

Universidad de Chile

Facultad de Medicina
Escuela de Postgrado

Relación del proceso apoptótico con la infección productiva del patógeno intracelular *Piscirickettsia salmonis* en células de salmónidos de cultivo

Título para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

María Verónica Rojas Durán

Profesor es: Dr. Sergio Marshall G. Dr. Norbel Galanti G.

Santiago, Chile 2007

Texto completo en: www.cybertesis.uchile.cl/tesis/uchile/2007/me-rojas_m/pdfAmont/me-rojas_m.pdf

Resumen . .	4
Disponible a texto completo . .	6

Resumen

El síndrome rickettsial del salmón (SRS) o piscirickettsiosis, producido por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, es una de las enfermedades que genera mayores pérdidas a la industria salmonera nacional; no obstante, a pesar del gran impacto económico que produce esta patología, se desconocen la mayor parte de los aspectos básicos relacionados con la interacción de este patógeno y la célula infectada. Al respecto, la modulación de la muerte de la célula hospedera parece ser un requisito necesario para establecer la infección por parte de varios patógenos y de éste en particular.

P. salmonis es una bacteria descrita hasta la fecha como intracelular obligada, Gram (-), pleomórfica, predominantemente cocoide (0.5 – 1.5 µm de diámetro), que se multiplica en vacuolas citoplasmáticas de las células infectadas. Los principales órganos de salmónidos que ataca son riñón, hígado, bazo y cerebro, produciendo alteraciones en el aspecto de estos órganos y en la conducta natatoria del pez.

Los modelos de estudio de *P. salmonis* corresponden a líneas celulares de peces salmónidos infectadas con la bacteria. En esta Tesis se utilizó la cepa de referencia LF-89 (ATCC VR 1361), aislada de ejemplares chilenos de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), para la cual se estandarizó su cultivo en monocapas de la línea celular CHSE-214, derivada de riñón de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*). La multiplicación de este patógeno se evidencia por la aparición gradual de cúmulos de células redondeadas lo que se conoce como efecto citopático. Esta línea celular se usó como modelo de infección de células de un órgano blanco de la piscirickettsiosis.

Los peces presentan un sistema inmune innato con mayor relevancia que el adquirido, que comprende barreras infectivas y mecanismos de fagocitosis. Los macrófagos participan principalmente en la respuesta frente a la invasión por bacterias patógenas y, por lo tanto, constituyen un buen modelo de estudio de la interacción de *P. salmonis* con células blanco del sistema inmune no específico del pez. En consecuencia, en esta tesis se utilizó la línea celular RTS11, derivada de monocitos/macrófagos de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), en la que se ha demostrado previamente su infectividad por *P. salmonis*.

La patogénesis de diversas bacterias se asocia particularmente a la habilidad de persistir en el hospedero infectado causando la muerte de las células requeridas para su defensa; algunas de ellas inducen un tipo de muerte celular programada, la apoptosis, principalmente de macrófagos, para eliminar células del sistema inmune, escapar de la primera línea de defensa del hospedero y asegurar así el inicio del proceso infeccioso. Sin embargo, otras bacterias inhiben la muerte apoptótica de la célula infectada como estrategia para facilitar su proliferación.

La apoptosis o muerte celular programada tipo I, se produce a través del desensamblaje ordenado de la célula que pasa por una secuencia de cambios morfológicos y bioquímicos característicos, tales como fragmentación del ADN, condensación de la cromatina, ondulaciones de la superficie celular, externalización de fosfatidilserina, contracción de la célula y fragmentación de ésta en cuerpos apoptóticos.

La apoptosis es producida por proteasas de la familia de las caspasas, que se activan por señales de muerte que se reciben a través de receptores en la superficie celular, o

señales internas por estrés o daño del DNA. Las vías extrínseca e intrínseca convergen en un mecanismo efector común a través de la activación de caspasas ejecutoras, generando degradación selectiva de proteínas blanco y los cambios morfológicos ya descritos.

Con todos los antecedentes señalados, se propuso estudiar la apoptosis como un posible mecanismo involucrado en la modulación de la infección por *P. salmonis*, usando como modelo las 2 líneas celulares de salmónidos señaladas, a tiempos tempranos (2 días), medios (5 días) y tardíos (10 días) de infección.

En primer lugar, se establecieron las condiciones de infección para hacerlas equivalentes entre las 2 líneas celulares, se definieron los parámetros de viabilidad y capacidad proliferativa de las células infectadas y la capacidad productiva de *P. salmonis* en los tiempos de infección considerados.

Luego, se definieron indicadores de apoptosis asociados a la infección en las 2 líneas celulares, tales como cambios morfológicos, fragmentación del DNA y exposición de fosfatidilserina en la superficie celular, así como la activación de caspasas en las células infectadas.

Los parámetros morfológicos y bioquímicos empleados indican que la infección por *P. salmonis* induce la muerte apoptótica de macrófagos infectados, y de células en suspensión tipo monocitos derivados de éstos; sin embargo, la infección no tiene un efecto claro sobre la inducción de apoptosis en las células epiteliales CHSE-214.

La inducción diferencial de muerte de células del sistema inmune por parte de *P. salmonis*, limitaría la capacidad de respuesta frente al patógeno invasor y posibilitaría su posterior dispersión hacia otros tejidos. En células de órganos blanco de la enfermedad, como las de riñón, la bacteria se multiplicaría preferentemente, para diseminarse a células vecinas y/o otros tejidos afectados por el patógeno.

Disponible a texto completo

Texto completo en: www.cybertesis.uchile.cl/tesis/uchile/2007/me-rojas_m/pdfAmont/me-rojas_m.pdf