



Ensayos de sensibilidad farmacológica de Caligus frente a Azametifós, Cipermetrina y Deltametrina mediante combinación de marcadores moleculares y bioensayos

Informe Técnico - Complementario

Proyecto Fondo de Inversión Estratégica FIE 2015-V014, Programa para la Gestión Sanitaria en Acuicultura



**Ensayos de sensibilidad farmacológica de Caligus frente a Azametifós,
Cipermetrina y Deltametrina mediante combinación de marcadores
moleculares y bioensayos**

Informe Técnico - Complementario

**Proyecto Fondo de Inversión Estratégica FIE 2015-V014, Programa para la
Gestión Sanitaria en Acuicultura**

**Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola (LBGA)
Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola, INCAR
Universidad de Concepción
- Mayo 2018 -**



Introducción

Numerosos antiparasitarios han sido utilizados a nivel mundial para el control de ectoparásitos, entre ellos se incluye la aplicación de peróxido de hidrogeno, avermectinas, piretroides y organofosforados[1]. Sin embargo, numerosos estudios sugieren la eficacia de los distintos tipos de antiparasitarios dependen del estado de desarrollo de los ectoparásitos como es el caso de *C. rogercresseyi* [2, 3]. En Chile, el primer tratamiento utilizado para el control de *C. rogercresseyi* en Chile fue benzoato de emamectina. Sin embargo, luego del año 2007, el uso de este antiparasitario demostró pérdida de eficacia, lo que hizo necesario la implementación de nuevos productos como son el piretroide, deltametrina y el organofosforado, azametifos [4]. En general, los tratamientos con antiparasitarios para el control de caligidosis han demostrado pérdida en su eficacia, debido a la generación de mecanismos de resistencia por el ectoparásito. La resistencia a antiparasitarios se basa en mecanismos moleculares que generan cambios en los blancos moleculares, vía de detoxificación, y la alteración en el flujo de antiparasitarios [5]. En búsqueda de comprender los mecanismos moleculares de resistencia a antiparasitarios generada por *C. rogercresseyi*, se ha observado que genes como acetilcolinesterasa, citocromo P-450, P-gp, receptores de acetilcolina generan cambios en sus niveles de expresión en los piojos de mar con diferentes niveles de susceptibilidad a los antiparasitarios [6, 7]. En el presente informe se muestran los resultados de la evaluación de *C. rogercresseyi* frente a Azametifos y Deltametrina mediante combinación de marcadores moleculares y bioensayos.

Objetivos

1. Identificar centros con eficacias farmacológicas contrastantes para Azametifós y Deltametrina utilizando las bases de datos de INTESAL y SERNAPESCA disponibles para el programa de Caligus.
2. Evaluar mediante bioensayos la sensibilidad farmacológica de *C. rogercresseyi* expuestos a azametifós, cipermetrina y deltametrina.
3. Evaluar los cambios de expresión de un panel de genes asociados a respuesta de antiparasitarios en poblaciones de *C. rogercresseyi* expuestos a azametifós, cipermetrina y deltametrina.

Metodología

Muestreo biológico

Se recolectaron muestras de hembras y machos adultos de *C. rogercresseyi* desde centros de cultivo de la región de Los Lagos y de Aysén cuyas eficacias farmacológicas han mostrados resultados contrastantes durante el 2016 y 2017. Estos individuos fueron transportados en agua de mar al laboratorio de bioensayos para luego evaluar cambios de expresión de genes asociados a antiparasitarios utilizados actualmente en Chile.

Bioensayos

Diez machos y diez hembras obtenidos desde el centro de cultivo de la Región de Aysén fueron expuestos, por triplicado, a distintas concentraciones de azametifós (0, 1, 3, 8, 10, 30, 100 ppb), deltametrina (0, 0.5, 1.5, 5, 15, 20, 50 ppb) y cipermetrina (0, 0.5, 1.5, 5, 15, 20, 50 ppb). Los Caligus adultos fueron expuestos a cada concentración en placas Petri con agua de mar. Cada experimento se realizó por triplicado. El tiempo de exposición con azametifós y deltametrina fue de 30 y 40 minutos, respectivamente. El bioensayo se realizó a 12°C. Fueron consideradas 3 réplicas por cada concentración de quimioterapéutico, cada réplica contenía 10 copépodos parásitos (9 hembras más 1 macho de acuerdo a la

proporción de las muestras), según metodología adaptada del SEARCH (2006). El bioensayo fue considerado válido con un valor igual o superior a 80% de supervivencia en los controles. Afectados= moribundos + muertos. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism versión 6.02. Después de 24hr, los organismos fueron fijados en RNAlater® RNA Stabilization Reagent (Ambion, USA) y almacenados a -80° para realizar luego extracción de RNA y análisis de secuenciación masiva de transcriptoma y análisis de expresión génica por RT-qPCR [6, 8].

Validación por RT-qPCR

Para la validación del análisis de RNA-seq se realizó una evaluación de la expresión relativa de los genes asociados a respuesta a antiparasitario de *C. rogercresseyi* utilizando las muestras obtenidas de los bioensayos (control, azametifos, cipermetrina y deltametrina). Los partidores utilizados fueron obtenido desde bibliografía [6]. El análisis se realizó mediante PCR cuantitativa a través del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) en el termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Para normalizar los datos se utilizó el gen β -Tubulina como gen housekeeping (HKG). La reacción de qPCR se llevó a cabo en un volumen total de 10 μ l usando kit Power UP Master (Applies Biosystem) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C por 10 min, 40 ciclos a 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 30s eg. El análisis estadístico de los datos se realizó con el software JMP. Los datos obtenidos se analizaron mediante el test de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos. Los datos con una distribución paramétrica se evaluaron con una prueba de ANOVA, y para determinar las diferencias entre condiciones se realizó el test de multi-comparación Tukey-HDS. Los datos que no paramétricos fueron evaluados a través del test K-Wallis. Los datos estadísticamente significativos presentaron un $p < 0,05$.

Resultados

El análisis de las bases de datos para caligus sobre las eficacias farmacológicas de antiparasitarios utilizados en la industria, mostró 8 centros con resultados contrastantes de

sensibilidad. Esta información fue utilizada con la finalidad de evaluar respuestas diferenciales sobre la sensibilidad y tolerancia de *Caligus* expuestos a antiparasitarios (Tabla 1). De esta forma, para cada bioensayo se estimó el EC50 y su ajuste al modelo estadístico. Finalmente, a partir de las muestras denominadas “peor” o “mejor” para Azametifós, Cipermetrina y Deltametrina se realizaron los análisis moleculares para determinar los niveles de expresión de biomarcadores. La tabla 1 muestra el resumen de los bioensayos obtenidos desde las regiones de Los Lagos y Aysén para Azametifós y Deltametrina.

Tabla 1. Resumen de bioensayos obtenidos desde las regiones de Los Lagos y Aysén para Azametifós y Deltametrina.

Código centro (letra)	Código Centro idc	ACS	Región	Antiparasitario	Fecha bioensayo (inicio)	Concentraciones usadas para el cálculo EC50	EC50	95% CI	R ² adj	Test réplicas	Evidencia de
											Inadecuacia del modelo
A	1796	10b	LL	Mejor Aza	23 09 2017	0, 1, 3, 25, 50, 100 (ppb)	0,4778	0.0765 - 1.275	0,803	p=0.981	No
I	1334	17b	LL	Mejor Aza	06 01 2018	0, 3, 25, 50, 100 (ppb)	7,19	3.878 - 14.7	0,948	p=0.2743	No
J	4826	19a	AY	Peor Aza	09 11 2017	0, 1, 3, 25, 50, 100 (ppb)	13,72	6.392 - 32.6	0,8655	p=0.01	SI
T	1376	9b	LL	Peor Ciper	23 09 2017	0, 3, 5, 15, 30, 60 (ppb)	9,709	3.155 - 57.84	0,7239	p=0.0534	No
C	4145	10b	LL	Mejor Ciper	01 12 2017	0, 1, 3, 5, 15, 30, 60 (ppb)	2,178	0.972 - 5.259	0,761	p=0.0331	SI
M	2885	19a	AY	Mejor Ciper	12 12 2017	0, 1, 3, 5, 15, 30, 60 (ppb)	3,12	1.852 - 5.346	0,913	p=0.467	NO
A	1796	10b	LL	Peor Delta	23 09 2017	0, 0,5, 1, 3, 10, 20, 40 (ppb)	1,424	0.634 - 3.746	0,7694	p=0.0922	No
C	1871	10a	LL	Peor Delta	12 10 2017	0, 0,5, 1, 3, 10, 20, 40 (ppb)	3,042	1.826 - 5.285	0,9257	p=0.2324	No
D		10b	LL	Peor Delta	07 02 2018	0, 0,5, 1, 3, 10, 20, 40 (ppb)	2,9	1.303 - 7.233	0,889	p=0.113	No
F			AY	Peor Delta	21 03 2018	0, 0,5, 1, 3, 10, 20, 40 (ppb)	1,34	0.781 - 2.41	0,912	p=0.0468	NO
S	3962	24	AY	Mejor Delta	24 11 2017	0, 0,5, 1, 3, 10, 20, 40 (ppb)	2,18	1.128 - 4.676	0,8561	p=0.3078	NO

Los análisis moleculares realizados en 13 genes para *Caligus* expuestos a los tres antiparasitarios demuestra que los mayormente regulados en respuesta a los fármacos y por tanto, evidencia un comportamiento específico de sensibilidad farmacológicas son mostrados en las Figuras 1, 2 y 3, respectivamente.

Azamethiphos - 0 vs 5 ppb

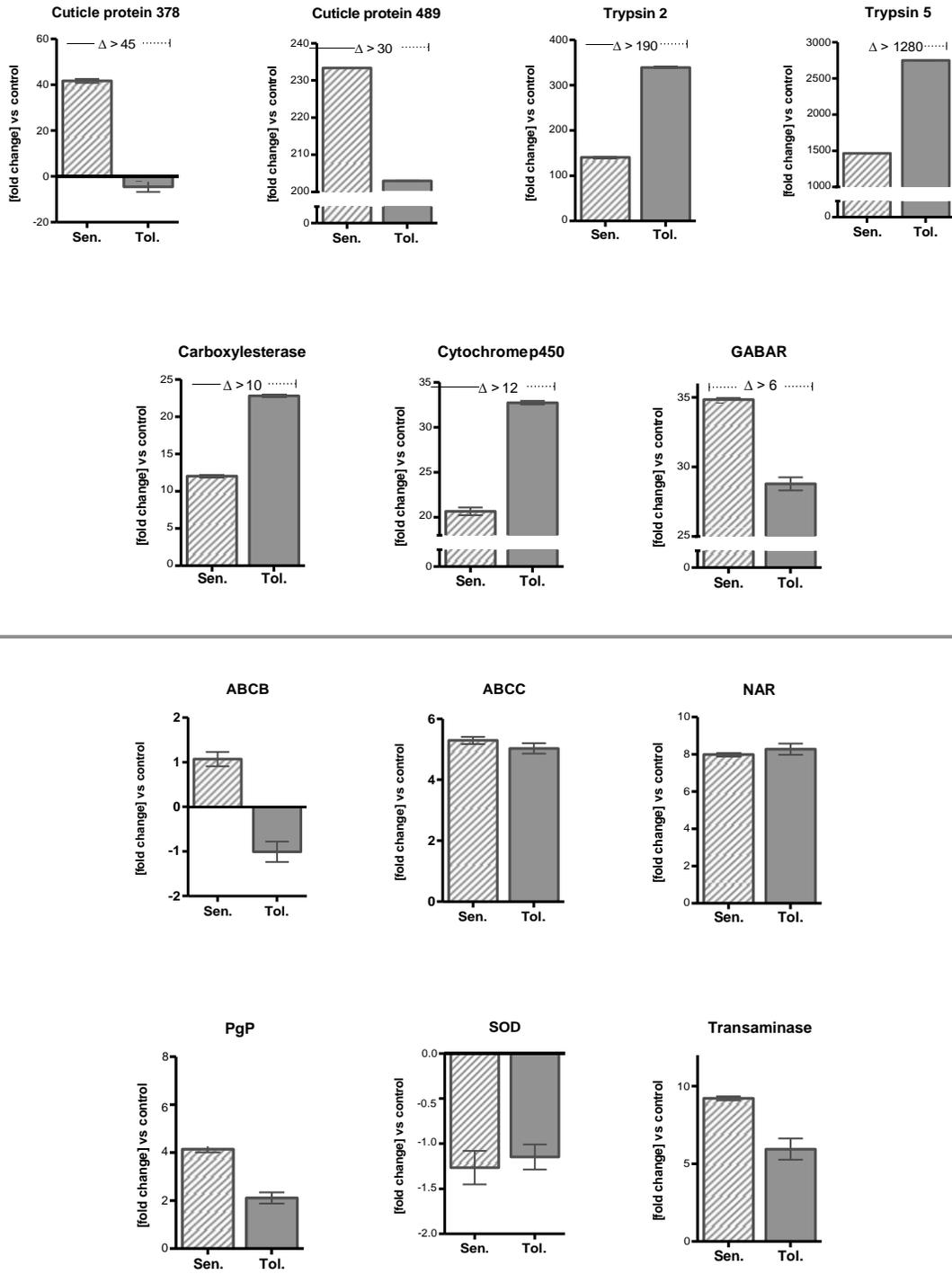


Figura 1. Análisis de biomarcadores para *C. rogercresseyi* sensibles y tolerantes expuestos a azametifós.

Cipermetrina - 0 vs 5 ppb

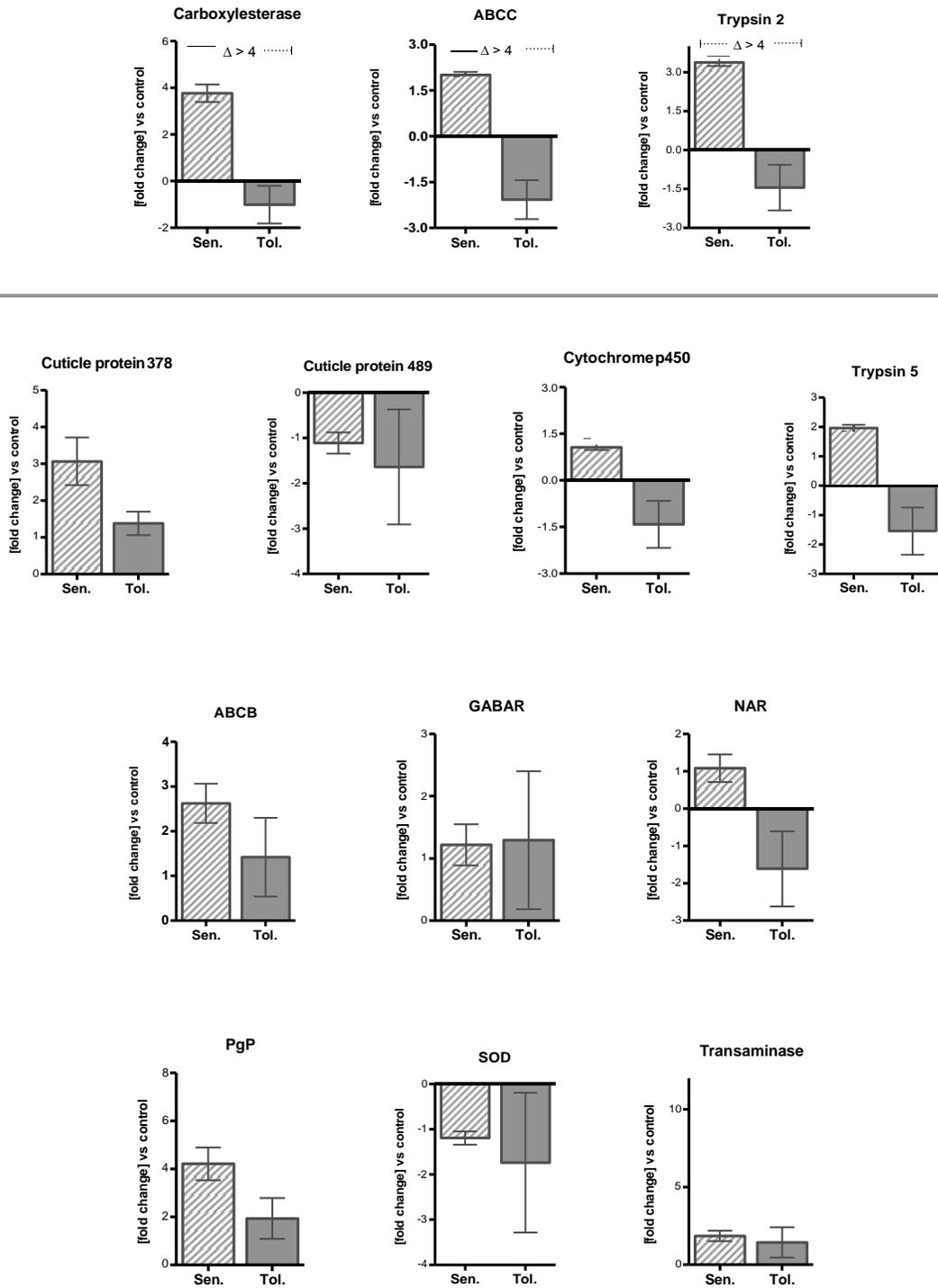


Figura 2. Análisis de biomarcadores para *C. rogercresseyi* sensibles y tolerantes expuestos a Cipermetrina.

Deltametrina - 0 vs 5 ppb

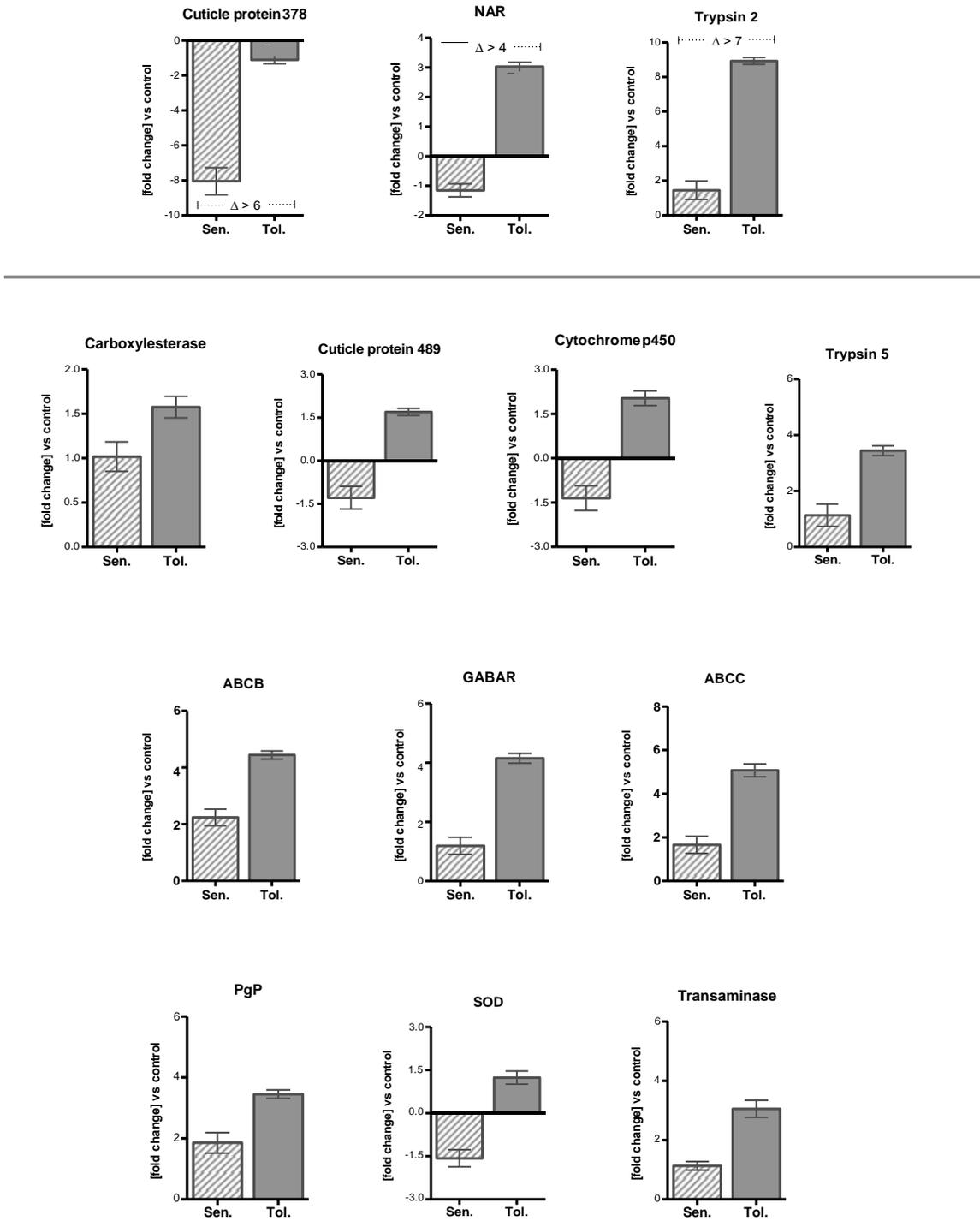


Figura 3. Análisis de biomarcadores para *C. rogercresseyi* sensibles y tolerantes expuestos a Deltametrina.

Conclusiones

Debido a las diferencias en los niveles de eficacia de los tratamientos utilizados para el control de *Caligus* en la industria salmonera de Chile, se requieren realizar estudios que permitan identificar los mecanismos moleculares involucrados en el proceso. Del análisis de expresión génica de genes asociados a la respuesta de antiparasitarios de *C. rogercresseyi* se observa que existen genes que son modulados de manera similar en *Caligus* sin efecto directo del tipo de antiparasitario que se utiliza. Así también, se observó diferencias de expresión de algunos genes evaluados entre las dos poblaciones de *Caligus*.

Dentro de los genes que han sido estudiados en ectoparásitos por su rol detoxificantes se encuentran los transportadores ABC. Entre estos transportadores se encuentran los ABCC y P-gp de la familia de los transportadores ABCB. En particular P-gp, se ha reportado cambios en sus niveles de expresión en piojo de mar con diferentes niveles de susceptibilidad a benzoato de Emamectina y piretroides [7, 9]. Además, los cambios de expresión de los transportadores ABCC han sido relacionados han sido reportados en *C. rogercresseyi* expuestos a azametifós y deltametrina [8]. En el caso de este estudio los *Caligus* expuestos a azametifós presentaron mayores niveles de expresión de ABCC, que pudiera estar participando en el proceso de eliminación del antiparasitario.

Dentro del efecto del uso de antiparasitarios se ha observado que pueden generar variaciones en el grosor de la cutícula de los artrópodos. En *L. salmonis* se ha observado variaciones en los niveles de expresión de genes asociados a formación de cutícula en cepas con distintos niveles de susceptibilidad a benzoato de emamectina [10]. En *C. rogercresseyi* se ha observado también cambios de expresión en este tipo de genes por efecto de la exposición a deltametrina y azametifós [11]. Del análisis hecho en este estudio es posible sugerir un efecto en los niveles de expresión de los tres antiparasitarios sobre la formación de genes claves para la respuesta de antiparasitarios en *C. rogercresseyi*.

Referencia

- [1] O. Torrissen, S. Jones, F. Asche, A. Guttormsen, O.T. Skilbrei, F. Nilsen, T.E. Horsberg, D. Jackson, Salmon lice – impact on wild salmonids and salmon aquaculture, *Journal of Fish Diseases* 36(3) (2013) 171-194.
- [2] S. Bravo, M. Nuñez, M. Silva, Efficacy of the treatments used for the control of *Caligus rogercresseyi* infecting Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in a new fish-farming location in Region XI, Chile, *Journal of Fish Diseases* 36 (2013) 221-228.
- [3] S. Bravo, M. Sepulveda, C. Lagos, Effectiveness of hydrogen peroxide in the control of *Caligus rogercresseyi* in Chile and implications for sea louse management, *Aquaculture* 303(1) (2010) 22-27.
- [4] S. Bravo, M. Nuñez, M.T. Silva, Efficacy of the treatments used for the control of *Caligus rogercresseyi* infecting Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in a new fish-farming location in Region XI, Chile, *Journal of Fish Diseases* 36(3) (2013) 221-228.
- [5] R.H. French-Constant, P.J. Daborn, G.L. Goff, The genetics and genomics of insecticide resistance, *Trends in Genetics* 20(3) (2004) 163-170.
- [6] V. Valenzuela-Muñoz, C. Gallardo-Escárate, Transcriptome mining: Multigene panel to test delousing drug response in the sea louse *Caligus rogercresseyi*, *Marine genomics* 25 (2016) 103-113.
- [7] V. Valenzuela-Muñoz, G. Nuñez-Acuña, C. Gallardo-Escárate, Molecular Characterization and Transcription Analysis of P-Glycoprotein Gene from the Salmon Louse *Caligus rogercresseyi*, *J Aquac Res Development* 5(236) (2014) 2.
- [8] V. Valenzuela-Muñoz, A. Sturm, C. Gallardo-Escárate, Transcriptomic insights on the ABC transporter gene family in the salmon louse *Caligus rogercresseyi*, *Parasites & vectors* 8(1) (2015) 1.
- [9] N.D. Tribble, J.F. Burka, F.S.B. Kibenge, Evidence for changes in the transcription levels of two putative P-glycoprotein genes in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) in response to emamectin benzoate exposure, *Molecular and Biochemical Parasitology* 153(1) (2007) 59-65.
- [10] S.N. Carmichael, J.E. Bron, J.B. Taggart, J.H. Ireland, M.I. Bekaert, S.T. Burgess, P.J. Skuce, A.J. Nisbet, K. Gharbi, A. Sturm, Salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) showing varying emamectin benzoate susceptibilities differ in neuronal acetylcholine receptor and GABA-gated chloride channel mRNA expression, *BMC Genomics* 14(1) (2013) 408.
- [11] J. Chávez-Mardones, V. Valenzuela-Muñoz, C. Gallardo-Escárate, In silico transcriptome analysis of cuticle-related genes associated with delousing drug responses in the sea louse *Caligus rogercresseyi*, *Aquaculture* 450 (2016) 123-135.