

Bioestructura de la Piel de la Aleta Caudal del Salmón del Atlántico, en Estado Smolt y sus Interacciones con el Estado Chalimus del *Caligus Rogerresseyi*

Biostructure of the Atlantic Salmon Skin of the Caudal Fin, in the Smolt Stage and its Interactions with the Chalimus Stage of *Caligus Rogerresseyi*

Mario Pellón¹; Carolina Smok^{2,3}; Bélgica Vásquez⁴; Mariano del Sol⁵ & Mariana Rojas⁶

PELLÓN, M.; SMOK, C.; VÁSQUEZ, B.; DEL SOL, M. & ROJAS, M. Bioestructura de la piel de la aleta caudal del salmón del atlántico, en estado smolt y sus interacciones con el estado chalimus del *Caligus rogerresseyi*. Int. J. Morphol., 40(2):489-494, 2022.

RESUMEN: *Caligus rogerresseyi* es un copépodo que representa uno de los principales desafíos de la industria del cultivo de salmónidos en Chile, ya que afecta profusamente a la piel. Es preciso destacar que los peces en agua dulce y estuario no son afectados, a diferencia del salmón, que desde el post-smolt resulta muy parasitado cuando es trasladado al mar. Se han realizado múltiples estudios sobre el ciclo de vida del parásito y desarrollado tratamientos químicos, físicos y mecánicos para eliminarlos. Sin embargo, a la fecha, los tratamientos no han sido eficaces, lo que produce un problema permanente para el bienestar del animal. El propósito de este estudio fue el de reconocer la bioestructura de la piel de la aleta caudal del salmón del atlántico en los sitios de la interacción con chalimus. Para esto, se utilizaron 15 post-smolt infectados con *Caligus* y 5 post-smolt controles, sin *Caligus*. Los salmones fueron aportados por Fundación Chile y la experiencia se realizó en su propio centro experimental. Una vez realizada la eutanasia, mediante sobredosis del anestésico benzocaína, se obtuvieron muestras de las aletas caudales, las cuales fueron fijadas en formalina al 10%, incluidas en paraplast para realizar cortes de 5 µm de espesor y teñidas con Tricrómico de Masson y PAS. Los resultados indicaron que la piel de la aleta caudal de los post-smolt afectados presentan mayor altura de la epidermis, escasa células secretoras de mucus y solución de continuidad en la epidermis. Además, la membrana basal se discontinúa y ocurre un aumento de melanomacrófagos en la dermis.

PALABRAS CLAVE: Piel; Aleta Caudal; Salmón del Atlántico; Estado chalimus; *Caligus rogerresseyi*.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por *Caligus rogerresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000), comúnmente conocido como piojo de mar, representan uno de los principales desafíos de la industria del cultivo de salmónidos en Chile (Costello, 2006; Johnson *et al.*, 2004). El salmónido más susceptible frente a este copépodo es el salmón Atlántico (*Salmo salar*). Cuando se produce un desequilibrio en la interacción entre parásito y hospedero se presentan signos como un aumento en la descarga de mucus, erosiones y ulceraciones de la piel, pérdida de escamas, edema, inflamación alrededor del punto de fijación y hemorragia; todos estos cambios se asociaron con el tubo bucal del chalimus (Jónsdóttir *et al.*, 1992). Los pe-

ces en agua dulce y estuarios no son afectados, de manera que la infección comienza con los post-smolt que ingresan al mar y permanecen en constante infección durante toda su fase de engorda. Los productores están obligados a realizar tratamientos periódicos, los que están estrictamente regulados por normativa, así como su conteo periódico y envío de información a Sernapesca, tales como, la evaluación de la resistencia antiparasitaria.

Según Valenzuela (2009) las patologías ocasionadas por los copépodos pueden ser directas (actividades de fijación y alimentación) o indirectas (actividades relacionadas

¹ Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Chile.

² Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas, Universidad de La Frontera, Chile.

³ Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Finis Terrae, Santiago, Chile.

⁴ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

⁵ Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ), Universidad de La Frontera, Chile.

⁶ Programa de Biología integrativa, ICBM. Fac de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

con la respuesta inmune del pez). Es importante destacar que el estrés producido por la presencia de parásitos aumenta la susceptibilidad a infecciones secundarias (Pickering & Pottinger, 1989), predisponiendo al desarrollo de otras patologías, tales como las infecciones causadas por el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa o *IPNV*, *Renibacterium salmoninarum* (agente causal de BKD) y *Piscirickettsia salmonis* (agente causal de SRS) (Johnson *et al.*), incluso en algunos casos produce la muerte.

Se han descrito varios estadios en el desarrollo ontogénico del *Caligus*, entre los cuales podemos citar: 1) tres formas libres del parásito que son los estadios de nauplius 1, 2 y copepodito, 2) las cuatro formas que están adheridas por su filamento frontal al pez y son chalimus I, II, III y IV, 3) las formas adultas que están adheridas por succión: hembra adulta (4200 µm) y macho adulto (3956 µm) (González & Carvajal, 2003). En este estudio nos interesa analizar la etapa de chalimus ya que es la fase de adherencia al pez (Tabla I).

Tabla I. Etapas del desarrollo ontogénico del caligus con mediciones en µm. Tomado de González y Carvajal, 2003.

Tres formas libres	Naupilus 1	425
	Naupilus 2	463
	Copepodito	658
Cuatro formas que están adheridas por su filamento frontal al pez	Chalimus I	830
	Chalimus II	1271
	Chalimus III	2146
	Chalimus IV hembra	4201
	Chalimus IV macho	3956
Formas adultas que están adheridas por succión	Adulto hembra	4201
	Adulto macho	3956

En otras especies de copépodos, tales como *Lepeophtheirus salmonis*, se ha indicado que las etapas de chalimus se unen a las aletas dorsal y pectoral (Wootton *et al.*, 1982). Las zonas del pez, comúnmente parasitadas por chalimus de *C. rogercresseyi*, corresponden al abdomen del hospedador, región perianal y las aletas (Treasurer & Bravo, 2011). El daño producido por el parásito es provocado tanto por la sujeción en el hospedero como por la alimentación que realiza del mucus epidérmico, la piel y la sangre (González *et al.*; Valenzuela).

Caligus secreta compuestos inmunomoduladores a través de sus glándulas salivales, siendo los responsables de la falta de respuesta inmunitaria en el sitio de fijación por parte de los peces parasitados. Las secreciones excretadas por otro copépodo (*L. salmonis*) contienen prostaglandina E2 (PGE2); entre los efectos de la PGE2 están la vasodilatación, que hace mantener el flujo de sangre en la zona de infección, gatilla un

incremento de la producción de mucus y reduce la producción de linfocitos en la zona afectada. También, provoca una disminución de la función de los macrófagos (Treasurer & Bravo, 2011).

Johnson & Albright (1992) demostraron que el salmón coho es más resistente que el salmón chinook y el salmón del Atlántico a la infección experimental con *Lepeophtheirus salmonis*. El examen histológico de los sitios de inserción y alimentación en las branquias del salmón coho reveló una respuesta inflamatoria bien desarrollada desde el primer día de la infección. Los copépodos fueron eliminados de las branquias del salmón coho desde los 10 días posteriores a la infección. El examen histológico de las aletas infectadas del salmón coho reveló erosión epidérmica variable e inflamación de la dermis hasta 5 días después de la infección. A las 10, 15 y 20 días después de la infección, las lesiones se caracterizaron por hiperplasias epiteliales bien desarrolladas e intensas respuestas inflamatorias. Según los autores la resistencia del salmón coho a *L. salmonis* como a *C. rogercresseyi* se debe a agentes presentes en el mucus de estas especies tales como la tripsina, la cual bloquea la secreción de proteasas de bajo peso molecular liberadas por estos parásitos.

Los propósitos de este estudio, llevado a cabo en salmón del Atlántico infectado con estado chalimus del copépodo *C. rogercresseyi*, fue reconocer la bioestructura de la piel de la aleta caudal infectada con el estado larvario, describir los cambios histoquímicos y cuantificar el número de células secretoras de mucus en las áreas de la piel que está interactuando con chalimus, así como evaluar la integridad de la membrana basal y los cambios de la dermis, relacionada con los chalimus.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 20 post-smolts de salmón de Atlántico, los cuales fueron divididos en dos grupos. El grupo 1, estaba constituido por 5 salmones libres de *Caligus* y el grupo 2 estaba formado por los otros 15 salmones infectados experimentalmente por este copépodo. Fundación Chile aportó con los peces y desarrolló en su piscicultura la primera parte de esta experiencia relacionada con la infección con los copépodos.

De acuerdo a las regulaciones éticas de la investigación con animales de experimentación, el protocolo fue aceptado por el comité de ética en el ACTA N° 14321 del proyecto de investigación N°072/21. Los peces utilizados no sufrieron dolor, estrés, ni angustia porque fueron anestesiados, previo a una sobredosis benzocaína al 5 % (BZ-20®, Veterquímica).

Las muestras fueron fijadas en formalina al 10 %, incluidas en paraplast para realizar cortes transversales de 5 μm de grosor. Se realizaron dos técnicas histoquímicas: Tricrómico de Masson para evaluar dermis y lepidotriquis y PAS para identificar glicógeno y evaluar la integridad de la membrana basal. En cada grupo y mediante visualización con microscopio óptico (Stemi DV4, Zeiss) se registró en la epidermis: a) la altura del epitelio de revestimiento, b) el número de capas celulares del epitelio y el índice de células secretoras de mucus por cada 100 células epiteliales, y c) soluciones de continuidad de la membrana basal próximos a los chalimus.

Estudio estadístico. Los valores obtenidos para las variables cuantitativas se describieron a través de la media aritmética y la desviación estándar. Se realizó una prueba de T de Students. Se consideró un error α del 5 % en todas las pruebas estadísticas empleadas.

RESULTADOS

Las aletas del grupo experimental presentaron márgenes irregulares y una capa de mucus superficial. Se observó con lupa estereoscópica los chalimus incluidos en la piel (Fig. 1). La altura de la epidermis de la aleta caudal del grupo afectado era $380 \pm 33 \mu\text{m}$ y la del grupo control $100 \pm 20 \mu\text{m}$ ($p < 0,05$).

La epidermis de la aleta caudal de los peces afectados por el chalimus presentó hiperplasia epitelial con un promedio de 30 capas celulares (Fig. 2A), mientras que la epidermis de los peces control tenía un promedio de 15 capas celulares (Fig. 2B). En este estudio, prácticamente no se observaron células secretoras de mucus (3 en 500 células epiteliales) (Fig. 3). La membrana basal PAS+ está

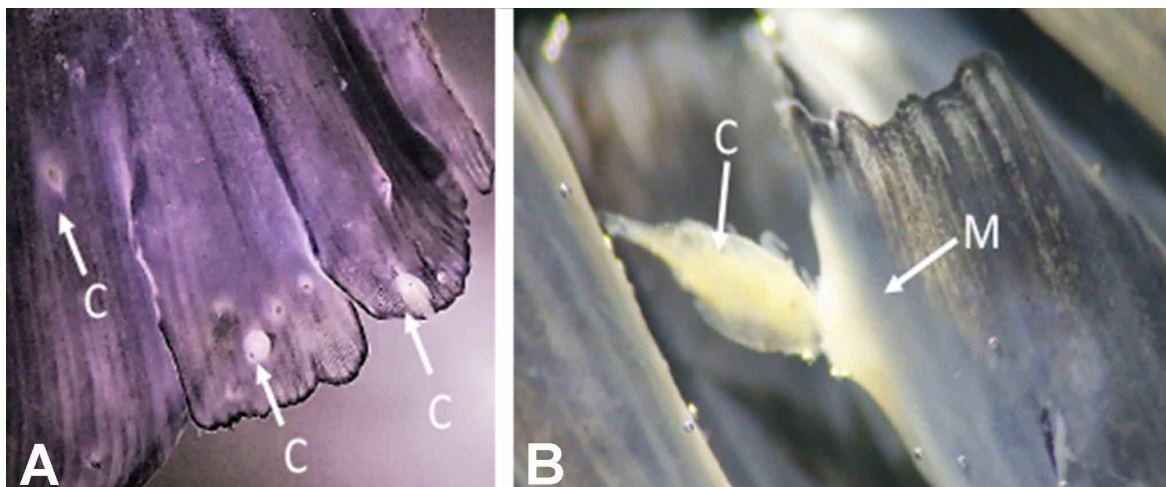


Fig. 1. A. Parte distal de la aleta caudal de salmón (*Salmo salar*). Se observan los chalimus (C) de color blanco en sus sitios de inserción unidos a la aleta. Los márgenes de aleta eran irregulares. Fig. B. Un chalimus (C) unido a la epidermis de la aleta caudal. La piel se observa con una gruesa capa de mucus (M).

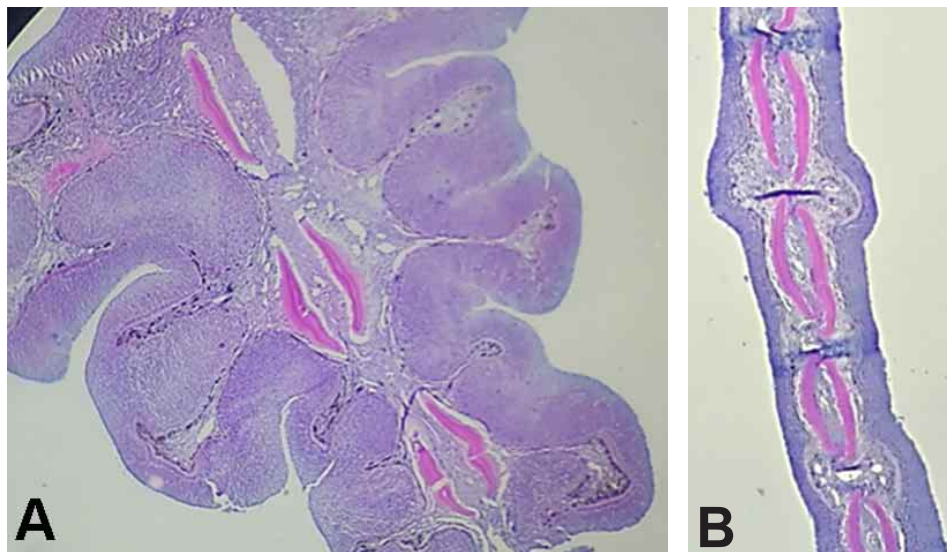


Fig. 2. A. Corte transversal de una aleta caudal, a través de tres lepidotriquis. Se observa hiperplasia de células epiteliales, la altura de la epidermis es tres veces mayor que la aleta control. B. Corte transversal de una aleta caudal control que toma cuatro rayos óseos. Técnica PAS 2,5X.

integra en gran parte de la aleta (Fig. 3A) a excepción de los lugares que se asocian a la presencia de *Caligus* donde ésta se interrumpe (Figs. 3B y 4A). Un gran número de melano-macrófagos se encuentran en la dermis como tam-

bién vasos sanguíneos y linfáticos (Figs. 3 y 4A). Finalmente, se identificó implantado el chalmus en la dermis subyacente a la epidermis (Fig. 4B).

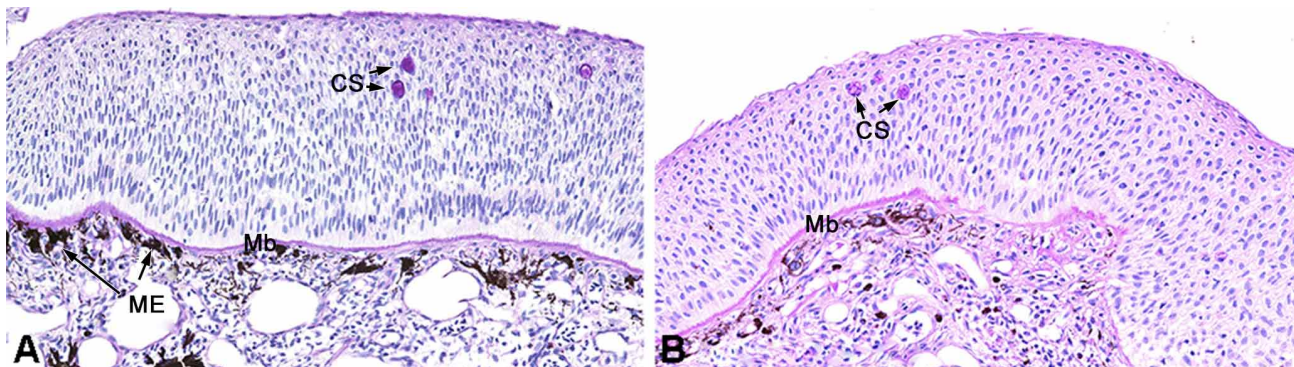


Fig. 3. Corte transversal de aleta caudal infestada con chalmus. A. Se observan tres células secretoras de mucus (CS), muchos melanomacrófagos (ME) y vasos sanguíneos en el tejido conjuntivo. La membrana basal (Mb) se mantiene íntegra en parte de la aleta. B. La epidermis no presenta soluciones de continuidad, pero se interrumpe la membrana basal (Mb). Se observan células secretoras de mucus (CS). Técnica PAS, 200X.

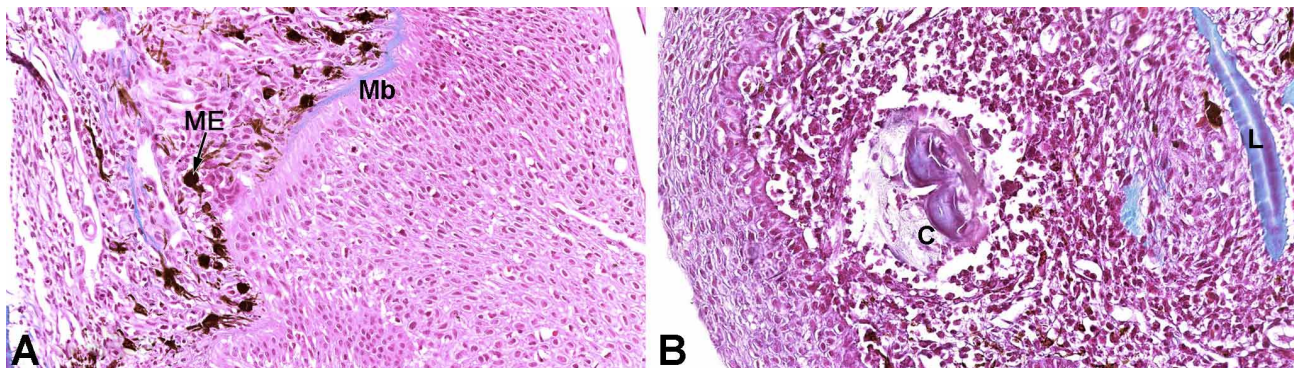


Fig. 4. Corte de aleta caudal. A. Se observa la epidermis formada por más de 30 capas celulares, con soluciones de continuidad. La membrana basal (Mb) se interrumpe en algunos segmentos, se observan muchos melanomacrófagos (ME). B. Un chalmus (C) ingresó y está incluido en la dermis bajo la epidermis y antes de las lepidotriquis (L). Técnica Tricómico de Masson, 200X.

DISCUSIÓN

En las áreas de la piel de la aleta caudal que está interactuando con chalmus se puede observar una solución de continuidad en el epitelio de revestimiento y la membrana basal. También es posible identificar lisis en el tejido mesenquimal de los inter-rayos y rayos óseos. La aleta caudal de los salmones parasitados por chalmus, presentan cambios a nivel del número de capas celulares de la epidermis con respecto al control, esto es similar a lo observado para un copépodo semejante a *Caligus*, llamado *Lepeophtheirus salmonis* (Wootton *et al.*, 1982), sin embargo los autores no estudiaron la aleta caudal y, en consecuencia, no describen que este copépodo pueda afectar esta aleta.

Los peces teleósteos presentan estrategias para defenderse de los agentes infecciosos, por ejemplo, las aletas tienen la capacidad de regenerarse completamente si estas son amputadas (Marí-Beffa & Murciano, 2010; Rolland-Lagan *et al.*, 2012). Por otra parte, y como hemos mencionado anteriormente, la epidermis está cubierta por un mucus glicoproteico que tiene la propiedad de capturar partículas extrañas, bacterias y virus, los cuales son removidos por el agua circulante. Es sabido que las sustancias tóxicas e irritantes pueden estimular en gran medida la secreción mucosa. Además, las infecciones bacterianas y parasitarias pueden modular el espesor o

alterar la consistencia de la capa de mucus. Estos resultados se relacionan con los estudios que indican que el espesor de la epidermis es mayor en la cabeza y aletas, donde no hay escamas (Rojas *et al.*, 2018). La dermis está compuesta por dos capas, la primera de ellas comprende una red de colágeno y fibras de reticulina con células pigmentarias, la segunda capa está formada por una matriz densa de fibras colágenas. La piel de los peces es la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos ambientales acuáticos. La presencia de mucus representa una adaptación evolutiva al medio acuático, ya que está poblado por diferentes especies bacterianas que pueden ser comensales u oportunistas, y que desempeñan un papel clave en el desarrollo del sistema inmune del huésped. La piel no solo tiene la propiedad de autoregenerarse, sino también, interviene y gatilla la formación de rayos óseos o lepidotriquiás en las aletas.

Las sustancias tóxicas e irritantes pueden estimular la secreción mucosa aumentando el espesor del mucus; este efecto es particularmente evidente en infecciones parasitarias. Se sabe que una capa de mucus es segregada por células secretoras inmediatamente después del primer contacto con patógenos. En este caso, no se observaron histológicamente células secretoras de mucus como lo describen los estudios de Fast *et al.* (2002) quienes demostraron claras diferencias en la susceptibilidad entre las especies, ellos midieron varios parámetros humorales no específicos en la trucha arcoiris, el salmón coho y el salmón del Atlántico y encontraron que este último tenía la actividad más baja de la lisozima y proteasa mucosas, la epidermis más delgada y distribución más escasa de células secretoras de mucus. En nuestro caso, en los peces que han sido parasitados, se observó que la aleta caudal cursa con hiperplasia epitelial, pero las células secretoras de mucus prácticamente están ausentes. A la fecha, la aleta caudal no había sido considerada como afectada por el chalimus (sea lice). Los estudios de Wootten *et al.* mencionan a las aletas dorsal y pectoral y los de Bravo (2011) indica que las zonas del pez comúnmente parasitadas por chalimus de *C. rogercresseyi*, corresponden al abdomen del hospedador, región perianal y las aletas dorsal y pectoral.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Chile por el aporte de los peces y su mantención en piscicultura durante el período experimental y al proyecto de investigación DIUFRO DFP 20-0033 de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

PELLÓN, M.; SMOK, C.; VÁSQUEZ, B.; DEL SOL, M. & ROJAS, M. Biostructure of the Atlantic salmon skin of the caudal fin, in the smolt stage and its interactions with the chalimus stage of *Caligus rogercresseyi*. *Int. J. Morphol.*, 40(2):489-494, 2022.

SUMMARY: *Caligus rogercresseyi* is a copepod that represents one of the main challenges of the salmon farming industry in Chile, since it profusely affects the skin. It should be noted that fish in freshwater and estuaries are not affected, unlike salmon, which from post-smolt is highly parasitized when transferred to the sea. Multiple studies have been carried out on the life cycle of the parasite and chemical, physical and mechanical treatments have been developed to eliminate them. However, to date, the treatments have not been effective, which produces a permanent problem for the welfare of the animal. The purpose of this study was to recognize the biostructure of Atlantic salmon caudal fin skin at sites of interaction with chalimus. For this, 15 post-smolt infected with *Caligus* and 5 post-smolt controls, without *Caligus*, were used. The salmon were provided by Fundación Chile and the experience was carried out in its own experimental center. Once the euthanasia was carried out, by means of an overdose of the anesthetic benzocaine, samples of the caudal fins were obtained, which were fixed in 10 % formalin, included in paraplast to make 5 µm-thick sections and stained with Masson's Trichrome and PAS. The results indicated that the skin of the caudal fin of the affected post-smolt presented a greater height of the epidermis, few mucus-secreting cells and a solution of continuity in the epidermis. In addition, the basement membrane is discontinued and an increase in melanomacrophages occurs in the dermis.

KEY WORD: Skin; Caudal fin; Atlantic salmon; Chalimus stage; *Caligus rogercresseyi*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boxshall, G. A. & Bravo, S. On the identity of the common *Caligus* (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen systems in southern Chile. *Contrib. Zool.*, 69:137-46, 2000.
- Costello, M. J. Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends Parasitol.*, 22(10):475-83, 2006.
- Fast, M. D.; Ross, N. W.; Mustafa, A.; Sims, D. E.; Johnson, S. C.; Conboy, G. A.; Speare, D. J.; Johnson, G. & Burka, J. F. Susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Atlantic salmon *Salmo salar* and coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to experimental infection with sea lice *Lepeophtheirus salmonis*. *Dis. Aquat. Organ.*, 52(1):57-68, 2002.
- González, L. & Carvajal, J. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*, 220(1-4):101-7, 2003.
- Johnson, S. C.; Treasurer, J. W.; Bravo, S.; Nagasawa, K. & Kabata, Z. A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zool. Stud.*, 43(2):229-43, 2004.
- Johnson, S. C. & Albright, L. J. Comparative susceptibility and histopathology of the response of naive Atlantic, chinook and coho salmon to experimental infection with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 14(3):179-93, 1992.
- Jónsdóttir, H.; Bron, J. E.; Wootten, R. & Turnbull, J. F. The histopathology associated with the pre-adult and adult stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 15(6):521-7, 1992.

- Marí-Beffa, M. & Murciano, C. Dermoskeleton morphogenesis in zebrafish fins. *Dev. Dyn.*, 239(11):2779-94, 2010.
- Pickering, A. D. & Pottinger, T. G. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 253-8, 1989.
- Rojas, M.; Romero, I. & Unda, F. Morfología de la piel de los salmónidos. *J. health med. sci.*, 4(2):131-4, 2018.
- Rolland-Lagan, A. G.; Paquette, M.; Tweedle, V. & Akimenko, M. A. Morphogen-based simulation model of ray growth and joint patterning during fin development and regeneration. *Development*, 139(6):1188-97, 2012.
- Treasurer, J. W. & Bravo, S. The spatial distribution patterns of *Caligus rogercresseyi* and *C. elongatus* on Atlantic salmon hosts (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 320(3-4):154-8, 2011.
- Valenzuela, T. Alimentación de los Estadios Chalmus del Piojo del Salmón, *Caligus rogercresseyi* Boxshall y Bravo 2000 y su Relación con el Daño Ocasionado sobre el Pez. Tesis de la Carrera de Biología Marina, Valdivia, Universidad Austral de Chile, 2009. 63 p.
- Wootten, R.; Smith, J. W. & Needham, E. A. Aspects of the biology of the parasitic copepods *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus* on farmed salmonids, and their treatment. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences*, 81(3):185-97, 1982.

Dirección para correspondencia:
Dra. Mariana Rojas Rauco
Programa de Biología integrativa
ICBM. Fac de Medicina
Universidad de Chile
Santiago
CHILE

Email: mrojasr@u.uchile.cl
dramrojas@hotmail.com