paquete HYPHY v 0.99+ beta (Kosakovsky Pond et al., 2005). Luego se utilizó el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009) para estimar el número mínimo de eventos de recombinación (R_m) en la historia de la muestra (Hudson y Kaplan, 1985). A continuación empleamos el programa LDhat (McVean et al., 2002) para probar la importancia de la recombinación con respecto a la mutación puntual en cada lote de secuencias. Para ello se calculó, para cada locus y especie, la tasa de mutación estimada por sitio de Watterson ($\theta=4N_e\mu$) y la tasa poblacional estimada de recombinación para la secuencia completa ($\rho=4N_e r$). Finalmente una prueba de probabilidades de permutación para recombinación fue implementada

basándose en el posible efecto de perder el carácter intercambiable cuando ocurría la recombinación ($p < 0,05$) (McVean et al., 2002).

4.9.2. Análisis de selección

Se utilizó tres pruebas distintas de neutralidad: la prueba D^* y F^* de Fu & Li, la prueba D de Tajima, y la prueba de McDonald y Kreitman; todas compiladas en el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009). La prueba de Tajima (Tajima, 1989) compara el número promedio de mutaciones entre pares de muestras contra una medida estandarizada del número de sitios polimórficos en la muestra. La prueba de Fu & Li (Fu y Li, 1993) se basa en las diferencias entre el número de singletons respecto al número total de mutaciones (prueba D^*) o respecto al número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (prueba F^*). Finalmente, la prueba de McDonald y Kreitman (McDonald y Kreitman, 1991) compara las variaciones en sitios sinónimos y no-sinónimos de una especie con respecto a la divergencia entre especies.

Las evidencias de selección positiva fueron probadas utilizando varios modelos basados en cambio de codón disponibles en PAML v4.2 (Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood) (Yang, 2007). Cinco modelos permitiendo diferentes niveles de selección entre sitios fueron probados. El modelo M_0 considera una tasa de sustitución constante entre todos los sitios (ω), M_1 asume dos categorías de sitios (conservado ($\omega=0$) y neutral ($\omega=1$)), M_2 incluye una nueva categoría de sitios seleccionados ($\omega>1$), mientras M_7 y M_8 asumen una tasa ω heterogénea con una distribución beta continua entre sitios, donde sólo el modelo M_8 permite que existan sitios seleccionados positivamente ($\omega>1$). Utilizando una prueba de probabilidades (Likelihood Ratio Test: $LRT=2\Delta\ln l$) pudimos comparar los modelos neutrales (M_1 y M_7) contra sus contrapartes que permiten selección (M_2 y M_8). Los valores LRT fueron comparados contra una distribución χ^2 con grados de libertad equivalentes al número de parámetros diferentes entre ambos modelos. Posteriormente los modelos pre-seleccionados fueron comparados entre sí utilizando el Criterio de Información Akaike (Akaike Information Criteria: $AIC = -2(\ln l) + 2$ (número de parámetros libres del modelo)) (Akaike, 1974) y aquel modelo minimizando este valor fue considerado el más apropiado. Finalmente, la aproximación Bayes Empirical Bayes (BEB) implementada en CODEML fue utilizada para identificar los sitios bajo selección positiva ($p>0,99$) definidos por el modelo seleccionado (Yang et al., 2005).

Dos métodos adicionales, basados en la probabilidad máxima de cambio de codón, fueron utilizados para identificar sitios bajo selección positiva o negativa. El método REL (Random Effects Likelihood) y el método FEL (Fixed Effects Likelihood) contenidos en el paquete HYPHY v0.99+ beta (Kosakovsky Pond et al., 2005). El método REL (Nielsen y Yang, 1998) utiliza una distribución fija de tasa de sustituciones a través de la secuencia y luego estima los valores dN/dS para cada sitio utilizando una aproximación empírica Bayesiana. Mientras el método FEL (Yang y Swanson, 2002) estima los valores dN/dS para cada sitio sin hacer ninguna presunción previa. Previamente, un análisis del modelo de sustitución nucleotídica llevado a cabo en HYPHY sugirió que el modelo F81 era aquel que se ajustaba mejor a todos nuestros datos, y por consiguiente éste fue el modelo utilizado para todos nuestros análisis de selección.

4.10. Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg

Para determinar el nivel de heterocigosis en nuestras poblaciones se realizó una prueba de probabilidades de Hardy-Weinberg basado en un método de cadena de Markov. Las significancias estadísticas fueron calculadas mediante la prueba de Fisher, teniendo como hipótesis nula el que nuestras poblaciones tuvieran una proporción alélica acorde al equilibrio de Hardy-Weinberg. La hipótesis fue rechazada ($p < 0,05$) cuando el número de heterocigotos resultó ser muy alto o muy bajo. Los parámetros de la prueba fueron establecidos a 1000 dememorizaciones, 100 lotes y 1000 iteraciones por lote, utilizando el programa Genepop v4.0 (Raymond y Rousset, 1995b).



4.11. Análisis de resistencia / susceptibilidad

Este tipo de análisis sólo fue llevado a cabo para el MHC clase II y para ello los individuos fueron subdivididos en dos sub-poblaciones. Aquellos individuos provenientes de centros de cultivos expuestos a epizootias de *P. salmonis* fueron clasificados como "sanos" o "enfermos" tanto por sintomatología clínica, como por IFAT contra el patógeno (sección 3.2.1.) Mientras que aquellos individuos provenientes de los ensayos de desafío con *P. salmonis* fueron clasificados como "sobreviviente" o "mortalidad" según su comportamiento durante el ensayo

(sección 3.2.2.). Para evitar confusiones, en los materiales y métodos se denominará “resistente” a aquellos individuos sanos o sobrevivientes, y “susceptible” a los individuos enfermos o muertos.

4.11.1. Pruebas de diferenciación genética

El programa Arlequin 3.01 (Excoffier et al., 2005) y/o el programa Genepop v4.0 (Raymond y Rousset, 1995b) fueron utilizados para buscar diferencias entre las poblaciones de individuos “resistentes” y “susceptibles”, utilizando dos aproximaciones diferentes. Una prueba de diferenciación pareada FST (Reynolds et al., 1983) que considera tanto las frecuencias haplotípicas como la similitud de secuencias entre alelos; y una prueba de diferenciación exacta (Raymond y Rousset, 1995a) que solo considera las frecuencias haplotípicas de cada población y las compara utilizando una prueba exacta de Fischer. Los parámetros fueron ajustados a 5000 permutaciones para la prueba FST y a 6000 pasos de Markov en la prueba Exacta. Se consideró los valores de probabilidad con un nivel de significancia de 0,05.

Adicionalmente, el programa DnaSP (Librado y Rozas, 2009) fue utilizado para calcular la disimilitud del MHC en cada individuo, estimando la tasa de sustituciones no-sinónimas (K_a) entre los dos alelos pertenecientes a cada individuo y posteriormente calculando el valor promedio de éstos para cada locus y especie (Consuegra y Garcia de Leaniz, 2008). La significancia de las diferencias en el K_a promedio entre individuos “resistentes” y “susceptibles” fue probada utilizando una prueba-t implementada en Excell (Microsoft corp.).

4.11.2. Análisis de asociación

Para cada locus y especie las frecuencias alélicas y genotípicas del MHC clase II alfa y beta fueron calculadas para los grupos de individuos “resistentes” y “susceptibles” utilizando el programa Genalex (Peakall y Smouse, 2006).

Para evaluar la asociación estadística entre los alelos del MHC clase II alfa y beta con la resistencia o susceptibilidad a *P. salmonis*, utilizamos el estadístico L_D (Hindar et al., 2004). Este estadístico considera una hipótesis nula en la cual la distribución alélica es homogénea entre dos poblaciones, y una hipótesis alternativa en la cual uno o más alelos tienen la representación más alta en una población particular. El modelo estadístico realiza una

comparación similar a una prueba Bonferroni basada en tablas de contingencia. Después de cada comparación el mayor valor L_D obtenido es comparado con el correspondiente valor χ^2 utilizando 1 grado de libertad y un nivel de significancia del 0,001 o 0,05 (Araneda et al., 2009).

Adicionalmente se calculó la contribución de cada alelo a la separación de las poblaciones “resistentes” y “susceptibles” mediante la realización de un análisis SIMPER (Clarke, 1993), utilizando el programa Primer 5 (Plymouth Marine Laboratory, UK).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta tesis pretende caracterizar el MHC de peces salmónidos en cultivo e identificar alelos del MHC que sirvan como eventuales marcadores de resistencia o susceptibilidad a la bacteria *Piscirickettsia salmonis*. Por ser un tema complejo y que involucra el análisis de poblaciones, para una mayor comprensión hemos decidido dividir los resultados en tres partes que, en esencia, representan cada uno de los tres objetivos específicos planteados; a saber:

- 1.- Determinar el polimorfismo del MHC clase I y II en las especies en cultivo: Parte I
- 2.- Definir alelos del MHC asociados a resistencia y/o susceptibilidad a *P. salmonis*: Parte II
- 3.- Corroborar asociación mediante ensayos de desafío: Parte III

Adicionalmente, dado el carácter poblacional de nuestro estudio, el tema evolutivo no podía ser soslayado y por ende, fue incorporado y discutido principalmente en la parte I, con incidencia en las partes II y III.

Así mismo, dada la complejidad particular de cada tema, para cada parte se exponen los antecedentes preliminares a este estudio y se discuten individualmente de sus resultados.

5.1. PARTE I:

Diversidad del MHC en salmónidos cultivados en Chile y evolución del MHC clase II

5.1.1. ANTECEDENTES PRELIMINARES

Los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I y II codifican para proteínas involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos para la generación de la respuesta inmune (Klein, 1986), constituyendo uno de los grupos de genes más polimórficos conocidos en la naturaleza (Trowsdale y Parham, 2004).

A pesar de su origen común (Flajnik et al., 1999), los genes del MHC clase I y clase II evolucionan a ritmos diferentes en distintas especies, posiblemente como consecuencia de su divergencia en función y estructura. La mayor parte del polimorfismo de los genes MHC se concentra en los aminoácidos responsables de la presentación de antígenos (PBR) (Hughes y Nei, 1988; 1989) y por ende, es ésta región la que presenta una mayor presión selectiva (Edwards y Hedrick, 1998; Hedrick, 2002; Penn et al., 2002).

La información existente sobre la estructura y función de los genes MHC proviene principalmente de estudios en humanos y especies modelos en los cuales a) Los genes del MHC I y II están estrechamente ligados (Hughes y Yeager, 1998), y b) la totalidad o la mayor parte del polimorfismo de la clase II se concentra en el gen de la cadena beta (Kaufman et al., 1999; Reche y Reinherz, 2003; Salomonsen et al., 2003).

Los peces teleósteos por el contrario, presentan genes de clase I y clase II no ligados (Hansen et al., 1999; Grimholt et al., 2002), y dentro de ellos, los salmónidos han sido utilizados comúnmente como modelo para el estudio de la evolución del MHC, por varias razones: (1) la estructura molecular de sus genes MHC es bien conocida para la mayoría de las especies (Grimholt et al., 1993; Hordvik et al., 1993; Dixon et al., 1995; Grimholt et al., 2000; Stet et al., 2002; Lukacs et al., 2007; Harstad et al., 2008); (2) los genes de clase I y II presentan diferentes historias evolutivas, con linajes antiguos muy divergentes para los genes de clase I y estrechamente ligados para la clase II (Miller y Withler, 1996; Shum et al., 2001); (3) existe evidencia de selección balanceada actuando en el potencial PBR de clase I

(Consuegra et al., 2005b) y de ambos dominios α y β de clase II (Landry y Bernatchez, 2001; Consuegra et al., 2005a); y (4) análisis de la evolución del MHC son relativamente simples en los salmónidos porque presentan un único locus clásico para el MHC clase I y clase II α y β (Grimholt et al., 2000; Stet et al., 2002; Conejeros et al., 2008; Croisetière et al., 2008).

Adicionalmente, estudios sobre la diversidad del MHC en variadas especies han demostrado que ésta es un buen indicador de la variabilidad presente en las poblaciones en estudio, pudiendo conocerse de estos datos si las poblaciones en cultivo han preservado o no sus condiciones de apareamiento naturales (Consuegra y Garcia de Leaniz, 2008).

En esta primera parte del trabajo de tesis se estudiaron los niveles de diversidad para los genes del MHC clase I y II en las tres especies salmónidas mayormente cultivadas en Chile: *Salmo salar* (*S. salar*), *Oncorhynchus mykiss* (*O. mykiss*) y *Oncorhynchus kisutch* (*O. kisutch*), centrándonos en la región que participa directamente en la presentación de antígenos (PBR). Además, utilizando las secuencias de los alelos obtenidos se realizó un estudio comparativo de la diversidad y los mecanismos moleculares de evolución del MHC clase II α y β . Hasta donde sabemos, este es el primer estudio sobre la diversidad de los salmónidos cultivados en Chile, y el primer estudio evolutivo comparando MHC de clase II α y β en un mismo organismo.

5.1.2. RESULTADOS

5.1.2.1. Selección de la región polimórfica a estudiar del MHC y diseño de partidores

Considerando que el objetivo principal de esta etapa de la tesis era conocer el nivel de diversidad existente en el MHC de poblaciones de salmónidos cultivados en Chile, el estudio se centró en la región correspondiente al putativo PBR (Hughes y Nei, 1988) del MHC clase I y clase II, dado que corresponde a la región más variable de la molécula y una de las más polimórficas conocidas en la naturaleza (Trowsdale y Parham, 2004).

Las regiones a amplificar, fueron escogidas utilizando como referente las secuencias publicadas en la base de datos nucleotídica de polimorfismos inmunológicos: IPD del EBI

(<http://www.ebi.ac.uk>), la cual contiene secuencias alélicas para los locus clásicos del MHC clase I (locus *UBA*) y del MHC clase II alfa (locus *DAA*) y beta (locus *DAB*), para las especies salmón del Atlántico (*S. salar*) y trucha arco iris (*O. mykiss*).

Se tomaron todas las secuencias existentes para cada locus y especie, y se realizaron alineamientos múltiples de secuencia utilizando la herramienta ClustalW del EBI (<http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2/>), tal como se ejemplifica en la Figura 5.1. Se buscaron zonas altamente conservadas entre secuencias, ubicadas en el extremo inicial y final del segundo exón de cada gen, abarcando así la región polimórfica correspondiente al PBR (dominio alfa 1 o beta 1); solo en el caso del locus *UBA* de *S. salar* se utilizó el exón 3 (dominio alfa 2). Se diseñaron partidores específicos capaces de amplificar todos los alelos de un locus, y en el caso de posiciones que presentaban más de un nucleótido posible se utilizó como referente la base más común, ya que al intentar utilizar partidores degenerados no se logró distinguir alelos individuales mediante DGGE (datos no mostrados).

Para todos los loci se logró diseñar partidores específicos que abarcaran una región de 200-300 pb (Figura 5.1). En el caso de *O. kisutch* y *O. mykiss* se pudo utilizar un mismo juego de partidores para cada locus debido a la cercanía filogenética que existe entre ambas especies, sin embargo, para *S. salar* debieron diseñarse juegos diferentes para cada locus.

Las propiedades físicas de los partidores diseñados como T_m , %GC y carencia de auto-complementariedad, fueron calculadas con el programa OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), procurando que las características de ambos partidores para un mismo gen fueran similares. La temperatura de "annealing" (T_a) fue calculada inicialmente como 5 °C menor que la T_m de los partidores y fue ajustada posteriormente mediante PCR en gradiente (Tabla A.1, Anexo I).

```

Onmy-DAB_0101 ACAGATGGATATTTTGAACAGGTTGTGAGACAGTGTGCGATACTCCTCAAAGGACCTGCAT 120
Onmy-DAB_0201 ACAGATGGATATTTTTCATCAGAGGTTGACACAGTGTGCGATTCTCCTCAGAGGACCTGCAT 120
Onmy-DAB_0301 -----GAACATCGGTTGGCACAGTGTGCGATACTCCTCAAAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_0401 -----CATCATCGGTTGGCACAGTGTGCGATACTCCTCAAAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_0501 -----TATCATCGGTTGGCACAGTGTGCGATACTCCTCAAAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_0601 -----TATCATCGGTTGGCACAGTGTGCGATACTCCTCAAAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_0602 -----TATCATCGGTTGGCACAGTGTGCGATACTCCTCAAAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_0701 -----AATCATCGGTTAAGACAGTGTGCGATACTCCTCAAAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_0801 -----CATCAGATGATGAGACAGTGTGCGATACTCCTCAAAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_0901 -----GAACAGTCTGTGAGACAGTGTGCGATTCTCCTCAGAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_1001 -----GAACAGAGGTTGACACAGTGTGCGATACTCCTCAGAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_1101 -----CATCAGAGGTTGACACAGTGTGCGATACTCCTCAAAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_1201 -----CATCAGAGGTTGACACAGTGTGCGATTCTCCTCAGAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_1301 -----CATCAGACTGTGAAACAGTGTGCGATTCTCCTCAAAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_1401 -----CATCAGACTGTGAGCCAGTGTGCGATACTCCTCAGAGGACCTGCAT 45
Onmy-DAB_1501 -----CATCAGACTGTGAGCCAETGTGCGATACTCCTCAAAGGACCTGCAT 45
* ** * ***** ***** *****

Onmy-DAB_0101 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGGAGCTGGAGCGTTACTGTAAGCCTAGC 300
Onmy-DAB_0201 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGTCAGCTGGAGAGTTACTGTAAGCATAAC 300
Onmy-DAB_0301 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGGAGCTGGAGCGTGTCTGTAAGCATAAC 225
Onmy-DAB_0401 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGGAGCTGGAGCGTTTCTGTAAGCATAAC 225
Onmy-DAB_0501 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGGGCTGGAGAGTTACTGTAAGCATAAC 225
Onmy-DAB_0601 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGGAGCTGGAGCGTTTCTGTAAGCATAAC 225
Onmy-DAB_0602 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGGAGCTGGAGCGTTTCTGTAAGCATAAC 225
Onmy-DAB_0701 AGTGATGCTGGGTTGCTGGGTCAAGAGCAGGGGGAGCTGGAGCGTGTCTGTAAGCATAAC 225
Onmy-DAB_0801 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGGAGCTGGAGCGTTTCTGTAAGCATAAC 225
Onmy-DAB_0901 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGGAGCTGGAGCGTGTCTGTAAGCATAAC 225
Onmy-DAB_1001 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGGGGAGCTGGAGCGTTACTGTAAGCATAAC 225
Onmy-DAB_1101 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGGAGCTGGAGCGTTTCTGTAAGCCTAAC 225
Onmy-DAB_1201 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGCAGCTGGAGAGTTACTGTAAGCATAAC 225
Onmy-DAB_1301 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGCAGCTGGAGAGTTACTGTAAGCCTAAC 225
Onmy-DAB_1401 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGGAGCTGGAGCGTTTCTGTAAGCCTAAC 225
Onmy-DAB_1501 AGTGATGCTGGGATCCTGGGTCAAGAGCAGGCGGAGCTGGAGCGTTTCTGTAAGCATAAC 225
***** * ***** ***** * ***** * ***** **

Onmy-DAB_0101 GCTGCTATCGACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 360
Onmy-DAB_0201 GCTGCTATCGACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 360
Onmy-DAB_0301 GCTGATCTCCACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_0401 GCTGCTAACCACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_0501 GCTGATATTTCTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_0601 GCTGATCTCCACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_0602 GCTGATCTCCACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_0701 ACTGCTAACCACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_0801 GCTGATCTCCACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_0901 GCTGATCTCCACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_1001 GCTGATATCGACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_1101 GCTGATATCTACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_1201 GCTGATATCGACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_1301 GCTGATATCGACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_1401 GCTGATCTCCACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
Onmy-DAB_1501 GCTGCTAACCACTACAGCGCCATACTGGACAAGACAGTTGAGCCCCATGTCAGACTGAGC 285
*** * ***** ***** *****

```

Figura 5.1. Selección de la región de estudio y diseño de partidores para el MHC. Como ejemplo se muestra el alineamiento en ClustalW de secuencias de la base de datos IPD-EBI para el locus *DAB* de *O. mykiss*. Se muestran los partidores sentido (verde) y antisentido (amarillo) diseñados en la región que comprende al exón 2 (letras en rojo) elegida para el estudio. Los asteriscos (*) indican similitud de secuencia y los guiones (-) ausencia del nucleótido. Para poder colocar todo el alineamiento en una página se ha eliminado la región comprendida entre los nucleótidos 46 y 165.

La correcta adición de una cola-GC en el diseño de los partidores, la cual estabiliza la T_m de la secuencia a estudiar (Myers y col, 1985; Sheffield y col, 1989), fue probada mediante el programa WinMelt de BioRad, tal como se ejemplifica en la Figura 5.2, donde se opta por agregar una cola-GC en el extremo 5' la cual crea un alto dominio de fusión al inicio que consigue emparejar la T_m del resto de la secuencia.

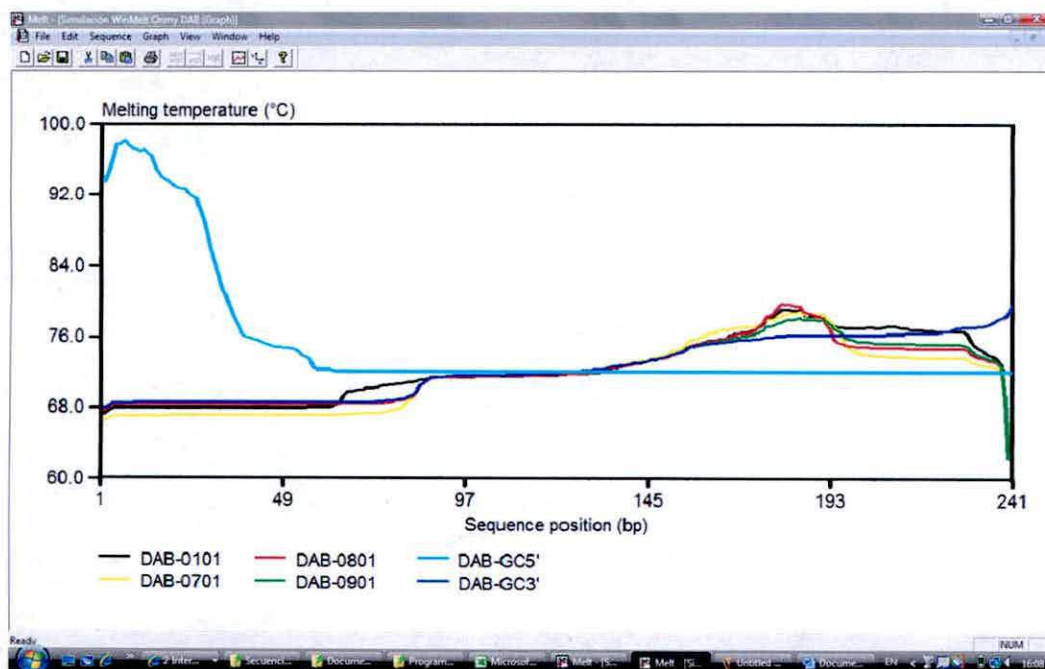


Figura 5.2. Simulación del perfil de fusión de una secuencia creado por el programa WinMelt de BioRad. Se muestra el perfil de T_m para 4 alelos del locus *DAB* de *O. mykiss* amplificados con un par de partidores específicos (negro, amarillo, rojo y verde) y luego una de estas secuencias con los mismos partidores teniendo adicionada una cola-GC en el partidor 5' (turquesa) o en el partidor 3' (azul).

5.1.2.2. Amplificación de los genes MHC clase I y II

Individuos de las especies *S. salar*, *O. mykiss* y *O. kisutch* fueron muestreados en distintos centros salmonicultores de la X y XI región de Chile. Muestras de tejido como hígado, músculo o bazo fueron obtenidas y su ADN extraído. Luego, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron las regiones polimórficas de los genes del MHC utilizando los partidores específicos diseñados y un protocolo estandarizado (Tablas A.1 y A.2, Anexo I).

Para todos los juegos de partidores la adición de la cola-GC no interfirió en la afinidad del partidador por su región blanco, y permitió en la gran mayoría de los casos, exceptuando el locus *UBA*, la amplificación de un único gen. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa 2% dando una amplificación abundante, limpia y del tamaño esperado para todos los loci (*UBA*, *DAA* y *DAB*) de las 3 especies (Figura 5.3).

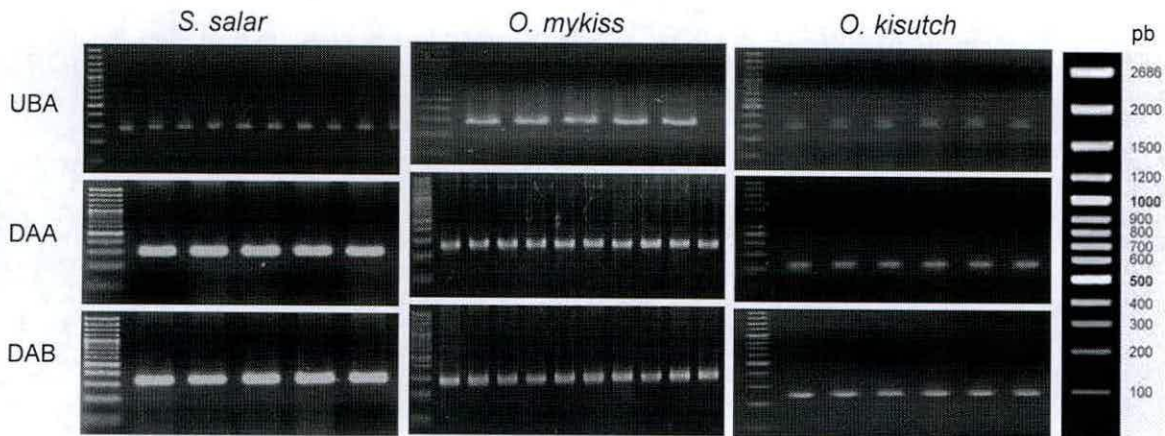


Figura 5.3. Amplificación por PCR de los loci *UBA*, *DAA* y *DAB* del MHC clase I y II de *S. salar*, *O. mykiss* y *O. kisutch*. Cada carril representa un individuo diferente y en la primera columna de cada gel se muestra el marcador de peso molecular de 100 pb esquematizado a la derecha.

5.1.2.3. Análisis preliminar de la variabilidad alélica del MHC por PCR en tiempo real

Pensando en la posibilidad de utilizar el PCR en tiempo real como herramienta para la caracterización del MHC, se realizó un análisis previo de la variabilidad alélica de algunos peces. Para ello se amplificaron las regiones polimórficas de los genes del MHC mediante PCR en tiempo real, utilizando SYBR-green como señal y los partidores específicos previamente diseñados sin colas-GC (Figura 5.4-A).

El análisis se centró en las curvas de fusión (T_m) para cada muestra, representativo de la diversidad de secuencias presentes. Para cada locus y especie analizada, cada individuo presentó un pico de temperaturas de fusión diferente, reflejando el alto grado de polimorfismo génico presente en la población (Figura 5.4-B). Sin embargo para cada pez solo se logró observar un pico de fusión representativo de uno de los dos alelos posibles a

encontrar por individuo (Figura 5.4-C). Análisis adicionales con mezclas de secuencias *in vitro* permitieron determinar que, en estos casos solo es posible amplificar la secuencia de mayor T_m (resultados no mostrados).

Por lo tanto esta metodología sólo sirvió para tener una idea preliminar de la existencia de variabilidad en los genes MHC de la población analizada, pero al no entregar información útil sobre los haplotipos presentes en cada individuo, no se prosiguió con este tipo de análisis.

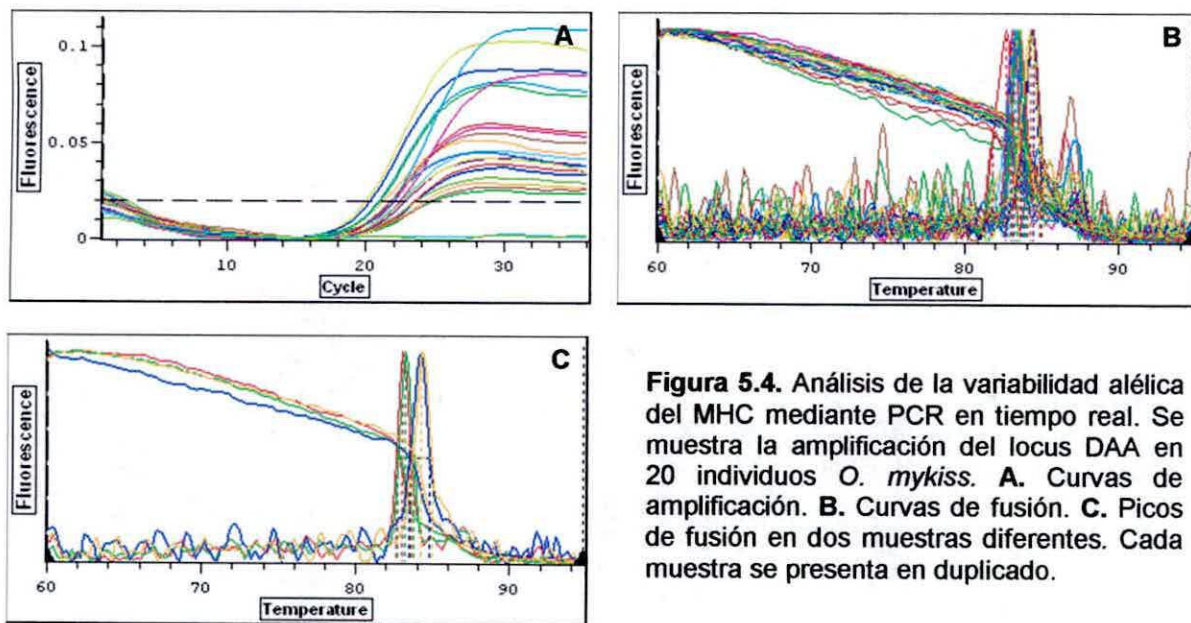


Figura 5.4. Análisis de la variabilidad alélica del MHC mediante PCR en tiempo real. Se muestra la amplificación del locus DAA en 20 individuos *O. mykiss*. **A.** Curvas de amplificación. **B.** Curvas de fusión. **C.** Picos de fusión en dos muestras diferentes. Cada muestra se presenta en duplicado.

5.1.2.4. Análisis de polimorfismo del MHC clase I

Los productos amplificados de los genes MHC clase I fueron usados para determinar el grado de polimorfismo del locus *UBA* en las población de peces muestreados para las especies *S. salar*, *O. mykiss* y *O. kisutch*. Para la primera especie el estudio se centró en el dominio alfa 2 (exón 3), y para las otras dos en el dominio alfa1 (exón 2), ambas codificantes para el PBR.

Los amplicones de cada pez fueron resueltos por electroforesis de geles de gradiente denaturante: DGGE (Fisher y Lerman, 1983), utilizando rangos de concentración de los

agentes denaturantes urea y formamida específicos para cada especie (Tabla A.3, Anexo I), lo que permitió que las secuencias amplificadas migraran a determinadas alturas según su temperatura de fusión, pudiendo así separar los alelos presentes en cada individuo.

Para las tres especies se obtuvo una amplificación abundante y una banda única en el gel post-PCR; sin embargo, al realizar la separación alélica mediante DGGE se observaron hasta ocho bandas migrando a diversas alturas del gel para cada individuo (Figura 5.5).

La secuenciación posterior de cada banda y una búsqueda de similitud mediante Blast permitió distinguir que estas secuencias, diferentes entre sí, correspondían principalmente a nuestro locus de interés, el gen clásico *UBA*, y a genes no-clásicos o posibles pseudogenes. Para *S. salar*, 8 de las secuencias encontradas presentaron homologías de un 97-100% con secuencias caracterizadas como el locus clásico locus *UBA*, mientras otras 2 presentaron homologías de 92-94% con el mismo locus siendo denominadas igualmente como *Sasa-UBA* (Grimholt *et al.*, 2002; Consuegra *et al.*, 2005b; Miller *et al.*, 2006). Del resto de las secuencias de *S. salar* 3 encontraron homologías de 98-100% con el locus no-clásico *ULA* (Grimholt *et al.*, 2002; Consuegra *et al.*, 2005b; Miller *et al.*, 2006) y otras 4 presentaron homologías de tan sólo 70-80% con secuencias descritas previamente para la especie, por lo que fueron etiquetados como pseudogenes (*Sasa-UBA**). Para *O. mykiss* solo 2 secuencias encontraron homologías de 99-100% con otras descritas previamente para el locus clásico *UBA* (Shum *et al.*, 2001; Aoyagi *et al.*, 2002), 6 secuencias presentaron identidad con el locus no-clásico *UDA* (Kiryu *et al.*, 2005; Shiina *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2006), 6 presentaron identidad con secuencias del locus no-clásico *UCA* (Dijkstra *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2006) y otras 3 presentaron homologías de 98-100% con secuencias denominadas *Onmy-A** descritas como pseudogenes (Miller y Withler, 1998). En la única especie que se logró específicamente la amplificación del locus *UBA* fue *O. kisutch*, donde las 4 secuencias encontradas presentaron homología de 97-100% con secuencias previamente caracterizadas como el locus clásico *UBA* (Miller y Withler, 1998) y las bandas adicionales correspondieron a artefactos de la técnica misma, denominados heterodímeros (mezcla de 2 hebras de alelos diferentes de un individuo) (Ruano y Kidd, 1992).

A pesar de que dentro del gel DGGE para cada especie fue posible identificar el lugar donde se ubica cada uno de estos locus o pseudogenes (Figura 5.5), similar a lo observado por Miller y Withler (1998), esto no constituyó una aproximación experimental adecuada para la

identificación de ellos, siendo siempre requerida la secuenciación, que sigue siendo el referente definitorio.

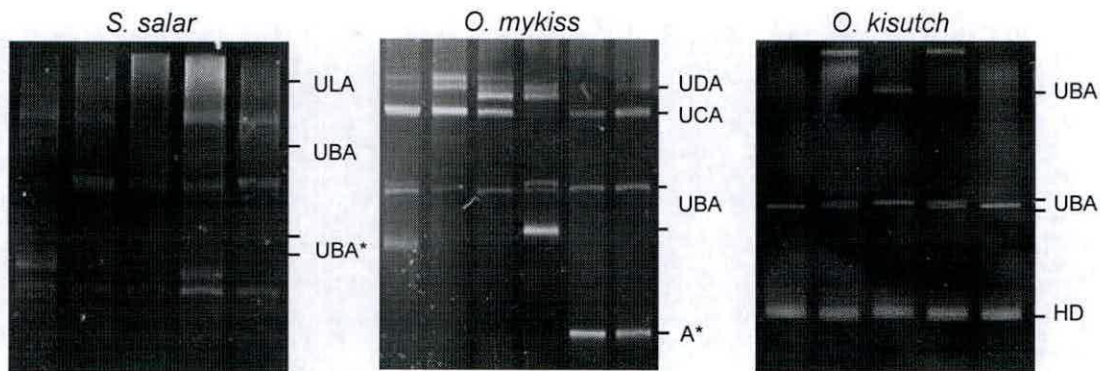


Figura 5.5. Caracterización de los genes del MHC clase I presentes en individuos de las especies *S. salar*, *O. mykiss* y *O. kisutch* mediante DGGE. Cada carril representa un pez diferente. Se indican los genes clásicos (*UBA*), no-clásicos (*UCA*, *UDA*, *ULA*), posibles pseudogenes (*A**, *UBA**) y heterodímeros de alelos (*HD*).

Alineamientos de las secuencias realizados en BioEdit (Hall, 1999) mediante ClustalW (Figura 5.6) demostraron diferencias importantes entre genes clásicos, no-clásicos y pseudogenes para toda la región amplificada. Sin embargo los extremos de estas secuencias, cercanos al lugar donde alinean nuestros partidores, presentaban homologías, consecuencia de lo cual pudieron ser amplificadas por los mismos partidores *UBA* de manera inespecífica.

Por su parte, los árboles filogenético realizados mediante Neighbor-Joining en MEGA v4.0 (Tamura et al., 2007) (Figura 5.7) demostraron, tanto a nivel aminoacídico como nucleotídico, que existen diferencias significativas entre locus clásico, no-clásicos y pseudogenes; lo que permitió ubicarlos en diferentes ramas del árbol (Figura 5.7). Mientras que para el gen clásico *UBA* diferentes alelos, incluso de especies distintas como *O. mykiss* y *O. kisutch*, se ubicaron en una misma rama demostrando la conservación de su secuencia y por ende de su eventual función (Figura 5.7-B).

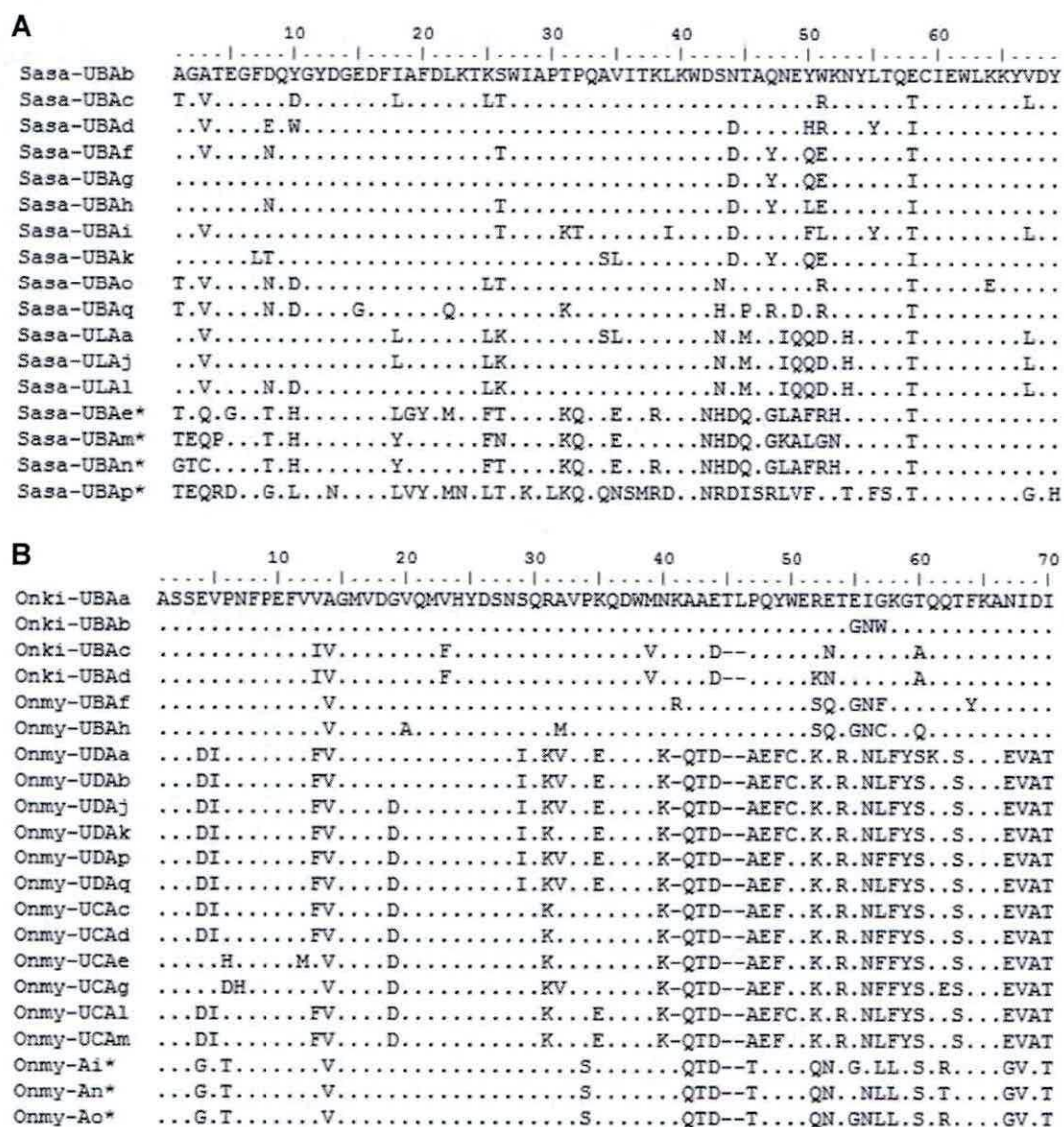


Figura 5.6. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas deducidas para el MHC Clase I. **A.** *S. salar*. **B.** *O. mykiss* y *O. kisutch*. Los puntos (.) indican identidad, y los guiones (-) falta del aminoácido. Se incluyen secuencias de putativos genes clásicos (*UBA*), no-clásicos (*UCA*, *UDA*, *ULA*) y pseudogenes (*A**, *UBA**).

Finalmente, debido a la dificultad de amplificar específicamente el locus clásico *UBA* y a que los genes del MHC clase I se encuentran asociados mayormente a la presentación de antígenos virales o péptidos endógenos, y no a bacterias como es el caso del patógeno intracelular facultativo *Piscirickettsia salmonis* (Gómez et al., 2009), no se siguió trabajando con estos genes, y el estudio se centró en adelante en el MHC clase II.

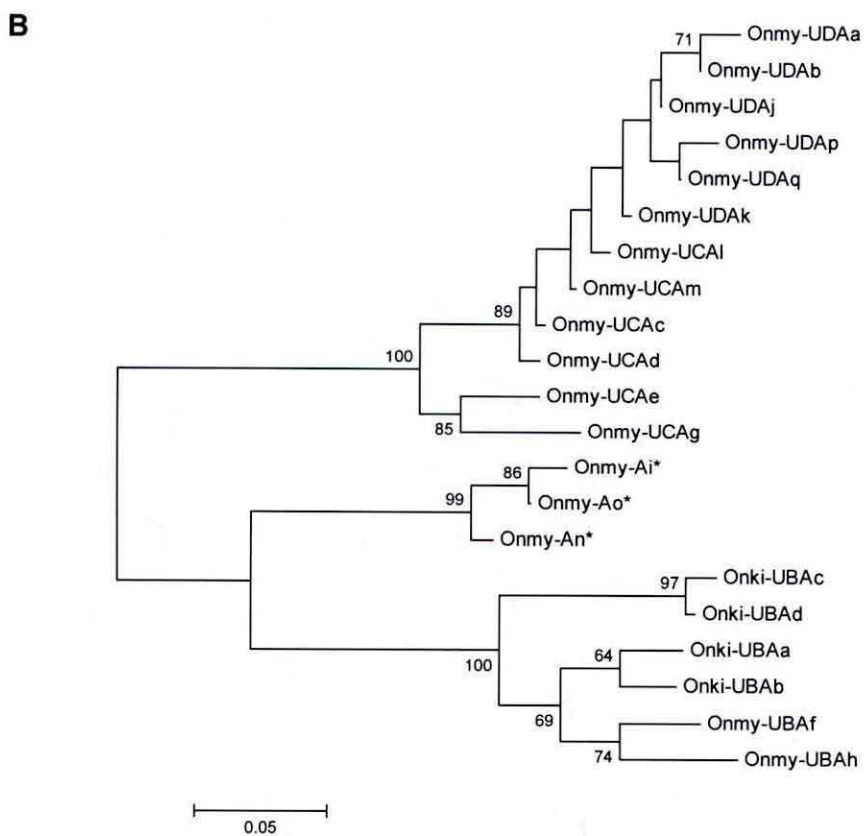
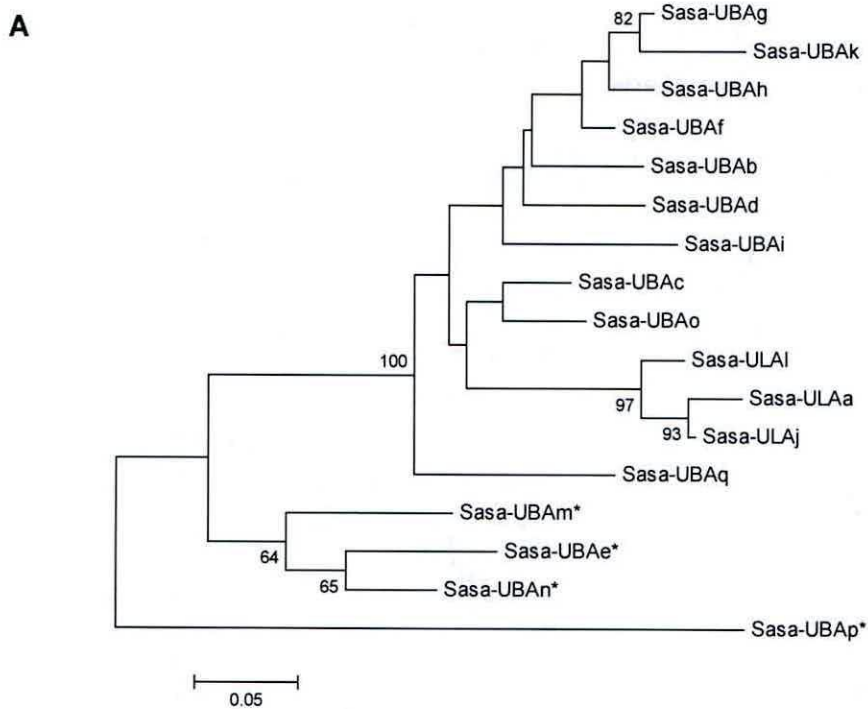


Figura 5.7. Árbol filogenético de las secuencias aminoácidas deducidas del MHC clase I. **A.** *S. salar*. **B.** *O. mykiss* y *O. kisutch*. Se incluyen las secuencias de putativos genes clásicos (UBA), no-clásicos (UCA, UDA, ULA) y pseudogenes (A*,UBA*). Solo los valores de bootstrap >60% son mostrados.

5.1.2.5. Análisis de polimorfismo del MHC clase II

Una región abarcando gran parte de los residuos de unión de péptidos (PBR) contenidos en el segundo exón de los genes del MHC clase II alfa (dominio alfa 1, locus *DAA*) y beta (dominio beta 1, locus *DAB*) fue analizada en su diversidad para las tres especies salmónidas *S. salar*, *O. mykiss* y *O. kisutch*.

Los productos de PCR previamente amplificados para los locus clásicos *DAA* y *DAB* de cada pez fueron resueltos, al igual que para el MHC clase I, mediante DGGE (Fisher y Lerman, 1983), en los que una combinación de denaturantes urea y formamida permitió la separación de los alelos presentes en cada individuo (Tabla A.3, Anexo I).

Para las tres especies se detectó generalmente 2 bandas por muestra, concordantes con los dos alelos esperados en individuos heterocigotos, mientras en los homocigotos se observó solo una banda (Figura 5.8). En aquellos casos en que más bandas fueron observadas la posterior secuenciación determinó que estas correspondían a repeticiones de los mismos alelos en el formato de heterodímeros derivados normalmente de la técnica de PCR (Ruano y Kidd, 1992).

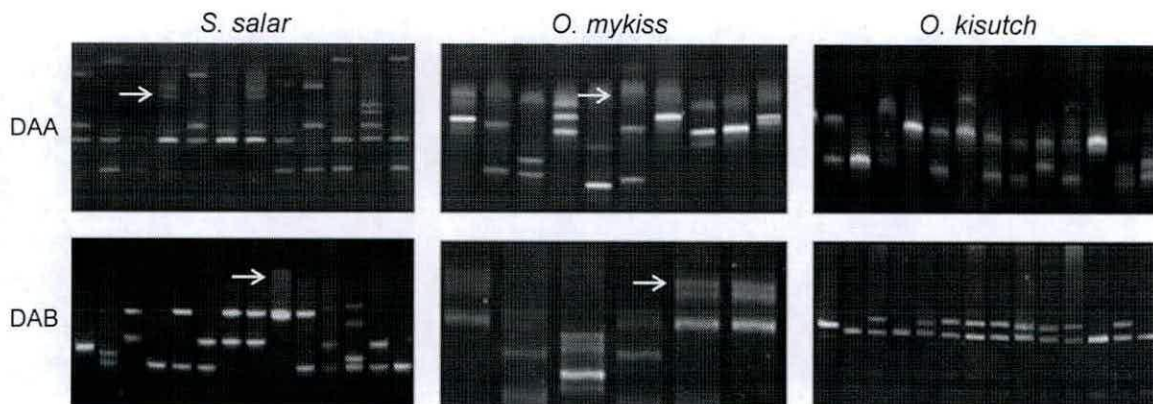


Figura 5.8. Caracterización alélica del MHC Clase II (Locus *DAA* y *DAB*) de *S. salar*, *O. mykiss* y *O. kisutch* mediante DGGE. Cada carril representa un individuo diferente. Las flechas ejemplifican la presencia de heterodímeros.

Debido a que ambos locus del MHC clase II pudieron ser caracterizados específicamente en las tres especies, al alto grado de diversidad observado mediante DGGE, a la implicancia del MHC clase II en la presentación antigénica bacteriana, y al hecho que su expresión ha sido

asociada a la patogenia de *P. salmonis* (Rise *et al.*, 2004); el resto del trabajo doctoral se centró en el estudio del MHC clase II.

En las poblaciones estudiadas fue posible encontrar un alto grado de diversidad para el MHC clase II en las tres especies. Para el locus *DAA* se encontraron 9 alelos para *S. salar*, 10 para *O. mykiss* y 4 para *O. kisutch*, mientras que para el locus *DAB* el número de alelos para cada especie fue de 9, 8 y 11 respectivamente (Tabla 5.1). Para el locus *DAB* y para el locus *DAA* de *S. salar*, la mayoría de los alelos encontrados habían sido descritos anteriormente (Hordvik *et al.*, 1993; Grimholt *et al.*, 2000; Landry y Bernatchez, 2001; Langefors *et al.*, 2001; Shum *et al.*, 2001; Stet *et al.*, 2002; Consuegra *et al.*, 2005a) con la excepción de los alelos *Onmy-DAB*1403*, *Onki-DAB*1801*, *Onki-DAB*2601* y *Sasa-DAA*0306* que fueron descrito en esta tesis. En contraste, todas las secuencias encontradas para el locus *DAA* de *O. mykiss* y *O. kisutch* son inéditas, con excepción del alelo *Onmy-DAA*0301* que ya había sido reportado por el grupo de Grimholt en 1999 (Genbank ID AJ251433).

Tabla 5.1.
Variabilidad del MHC clase II alfa (*DAA*) y beta (*DAB*) en *S. salar* (*Sasa*), *O. mykiss* (*Onmy*) y *O. kisutch* (*Onki*).

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>dN</i>	<i>dS</i>	π	<i>DA</i>
<i>Onki-DAA</i>	75	4	4	0,018	0,009	0,016	0,035
<i>Onmy-DAA</i>	40	10	31	0,076	0,048	0,069	0,146
<i>Sasa-DAA</i>	27	9	20	0,067	0,023	0,057	0,109
<i>Todos DAA*</i>	142	23	41	0,091	0,103	0,094	0,157
<i>Onki-DAB</i>	75	8	30	0,061	0,044	0,057	0,114
<i>Onmy-DAB</i>	40	11	28	0,061	0,016	0,051	0,132
<i>Sasa-DAB</i>	27	9	28	0,075	0,027	0,064	0,138
<i>Todos DAB*</i>	142	28	51	0,107	0,065	0,097	0,203

N= número de individuos; *A*= número de alelos; *S*= número de sitios segregantes; *dN* & *dS*= distancias no-sinónimas y sinónimas promedio entre haplotipos; π = diversidad nucleotídica; *DA*= diversidad aminoacídica.

La diversidad estimada para cada especie y cada locus (Tabla 5.1) fue mayor para el locus *DAB* que para el *DAA* de *S. salar* y de *O. kisutch*, pero no así para *O. mykiss* donde el locus *DAA* presentó mayores valores. Por otra parte, *O. kisutch*, a pesar de tener el mayor número de sitios segregantes para el locus *DAB* (30 vs. 28), fue la especie que presentó los menores niveles de diversidad para ambos loci. Adicionalmente, la diversidad aminoacídica promedio (*DA*) fue mayor para el locus *DAB* que para el *DAA* al considerar todas las secuencias para

un locus (Tabla 5.1). Los valores DA dentro de las poblaciones (0,097 para *DAA* y 0,128 para *DAB*) fueron mayores que los valores DA entre-poblaciones (0,060 para *DAA* y 0,075 para *DAB*), observándose además que en ambos locus se favorecen los cambios no-sinónimos por sobre los sinónimos (dN>dS) (Tabla 5.1).

Un alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas para todos los alelos de cada locus (Figura 5.9) mostró un alto nivel de polimorfismo para todas las especies en ambos loci, con la mayoría de los sitios, tanto variables como conservados, concordantes entre las tres especies. Análisis comparativos adicionales con la secuencia de las moléculas MHC humana HLA-DR (HLA-DRA*0101 No. acceso V00523 y HLA-DRB1*0101 No. acceso M11161) (Larhammar *et al.*, 1982; Bell *et al.*, 1985), revelaron que aquellos aminoácidos claves en la estructura global del MHC clase II humano (Stern *et al.*, 1994) también parecen estar conservados en salmónidos, mientras que muchos de los sitios variables en salmónidos coinciden con aminoácidos descritos como parte del correspondiente PBR de humanos estando en directo contacto con el antígeno a presentar. Esto queda más claro al observar un modelo tridimensional del PBR de la molécula MHC clase II de *S. salar* elaborado por Cárdenas *et al.* (2010) (Figura 2.8), donde se muestra que algunos residuos que participan en el contacto con el péptido varían entre salmónidos y humanos, e incluso entre alelos de *S. salar*, coincidiendo con los mostrados en nuestro alineamiento. Por ejemplo, señalando entre paréntesis el sitio en nuestro alineamiento, algunos cambio entre humanos y salmónidos para la cadena alfa son: α F22/D(2), α F24/Y(4), α I31/M(11), α D64/C(48), α M73/N/S(55); y para la cadena beta son: β L26/F/L(1), β E28/D/T(3), β C30/Y(5), β S37/Y(12), β V38/V/I(13), β R72/L(47), β Y78/F/V(53).

La creación de árboles filogenéticos relacionando todos los alelos disponibles en la base de datos del NCBI, incluyendo los descritos en esta tesis, para cada locus en las especies en estudio (Figura 5.10), nos permitió descubrir la existencia de polimorfismo *trans*-especies (TSP), descrito como la presencia de linajes alélicos similares entre especies derivadas de un ancestro común (Klein *et al.*, 1998). Nosotros hemos detectado la presencia de alelos compartidos entre géneros, *O. mykiss* y *S. salar* para el locus *DAA*, y entre *O. kisutch* y *S. salar* para el locus *DAB*, pero no encontramos alelos compartidos entre ambas especies del género *Oncorhynchus* (tal como en Miller y Withler, 1996). Y aunque éste representa el primer reporte de TSP entre distintos géneros de salmónidos, su real significancia deberá ser analizada en otro estudio específico.

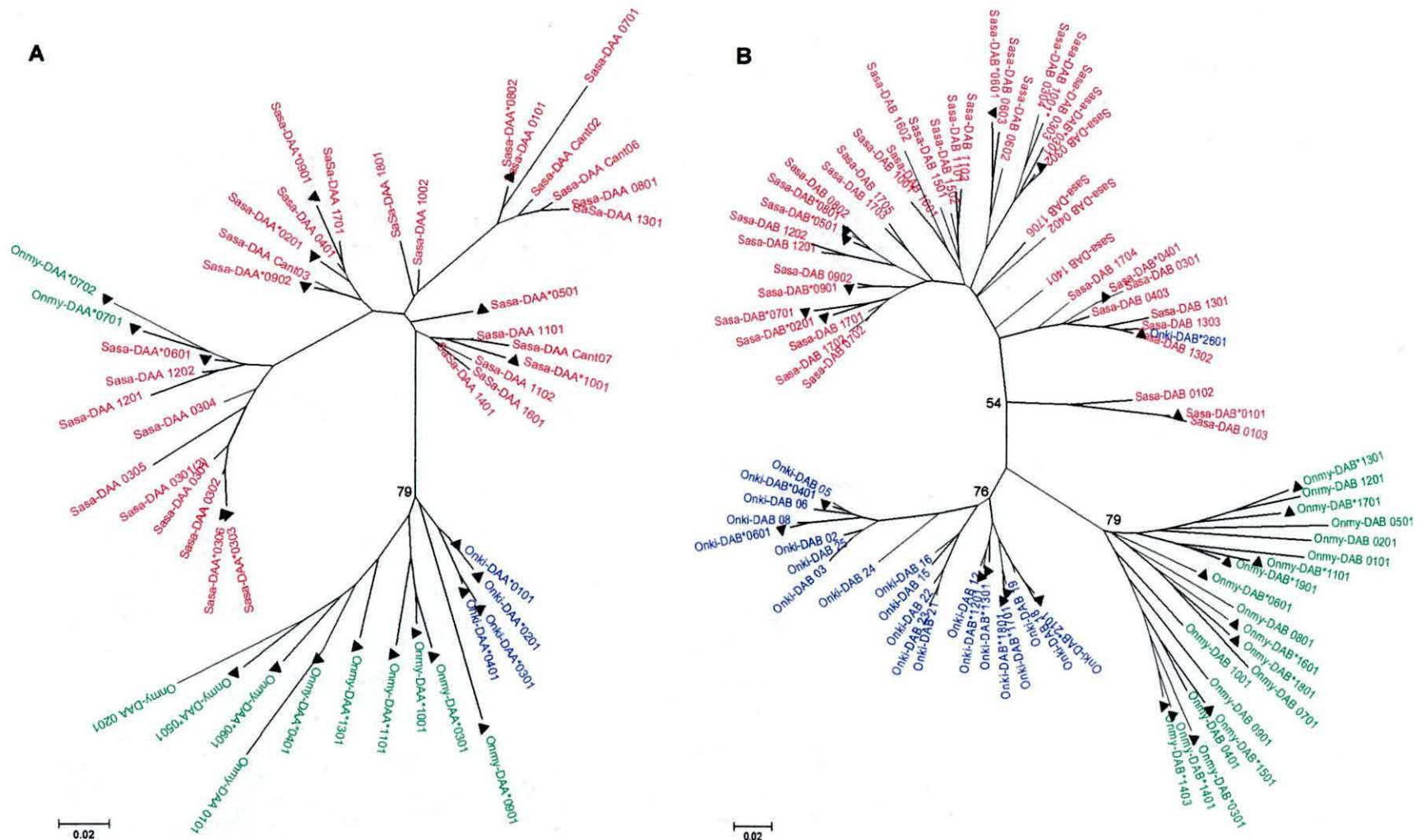


Figura 5.10. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas deducidas del MHC clase II para *S. salar* (rojo), *O. mykiss* (verde) y *O. kisutch* (azul). **A.** Locus *DAA* **B.** Locus *DAB*. Se presentan todas las secuencias del NCBI incluyendo las reportadas en este trabajo (▲). Solo los valores de bootstrap >50% son mostrados en las ramificaciones principales.

5.1.2.6. Análisis evolutivo del MHC clase II

Dado los altos niveles de diversidad encontrados, tanto en el MHC clase II alfa y beta de salmónidos, y al hecho de que sus genes de clase I y II no están ligados (Hansen *et al.*, 1999; Grimholt *et al.*, 2002), a diferencia de otros organismos vertebrados superiores como humanos, ratones y pollos donde estos genes están estrechamente ligados (Hughes y Yeager, 1998), decidimos estudiar los mecanismos evolutivos involucrados en la generación de dicha diversidad, teniendo en cuenta que la mayor parte del polimorfismo del MHC clase II se concentra, en general, en la cadena beta (Kaufman *et al.*, 1999; Reche y Reinherz, 2003; Salomonsen *et al.*, 2003). Así, utilizando diversos análisis bioinformáticos analizamos si procesos tales como recombinación, mutación y selección positiva podrían tener un rol relevante en la generación de la alta diversidad alélica observada.

a) Análisis de recombinación

A través de tres diferentes métodos (LDhat, GARD y DnaSP), pero complementarios entre sí, fuimos capaces de encontrar evidencias de recombinación en ambos locus del MHC clase II, alfa y beta, en las tres especies estudiadas (a excepción de *Onki-DAA*, donde el bajo número de secuencias impidió un análisis más exhaustivo) (Tabla 5.2). Los tres métodos buscan evidencias de recombinación desde diferentes perspectivas, basados en el alineamiento de secuencias entregado para cada locus y especie. El análisis LDhat calcula y compara las tasas de mutación (θ) y de recombinación (ρ) en el grupo de secuencias, realizando una prueba estadística que verifica la existencia de recombinación ($p < 0,05$) (McVean *et al.*, 2002). El programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009) estima el número mínimo de eventos de recombinación (R_m) en la historia de la muestra (Hudson y Kaplan, 1985). Y finalmente el método GARD (Genetic Algorithm Recombination Detection) muestra los posibles puntos de quiebre en la secuencia (BP) donde puede haber ocurrido recombinación (Kosakovsky Pond *et al.*, 2005).

Tabla 5.2.

Resultados del análisis de recombinación para los locus *DAA* y *DAB* del MHC clase II de salmónidos utilizando tres programas diferentes: DnaSP, GARD y LDhat.

<i>Locus</i>	<i>DnaSP</i> <i>Rm</i>	<i>GARD</i> <i>BP aa</i>	<i>LDhat</i>			
			θ	ρ	Lk	p Lkmax
<i>Onmy-DAA</i>	5	37	10,96	90	-5310,70	0,000
<i>Sasa-DAA</i>	3	37	7,36	66	-1955,19	0,000
<i>Todos DAA*</i>	9	no	11,11	20	-12801,72	0,008
<i>Onki-DAB</i>	3	47	11,57	0	-4944,17	0,647
<i>Onmy-DAB</i>	7	36	9,56	100	-5562,06	0,001
<i>Sasa-DAB</i>	5	22, 47	10,30	33	-4859,42	0,000
<i>Todos DAB*</i>	11	no	13,11	33	-28611,52	0,000

DnaSP *Rm*= número mínimo de eventos de recombinación calculados por DnaSp; GARD *BP aa*= sitios aminoacídicos de ruptura estimados por GARD; Los parámetros calculados por LDhat son: θ = tasa de mutación de Watterson; ρ = tasa de recombinación poblacional; Lk y pLkmax= probabilidad resultante de probar la hipótesis nula de no recombinación con una prueba de permutaciones de probabilidad (McVean et al., 2002).

El análisis LDhat (Tabla 5.2) mostró en todos los casos que la tasa de recombinación (ρ) en cada especie y locus excedía a la tasa estimada de mutación de Watterson (θ), sugiriendo que la recombinación es la mayor fuerza en la generación del polimorfismo en el MHC de salmónidos, coincidiendo con resultados previos reportados para *S. salar* (Consuegra et al., 2005a); siendo *Onki-DAB* el único locus en el cual LDhat no mostró evidencias de recombinación. El número mínimo de eventos de recombinación (*Rm*), estimado por el programa DnaSP (Tabla 5.2), fue siempre mayor para el locus *DAB* que para el *DAA*, y cuando todas las especies fueron analizadas conjuntamente, se identificaron a lo menos 7 posibles sitios de recombinación para cada locus, encontrándose una alta superposición (>60%) entre estos sitios y aquellos que se encuentran bajo selección positiva (Figura 5.9). Por otro lado, el número estimado de puntos de recombinación (*BP site*) estimado por GARD fue siempre menor que el número mínimo de eventos de recombinación (*Rm*) para ambos loci, siendo GARD capaz de identificar solo un punto de recombinación para cada set de secuencias por locus y especie, pero incapaz de encontrarlos cuando todas las especies fueron analizadas en conjunto por locus (Tabla 5.2). Algunos de estos sitios *BP* fueron similares entre especies para el mismo locus, y todos coincidieron con regiones de recombinación detectadas por DnaSP y/o con algunos sitios seleccionados positivamente (Figura 5.9).

b) Análisis de selección

Tres pruebas de neutralidad diferentes (Tajima, Fu y Li, McDonald y Kreitman) fueron realizadas para probar la hipótesis nula de que todas las mutaciones son selectivamente neutras (Kimura, 1983) (ver sección 4.9.2). La prueba D de Tajima (Tajima, 1989) y las pruebas F* y D* de Fu & Li (Fu y Li, 1993), fueron incapaces de rechazar la hipótesis nula de neutralidad en todos los casos. En contraste, la prueba de McDonald y Kreitman (MK) (McDonald y Kreitman, 1991), que compara la variabilidad dentro y entre especies, rechazó la hipótesis neutral para alguno de nuestros grupos de datos e identificó diferencias fijas entre las especies del género *Oncorhynchus* y *S. salar* para el locus *DAA* (valores de la prueba exacta de Fisher: 0,007 y 0,019) pero no para el locus *DAB* (valores de la prueba exacta de Fisher: 0,581 y 0,084). Esto probablemente se deba a la similitud existente entre el alelo *Onki-DAB*2601* y las secuencias de *S. salar* para este locus.

Los análisis de selección positiva se realizaron juntando todas las secuencias, de las tres especies para cada locus, para tener un mayor número de datos y así aumentar el poder de las pruebas (Kosakovsky Pond y Frost, 2005). Una prueba comparando diferentes modelos evolutivos en PAML (Yang, 2007) (ver sección 4.9.2), estudió la tasa de sustitución aminoacídica a través de los sitios ($\omega = dN/dS$), indicando que aquellos modelos que consideraban selección (M2 y M8, $\omega > 1$) se encajaban mejor a nuestros datos que aquellos modelos que consideraban evolución neutral (M1 y M7, $\omega = 1$), tanto para el locus alfa como beta del MHC clase II (Tabla 5.3). Una comparación más profunda de los modelos que incluían selección positiva (M2 vs. M8) utilizando el criterio AIC, indicó que el modelo M2, que permite un valor de sustitución heterogéneo entre sitios, es el que mejor representa nuestros datos para ambos loci. Los resultados de este modelo sugirieron que el 16% y 14% de los sitios se encontraban bajo selección positiva en los locus *DAA* ($\omega = 7.9$) y *DAB* ($\omega = 6.9$), respectivamente. Cuando el análisis fue llevado a cabo separadamente para cada especie nuevamente la mayoría de nuestros datos se ajustaron mejor al modelo M2, con la excepción del locus *DAB* para *O. kisutch*, donde la prueba no mostró evidencias significativas de selección positiva. Así mismo, los métodos FEL (Yang y Swanson, 2002) y REL (Nielsen y Yang, 1998) del programa Hyphy, que también estudian los valores de sustitución dN/dS en las secuencias, ya sea de asumiendo un valor promedio (FEL) o particular para cada sitio (REL), fueron igualmente capaces de encontrar evidencias de selección positiva en ambos loci cuando todas las secuencias fueron analizadas en conjunto (Tabla 5.4).

Tabla 5.3.

Modelos de sitios al azar estimados para los locus *DAA* y *DAB* del MHC clase II de salmónidos. Los valores de Log-likelihood (*L*) y los parámetros estimados para cada modelo fueron calculados utilizando el programa CODEML de PAML.

Modelo	Todos <i>DAA</i>*	Todos <i>DAB</i>*
<i>M0</i>	<i>L</i> =-835,338 $\omega=1,239$	<i>L</i> =-978,841 $\omega=2,579$
<i>M1</i>	<i>L</i> =-788,004 $p_0=0,608$ ($\omega_0=0,002$) $p_1=0,393$ ($\omega_1=1$)	<i>L</i> =-953,447 $p_0=0,561$ ($\omega_0=0,056$) $p_1=0,439$ ($\omega_1=1$)
<i>M2</i>	<i>L</i> =-754,853 $p_0=0,552$ $p_1=0,284$ $p_2=0,164$ ($\omega_2=7,9$)	<i>L</i> =-921,953 $p_0=0,375$ $p_1=0,483$ $p_2=0,142$ ($\omega_2=6,9$)
<i>M7</i>	<i>L</i> =-787,909 $p=0,003$ ($\omega=1$) $q=0,005$	<i>L</i> =-953,565 $p=0,022$ ($\omega=1$) $q=0,027$
<i>M8</i>	<i>L</i> =-754,918 $p_0=0,835$ $p_1=0,166$ ($\omega=7,8$) $p=0,002$ $q=0,005$	<i>L</i> =-921,999 $p_0=0,857$ $p_1=0,143$ ($\omega=7,1$) $p=0,007$ $q=0,005$

ω = razón dN/dS; p_i = fracción de los aminoácidos siguiendo una distribución ω_i ; p & q = parámetros estadísticos de la distribución beta.

Finalmente, el método Bayes Empirical Bayes (BEB) implementado en PAML bajo el modelo *M2*, fue capaz de identificar 7 y 5 sitios bajo selección positiva en los locus *DAA* y *DAB*, respectivamente. De ellos, 3 y 2 sitios respectivamente, fueron también identificados por los métodos FEL y REL de Hyphy, existiendo total acuerdo en la existencia de selección positiva en el MHC clase II de salmónidos (Tabla 5.4). Adicionalmente, la mayoría de estos sitios bajo selección positiva en salmónidos coincidieron o se encontraban muy cercanos a sitios involucrados directamente en la presentación antigénica en el HLA-DR de humanos (Figura 5.9). Los sitios identificados bajo selección positiva fueron similares entre especies para el locus *DAB* cuando los análisis fueron llevados a cabo para cada especie por separado, mientras este análisis no fue posible para el locus *DAA* de *O. kisutch* dado el reducido número de secuencias.

Tabla 5.4.

Sitios bajo selección positiva en los locus *DAA* y *DAB* del MHC clase II de salmónidos identificados utilizando tres diferentes métodos: PAML, REL y FEL. Los números de los sitios corresponden con los de la Figura 5.9. Sitios en negrita fueron identificados por al menos dos métodos y sitios subrayados fueron identificados por los tres.

	PAML	REL	FEL
<i>Todos <i>DAA</i>*</i>	19, 37,40 ,44,47, 54,55	37,54,55	1*,23*, 37,40* ,50*, 54,55
<i>Todos <i>DAB</i>*</i>	28,53,56,60,61	1,12,22, 28,45,53,56,59,60,61	53,59*,61

PAML= Prueba Bayes Empirical Bayes $p>0,99$; REL= Bayes Factor >1000 ; FEL= $p>0,95$. * $p>0,9$.

En resumen, todos estos análisis evolutivos en conjunto nos muestran que para el MHC clase II de salmónidos la recombinación y la selección positiva han actuado en conjunto generando diversidad, especialmente en aquellos sitios involucrado directamente en la presentación de antígenos como parte del PBR.

5.1.3. DISCUSIÓN

En esta tesis se estudió por primera vez la diversidad de las especies salmónidas *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Oncorhynchus kisutch* cultivadas en nuestro país, a través del análisis del polimorfismo de sus genes de MHC clase I y II. Además, el haber obtenido datos de secuencias provenientes de estas tres especies nos permitió aproximarnos al estudio de los mecanismos evolutivos involucrados en la generación del polimorfismo del MHC clase II.

Previo a este estudio prácticamente no existían datos sobre *O. kisutch* a excepción de los trabajos de Miller y Withler (1996, 1998) (Miller y Withler, 1996; Miller y Withler, 1998), los cuales no proporcionaban información detallada sobre la diversidad del MHC en esta especie. Por lo mismo nuestro diseño experimental se basó a partir de lo que existía registrado en ese momento en la base de datos de polimorfismos inmunológicos del EBI para las especies *S. salar* y *O. mykiss*. En un principio se trató de crear un solo juego de partidores por locus para amplificar los genes correspondientes de las tres especies, ya que esto hubiese facilitado el proceso experimental y aunado aún más los datos para sus posteriores análisis. Lamentablemente por tratarse de dos géneros diferentes (*Oncorhynchus* y *Salmo*) esto no fue posible, pudiendo utilizarse los mismos juegos de partidores sólo para *O. mykiss* y *O. kisutch*.

Para el MHC clase I los partidores consiguieron una amplificación abundante y una banda única en el PCR, pero los posteriores análisis mediante DGGE demostraron la existencia de varias bandas por individuo que post secuenciación fueron identificadas como heterodímeros, genes no-clásicos y pseudogenes, y en menor proporción como nuestro gen de interés, el locus clásico *UBA*. La existencia de estos otros genes ya había sido descrita para *O. mykiss* y *S. salar* (Miller y Withler, 1998; Shiina *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2006; Lukacs *et al.*, 2007), habiendo amplificado nosotros la mayoría de estos genes no-clásicos descritos, posiblemente por un alto grado de homología entre genes clásicos y no-clásicos

en las regiones que forman los bordes del bolsillo de unión de péptidos. El hecho de que estos genes no-clásicos no fueran amplificadas en *O. kisutch* nos hace pensar que tal vez no existan en esta especie, pudiendo haber sido eliminados en la evolución por desuso debido al reducido nicho ecológico en que se ha desarrollado la especie (Van den Berghe y Gross, 1989), aunque son necesarios más estudios para sacar conclusiones al respecto.

Para el MHC de clase II una región que abarca la mayor parte del segundo exón de los genes de la cadena α y β (dominios alfa 1 y beta 1) fue analizada para las tres especies salmónidas en estudio. Nuestros datos muestran que tanto el locus de clase II α (*DAA*) como β (*DAB*) presentan altos niveles de polimorfismo, en contraste con vertebrados superiores como mamíferos y aves, donde la mayoría o la totalidad de la variabilidad se encuentra sólo en la cadena β (Hughes y Nei, 1989; Reche y Reinherz, 2003; Hughes *et al.*, 2008).

Un máximo de dos alelos por individuo fue amplificado, para ambos locus en las tres especies analizadas, sugiriendo que la presencia de un solo locus clásico de MHC clase II α y β podría ser una característica común en la familia de los salmónidos, y no una excepción del género *Salmo* (Grimholt *et al.*, 2000; Conejeros *et al.*, 2008; Croisetière *et al.*, 2008). Aunque esta interpretación requeriría ser confirmada por estudios posteriores.

Para la cadena alfa (*DAA*) de *S. salar* la mayoría de las secuencias encontradas concuerdan con las reportadas en la literatura (Stet *et al.*, 2002; Grimholt *et al.*, 2003a; Consuegra *et al.*, 2005a), no así para el género *Oncorhynchus*, en que la gran mayoría de las secuencias que se reportan en esta tesis, son nuevas. Para la cadena beta (*DAB*), en contraste, la mayor parte de los alelos encontrados ya habían sido descritos (Hordvik *et al.*, 1993; Grimholt *et al.*, 2000; Landry y Bernatchez, 2001; Langefors *et al.*, 2001; Shum *et al.*, 2001; Stet *et al.*, 2002).

El mismo número de alelos (9 secuencias) fue encontrado para los locus clásicos *DAA* y *DAB* en *S. salar*, lo que posiblemente refleja el ligamiento entre ambos loci previamente sugerido para esta especie (Stet *et al.*, 2002). Por el contrario, en *O. mykiss* y *O. kisutch* el número de alelos encontrado en el locus *DAB* fue mayor al del locus *DAA*. La presencia de más de un locus de clase II beta había sido sugerido previamente para el género *Oncorhynchus* (Miller y Withler, 1996), sin embargo, a pesar de que no podemos descartar completamente que nuestros partidores amplificasen un segundo locus, la presencia de un

máximo de dos bandas por individuos en el DGGE y la filogenia de los alelos, nos sugieren que no existiría un locus *DAB* clásico adicional en nuestras muestras.

Los niveles de polimorfismo encontrado para *S. salar* y *O. mykiss* fueron similares a los reportados en trabajos anteriores realizados en poblaciones naturales (Miller y Withler, 1996; Grimholt *et al.*, 2000; Landry y Bernatchez, 2001; Shum *et al.*, 2001; Consuegra *et al.*, 2005a; Aguilar y Garza, 2006). Ello nos sugiere que nuestra base de datos es representativa de la diversidad del MHC existente en estas especies. La baja diversidad encontrada para el MHC clase II α de *O. kisutch* no tiene referentes ya que no existen estudios previos para dicho dominio en esta especie, sin embargo bajos valores de diversidad para el gen de clase II β en esta especie (Miller y Withler, 1996) fueron atribuidos a un posible "cuello de botella" durante y después de la especiación, aunque en nuestro estudio el gen beta presentó altos niveles de polimorfismo. A pesar de que no se puede descartar totalmente la posibilidad de que la baja diversidad observada en *O. kisutch* se deba a un eventual proceso de endogamia, por tratarse de peces en cultivo, existen varios factores que argumentan en contra de esta posibilidad; de hecho, los peces analizados en este trabajo provenían de más de un centros de cultivo, presentando un alto porcentaje de individuos heterocigotos (58% y 69% de *DAA* y *DAB*, respectivamente). Por otra parte, estudios recientes en *Oncorhynchus gilae* (Peters y Turner, 2008) también mostraron niveles extremadamente bajos de polimorfismo en el MHC clase II β (5 alelos en 142 individuos), lo que sugiere que las especies con distribución restringida (como es el caso de *O. gilae* y *O. kisutch*) podrían no necesitar mostrar una gran diversidad como consecuencia de su reducido nicho ecológico (Van den Berghe y Gross, 1989).

El hecho de que la diversidad aminoacídica dentro de las poblaciones fuera mayor que entre poblaciones, y que para ambos locus se favorecieran los cambios no-sinónimos por sobre los sinónimos, sugieren que las moléculas del MHC clase II de salmónidos han estado sometidas a selección positiva, habiendo una presión más fuerte en los codones que codifican para el PBR (Bernatchez y Landry, 2003). Esto probablemente debido al hecho que, desde un punto de vista funcional, se requeriría una mayor variedad de moléculas capaces de presentar los antígenos patogénicos a los que se ve expuesta una población determinada.

La existencia de polimorfismo *trans*-especies (TSP) entre los dos géneros de peces, *Oncorhynchus* y *Salmo*, fue algo inesperado pero muy interesante. Este fenómeno, que describe la presencia de alelos similares entre especies derivadas de un ancestro común, había sido reportado entre humanos y gorilas para el MHC clase I (Mayer et al., 1988), en aves para el MHC clase II β e incluso en algunos peces ciprínidos donde se encontró TSP para el para el MHC clase II entre especies a nivel de subfamilia (Graser et al., 1996; Ottová et al., 2005). En salmónidos sólo había sido descrito entre especies del mismo género para el MHC clase II de *S. salar* y *Salmo trutta* (Stet et al., 2002), y para las especies del género *Oncorhynchus* (*O. mykiss*, *O. ketta* y *O. nerka*) (Aguilar y Garza, 2006). Sin embargo esta es la primera evidencia de TSP entre dos géneros diferentes de peces, la que tal vez no había sido descrita previamente debido a la escasez de estudios comparativos (Shum et al., 2001), y que corresponde a una evidencia adicional sobre el pasado común existente entre ambos géneros de salmónidos.

Un análisis comparativo sobre los niveles de diversidad en el MHC clase I versus al MHC clase II no fue posible. Primero debido a que para clase I sólo se analizó el dominio alfa 1 del género *Oncorhynchus* y el dominio alfa 2 de *S. salar*; a diferencia de clase II donde se contaba con datos para ambas cadenas alfa y beta del PBR. Segundo, porque para el MHC clase I se consiguió una amplificación inespecífica de loci no-clásicos, situación que, sin lugar a dudas, hubiera interferido en el análisis de diversidad. Y tercero, porque el número de peces analizados para el MHC clase I fue considerablemente inferior al analizado para el MHC clase II donde se centró la mayor parte de nuestro estudio.

Sin embargo, la presencia de polimorfismo tanto en la cadena α y β del MHC clase II en los géneros *Oncorhynchus* y *Salmo* sugiere un mecanismo común para la mantención de la variabilidad en estos loci en particular. De hecho, estudios previos en salmónidos sugieren que la mayoría de las divergencias observadas en el MHC clase II en las poblaciones actuales podrían ser anteriores a la especiación dentro de los salmónidos (por ejemplo Conejeros et al., 2008), por lo que resultó interesante evaluar si fenómenos como la recombinación, mutación y selección podrían haber sido partícipes de la generación de este polimorfismo en el MHC clase II de salmónidos.

Los resultados encontrados por diferentes análisis concuerdan en que existen evidencias de recombinación para ambos locus, *DAA* y *DAB*, en las tres especies, exceptuando *Onki-DAA*, donde el bajo número de secuencias impidió el análisis. Los resultados del análisis Ldhat sugieren que tanto la mutación como la recombinación están involucradas en la creación de la variabilidad en los genes *DAA* y *DAB*; sin embargo, sería la recombinación la que juega un rol mayor, concordando con estudios previos para el MHC clase II alfa en salmón del Atlántico (Consuegra et al., 2005a). El número estimado de puntos de recombinación (BP) estimado por GARD fue siempre menor que el número mínimo de eventos de recombinación (R_m) para ambos loci posiblemente como consecuencia de la sub-estimación de GARD en la detección de recombinación basada en discordancia filogenética cuando el número de secuencias es escaso (Kosakovsky Pond et al., 2006). Sin embargo, para ambos análisis los sitios involucrados en recombinación se superponen con algunos detectados bajo selección positiva, ajustándose a un modelo de conversión génica y mutación puntual como elementos sinérgicos en la generación de polimorfismo (Ohta, 1995). Finalmente, cabe decir que nuestros resultados contrastan con los encontrados para MHC clase I en la misma especie, donde la mutación aparece como la principal fuerza evolutiva (Consuegra et al., 2005b), proponiendo entonces mecanismos evolutivos alternativos para los genes del MHC clase I y clase II, pero similares para las clases II α y β .

Por otra parte, los resultados divergentes encontrados en las pruebas de neutralidad, donde unos encontraron evolución neutral y otros no, pueden deberse a los diferentes criterios utilizados por cada prueba. Las prueba D de Tajima y la prueba de Fu y Li fueron incapaces de rechazar la hipótesis de neutralidad, probablemente porque no tienen en cuenta la recombinación como fuente de polimorfismo (Fu y Li, 1993; Li et al., 2003), siendo que el análisis de LDhat ya había demostrado que esta es una de las mayores fuentes de diversidad para el MHC clase II de salmónidos. Sin embargo, los resultados de la prueba de McDonald y Kreitman (McDonald y Kreitman, 1991) indicaron que algunas de las secuencias sí han evolucionado de una manera no neutral. Esta prueba compara el número de polimorfismos (sustituciones dentro de las especies) y las diferencias fijas (sustituciones entre las especies) como indicadores de las tasas de evolución y asume que las mutaciones ocurren en sitios diferentes en diferentes linajes (Egea et al., 2008), sugiriendo que este tipo de mecanismos evolutivo pudo haber actuado en salmónidos en la generación de diversidad.

Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que la diversidad observada en las secuencias de MHC clase II α y β puede haber sido generada, en cierta medida, por selección positiva en el PBR. El modelo que mejor se ajusta a nuestros datos (M2) considera tres tipos de sitios: conservados, neutrales y bajo selección positiva. Este modelo es consistente con las variadas interacciones en que estos residuos están involucrados dentro de las moléculas MHC, en contacto con los péptidos de unión y los receptores de la superficie celular (Van den Berg et al., 2004). Nosotros encontramos pruebas de selección positiva actuando tanto en los genes de MHC clase II α y β , cuando todas las secuencias fueron analizadas en conjunto, y también cuando *S. salar* y *O. mykiss* fueron analizados individualmente, pero, debido al bajo número de secuencias, sólo se consideraron los resultados de todas las especies en común y los sitios que fueron identificados por los tres métodos utilizados (Figura 5.9). Aunque la prueba de razón de probabilidades puede verse afectada por altos niveles de recombinación génica y el modelo M2 es potencialmente el más afectado, los resultados de las pruebas LRT todavía son precisas cuando, como en nuestro caso, menos de tres eventos de recombinación están presentes en una muestra de 10 secuencias (Anisimova et al., 2003). Además, el uso de la predicción Bayes Emprirical Bayes de sitios seleccionados en PAML, ha demostrado ser más precisa con altos niveles de selección positiva (Kosakovsky Pond y Frost, 2005). Por otro lado, la deriva genética como consecuencia de los cuellos de botella de la población podría dar lugar a un patrón similar al de selección positiva en la prueba que comparan las relaciones entre las sustituciones sinónimas y no-sinónimas, tales como la prueba de McDonald y Kreitman (MK) (McDonald y Kreitman, 1991) y la prueba de máxima probabilidad (ML) (Yang, 2007). Sin embargo, la concordancia entre los resultados de las diferentes metodologías y la historia conocida de selección en los genes del MHC sugiere que los patrones de selección positiva que encontramos aquí no son un artefacto y que las discrepancias entre las distintas pruebas son sólo el resultado de diferencias en las metodologías.

La alta coincidencia de sitios conservados y polimórficos en los alineamientos de secuencias aminoacídicas entre las tres especies analizadas reflejan una estructura bien preservada para la región de unión de péptidos (PBR) en salmónidos. Además comparaciones anteriores con el MHC humano (Bjorkman et al., 1987b; Stern et al., 1994; Stet et al., 2002) también muestran concordancias entre los sitios polimórficos, a pesar de que la distancia filogenética entre teleósteos y humanos no permite llegar a conclusiones definitivas con respecto a la ubicación de los sitios funcionales en el PBR. Hasta el momento, no existen modelos

cristalográficos de las proteínas del MHC II de teleósteos, por lo que la mayoría de las predicciones se basan en estructuras 3D de humanos o ratón disponibles en la base de datos de PDB (www.pdb.org), y también en el alto nivel de variabilidad existente en dichos residuos críticos (Reche y Reinherz, 2003). Utilizando estos criterios, más del 60% de los sitios identificados bajo selección positiva coincidieron con residuos predichos como parte del PBR del HLA-DR humano basados en estudios cristalográficos (Stern et al., 1994), lo que podría reafirmar la semejanza entre teleósteos y humanos. Además, modelos bioinformáticos recientes del MHC de *S. salar* dan sustento a estas suposiciones (Cárdenas et al., 2010).

En resumen, apartir de la caracterización del MHC de las poblaciones de *S. salar*, *O. mykiss* y *O. kisutch* cultivadas en Chile podemos asumir que el grado de diversidad presente en ellas es alto y muy similar al de poblaciones naturales.

Así mismo los análisis evolutivos indican que los mecanismos utilizados en la generación de diversidad del MHC fueron aparentemente diferentes para el MHC clase I y el MHC clase II, pero similares para el MHC clase II alfa y beta en salmónidos. El MHC clase I se presenta como una estructura compleja con el locus clásico *UBA* y múltiples locus no-clásicos, con su mayor fuerza evolutiva proviniendo de la mutación; mientras el MHC clase II al parecer solo presenta los locus clásicos *DAA* y *DAB*, ambos altamente polimórficos, teniendo a la recombinación como la mayor fuerza generadora de la diversidad. Sin embargo en ambos MHC hay evidencias de selección positiva actuando en sitios predichos como parte de la región de unión de péptido (PBR), sugiriendo una coordinación en el actuar de estos estos mecanismos evolutivos, con el propósito final de optimizar y diversificar la presentación antigénica.

Finalmente, dadas las diferencias con vertebrados superiores, que presentan al MHC clase II alfa poco polimórfico, nuestros resultados sugieren que el mantenimiento de la variabilidad en el MHC clase II alfa podría ser un mecanismo para aumentar la diversidad total en el MHC clase II en los salmónidos con el fin de compensar la expresión de un solo gen clásico de clase II α y β .

Parte II:

Asociación entre la diversidad del MHC clase II y la resistencia o susceptibilidad a *Piscirickettsia salmonis* en peces salmónidos cultivados en Chile

5.2.1. ANTECEDENTES PRELIMINARES

Como ya se ha demostrado, *Piscirickettsia salmonis* es lejos el patógeno más persistente y agresivo que afecta la salmicultura nacional (Leal y Woywood, 2007). A pesar de las prácticas de bioseguridad y de las variadas alternativas profilácticas desarrolladas contra el patógeno, este sigue generando un significativo efecto negativo en la industria (Somerset et al., 2005). Por lo mismo, la selección asistida por marcadores (MAS) se presenta como la opción más atractiva (Meuwissen y Sonesson, 2004) y los genes del MHC aparecen como los mejores candidatos para la selección de resistencia a enfermedades (Grimholt et al., 2003a; Kjøglum et al., 2006; Xu et al., 2008; Rakus et al., 2009).

Dichos genes están involucrados en la distinción entre lo ajeno y lo propio mediante la presentación de antígenos (Steinmetz y Hood, 1983), y su región de unión de péptidos (PBR) ha evolucionado en una de las más polimórficas de la naturaleza para aumentar la posibilidad de sobrevivir a diferentes agentes (Grimholt et al., 2003a; Reche y Reinherz, 2003).

En esta segunda parte de la tesis hemos utilizado la información proveniente de la diversidad del MHC clase II en poblaciones de individuos *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Oncorhynchus kisutch* naturalmente expuestos a la bacteria *P. salmonis* en diferentes centros de cultivo del país, para identificar alelos posiblemente relacionados con resistencia o susceptibilidad a este patógeno.

5.2.2. RESULTADOS

5.2.2.1. Análisis de diversidad del MHC clase II

La diversidad alélica del MHC clase II fue analizada y comparada entre peces salmónidos provenientes de distintos centros de cultivo del país, los cuales resultaron resistentes o susceptibles a epizootias del patógeno *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*). Muestras de las tres especies salmónidas mayormente cultivadas en Chile: *Salmo salar* (*S. salar*), *Oncorhynchus mykiss* (*O. mykiss*) y *Oncorhynchus kisutch* (*O. kisutch*), fueron analizadas. El estudio se centró en la región conteniendo los sitios de unión de péptido (PBR) codificados en el segundo exón de los genes MHC clase II para la cadena alfa (locus *DAA*) y beta (locus *DAB*).

En las tres especies salmónidas se observó un alto nivel de polimorfismo para ambos loci. Para el locus *DAA*, encontramos 12 alelos diferentes para *S. salar*, 11 para *O. mykiss* y 5 para *O. kisutch*; mientras que para el locus *DAB*, el número de secuencias para cada especie fue de 13, 13 y 14, respectivamente. Algunas de estas secuencias ya habían sido reportadas en la primera parte de esta tesis, pero 18 son secuencias nuevas; todas las cuales ya fueron subidas a la base de datos del NCBI (Anexo II).

5.2.2.2. Análisis de equilibrio poblacional de Hardy-Weinberg

Basado en el análisis de los alelos de los locus *DAA* y *DAB* del MHC clase II, se realizó un análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) en las poblaciones originales a estudiar, con la idea de posteriormente comparar las poblaciones de peces sanos y enfermos. El principio de HW establece que la composición génica permanecerá constante a través de las generaciones en aquellas poblaciones con gran tamaño y apareamiento al azar, siempre y cuando no exista selección, mutación o migración (Guo y Thompson, 1992). En nuestro caso, las muestras provenían de diferentes centros de cultivo y por ende fueron catalogadas cada una como una población diferente, a pesar de sus reducidos tamaños (Tabla 5.5). Los resultados indican que más del 65% de las poblaciones estaban en equilibrio de HW, con el resto de ellas mostrando desequilibrio sólo en uno de los dos loci analizados (*DAA* o *DAB*)

debido a un exceso de individuos homocigotos. Sólo en una población de *O. mykiss* el desequilibrio se detectó en ambos loci.

Debido al reducido tamaño muestral de nuestras poblaciones iniciales, fue imposible comparar los niveles de heterocigosidad entre los grupos de individuos "sanos" y "enfermos" originales, siendo necesario agruparlos por especie con el fin de aumentar el tamaño poblacional. Al realizar esto se encontró indistintamente, tanto para algunos grupos de individuos sanos como enfermos (poblaciones S y E en Tabla 5.5), en uno u ambos loci, un exceso de homocigotos similar al encontrado en algunas poblaciones originales, por lo que no se dio relevancia a dichos resultados.

Tabla 5.5.

Prueba de Hardy-Weinberg para el MHC de salmónidos naturalmente expuestos a *P. salmonis*. Valores estimados para los locus *DAA* y *DAB* del MHC clase II de las poblaciones de peces salmónidos originales y para los grupos de individuos sanos (S) y enfermos (E) de cada especie. Se muestra el número (N) de individuos totales, sanos y enfermos para cada población (Pob). Los valores de Fis positivos y negativos indican respectivamente un exceso de individuos homocigotos o heterocigotos para aquellas poblaciones con desviaciones del equilibrio de HW (*valor-p<0,05).

Especie	Pob	N Total	N S	N E	DAA			DAB		
					Valor-p	Fis W&C	Fis R&H	Valor-p	Fis W&C	Fis R&H
<i>S. salar</i>	Sasa	6	3	3	0*	0,655	0,589	0,033	0,322	0,238
	Sasb	6	4	2	0,254	0,273	0,247	0,920	-0,200	-0,120
	Sasc	15	0	15	0,635	0,145	0,123	1	-0,114	-0,046
	Sase	15	12	3	0,278	0,056	0,021	0*	0,497	0,294
	Sasf	15	15	0	0,208	0,005	-0,014	0,021*	0,069	0,025
	S	0	34	0	0*	0,178	0,152	0*	0,245	0,129
	E	0	0	23	0,033	0,236	0,101	0,269	0,025	0,080
<i>O. mykiss</i>	Onma	30	26	4	0,042	0,197	0,146	0*	0,595	0,471
	Onmb	10	9	1	0,003*	0,355	0,164	0*	0,451	0,301
	Onmc	4	0	4	0,200	1	1,500	0,760	0,053	0,021
	S	0	35	0	0,002*	0,212	0,189	0*	0,641	0,581
	E	0	0	9	0*	0,714	0,600	0,172	0,132	0,071
<i>O. kisutch</i>	Onka	12	11	1	1	0,114	0,069	0,243	0,018	0,018
	Onkb	13	12	1	0,564	-0,200	-0,141	0,280	-0,103	-0,081
	Onkc	9	9	0	1	0,024	0,034	0,191	0,118	0,056
	Onkd	10	2	8	0,377	0,253	0,375	0,844	0	0
	Onke	10	5	5	0,396	0,211	0,231	0,349	-0,068	0,066
	Onkf	12	4	8	0,066	-0,303	-0,236	0,151	0,059	0,043
	Onkg	5	0	5	1	-0,091	-0,028	0,804	0,368	0,167
	Onkh	5	3	2	0,615	0,143	0,163	0,307	0,217	0,167
	Onki	12	0	12	0,530	0,214	0,324	0*	0,273	0,239
	S	0	46	0	0,503	-0,109	-0,061	0,001*	0,045	0,089
	E	0	0	42	0,033	0,201	0,287	0*	0,231	0,297

5.2.2.3. Prueba de diferenciación poblacional

En la búsqueda de diferencias entre los grupos de peces sanos y enfermos, dos pruebas de diferenciación poblacional fueron utilizadas: un análisis de FST y una prueba exacta (Tabla 5.6). Ambas pruebas fueron capaces de identificar diferencias significativas entre los grupos de peces a lo menos en algunos casos. En el análisis de diferenciación FST (Reynolds *et al.*, 1983) se encontraron diferencias significativas (valor- $p < 0,05$) entre los peces sanos y enfermos sólo para los loci *DAA* y *DAB* de *S. salar*. Mientras que en la prueba exacta de diferenciación poblacional (Raymond y Rousset, 1995a) se encontraron diferencias significativas (valor- $p < 0,05$) entre ambos grupos tanto para el locus *DAB* de las tres especies, como para el locus *DAA* de *S. salar*. Tomando en cuenta estos resultados se procedió a buscar qué elementos estaban provocando tales diferencias.

Tabla 5.6.

Pruebas FST y de diferenciación exacta entre los grupos de peces sanos y enfermos naturalmente expuestos a *P. salmonis*. Se muestran los resultados para los locus *DAA* y *DAB* del MHC clase II de las especies *S. salar*, *O. mykiss* y *O. kisutch*. Se indican las diferencias significativas (*valor- $p < 0,05$).

<i>Locus</i>	<i>Valor FST</i>	<i>Valor-p FST</i>	<i>Valor-p exacto</i>
<i>Sasa-DAA</i>	0,057	0,006*	0,004*
<i>Sasa-DAB</i>	0,033	0,042*	0,0007*
<i>Onmy-DAA</i>	0,005	0,331	0,072
<i>Onmy-DAB</i>	0,036	0,078	0,044*
<i>Onki-DAA</i>	-0,001	0,385	0,305
<i>Onki-DAB</i>	0,011	0,156	0,0003*

5.2.2.4. Análisis de disimilitud alélica del MHC clase II

Se estimó la diversidad nucleotídica no-sinónima promedio (Ka) para cada locus y especie, y se compararon los valores obtenidos tanto para los grupos de peces sanos como para los enfermos utilizando una prueba-t (Figura 5.11). Se encontraron diferencias estadísticas sólo para la especie *O. mykiss* (valor- $p < 0,05$), observándose una interesante relación entre la diversidad del MHC clase II y el estado de salud de los peces, la cual fue contradictoria entre ambos locus. Para el locus *DAA* los individuos sanos presentaron una mayor disimilitud alélica (Ka) que los enfermos ($p=0,009$); en cambio, para el locus *DAB* los individuos sanos mostraron una Ka menor que los enfermos ($p=0,016$).

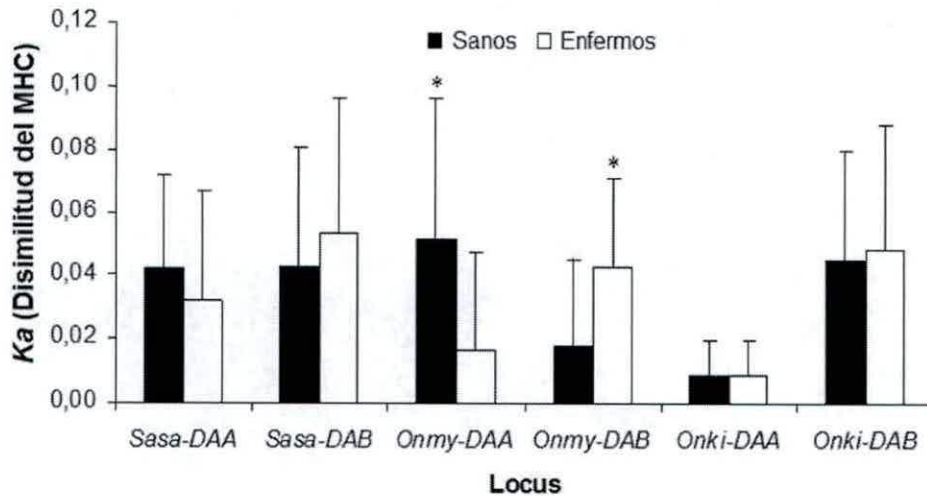


Figura 5.11. Diversidad nucleotídica no-sinónima promedio (K_a) para el MHC clase II de salmónidos naturalmente expuestos a *P. salmonis*. Se muestran los valores para el locus DAA y DAB en los peces sanos (barras negras) o enfermos (barras blancas) de las especies *S. salar*, *O. mykiss* y *O. kisutch*. Se indican la desviación estándar y las diferencias significativas en la prueba-t (* $p < 0,05$).

5.2.2.5. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas.

Al analizar las frecuencias alélicas del MHC de clase II para cada locus y especie, y comparar sus valores entre los grupos de peces sanos y enfermos mediante la prueba estadística L_D (Hindar *et al.*, 2004) encontramos alelos altamente asociados con la susceptibilidad a la bacteria *P. salmonis* (valor- $p < 0,001$) (Figura 5.12). Para *S. salar* esta observación fue válida para ambos loci DAA y DAB (alelos *Sasa-DAA**0901 y *Sasa-DAB**0701); en cambio para *O. mykiss* sólo para el locus DAA (alelo *Onmy-DAA**1103), y para *O. kisutch* sólo para el locus DAB (alelo *Onki-DAB**0601). Otros alelos mostraron diferente frecuencia entre los grupos de peces sanos y enfermos con una significancia estadística menor (valor- $p < 0,05$) destacando aquellos que se encuentra solo en individuos sanos como *Sasa-DAA**0301, *0302 y *0401; *Sasa-DAB**0202, *0401 y *0402; y *Onmy-DAB**1501.

Adicionalmente, se observó una tendencia tanto para *S. salar* como para *O. mykiss* en que la mayoría de los alelos altamente relacionados con la susceptibilidad a *P. salmonis* presentaron las mayores frecuencias en la población; mientras que los posiblemente relacionadas con resistencia presentaron las frecuencias menores (Figura 5.12).

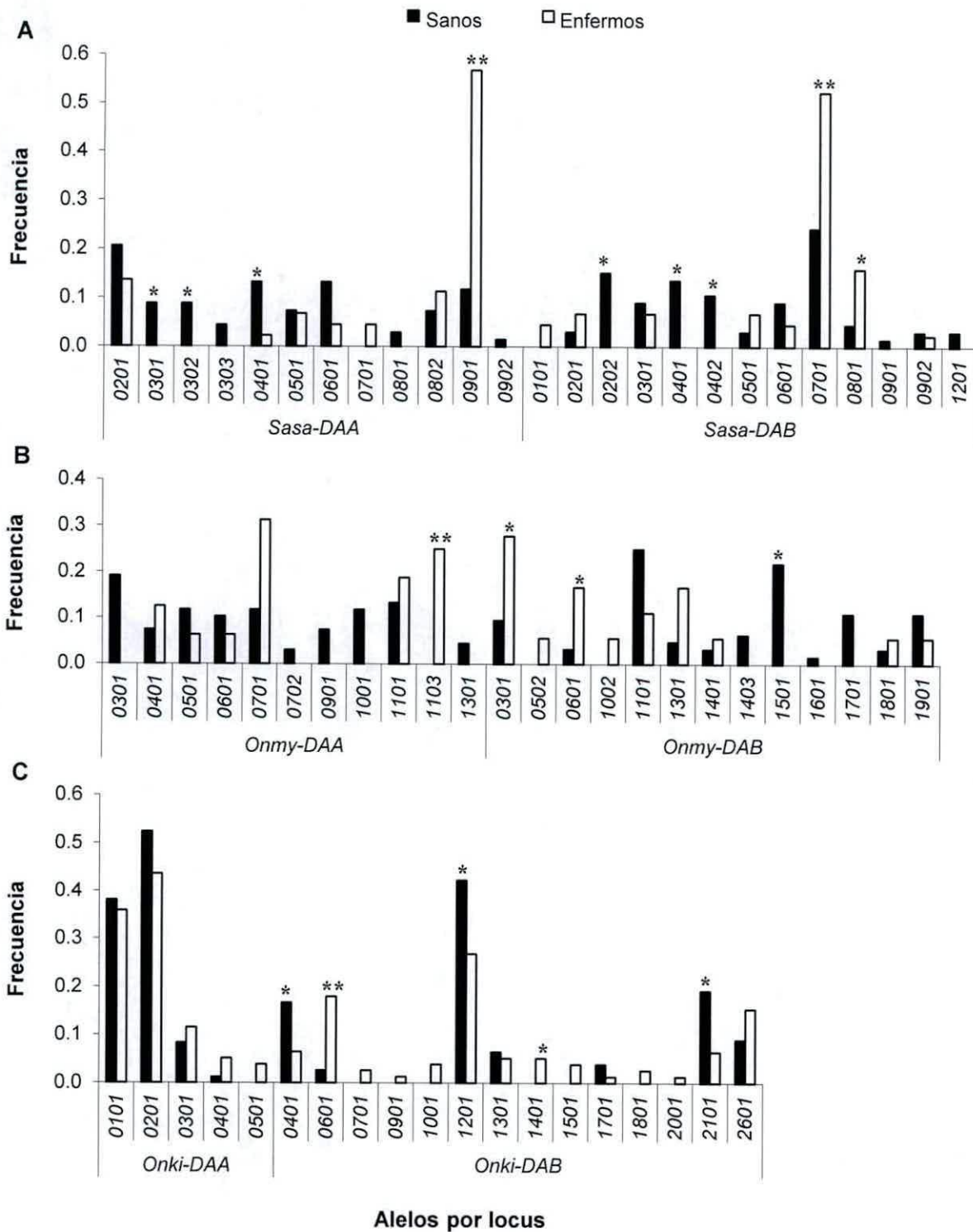


Figura 5.12. Frecuencias alélicas para el MHC Clase II en salmónidos naturalmente expuestos a *P. salmonis*. Se muestran los valores para los locus *DAA* y *DAB* en los grupos sanos (barras negras) o enfermos (barras blancas) de las especies **A.** *S. salar*, **B.** *O. mykiss* y **C.** *O. kisutch*. Se indica la asociación de alelos al estado sano o enfermo medido con la prueba estadística L_D (** $p < 0,001$, * $p < 0,05$).

Con respecto a las frecuencias genotípicas analizadas por el estadístico L_D , sólo dos genotipos, *Sasa-DAA*0901/0901* ($p=0,0003$) y *Sasa-DAB*0701/0801* ($p=0,0041$), presentaron una frecuencia significativamente mayor en la población enferma. Esta asociación se debe probablemente a que ambos genotipos contienen alelos que ya individualmente estaban relacionados con la susceptibilidad a *P. salmonis* (alelos *Sasa-DAA*0901* y *Sasa-DAB*0701*).

Finalmente, se estimó la contribución de cada alelo a la separación de los grupos sanos y enfermos mediante un análisis SIMPER (Clarke, 1993). Para *S. salar* y *O. mykiss*, los alelos que contribuyen más son aquellos relacionados con la susceptibilidad al patógeno mediante la prueba L_D : alelos *Sasa-DAA*0901* (26%), *Sasa-DAB*0701* (24%) y *Onmy-DAB*0301* (18%). Mientras que para *O. kisutch* el alelo de mayor contribución a la diferenciación de las poblaciones es *Onki-DAB*1201* (22%), el cual estaba relacionado con resistencia al patógeno según el estadístico L_D . Para el locus *DAA* de *O. mykiss* y de *O. kisutch* este análisis no se llevó a cabo por no existir diferencias significativas entre los grupos de peces sanos y enfermos (Tabla 5.6).

Estos resultados nos indican que es posible encontrar alelos del MHC clase II altamente relacionados con la resistencia o susceptibilidad a *P. salmonis* en las especies estudiadas.

5.2.3. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en salmónidos que intenta correlacionar la resistencia o susceptibilidad a la bacteria patógena *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*) con la variabilidad en genes del sistema inmune de peces cultivados. Mediante el análisis y comparación de la diversidad alélica del MHC clase II de peces que sobrevivieron o murieron durante epizootias de *P. salmonis*, hemos sido capaces de identificar diferencias en las frecuencias alélicas entre los peces sanos y enfermos, lo que sugiere fuertemente que alelos particulares podrían reflejar la habilidad de un pez a responder diferencialmente a la infección del patógeno.

El análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) en nuestras poblaciones originales estableció que algunas de ellas estaban en desequilibrio, lo cual podría deberse al reducido

tamaño muestral de ellas (Guo y Thompson, 1992). Se ha establecido por ejemplo que se requiere un mínimo 20 individuos para conseguir resultados con niveles de significancia de 0,15 (Elston y Forthofer, 1977), y por lo mismo se decidió comparar en conjunto los grupos de individuos sanos u enfermos totales por especie. Sin embargo al realizar esto se observó un exceso de homocigotos, que en ningún caso se relacionó con una susceptibilidad frente al patógeno *P. salmonis* como se hubiera esperado según la hipótesis evolutiva de ventaja heterocigótica (Penn *et al.*, 2002), sino más bien que podría ser atribuida al denominado efecto Wahlund que establece que al mezclar dos poblaciones, incluso estando ellas en equilibrio HW, se produce un desbalance que provoca un déficit de heterocigotos (Wahlund, 1928). Dado lo anterior, decidimos no considerar los resultados de estos análisis, no obstante de seguir utilizando en conjunto las muestras por especie para cada condición, sanas o enfermas, en el resto de nuestros análisis.

En las pruebas de diferenciación génica poblacional detectamos discrepancias entre los resultados obtenidos por la prueba FST y la prueba exacta. La primera detectó diferencias génicas entre las poblaciones de peces sanos y enfermos solo para *Salmo salar*, mientras que la prueba exacta para las tres especies. Lo anterior puede atribuirse a diferencias en los parámetros utilizados por dichas pruebas, ya que por ejemplo, el análisis de FST considera tanto las frecuencias haplotípicas como la similitud de secuencia entre los alelos (Reynolds *et al.*, 1983), mientras que la prueba exacta sólo tiene en cuenta las frecuencias de los haplotipos (Raymond y Rousset, 1995a). Dado que el criterio de frecuencias alélicas fue utilizado posteriormente para determinar los alelos asociados a resistencia o susceptibilidad a *P. salmonis*, y a que la prueba exacta fue capaz de encontrar mayores diferencias génica entre nuestros grupos experimentales, se determinó que los resultados de dicha prueba fueran considerados como base para los futuros análisis.

Nuestros resultados han mostrado un interesante resultado respecto al grado de diversidad alélica del MHC (K_a) en *O. mykiss* y el estado de salud de los salmónidos frente al patógeno *P. salmonis*, el cual fue contradictorio entre ambos locus: K_a mayor en los individuos sanos en el locus DAA, pero menor en los individuos sanos en el locus DAB (Figura 5.11). Los resultados para el locus DAA, concuerdan con los encontrados por (Consuegra y Garcia de Leaniz, 2008), donde individuos *S. salar* resistentes para el nematodo *Anisakis* sp. fueron más disímiles en su MHC clase II α que los infectados; y es lo que esperaríamos suponiendo que los individuos con MHC disímiles se benefician al ser capaces de presentar una gama

más amplia de agentes patógenos (Penn *et al.*, 2002). Sin embargo al no ocurrir lo mismo para el locus *DAB*, ni para las otras especies, debemos suponer que son determinados alelos en particular, y no la variabilidad per-sé, los que podrían estar confiriendo una ventaja adaptativa (Takahata y Nei, 1990), tal como se demostró en análisis posteriores.

Los resultados de los análisis de las frecuencias alélicas en nuestras poblaciones de salmones sanos y enfermos sugieren la existencia de alelos altamente correlacionados con la susceptibilidad a *P. salmonis*, y otros que con menor significancia podrían estar relacionados con resistencia al patógeno (Figura 5.12). Así mismo, la alta contribución de estos alelos a la separación de las poblaciones de individuos sanos y enfermos, avala los resultados de correlación obtenidos y el posible uso de dichos alelos en la selección de individuos.

Estos resultados respaldan la hipótesis de selección natural dirigida por patógenos, sugiriendo que ellos juegan un rol fundamental en la evolución y mantención de la diversidad del MHC (Bernatchez y Landry, 2003). Adicionalmente, la tendencia observada en que la mayoría de los alelos altamente relacionados con susceptibilidad presentaron las frecuencias poblacionales mayores; mientras que los relacionadas con resistencia presentaron las frecuencias menores, sugiere que dicha selección natural está impulsada por una ventaja de alelos raros (Takahata y Nei, 1990).

Se propone, entonces, que los alelos de MHC clase II pueden ser muy útiles en la identificación y selección de poblaciones de reproductores salmónidos susceptibles o resistentes a *P. salmonis*.

5.2. Parte III:

Asociación de alelos del MHC clase II con resistencia o susceptibilidad a *Piscirickettsia salmonis* en ejemplares *Salmo salar* desafiados con la bacteria

5.3.1. ANTECEDENTES PRELIMINARES

Salmo salar ha sido históricamente la mayor especie salmónida cultivada en Chile y uno de los modelos animales más utilizados en ciencia básica e investigación acuícola (Revisado en Grimholt *et al.*, 2009). Su MHC se encuentra bien caracterizado (Stet *et al.*, 2002; Lukacs *et al.*, 2007; Harstad *et al.*, 2008) y por lo mismo ha sido utilizado en varios estudios de diversidad poblacional y evolución (Por ejemplo Landry y Bernatchez, 2001; Consuegra *et al.*, 2005a; Consuegra *et al.*, 2005b; Gómez *et al.*, 2010).

La asociación de sus genes MHC con la resistencia a enfermedades ha sido ampliamente estudiada para diferentes patógenos tanto bacterianos como virales (Langefors *et al.*, 2001; Lohm *et al.*, 2002; Grimholt *et al.*, 2003a; Miller *et al.*, 2004a; Kjøglum *et al.*, 2006; 2007; Wynne *et al.*, 2007; Consuegra y Garcia de Leaniz, 2008; Dionne *et al.*, 2009); sin embargo, no existen estudios que involucren a la bacteria patógena *Piscirickettsia salmonis*, que constituye la principal amenaza para la subsistencia de la acuicultura nacional (Fryer y Hedrick, 2003).

En un intento de encontrar una solución contra *P. salmonis*, se realizó un ensayo de desafío controlado con la bacteria en la especie *S. salar* y se analizó sus genes del MHC clase II en la búsqueda de alelos que pudieran estar relacionados con la resistencia o susceptibilidad a este patógeno.

5.3.2. RESULTADOS

5.3.2.1. Ensayo de desafío y análisis de diversidad del MHC clase II

Un total de 200 peces de la especie *Salmo salar* (*S. salar*) fue desafiado con la bacteria *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*) y la diversidad de sus genes MHC clase II analizada. Los peces, provenientes de dos familias diferentes (grupos experimentales A y B), fueron inyectados con la bacteria, y mantenidos en dos tanques experimentales (tanque 1 y 2), cada uno conteniendo 50 individuos de cada grupo (Figura 4.1). Las mortalidades fueron colectadas diariamente hasta el día 20, alcanzando valores de 75% y 79% para los grupos A y B respectivamente, y de 63% y 90% para los tanques 1 y 2 respectivamente (Tabla 5.7).

Tabla 5.7.

Valores de sobrevivencia (S) y mortalidad (M) para grupos *S. salar* desafiados con *P. salmonis*. Se muestran el número de individuos por grupo experimental (A y B) y por tanque (T1 y T2).

<i>Grupo</i>	<i>Tanque</i>	<i>S</i>	<i>M</i>
A	T1	22	28
	T2	3	47
B	T1	15	35
	T2	6	41
Total		45	152

El ADN de cada individuo, mortalidad o sobreviviente del ensayo, fue extraído y utilizado para la amplificación, mediante PCR, de los genes del MHC clase II alfa (locus *DAA*) y beta (locus *DAB*) utilizando los partidores y condiciones establecidos en las Tablas A.1 y A.2 del Anexo I. Los amplicones de cada individuo fueron resueltos mediante DGGE utilizando las condiciones de denaturante establecidas para cada locus (Tabla A.3, Anexo I), obteniéndose una buena resolución con un máximo de dos alelos por individuo para cada gen.

El análisis de las bandas correspondientes a los alelos del MHC clase II reveló que los grupos experimentales utilizados presentaban un alto grado de polimorfismo en los loci analizados, con altos valores de diversidad tanto nucleotídica como aminoacídica en ambos grupos (Tabla 5.8). Para el locus *DAA* se encontraron 9 alelos, y para el locus *DAB* 12 alelos en total (Tabla 5.8), con distribuciones levemente diferentes entre ambos grupos experimentales (ver Figura 5.15).

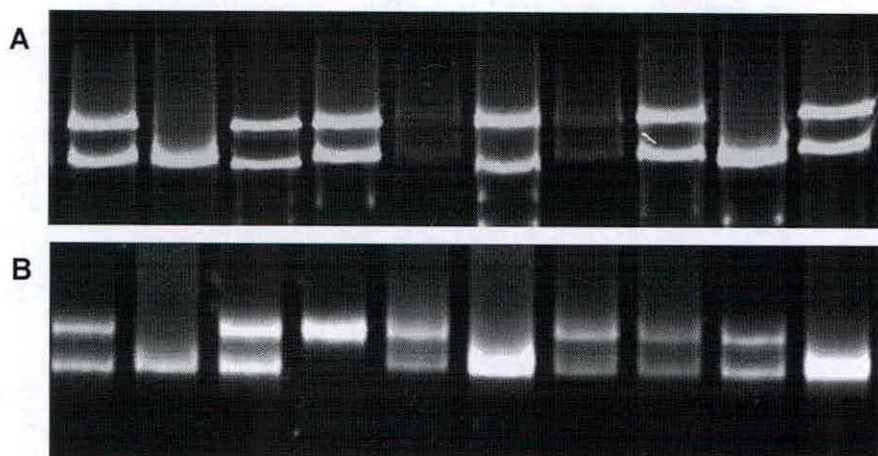


Figura 5.13. Caracterización alélica del MHC Clase II de *S. salar* mediante DGGE. **A.** Locus *DAA*. **B.** Locus *DAB*. Cada carril representa un individuo diferente.

Tabla 5.8.

Variabilidad del locus *DAA* y *DAB* del MHC clase II en los grupos *S. salar* desafiados con *P. salmonis*.

<i>Locus</i>	<i>Grupo</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>dN</i>	<i>dS</i>	π	<i>DA</i>
<i>DAA</i>	A	97	8	22	0,058	0,019	0,049	0,096
	B	90	9	22	0,058	0,019	0,049	0,095
<i>DAB</i>	A	97	10	42	0,075	0,026	0,064	0,134
	B	92	11	36	0,064	0,027	0,055	0,114

N= número de individuos; A= número de alelos; S= número de sitios segregantes; dN & dS= distancias no-sinónimas y sinónimas promedio entre haplotipos; π = diversidad nucleotídica; DA= diversidad aminoacídica.

5.3.2.2. Análisis de equilibrio poblacional de Hardy-Weinberg

Una vez conocida la composición alélica individual se realizó un análisis de Hardy-Weinberg (HW) (Guo y Thompson, 1992) para ver si nuestras poblaciones origen estaban en equilibrio. Ninguno de los dos grupos utilizados en el desafío estaba en equilibrio HW para los locus *DAA* y *DAB* del MHC clase II (Tabla 5.9). El grupo A presentaba un desequilibrio a causa de un exceso de individuos homocigotos (Fis positivo) y el grupo B un desequilibrio causado por un exceso de heterocigotos (Fis negativo), presentando ambos grupos resultados concordantes entre los dos locus del MHC analizados. Adicionalmente analizamos si los subgrupos de individuos sobrevivientes o mortalidades del ensayo de desafío tenían un comportamiento similar a sus poblaciones origen, dándonos cuenta que esto se cumplió para todos los subgrupos, a excepción de los individuos sobrevivientes del grupo B (B-S) que inesperadamente estaban en equilibrio.

Tabla 5.9.

Prueba de Hardy-Weinberg para el MHC de individuos *S. salar* desafiados con *P. salmonis*. Valores estimados para el locus *DAA* y *DAB* del MHC clase II de los grupos experimentales A y B y los subgrupos de individuos sobrevivientes (S) y mortalidades (M). Se muestra el número (N) total de individuos para cada grupo. Los valores de Fis positivos y negativos indican respectivamente un exceso de individuos homocigotos o heterocigotos para aquellas poblaciones con desviaciones del equilibrio de HW (*valor-p<0,05).

Grupo	N Total	DAA			DAB		
		Valor-p	Fis W&C	Fis R&H	Valor-p	Fis W&C	Fis R&H
A	98	0,0004*	0,075	0,072	0*	0,070	0,069
A-S	25	0,0657	0,032	0,053	0,0054*	0,121	0,121
A-M	73	0,0018*	0,093	0,070	0,0001*	0,059	0,055
B	94	0,0070*	-0,055	-0,038	0,0086*	-0,015	-0,012
B-S	20	0,9352	-0,110	-0,089	0,8955	-0,089	-0,053
B-M	74	0,0110*	-0,049	-0,029	0,0090*	0,000	-0,002

5.3.2.3. Prueba de diferenciación poblacional

Buscando diferencias entre nuestros grupos de peces sobrevivientes y mortalidades de los ensayos de desafío realizamos una prueba exacta de diferenciación poblacional (Raymond y Rousset, 1995a; Raymond y Rousset, 1995b) (Tabla 5.10). Esta prueba había demostrado mayor sensibilidad en la búsqueda de diferencias que la prueba FST (Reynolds *et al.*, 1983), sin embargo fue incapaz de encontrar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los subgrupos de individuos sobrevivientes y mortalidades de nuestros grupos experimentales A y B; ni siquiera aun cuando sus subgrupos fueron comparados en conjunto (A+B).

Tabla 5.10.

Prueba de diferenciación génica exacta entre los peces sobrevivientes y mortalidades de los grupos experimentales A y B desafiados con *P. salmonis*. Se muestran los valores de probabilidad (valor-p) para la prueba G en los locus *DAA* y *DAB* del MHC clase II de la especie *S. salar*.

Locus	Grupo A Valor-p	Grupo B Valor-p	Grupos A+B Valor-p
<i>DAA</i>	0,664	0,177	0,332
<i>DAB</i>	0,785	0,266	0,578

5.3.2.4. Análisis de disimilitud alélica del MHC clase II

Debido a que se conocían los alelos del MHC clase II presentes en cada individuo y la secuencia nucleotídica de ellos, fue posible estimar la diversidad nucleotídica no-sinónima (Ka) para cada individuo por locus, y posteriormente calcular su valor promedio para los subgrupos de individuos sobrevivientes y mortalidades de cada grupo experimental (Figura 5.14). Los valores Ka promedio para el locus *DAA* fueron similares entre los subgrupos de individuos sobrevivientes y mortalidades de los grupos A y B; mientras que para el locus *DAB*, aunque el grupo experimental B pareciera tener una Ka promedio mayor que el grupo A, no se demostraron diferencias significativas entre ambos grupos o entre sus respectivos subgrupos.

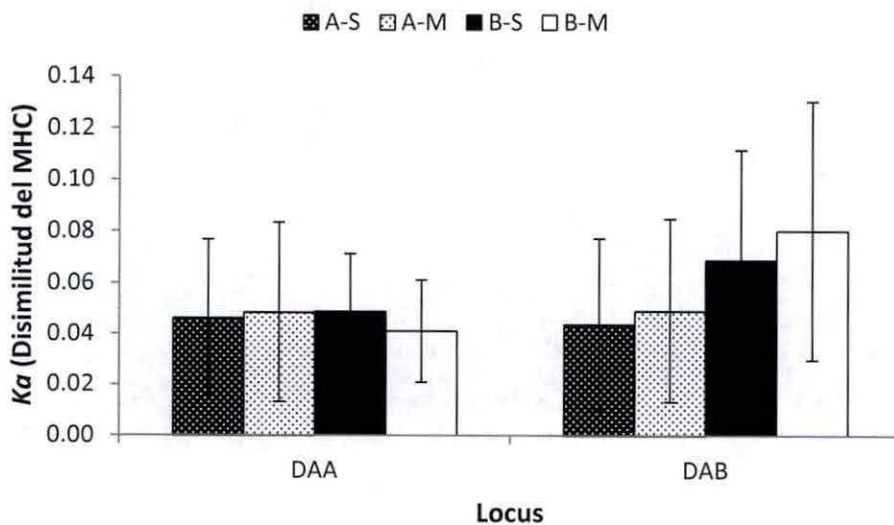


Figura 5.14. Diversidad nucleotídica no-sinónima promedio (Ka) del MHC clase II de *S. salar* desafiados con *P. salmonis*. Se muestran los valores para el locus *DAA* y *DAB* en los peces sobrevivientes del grupo A (A-S), mortalidades del grupo A (A-M), sobrevivientes del grupo B (B-S), y mortalidades del grupo B (B-M). Se indica la desviación estándar.

5.3.2.5. Análisis de frecuencias alélicas y haplotípicas

Primero se analizó las frecuencias alélicas totales en los grupos experimentales A y B (Figura 5.15-A), observando que, aunque la mayoría de los alelos son compartidos entre ambas poblaciones la frecuencia de ellos en cada población es diferente y existen alelos únicos para cada una, como *Sasa-DAB*0101* para el grupo A y *Sasa-DAB*0201* para el grupo B. Así mismo, al analizar las frecuencias haplotípicas nos dimos cuenta que un grupo

de tan solo 10 haplotipos representaba más del 80% de las combinaciones existentes en nuestros grupos A y B (Figura 5.15-B)

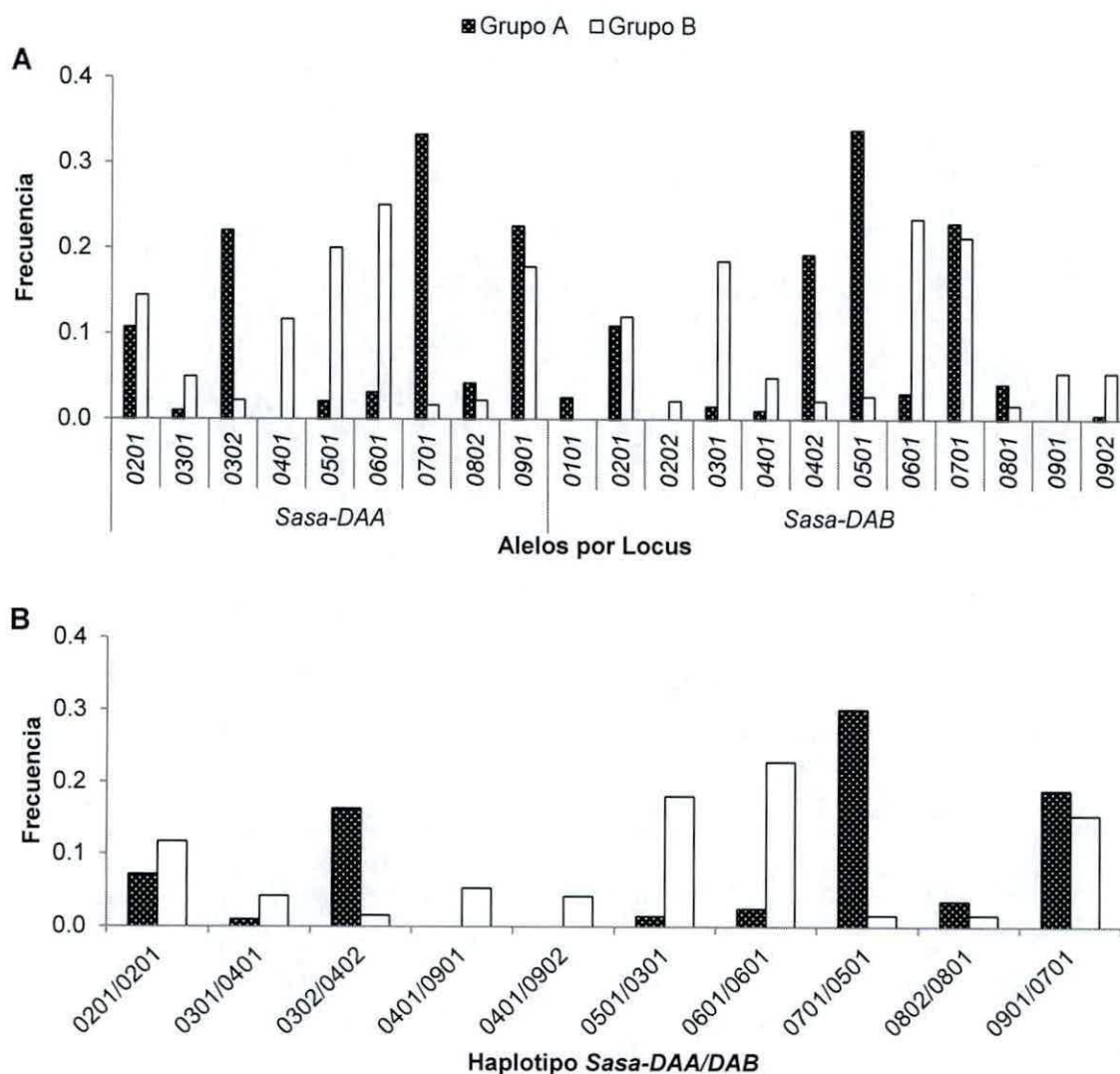


Figura 5.15. Frecuencias alélicas y haplotípicas totales para el MHC Clase II de *S. salar* por grupos experimentales del ensayo de desafío. Se muestra las frecuencias **A.** alélicas y **B.** haplotípicas para los grupos A (barras negras punteadas) y B (barras blancas).

Luego, se compararon las frecuencias alélicas y haplotípicas entre individuos sobrevivientes y mortalidades utilizando el estadístico L_D (Hindar *et al.*, 2004) con un nivel de significancia de 0,05.

Al comparar las frecuencias entre individuos sobrevivientes y mortalidades totales del ensayo de desafío, sin separar por grupo ni tanque experimental, no se encontró diferencias significativas entre estos subgrupos (Figura 5.16).

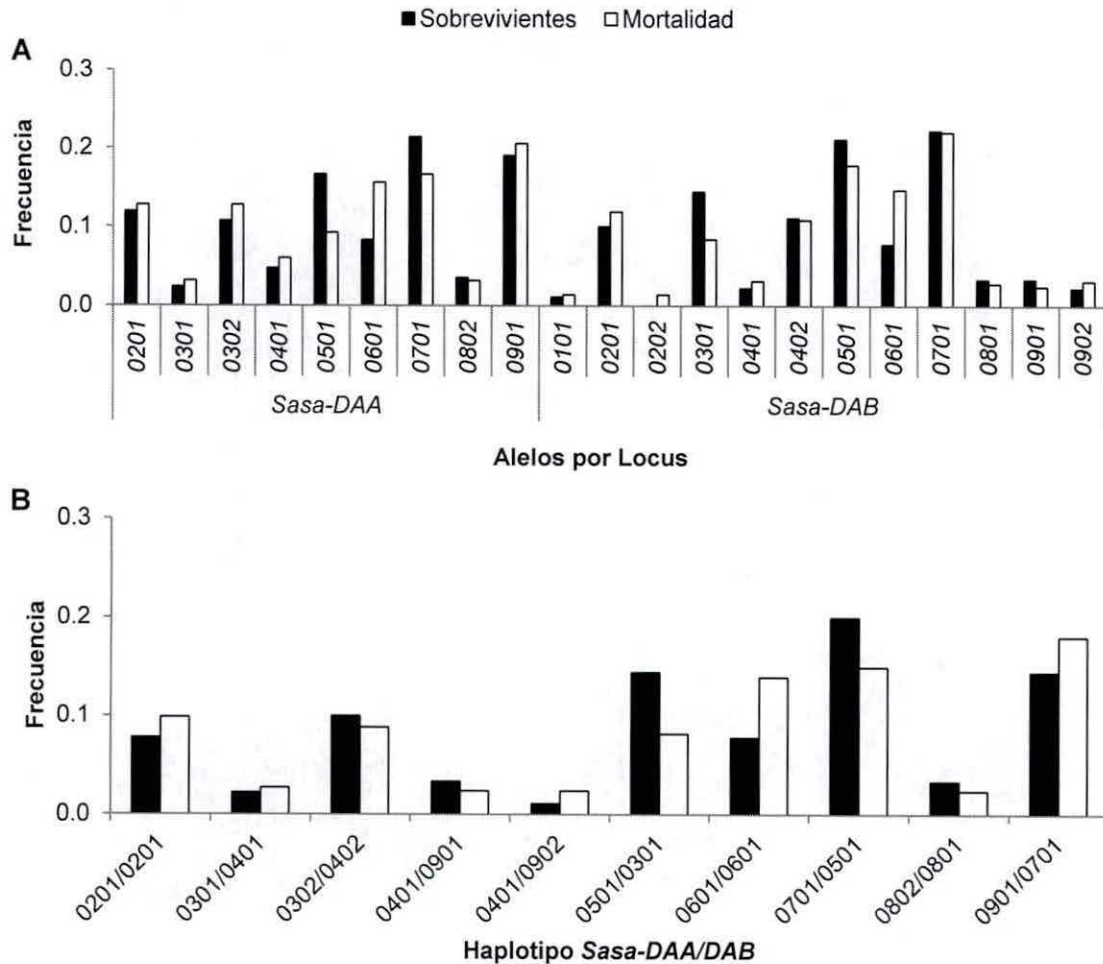


Figura 5.16. Frecuencias alélicas y haplotípicas totales para el MHC Clase II de *S. salar* por subgrupos sobrevivientes y mortalidades del ensayo de desafío. Se muestra las frecuencias **A.** alélicas y **B.** haplotípicas para los individuos sobrevivientes (barras negras) o mortalidades (barras blancas). No se observa asociación a sobrevivencia o mortalidad medido con la prueba estadística L_D .

Posteriormente, al separar los individuos por grupo experimental (A y B) se observaron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas y haplotípicas de los subgrupos sobrevivientes y mortalidades (Figura 5.17). Para el grupo B los alelos *Sasa-DAA**0501 y *Sasa-DAB**0301, estaban mayormente representados en los individuos sobrevivientes

(Figura 5.17-A), y concordantemente, el haplotipo *Sasa-DAA*0501/DAB*0301* presentaba el mismo comportamiento (Figura 5.17-B).

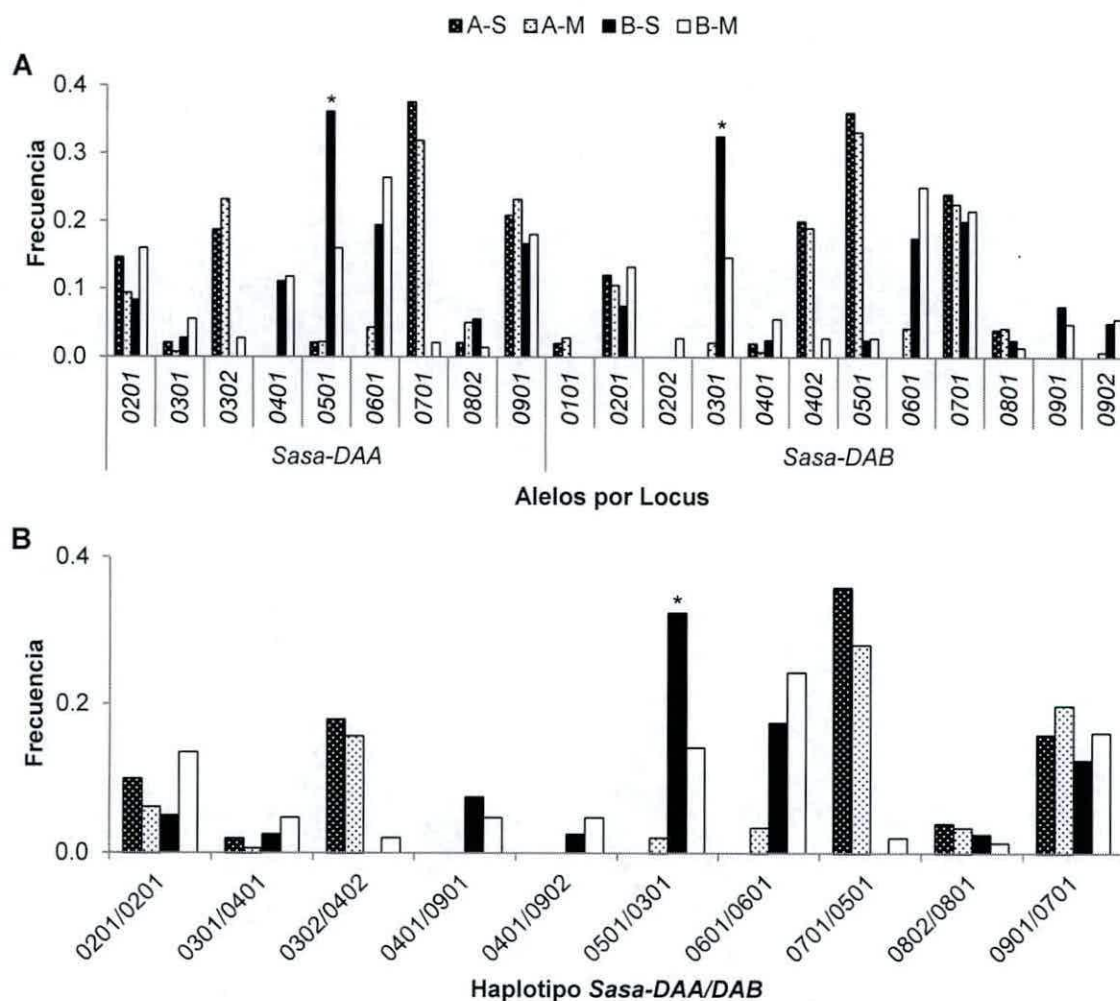


Figura 5.17. Frecuencias alélicas y haplotípicas para el MHC Clase II de *S. salar* por grupo experimentales y estado de salud en el ensayo de desafío. Se muestra las frecuencias **A.** alélicas y **B.** haplotípicas para los individuos sobrevivientes (barras negras) o muertos (barras blancas) dentro de los grupos A (barras punteadas) y B (barras lisas). Se muestra asociación del alelo a la mortalidad o sobrevivencia medido con la prueba estadística L_D (* $p < 0,05$).

Finalmente, al comparar las frecuencias entre los subgrupos sobrevivientes y mortalidades de los tanques experimentales (tanques 1 y 2), se observó que en el tanque 2 nuevamente los alelos *Sasa-DAA*0501* y *Sasa-DAB*0301* estaban significativamente más representados en el grupo de sobrevivientes (Figura 5.18).

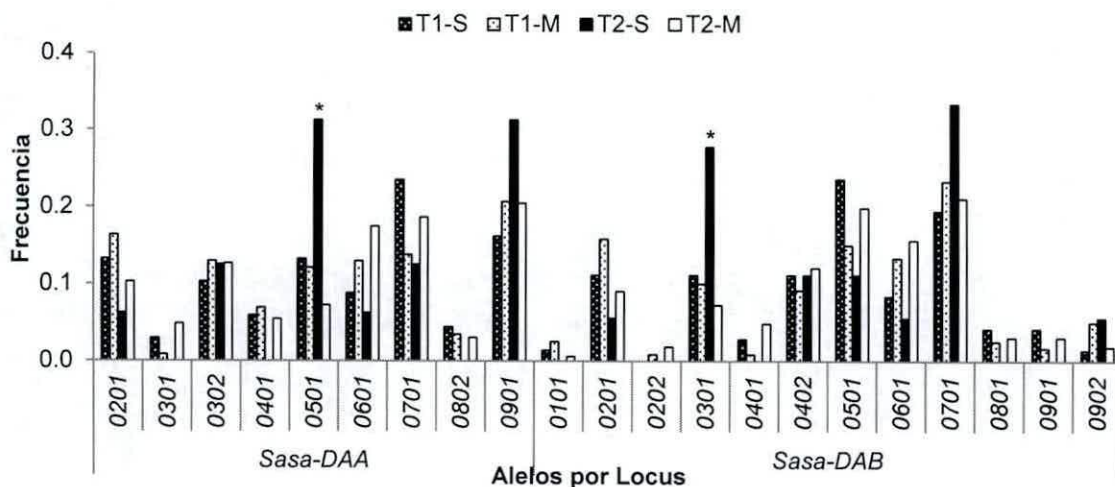


Figura 5.18. Frecuencias alélicas para el MHC Clase II de *S. salar* por tanque experimental en el ensayo de desafío. Se comparan los individuos sobrevivientes (barras negras) o muertos (barras blancas) para los tanques 1 (barras punteadas) y 2 (barras lisas). Se muestra asociación del alelo a la mortalidad o sobrevivencia medido con la prueba estadística L_D (* $p < 0,05$).

5.3.3. DISCUSIÓN

A partir de los análisis del MHC de individuos *Salmo salar* (*S. salar*) desafiados con *Piscirickettsia salmonis* (*P. salmonis*) se observó que existía una diferencia significativa entre la composición del MHC de los locus *DAA* y *DAB* de individuos sanos y enfermos, pudiéndose encontrar alelos de ambos locus asociados con resistencia a la bacteria. El haber aumentado el número de muestras nos permitió fortalecer el análisis estadístico posterior y obtener conclusiones valederas (Edwards *et al.*, 2005). Sin embargo, y tal como discute Grimholt *et al.* (2009), la falta de un grupo experimental estandarizado evita la obtención de resultados reproducibles, y en nuestro caso, aunque obtuvimos nuevos e interesantes resultados, no pudimos corroborar a través de los ensayos de desafío lo observado a partir de muestras de centros de cultivo.

Un primer problema en la realización de estos ensayos fue que a pesar de que ambos grupos experimentales presentaron similares niveles de mortalidad total (~75%), éstas variaron entre los dos tanques utilizados para el experimento, con el tanque 2 presentando niveles de mortalidad muy elevados (90%), que provocaron que el número de individuos

sobrevivientes al ensayo fuera muy inferior al de mortalidades, sesgando así el análisis de los datos. Esta diferencia entre ambos tanques puede deberse a que las condiciones de mantenimiento en el segundo tanque no fueron las óptimas (alimentación, temperatura, pH, turbulencia, etc), provocando stress en los individuos, lo cual es sabido puede aumentar el nivel de mortalidades cuando se está en presencia de un agente patógeno como *P. salmonis* (Fryer y Hedrick, 2003).

Los análisis iniciales de diversidad, así como los posteriores análisis de frecuencias alélicas demostraron que la distribución y diversidad alélica eran disímiles entre nuestras poblaciones experimentales, siendo dichas diferencias más notorias para el locus *DAB*. Sin embargo, aunque el grupo experimental B presentó un número de alelos mayor al del grupo A, éste último presentó valores de diversidad totales similares o superiores al del grupo B, equiparando finalmente los niveles de polimorfismo (Tabla 5.8). Además, cabe destacar que los valores de diversidad total encontrados fueron muy similares a los encontrados en centros de cultivo y en poblaciones naturales de *S. salar* (Landry y Bernatchez, 2001; Consuegra *et al.*, 2005a), con el locus *DAB* más diverso que el *DAA*.

Los resultados del análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) permitieron darnos cuenta que nuestros grupos experimentales, provenientes de dos familias diferentes, poseían frecuencias alélicas en su MHC clase II que estaban en discordancia con el esperado equilibrio de HW. El grupo A poseía un exceso de individuos homocigotos y el grupo B de heterocigotos, lo cual se podría adjudicar por un lado al origen de cultivo de las familias originales, las cuales podrían estar limitadas en su apareamiento natural, provocando una desviación de las frecuencias esperadas en el equilibrio (Guo y Thompson, 1992); o en el caso del grupo A, a un origen mezclado de la población utilizada que provocaría un déficit de heterocigotos (Wahlund, 1928). Debido a este desequilibrio de HW en las poblaciones origen, fue imposible verificar si la heterocigosis del MHC constituía una ventaja adaptativa *per sé* en nuestras poblaciones como es postulado por una de las hipótesis de selección natural dirigida por patógenos (Penn *et al.*, 2002), sin embargo dicho desequilibrio podría haber influenciado el análisis de asociación ya que los únicos dos alelos asociados posteriormente con resistencia a *P. salmonis* provenían del grupo B en el cual se encontró un exceso de heterocigosis.

A pesar de que en los análisis de las muestras provenientes de centros de cultivo habíamos detectado diferencias significativas entre peces *S. salar* sanos y enfermos utilizando dos pruebas de diferenciación génica, en este ensayo fuimos incapaces de encontrar diferencias entre peces sobrevivientes o mortalidades cuando analizamos cada grupo experimental por separado o en conjunto utilizando la prueba menos estricta. Esto puede deberse a que esta prueba de diferenciación exacta (Raymond y Rousset, 1995a) considera sólo la distribución de frecuencias alélicas totales y no la frecuencia de cada alelo en particular, y cómo pudimos ver en nuestros gráficos (Figura 5.17-A), aunque ciertos alelos están más representados en uno u otro subgrupo, en general su distribución es uniforme entre sobrevivientes y mortalidades.

El análisis de disimilitud alélica del MHC (K_a) no reveló diferencias entre los valores promedio de los subgrupos de individuos sobrevivientes o mortalidades del ensayo de desafío, concordando con los resultados obtenidos desde centros de cultivo para *S. salar*, pero contrastando con la tendencia observada en dichos análisis y en estudios anteriores donde al menos para el locus *DAA* de *S. salar* se había asociado una alta disimilitud alélica con la resistencia al parásito *Anisakis sp.* (Consuegra y Garcia de Leaniz, 2008). De esto se podría deducir que solo el poseer una alta disimilitud alélica no confiere una ventaja adaptativa en *S. salar* contra *P. salmonis*, y que por ende podrían ser determinados alelos en particular los que podrían estar confiriendo esta ventaja (Takahata y Nei, 1990), tal como se demostró en análisis posteriores.

Quizá uno de los resultados más interesantes de nuestro estudio fue el descubrir que existen haplotipos determinados para los locus *DAA/DAB* que se encuentran repetidos dentro de las poblaciones en estudio, con un grupo de ellos representando más del 80% de la población. Estos haplotipos sugieren una heredabilidad conjunta de los alelos de los locus *DAA* y *DAB*, constituyendo una evidencia para la teoría de ligamiento entre ambos locus en *S. salar* propuesta anteriormente (Stet *et al.*, 2002). Este ligamiento ya ha sido probado en teleósteos para zebrafish, encontrándose que los genes de clase II alfa y beta se ubican cercanos en el cromosoma 8 (Sambrook *et al.*, 2005), sin embargo, para poder decir que efectivamente ocurre lo mismo en *S. salar* tendría que secuenciarse toda la región cercana a dichos genes.

Finalmente, si bien los análisis comparativos de las frecuencias alélicas y haplotípicas entre individuos sobrevivientes y mortalidades totales del ensayo de desafío no lograron encontrar

diferencias significativas entre ambos grupos; se obtuvieron interesantes y concordantes resultados cuando se realizó el análisis de forma separada tanto por grupo como por tanque experimental. En ambos análisis los alelos *Sasa-DAA*0501*, *Sasa-DAB*0301* y el haplotipo *Sasa-DAA*0501/DAB*0301*, se encontraban significativamente más representados en el subgrupo de individuos sobrevivientes, por lo que dichos alelos estarían fuertemente asociados a la resistencia al patógeno *P. salmonis*. Y aunque estos alelos no se encontraban en bajas proporciones en la población total, tal como se esperaba bajo la teoría de ventaja de los alelos raros (Takahata y Nei, 1990), su presencia conjunta en los individuos sobrevivientes hace suponer que dicho haplotipo crea una estructura de PBR muy apta para la presentación antigénica de los péptidos provenientes de *P. salmonis*, y con ello un mecanismo de defensa efectivo ante el patógeno.

En resumen, se puede decir que los ensayos de desafío controlado constituyen una buena herramienta para realizar estudios sobre la resistencia a enfermedades, y que en nuestro caso nos permitieron encontrar alelos y haplotipos significativamente asociados con la resistencia a la bacteria *P. salmonis* en la especie *S. salar*. Adicionalmente, el alto número de ejemplares utilizados provenientes de familias conocidas, nos permitió descubrir la existencia de haplotipos del MHC clase II alfa y beta establecidos en la población que sugieren un ligamiento entre los genes de los loci *DAA* y *DAB* del MHC de *S. salar*.

6. CONCLUSIONES FINALES

En esta Tesis, hemos caracterizado el MHC de las poblaciones de peces *S. salar*, *O. mykiss* y *O. kisutch* cultivados en Chile. Al hacer un análisis transversal de todos los temas analizados y discutidos, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- 1.- El grado de diversidad del MHC en las poblaciones de cultivo confinado es alto y similar al reportado para poblaciones naturales.
- 2.- El análisis del MHC clase I y II de salmónidos muestra diferencias significativas en su complejidad. El MHC clase I presenta un locus clásico UBA y múltiples loci no-clásicos, todos polimórficos. El MHC clase II a pesar de la existencia de loci no-clásicos, presenta altos grados de polimorfismo para los loci clásicos DAA y DAB.
- 3.- El análisis evolutivo del MHC clase II nos indica que tanto la recombinación como la selección positiva son los principales gestores de diversidad para la cadena alfa y beta; contrario a lo reportado para el MHC clase I, donde la mutación cobra relevancia.
- 4.- Como era de esperar, la mayor parte de la diversidad del MHC se concentra en la región de unión de péptido (PBR), directamente involucrada en la presentación antigénica.
- 5.- Independiente que se analicen genes en peces de cultivo naturalmente infectados o desafiados en forma controlada con el patógeno *P. salmonis*, es posible identificar alelos significativamente asociados con resistencia y/o susceptibilidad a este patógeno.
- 6.- La concordancia entre resultados y su validación estadística permite concluir que el MHC clase II constituye un buen marcador en la identificación y selección de poblaciones de salmónidos susceptibles o resistentes a *P. salmonis*.

7. PROYECCIÓN FUTURA Y RECOMENDACIONES

Esta tesis se encuentra enmarcada dentro del proyecto CORFO Innova: “Selección de alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) para el diseño de productos que indiquen tanto resistencia como susceptibilidad a *P. salmonis* en especies salmónidas en cultivo”, por lo que el objetivo final es la obtención de un producto que nos permita identificar y seleccionar especímenes reproductores capaces de producir una progenie resistente al patógeno *Piscirickettsia salmonis*.

Los resultados obtenidos durante la tesis nos permitieron identificar los posibles alelos del MHC que podrían ser utilizados como marcadores de resistencia o susceptibilidad en las tres especies salmónidas estudiadas, por lo que sólo queda por delante establecer la metodología a utilizar para detectar dichos alelos en las poblaciones problema. Para ello hemos propuesto tres posible metodologías: un procedimiento DGGE similar al utilizado durante la tesis; el diseño de sondas Taqman específicas para cada alelo a identificar; o el diseño y producción de anticuerpos específicos contra los mismos alelos (Figura 7.1)

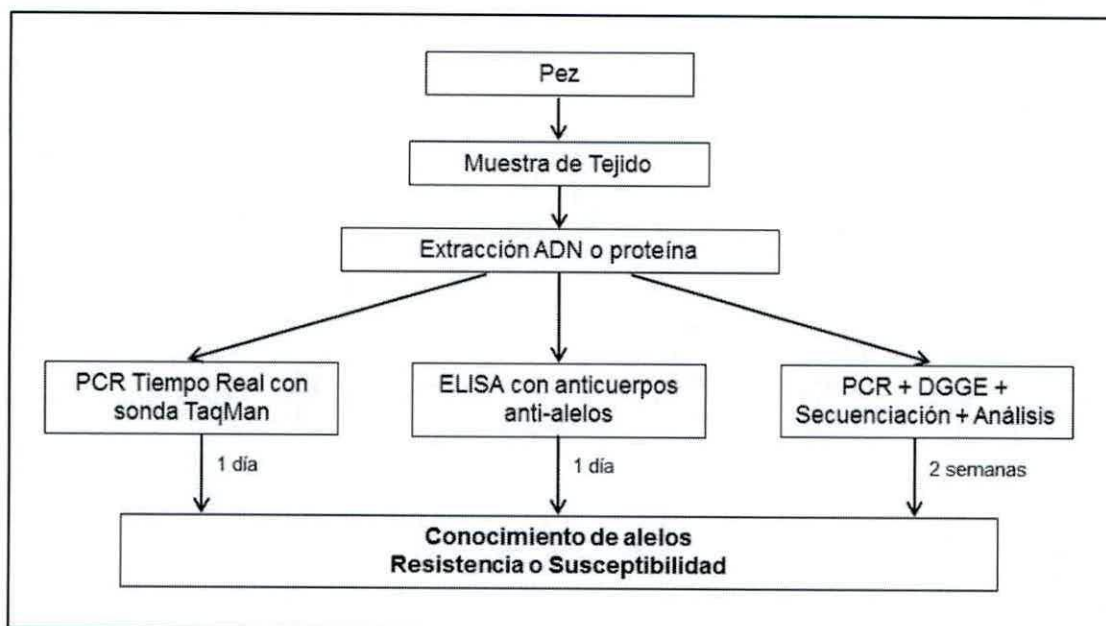


Figura 7.1. Posibles metodologías a implementar en la identificación de individuos resistentes o susceptibles a *P. salmonis* utilizando el MHC como marcador.

La decisión sobre la metodología a utilizar dependerá de las tecnologías existentes en el laboratorio que prestará el servicio, sin embargo, cada una individualmente presenta sus ventajas y desventajas. La metodología DGGE ya está estandarizada en nuestro laboratorio, contando con todos los equipos necesarios; sin embargo, es muy laboriosa y de costo elevado en comparación con las otras dos. La realización de una prueba de ELISA es muy fácil y estandarizable para cualquier laboratorio, cuando se posee un lector de placas de ELISA, y sólo requeriría del diseño y producción previa de una batería de anticuerpos específicos para nuestros alelos. Finalmente, la tecnología de sondas TaqMan se presenta como una alternativa a DGGE cuando ya se conocen las secuencias a identificar, diseñándose sondas específicas contra cada alelo que se agregan a la reacción de PCR emitiendo una señal que es detectable en un equipo de PCR en tiempo real. Estas sondas son capaces de identificar cambios sutiles a nivel nucleotídico y su costo es muy inferior al de un anticuerpo, por lo que sugiero sería la mejor tecnología a utilizar en la identificación de individuos resistentes o susceptibles a *P. salmonis*.

8. NOMENCLATURA

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIC: Criterio de información de Akaike. $AIC = -2 (\ln l) + 2$ (número de parámetros libres del modelo) (Del inglés Akaike Information Criteria).

APC: Célula presentadora de antígenos (Del inglés Antigen Presenting Cell).

Arlequin: Programa para el análisis de datos genéticos de poblaciones.

BEB: Método Bayes Emprirical Bayes utilizado en la identificación de sitios bajo selección positiva en el programa PAML.

Bioedit: Programa para edición de alineamientos de secuencias.

BP: Sitio de recombinación identificado por el análisis GARD (Del inglés Breaking Point).

CODEML: Parte del programa PAML. Realiza análisis de máxima probabilidad de secuencias utilizando modelos de sustitución de codones.

ClustalW: Programa para alineamiento múltiple de secuencias.

DA: Diversidad aminoacídica.

DAA: Locus clásico del MHC clase II de salmónidos codificando el gen de la cadena alfa.

DAB: Locus clásico del MHC clase II de salmónidos codificando el gen de la cadena beta.

DGGE: Electroforesis en Geles de Gradiente Desnaturante (Del inglés Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)

dN: Distancia no-sinónima promedio entre secuencias.

DnaSP: Programa de análisis de polimorfismo de secuencias nucleotídicas (Del inglés DNA Sequence Polymorphism)

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

dS: Distancia sinónima promedio entre secuencias.

FEL: Método probabilístico de efectos fijos utilizado para identificar sitios bajo selección positiva o negativa (Del inglés Fixed Effects Likelihood).

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína (Del inglés Fluorescein Isothiocyanate).

FOB: Se refiere al valor económico de la mercancía una vez puesta en el barco hacia su destino (Del Inglés Free on Board).

FST: Análisis de distancias genéticas entre secuencias.

GARD: Método de Algoritmo genético para la detección de recombinación (Del inglés Genetic Algorithm Recombination Detection).

Genepop: Paquete de programas para el análisis genético de poblaciones.

HLA: Denominación de los genes del MHC humano (Del inglés Human Leukocyte Antigen).

HW: Principio de Hardy-Weinberg.

HYPHY: Paquete de programas de análisis de máxima probabilidad de datos genéticos (Del inglés Hypothesis testing using Phylogenies).

Ka: tasa de sustituciones no-sinónimas entre secuencias.

IFAT: Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (Del inglés Immunofluorescence Antibody Test)

IFOP: Instituto de Fomento pesquero (Chile).

IHN: Necrosis hematopoyética infecciosa causada por virus (Del inglés Infectious hematopoietic necrosis)

IPN: Necrosis pancreática infecciosa causada por virus (Del inglés Infectious Pancreatic Necrosis).

ISA: Anemia infecciosa del salmón causada por virus (Del inglés Infectious Salmon Anemia).

Ig: Inmunoglobulina.

L_D : Estadístico para análisis de distribución alélica entre poblaciones.

LDhat: Paquete de programas para el análisis de recombinación genética poblacional.

Lk: Probabilidad (Del inglés Likelihood).

LMP: Subunidad del proteosoma (Del inglés Low Molecular mass Polypeptide).

LRT: Prueba de tasas de probabilidad. $LRT=2\Delta\ln l$ (Del inglés Likelihood Ratio Test).

MAS: Selección asistida por marcadores (Del inglés Marker-assisted Selection).

MEGA: Programa de análisis de alineamientos de secuencia (Del inglés Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (Del inglés Major Histocompatibility Complex).

MK: Prueba de neutralidad de McDonald y Kreitman.

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (Del inglés National Center for Biotechnology Information).

Onki: Abreviación de *Oncorhynchus kisutch*.

Onmy: Abreviación de *Oncorhynchus mykiss*.

PAML: Programa de análisis filogenético por probabilidad máxima (Del inglés Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood).

pb: Pares de bases nucleotídicas.

PBR: Región de unión de péptidos (Del inglés Peptide Binding Region).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Del inglés Polymerase Chain Reaction).

PDB: Base de datos proteica (Del inglés Protein Data Base).

PsmB: Subunidad B del Proteosoma.

π : Diversidad nucleotídica.

QTL: Loci genético cuantitativo de un rasgo (Del inglés Quantitative Trait Loci).

RE: Retículo Endoplásmico.

REL: Método probabilístico de efectos al azar utilizado para identificar sitios bajo selección positiva o negativa (Del inglés Random Effects Likelihood).

RFLPs: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (Del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism).

Rm: Número mínimo de eventos de recombinación estimado por DnaSP.

S: Número de sitios segregantes.

Sasa: Abreviación de *Salmo salar*.

SRS: Síndrome Rickettsial Salmónido.

TAE: Buffer Tris-Acetato-EDTA.

TAP: transportador asociado al procesamiento de antígenos (Del inglés Transported associated with Antigen processing).

TCR: Receptor de células T (Del inglés T Cell Receptor).

TSP: Polimorfismo *trans*-especie (Del inglés Trans-Species Polymorphism).

UBA: Locus clásico del MHC clase I de salmónidos codificando el gen de la cadena alfa.

UCA, ULA, UFA, ULA, UEA: Locus no-clásicos y pseudogenes del MHC clase I

VHS: Septicemia hemorrágica viral (Del inglés Viral hemorrhagic septicaemia).

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A., Lichtman A., Pillai S. (Eds.) 2008. Cellular and Molecular Immunology.
- Aguilar A. y Garza J.C., 2006. A comparison of variability and population structure for major histocompatibility complex and microsatellite loci in California coastal steelhead (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Molecular Ecology*. 15: 923-937.
- Akaike H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control*. 19: 716-723.
- Almendras F., Fuentealba I., Jones S., Markham F., Spangler E., 1997. Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases*. 20: 409-418.
- Anisimova M., Nielsen R., Yang Z., 2003. Effect of recombination on the accuracy of the likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites. *Genetics*. 164: 1229-1236.
- Aoyagi K., Dijkstra J.M., Xia C., Denda I., Ototake M., Hashimoto K., Nakanishi T., 2002. Classical MHC class I genes composed of highly divergent sequence lineages share a single locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Immunology*. 168: 260-273.
- Aqua, Estadísticas de Acuicultura y Pesca. Enero-Diciembre 2006. Revista Aqua. TechnoPress, Chile, 2007a.
- Aqua, Salud para salmónidos: Disponibilidad de vacunas para agua dulce. . Revista Aqua. Technopress, Chile, 2007b.
- Araneda C., Lam N., Díaz N., Cortez S., Pérez C., Neira R., Iturra P., 2009. Identification, development, and characterization of three molecular markers associated to spawning date in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*. 296: 21-26.
- Arkoosh M.R. y Kaattari S.L., 1991. Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Developmental & Comparative Immunology*. 15: 279-293.
- Arkush K.D., McBride A.M., Mendonca H.L., Okihiro M.S., Andree K.B., Marshall S., Henriquez V., Hedrick R.P., 2005. Genetic characterization and experimental pathogenesis of *Piscirickettsia salmonis* isolated from white seabass *Atractoscion nobilis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 63: 139-149.
- Barroso R., Wheeler P., LaPatra S., Drew R., Thorgaard G., 2008. QTL for IHNV resistance and growth identified in a rainbow (*Oncorhynchus mykiss*)× Yellowstone cutthroat (*Oncorhynchus clarki bouvieri*) trout cross. *Aquaculture*. 277: 156-163.
- Bartl S., Baltimore D., Weissman I.L., 1994. Molecular evolution of the vertebrate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91: 10769-10770.
- Belich M., Madrigal J., Hildebrand W., Zemmour J., Williams R., Luz R., Petzl-Erler M., Parham P., 1992. Unusual HLA-B alleles in two tribes of Brazilian Indians. *Nature*. 357: 326-329.

- Bell J., Estess P., John T., Saiki R., Watling D., Erlich H., McDevitt H., 1985. DNA Sequence and Characterization of Human Class II Major Histocompatibility Complex ss Chains from the DR1 Haplotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 82: 3405-3409.
- Bernatchez L. y Landry C., 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology*. 16: 363-377.
- Bingulac-Popovic J., Figueroa F., Sato A., Talbot W., Johnson S., Gates M., Postlethwait J., Klein J., 1997. Mapping of Mhc class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio*. *Immunogenetics*. 46: 129-134.
- Birkbeck T.H., Griffen A.A., Reid H.I., Laidler L.A., Wadsworth S., 2004. Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells. *Infection and immunity*. 72: 3693-3694.
- Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennet W.A.S., Strominger J.L., Wiley D.C., 1987a. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*. 329: 512.
- Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C., 1987b. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 329: 506-512.
- Bonneaud C., Pérez-Tris J., Federici P., Chastel O., Sorci G., 2006. Major histocompatibility alleles associated with local resistance to malaria in a passerine. *Evolution*. 383-389.
- Bontrop R.E., Otting N., de Groot N.G., Doxiadis G.G.M., 1999. Major histocompatibility complex class II polymorphisms in primates. *Immunological Reviews*. 167: 339-350.
- Branson E. y Nieto Díaz-Muñoz D., 1991. Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. *Journal of fish diseases*. 14: 147-156.
- Bravo S., 1994. Piscirickettsiosis in freshwater. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 14: 137-138.
- Bravo S. y Campos M., 1989a. Coho salmon syndrome in Chile. *FHS/AFS Newsletter*. 17: 3.
- Bravo S. y Campos M., 1989b. Síndrome del salmón Coho. *Chile Pesquero*. 54: 47-48.
- Bravo S. y Midtlyng P.J., 2007. The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999-2003. *Aquaculture*. 270: 36-42.
- Briles W., Briles R., Taffs R., Stone H., 1983. Resistance to a malignant lymphoma in chickens is mapped to subregion of major histocompatibility (B) complex. *Science*. 219: 977.
- Brocklebank J., Evelyn T., Speare D., Armstrong R., 1993. Rickettsial septicemia in farmed Atlantic and chinook salmon in British Columbia: clinical presentation and experimental transmission. *The Canadian Veterinary Journal*. 34: 745.
- Brown J.H., Jardetzky T., Saper M.A., Samraoui B., Bjorkman P.J., Wiley D.C., 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*. 364: 33.
- Cabello F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. 8: 1137-1144.

- Cárdenas C., Bidon-Chanal A., Conejeros P., Arenas G., Marshall S., Luque F.J., 2010. Molecular modeling of class I and II alleles of the major histocompatibility complex in *Salmo salar*. *Journal of computer-aided molecular design*. 1-17.
- Clarke K., 1993. Non parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*. 18: 117-143.
- Conejeros P., Phan A., Power M., Alekseyev S., O'Connell M., Dempson B., Dixon B., 2008. MH class II polymorphism in local and global adaptation of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Immunogenetics*. 60: 325-337.
- Consortium T.M.S., 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*. 401: 921-923.
- Consuegra S. y Garcia de Leaniz C., 2008. MHC-mediated mate choice increases parasite resistance in salmon. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 275: 1397-1403.
- Consuegra S., Megens H.J., Leon K., Stet R.J.M., Jordan W.C., 2005a. Patterns of variability at the major histocompatibility class II alpha locus in Atlantic salmon contrast with those at the class I locus. *Immunogenetics*. 57: 16-24.
- Consuegra S., Megens H.J., Schaschl H., Leon K., Stet R.J.M., Jordan W.C., 2005b. Rapid Evolution of the MH Class I Locus Results in Different Allelic Compositions in Recently Diverged Populations of Atlantic Salmon. *Molecular Biology and Evolution*. 22: 1095-1106.
- Croisetière S., Tarte P., Bernatchez L., Belhumeur P., 2008. Identification of MHC class II resistance/susceptibility alleles to *Aeromonas salmonicida* in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Molecular Immunology*. 45: 3107-3116.
- Cvitanich J. y Garate N., 1991. The isolation of a rickettsia like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *Journal of fish diseases*. 14: 121-145.
- Dekkers J.C.M., 2004. Commercial application of marker-and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *Journal of Animal Science*. 82: E313-328.
- Dijkstra J.M., Katagiri T., Hosomichi K., Yanagiya K., Inoko H., Ototake M., Aoki T., Hashimoto K., Shiina T., 2007. A third broad lineage of major histocompatibility complex (MHC) class I in teleost fish; MHC class II linkage and processed genes. *Immunogenetics*. 59: 305-321.
- Dijkstra J.M., Kiryu I., Yoshiura Y., Kumánovics A., Kohara M., Hayashi N., Ototake M., 2006. Polymorphism of two very similar MHC class Ib loci in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics*. 58: 152-167.
- Dionne M., Miller K.M., Dodson J.J., Bernatchez L., 2009. MHC standing genetic variation and pathogen resistance in wild Atlantic salmon. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364: 1555-1565.
- Dixon B., van Erp S., Rodrigues P., Egberts E., Stet R., 1995. Fish major histocompatibility complex genes: an expansion. *Developmental and Comparative Immunology*. 19: 109-133.
- Dorschner M., Duris T., Bronte C., Burnham Curtis M., Phillips R., 2000. High levels of MHC class II allelic diversity in lake trout from Lake Superior. *Journal of Heredity*. 91: 359-363.

- Edwards B.J., Haynes C., Levenstien M.A., Finch S.J., Gordon D., 2005. Power and sample size calculations in the presence of phenotype errors for case/control genetic association studies. *BMC genetics*. 6: 18.
- Edwards S.V. y Hedrick P.W., 1998. Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution*. 13: 305-311.
- Egea R., Casillas S., Barbadilla A., 2008. Standard and generalized McDonald-Kreitman test: a website to detect selection by comparing different classes of DNA sites. *Nucleic Acids Research*. 36: W157-162.
- Elston R. y Forthofer R., 1977. Testing for Hardy-Weinberg Equilibrium in small samples. *Biometrics*. 33: 536-542.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*. 1: 47.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783.
- Ferguson M. y Danzmann R., 1999. Inter-strain differences in the association between mitochondrial DNA haplotype and growth in cultured Ontario rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 178: 245-252.
- Flajnik M., Ohta Y., Namikawa-Yamada C., Nonaka M., 1999. Insight into the primordial MHC from studies in ectothermic vertebrates. *Immunological Reviews*. 167: 59.
- Flores-Villanueva P., Hendel H., Caillat-Zucman S., Rappaport J., Burgos-Tiburcio A., Bertin-Maghit S., Ruiz-Morales J., Teran M., Rodriguez-Tafur J., Zagury J., 2003. Associations of MHC ancestral haplotypes with resistance/susceptibility to AIDS disease development. *The Journal of Immunology*. 170: 1925.
- Fryer J. y Hedrick R., 2003. *Piscirickettsia salmonis*: a Gram negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of fish diseases*. 26: 251-262.
- Fryer J. y Lannan C., 1996. Rickettsial infections of fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 6: 3-13.
- Fryer J., Lannan C., Garcés L., Larenas J., Smith P., 1990. Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathology*. 25: 107-114.
- Fryer J., Lannan C., Giovannoni S., Wood N., 1992. *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 42: 120-126.
- Fryer J.L. y Muel M.J., 1997. The rickettsia: an emerging group of pathogens in fish. *Emerging Infectious Diseases*. 3: 137-144.
- Fu Y. y Li W., 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. 133: 693-709.
- Gaggero A., Castro H., Sandino A., 1995. First isolation of *Piscirickettsia salmonis* from coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during the freshwater stage of their life cycle. *Journal of fish diseases*. 18: 277-280.
- Galilea P., La salmonicultura está en franca recuperación. *Tribuna*. Surlink, Osorno, 2011.

- Godoy M.G., Aedo A., Kibenge M.J.T., Groman D.B., Yason C.V., Grothusen H., Lisperguer A., Calbucura M., Avendaño F., Imilán M., 2008. First detection, isolation and molecular characterization of infectious salmon anaemia virus associated with clinical disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chile. *BMC Veterinary Research*. 4: 28.
- Gómez D., Conejeros P., Marshall S., Consuegra S., 2010. MHC evolution in three salmonid species: a comparison between class II alpha and beta genes. *Immunogenetics*. 62: 531-542.
- Gómez F., Henríquez V., Marshall S., 2009. Evidencia adicional de la naturaleza intracelular facultativa del patógeno bacteriano de peces *Piscirickettsia salmonis*. *Arch. med. vet.* 41: 261-267.
- Graser R., O'hUigin C., Vincek V., Meyer A., Klein J., 1996. Trans-species polymorphism of class II Mhc loci in danio fishes. *Immunogenetics*. 44: 36-48.
- Grimholt U., 1997. Transport-associated proteins in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics*. 46: 213-221.
- Grimholt U., Drabløs F., Jørgensen S., Høyheim B., Stet R., 2002. The major histocompatibility class I locus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): polymorphism, linkage analysis and protein modelling. *Immunogenetics*. 54: 570-581.
- Grimholt U., Getahun A., Hermsen T., Stet R.J.M., 2000. The major histocompatibility class II alpha chain in salmonid fishes. *Developmental and Comparative Immunology*. 24: 751-763.
- Grimholt U., Hordvik I., Fosse V.M., Olsaker I., Endresen C., Lie Ø., 1993. Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics*. 37: 469-473.
- Grimholt U., Johansen R., Smith A., 2009. A review of the need and possible uses for genetically standardized Atlantic salmon (*Salmo salar*) in research. *Laboratory animals*. 43: 121-126.
- Grimholt U., Larsen S., Nordmo R., Midtlyng P., Kjoeglum S., Storset A., Saebø S., Stet R., 2003a. MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci. *Immunogenetics*. 55: 210-219.
- Günther E. y Walter L., 2001. The major histocompatibility complex of the rat (*Rattus norvegicus*). *Immunogenetics*. 53: 520-542.
- Guo S.W. y Thompson E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48: 361-372.
- Hall T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hansen J., Strassburger P., Thorgaard G., Young W., Du Pasquier L., 1999. Expression, linkage, and polymorphism of MHC-related genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of immunology*. 163: 774.
- Harf R. y Sommer S., 2005. Association between major histocompatibility complex class II DRB alleles and parasite load in the hairy-footed gerbil, *Gerbillurus paeba*, in the southern Kalahari. *Molecular Ecology*. 14: 85-91.
- Harstad H., Lukacs M., Bakke H., Grimholt U., 2008. Multiple expressed MHC class II loci in salmonids; details of one non-classical region in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*. 9: 193.

- Hashimoto K., Nakanishi T., Kurosawa Y., 1990. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 87: 6863-6867.
- Hedrick P.W., 2002. Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evolution*. 56: 1902-1908.
- Hill A.V.S., Allsopp C.E.M., Kwiatowski D., Anstey N.M., Twumasi P., Rowe P.A., 1991. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*. 352: 595-600.
- Hindar K., Tufto J., Sættem L., Balstad T., 2004. Conservation of genetic variation in harvested salmon populations. *ICES Journal of Marine Science*. 61: 1389-1397.
- Hordvik I., Grimholt U., Fosse V.M., Lie Ø., Endresen C., 1993. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the MHC class II β chain in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Immunogenetics*. 37: 437-441.
- Horton R., Wilming L., Rand V., Lovering R., Bruford E., Khodiyar V., Lush M., Povey S., Talbot C., Wright M., 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics*. 5: 889-899.
- Hudson R. y Kaplan N., 1985. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics*. 111: 147-164.
- Hughes A.L., Hughes M.K., Howell C.Y., Nei M., 1994. Natural selection at the class II major histocompatibility complex loci of mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 345: 359-367.
- Hughes A.L. y Nei M., 1988. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*. 335: 167-170.
- Hughes A.L. y Nei M., 1989. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 86: 958-962.
- Hughes A.L. y Yeager M., 1998. Natural selection at the major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annual Review of Genetics*. 32: 415-435.
- Hughes C., Miles S., Walbroehl J., 2008. Support for the minimal essential MHC hypothesis: a parrot with a single, highly polymorphic MHC class II B gene. *Immunogenetics*. 60: 219-231.
- Hurt P., Walter L., Sudbrak R., Klages S., Muller I., Shiina T., Inoko H., Lehrach H., Günther E., Reinhardt R., Himmelbauer H., 2004. The Genomic Sequence and Comparative Analysis of the Rat Major Histocompatibility Complex. *Genome Research*. 14: 631-639.
- Jones S.R.M., Markham R.J., Groman D.B., Cusack R.R., 1998. Virulence and antigenic characteristics of a cultured Rickettsiales-like organism isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in eastern Canada. *Disease of Aquatic Organism*. 33: 25-31.
- Kasahara M., 1997. New insights into the genomic organization and origin of the major histocompatibility complex: role of chromosomal (genome) duplication in the emergence of the adaptive immune system. *Hereditas*. 127: 59-65.
- Kaufman J., Milne S., Göbel T., Walker B., Jacob J., Auffray C., Zoorob R., Beck S., 1999. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature*. 401: 923-925.

Kekäläinen J., Vallunen J.A., Primmer C.R., Rättyä J., Taskinen J., 2009. Signals of major histocompatibility complex overdominance in a wild salmonid population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 276: 3133-3140.

Kimura M., *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1983.

Kiryu I., Dijkstra J.M., Sarder R.I., Fujiwara A., Yoshiura Y., Ototake M., 2005. New MHC class Ia domain lineages in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) which are shared with other fish species. *Fish & Shellfish Immunology*. 18: 243-254.

Kjøglum S., Grimholt U., Larsen S., 2005. Non-MHC genetic and tank effects influence disease challenge tests in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 250: 102 - 109.

Kjøglum S., Henryon M., Aasmundstad T., Korsgaard I., 2008. Selective breeding can increase resistance of Atlantic salmon to furunculosis, infectious salmon anaemia and infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture Research*. 39: 498-505.

Kjøglum S., Larsen S., Bakke H., Grimholt U., 2006. How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology*. 21: 431-441.

Kjøglum S., Larsen S., Bakke H., Grimholt U., 2007. The effect of specific MHC class I and class II combinations on resistance to furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scandinavian Journal of Immunology*. 67: 160-168.

Klein J., 1986. *Natural history of the major histocompatibility complex*. John Wiley & Sons, New York.

Klein J., Sato A., Nagl S., O'Uigin C., 1998. Molecular trans-species polymorphism. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 29: 1-21.

Knapp L.A., 2005. Denaturing gradient gel electrophoresis and its use in the detection of major histocompatibility complex polymorphism. *Tissue antigens*. 65: 211-219.

Kosakovsky P. and Frost S., 2005. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular Biology and Evolution*. 22: 1208-1222.

Kosakovsky P., Frost S., Muse S., 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*. 21: 676-679.

Kosakovsky P., Posada D., Gravenor M.B., Woelk C.H., Frost S.D.W., 2006. GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics*. 22: 3096-3098.

Kruiswijk C.P., Hermsen T.T., Westphal A.H., Savelkoul H.F.J., Stet R.J.M., 2002. A novel functional class I lineage in zebrafish (*Danio rerio*), carp (*Cyprinus carpio*), and large barb (*Barbus intermedius*) showing an unusual conservation of the peptide binding domains. *The Journal of Immunology*. 169: 1936-1947.

Kulski J.K., Shiina T., Anzai T., Kohara S., Inoko H., 2002. Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunological Reviews*. 190: 95-122.

Kurtz J., Kalbe M., Aeschlimann P., Haberli M., Wegner K.M., Reusch T.B.H., Milinski M., 2004. Major histocompatibility complex diversity influences parasite resistance and innate immunity in sticklebacks. *Proc R Soc Lond Ser B-Biol Sci*. 271: 197 - 204.

- Landry C. y Bernatchez L., 2001. Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Ecology*. 10: 2525-2539.
- Langefors Å., Lohm J., Grahn M., Andersen O., Von Schantz T., 2001. Association between major histocompatibility complex class IIB alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 268: 479 - 485.
- Langefors Å., Lohm J., Von Schantz T., Grahn M., 2000. Screening of Mhc variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a comparison of restriction fragment length polymorphism (RFLP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and sequencing. *Molecular Ecology*. 9: 215-219.
- Lannan C. y Fryer J., 1994. Extracellular survival of *Piscirickettsia salmonis*. *Journal of Fish Diseases*. 17: 545-548.
- Larenas H., Hidalgo V., Garcés A., Fryer J., Smith P., 1995. Piscirickettsiosis: lesiones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 10: 53-58.
- Larenas J., Astorga C., Contreras J., Smith P., 1996. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas fertilizadas provenientes de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculada experimentalmente. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 28: 161-166.
- Larenas J., Bartholomew J., Troncoso O., Fernandez S., Ledezma H., Sandoval N., Vera P., Contreras J., Smith P., 2003. Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and in vitro study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. *Diseases of Aquatic Organisms*. 56: 25-30.
- Larenas J., Contreras J., Smith P., Estado actual de la Piscirickettsiosis en Salmones. *Revista AquaTIC*, Vol. 5, 1998.
- Larhammar D., Schenning L., Gustafsson K., Wiman K., Claesson L., Rask L., Peterson P., 1982. Complete Amino Acid Sequence of an HLA-DR Antigen-Like ss Chain as Predicted from the Nucleotide Sequence: Similarities with Immunoglobulins and HLA-A,-B, and-C Antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 79: 3687-3691.
- Leal J. y Woywood D., Piscirickettsiosis en Chile: Avances y perspectivas para su control. Vol. 2. *SalmoCiencia*, 2007, pp. 34-42.
- Li H., Zhang Y., Zhang Y., Fu Y., 2003. Neutrality tests using DNA polymorphism from multiple samples. *Genetics*. 163: 1147-1151.
- Li J., Barreda D.R., Zhang Y.A., Boshra H., Gelman A.E., LaPatra S., Tort L., Sunyer J.O., 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature immunology*. 7: 1116-1124.
- Librado P. y Rozas J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451.
- Lohm J., Grahn M., Langefors Å., Andersen Ø., Storset A., Schantz T., 2002. Experimental evidence for major histocompatibility complex-allele-specific resistance to a bacterial infection. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 269: 2029-2033.
- Lukacs M., Harstad H., Grimholt U., Beetz-Sargent M., Cooper G., Reid L., Bakke H., Phillips R., Miller K., Davidson W., Koop B., 2007. Genomic organization of duplicated major histocompatibility complex class I regions in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*. 8: 251-267.

- Marshall S.H., Conejeros P., Zahr M., Olivares J., Gomez F., Cataldo P., Henriquez V., 2007. Immunological characterization of a bacterial protein isolated from salmonid fish naturally infected with *Piscirickettsia salmonis*. *Vaccine*. 25: 2095-2102.
- Martinsohn J., Sousa A., Guethlein L., Howard J., 1999. The gene conversion hypothesis of MHC evolution: a review. *Immunogenetics*. 50: 168-200.
- Mauel M., Giovannoni S., Fryer J., 1999. Phylogenetic analysis of *Piscirickettsia salmonis* by 16S, internal transcribed spacer (ITS) and 23S ribosomal DNA sequencing. *Diseases of aquatic organisms*. 35: 115-123.
- Mauel M., Ware C., Smith P., 2008. Culture of *Piscirickettsia salmonis* on enriched blood agar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 20: 213.
- Mauel M.J. y Miller D.L., 2002. Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: a review. *Veterinary microbiology*. 87: 279-289.
- Mayer W., Jonker M., Klein D., Ivanyi P., Van Seventer G., Klein J., 1988. Nucleotide sequence of chimpanzee MHC class I alleles: evidence for *trans*-species mode of evolution. *The EMBO Journal*. 7: 2765-2774.
- McDonald J. y Kreitman M., 1991. Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature*. 351: 652-654.
- McVean G., Awadalla P., Fearnhead P., 2002. A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics*. 160: 1231-1241.
- Medina E. y North R., 1998. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and *Nramp1* genotype. *Immunology*. 93: 270.
- Messaoudi I., Patino J., Dyall R., LeMaout J., 2002. Direct link between mhc polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense. *Science*. 298: 1797.
- Meuwissen T. y Sonesson A., 2004. Genotype-assisted optimum contribution selection to maximize selection response over a specified time period. *Genetics Research*. 84: 109-116.
- Midtlyng P., 1997. Vaccinated fish welfare: protection versus side-effects. *Developments in Biological Standardization*. 90: 371-379.
- Mikalsen J., Skjærvik O., Wiik Nielsen J., Wasmuth M., Colquhoun D., 2008. Agar culture of *Piscirickettsia salmonis*, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. *FEMS Microbiology Letters*. 278: 43-47.
- Miller K., Ming T., Schulze A., Withler R., 1999. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations. *Biotechniques*. 27: 1016-8, 1020-2, 1024.
- Miller K., Winton J., Schulze A., Purcell M., Ming T., 2004a. Major histocompatibility complex loci are associated with susceptibility of Atlantic salmon to infectious hematopoietic necrosis virus. *Environmental Biology of Fishes*. 69: 307-316.
- Miller K. y Withler R., 1996. Sequence analysis of a polymorphic Mhc class II gene in Pacific salmon. *Immunogenetics*. 43: 337-351.

- Miller K.M., Li S., Ming T.J., Kaukinen K.H., Schulze A.D., 2006. The salmonid MHC class I: more ancient loci uncovered. *Immunogenetics*. 58: 571-589.
- Miller K.M. y Withler R.E., 1998. The salmonid class I MHC: limited diversity in a primitive teleost. *Immunological Reviews*. 166: 279-293.
- Miller K.M., Withler R.E., Beacham T.D., 1997. Molecular evolution at *Mhc* genes in two populations of chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Molecular Ecology*. 6: 937-954.
- Miller M., Bacon L., Hala K., Hunt H., Ewald S., Kaufman J., Zoorob R., Briles W., 2004b. Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. *Immunogenetics*. 56: 261-279.
- Miller N., Wilson M., Bfufftén E., Stuge T., Warr G., Ciem W., 1998. Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. *Immunological Reviews*. 166: 187-197.
- Muñoz Gomá O. (Ed.) 2009. Aguas arriba: La transformación socioeconómica del ecosistema Llanquihue-Chiloé (Chile) durante los años 90. CLACSO, Buenos Aires.
- Myers R., Maniatis T., Lerman L., 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*. 155: 501-527.
- Nei M. y Gojobori T., 1986. Simple methods for estimating the number of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418.
- Nielsen R. y Yang Z., 1998. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics*. 148: 929-936.
- Noakes M.A., Reimer T., Phillips R.B., 2003. Genotypic Characterization of an MHC Class II Locus in Lake Trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Superior by Single-Stranded Conformational Polymorphism Analysis and Reference Strand-Mediated Conformational Analysis. *Marine Biotechnology*. 5: 270-278.
- Ohta T., 1995. Gene conversion vs point mutation in generating variability at the antigen recognition site of major histocompatibility complex loci. *Journal of Molecular Evolution*. 41: 115-119.
- Ohta Y., Landis E., Boulay T., Phillips R.B., Collet B., Secombes C.J., Flajnik M.F., Hansen J.D., 2004. Homologs of CD83 from elasmobranch and teleost fish. *The Journal of Immunology*. 173: 4553-4560.
- Olesen I., Groen A.F., Gjerde B., 2000. Definition of animal breeding goals for sustainable production systems. *Journal of Animal Science*. 78: 570-582.
- Olivares J. y Marshall S., 2010. Determination of minimal concentration of *Piscirickettsia salmonis* in water columns to establish a fallowing period in salmon farms. *Journal of fish diseases*. 33: 261-266.
- Olsen A., Melby H., Speilberg L., Evensen O., Håstein T., 1997. *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway- epidemiological, pathological and microbiological findings. *Diseases of aquatic organisms*. 31: 35-48.
- Ottová E., Simková A., Martin J.-F., Goüy de Bellocq J., Gelnar M., Allienne J.-F., Morand S., 2005. Evolution and trans-species polymorphism of *MHC* class II β genes in cyprinid fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 18: 199-222.

- Palti Y., Nichols K., Waller K., Parsons J., Thorgaard G., 2001. Association between DNA polymorphisms tightly linked to MHC class II genes and IHN virus resistance in backcrosses of rainbow and cutthroat trout. *Aquaculture*. 194: 283-289.
- Parham P. y Ohta T., 1996. Population Biology of Antigen Presentation by MHC Class I Molecules. *Science*. 272: 67-74.
- Paterson S., Wilson K., Pemberton J.M., 1998. Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 95: 3714-3719.
- Peakall R. y Smouse P., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.
- Penn D.J., Damjanovich K., Potts W.K., 2002. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 99: 11260-11264.
- Peters M. y Turner T., 2008. Genetic variation of the major histocompatibility complex (MHC class II β gene) in the threatened Gila trout, *Oncorhynchus gilae gilae*. *Conservation Genetics*. 9: 257-270.
- Piertney S.B. y Oliver M.K., 2006. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*. 96: 7-21.
- Rakus K., Wiegertjes G., Adamek M., Siwicki A., Lepa A., Irmazarow I., 2009. Resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to Cyprinid herpesvirus-3 is influenced by major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism. *Fish & Shellfish Immunology*. 26: 737-743.
- Randelli E., Buonocore F., Scapigliati G., 2008. Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish & Shellfish Immunology*. 25: 326-340.
- Raymond M. y Rousset F., 1995a. An exact test for population differentiation. *Evolution*. 49: 1280-1283.
- Raymond M. y Rousset F., 1995b. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered.* 86: 248-249.
- Reche P. y Reinherz E., 2003. Sequence variability analysis of human class I and class II MHC molecules: functional and structural correlates of amino acid polymorphisms. *Journal of Molecular Biology*. 331: 623-641.
- Reusch T.B.H., Wegner K.M., Kalbe M., 2001. Rapid genetic divergence in postglacial populations of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): the role of habitat type, drainage, and geographic proximity. *Molecular Ecology*. 10: 2435-2446.
- Reynolds J., Weir B., Cockerham C., 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*. 105: 767.
- Rise M., Jones S., Brown G., von Schalburg K., Davidson W., Koop B., 2004. Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Physiological genomics*. 20: 21-35.
- Rodger H. y Drinan E., 1993. Observation of a rickettsia-like organism in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *Journal of fish diseases*. 16: 361-369.

- Rojas M., Olivares J., del Río R., Marshall S., 2008. Characterization of a novel and genetically different small infective variant of *Piscirickettsia salmonis*. *Microbial pathogenesis*. 44: 370-378.
- Rojas V., Galanti N., Bols N., Jiménez V., Paredes R., Marshall S., 2010. *Piscirickettsia salmonis* induces apoptosis in macrophages and monocyte like cells from rainbow trout. *Journal of cellular biochemistry*. 110: 468-476.
- Rojas V., Galanti N., Bols N., Marshall S., 2009. Productive infection of *Piscirickettsia salmonis* in macrophages and monocyte like cells from rainbow trout, a possible survival strategy. *Journal of cellular biochemistry*. 108: 631-637.
- Ruano G. y Kidd K., 1992. Modeling of heteroduplex formation during PCR from mixtures of DNA templates. *Genome Research*. 2: 112-116.
- Ruiz I., Fernández A.B., de Blas I., 2003. El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune específica. *Revista AquaTIC*. 18: 33-38.
- Saitou N. y Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406.
- Salinas G., Contreras J., Smith P., Larenas J., Horizontal transmission and excretion of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water condition. In: Pathologists E.A.o.F., (Ed.), VIII International Conference Diseases of Fish and Shellfish, Heriot-Watt University, Edinburgh, 1997, pp. P-057.
- Salomonsen J., Marston D., Avila D., Bumstead N., Johansson B., Juul-Madsen H., Olesen G., Riegert P., Skjødt K., Vainio O., 2003. The properties of the single chicken MHC classical class II a chain (B-LA) gene indicate an ancient origin for the DR/E-like isotype of class II molecules. *Immunogenetics*. 55: 605-614.
- Sambrook J.G., Figueroa F., Beck S., 2005. A genome-wide survey of Major Histocompatibility Complex(MHC) genes and their paralogues in zebrafish. *BMC genomics*. 6: 152.
- San Martín B., Yatabe T., Gallardo A., Medina P., Manual de buenas prácticas en el uso de antibióticos y antiparasitarios en la salmonicultura nacional. In: Laboratorio de Farmacología Veterinaria F.d.C.V.y.P., Universidad de Chile., (Ed.), Santiago-Chile, 2010.
- Schäfer J., Alvarado V., Enriquez R., Monrás M., 1990. The " Coho Salmon Syndrome"(CSS): a new disease in chilean salmon reared in sea water. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 10: 130.
- Sheffield V., Cox D., Lerman L., Myers R., 1989. Attachment of a 40-base-pair G+ C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 86: 232-236.
- Shiina T., Dijkstra J.M., Shimizu S., Watanabe A., Yanagiya K., Kiryu I., Fujiwara A., Nishida-Umehara C., Kaba Y., Hirano I., 2005. Interchromosomal duplication of major histocompatibility complex class I regions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a species with a presumably recent tetraploid ancestry. *Immunogenetics*. 56: 878-893.
- Shum B., Guethlein L., Flodin L., Adkison M., Hedrick R., Nehring R., Stet R., Secombes C., Parham P., 2001. Modes of Salmonid MHC Class I and II Evolution Differ from the Primate Paradigm 1. *The Journal of Immunology*. 166: 3297-3308.

Skarmeta A., Henriquez V., Zahr M., Orrego C., Marshall S., 2000. Isolation of a virulent *Piscirickettsia salmonis* from the brain of naturally infected coho salmon. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 20: 261-264.

Smith P., Lannan C., Garces L., Jarpa M., Larenas J., Caswell-Reno P., Whipple M., Fryer J., 1995. Piscirickettsiosis: a bacterin field trial in coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 15: 137-141.

Smith P., Pizarro P., Ojeda P., Contreras J., Oyanedel S., Larenas J., 1999. Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 37: 165-172.

Sommerset I., Krossoy B., Biering E., Frost P., 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*. 4: 89-101.

Steinmetz M. y Hood L., 1983. Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man. *Science*. 222: 727-733.

Stern L.J., Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Urban R.G., Strominger J.L., Wiley D.C., 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*. 368: 215-221.

Stet R., de Vries B., Mudde K., Hermsen T., van Heerwaarden J., Shum B., Grimholt U., 2002. Unique haplotypes of co-segregating major histocompatibility class II A and class II B alleles in Atlantic salmon (*Salmo salar*) give rise to diverse class II genotypes. *Immunogenetics*. 54: 320-331.

Stet R., Dixon B., Van Erp S., Van Lierop M., Rodrigues P., Egberts E., 1996. Inference of structure and function of fish major histocompatibility complex (MHC) molecules from expressed genes. *Fish & Shellfish Immunology*. 6: 305-318.

Stet R., Kruiswijk C., Dixon B., 2003. Major histocompatibility lineages and immune gene function in teleost fishes: the road not taken. *Critical Reviews in Immunology*. 23: 441-471.

Sültmann H., Mayer W.E., Figueroa F., O'Huigin C., Klein J., 1994. Organization of Mhc class II B genes in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Genomics*. 23: 1-14.

Tajima F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585-595.

Takahata N. y Nei M., 1990. Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics*. 124: 967.

Takami K., Zaleska-Rutczynska Z., Figueroa F., Klein J., 1997. Linkage of LMP, TAP, and RING3 with Mhc class I rather than class II genes in the zebrafish. *The Journal of Immunology*. 159: 6052-6060.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.

Tort L., Balasch J., Mackenzie S., 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*. 22: 277-286.

Trowsdale J. y Parham P., 2004. Mini-review: defense strategies and immunity-related genes. *European Journal of Immunology*. 34: 7-17.

- Vallejo A.N., Miller N.W., William Clem L., 1992. Antigen processing and presentation in teleost immune responses. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 73-89.
- Van den Berg T., Yoder J., Litman G., 2004. On the origins of adaptive immunity: innate immune receptors join the tale. *TRENDS in Immunology*. 25: 11-16.
- Van den Berghe E. y Gross M., 1989. Natural selection resulting from female breeding competition in a Pacific salmon (coho: *Oncorhynchus kisutch*). *Evolution*. 43: 125-140.
- Van Erp S., Egberts E., Stet R.J.M., 1996. Evidence for multiple distinct major histocompatibility complex class I lineages in teleostean fish. *European Journal of Immunogenetics*. 23: 371-381.
- Vejbæsya S., Eiermann T., Suthipinitiharm P., Bancha C., Stephens H., Luangtrakool K., Chandanayingyong D., 1998. Serological and molecular analysis of HLA class I and II alleles in Thai patients with psoriasis vulgaris. *Tissue antigens*. 52: 389-392.
- Wahlund S., 1928. Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas*. 11: 65-106.
- Watkins D., McAdam S., Liu X., Strang C., Milford E., Levine C., Garber T., Dogon A., Lord C., Ghim S., 1992. New recombinant *HLA-B* alleles in a tribe of South American Amerindians indicate rapid evolution of MHC class I loci. *Nature*. 357: 329-333.
- Watts M., Munday B., Burke C., 2001. Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal*. 79: 570-574.
- Wedekind C., Walker M., Portmann J., Cenni B., Müller R., Binz T., 2004. MHC-linked susceptibility to a bacterial infection, but no MHC-linked cryptic female choice in whitefish. *Journal of Evolutionary Biology*. 17: 11-18.
- Wegner K.M., Kalbe M., Kurtz J., Reusch T.B.H., Milinski M., 2003. Parasite selection for immunogenetic optimality. *Science*. 301: 1343.
- Wilhelm V., Miquel A., Burzio L.O., Roseblatt M., Engel E., Valenzuela S., Parada G., Valenzuela P.D.T., 2006. A vaccine against the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* based on recombinant proteins. *Vaccine*. 24: 5083-5091.
- Wynne J., Cook M., Nowak B., Elliott N., 2007. Major histocompatibility polymorphism associated with resistance towards amoebic gill disease in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 22: 707-717.
- Xu T., Chen S., Ji X., Tian Y., 2008. MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families. *Fish & Shellfish Immunology*. 25: 213-221.
- Yang Z., 2007. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1586-1591.
- Yang Z. y Swanson W., 2002. Codon-substitution models to detect adaptive evolution that account for heterogeneous selective pressures among site classes. *Molecular Biology and Evolution*. 19: 49-57.
- Yang Z., Wong W., Nielsen R., 2005. Bayes empirical bayes inference of amino acid sites under positive selection. *Molecular Biology and Evolution*. 22: 1107-1118.

Zhang Y., Chen S., Liu Y., Sha Z., Liu Z., 2006. Major histocompatibility complex class IIB allele polymorphism and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Marine Biotechnology*. 8: 600-610.

Zhang Y.A., Salinas I., Li J., Parra D., Bjork S., Xu Z., LaPatra S., Bartholomew J., Sunyer J., 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology*. 11: 827-835.

ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág
ANEXO I: Complemento a Materiales y Métodos.....	109
Tabla A.1. Características de los partidores utilizados en la amplificación de los genes MHC de salmónidos.....	109
Tabla A.2. Protocolo estándar de amplificación de los genes MHC de salmónidos mediante PCR.....	109
Tabla A.3. Condiciones de denaturación utilizadas en el DGGE para los distintos locus del MHC de las especies salmónidas.....	109
ANEXO II: Secuencias subidas a la base de datos nucleotídica GenBank del NCBI.....	110
ANEXO III: Productividad: Pasantía Doctoral, Publicaciones ISI y Presentaciones a Congresos.....	112

ANEXO I

Complemento a Materiales y Métodos

Tabla A.1.

Características de los partidores utilizados en la amplificación de los genes MHC de salmónidos.

<i>Especie</i>	<i>Locus</i>	<i>Partidor^a</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Ta^b (°C)</i>	<i>Long^c (pb)</i>
<i>S. salar</i>	UBA	SasaUBA-F	TGTGAGTGGGATGATGAG	50	276
		SasaUBA-R	CTCATCAGAGTGCTCTTC		
	DAA	SasaDAA-F	GTGTTTTATTGGGTTTTCTTTTCTC	55	333
		SasaDAA-R	CTCTAAATTACTTCTCTCTTTAC		
	DAB	SasaDAB-F	TCTGTATTATGTTTTCCCTCC	55	351
		SasaDAB-R	CACCTGTCTTGTCCAGTATG		
<i>O. mykiss</i> y <i>O. kisutch</i>	UBA	OnmyUBA-F	TCCCTGAAGTATTTCTACAC	50	279
		OnmyUBA-R	TTTGGTTAAAACGCTGCTTTA		
	DAA	OnmyDAA-F	GGATGCAGTGATTGAGATGGAG	57	243
		OnmyDAA-R	CTCTGGTGGGTTCTTGTAAG		
	DAB	OnmyDAB-F	GTGTCGATACTCCTCAAAGGAC	60	271
		OnmyDAB-R	CTTGTCAGTATGGCGCTGTAG		
Todos		Cola GC	GCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCC		

^a F= Partidor "forward" o sentido; R= Partidor "reverse" o antisentido.

^b Ta= Temperatura de annealing, unión de los partidores al ADN durante el PCR.

^c Long= Longitud del fragmento génico amplificado, incluyendo la adición de la cola GC.

Tabla A.2.

Protocolo estándar de amplificación de los genes MHC de salmónidos mediante PCR.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Duración</i>	<i>No. de ciclos</i>
Denaturación Inicial	94 °C	5 min	1
Denaturación	94 °C	30 seg	30
Annealing	Ta °C ^a	35 seg	
Extensión	72 °C	45 seg	
Extensión Final	72 °C	8 min	1

^a Ta= Temperatura de annealing (ver Tabla A.1)

Tabla A.3.

Condiciones de denaturación utilizadas en el DGGE para los distintos locus del MHC de las especies salmónidas.

<i>Especie</i>	<i>Locus</i>	<i>% Denaturante^a</i>
<i>S. Salar</i>	UBA	30-50
	DAA	40-50
	DAB	30-40
<i>O. mykiss</i> y <i>O. kisutch</i>	UBA	40-50
	DAA	30-35
	DAB	30-40

^a Denaturante utilizado corresponde a una mezcla Urea-Formamida.

ANEXO II

Secuencias subidas a la base de datos nucleotídica GenBank del NCBI

Especie *Salmo Salar*:

Nombre Alelo	GenBank ID
<i>Sasa-DAA*0201</i>	FJ597522
<i>Sasa-DAA*0301</i>	HQ839642
<i>Sasa-DAA*0302</i>	HQ839643
<i>Sasa-DAA*0303</i>	GQ375898
<i>Sasa-DAA*0306</i>	FJ597523
<i>Sasa-DAA*0401</i>	HQ839644
<i>Sasa-DAA*0501</i>	FJ597524
<i>Sasa-DAA*0601</i>	FJ597525
<i>Sasa-DAA*0701</i>	HQ839645
<i>Sasa-DAA*0801</i>	HQ839646
<i>Sasa-DAA*0802</i>	FJ597526
<i>Sasa-DAA*0901</i>	FJ597527
<i>Sasa-DAA*0902</i>	FJ597528
<i>Sasa-DAA*1001</i>	GQ375898

Nombre Alelo	GenBank ID
<i>Sasa-DAB*0101</i>	FJ597529
<i>Sasa-DAB*0201</i>	FJ597530
<i>Sasa-DAB*0202</i>	FJ597531
<i>Sasa-DAB*0301</i>	FJ597532
<i>Sasa-DAB*0401</i>	FJ597533
<i>Sasa-DAB*0402</i>	HQ839649
<i>Sasa-DAB*0501</i>	FJ597534
<i>Sasa-DAB*0601</i>	FJ597535
<i>Sasa-DAB*0701</i>	FJ597536
<i>Sasa-DAB*0801</i>	FJ597537
<i>Sasa-DAB*0901</i>	FJ597538
<i>Sasa-DAB*0902</i>	HQ839650
<i>Sasa-DAB*1201</i>	HQ839651

Especie *Oncorhynchus mykiss*:

Nombre Alelo	GenBank ID
<i>Onmy-DAA*0301</i>	FJ597489
<i>Onmy-DAA*0401</i>	FJ597490
<i>Onmy-DAA*0501</i>	FJ597491
<i>Onmy-DAA*0601</i>	FJ597492
<i>Onmy-DAA*0701</i>	FJ597494
<i>Onmy-DAA*0702</i>	FJ597495
<i>Onmy-DAA*0901</i>	FJ597498
<i>Onmy-DAA*1001</i>	FJ597500
<i>Onmy-DAA*1101</i>	FJ597501
<i>Onmy-DAA*1102</i>	FJ597502
<i>Onmy-DAA*1103</i>	HQ839647
<i>Onmy-DAA*1201</i>	FJ597503
<i>Onmy-DAA*1301</i>	FJ597504

Nombre Alelo	GenBank ID
<i>Onmy-DAB*0301</i>	GQ375896
<i>Onmy-DAB*0502</i>	HQ839652
<i>Onmy-DAB*0601</i>	GQ375897
<i>Onmy-DAB*1002</i>	HQ839653
<i>Onmy-DAB*1101</i>	FJ597509
<i>Onmy-DAB*1301</i>	FJ597510
<i>Onmy-DAB*1401</i>	FJ597512
<i>Onmy-DAB*1403</i>	FJ597514
<i>Onmy-DAB*1501</i>	FJ597515
<i>Onmy-DAB*1601</i>	FJ597517
<i>Onmy-DAB*1701</i>	FJ597518
<i>Onmy-DAB*1801</i>	FJ597519
<i>Onmy-DAB*1901</i>	FJ597521

Especie *Oncorhynchus kisutch*:

Nombre Alelo	GenBank ID
<i>Onki-DAA*0101</i>	FJ943245
<i>Onki-DAA*0201</i>	FJ943246
<i>Onki-DAA*0301</i>	FJ943247
<i>Onki-DAA*0401</i>	FJ943248
<i>Onki-DAA*0501</i>	HQ839648

Nombre Alelo	GenBank ID
<i>Onki-DAB*0401</i>	FJ943249
<i>Onki-DAB*0601</i>	FJ943250
<i>Onki-DAB*0701</i>	HQ839654
<i>Onki-DAB*0901</i>	HQ839655
<i>Onki-DAB*1001</i>	HQ839656
<i>Onki-DAB*1201</i>	FJ943251
<i>Onki-DAB*1301</i>	FJ943252
<i>Onki-DAB*1401</i>	HQ839657
<i>Onki-DAB*1501</i>	HQ839658
<i>Onki-DAB*1701</i>	FJ943253
<i>Onki-DAB*1801</i>	FJ943254
<i>Onki-DAB*2001</i>	HQ839660
<i>Onki-DAB*2101</i>	FJ943255
<i>Onki-DAB*2601</i>	GQ375895

ANEXO III

Productividad: Pasantía Doctoral, Publicaciones ISI y Presentaciones a Congresos

Pasantía Doctoral:

- Título trabajo: "Análisis de secuencias alélicas del MHC de salmónidos para la detección de haplotipos claves en la resistencia o susceptibilidad a *Piscirickettsia salmonis*"
- Profesor a cargo: Dra. Sonia Consuegra del Olmo
Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences
Universidad de Aberystwyth (Gales, Reino Unido)
- Fecha pasantía: 6 Junio - 29 Agosto de 2009
- Financiamiento: Beca Chile de Pasantía Doctoral en el Extranjero

Publicaciones ISI:

Gómez D., Conejeros P., Marshall S.H., Consuegra S. (2010). MHC evolution in three salmonid species: a comparison between class II alpha and beta genes. Immunogenetics (Publicado on-line el 3 de Junio, 2010).

Conejeros P.A., Calderón C., Gómez D., Nilo L., Marshall S.H. (2011). High immune diversity in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) Aquaculture International (Aceptado el 10 de Enero de 2011).

Gómez D., Conejeros P., Consuegra S., Marshall S.H. (2011). MHC mediated resistance to *Piscirickettsia salmonis* in salmonids farmed in Chile. Aquaculture (Aceptado el 13 de Abril de 2011).

Presentaciones a Congresos:

9-13 Diciembre 2007

Simposio Internacional de Biotecnología Marina en el Hemisferio Sur "Waking up a Sleeping Beauty". Hotel del Mar. Viña del Mar, Chile. Presentación formato Póster del Trabajo: "DGGE as an alternative technique to typify type polymorphism in epizootic-derived *Piscirickettsia salmonis* strains. Advantages over real time PCR procedures". Gómez D., Marshall S.

26-29 Noviembre 2008

LI Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile. Gran Hotel Pucón. Pucón, Chile. Presentación oral del trabajo: "Identificación de alelos del MHC Clase II mediante DGGE en salmónidos cultivados en Chile". Gómez D., Conejeros P., Marshall S.

28 Junio - 4 Julio 2009

XI Congreso Internacional de la Sociedad Internacional de Desarrollo e Inmunología Comparativa (ISDCI). Diplomat Hotel. Praga, República Checa. Presentación formato Póster del Trabajo: "MHC Class II Polymorphism analysis on farmed *Oncorhynchus kisutch*". Gómez D., Conejeros P., Marshall S.

3-7 Noviembre 2009

IX Congreso Latinoamericano de Inmunología. Hotel del Mar. Viña del Mar, Chile. Presentación oral en inglés del trabajo: "MHC class II alpha and beta evolution in salmonids". Gómez D., Marshall S., Consuegra S.

23-27 Mayo 2010.

I Simposio de la Organización Europea de Inmunología en Peces (EOFFI). Domus La Quercia. Viterbo, Italia. "Association between MHC alleles and Resistance/Susceptibility to *Piscirickettsia salmonis* in salmonids farmed on Chile". Gómez D., Conejeros P., Consuegra S., Marshall S.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada gracias al financiamiento de:

- Proyecto CORFO-Innova 07CN13PBT-165.
- Beca CONICYT para estudios de doctorado.
- Beca Chile para pasantía doctoral en el extranjero.
- Becas CONICYT, PUCV, UTFSM, ISDCI y EOFFI para asistencia a congresos nacionales e internacionales.