



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Susceptibilidad de macrófagos de salmón a infección de *Piscirickettsia salmonis*: efectos de la disponibilidad y distribución del colesterol”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

LILIANA JACQUELINE MONTT TOBAR

Director del Seminario de Título: Rodrigo Pulgar Tejo

Junio 2018 Santiago – Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr(ta) Liliana Jacqueline Montt Tobar

“Susceptibilidad de macrófagos de salmón a infección de *Piscirickettsia salmonis*: efectos de la disponibilidad y distribución del colesterol”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

**Director Seminario de Título:** \_\_\_\_\_

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:** \_\_\_\_\_

**Evaluador:** \_\_\_\_\_

Santiago de Chile, junio, 2018

## INDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS) y su agente etiológico, <i>Piscirickettsia salmonis</i> .....	1
1.2 Manejo, prevención y tratamiento de SRS.....	2
1.3 Nuevas estrategias para combatir infecciones intracelulares bacterianas.....	5
1.4 Homeostasis celular de colesterol .....	6
1.5 Colesterol y susceptibilidad a la infección.....	8
1.6 Hipótesis.....	10
1.7 Objetivos.....	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.1. Materiales.....	11
2.1.1. Líneas celulares.....	11
2.1.2 Células procariontes.....	11

2.1.3. Fluoróforos .....	11
2.1.4 Partidores.....	12
2.1.5 Sales y reactivos.....	12
2.2 Métodos.....	12
2.2.1. Ensayo MTT .....	12
2.2.2. Ensayo Viabilidad células SHK-1.....	13
2.2.3. Ensayo de viabilidad <i>Piscirickettsia salmonis</i> .....	13
2.2.4. Inmunofluorescencia indirecta .....	13
2.2.5. Cuantificación de colesterol intracelular .....	14
2.2.6. Ensayos de infección <i>in vitro</i> .....	15
3. RESULTADOS.....	17
3.1. Optimización de ensayo MTT para células SHK-1.....	18
3.2. Viabilidad de células SHK-1 con tratamiento de fármacos.....	20
3.3. Viabilidad de <i>Piscirickettsia salmonis</i> con tratamiento de fármacos.....	27
3.4. Distribución subcelular y disponibilidad de colesterol.....	29
3.5. Medición de proteínas y colesterol en células SHK-1.....	32
3.6. Disponibilidad intracelular de colesterol en macrófagos de salmón.....	34
3.7. Susceptibilidad de los macrófagos de salmón a la infección por <i>Piscirickettsia salmonis</i> .....	36
4.DISCUSIÓN Y PROYECCIONES.....	39
4.1 Optimización de ensayo MTT para células SHK-1.....	39
4.2 Viabilidad de células SHK-1 con tratamiento de fármacos.....	39
4.3 Viabilidad de <i>Piscirickettsia salmonis</i> con tratamiento de fármacos.....	40
4.4 Distribución subcelular y disponibilidad de colesterol.....	41

4.5 Susceptibilidad de los macrófagos de salmón a la infección por <i>Piscirickettsia salmonis</i> .....	43
5.CONCLUSIONES.....	44
6.BIBLIOGRAFIA.....	45

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Referencias de rangos de concentraciones de fármacos usados en otros estudios .....	21
--	----

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Optimización de ensayo MTT para células SHK-1.....	19
<b>Figura 2</b> Viabilidad de células SHK-1 con tratamiento de fármacos.....	23
<b>Figura 3</b> Morfología y distribución de células SHK-1.....	26
<b>Figura 4</b> Viabilidad de <i>Piscirickettsia salmonis</i> con tratamiento de fármacos.....	28
<b>Figura 5</b> Distribución subcelular de colesterol.....	31
<b>Figura 6</b> Medición de colesterol intracelular y proteína total en células SHK-1.....	33
<b>Figura 7</b> Concentración intracelular de colesterol en respuesta a tratamientos farmacológicos.....	35
<b>Figura 8</b> Infecciones <i>in vitro</i> de macrófagos de salmón.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

SRS: Septicemia Rickettsial Salmonídea

ISAV: Virus de la anemia infecciosa del salmón

BCVs: Vacuolas citoplasmáticas del hospedero que contienen bacterias

MAS: Selección asistida por marcadores

GAS: Selección asistida por genoma

PDAD: Drogas antimicrobianas dirigidas al patógeno (antibióticos)

HDAD: Drogas antimicrobianas dirigidas el hospedero

FBS: Suero fetal bovino

PCR-RFLP: PCR de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

rpm: Revoluciones por minutos

°C: Grados Celsius

PBS: Buffer fosfato salino

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

MOI: Multiplicidad de infección

LDL: Lipoproteína de baja densidad

HMG-CoA reductasa: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa

CPE: Efectos citopáticos

Dpi: Días post inoculación

ADN: Ácido desoxirribonucleico

qPCR: PCR cuantitativo en tiempo real

SHK-1: Macrófagos de riñón proximal de *Salmo salar*

GlyA: Serina hidroximetil transferasa

Elf-1: Factor de elongación 1

dpi: Días post inoculación

## RESUMEN

La Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS) es una enfermedad que afecta a las especies salmónidas, causada por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, y que causa pérdidas de millones de dólares en la industria salmonera chilena. Desde su detección se han utilizado distintas estrategias para controlarla, incluyendo medidas profilácticas como las vacunas y tratamientos basados en antibióticos. A pesar de esto, se siguen reportando nuevos brotes de la enfermedad lo que sugiere que las medidas existentes son insuficientes y que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para controlarla. Una nueva aproximación es enfocarse, no en el patógeno como blanco terapéutico, sino que en el hospedero para perturbar la relación con el patógeno y evitar la infección.

En esta memoria se evaluó el efecto de fármacos que alteran la distribución (U18666A) y contenido (atorvastatina) intracelular de colesterol sobre la susceptibilidad/resistencia de macrófagos de salmón a infecciones de *P. salmonis*. Se determinaron dosis y tiempos de tratamientos con estas drogas que no mostraron propiedades antibióticas ni citotóxicas, como también el efecto sobre la cantidad y distribución intracelular de colesterol. Los resultados indican que ambos fármacos fueron capaces de inhibir la infección con *P. salmonis*, lo cual se evaluó a través de la inhibición de los efectos citopáticos clásicos de la infección (vacuolización) como también a través de la escasa presencia de la bacteria al interior de macrófagos luego de 5 días de infección. Futuros estudios permitirán evaluar el potencial que tienen estos compuestos de convertirse en terapias farmacológicas para contribuir al combate de la SRS y contribuir a la sustentabilidad de la industria salmonera nacional.

## ABSTRACT

Salmonid Rickettsial Septicemia (SRS) is a disease that affects salmonid species, caused by the bacterium *Piscirickettsia salmonis*, which causes losses of millions of dollars in the Chilean salmon industry. Since its detection, different strategies have been used to control it, including prophylaxis such as vaccines and treatments based in antibiotic. Despite this, new outbreaks of the disease continue being reported, suggesting that existing strategies are insufficient and that the development of new therapies to control this disease is necessary. A new approach is to focus, not on the pathogen as a therapeutic target, but on the host to disrupt the relationship with the pathogen and thus avoid the infection.

In this report we evaluated the effect of drugs that alter the distribution (U18666A) and intracellular (atorvastatine) content of cholesterol on the susceptibility/resistance of salmon macrophages to infections of *P. salmonis*. We determined doses and times of treatment that did not show cytotoxic or antibiotic effects and we evaluated the effect on the amount and intracellular distribution of cholesterol. Notably, the results indicate that both drugs were able to inhibit the infection with *P. salmonis*, which was evaluated through the inhibition of the classic cytopathic effects of the infection (vacuolization) as well as through the practically null presence of the bacteria within the macrophages after 5 days of infection. Future results will allow us to evaluate the potential of these data to become pharmacological therapies to contribute to the fight against SRS and contribute to the sustainability of the national salmon industry.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Septicemia rickettsial salmonídea (SRS) y su agente etiológico, *Piscirickettsia salmonis*

Chile es el segundo productor más grande de salmones en el mundo. A pesar de que esta industria ha enfrentado varias pérdidas económicas estos últimos años debido a enfermedades infecciosas. Entre estas enfermedades destaca la anemia infecciosa del salmón (ISA), una enfermedad de los salmones cultivados causada por el virus ISA (ISAV) que causó una crisis económica aguda en la industria del salmón entre 2007 y 2009 (Mardones y col., 2014). Sin embargo, la enfermedad infecciosa más importante del salmón de cultivo chileno es la Septicemia Rickettsial Salmonídea (SRS) o Piscirickettsiosis, la cual da cuenta de una pérdida anual por sobre los US\$700 millones (Feest, 2014). SRS fue descrita por primera vez en los inicios del cultivo del salmón Coho chileno (*Oncorhynchus kisutch*) en 1989, y desde ese entonces se ha encontrado también en el hemisferio norte, en todas las especies de salmones cultivados y algunas especies no salmónidas como la lubina europea y blanca (Contreras-Lynch & col., 2015), sin embargo, sólo tiene impacto económico en Chile. El agente causal de SRS es *Piscirickettsia salmonis*, una bacteria intracelular facultativa gram negativa, aeróbica, no móvil, con un diámetro de entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{m}$  y pleiomórfica, pero predominantemente cocoide. *P. salmonis* produce una infección sistémica en el pez, que se caracteriza por la colonización de múltiples órganos, incluyendo riñones, cerebro, hígado, bazo, intestino y branquias (Fryer & Hedrick 2003), como también lesiones hemorrágicas en la piel, músculo y órganos viscerales. Los peces infectados muestran una signología variadas y heterogénea, sin embargo

destacan la letargia, anorexia, oscurecimiento de la piel, dificultad respiratoria y nado superficial, lo que

termina en la muerte en la mayoría de los casos (Rozas & Enríquez 2014). Desde el punto de vista microbiológico, *P. salmonis* esta filogenéticamente relacionada a las bacterias *Legionella pneumophila* y *Coxiella burnetii* (Gómez y col., 2013), ambas patógenas intracelulares con las que comparte la capacidad de replicarse dentro de vacuolas citoplasmáticas al interior del hospedero (bacterial containing vacuole, BCV). En general, este tipo de patógeno bacteriano controla la formación de estas vacuolas lo que facilita su replicación intracelular y su sobrevivencia. La formación y mantenimiento de estas estructuras son dependientes de la capacidad de la bacteria para manipular el tráfico vesicular de la célula hospedera, en particular los compartimientos involucrados en el tráfico de membrana de endo y exocitosis (Isberg y col., 2009). La persistencia bacteriana o la proliferación en las BCVs puede verse incrementada por la alteración de los procesos de transporte de la célula hospedera por los factores secretados por las bacterias (proteínas efectoras) lo que facilita la adquisición de membrana y nutrientes (Tang, 2015). Estas proteínas efectoras son liberadas al ambiente o directamente dentro del citoplasma de la célula hospedera para controlar sus funciones a través del sistema de secreción tipo IVB de factores de virulencia.

## **1.2 Manejo, prevención y tratamiento de SRS**

Desde que SRS ha sido reconocido como el mayor patógeno de peces chilenos por más de 20 años en las pesquerías chilenas y centros de acuicultura (Sernapesca, 2013), se ha implementado un programa de vigilancia de salud específico para SRS que consiste en pruebas de diagnóstico periódicas para identificar la presencia de *P. salmonis* en los peces de centros de cultivos (Mandakovic y col., 2016). Los centros que detectan la presencia de *P. salmonis* realizan acciones monitoreadas por SERNAPESCA que incluyen la eliminación temprana y segura de los peces muertos y

los peces clínicamente enfermos y la reducción de la densidad de peces, así como el muestreo rutinario de los reproductores y la eliminación de los huevos de peces infectados (Bravo, 2012).

Una de las medidas de prevención más utilizadas para las enfermedades infecciosas en animales y humanos corresponden a las vacunas, las cuales han demostrado ser herramientas efectivas en los brotes de algunos patógenos. El uso de vacunas para salmones en Chile comenzó de manera exitosa cerca de 1980, pero luego esta práctica fue discontinuada hasta 1995 luego de la primera aparición de la enfermedad de la boca roja (ERD), infección bacteriana causada por el patógeno facultativo *Yersinia ruckeri* (Bravo, 2012). En el caso de SRS, hay actualmente más de 20 vacunas contra *P. salmonis* inscritas en el servicio agrícola ganadero chileno (SAG), sin embargo, recientes estudios (Marshall y col., 1998) han mostrado una baja eficacia de estas vacunas a largo plazo. Alternativamente, otra estrategia que se ha usado para prevenir SRS es la selección y cultivo de familias de peces con mayores niveles de resistencia/tolerancia a la infección con *P. salmonis*. Actualmente, la selección asistida por marcadores (MAS) y la selección asistida por genómica (GAS) son estrategias comúnmente utilizadas para este propósito (Banger y col., 2017; Meuwissen y col., 2016). Sin embargo, se ha publicado recientemente que la resistencia a *P. salmonis* es un rasgo poligénico y que la proporción de la varianza fenotípica explicada por marcadores es baja (Correa y col., 2015)

Hasta ahora los enfoques profilácticos que se han probado para combatir SRS han sido insuficientes, razón por la cual el control de SRS ha sido mayormente llevado a cabo usando estrategias de tratamientos farmacológicos. En este sentido, el uso de antibióticos, en particular florfenicol y oxitetraciclina, es el único tratamiento usado para

combatir SRS en la industria. De hecho, se ha reportado que más de un 80% de los antibióticos que se utilizan en la industria salmónica en Chile se debe a la presencia de *P. salmonis* (Bravo, 2012), llegando a usar más de 550 veces la cantidad de antibióticos usados en Noruega para obtener similares cantidades de salmón. (Esposito, 2015; Henríquez y col., 2016). Esta estrategia de drogas antimicrobianas dirigidas o enfocadas al patógeno (pathogen-directed antimicrobial drugs, PDAD) ha gatillado una severa desventaja, la cual es el desarrollo de resistencia bacteriana a las drogas y el consecuente resurgimiento de las enfermedades infecciosas (Schwegmann & Brombacher 2008). Además, los patógenos bacterianos intracelulares o facultativos, como *P. salmonis*, son más difíciles de tratar con los antibióticos convencionales que las bacterias extracelulares, porque los niveles de antibiótico pueden no alcanzar las concentraciones suficientes dentro de las células hospederas en contextos *in vivo*, requiriendo medicación alternativa o dosis mayores. Desafortunadamente, a pesar del incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos y a la creciente necesidad por nuevos antibióticos, el desarrollo de nuevas terapias ha disminuido (Stanton, 2013). Por lo tanto, en este escenario, la aparición de fenotipos de *P. salmonis* resistentes es de esperarse, y aunque diferentes aislados han mostrado una gran variación en sus patrones de sensibilidad antimicrobiana, ya hace bastante tiempo se ha descrito la existencia de cepas resistentes a la penicilina y estreptomina (Cvitanich y col., 1991), junto a una incidencia alta de resistencia a quinolonas (Henríquez y col., 2016). A pesar de los esfuerzos hechos por la industria para combatir SRS, la alta frecuencia de nuevos episodios epizooticos indica que el manejo actual, prevención y tratamiento, incluyendo el uso de vacunas y antibióticos, han tenido una limitada efectividad. Por lo tanto, se requieren nuevas estrategias alternativas para la prevención y tratamiento de SRS.

### **1.3 Nuevas estrategias para combatir infecciones intracelulares bacterianas**

Debido a la creciente resistencia a los actuales tratamientos de drogas dirigidas a patógenos (antibióticos), se hace necesario desarrollar intervenciones innovadoras para controlar infecciones intracelulares de manera urgente. Con este propósito, un nuevo enfoque terapéutico se enfoca en perturbar procesos biológicos y/o vías metabólicas del hospedero que son utilizadas por los patógenos intracelulares en algunas de las etapas de su ciclo de vida, (entrada, crecimiento intracelular y salida), a través del uso de drogas antimicrobianas dirigidas o enfocadas al hospedero (host-directed antimicrobial drugs, HDAD) (Czyz y col., 2014; Schwegmann y Brombacher 2008). Esta estrategia disminuye la presión selectiva hacia el patógeno, debido a que dichos agentes tienen el beneficio adicional de reducir el desarrollo de resistencia respecto de los antibióticos convencionales (Guler & Brombacher 2015), mientras la mayoría de los estudios de los blancos de las drogas dirigidas al hospedero se han concentrado en las infecciones virales, son estos mismos los que han levantado la posibilidad de aplicar enfoques similares en las infecciones intracelulares bacterianas (Schwegmann & Brombacher 2008). Estas estrategias combinan biología computacional, ciencias ómicas y genética tradicional y reversa, y han permitido identificar interacciones hospedero-patógeno y funciones del hospedero críticas para el establecimiento de las infecciones. Desafortunadamente, a pesar de los potenciales beneficios de estos enfoques promisorios, la identificación de las funciones críticas del hospedero para el establecimiento de una infección puede ser bastante costosa y a largo plazo. Para sobrellevar esta dificultad, algunos investigadores han realizado aproximaciones farmacológicas, utilizando bibliotecas de cientos de drogas que otorgan resistencia/tolerancia a células hospederas frente a infecciones causadas por

varios patógenos (Czyz y col., 2014). En particular, los estudios de Czyz y colaboradores, utilizando macrófagos de mamíferos infectadas con *Legionella pneumophila* y *Coxiella burnetii* en presencia de 640 drogas, describieron que en general, las drogas que confieren mayor capacidad de resistencia de estos macrófagos a las bacterias tienen como blanco principalmente tres tipos de funciones en el hospedero: receptores acoplados a proteína G, señales intracelulares de calcio y distribución del colesterol en las membranas. En particular, las drogas que afectan el tráfico de colesterol atenuaron fuertemente su entrada o multiplicación intracelular, sugiriendo que estas vías soportan su capacidad de infección. Por lo tanto, se hipotetiza que las drogas que perturban la homeostasis del colesterol en el hospedero podrían ser candidatos terapéuticos contra patógenos intracelulares relacionados filogenéticamente a *Legionella pneumophila* y *Coxiella burnetii*, como *P. salmonis*.

#### **1.4 Homeostasis celular de colesterol**

El colesterol es esencial para la estructura y el funcionamiento de la membrana en células animales. En la membrana plasmática, el alto contenido de colesterol (~30% del total de los lípidos de la membrana plasmática) influye en la fluidez y permeabilidad (Mukherjee y col., 1998). Adicionalmente, el colesterol también regula el tráfico endosomal y microdominios de membrana ricos en colesterol (balsas lipídicas), secuestrando proteínas involucradas en la transducción de señales, fusión de membrana y endocitosis/fagocitosis (Mouritsen y Zuckermann 2004; Sugii y col., 2006). Tal es la relevancia del colesterol que las células animales poseen dos sistemas para obtenerlo: 1) tomando colesterol exógeno a través de lipoproteína de baja densidad (LDL) y 2) por biosíntesis de colesterol endógeno. Las LDL son los mayores

transportadores de colesterol en la sangre, los que son reconocidos por receptores LDL en las células blanco. El complejo de colesterol LDL y su receptor son endocitados y luego fusionados con el lisosoma, donde el colesterol es hidrolizado para la biosíntesis de la membrana o esterificado para almacenamiento celular. Por otro lado, la síntesis de colesterol *de novo* ocurre en el retículo endoplasmático (alrededor de un 5% del total de los lípidos de membrana) donde todas las células lo sintetizan a través de un complejo proceso de 37 pasos que comienza con la vía del mevalonato y termina con una conversión de 19 pasos del lanosterol a colesterol. La biosíntesis del colesterol está directamente regulada por los niveles del colesterol, aunque estos mecanismos están parcialmente caracterizados (Simons & Ikonen 2000), por lo tanto, defectos en su biosíntesis pueden tener severas consecuencias. Afortunadamente, las estatinas (o inhibidores de la HMG-Coa reductasa) son drogas efectivas comúnmente usadas para inhibir la biosíntesis de colesterol endógeno en caso de una sobreproducción o un sobreconsumo (Bedi y col., 2016). Por su parte, otro aspecto relevante para la homeostasis del colesterol dependen de los mecanismos asociados a su tráfico intracelular. Se ha (Lu et al. 2015; Yévenes et al. 2012) descrito que la proteína de membrana lisosómica Niemann-Pick tipo C1 (NPC1) media el tráfico de colesterol endocitado desde el lisosoma a otros organelos y que su disfunción resulta en la acumulación de colesterol en el compartimiento del endosoma tardío/lisosoma, causando una enfermedad fatal (enfermedad NPC) (Schultz y col., 2016). Esta enfermedad puede ser inducida experimentalmente por la droga U18666A, la cual se une a la proteína NPC1 y bloquea el movimiento de colesterol hacia fuera del lisosoma (Lu et al. 2015; Yévenes et al. 2012). Auspiciosamente, la metil  $\beta$  ciclodextrina (M $\beta$ CD) ha sido evaluada como droga promisorio para reducir la acumulación

intracelular de colesterol en células mutantes tipo Niemann-Pick C (Rosenbaum y col., 2010).

### **1.5 Colesterol y susceptibilidad a la infección**

Algunos reportes han asociado la disponibilidad y distribución de colesterol a diferentes niveles de susceptibilidad a enfermedades infecciosas. Estudios epidemiológicos en humanos han encontrado una correlación positiva entre tratamiento de estatina y bajas tasas en mortalidad en pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* (Liappis y col., 2001). Otros estudios describen que los tratamientos de estatinas incrementan la respuesta protectora del hospedero en contra de patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis* en ratones (Guler y Brombacher 2015; Parihar y col., 2013), y muestran un efecto positivo en la respuesta al virus de Hepatitis C e inmunodeficiencia adquirida en humanos (Bader y col., 2008; Schwegmann & Brombacher 2008). Sin embargo, también ha sido reportado que el colesterol no es esencial para la invasión y replicación intracelular de *S. Typhimurium* y *C. trachomatis*, pero juega un rol en las interacciones entre *C. burnetii* y las células hospederas (Gilk y col., 2013), por lo tanto, el efecto de las estatinas en reducir la susceptibilidad (aumentar la resistencia/tolerancia) hacia infecciones sugiere ser dependiente de la naturaleza de los patógenos. Por otro lado, el tráfico y la distribución intracelular de colesterol también parece ser importante para la susceptibilidad de diferentes patógenos. Por ejemplo, se ha reportado que ratones deficientes de la proteína NPC1 son naturalmente resistentes a la infección con la bacteria intracelular *Brucella abortus* (Watarai y col., 2002), lo cual junto con el conocimiento de que la droga U18666A es capaz de inhibir las infecciones del virus Ébola (Lu y col., 2015), sugieren que el tráfico

de colesterol parece ser crítico para el establecimiento de infecciones de algunos patógenos intracelulares.

Considerando que *P. salmonis* está estrechamente relacionada filogenéticamente a *L. pneumophila* y *C. burnetii* y comparte con ellas un gran número de genes ortólogos (incluidos factores de virulencia y sistemas) (Pulgar y col., 2015), los datos sugieren que el uso de drogas HDAD que afectan la disponibilidad y distribución del colesterol puede ser una herramienta promisoría para combatir SRS. Desde que *P. salmonis* es capaz de infectar, replicar y propagar en vacuolas contenedoras de *P. salmonis* (PCV) en macrófagos de salmón (McCarthy y col., 2008), la línea celular SHK-1 es un modelo de estudio ideal para la alteración en la homeostasis de colesterol y su efecto en una infección de *P. salmonis*. En este proyecto, se usaron estatinas y la droga U18666A para perturbar la biosíntesis de colesterol y su distribución intracelular respectivamente, y se evaluó la susceptibilidad de macrófagos de salmón frente a infecciones de *P. salmonis*.

Finalmente, estas estrategias deberían proveer las bases para entender los roles de la disponibilidad y distribución celular de colesterol en la susceptibilidad de macrófagos de salmón a infecciones de *P. salmonis* y contribuirá a terapias futuras que se pueden combinar con tratamientos convencionales con drogas PDAD para eliminar eficientemente el patógeno invasor.



### **Hipótesis**

Drogas que modifican la abundancia y distribución de colesterol en macrófagos de salmón le confieren resistencia a la infección con *P. salmonis*.

### **Objetivos**

1. Determinar el efecto de atorvastatina y U18666A sobre la viabilidad de macrófagos de salmón y *P. salmonis*.
2. Determinar el efecto de atorvastatina y U18666A sobre la abundancia y distribución de colesterol en macrófagos de salmón.
3. Determinar el efecto de la abundancia y distribución de colesterol sobre la susceptibilidad de los macrófagos de salmón a la infección por *P. salmonis*.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Materiales

**2.1.1 Líneas celulares.** Durante este estudio se usó la línea celular modelo SHK-1 (ECACC 971111106). Esta línea celular fue establecida a partir del cultivo de macrófagos del riñón proximal (primer tercio) de Salmon del Atlántico (*Salmo salar*) (Dannevig y col., 1997). Estas se mantuvieron en frascos de cultivo T25 sin antibióticos a 18 °C en medio Leibovitz's L-15 (Thermo Fisher Scientific) suplementado con Suero Bovino Fetal (FBS) al 5 % suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol (0,1 mM).

**2.1.2 Células procariontes.** En esta investigación se utilizó la bacteria *P. salmonis* cepa LF-89, adquirida en la ATCC bajo el código VR-1361. Esta cepa se mantuvo de manera aeróbica en medio líquido con caldo caso (30 g/l), NaCl (15 g/l), L-cisteína (1 g/l) y FeCl<sub>2</sub> (10 mg/l) (medio sAB) a 18 °C con agitación continua a 180 rpm. El crecimiento se monitoreó por densidad óptica a 600 nm (OD 600) cada día durante 12 días para construir curvas de crecimiento (Pulgar y col., 2015b). La pureza del cultivo se determinó mediante ensayos moleculares de PCR-RFLP desarrollado en nuestro laboratorio (Mandakovic y col., 2016).

**2.1.3 Fluoróforos.** Faloidina (Alexa Fluor 546, Thermo Fisher) es un péptido bicíclico que se une a microfilamentos de actina que emite a 573 nm. SYTOX es una tinción de alta afinidad por los ácidos nucleicos, emite a 523 nm (Thermo Fisher). Filipina III es un macrólido de polieno que ejerce su acción al unirse a colesterol, emite a 480 nm (Sigma).

**2.1.4 Partidores.** La amplificación por PCR de las secuencias de interés fue realizada con partidores diseñados utilizando el programa Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International) y sintetizados por Macrogen Korea. Las parejas de partidores poseen una temperatura de melting ( $T_m$ ) que difieren en menos de 4 °C, no forman dímeros de partidores ni autocomplemento de bases según las predicciones del programa utilizado en su diseño. Las secuencias sentido y antisentido se expresan desde el extremo 5' al 3', ELF-1F CACCACCGGCCATCTGATCTACAA; ELF-1R TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC y GlyA-F GACTCGCGTACCATTGCAGA; GlyA-R GCACACGCGGACTCGTATAA.

**2.1.5 Sales y reactivos.** Todas las demás sales o reactivos no especificados fueron adquiridos en Merck, Sigma o Winkler Ltda.

## **2.2 Métodos**

**2.2.1 Ensayo Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).** El análisis de viabilidad celular se realizó en placas de 24 pocillos (Falcon) a través de la cuantificación de un marcador de la actividad mitocondrial; MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Mosmann, 1983). Para optimizar este ensayo se sembraron 30.000, 60.000 y 120.000 células en 400  $\mu$ l de medio Leibovitz's L-15 suplementado y se dejaron 24 horas a 18 °C para que éstas se adhirieran a la superficie de los pocillos. Luego de este tiempo, se añadió 40  $\mu$ l de una solución de MTT a 5 mg/ml y se incubó a 18 °C por 0, 1, 3, 5 y 7 horas; una vez terminada la incubación se procedió a agregar 400  $\mu$ l de una solución de SDS al 10 % en 0,01 M HCl y a resuspender por pipeteo los cristales de formazan presentes en cada pocillo. Finalmente se midió la absorbancia a 570 nm y 690 nm en el lector de microplacas Tecan Infinite 200 PRO. Los ensayos de MTT para las curvas de viabilidad se

realizaron de esta misma manera con la salvedad de que se sembraron las células señaladas en cada experimento y se incubaron con la solución de MTT por 5 horas.

**2.2.2 Ensayo de viabilidad en células SHK-1.** Se sembraron 80.000 células SHK-1 en placas de 24 pocillos en 400  $\mu$ l de medio Leibovitz's L-15 suplementado y se dejaron 24 horas a 18 °C para que éstas se adhiriesen. U18666A y atorvastatina se añadieron a diferentes concentraciones finales en el medio para evaluar la viabilidad/toxicidad durante diez días. Estas curvas finalizaron realizando un ensayo MTT para medir la viabilidad en cada caso. Los análisis estadísticos se realizaron mediante prueba de T Student; comparando la viabilidad en cada tiempo respecto de la condición no suplementada (control).

**2.2.3 Ensayo de viabilidad en *P. salmonis*.** Para llevar a cabo estos experimentos se realizó un subcultivo de *P. salmonis* proveniente de un cultivo de 7 días, del cual se tomaron 7  $\mu$ l (1 % volumen final del ensayo) y se añadieron a 700  $\mu$ l de medio sAB en placas multipocillos de 48 pocillos (Falcon). El medio sAB se suplementó con U18666A y atorvastatina en las concentraciones seleccionadas y se mantuvo a 18 °C con agitación de 180 rpm por diez días. Diariamente se midió la densidad óptica a 600 nm en el lector de microplacas Tecan Infinite 200 PRO, con lo que se construyeron las curvas de viabilidad. Los análisis estadísticos se realizaron mediante prueba de T Student; comparando la viabilidad en cada tiempo respecto de la condición no suplementada (control).

**2.2.4 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).** Cubreobjetos de vidrios de 12 mm se lavaron con una solución de HCl 1 N por una hora a temperatura ambiente y con agitación, luego se realizaron seis lavados con agua destilada cada uno de quince minutos, se sometieron a autoclave para esterilización y luego se incubaron con 100  $\mu$ l

de la proteína del factor de fijación por una hora a temperatura ambiente, se lavó dos veces con PBS y células SHK-1 se sembraron en ellos en una densidad de 50.000 células en una placa multipocillos de 24 pocillos. Después de que las células se adhirieron a esta superficie, alrededor de 24 horas, se suplemento el medio Leibovitz's L-15 con U18666A y atorvastatina y se mantuvo a 18 °C por el tiempo determinado. Posterior a esto se realizó la IFI según lo descrito previamente con algunas modificaciones (Yévenes y col., 2012). Brevemente, entre cada uno de los siguientes pasos se realizaron lavados con PBS por cinco minutos, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS por 30 minutos, se trataron con glicina a una concentración de 2,5 mg/ml durante 20 minutos, se permeabilizaron con PBS más saponina al 0,1 % por 15 minutos, se tiñeron con filipina (25 µg/ml), faloidina (1:200) y SYTOX (1:70000) por 30 minutos y finalmente se montaron sobre portaobjetos usando 5 µl de medio de montaje de fluorescencia. Estas preparaciones se observaron en el microscopio de epifluorescencia Nikon eclipse 50i con aumento de 100x bajo aceite de inmersión y las imágenes obtenidas se procesaron con el programa Fiji Image J (GNU General Public License).

**2.2.5 Cuantificación de colesterol intracelular.** Previo a la cuantificación de colesterol se evaluaron distintos métodos de preparación de las muestras, para lo cual se sembraron cantidades conocidas de células en placas de 24 pocillos, algunas de estas células se despegaron de los pocillos con tripsina más EDTA al 0,25 % (lisis química sin extracción), y otro grupo se despegaron al ser raspadas (lisis mecánica sin extracción). A un subgrupo de las células raspadas (lisis mecánica con extracción), todo esto con material de vidrio, se le agregaron 200 µl de hexano/isopropanol (3:2 v/v) y se incubó por 15 minutos, posteriormente, se agregó 100 µl de cloroformo con tritón

X-100 al 2 %, se centrifugo 5 minutos a 35000 rpm, se conservó el sobrenadante y se secó bajo corriente de nitrógeno. Se tomaron los tres grupos de células y se usó el kit Amplex Red cholesterol Assay (Molecular Probes) según las indicaciones del fabricante en placas de 96 pocillos negras con fondo blanco, una vez lista la incubación se utilizó el lector de microplacas Tecan Infinite 200 PRO para excitar las muestras a 560 nm y capturar la fluorescencia a 590 nm.

Para la cuantificación de colesterol intracelular luego de los tratamientos farmacológicos las células SHK-1 se lavaron con PBS y se desprendieron de la superficie con tripsina más EDTA al 0,25 %, estas células se centrifugaron por 5 minutos a 3.000 rpm y el pellet resultante se resuspendió en 100 µl de reaction buffer 1x, de los cuales 50 µl se utilizó para medir colesterol y los restantes 50 µl se usó para medir proteínas por el método Bradford adicionando 50 µl de buffer RIPA más inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las mediciones de colesterol y de proteína total se realizaron en un lector de microplacas Tecan Infinite 200 PRO, como se indicó más arriba en el caso de las mediciones de colesterol. Los análisis estadísticos se realizaron con un ANNOVA de una vía con una comparación posterior de Bonferroni,  $P < 0,05$ .

**2.2.6 Ensayos de infección *in vitro*.** Para realizar las infecciones con *P. salmonis*, 100.000 células SHK-1 se sembraron en placas de 6 pocillos (Falcon), luego de 24 horas el medio Leibovitz's L-15 se suplementó con U18666A y atorvastatina o mezclas de estas drogas y de manera simultánea se inóculo con *P. salmonis* en un MOI de 100. A los 5 días las células infectadas se lavaron con PBS, se centrifugaron por 5 minutos a 3000 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se sometió a lisis celular según las indicaciones del fabricante del kit DNeasy Blood and Tissue para DNA

(Qiagen) para extraer ADN genómico. Para medir la carga bacteriana se amplificaron por qPCR genes constitutivos (serina hidroximetil transferasa, para *P. salmonis* y el factor de elongación 1 para células SHK-1) tanto para las células SHK-1 y *P. salmonis*, utilizando el kit Terra PCR (Clontech). La reacción de qPCR se realizó en un volumen de 20  $\mu$ L que contenían 20 ng del ADN genómico total extraído, 10  $\mu$ L del mastermix incluido en el kit, 0,4  $\mu$ L de una mezcla de los partidores forward y reverse (10 mM). El PCR se llevó a cabo en el equipo AriaMx real-time PCR System con el siguiente perfil térmico: 3 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 5 segundos a 95 °C, 10 segundos a 61 °C y 10 segundos a 68 °C, finalizando con una curva de melting de un ciclo de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 65 °C y 30 segundos a 95 °C. Con los resultados del qPCR se normalizaron los  $\Delta$ Cq de las amplificaciones de las muestras bacterianas con las amplificaciones de las muestras de las células SHK-1 y se expresaron en porcentaje del control para ser graficadas. Durante el curso de las infecciones se tomaron fotografías en campo claro en el microscopio confocal Nikon A1R+ en un aumento 20x y se analizaron en el programa Fiji Image J (GNU General Public License). Las diferencias significativas se evaluaron con ANNOVA de dos vías con un  $P < 0,001$ .

### 3. RESULTADOS

El objetivo general de esta investigación fue examinar los efectos de la disponibilidad y distribución del colesterol en la susceptibilidad de macrófagos de salmón frente a una infección de *P. salmonis*. Sin embargo, el metabolismo de colesterol no ha sido caracterizado en macrófagos de salmón, por lo que el primer objetivo para lograr caracterizarlo fue determinar el efecto de drogas que lo alteran usando como modelo la línea celular SHK-1. La alteración de la biosíntesis de colesterol endógeno se inducirá con inhibidores de la enzima HMG-CoA reductasa (estatinas), mientras que la distribución de colesterol intracelular se alterará con el inhibidor de la proteína NPC1 (U18666A) que produce acumulación en compartimientos endosomales y lisosomales (generando el fenotipo de la enfermedad Niemann-Pick C).

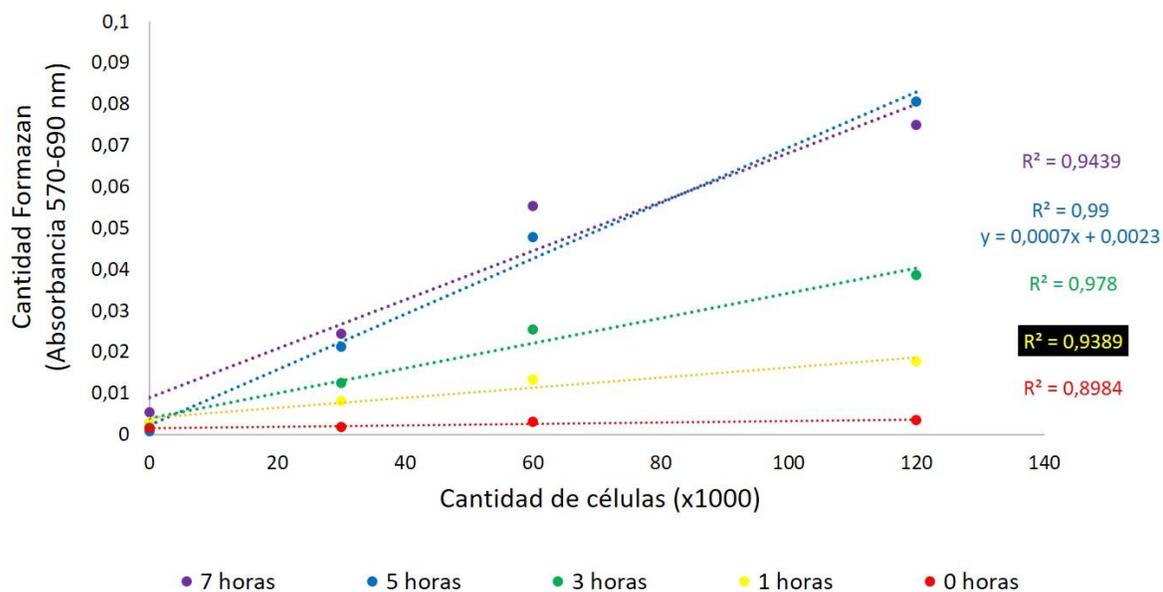
Considerando que el colesterol es un elemento esencial para la vida de los animales, es necesario considerar primeramente, que las concentraciones a utilizar de los fármacos que perturban el metabolismo de colesterol en las infecciones de macrófagos de salmón con *P. salmonis* no afecten la viabilidad celular del hospedero ni del patógeno, ya sea esto provocado por los cambios producidos en el mismo colesterol, como también, por concentraciones tóxicas que por mecanismos desconocidos provoquen daño. Para esto se determinarán las dosis más altas y los tiempos de exposición a estas drogas que no afecten la viabilidad celular de los macrófagos de salmón y ni de *P. salmonis*, por lo que el primer objetivo será medir la viabilidad de las células SHK-1 a través de ensayo MTT y curvas de crecimiento microbiano, respectivamente. Puesto que este ensayo está diseñado para células de mamíferos (endotermos) que crecen a 37 °C, es que se optimizó este ensayo para esta línea celular de salmones (poiquilotermos) que en específico crecen entre 12 y 18

°C. A continuación, se muestran los resultados asociados al **objetivo 1: Determinar el efecto de las drogas que alteran la abundancia y distribución de colesterol celular sobre la viabilidad de macrófagos de salmón y *P. salmonis***

### **3. 1. Optimización de ensayo MTT para células SHK-1**

El ensayo de MTT consiste en un ensayo colorimétrico que evalúa la actividad metabólica de las células lo que está directamente relacionado con su viabilidad celular. Ya que diferentes tipos celulares tienen metabolismos diferentes, es que fue necesario inicialmente optimizar este ensayo para las células SHK-1.

Los resultados de las curvas de calibración de muestran en la figura 1. Debido a que los valores absolutos de absorbancia no deben estar cercanos al límite de detección de la técnica es que solo se consideraron como más confiables las curvas de las 3, 5 y 7 horas de incubación para los análisis posteriores. Se analizaron los coeficientes de determinación R cuadrado para cada una de las curvas de calibración y se seleccionó la curva de 5 horas por tener el valor más alto del coeficiente ya mencionado y una mayor pendiente entre las variables medidas, utilizándose la ecuación de la recta  $y = 0,0007x + 0,0023$  para todos los cálculos futuros de viabilidad. Cabe mencionar que no se ensayaron tiempos más prolongados pues el MTT es un compuesto tóxico que luego de siete horas de incubación, comenzaron a generar la manifestación de signos de un claro efecto citotóxico con la consecuente muerte celular posterior por parte de las células SHK-1 (datos no mostrados).



**Figura 1. Optimización de ensayo MTT para células SHK-1.** Gráfico que representa la relación lineal entre la cantidad de células presentes y la cantidad de formazan medido en cada caso. La leyenda corresponde a horas de incubación de MTT junto a las células SHK-1. Los datos obtenidos se representan con promedio y error estándar para un  $n = 10$ .

### **3.2 Viabilidad de células SHK-1 con tratamiento de fármacos**

Se ha reportado con anterioridad el efecto antiproliferativo de las estatinas en variadas líneas celulares a concentraciones algunos órdenes de magnitud mayor que las concentraciones utilizadas como tratamiento para modificar el metabolismo de colesterol. Es por esta razón que el filtro inicial para definir las concentraciones a utilizar para los fármacos fue la viabilidad celular de macrófagos de salmón.

Las concentraciones utilizadas para las pruebas de viabilidad (Tabla 1) se seleccionaron luego de una búsqueda bibliográfica. Los resultados encontrados indican que son muy pocos los estudios que han reportado el uso de atorvastatina o U18666A en macrófagos de mamíferos ni en células de peces. Las concentraciones exhibidas en la tabla se utilizaron para diferentes propósitos en distintas líneas celulares, lo más cercano a nuestros objetivos en el uso de atorvastatina es el estudio de Ellesat y colaboradores (2010), quien utiliza concentraciones entre 0,39 y 400  $\mu\text{M}$  para evaluar la viabilidad celular de hepatocitos de trucha arcoíris. Los propósitos del uso de U18666A en aquellas investigaciones están muy relacionados con los objetivos aquí expuestos, aun así, se puede ver evidentemente que las concentraciones de esta droga usadas como tratamiento son inferiores a las usadas con atorvastatina.

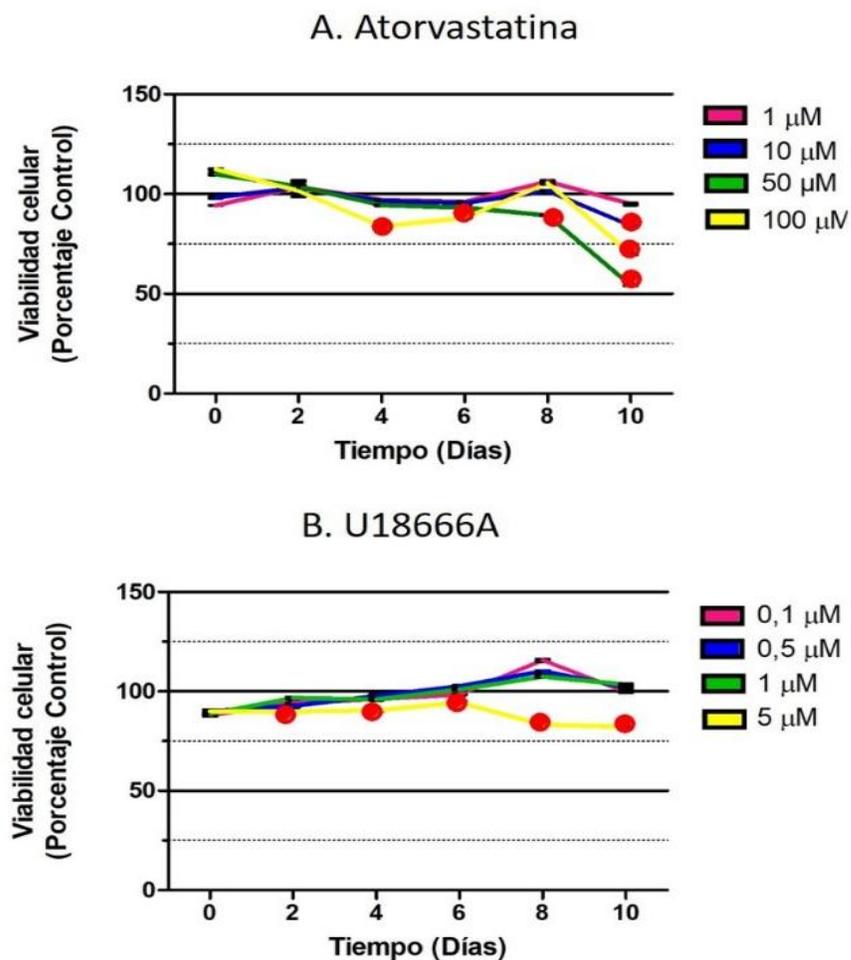
Dado que la mayoría de estas publicaciones utiliza como modelo de estudio líneas celulares de mamíferos, es que se tomaron estas concentraciones como indicios para determinar los rangos de concentraciones de fármacos ensayados más adelante. Para atorvastatina se decidió mantenerse dentro del rango de 0 y 100  $\mu\text{M}$ , y en cuanto a U18666A, se determinó como rango las concentraciones entre 0 y 5  $\mu\text{M}$ .

**Tabla 1:** Referencias de rangos de concentraciones de fármacos usados en otros estudios.

Fármaco	Concentración	Línea celular	Tejido/órgano	Especie	Referencias
atorvastatina	0,39 – 400 $\mu$ M (Viabilidad celular)	cultivo primario	hepatocito	trucha arcoíris	(Ellesat y col., 2010)
	100, 200, 400 $\mu$ M (Viabilidad celular)	Miocitos	músculo	humano	(Skottheim y col., 2008)
	0 – 40 $\mu$ M (Expresión genes metabolismo colesterol)	HepG2	hígado	humano	(Stormo y col., 2014)
U18666A	1-5 $\mu$ M (Susceptibilidad a infección)	HeLa	cérvix uterino	humano	(Mulye y col., 2017)
	0,03 – 4,5 $\mu$ M (Alteración metabolismo colesterol)	CHO-K1	ovario	hámster	(Lu y col., 2015)
	0,25 – 0,5 $\mu$ M (Estudio enfermedad Niemann-Pick)	CHO	ovario	hámster	(Pipalia y col., 2006)

Los efectos citopáticos (vacuolización y despegue celular) y la viabilidad relativos a la infección de SHK-1 con *P. salmonis* han sido caracterizados en nuestro laboratorio y ocurren entre los 3 y 10 días luego de la inoculación bacteriana, por lo cual los análisis de viabilidad tanto para macrófagos de salmón como para bacterias se realizaron a un tiempo máximo de diez días. Así entonces, luego de diez días de tratamiento con atorvastatina y U18666A se observa que ambos fármacos son capaces de afectar la viabilidad de las células SHK-1 de una manera dosis y tiempo dependiente (Figura 2). En el caso de atorvastatina, la concentración de 1  $\mu\text{M}$  no presentó diferencias significativas con respecto al control para ninguno de los tiempos ensayados. Las concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{M}$  manifestaron diferencias significativas a partir del día 6 y 100  $\mu\text{M}$ , a partir del día 4, disminuyendo la viabilidad en el día 10 un 15,8; 30 y 45,6 %, respectivamente.

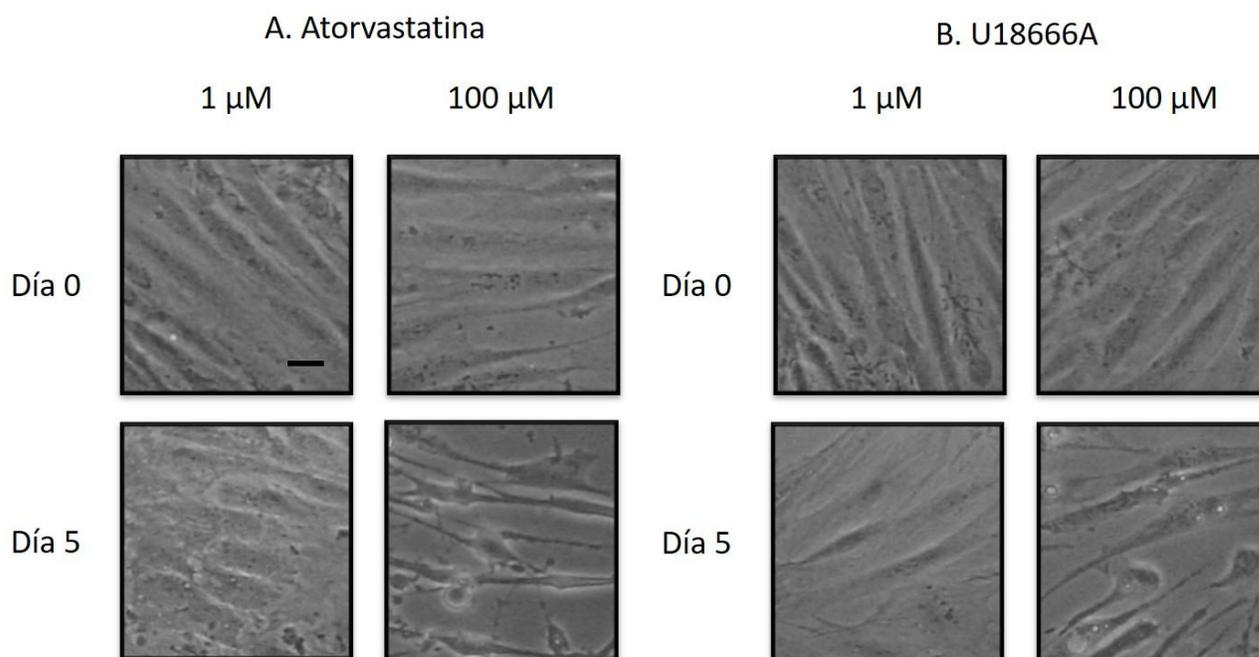
Por su parte, U18666A mostró diferencias significativas en la concentración de 5  $\mu\text{M}$  desde el día 2 en adelante, disminuyendo la viabilidad en un 17,8 %, las demás concentraciones no manifestaron diferencias respecto al control. Utilizando estas curvas de viabilidad es que se determinaran las concentraciones y tiempos máximos a ensayar en los próximos experimentos, con la seguridad de que los tratamientos usados no afectarían la viabilidad celular y cualquier efecto observado se deberá a las demás variables dentro del ensayo.



**Figura 2. Viabilidad de células SHK-1 con tratamiento de fármacos.** Concentraciones de **(A)** atorvastatina y **(B)** U18666A se utilizaron durante 10 días como tratamiento para SHK-1. Para medir viabilidad se realizó ensayo de MTT, los datos obtenidos se representan con promedio y error estándar para un  $n = 10$ . Las diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) se indica con círculos rojos.

Con los datos obtenidos fue posible seleccionar concentraciones y tiempos máximos de exposición de los fármacos que no afectan la viabilidad celular en macrófagos de salmón, sin embargo, se consideró como un segundo filtro que las drogas usadas no generasen efectos en la morfología o la distribución celular como indicador de daño. Para alcanzar este objetivo, se tomaron fotografías en campo claro de células suplementadas para cada tiempo de exposición y concentraciones evaluadas. En la figura 2 se muestra los días 0 y 5 de tratamiento y la concentración de 1  $\mu\text{M}$ . La decisión de realizar los análisis a los 5 dpi se debe a que los ensayos de infección puestos a punto en el laboratorio previamente han demostrado que a los 5 dpi es posible distinguir claramente la presencia del efecto citopático clásico de vacuolización que contiene a *P. salmonis* (PCV) en SHK-1. Las fotografías de la figura 3 son imágenes representativas de los puntos indicados en la figura 2, logrando visualizar células con una morfología alargada y aplanada tipo fibroblasto bipolar, distribuidas una junto a otra célula que se propagan hasta formar una monocapa de una orientación única, que es lo que se encuentra descrito para esta línea celular. A medida que transcurre el tiempo con las concentraciones de fármacos que muestran un efecto significativo sobre la viabilidad de los macrófagos, se observa como la morfología cambia como también la distribución de las mismas. Los macrófagos cambian a una forma menos elongada multipolar, incluso es posible ver células que exhiben zonas considerablemente contraídas en los extremos con un centro abultado, lo que es lo opuesto a lo esperado para una célula en condiciones saludables. Por otra parte, la distribución de los macrófagos también varía frente a los tratamientos farmacológicos, estas células ya dejan de formar una monocapa y solo se ven células aisladas casi sin contacto con sus vecinas. Todo lo anterior indica que las drogas utilizadas, además de afectar la viabilidad, causan un efecto tanto en la distribución como en la morfología

celular. Existen tanto tiempos de exposición como concentraciones de fármacos que, a pesar de que no muestran cambios en la viabilidad celular, afectan su morfología o su distribución. Es así que usando los criterios señalados se usó 1  $\mu\text{M}$  de cada fármaco durante 5 días de exposición para los siguientes experimentos en células SHK-1.

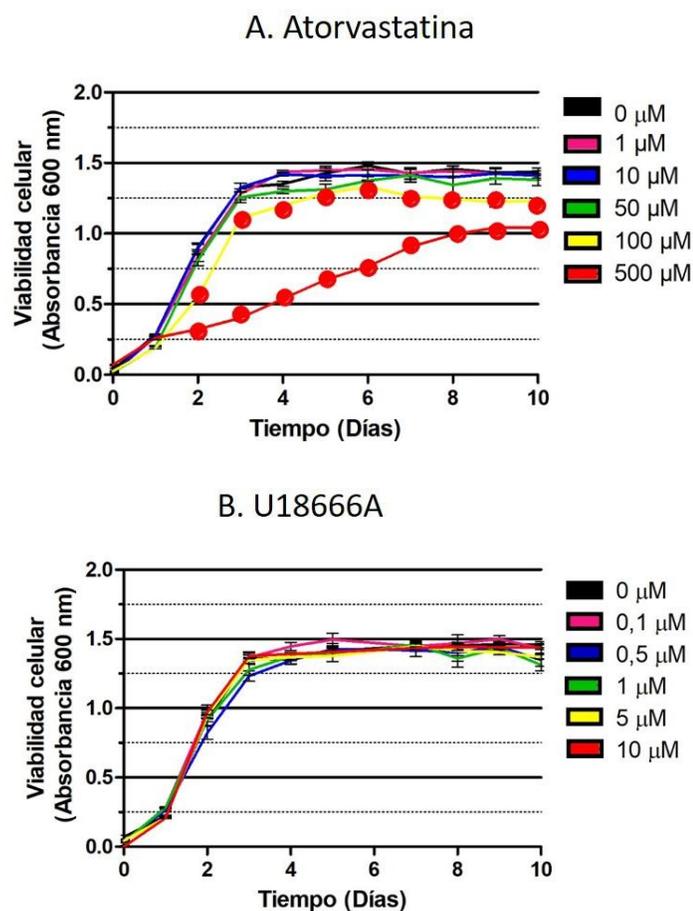


**Figura 3. Morfología y distribución de células SHK-1.** Se muestran fotografías representativas para algunas concentraciones y tiempos seleccionados utilizados por 10 días como tratamiento para SHK-1, las cuales fueron tomadas a un aumento de 20x. La barra de tamaño corresponde a 5  $\mu$ m.

### 3.3 Viabilidad de *P. salmonis* con tratamiento de fármacos

Una vez que ya se determinaron los tiempos y concentraciones que no afectan la viabilidad de macrófagos de salmón, fue necesario realizar este mismo análisis para el otro agente biológico de este sistema, *P. salmonis*, asegurándose que los efectos observados en las futuras infecciones no son atribuibles a características antibióticas de las drogas utilizadas.

Se cultivó *P. salmonis* durante diez días con distintos tratamientos farmacológicos, tiempo durante el cual se midió su absorbancia para determinar el crecimiento bacteriano de estos cultivos. Como se puede apreciar en la figura 4A, atorvastatina causa un efecto en el crecimiento bacteriano en las concentraciones de 500 y 100  $\mu\text{M}$  con respecto al control, disminuyendo la absorbancia en la fase estacionaria para el día 10 en un 14 y 27 % respectivamente, estos tratamientos también reducen el tiempo generacional y la carga bacteriana, pero de igual forma estas dos curvas muestran las fases de latencia, exponencial y estacionaria. En el caso del U18666A no se presentan diferencias significativas para ninguna de las concentraciones ensayadas respecto de la curva control. Estos resultados en su conjunto permiten confirmar que la concentración 1  $\mu\text{M}$  de cada fármaco no poseen efecto citotóxico ni antibiótico sobre las células SHK-1 y *P. salmonis*, respectivamente. Con esta información se procedió a determinar el efecto de las drogas sobre la distribución y concentración intracelular de colesterol.



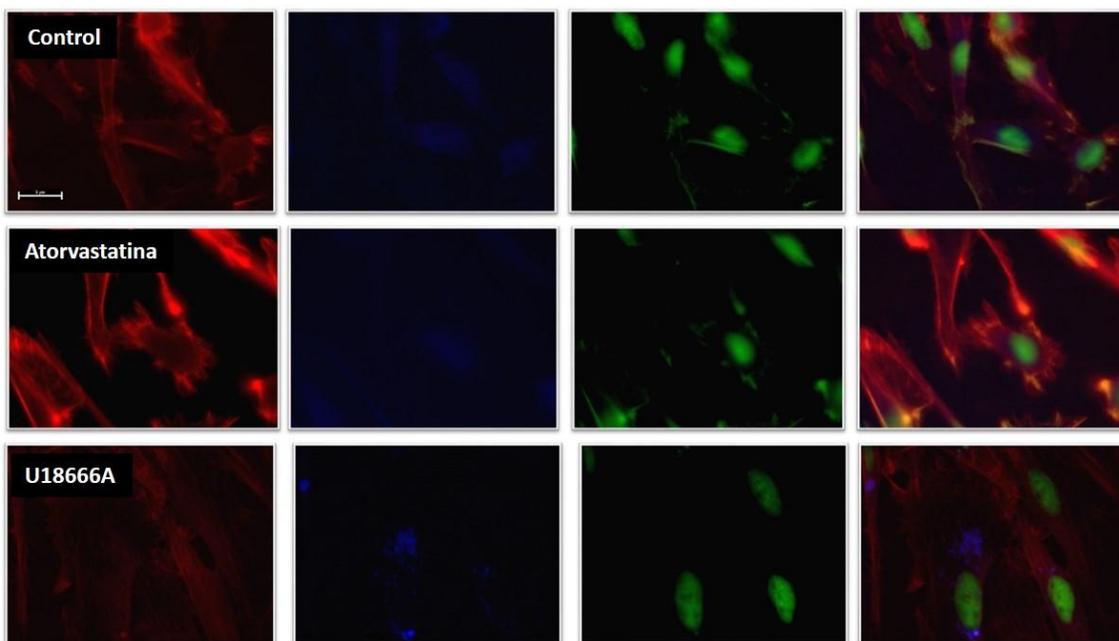
**Figura 4. Viabilidad de *P. salmonis* con tratamiento de fármacos.** Concentraciones de **(A)** atorvastatina y **(B)** U18666A se utilizaron durante 10 días como tratamiento para *P. salmonis*. Para medir viabilidad se midió absorbancia a 600 nm, los datos obtenidos se representan con promedio y error estándar para un  $n = 5$ . Las diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) se indica con círculos rojos.

El colesterol es el mayor constituyente de las membranas plasmáticas de los organismos eucariontes, está involucrado en las características fisicoquímicas de las membranas y forma zonas de microdominios que participan en variados procesos biológicos. Existen algunos métodos para identificar el lugar en donde se encuentra el colesterol en las células como, por ejemplo, sondas radioactivas, fotoafines o fluorescentes. La filipina es un polieno que está dentro de las sondas fluorescente y se une al colesterol, pero no a los otros lípidos presentes en las membranas, esta sonda junto a un kit bioquímico fluorescente serán las herramientas utilizadas para llevar a cabo el **objetivo 2: Determinar el efecto de drogas que alteran el colesterol sobre su distribución y disponibilidad en células macrófagos de salmón**

#### **3.4 Distribución subcelular y disponibilidad de colesterol**

Ya habiendo determinado las dosis y tiempos no citotóxicos para SHK-1 y *P. salmonis*, y continuando con la caracterización del metabolismo de colesterol en los macrófagos de salmón, es que el próximo paso fue establecer el efecto de las drogas sobre distribución y abundancia de colesterol. Para esto, se utilizaron las concentraciones de fármacos determinadas anteriormente como tratamiento en las células SHK-1, luego de lo cual se sometieron a ensayos de fluorescencia para determinar tanto la distribución subcelular como la disponibilidad de colesterol al interior de las células. Para la distribución subcelular se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia indirecta, cuyos resultados se muestran en la figura 5. En las células sin suplemento de fármacos es posible ver la marca de filipina en toda la superficie celular, representando la distribución celular esperado para el colesterol, siendo esta marca muy similar a la vista por parte de faloidina que señala el citoesqueleto de las células al unirse a filamentos de actina. El tratamiento con atorvastatina mantiene la marca de filipina de

manera bastante similar al control, sin observarse diferencias evidentes. Al suplementar las células con U18666A se puede ver como la marca de filipina se acumulada en el sector perinucleares, como se espera para el fenotipo Niemann-Pick. Con estos resultados podemos saber cómo este fármaco modifica la distribución subcelular de colesterol, pero aun así falta todavía saber cuál es el nivel de colesterol al interior de las células luego de estos tratamientos. Debido a que la IFI no es una buena herramienta para realizar cuantificación es que se asumió el desafío de poner a punto un protocolo de determinar celular de colesterol mediante una batería de determinación bioquímica de colesterol plasmático.



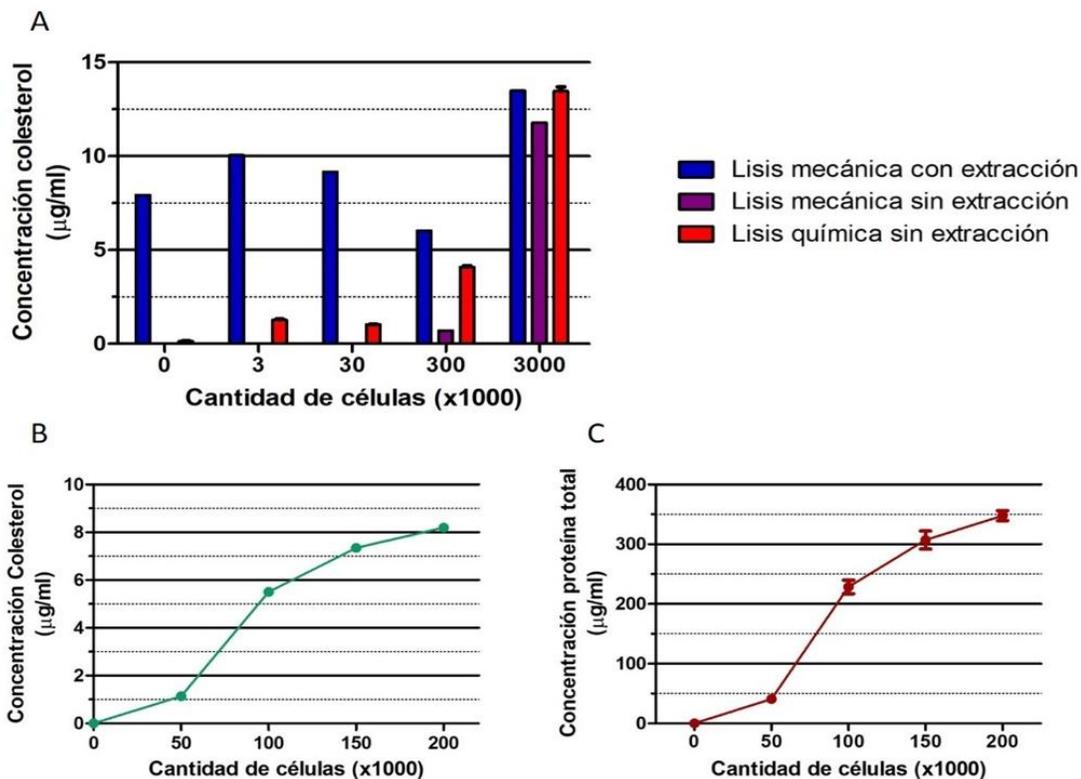
**Figura 5. Distribución celular de colesterol.** Fotografías de células SHK-1 obtenidas en un microscopio de epifluorescencia a un aumento de 100x bajo aceite de inmersión. La primera fila muestra células controles, la segunda fila corresponde a células tratadas con U18666A (1  $\mu$ M) y atorvastatina (1  $\mu$ M) por 5 días, todas las células fueron teñidas con faloidina (rojo), filipina (azul) y SYTOX (verde); la barra de tamaño corresponde a 5  $\mu$ m.

### **3.5 Medición de proteínas y colesterol en células SHK-1**

Como se mostró en la sección anterior, las inmunofluorescencias no representan una técnica que permita cuantificar de manera adecuada la cantidad de colesterol que existe al interior de los macrófagos de salmón, por lo tanto, se puso a punto el uso del kit Amplex Red Cholesterol Assay para este propósito. Para esto se cultivaron números conocidos y crecientes de células ( $3 \times 10^1$ - $3 \times 10^3$ ) y se probaron tres distintos métodos para lisar los cultivos celulares para la cuantificación de colesterol con el kit (Figura 6a), esperando un aumento proporcional en la cantidad de colesterol registrado. La lisis mecánica con extracción de lípidos presentó un comportamiento que no se condice con la cantidad de células presentes en las muestras, presentando valores incluso en el control negativo. La lisis mecánica sin extracción mostró valores de concentración de colesterol solo en las dos muestras que tenían los números más altos de células, por lo que bajo límite de detección nos permitió descartar su uso. Por otra parte, la lisis química sin extracción exhibió valores de concentraciones de colesterol intracelular en todas las muestras ensayadas, presentando un aumento de los valores conforme aumentan la cantidad de células en las muestras. Dada el mejor límite de detección del protocolo y la sensibilidad en el rango de las 100.000 células (número usado en los ensayos de infección) se seleccionó la lisis química sin extracción para los futuros ensayos.

Con el protocolo seleccionado se midió el contenido de colesterol en un rango estrecho de células SHK-1, cercano al rango de uso para los ensayos futuros de infección, obteniendo valores de colesterol directamente proporcionales al aumento de células. Del mismo modo se midió para cada número de células definido su contenido de

proteínas mediante el método de Bradford de manera de normalizar los valores de colesterol (Figura 6b y 6c).



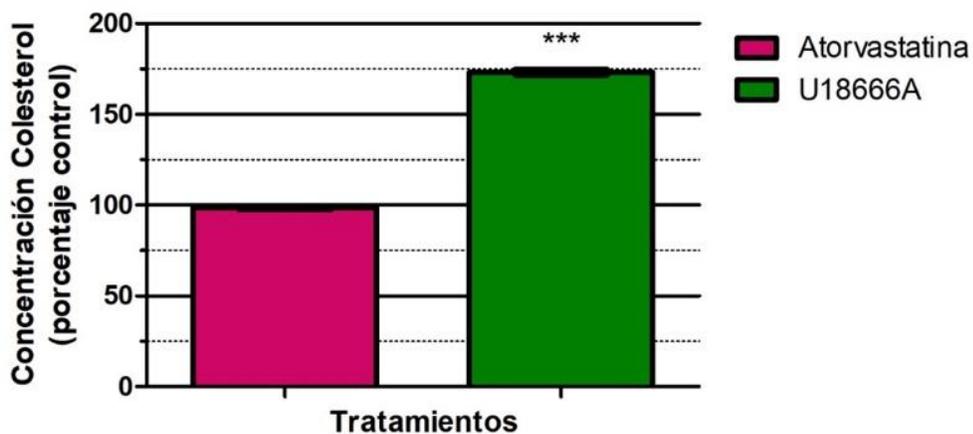
**Figura 6. Medición de colesterol intracelular y proteína total en células SHK-1.**

Cantidades crecientes de células se utilizaron para probar la utilidad de las técnicas seleccionadas para medir **(A)** concentración de colesterol intracelular con diferentes técnicas, **(B)** concentración de colesterol intracelular y **(C)** concentración de proteína total. Los datos obtenidos se representan con promedio y error estándar para un  $n = 18$  (A) y  $n = 10$  (B y C).

### 3.6 Disponibilidad intracelular de colesterol en macrófagos de salmón

Al contar con las herramientas para realizar las mediciones de colesterol intracelular y proteína total en las células SHK-1, es posible estudiar el efecto sobre la disponibilidad intracelular de colesterol por parte de las drogas ensayadas en la figura 2. Lo anterior adquiere relevancia por lo mencionado en la sección de “colesterol y susceptibilidad a la infección” en la introducción de este escrito, en donde se menciona la relación entre los cambios en los niveles de colesterol y la susceptibilidad de distintos modelos biológicos a variadas enfermedades tanto bacterianas como virales. En este caso deseamos probar el cambio en la susceptibilidad de los macrófagos de salmón a las infecciones de *P. salmonis* al alterar la homeostasis de colesterol, con lo que, anteriormente evaluaremos lo mencionado al inicio de este párrafo.

La estatina escogida para este experimento, contrario a lo esperado, no mostró efecto significativo sobre el colesterol intracelular a los 5 días de tratamiento (Figura 7), mientras que el tratamiento con U18666A correlaciona con un aumento significativo del nivel de colesterol respecto al control, aumentando este hasta 173 % (Figura 7).



**Figura 7. Concentración celular de colesterol en respuesta a tratamientos farmacológicos.** Concentraciones de atorvastatina (1  $\mu$ M) y U18666A (1  $\mu$ M), se utilizaron durante 5 días como tratamiento para SHK-1. Los datos obtenidos se representan con promedio y error estándar para un  $n = 18$ , normalizados por la concentración de proteína total de cada muestra.

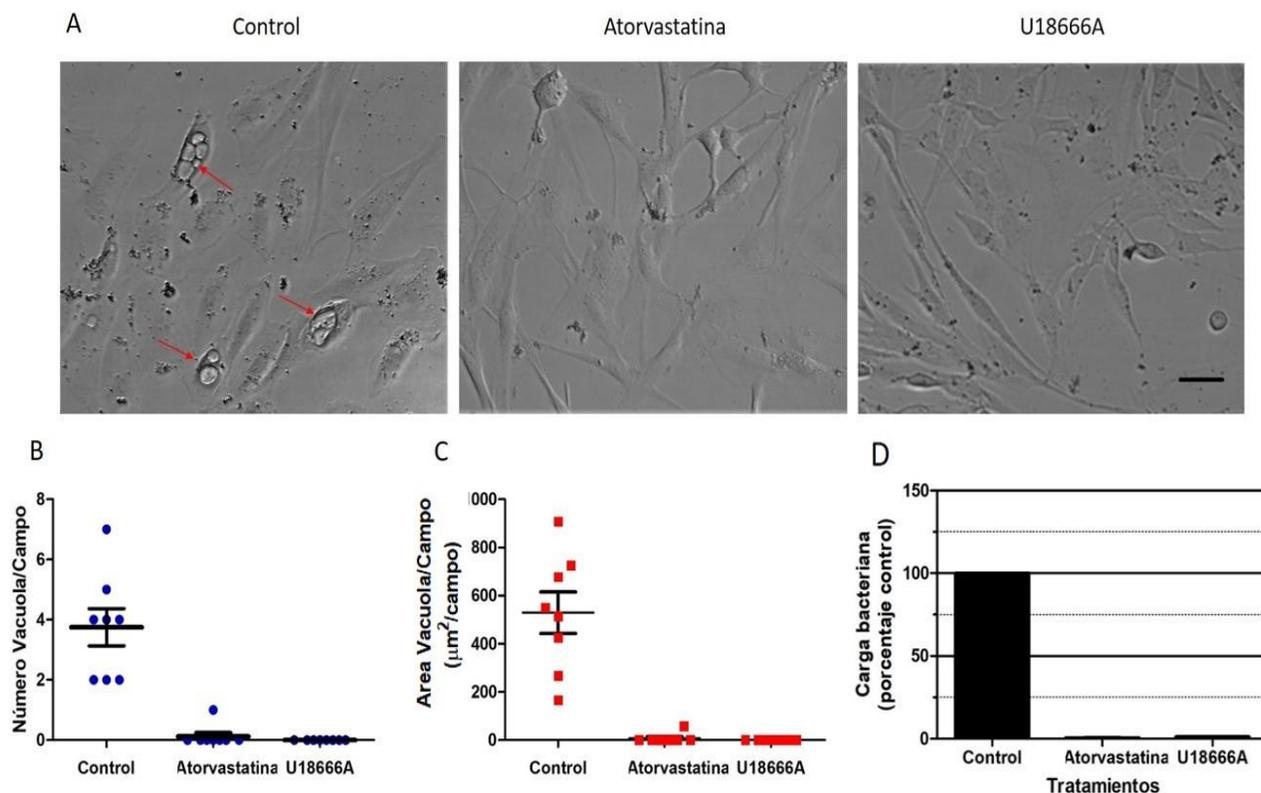
Existe variada evidencia de la relación del colesterol intracelular y la susceptibilidad a diferentes enfermedades infecciosas. Por otro lado, la infección causada por *P. salmonis* se ha intentado manejar por mucho tiempo con las estrategias clásicas como antibióticos o vacunas, sumado esto a la información de caracterización del metabolismo de colesterol en macrófagos de salmón ya presentada es que se realizarán infecciones *in vitro* para poder avanzar en el conocimiento del **objetivo 3: Determinar el efecto de la reducción del colesterol o las alteraciones en su distribución sobre la susceptibilidad de los macrófagos de salmón a la infección por *P. salmonis***

### **3.7 Susceptibilidad de los macrófagos de salmón a la infección con *P. salmonis***

Las infecciones con *P. salmonis* en células de salmónidos duran hasta 12 días después de la inoculación hasta llegar a la muerte y despegue de las células inoculadas. Anterior a esta etapa tardía de infección existen claros efectos citopáticos (CPE), en los primeros días post inoculación (3-6) comienzan a ser visibles vacuolas en el citoplasma de las células con bacterias en su interior que con el paso de los días comienzan a multiplicarse y a aumentar de tamaño llegando a ocupar gran parte del citoplasma de la célula, posterior a lo cual se llega a la etapa de muerte celular. Dado que el objetivo de esta investigación es analizar el efecto de los cambios en el metabolismo de colesterol en la susceptibilidad por parte de los macrófagos de salmón es que son interesantes las fases iniciales de infección en donde la bacteria está ingresando a las células o replicándose dentro de ella, por lo que se determinó realizar los análisis de estos experimentos a los 5 dpi, puesto que los CPE son evidentes.

Con toda la información, es posible evaluar la susceptibilidad y/o resistencia por parte de células SHK-1 a infecciones de *P. salmonis*. En la figura 8B se observa que las células control presentan un promedio de 3,9 vacuolas por campo a los 5 dpi, lo que muestra diferencias significativas con respecto a los tratamientos con atorvastatina con un promedio de 0,5 vacuolas por campo para el mismo día y también con el tratamiento de U18666A, que presenta un promedio de 0,3 vacuolas por campo. Por otra parte, la medición del tamaño de las vacuolas indica que el área vacuolar es significativamente menor en las condiciones suplementadas con fármacos respecto de la condición control, ya que si bien en las células con tratamientos se lograron ver algunas vacuolas, estas son de un tamaño mucho menor que las vistas en los controles (Figura 8C), indicando que la perturbación en el metabolismo de colesterol no sólo afecta la producción de vacuolas que contienen a la bacteria y permiten su replicación, sino que también afectan su tamaño.

Los resultados mostrados en la Figura 9B indican que las células tratadas con atorvastatina tuvieron un descenso de la carga bacteriana de un 99,5 % con respecto al control, hecho similar al tratamiento con U18666A, con una disminución de la carga bacteriana de un 99,3 % (Figura 8D) respecto de la condición control. En su conjunto, estos resultados sugieren que perturbaciones en el contenido y/o distribución de colesterol celular impacta sobre la capacidad de *P. salmonis* de infectar o replicarse en SHK-1.



**Figura 8. Infecciones *in vitro* de macrófagos de salmón.** Células SHK-1 inoculadas con *P. salmonis* y tratadas con fármacos que modifican el metabolismo de colesterol. En **(A)** se muestran fotografías representativas de cada tratamiento, las flechas rojas muestran las vacuolas que contienen bacteria en su interior. El grafico **(B)** y **(C)** presenta el recuento de vacuolas en las células tratadas con Atorvastatina (1  $\mu\text{M}$ ) y U18666A (1  $\mu\text{M}$ ) a los 5 dpi. El grafico **(D)** muestra la carga bacteriana de células tratadas con Atorvastatina (1  $\mu\text{M}$ ) y U18666A (1  $\mu\text{M}$ ) a los 5 dpi. Los datos obtenidos se representan con el promedio y error estándar para un  $n=8$  (B y C) y  $n=2$  (D). La barra de tamaño corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .

## **4. DISCUSION**

### **4.1 Optimización de ensayo MTT para células SHK-1**

El ensayo de viabilidad de MTT se basa en la reducción del MTT para la formación de cristales de formazan, lo que depende de variables como la concentración de MTT al principio del ensayo, el periodo de incubación, el número de células viables y su actividad metabólica (Mosmann, 1983). Los resultados obtenidos de este ensayo nos muestran que efectivamente hay una relación proporcional entre el número de células viables y la cantidad de cristales de formazan encontrados en cada caso. Puesto que las células SHK-1 son de tipo macrófago, éstas presentan una baja actividad metabólica lo que produce una baja señal en el sistema basado en espectrofotometría, razón por lo cual fue necesario poner a punto la técnica y adaptar los protocolos de la técnica en células de mamíferos que usan tiempos de no más de una hora de exposición. Por otra parte, ya que se ha reportado que MTT tiene características citotóxicas para largos tiempos de exposición (Riss y col., 2013) por lo que no se pudieron mejorar los valores de absorbancia para cada la cantidad de células estudiadas. De todas maneras, la relación proporcional entre el número de células viables y la cantidad de cristales de formazan alcanzada fue adecuada para medir este parámetro.

### **4.2 Viabilidad de células SHK-1 con tratamiento de fármacos**

Un gran porcentaje de las investigaciones relacionadas con las estatinas y los fármacos han sido llevadas a cabo en mamíferos (Bedi y col., 2016) y un limitado número en peces (A. Al-Habsi, 2014), por lo que las concentraciones encontradas en la búsqueda bibliográfica realizadas son las que se aplican a estos modelos mamíferos,

encontrándose principalmente datos asociados a concentraciones plasmáticas de pacientes con tratamiento por hipercolesterolemia (Chou y col., 2013). A pesar de esto, el suplemento en cultivos celulares con atorvastatina mostró un efecto en la viabilidad de los macrófagos de salmón a concentraciones crecientes, tal como se había descrito en otros estudios en salmónidos, particularmente en hepatocitos de trucha (Ellesat y col., 2010). Entre estos cambios destacan cambios morfológicos como el redondeo de las células, el despegue de la superficie, efectos en la actividad metabólica y la integridad de sus membranas, efectos que fueron también observados frente a la exposición con otra estatina. De igual forma, U18666A mostró actividad citotóxica en la concentración 5  $\mu$ M, lo que se coincide con lo reportado por Wiklund y col. (2010), quienes trataron líneas celulares humanas con esta droga durante tres días, con lo que se pudo deducir que el efecto en la viabilidad celular es producido por un efecto de muerte celular más que un efecto de inhibición de la proliferación, datos que unidos al cambio morfológico exhibido por las células SHK-1, hace pensar que U18666A causa muerte celular lo que provoca el efecto en la viabilidad visto con anterioridad. Este efecto citotóxico es también esperado si se considera la función que estaría ejerciendo el fármaco en su contexto de emulador del fenotipo de la enfermedad de Niemann-Pick. Estos antecedentes en su conjunto, demuestran la relevancia de haber determinado concentraciones no citotóxicas para realizar los ensayos de suplementos en las células de interés.

#### **4.3 Viabilidad de *P. salmonis* con tratamiento de fármacos.**

Los integrantes del reino procariota no poseen colesterol en su membrana plasmática, esta molécula es reemplazada en estos organismos por los hopanoides, lípidos isoprenoides cíclicos que son ubicuos dentro de este reino (Sáenz y col., 2015).

Teniendo esta información en consideración es esperable que *P. salmonis* se vea menos afectada por los tratamientos farmacológicos en comparación con las células SHK-1 (eucarionte). Esta hipótesis se condice con los resultados obtenidos, los cuales indican que solo el suplemento con atorvastatina se correlaciona con una disminución la viabilidad de la bacteria en las concentraciones más altas (sobre 100  $\mu$ M) y que U18666A no haya presentado efecto alguno sobre la viabilidad a las concentraciones ensayadas. Si bien se han reportado propiedades antibióticas para algunas estatinas en algunas especies bacterianas (Jerwood & Cohen 2008; Masadeh y col., 2012), los mecanismos asociados son desconocidos. Sin embargo se ha descrito que algunas estatinas interfieren con proteínas que se encuentran en los microdominios funcionales de la membrana celular de *Staphylococcus aureus* (García-Fernández y col., 2017) lo que podría dar indicios de los mecanismos por los que las estatinas afectan la viabilidad de las bacterias. A pesar de esto, en el presente estudio seleccionamos concentraciones no antibióticas puesto que nuestro interés es perturbar rutas metabólicas o procesos biológicos del hospedero que afecta la capacidad bacteriana de infectar.

#### **4.4 Distribución subcelular y disponibilidad de colesterol**

Como se ha reportado, logramos visualizar como la presencia de U18666A correlaciona con una acumulación perinuclear de colesterol (en los lisosomas) (Ringerike y col., 2002). Se sabe que esta molécula actúa de dos maneras sobre el colesterol de la membrana celular: bloqueando el transporte del colesterol endocitado en forma de LDL y bloqueando la síntesis de novo de colesterol suprimiendo los pasos intermedios de esta vía (Sexton y col., 1983). Debido al rápido fotoblanqueo de la sonda filipina, a la poca sensibilidad de la misma a variaciones pequeñas de colesterol

en las muestras evaluadas y a la alta variación de los niveles de fluorescencia dentro de una misma muestra (Marullo y col., 2012) es que esta herramienta la consideramos solo útil para ver cambios en la distribución subcelular de colesterol, pero no así para hacer una medición cuantitativa de este. De esto surge la duda de si los tratamientos farmacológicos seleccionados provocan algún efecto en la cantidad de colesterol intracelular, para esto se utilizó un kit comercial que resultó ser una gran herramienta para este fin ya que las mediciones obtenidas están dentro de los rangos reportados para varias líneas celulares (Geoghegan y col., 2017). Atorvastatina exhibió poco efecto sobre los niveles de colesterol a los tiempos medidos (5 dpi). Este hecho podría deberse a la elección de concentraciones y tiempos de análisis menores o mayores a los cuales se registra el efecto de baja en el colesterol por parte de las estatinas, ya que la mayoría de referencias hablan esto como lo más frecuente al realizar tratamientos con estatinas (Al-Habsi y col., 2017), también es necesario considerar que el sistema diseñado para este experimento no es libre de colesterol ni LDL ya que el medio en donde se mantienen estas células está suplementado con 10 % de SFB en su composición. Sorprendentemente, U18666A aumentó los niveles de colesterol en la mayoría de los tiempos evaluados, de este hecho no existe mucha información ya que la gran parte de las investigaciones que utilizan este fármaco solo lo hacen para evaluar la acumulación de colesterol al interior de los lisosomas para emular la enfermedad de Niemann-Pick, lo cual sugiere que este fármaco al no dejar al colesterol endocitado disponible para las demás estructuras de la célula (Pipalia y col., 2006), el sistema biológico sensa una baja cantidad y promueve la síntesis de más receptores LDL con esto mayor endocitosis de colesterol el cual se acumula en lisosomas. Tampoco es posible descartar la posibilidad que se sintetice más colesterol por la vía del mevalonato. Ambas hipótesis serán evaluadas en futuros experimentos.

#### **4.5 Susceptibilidad de los macrófagos de salmón a la infección por *P. salmonis***

*P. salmonis* provoca un efecto citopático clásico en las células hospederas, caracterizado por la presencia de vacuolas intracelulares que contienen bacterias que se aprecia a partir de los 3-5 dpi (Ramírez y col., 2015). Posteriormente, entre los 8 y 12 dpi se forman placas de despeje en donde las células comienzan a morir (Rojas y col., 2010). Nuestros resultados indican que las vacuolas se observan con menor frecuencia y menor tamaño en las células tratadas con atorvastatina y U18666A lo que puede estar relacionado con un efecto de los fármacos sobre la entrada como sobre la replicación de *P. salmonis* al interior de la célula. Para determinar si el suplemento con los fármacos sólo modifica el efecto citopático característico de vacuolización o estaba directamente afectando la capacidad de la bacteria de internalizarse o reproducirse al interior de la célula se midió directamente la cantidad de *P. salmonis* y se comparó la carga entre las condiciones. Los resultados indicaron que ambos tratamientos farmacológicos, no citotóxicos ni antibióticos, fueron capaces de disminuir significativamente la carga bacteriana respecto de la condición control. Estas observaciones se han descrito en otros contextos. Por ejemplo, Chattopadhyay y Jafurulla (2015) reportaron la interacción entre *Leishmania*, un parásito intracelular y su hospedero, y que, al modificar el contenido de colesterol de la membrana celular del hospedero, *Leishmania* no es capaz de ingresar a la célula sugiriendo que una situación similar podría estar pasando en las infecciones *in vitro* de *P. salmonis*. Futuros ensayos son necesarios para profundizar en los mecanismos que expliquen los interesantes resultados obtenidos en esta memoria.

## 5. CONCLUSIONES

Con el objetivo de determinar si cambios en la abundancia y distribución de colesterol en macrófagos de salmón confieren resistencia a la infección con *Piscirickettsia salmonis*, durante esta memoria se utilizaron estatinas y U18666A, demostrando que son drogas que pueden ser utilizar en macrófagos y *P. salmonis* sin causar efectos citotóxicos ni antibióticos, respectivamente. Además, U18666A es capaz de afectar la distribución y concentración de colesterol en macrófagos de salmones y aunque no se observó el efecto deseado con atorvastatina fue posible fue inhibir la infección con *P. salmonis* en macrófagos de salmón utilizando ambos fármacos. Futuros ensayos permitirán definir si los fármacos utilizados afectan la entrada y/o replicación bacteriana al interior de los macrófagos.

Los resultados obtenidos en su conjunto permiten aceptar la hipótesis de que las drogas que modifican la abundancia y distribución de colesterol en macrófagos de salmón confieren resistencia a la infección con *Piscirickettsia salmonis*. Esto permite resaltar la importancia de esta investigación en el establecimiento del metabolismo de colesterol como eje central en el desarrollo de nuevas estrategias para combatir las infecciones intracelulares en peces salmónidos, lo cual puede ser de amplia utilidad para la sustentabilidad para la industria de cultivo de salmón en Chile.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Al-Habsi, A.A., A. Massarsky, and T.W. Moon. 2017. "Atorvastatin Alters Gene Expression and Cholesterol Synthesis in Primary Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Hepatocytes." *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology* (May).
- Al-Habsi, Aziz. 2014. "The Effects of Statin and Fibrate Drugs on Cholesterol Metabolism and Steroid Production in Two Fish Species . Aziz Al-Habsi."
- Bader, Ted et al. 2008. "Fluvastatin Inhibits Hepatitis C Replication in Humans." *American Journal of Gastroenterology* 103(6): 1383–89.
- Bangera, Rama et al. 2017. "Genomic Predictions Can Accelerate Selection for Resistance against *Piscirickettsia Salmonis* in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*)." *BMC Genomics* 18(1): 1–12. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-3487-y>.
- Bedi, Onkar, Veena Dhawan, P. L. Sharma, and Puneet Kumar. 2016. "Pleiotropic Effects of Statins: New Therapeutic Targets in Drug Design." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 389(7): 695–712. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-016-1252-4>.
- Bravo, S. 2012. "Environmental Impacts and Management of Veterinary Medicines in Aquaculture: The Case of Salmon Aquaculture in Chile." *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 547: 207.
- Chou, Yuh Ching, Yi Kai Wang, Min Ji Charng, and Yune Fang Ueng. 2013. "Determination of Serum Atorvastatin Concentrations in Lipid-Controlling Patients with and without Myalgia Syndrome." *Journal of Food and Drug Analysis* 21(2): 147–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2013.05.003>.
- Contreras-Lynch, Sergio et al. 2015. "Identification and Genetic Characterization of *Piscirickettsia Salmonis* in Native Fish from Southern Chile." *Diseases of Aquatic Organisms* 115(3): 233–44.
- Correa, Katharina et al. 2015. "Genome-Wide Association Analysis Reveals Loci Associated with Resistance against *Piscirickettsia Salmonis* in Two Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.) Chromosomes." *BMC Genomics* 16(1): 1–9. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-2038-7>.
- Cvitanich, J. D., O. GARATE N., and C. E. SMITH. 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(2): 121–45.
- Czyz, Daniel M et al. 2014. "Host-Directed Antimicrobial Drugs with Broad-Spectrum Efficacy against Intracellular Bacterial Pathogens." 5(4): 1–14.
- Dannevig, B. H. et al. 1997. "Characterisation of a Long-Term Cell Line (SHK-1) Developed from the Head Kidney of Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.)." *Fish and Shellfish Immunology* 7(4): 213–26.
- Ellesat, Kathrin Sabine et al. 2010. "Cytotoxicity of Atorvastatin and Simvastatin on Primary Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Hepatocytes." *Toxicology in Vitro*

- 24(6): 1610–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.06.006>.
- Esposito, Anthony. 2015. "Addicted to Antibiotics, Chile's Salmon Flops at Costco, Grocers." *Reuters*. <https://www.reuters.com/article/us-chile-salmon-antibiotics-feature-idUSKCN0PX1IG20150723>.
- Feest, Patricio. 2014. "ADL Diagnostic Presentó Resultados Sobre Proyecto Programa de Vigilancia de SRS." *salmonexpert*. <https://www.salmonexpert.cl/article/adl-diagnostic-present-oacute-resultados-sobre-proyecto-programa-de-vigilancia-de-srs/>.
- Fryer, J. L., and R. P. Hedrick. 2003. "Piscirickettsia Salmonis: A Gram-Negative Intracellular Bacterial Pathogen of Fish." *Journal of Fish Diseases* 26(5): 251–62.
- García-Fernández, Esther et al. 2017. "Membrane Microdomain Disassembly Inhibits MRSA Antibiotic Resistance." *Cell* 171(6): 1354–1367.e20.
- Geoghegan, Vincent et al. 2017. "Perturbed Cholesterol and Vesicular Trafficking Associated with Dengue Blocking in Wolbachia-Infected Aedes Aegypti Cells." *Nature Communications* 8(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00610-8>.
- Gilk, Stacey D. et al. 2013. "Bacterial Colonization of Host Cells in the Absence of Cholesterol." *PLoS Pathogens* 9(1).
- Gómez, Fernando A. et al. 2013. "Evidence of the Presence of a Functional Dot/Icm Type IV-B Secretion System in the Fish Bacterial Pathogen Piscirickettsia Salmonis." *PLoS ONE* 8(1).
- Guler, Reto, and Frank Brombacher. 2015. "Host-Directed Drug Therapy for Tuberculosis." *Nature Chemical Biology* 11(10): 748–51. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1917>.
- Henríquez, P. et al. 2016. "Comprehensive Antibiotic Susceptibility Profiling of Chilean Piscirickettsia Salmonis Field Isolates." *Journal of Fish Diseases* 39(4): 441–48.
- Isberg, Ralph R, Tamara O Connor, Matthew Heidtman, and Harrison Avenue. 2009. "The *Legionella Pneumophila* Replication Vacuole: Making a Cozy Niche inside Host Cells." *Nature Reviews Microbiology* 7(1): 13–24.
- Jerwood, S., and J. Cohen. 2008. "Unexpected Antimicrobial Effect of Statins." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61(2): 362–64.
- Liappis, A. P., V. L. Kan, C. G. Rochester, and G. L. Simon. 2001. "The Effect of Statins on Mortality in Patients with Bacteremia." *Clinical Infectious Diseases* 33(8): 1352–57. <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/323334>.
- Lu, Feiran et al. 2015. "Identification of NPC1 as the Target of U18666A, an Inhibitor of Lysosomal Cholesterol Export and Ebola Infection." *eLife* 4(December2015): 1–16.
- Mandakovic, Dinka et al. 2016. "Genomic-Based Restriction Enzyme Selection for Specific Detection of Piscirickettsia Salmonis by 16S rDNA PCR-RFLP." *Frontiers in Microbiology* 7(MAY).
- Mardones, F. O. et al. 2014. "The Role of Fish Movements and the Spread of Infectious

- Salmon Anemia Virus (ISAV) in Chile, 2007-2009." *Preventive Veterinary Medicine* 114(1): 37–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.01.012>.
- Marshall, Sergio et al. 1998. "Minimally Invasive Detection of Piscirickettsia Salmonis in Cultivated Salmonids via the PCR Minimally Invasive Detection of Piscirickettsia Salmonis in Cultivated Salmonids via the PCR." 64(8): 6–10.
- Marullo, Manuela et al. 2012. "Pitfalls in the Detection of Cholesterol in Huntington ' S Disease Models." *Plos Currents Huntington Disease*: 1–21.
- Masadeh, Majed et al. 2012. "Antibacterial Activity of Statins: A Comparative Study of Atorvastatin, Simvastatin, and Rosuvastatin." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 11: 1–5.
- McCarthy, Úna M. et al. 2008. "Survival and Replication of Piscirickettsia Salmonis in Rainbow Trout Head Kidney Macrophages." *Fish and Shellfish Immunology* 25(5): 477–84.
- Meuwissen, Theo, Ben Hayes, and Mike Goddard. 2016. "Genomic Selection: A Paradigm Shift in Animal Breeding." *Animal Frontiers* 6(1): 6. <https://dl.sciencesocieties.org/publications/af/abstracts/6/1/6>.
- Mosmann, Tim. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65(1–2): 55–63.
- Mouritsen, OG, and MJ Zuckermann. 2004. "What's so Special about Cholesterol?" *Lipids* 39: 1101–1113.
- Mukherjee, Sushmita, Xiaohui Zha, Ira Tabas, and Frederick R. Maxfield. 1998. "Cholesterol Distribution in Living Cells: Fluorescence Imaging Using Dehydroergosterol as a Fluorescent Cholesterol Analog." *Biophysical Journal* 75(4): 1915–25. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77632-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77632-5).
- Mulye, Minal et al. 2017. "Elevated Cholesterol in the Coxiella Burnetii Intracellular Niche Is Bacteriolytic." 8(1): 1–18.
- Parihar, Suraj P. et al. 2013. "Simvastatin Enhances Protection against Listeria Monocytogenes Infection in Mice by Counteracting Listeria-Induced Phagosomal Escape." *PLoS ONE* 8(9): 1–11.
- Pipalia, Nina H. et al. 2006. "Automated Microscopy Screening for Compounds That Partially Revert Cholesterol Accumulation in Niemann-Pick C Cells." *Journal of Lipid Research* 47(2): 284–301. <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M500388-JLR200>.
- Pulgar, Rodrigo et al. 2015. "Complete Genome Sequence of Piscirickettsia Salmonis LF-89 (ATCC VR-1361) a Major Pathogen of Farmed Salmonid Fish." *Journal of Biotechnology* 212: 30–31.
- Ramírez, Ramón, Fernando A. Gómez, and Sergio H. Marshall. 2015. "The Infection Process of Piscirickettsia Salmonis in Fish Macrophages Is Dependent upon Interaction with Host-Cell Clathrin and Actin." *FEMS Microbiology Letters* 362(1):

1–8.

- Ringerike, Tove et al. 2002. "Cholesterol Is Important in Control of EGF Receptor Kinase Activity but EGF Receptors Are Not Concentrated in Caveolae." *Journal of cell science* 115(Pt 6): 1331–40.
- Riss, Terry L et al. 2013. "Cell Viability Assays." *Assay Guidance Manual* 114(8): 785–96.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>.
- Rojas, Verónica et al. 2010. "Piscirickettsia Salmonis Induces Apoptosis in Macrophages and Monocyte-like Cells from Rainbow Trout." *Journal of Cellular Biochemistry* 110(2): 468–76.
- Rosenbaum, A. I., G. Zhang, J. D. Warren, and F. R. Maxfield. 2010. "Endocytosis of Beta-Cyclodextrins Is Responsible for Cholesterol Reduction in Niemann-Pick Type C Mutant Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(12): 5477–82. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914309107>.
- Rozas, M., and R. Enríquez. 2014. "Piscirickettsiosis and Piscirickettsia Salmonis in Fish: A Review." *Journal of Fish Diseases* 37(3): 163–88.
- Sáenz, James P. et al. 2015. "Hopanoids as Functional Analogues of Cholesterol in Bacterial Membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(38): 11971–76. <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1515607112>.
- Schultz, ML, KL Krus, and AP Lieberman. 2016. "Lysosome and Endoplasmic Reticulum Quality Control Pathways in NiemannPick Type C Disease." *Brain Res.* 26(pii: S0006-8993): (16)30166-4.
- Schwegmann, Anita, and Frank Brombacher. 2008. "Host-Directed Drug Targeting of Factors Hijacked by Pathogens." *Science Signaling* 1(29): 1–8.
- Sexton, RC, SR Panini, F Azran, and H Rudney. 1983. "Effects of 3. Beta.- Androst-5-En-17-One on the Synthesis of Cholesterol and Ubiquinone in Rat Intestinal Epithelial Cell Cultures." *Biochemistry* 22(25).  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00294a001>.
- Simons, KI, and E Ikonen. 2000. "How Cells Handle Cholesterol." *Science* , Vol. 290(Issue 5497): p 1721-1726.
- Skottheim, Ine Blankenberg et al. 2008. "Statin Induced Myotoxicity: The Lactone Forms Are More Potent than the Acid Forms in Human Skeletal Muscle Cells in Vitro." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 33(4–5): 317–25.
- Stanton, Thaddeus B. 2013. "A Call for Antibiotic Alternatives Research." *Trends in Microbiology* 21(3): 111–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.002>.
- Stormo, Camilla et al. 2014. "RNA-Sequencing Analysis of HepG2 Cells Treated with Atorvastatin." *PLoS ONE* 9(8): 19–23.
- Sugii, Shigeki et al. 2006. "Roles of Endogenously Synthesized Sterols in the Endocytic Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 281(32): 23191–206.

- Tang, BL. 2015. "Bacteria-Containing Vacuoles: Subversion of Cellular Membrane Traffic and Autophagy." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 25(2): 163–74.
- Watarai, Masahisa et al. 2002. "Macrophage Plasma Membrane Cholesterol Contributes to Brucella Abortus Infection of Mice Macrophage Plasma Membrane Cholesterol Contributes to Brucella Abortus Infection of Mice." *Society* 70(9): 4818–25.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12183525](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12183525).
- Yévenes, Luz Fernanda et al. 2012. "Lysosomal Vitamin E Accumulation in Niemann-Pick Type C Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1822(2): 150–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.11.009>.