

Identificación y selección de salmónidos genéticamente resistentes al ectoparásito *Caligus rogercresseyi* usando técnicas clásicas de genética cuantitativa y biomarcadores inmunológicos

DR. JOSÉ A. GALLARDO^{1*}, DR. LUIS MERCADO² & DR. (C) JEAN PAUL LHORENTE¹.

1 ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO. AVDA. ALMIRANO 1480. VALPARAÍSO, CHILE.

*** DIRECTOR DE PROYECTO INNOVA CHILE DE CORFO N° 7CN13PBT-61.**

E-mail: jose.gallardo@ucv.cl

2 INSTITUTO DE BIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO. AVDA. UNIVERSIDAD 330. CAMPUS CURAUMA. VALPARAÍSO, CHILE.

E-mail: lmercado@ucv.cl

3 AQUAINNOVO S.A., POLPAICO 037, BARRIO INDUSTRIAL, PUERTO MONTT, CHILE
www.aquainnovo.net

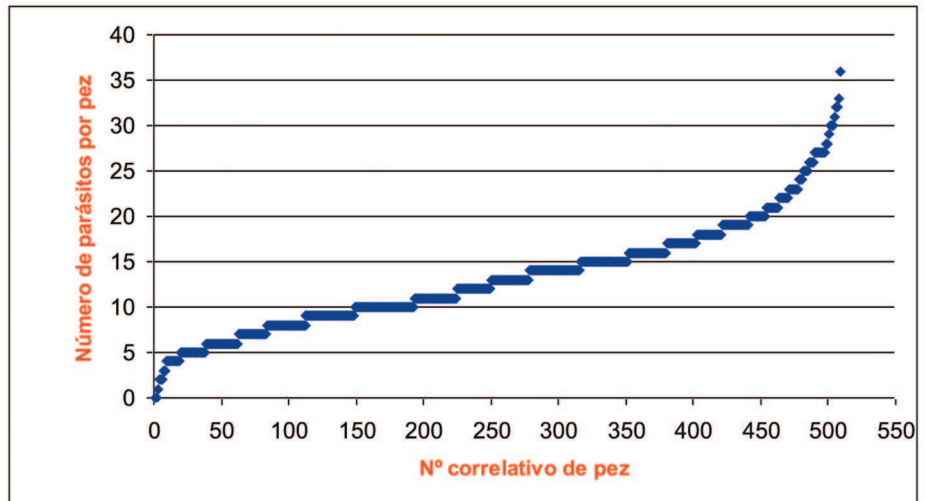


FIGURA 1
Variación fenotípica individual en el número de parásitos por pez obtenido en una prueba de desafío de salmón del Atlántico con *C. rogercresseyi*.

Introducción

Caligus rogercresseyi ha constituido por muchos años uno de los problemas sanitarios más importantes durante la fase de engorda de los salmones cultivados en Chile. Esta especie de piojo de mar ha sido transmitida a los salmones desde especies nativas tales como el róbalo y el pejerrey (González y Carvajal, 2003). González y col. (2000) muestran que Trucha arcoiris es la especie más susceptible a la infestación, seguida del salmón del Atlántico, mientras que salmón Coho sería la especie más resistente, cuando no está afectada por otra enfermedad. La susceptibilidad o resistencia a caligus entre especies podría ser explicada entonces por diferencias interspecificas. La infestación de los peces por *C. rogercresseyi* usualmente no genera muerte directa, pero si es evidente que produce estrés, disminución del apetito, inmunodepresión y daño a nivel de la piel (Furci, 2009), y puede constituir un factor preponderante en el aumento de la susceptibilidad de los salmones a otras enfermedades (Pike y Wadsworth, 1999).

El cultivo de peces resistentes a caligus se ha planteado como una prioridad para la industria, por lo que el objetivo general de este proyecto es desarrollar una nueva metodología para la identificación y selección de salmónidos genéticamente resistentes al ectoparásito *Caligus rogercresseyi*. Para la concreción de este objetivo hemos conformado un equipo interdisciplinario de profesionales de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, de la Universidad de Concepción y de la empresa AQUAINNOVO. Estos profesionales, junto

con el apoyo del INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL SALMON, han trabajado los últimos 30 meses realizando pruebas de desafío, análisis de laboratorio, estudios poblacionales y evaluaciones de campo de resistencia genética. En este artículo presentamos los avances más importantes del proyecto realizados a la fecha.

SECCIÓN 1. Elaboración y aplicación de protocolos para identificar peces genéticamente resistentes a caligus.

Nosotros hemos elaborado y aplicado un protocolo para identificar peces genéticamente resistentes a caligus mediante la realización de pruebas de desafío en peces del programa genético de Antares S.A. La primera prueba de desafío se realizó entre Octubre y Noviembre del 2009 y considero la infestación de 1500 peces de 75 familias de la clase año 2008 del programa genético de Antares S.A. Los peces fueron desafiados con 150.000 copepoditos y el registro de la infestación se realizó mediante el conteo de parásitos en las distintas zonas del cuerpo de los peces. Adicionalmente, muestras de mucus y de distintos órganos fueron caracterizadas en distintos parámetros inmunológicos. En la figura 1 se representa la variación fenotípica del rasgo N° de parásitos por pez post infestación (Promedio= 13,24 ±6.03; Coeficiente de variación= 45,56 %; Min= 0; Max = 36). El análisis de los datos permitió estimar una heredabilidad de magnitud media para este rasgo de resistencia genética a

caligus con valores entre 0,22-0,34. Estos valores son mayores a los niveles de hereabilidad contra *L. salmonis* (Glover y col., 2005; Kolstad y col., 2005), e indican para esta población que la selección para resistencia a *Caligus rogercresseyi* es factible de realizar. Actualmente, estamos trabajando en caracterizar la respuesta inmunológica de Salmón del Atlántico a *Caligus rogercresseyi* para así poder discriminar si la resistencia es causada por la expresión diferencial de algún componente del sistema inmunológico.

SECCIÓN 2. Producción de biomarcadores para la identificación de resistencia inmunológica

La identificación del fenotipo de la respuesta inmune en peces, es un desafío continuo que ha sido abordado a través de la identificación de determinados genes pro-inflamatorios, mediante técnicas de PCR en tiempo real. Sin embargo, el uso de anticuerpos es la única herramienta que otorga información acerca de la presencia de proteínas efectivamente expresadas y potenciales sistemas biológicos (Randelli y col., 2008). El análisis de la expresión de moléculas propias de la respuesta inmune, podría constituir un indicador eficaz de resistencia o susceptibilidad a un patógeno. En el caso del patógeno *Caligus sp.*, su presencia en la piel del pez desencadena una respuesta inmune que podría determinar la

capacidad de rechazo en peces resistentes o de susceptibilidad en peces que no logran impedir que el ectoparásito se instale persistentemente en la piel. Con el afán de iniciar la caracterización inmune de peces afectada por el parásito, se ha diseñado una serie de anticuerpos, dirigidos al reconocimiento de epítopes propios de moléculas pro-inflamatorias de salmónidos (Narváez y col., 2010). Como un ejemplo referimos aquí el análisis de una molécula en particular. Utilizando especies de *Salmo salar* que fueron desafiadas con copepoditos de *Caligus rogercresseyi*, se cuantificó en diferentes órganos la expresión de una citoquina que regula la respuesta inflamatoria, se trata de la quimioquina IL-8, que regula la llegada de leucocitos al sitio de infección. Resultados preliminares indican diferentes patrones de expresión de acuerdo al nivel de infestación con los parásitos. Se agrupó en tres categorías a los peces desafiados con el ectoparásito, los de tendencia al fenotipo resistente (2-10 parásitos adheridos), al fenotipo susceptible a la infección (21-30 parásitos adheridos) y los de respuesta intermedia (11-20 parásitos adheridos). Al analizar el nivel de expresión de la citoquina en distintos tejidos, es posible iniciar la propuesta de potenciales marcadores de respuesta al ectoparásito. La interpretación de los resultados obtenidos no es sencilla, debido a que es necesario distinguir con agudeza cuando se trata de un marcador de resistencia, diferenciando con claridad si los indicadores lo son, o constituyen simplemente una tendencia o una evaluación de la respuesta inmune. La citoquina IL-8, es una quimioquina clave en la respuesta inmune innata, debido a que sus efectos proinflamatorios permiten la extravasación, o llegada de leucocitos a los sitios de infección. La tendencia más clara de resistencia es la expresión de IL-8 en tejido branquial, el grupo de peces menos infectados duplica el valor observado para esta molécula con respecto al grupo de peces más susceptibles, con una tendencia decreciente entre ambos en el grupo intermedio (Figura 2). Luego en la piel, que es el sitio de infección, probablemente también la resistencia esté dada por la mayor expresión de IL-8, y la susceptibilidad por la menor expresión de esta citoquina. Sin embargo, el grupo intermedio pone en duda esta interpretación. Por el contrario en bazo, se puede interpretar que el mayor expresión IL-8 no es un signo de susceptibilidad, sino que más bien podría tratarse de una consecuencia de la infección más alta. Finalmente a nivel hepático, la resistencia podría estar dada por la mayor expresión de IL-8, al igual que el grupo intermedio.

En una conclusión preliminar podríamos proponer que la citoquina IL-8 expresada en tejido branquial, es un marcador inmunológico de resistencia a *Caligus*, aquellos individuos con mayor producción de citoquina resisten la infección, mientras que aquellos con una menor expresión, serán susceptibles. Exist-

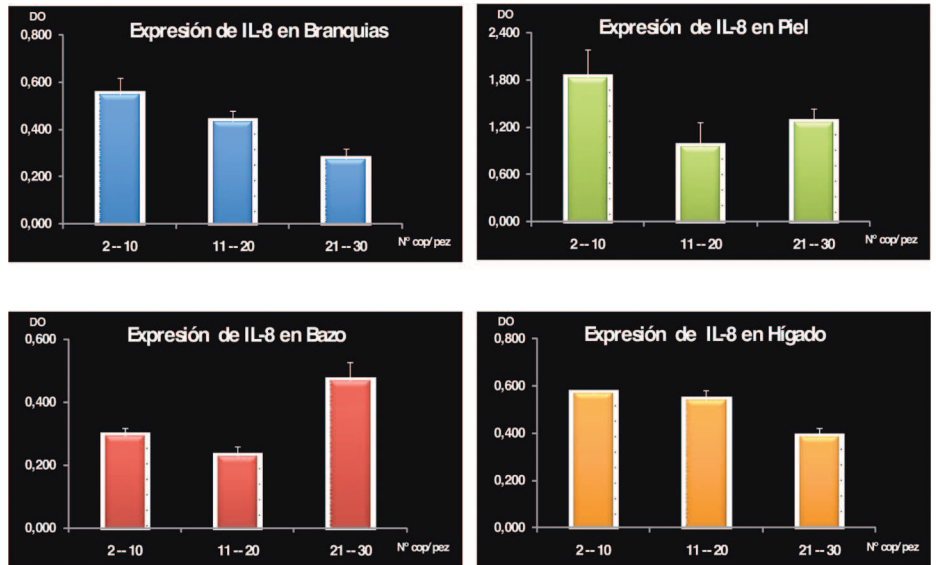


FIGURA 2
Cuantificación de la expresión de IL-8 mediante ELISA, en diferentes tejidos de *Salmo salar* infectados con *Caligus rogercresseyi*, agrupados en tres categorías: Resistentes (2-10 copepoditos por pez), Susceptibles (21-30) y el grupo Intermedio (11-20). Los datos se muestran en valores de absorbancia y corresponden al promedio detectado entre todos los individuos (n=15). El valor control de referencia ha sido restado para la normalización de los datos.

en otros argumentos que podrían respaldar este hallazgo, básicamente la reciente caracterización de tejido linfoide secundario, en la base de las laminillas secundarias (Kolstad y col., 2008), donde también hemos observado un proceso de modificación histológica en respuesta a la infección por *Caligus*.

Conclusión

En el corto plazo se espera que la metodología desarrollada para identificar peces resistentes sea asequible a toda la industria chilena mediante diferentes mecanismos de transferencia tecnológica. En el mediano plazo, esperamos que la aplicación de la metodología permitirá generar líneas de peces resistentes al ectoparásito aumentando la competitividad de la industria salmonera mediante la reducción de costos de producción asociados al uso de antiparasitarios, al aumento de ingresos asociados a mejor calidad de producto final y a la disminución del impacto sobre los peces nativos y el ambiente, actualmente provocado por los productos químicos utilizados para combatir el parásito.

Referencias

Glover K.A; Skaundstad T; Nilsen F; Storset A and Skaal O, 2005. Variation in susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) to sea lice *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus*. *Aquaculture* 245: 19-30.

González L., J. Carvajal & M. George-Nascimento. 2000. Differential infectivity of

Caligus flexispina (Caligidae: Copepoda) in 3 salmonid host species cultivated in Chile. *Aquaculture* 183:13-23.

Gonzalez, L and Carvajal, J. 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220: 101-117.

Haugvold E., Bjerkaas I., Hordvik I. and Koppang E. 2008. Identification and characterization of a novel intra-epithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *Journal of Anatomy* 213(2): 202-209.

Kolstad K; Heuch P.A; Gjerde B; Gjedrem T and Salte R, 2005. Genetic variation in resistance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*. *Aquaculture*, 247:145-151.

Furci, G, 2009. Caligus: El piojo de salmón en salmonicultura chilena. Publicaciones Fundación Terram, APP N° 49, 17 p.

Narváez E., Berendsen J., Guzmán F., Gallardo J & Mercado L. 2010. An immunological method for quantifying antibacterial activity in *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) skin mucus. *Fish and Shellfish Immunology*. 28(1): 235-239.

Pike, A.W and Wadsworth, S.L, 1999. Sea lice on salmonids: their biology and control. *Adv. Parasitol.*, 44:223-337.

Randelli E., Buonocore F. & Scapigliati G. Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish and Shellfish Immunology*. 2008, 25: 326-340.