

Complejo de cobre (I) como suplemento alimenticio para el tratamiento en salmónidos contra *Piscirickettsia salmonis* y *Flavobacterium psychrophilum*

Resumen

Chile es el segundo mayor productor mundial de salmónidos, lo que lo convierte en una actividad clave para la economía nacional. Sin embargo, se producen pérdidas significativas debido a enfermedades infecciosas, especialmente las causadas por *Piscirickettsia salmonis* y *Flavobacterium psychrophilum*, que se controlan principalmente con el uso excesivo de antibióticos, lo que genera efectos negativos como resistencia, contaminación ambiental y reducción de la calidad del producto. En la búsqueda de nuevas herramientas para reducir el alto uso de antibióticos, hemos desarrollado un nuevo compuesto llamado CuBacti, con potencial como suplemento dietético para proteger a los salmónidos de infecciones. Experimentos demostraron su capacidad para estimular la respuesta inmunitaria y brindar protección contra infecciones causadas por *P. salmonis* y *F. psychrophilum*.

M. Parra¹, M. Rubio¹, J. Guerrero² y B. Modak^{1*}

¹ Laboratorio de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

² Laboratorio de Compuestos de Coordinación y Supramolecular, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

*brenda.modak@usach.cl

Introducción

Chile es el segundo país productor de salmónidos a nivel mundial, representando gran importancia en la economía del país (FAO, 2022). Las especies más producidas son salmón del Atlántico, trucha arcoíris y salmón coho, las cuales se ven afectadas por enfermedades infecciosas que disminuyen considerablemente la producción. Algunas de estas son las generadas principalmente por los patógenos *Piscirickettsia salmonis* y *Flavobacterium psychrophilum* (Sernapesca, 2023a).

Para su control, se utilizan principalmente vacunas y antibióticos. Sin embargo, las vacunas no presentan gran efectividad por la poca información sobre el funcionamiento del sistema inmune en salmónidos (Maisey y col., 2017; Figueroa y col., 2022). Por esta razón, el uso de antibióticos es la mayor herramienta para el control de las enfermedades (Sernapesca 2023b), provocando efectos adversos como la devaluación del producto, contaminación ambiental, resistencia bacteriana, disbiosis, entre otros.

Por lo tanto, es necesario la búsqueda de tratamientos alternativos para

el control de estas enfermedades. En los Laboratorios de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones y de Compuestos de Coordinación y Supramolecular de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile, hemos sintetizado un compuesto de coordinación de cobre (I) con un ligando derivado de cumarina, que denominamos CuBacti, con el objetivo de desarrollar un suplemento alimenticio con las capacidades antibacterianas del cobre y las propiedades inmunoestimulantes de compuestos naturales como la cumarina, que pudiera generar protección en salmónidos frente a la infección con *P. salmonis* y *F. psychrophilum* (Aldabaldetrecu y col., 2020; 2022; Parra y col., 2024a; 2024b).

Materiales y métodos

Síntesis por método template

Al precursor $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$, se añadió el doble de cantidades equimolares de reactivos de partida, 2-quinolin-carboxaldehído y 6-amino-cromen-2-ona, todo disuelto en acetonitrilo, y se mantuvo a temperatura ambiente con agitación constante, formándose una solución de color violeta que se concentró hasta obtener CuBacti cristalizado. (Parra y col., 2024a).

Efecto antibacteriano frente a *P. salmonis* y *F. psychrophilum*

El efecto antibacteriano del suplemento fue evaluado en medio libre de células mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento bacteriano (IC50) (Aldabaldetrecu y col., 2020; Parra y col., 2024a).

Evaluación del efecto inmunoestimulante en salmónidos

Se evaluó la capacidad de la dieta suplementada con el aditivo, en concentraciones de 20, 40 y 60 µg/gramo de pez, de modular la respuesta inmune en salmónidos, usando 120 truchas arcoíris y salmones del Atlántico.

Los peces fueron alimentados durante 60 días con la dieta suplementada con el aditivo. Se tomaron muestras de riñón anterior a los 15, 30, 45 y 60 días para evaluar los niveles de expresión de marcadores de la respuesta inmune

(IL-12, IL-1β, IFN-γ, TNF-α, TGF-β, CD4, Perforina y Lisozima) (Parra y col., 2024a; Parra y col., 2024b).

Evaluación del efecto protector de la dieta suplementada frente a infecciones con *P. salmonis* y *F. psychrophilum*.

En condiciones de laboratorio se evaluó el efecto protector de la dieta suplementada con el aditivo utilizando 60 salmones del Atlántico, los cuales fueron desafiados con *P. salmonis*, registrando su mortalidad durante 30 días (Parra y col., 2024a) y 60 truchas Arcoíris desafiadas con *F. psychrophilum* registrando su mortalidad durante 25 días (Aldabaldetrecu y col., 2022).

En ambos casos se evaluó carga bacteriana en los peces muertos y sobrevivientes. El efecto protector del suplemento en trucha arcoíris sobre *F. psychrophilum* también fue evaluado frente a un brote del patógeno en la piscicultura de Río Blanco “Federico Albert Taupp” utilizando 1.200 truchas arcoíris.

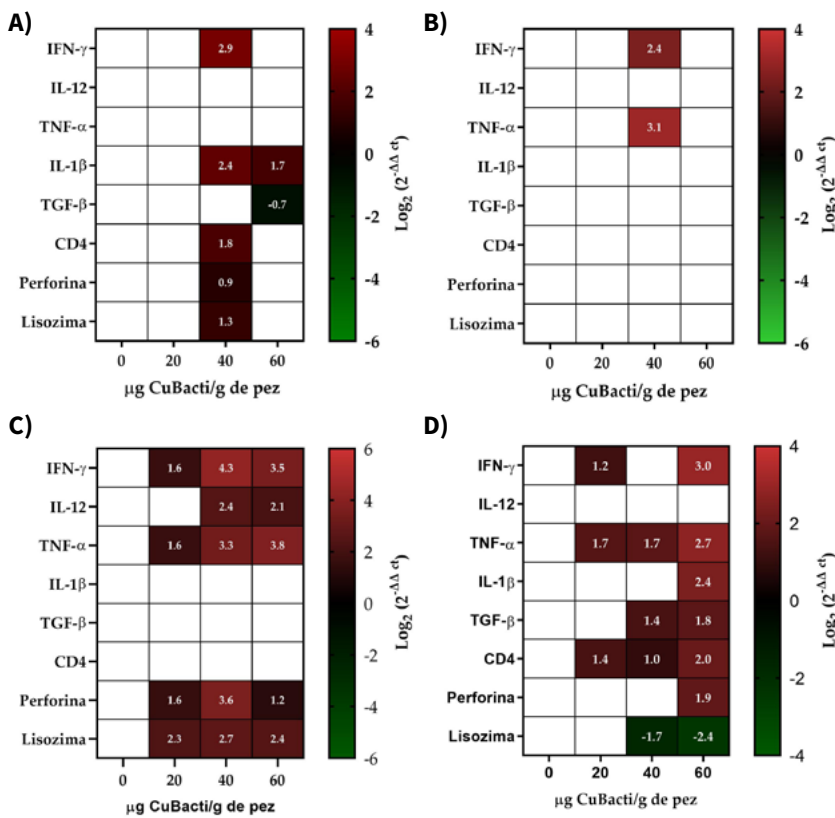


Figura 1. Evaluación de la respuesta inmune de salmónidos alimentados con el aditivo. a) Salmónes del Atlántico alimentados durante 15 días con el aditivo. b) Salmónes del Atlántico alimentados durante 30 días con el aditivo (Imagen modificada de Parra y col., 2024a). c) Truchas arcoíris alimentadas durante 30 días con el compuesto. d) Truchas arcoíris alimentadas durante 30 días con el compuesto. Fuente: modificada de Parra y col., 2024b.

Resultados

Actividad antibacteriana sobre *P. salmonis* y *F. psychrophilum*

El aditivo presentó actividad antimicrobiana frente a un aislado de *F. psychrophilum* con valores de CIM de 32 µg/mL y un IC50 de 10,4 µg/mL, mientras que para cuatro aislados de *P. salmonis* los valores de CIM fueron entre 15 a 34 µg/mL y de IC50 entre 5 a 15 µg/mL (Aldabaldetrecu y col., 2020; Parra y col., 2024a).

Evaluación de la respuesta inmune en salmónidos con dieta suplementada con el aditivo

El suplemento modula la respuesta inmune en salmón del Atlántico observando un aumento en los niveles de transcrito de IL-1β, IFN-γ, TGF-β, CD4,

Perforina y Lisozima a los 15 y 30 días de alimentación, en los peces tratados con 40 µg/gramo de pez del compuesto (Figura 1a y 1b) (Parra y col., 2024a).

Por otro lado, en la trucha arcoíris, el aditivo modula la respuesta inmune observando un aumento en los niveles de transcrito de IL-1β, IFN-γ, TNF-α, TGF-β, CD4, Perforina y Lisozima a los 30 y 45 días de alimentación en los peces tratados con 20, 40 y 60 µg/gramo de pez del compuesto. Sin embargo, el mayor efecto se observó en los peces tratados con 40 y 60 µg/gramo de pez (Figura 1c y 1d) (Parra y col., 2024b).

Evaluación en salmónidos del efecto protector de la dieta suplementada con CuBacti frente a desafíos con *P. salmonis* y *F. psychrophilum*.

En salmones del Atlántico, el grupo de peces a los cuales se les administró la dieta con 40 µg/gramo de pez del aditivo, sobrevivieron cerca del 90%, mientras que el grupo de peces sin tratamiento presentó un 30 % de sobrevivencia, luego de 30 días de seguimiento (Figura 2a) (Parra y col., 2024a). Por otro lado, del análisis de la carga bacteriana post desafío, en los peces sobrevivientes tratados y no tratados, se observó que en el grupo tratado con el compuesto no se detectó presencia de *P. salmonis* en ninguno de los peces (Parra y col., 2024a).

En truchas arcoíris, el grupo de peces a los cuales se les administró la dieta 60 µg/gramo de pez del aditivo, sobrevivió cerca del 75 %, mientras que el grupo sin tratamiento presentó un 35 % de sobrevivencia, luego de 20 días de seguimiento (Figura 2b) (Aldabaldetrecu y col., 2022). En cuanto a la carga bacteriana obtenida, en un 80% de los peces sobrevivientes del grupo tratado con el compuesto no se detectó *F. psychrophilum*, mientras que en el 57% de los peces del grupo control no se detectó la bacteria (Aldabaldetrecu y col., 2022).

Los experimentos realizados en la piscicultura de Río Blanco frente a un brote natural de *F. psychrophilum*, mostraron que los peces que recibieron el aditivo sobrevivieron cerca de un 94%, mientras que el grupo de peces alimentado con la dieta control sobrevivió cerca de un 88%,

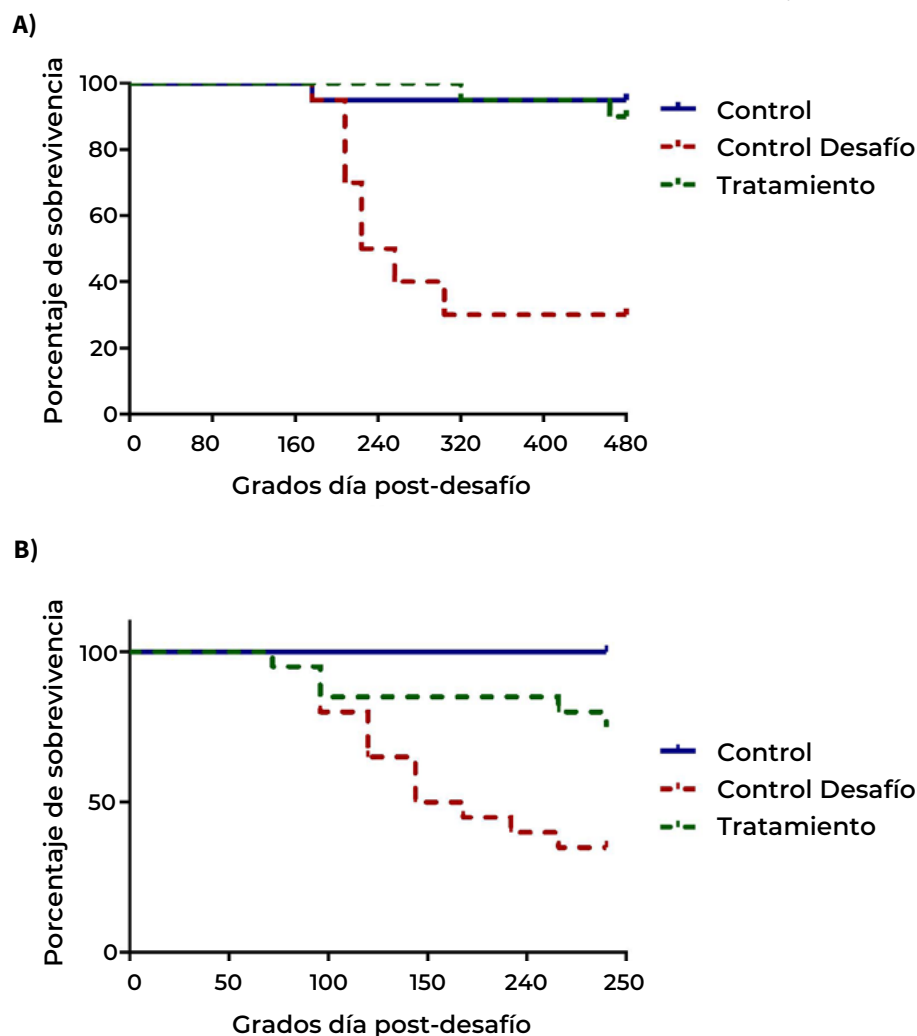


Figura 2. Ensayo de desafío en salmón del Atlántico y trucha arcoíris. (a) Curva de sobrevivencia de salmón del Atlántico frente a un desafío con *P. salmonis* ($p=0,0001$) (Imagen modificada de Parra y col., 2024). (b) Curva de sobrevivencia de trucha arcoíris frente a un desafío con *F. psychrophilum* ($p=0,0118$). Fuente: modificada de Aldabaldetrecu y col., 2022.

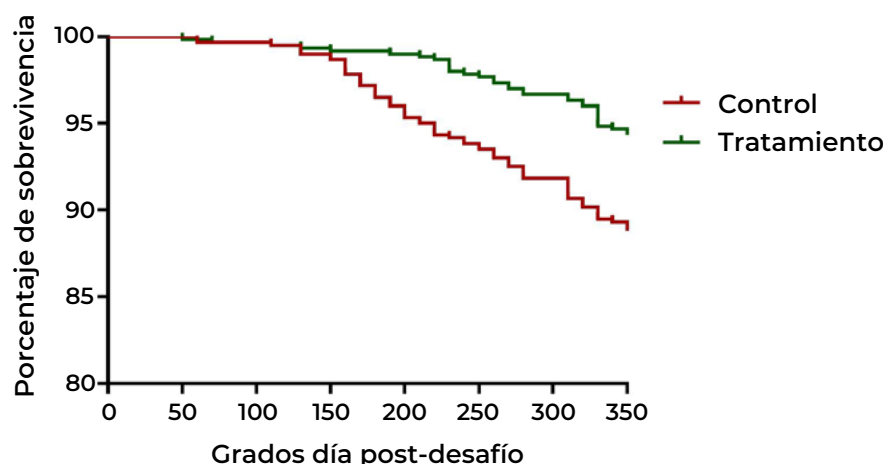


Figura 3. Curva de supervivencia de trucha arcoíris frente a un brote de *F. psychrophilum* tratados con CuBacti ($p = 0,0005$).

lo que se traduce en una reducción de la mitad de las mortalidades (Figura 3).

Discusión

El complejo de cobre (I) denominado CuBacti presentó actividad antibacteriana contra aislados de los dos patógenos de interés, probablemente debido a las propiedades antimicrobianas del centro metálico del complejo y al aumento en la permeabilidad celular lo que permitiría ingresar una mayor cantidad del complejo al interior de la bacteria (Chohan y col., 2010; Galkin y col., 2009). Sin embargo, es necesario realizar estudios para evaluar el mecanismo de acción del aditivo.

En salmónidos, la administración del compuesto en el pellet mediante aceitado mecánico, generó un aumento en marcadores de la respuesta inmune, principalmente los relacionados con respuesta inmune celular tipo Th1. Uno de los marcadores que presentó un aumento en ambos experimentos fue IFN- γ , el cual se relaciona con la activación de macrófagos, presentación de antígenos e inhibición de la replicación viral, además de estar relacionado con el aumento de otras citoquinas como IL-12, IL-1 β y TNF- α (Boehm y col., 1997; Green y col., 2017; Sica y col., 2012).

En la literatura también se ha reportado que compuestos como el ácido ferúlico y el ácido transcinámico aumentan la expresión de estas citoquinas y a la vez que generan protección contra *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas veronii* en trucha

arcoíris y tilapia del Nilo (Dawood y col., 2020; Yilmaz and Ergun 2018; Yilmaz 2019).

Por otro lado, el aditivo fue capaz de generar protección frente al desafío con *P. salmonis* y *F. psychrophilum* en salmón del Atlántico y trucha arcoíris. Resultados similares se han reportado para otros compuestos de cobre en pez gato, en los cuales se ha observado un aumento en la supervivencia al ser desafiados con *F. columnare* (Farmer y col., 2017).

Conclusión

El complejo de cobre (I), llamado CuBacti, demostró en experimentos en laboratorio, tener la capacidad de estimular la respuesta inmune en salmónidos y generar protección frente a desafíos con *P. salmonis* y *F. psychrophilum*. Futuros experimentos son necesarios para evaluar la capacidad de este compuesto, incorporado en el extrusado, de estimular la respuesta inmune y generar protección, para poder avanzar en el desarrollo de un suplemento alimenticio que pueda ser utilizado en la industria salmonera.

Financiamiento

Fondef ID24110149, Fondecyt 1180265, Fondecyt 1191902, VIU 21P007, Despega USACH 2020, Rápida implementación Science UP 2030 •

Referencias:

Descarga las referencias en www.salmonexpert.cl/descargas