

Antivirales de origen natural en la industria acuícola: Un desafío a la Fitoterapia.

[Natural antivirals in the Aquaculture industry: a challenge to Phytotherapy]

Brenda MODAK CANOBRA

*Laboratorio de Química de Productos Naturales, Facultad de Química y Biología,
Universidad de Santiago de Chile.*

Contactos / Contacts: *Dra. Brenda MODAK CANOBRA - Email: brenda.modak@usach.cl*

Abstract

In Chile, salmon farming has grown greatly in recent years becoming an important commercial activity. However, the emergence of viral diseases has serious economic consequences. Salmonid species are the most affected ones, causing an important impact in salmon culture due to high mortality rates of fry and fingerling. For salmon culture, this is a big problem because of the difficulty of having closed and controlled spaces that avoids the easy dissemination of the pathogens to the sea and lakes. At present, control measures are limited to the use of disinfectants for the eggs and early detection of pathogens, as well as implementation of some vaccines that offers little protection. Therefore, the search for antiviral of natural origin, biodegradable and safe for the environment, emerges as a major challenge for phytochemical.

Key words: antivirals, aquaculture, salmon farming, phytotherapy

Resumen:

En Chile el cultivo de salmónes ha crecido de gran manera en los últimos años convirtiéndose en una actividad comercial muy importante. Sin embargo, en la industria acuícola, uno de los riesgos más graves que enfrentan los sistemas de cultivo intensivo es la aparición de enfermedades infecciosas, principalmente de origen viral, debido a las altas mortalidades de los individuos y la disminución en los parámetros productivos, como resultado de la enfermedad. En el caso de la salmonicultura esto se ve aumentado por la dificultad de tener espacios cerrados y controlados, de modo de, evitar la diseminación de los patógenos a los lagos y mares. Hasta ahora, las medidas de control se limitan al uso de desinfectantes de las ovas y el diagnóstico precoz de los patógenos, así como la aplicación de algunas vacunas que han mostrado baja protección. Por lo tanto, la búsqueda de antivirales de origen natural, biodegradables e inoocuos para el medio ambiente, surge como un gran desafío para los fitoquímicos.

Palabras claves: antivirales, acuicultura, salmonicultura, fitoterapia

Durante los últimos años, Chile ha desarrollado una industria de cultivo de salmón muy importante. De registrar exportaciones mínimas en 1980, Chile ha llegado a ser el segundo país productor del mundo alcanzando a Noruega, que ha sido históricamente el principal productor. En 1994, las exportaciones de productos de salmón llegaron a U\$ 349 millones. En poco más de una década, la cifra era siete veces mayor y en el 2008 alcanzó a U\$ 2.390 millones. Hoy en día, el salmón es el segundo sector exportador más importante de Chile (Anuario

estadístico Exportaciones Chilenas, 2010). Este sector constituye un elemento fundamental de la diversificación de la economía nacional y es uno de los pilares de la estrategia para convertir a Chile en una poderosa industria alimentaria (SalmonChile, 2010). Tal cómo lo reconocen los mismos productores, las condiciones geográficas, climáticas y del agua, han contribuido enormemente al éxito de esta actividad. Sin embargo, la globalización de los mercados mundiales ha significado que Chile, un país hace unos años libre de muchas enfermedades, ya no

tenga esta ventaja y el logro de una alta competitividad se ha visto amenazado. En general, los cultivos de piscicultura están constantemente expuestos a los ataques de diversas enfermedades infecciosas debido a las condiciones extremas de producción, provocando que el desarrollo de microorganismos sea de fácil difusión representando un problema difícil de controlar. Hay una gran variedad de enfermedades infecciosas que afectan el cultivo de peces que representan la principal causa de muerte. Estas enfermedades pueden ser causadas por virus, bacterias, parásitos y hongos, y causan cada año pérdidas de producción importantes. Así, la gran disminución de las exportaciones de salmón en el año 2009 tuvo su origen en el brote de enfermedades virales. De acuerdo con el Informe de Comercio Exterior elaborado por el Servicio Nacional de Aduanas de Chile, los envíos que representan el 55% de la pesca y la acuicultura, disminuyeron un 17% en 2009 (SalmonChile, 2010).

El desarrollo a gran escala del cultivo del salmón en nuestro país se ha enfrentado a la aparición y propagación de diversas enfermedades que en algunos casos se han convertido en patologías endémicas en salmones cultivados en el sur de Chile. Tal es el caso de la enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), Síndrome Rickettsia Salmonídeo (SRS) y la enfermedad de la Boca Roja (ERM). Probablemente estas patologías llegaron al país a través de la importación de ovas, de la que dependía casi en forma exclusiva Chile en el pasado, cuando las exigencias de internación no eran tan rigurosas (Pinto, 2003). En los últimos años, han aparecido otras enfermedades causadas principalmente por bacterias tales como la Vibriosis, Estreptocosis y Furunculosis atípica y parásitos tales como *Diphyllbothrium* sp., la amebiasis branquial (Torres, 2000) y Cáligus, un parásito que causa heridas y estrés a los peces y que son inmunosupresores, es decir, debilitan sus defensas dejándolos susceptibles al ataque de bacterias y virus. Sin embargo, dentro de los agentes infecciosos que mayor problema han causado, se encuentran los virus, especialmente el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN), que es el virus de mayor incidencia en todo el mundo (Wolf, 1988). IPNV es un birnavirus (familia Birnaviridae) (Dobos *et al.*, 1979). Este virus ha sido detectado en la mayoría de los centros de producción de salmón en el mundo, incluyendo Chile (Wolf, 1988; Hill y Way, 1995). IPNV afecta principalmente a peces jóvenes (crías y alevines), produciendo

grandes mortalidades (Wolf, 1988; Imajoh *et al.*, 2005). Otra enfermedad que afecta significativamente al cultivo salmónes es la causada por el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV), descubierta en 1984 en Noruega (Thorud y Djupvik, 1988). Este agente etiológico ha sido un problema para los centros de cultivos de salmónes del hemisferio norte, tales como Noruega, Canadá, Escocia, Islas Faroe y Estados Unidos (Lovely *et al.*, 1999), ya que las altas mortalidades observadas produjeron pérdidas que llegaron a abarcar en el caso de Noruega, casi la totalidad de la producción (Mjaaland *et al.*, 1997). En Chile, se describió un hallazgo de virus ISA en el año 2001, pero contrario al caso de los países del hemisferio norte, en ese momento no se asociaron grandes mortalidades y pérdidas a este agente infeccioso (Kibenge *et al.*, 2001). Sin embargo, en el 2007 el virus ISA comenzó a devastar el salmón chileno hasta alcanzar una pérdida de un 40% de la producción nacional.

Este es uno de los problemas principales para los centros de cultivo de salmón debido a la dificultad de contar con espacios cerrados y controlados para evitar la fácil diseminación de patógenos a los lagos y el mar. Debido a su importancia ecológica y comercial, se ha puesto mucho esfuerzo en los estudios relacionados con las infecciones virales y la búsqueda de compuestos antivirales (Rodríguez *et al.*, 2003). En la actualidad, la prevención de las enfermedades que afectan a los salmónes se realiza principalmente a través de las prácticas de manejo sanitario, el uso de vacunas autorizadas y/o selección de reproductores sanos (Sandoval, 2004). Las grandes pérdidas causadas por este tipo de enfermedades infecciosas han llevado a la búsqueda de soluciones, que de alguna manera controlen el progreso de ellas. En el caso de IPNV se han desarrollado vacunas, pero su grado de eficacia va entre un 40% y un 70% (Ramstad *et al.*, 2007), probablemente por la débil memoria del sistema inmunológico que presentan los peces (Sadasi, 1995). En el caso del virus ISA, además se ha demostrado que los orthomyxovirus, poseen una alta tasa de recombinación y mutaciones que da lugar a nuevas cepas, lo que dificulta la prevención por vacunas. Además, el uso profiláctico de antibióticos está dirigido a la prevención de infecciones bacterianas en peces altamente susceptibles a la infección a causa de perturbaciones inmunológicas causadas por el hacinamiento, las manipulaciones y problemas dietéticos creados por su desarrollo en un

sistema industrial. Sin embargo, hay evidencia de que el uso de antibióticos en la acuicultura genera la aparición de bacterias resistentes en los entornos acuáticos de esta actividad y hay evidencias epidemiológicas y moleculares, señalando que los genes involucrados en esta resistencia pueden ser transmitidos de bacterias acuáticas a bacterias capaces de infectar a los seres humanos y animales terrestres (Cabello, 2004). En resumen, las terapias utilizadas actualmente para el control de enfermedades infecciosas de los salmónidos, están basadas en el uso de productos químicos y vacunas que no tienen la suficiente eficiencia. Además, muchos de estos productos químicos están causando efectos secundarios o son sustancias prohibidas en otros países.

Existen algunas vacunas que ayudan a prevenir la infección por virus IPN (Christie, 2004; Salgado-Miranda, 2006), pero la inoculación es estresante y es difícil en alevines debido al pequeño tamaño de los peces. Además, los alevines tienen un sistema inmunitario inmaduro, por tanto, no se obtienen las respuestas esperadas. Por otra parte, existen algunos compuestos antivirales sintéticos que inhiben la replicación en cultivos celulares, tales como, isoxazol (U.S.Pat. N°10/314.366), ribavirina (Migus, 1980), pirazofurina (Jashés, 1996) y 5-etinil-1-β-D-ribofuranosilimidazol-4-carboximida (EICAR) (Jashés, 2000). Estos compuestos corresponden a productos químicos obtenidos sintéticamente, específicamente nucleósidos sintéticos. Los tres últimos inhiben la replicación viral a concentraciones que no tienen efecto citotóxico. Sin embargo, la ribavirina no ha tenido buenos resultados en los ensayos desarrollados in vivo (Somogyi y Dobos, 1980) y EICAR disminuye la mortalidad de los peces pero es inestable en el agua (Moya *et al.*, 2000).

Además, los virus que poseen como genoma RNA son los que sufren mayores variaciones por lo que resulta muy ineficiente desarrollar una vacuna, ya que aparecen cepas virales nuevas continuamente, las que se escapan a la respuesta inmune producida por la vacuna. Es por esto que desarrollar una terapia antiviral resulta más efectivo en estos casos. Por este motivo, obtener compuestos de origen natural, que no resulten nocivos, que sean biodegradables, que no alteren el ambiente y que posean actividad antiviral, es un gran desafío y una gran oportunidad para los químicos de productos naturales.

Hasta ahora, existe una gran variedad de estudios de compuestos naturales con actividad

antiviral sobre virus que atacan al hombre. Por ejemplo, existen compuestos naturales aislados de plantas que actúan sobre fases tempranas de ciclo de replicación del VIH. Se ha sugerido que los polisacáridos de *Rhizophora apiculata* y el ácido repandusínico de *Phyllanthus niruri* actúan previniendo la adsorción. Por su parte, se ha propuesto que la baicalina de *Scutellaria baicalensis* actúa inhibiendo la fusión entre el virus y las células receptoras. Se han aislado otros compuestos que actúan sobre fases más tardías del ciclo replicativo del VIH. Tal es el caso de las cumarinas aisladas del género *Calophyllum*, que parecen inhibir específicamente la retrotranscriptasa del VIH-1 (Perera, 2007). De igual modo, componentes del té verde, han sido utilizados satisfactoriamente en trabajos preclínicos contra el virus de la influenza A (Oxford *et al.*, 2007), solo por nombrar algunos ejemplos. Sin embargo, la investigación de antivirales naturales para salmónidos es casi nula. Al respecto, la única patente en que se describe un agente terapéutico de origen natural es U.S.Pat. N°6.440.466 que provee una composición profiláctica y/o terapéutica que contiene cantidades efectivas de extractos obtenidos de las plantas *Lantena camera*, *Aegle marmelos*, *Ocimum sanctum*, *Mimosa pudica*, *Cynodon dactylon*, *Curcuma longa* y *Allium sativum*, opcionalmente en combinación con diluyentes o excipientes aceptados farmacológicamente.

En Chile, se están realizando estudios sobre la actividad antiviral de derivados terpénicos aislados desde especies del género *Heliotropium*. De esta investigación, se determinó que el éster senecionílico de filifolinol logró una inhibición significativa de la replicación viral de IPNV a dosis no citotóxicas, determinándose un EC₅₀ de 160 µg/mL. El estudio de la síntesis de proteínas, mostró que este compuesto actúa inhibiendo la síntesis de RNA mensajero viral (Modak *et al.*, 2010). Por otra parte, recientes estudios se están llevando a cabo utilizando algas como fuentes de antivirales naturales contra el virus ISA (Cortés, 2009).

A pesar de que plantas y yerbas medicinales, son ampliamente conocidas, documentadas y utilizadas en la salud humana y como potenciales biocidas (Cespedes *et al.*, 2010; Urzúa *et al.*, 2010; Ocampo *et al.*, 2010; Gomez Estrada *et al.*, 2011), muy poco hay respecto de su uso en terapias antivirales para especies acuícolas, abriendo un amplio campo de investigación en el área de la Fitoquímica, invitándonos a tomar este desafío.

Referencias

- Cabello F. 2004. Antibiotics and aquaculture in Chile: Implications for human and animal health. **Rev Méd Chile** 132: 1001 - 1006.
- Céspedes CL, Alarcón J, Avila JG, El-Hafidi M. 2010. Anti-inflammatory, antioedema and gastroprotective activities of *Aristolochia chilensis* extracts, part 2. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 9: 432 - 439.
- Christie K. 2004. Immunization with viral antigens: infectious pancreatic necrosis. **J Virol** 78: 13829 - 13838.
- Cortés M. 2009-2011. **Búsqueda de un tratamiento antiviral contra el Virus de la Anemia infecciosa del Salmón (ISAV) basado en el uso de compuestos naturales extraídos de algas marinas**. Proyecto PBCT de inserción a la academia. Investigador principal. Universidad de Santiago de Chile.
- Dobos P, Hill B, Hallett R, Kells D, Becht H, Teninges D. 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. **J Virol** 32: 593 - 605.
- Gómez Estrada HA, González Ruiz KN, Medina JD. 2011. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 10: 182 - 217.
- Hill B, Way K. 1995. Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other birnaviruses. **Annu Rev Fish** 5: 55 - 77.
- Imajoh M, Hirayama T, Oshima S. 2005. Frequent occurrence of apoptosis is not associated with pathogenic infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) during persistent infection. **Fish Shellfish Immunol** 18:163 - 177.
- Jashes M, González M, López-Lastra M, De Clerq E, Sandino A. 1996. Inhibitors of infectious pancreatic necrosis virus replication. **Antiviral Res** 29: 309 - 312.
- Jashes M, Mlynarz G, De Clerq E, Sandino A. 2000. Inhibitory effects of EICAR on infectious pancreatic necrosis virus replication. **Antiviral Res** 45 9 - 17.
- Kibenge F, Garate O, Jonson G, Arriagada R, Kibenge M, Wadowska D. 2001. Isolation and identification of infectious salmon anemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. **Dis Aquat Organ** 45: 9 - 18.
- Lovely J, Dannevig B, Falk K, Hutchin L, MacKinnon A, Melville K, Rimstad E, Griffiths S. 1999. First identification of infectious salmon anaemia virus in North America with haemorrhagic kidney syndrome. **Dis Aquat Organ** 35: 145 - 148.
- Migus D, Dobos P. 1980. Effect of ribavirin on the replication of infectious pancreatic necrosis virus in fish cell cultures. **J Gen Virol** 47: 47 - 57.
- Mjaaland S, Rimstad E, Falk K, Dannevig B. 1997. Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo solar* L): an orthomyxo-like virus in a teleost. **J Virol** 71: 7681 - 7686.
- Modak B, Sandino A, Arata L, Cárdenas-Jirón G, Torres R. 2010. Inhibitory effect of aromatic geranyl derivatives isolated from *Heliotropium filifolium* on infectious pancreatic necrosis virus replication. **Vet Mic** 141: 53 - 58.
- Moya J, Pizarro H, Jashes M, De Clerq E, Sandino A. 2000. In vivo effect of EICAR (5-ethylnyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-carboxamide) on experimental infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fry with infectious necrosis virus. **Antiviral Res** 48: 125 - 130.
- Ocampo R, Mora G. 2010. Las plantas medicinales de America latina como materia prima ¿Cuál ES, o debería ser su papel?. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 9: 323 - 325.
- Oxford J, Lambkin R, Guralnik M, Rosenbloom R, Petteruti M, Digian K, Lefante C. 2007. Preclinical in vitro activity of QR-435 against influenza A virus as a virucide and in paper masks for prevention of viral transmission. **Am J Ther** 14: 455 - 461.
- Perera M. 2007. Mecanismo de acción de compuestos antivirales de plantas: el virus de la inmunodeficiencia humana como modelo. **Revista Digital de la Academia de Biomedicina de la Facultad de Medicina de Venezuela, VITAE**, 31.
- Pinto J. 2003. "Riesgos de introducción de enfermedades infectocontagiosas en salmonidos". Proyecto FIP 2001-2008 **Informe de Resultados**.
- Ramstad A, Romstad A, Knappskog D, Midtlyng P. 2007. Field validation of experimental challenge models for IPN vaccines. **J Fish Dis** 30: 723 - 731.

- Rodriguez S, Borrego J, Pérez-Prieto S. 2003. Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis and diagnostic methods. **Adv Virus Res** 62: 113 - 165.
- Sadasiv E. 1995. Immunological and pathological responses of salmonids to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). **Annu Rev Fish Dis** 5: 209 - 223.
- Salgado-Miranda C. 2006. Infectious pancreatic necrosis: an emerging disease in the Mexican trout culture. **Vet Mex** 37: 467 - 477.
- Sandoval F. 2004. “Estatus ambiental y sanitario de la acuicultura chilena”. Presentación del Subsecretario de Pesca de Chile. AquaVision, Noruega.
- Somogyi P, Dobos P. 1980. Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. **J Virol** 33: 129 - 139.
- Thorud K, Djupvik H. 1988. Infectious anemia in Atlantic salmon (*Salmo solar* L). **Bull Eur Assoc Fish Pathol** 8:109 - 111.
- Torres P, Aedo E, Figueroa L, Siegmund I, Silva R, Navarrete N, Puga S, Marín F, Aedo E. 2000. Infección por helmintos parásitos en salmón coho, *Oncorhynchus kisutch*, durante su retorno al río Simpson, Chile. **Bol Chil Parasitol** 55: 31 - 35.
- Urzúa A, Santander R, Echeverría J, Villalobos C, Palacios SM, Rossi Y. 2010. Insecticidal properties of *Peumus boldus* Mol. Essential oil on the house fly, *Musca domestica* L. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 9: 465 - 469.
- Wolf K. 1988. **Infectious pancreatic necrosis**, pp.115-157. In *Fish Viruses and Fish Diseases*. Comstock Publishing Associate, Cornell University Press, Londres, Inglaterra.