



PLAN OPERATIVO

PROYECTOS 2012

NOMBRE INICIATIVA:	Plataforma para la producción in situ de proteínas con actividad estimulante de la respuesta inmune en Salmónidos.
EJECUTOR:	Universidad de Santiago de Chile
CODIGO:	PYT-2012-0056
FECHA:	26-07-2012

FIRMA POR FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

FIRMA POR EJECUTOR (Coordinador Principal)

CONTENIDO

I.	PLAN DE TRABAJO TÉCNICO.....	3
A.	Antecedentes Generales	3
B.	Plan de Trabajo	5
C.	Dedicación	18
D.	Fichas curriculares.....	20
E.	Indicadores Solicitados por el Ministerio de Agricultura	26

I. PLAN DE TRABAJO TÉCNICO

A. Antecedentes Generales

1. Nombre Ejecutor (Entidad Responsable)

Nombre	Giro / actividad	RUT	Representante(s) Legal(es)
Universidad de Santiago de Chile (USACH)	EDUCACIÓN		Juan Manuel Zolezzi Cid

2. Identificación de Agentes Asociados

Nombre	Giro / actividad	RUT	Representante(s) Legal(es)
ActivaQ S.A.	Laboratorio de Investigación y Desarrollo y Comercialización de Productos Veterinarios		Geraldine Mlynarz Zylberberg

3. Coordinadores Principal y Alterno

Nombre	Formación / grado académico	Empleador	Función dentro del proyecto
Mario Tello Reyes	Dr. Bioquímica	USACH	Coordinador Principal
Ana María Sandino	Dr. en Ciencias	USACH	Coordinador Alterno

4. Duración y ubicación del Proyecto

Duración		Período de ejecución	
Meses	36	Fecha de inicio	01 de agosto de 2012
		Fecha de término	31 de julio de 2015
Territorio			
Región (es)		Comuna (as)	
Metropolitana		Santiago	

5. Resumen ejecutivo (máximo 400 palabras)

Chile fue el segundo productor mundial de salmónidos, sin embargo los diversos agentes patógenos que afectan a la Salmonicultura han reducido su competitividad. La gravedad de esta situación se evidenció entre 2007 y 2010 cuando producto de brotes de virus ISA se produjo el cierre del 90% de los centros productores.

Estos problemas se han combatido principalmente preparando el sistema inmune de los peces. La vacunación es la estrategia más utilizada, sin embargo muestra resultados variables con importantes pérdidas debido al estrés ocasionado al pez, daño en la calidad del filete y muerte de los ejemplares por mala manipulación. Esta situación desincentiva su uso y merma su eficiencia, requiriendo de varias vacunaciones para un óptimo resultado.

Estudios sobre la respuesta inmunológica en salmones, mamíferos y humanos indican que el Interferón I media la respuesta inmune frente a infecciones virales, confiriendo a la célula un estado de resistencia a la infección. En humanos y mamíferos se han logrado terapias efectivas cuando se administra interferón I en forma independiente o conjunta con antivirales. Esta evidencia indica que el desarrollo de una plataforma para producir y liberar Interferón I administrada por vía oral, mejoraría la competitividad de la industria Salmonera incrementando la resistencia de los salmones a infecciones virales.

En este proyecto se propone administrar interferón I, utilizando como vehículo a *Lactococcus lactis* una bacteria parte de la flora intestinal de salmones y GRAS para humanos, la cual podrá sintetizar y liberar en la mucosa del pez el interferón I, produciendo una barrera a nivel celular que impida la replicación del virus.

Se plantean como objetivos 1.- Obtener una cepa de *L. lactis* que permita la expresión y secreción de Interferón I utilizando un plasmidio carente de resistencia antibióticos 2.- Evaluar las propiedades biológicas y bioquímicas del interferón I producido por *L. lactis*, 3.- Probar la efectividad de este tratamiento preventivo desafiando con virus IPNV poblaciones de salmones alimentadas con la bacteria productora de Interferón I y 4.- Realizar la transferencia tecnológica de este producto a empresas del sector acuícola.

Como resultado del proyecto se espera: 1.- Obtener una plataforma de producción de proteínas recombinantes con propiedades terapéuticas (antígenos, citoquinas, anticuerpos, etc.) en salmónidos que permita su liberación in situ, 2.- Generar una bacteria que libere interferón I en el tracto gastrointestinal de salmónidos, produciendo su inmunoestimulación y 3.- El licenciamiento de estos dos desarrollos que serán escalados comercialmente por la empresa asociada ActivaQ. S.A.

6. Propiedad Intelectual

¿Existe interés por resguardar la propiedad intelectual?	Si	X	No	
Nombre institución que la protegerá	% de participación			
Universidad de Santiago de Chile	60%			
ActivaQ S.A.	40%			

B. Plan de Trabajo

7. Objetivos

Objetivo general	
Desarrollar una plataforma que permita la expresión in situ de proteínas recombinantes con propiedades terapéuticas sobre <i>Salmo salar</i> , específicamente la expresión de Interferón I por su propiedad inmunoestimuladora, de modo de optimizar la eficiencia del uso de antibióticos y de vacunas aplicadas actualmente.	
Nº	Objetivos específicos (OE)
1	Establecer en <i>Lactococcus lactis</i> un sistema de expresión y liberación de Interferón I por sus propiedades inmunoestimulantes sobre <i>Salmo salar</i> .
2	Validar <i>in vitro</i> las propiedades biológicas y funcionalidad del Interferón I producido por la cepa recombinante de <i>Lactococcus lactis</i> .
3	Validar <i>in vivo</i> , sobre <i>Salmo salar</i> , las propiedades terapéuticas e inmunoestimulantes de la cepa de <i>Lactococcus lactis</i> productora de Interferón I.
4	Realizar la transferencia tecnológica para la producción de las cepas de <i>Lactococcus lactis</i> productoras de Interferón I, con fines de comercialización.

8. Resultados esperados (RE)

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicadores de Resultados				Fecha de Cumplimiento	
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base del indicador (situación actual)	Meta del indicador (al final del proyecto)		
1	1	Una plataforma que permita la expresión y liberación de Interferón I	Producción de Interferón I de <i>Salmo salar</i> mediante el uso de cepas de <i>Lactococcus lactis</i> .		1	>10	Septiembre 2013	
					0	500 ng	Septiembre 2013	
2	2	Proteínas recombinantes producidas por <i>Lactococcus lactis</i> con propiedades inmunoestimuladoras, activa biológica y funcionalmente ex vivo.	Estimulación de la respuesta a Interferón I en cultivo celular de Salmón.		~1	>20	De acuerdo a los resultados de Ooi et al 2008	Diciembre 2013
					~1			
			Bioactividad del interferón I sobre la expresión de los genes Mx y PKR		0 UA	> 6UA	Diciembre 2013	
					0 UA	> 6UA		

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicadores de Resultados				Fecha de Cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base del indicador (situación actual)	Meta del indicador (al final del proyecto)	
2	2	Proteínas recombinantes producidas por <i>Lactococcus lactis</i> con propiedades inmunoestimuladoras, activa biológica y funcionalmente ex vivo.	Resistencia a la Infección por IPN Virus (tratamiento preventivo).		1	<1/1000	Abril 2014
3	3	Cepas recombinante de <i>Lactococcus lactis</i> , que luego de ser administrada oralmente a <i>Salmo salar</i> , permitan la expresión de interferón recombinante, "in situ", inmunoestimulándolo.	Inmunoestimulación del Pez		~1	>20 (De acuerdo a los resultados de Ooi et al. 2008)	Agosto 2014
			Resistencia a Infecciones por IPNV		40%	65%	Agosto 2014
4	4	Producción a escala piloto de <i>Lactococcus lactis</i> productor de Interferón I	Escalamiento productivo piloto		0	>10 millones de dosis/m ³	Diciembre 2014
					0	OD =1,5	Diciembre 2014
			Evaluación de producción y actividad de Interferón producido por <i>L. lactis</i> .		0	>10	Diciembre 2014

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicadores de Resultados				Fecha de Cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base del indicador (situación actual)	Meta del indicador (al final del proyecto)	
4	4	Producción a escala piloto de <i>Lactococcus lactis</i> productor de Interferón I	Evaluación de producción y actividad de Interferón producido por <i>L. lactis</i> .			500 ng	
					~1	>20	
					~1	De acuerdo a los resultados de Ooi et al 2008	
4	5	Transferencia a ActivaQ de Protocolos y Cepas para el crecimiento a escala piloto de <i>Lactococcus lactis</i> productor de Interferón I	Autorizaciones otorgadas para la comercialización de <i>L. lactis</i> productor de Interferón I		0 UA	> 6UA	Abril 2015
					0 UA	> 6UA	
4	5	Transferencia a ActivaQ de Protocolos y Cepas para el crecimiento a escala piloto de <i>Lactococcus lactis</i> productor de Interferón I	Autorizaciones otorgadas para la comercialización de <i>L. lactis</i> productor de Interferón I		0	1	Abril 2015

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicadores de Resultados				Fecha de Cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base del indicador (situación actual)	Meta del indicador (al final del proyecto)	
4	6	Difusión de resultados	Presentaciones nacionales	N° de presentaciones nacionales.	0	2	Diciembre 2014
				Cantidad total de personas asistentes en las presentaciones nacionales	0	300	
			Presentaciones internacionales	N° de presentaciones internacionales de resultados.	0	1	Diciembre-2014
				Cantidad total de personas asistentes en las presentaciones internacionales	0	500	
			Seminario con piscicultores	N° de seminarios con piscicultores.	0	1	Mayo-2015
				Cantidad total de personas asistentes en los seminarios con piscicultores	0	50	

9. Actividades

Nº OE	Nº RE	Actividades	Fecha de inicio	Fecha de término
1	1	Síntesis de Fragmentos de DNA	Agosto-2012	Septiembre-2012
1	1	Implementación de Técnicas de Biología Molecular	Agosto-2012	Diciembre-2012
1	1	Construcción de plasmidios	Octubre-2012	Marzo-2013
1	1	Transformación del plasmidio en <i>Lactococcus lactis</i> y selección por capacidad de crecer en sacarosa o lactosa	Enero-2013	Abril-2013
1	1	Evaluación y cuantificación de la presencia de Interferón I en cultivos de <i>L. lactis</i> recombinantes	Abril-2013	Septiembre-2013
2	2	Implementación de cultivos celulares	Enero-2013	Mayo-2013
2	2	Implementación de cultivos de <i>Lactococcus lactis</i> recombinantes con el plasmidio productor de Interferón I.	Marzo-2013	Mayo-2013
2	2	Verificación de la presencia de Interferón I en el sobrenadante de cultivo incubado con <i>Lactococcus lactis</i> que contiene el plasmidio productor de Interferón I.	Junio-2013	Agosto-2013
2	2	Evaluación de la estimulación de Mx y PKR en cultivos celulares incubados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I.	Julio-2013	Diciembre-2013
2	2	Evaluación de la actividad antiviral de los cultivos celulares incubados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I.	Septiembre-2013	Marzo-2014
3	3	Evaluación de la inmunoestimulación en Peces alimentados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I.	Enero-2014	Julio-2014
3	3	Evaluación de la seguridad del producto	Junio-2014	Agosto-2014
3	3	Desafío con virus IPN a peces alimentados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I	Enero-2014	Julio-2014
4	4	Ajuste de las condiciones de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> para el escalamiento de productivo piloto	Junio-2014	Agosto-2014
4	4	Validación a escala piloto de las condiciones de crecimiento establecidas	Septiembre-2014	Diciembre-2014
4	5	Transferencia de los protocolos de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> productor de Interferón I	Enero-2015	Marzo-2015
4	5	Transferencia de las cepas generadas	Enero-2015	Marzo-2015
4	6	Lanzamiento de proyecto	Octubre-2012	Diciembre-2012
4	6	Actividades de difusión a nivel nacional 1	Julio-2013	Diciembre-2013
4	6	Actividades de difusión a nivel nacional 2	Junio-2014	Diciembre-2014
4	6	Actividades de difusión a nivel internacional	Junio-2014	Diciembre-2014
4	6	Seminario con empresas Salmonicultoras	Marzo-2015	Mayo-2015

10. Hitos Críticos

Nº RE	Hitos críticos	Fecha Cumplimiento
1.1	Generación de Plasmidio Recombinante	Abril, 2013
2.1	Generación de Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> capaces de expresar Interferón In Vitro.	Agosto, 2013
2.1	Lograr un efecto inmunoestimulador y protector contra la infección viral del Interferón I producido por <i>Lactococcus lactis ex vivo</i> .	Marzo, 2014
3.1	Validar en peces el efecto inmunoestimulador y protector contra infecciones de IPN del alimento suplementado con <i>Lactococcus lactis</i> productor de Interferón I	Julio, 2014
4.1	Lograr la densidad de cultivo y producción de interferón requerida (OD600 = 1,5)	Septiembre 2014
4.1	Lograr densidad optima a escala piloto (OD600 = 1,5)	Enero, 2015

11. Método

Objetivo N° 1	Establecer en <i>Lactococcus lactis</i> un sistema de expresión y liberación de Interferón I por sus propiedades inmunoestimulantes sobre <i>Salmo salar</i> .
<p>Mediante síntesis in Vitro de DNA enzimas de restricción y clonamiento[1], se generará un vector basado en el plasmidio pCIT que replique en <i>E. coli</i> y <i>L. lactis</i>[2]. El plasmidio contendrá: 1.- el origen dependiente de la proteína A (RepA), 2.- El gen de Interferón I de <i>S. salar</i> (optimizado al uso de codones de <i>L. lactis</i>), bajo el promotor P1 (constitutivo)[3] de <i>L. lactis</i> y fusionado en marco con el péptido líder de la proteína USP45[4]. 3.- Un cassette para la importación y degradación de Sacarosa (~4 kb), (transposón Tn6898; <i>L. lactis</i> KF147)[5]. La eliminación de la resistencia a antibióticos se realizará mediante cortes con enzimas de restricción. El plasmidio será transformado por electroporación sobre <i>L. lactis</i> [6] y seleccionado por su capacidad de conferir crecimiento en Sacarosa (<i>L. lactis</i> es naturalmente Auxótrofo para la Sacarosa). Alternativamente se podrá usar el sistema comercial NICE (mobitec Inc)[7]. Se evaluará la producción de Interferón I mediante geles de SDS-PAGE teñidos con Plata, utilizando extractos de proteínas totales de <i>L. lactis</i> conteniendo el gen de Interferón I, versus extractos de proteínas de <i>L. lactis</i> carentes del plasmidio. Se confirmará la naturaleza de la proteína mediante espectrometría de masa[8, 9].</p>	

Objetivo N° 2	Validar <i>in vitro</i> las propiedades biológicas y funcionalidad del Interferón I producido por la cepa recombinantes de <i>Lactococcus lactis</i> .
<p>Extractos proteicos de sobrenadantes y de citoplasma de <i>L. lactis</i> que expresen Interferón I, se utilizarán para estimular cultivos de células de Salmón como CHSE214 o SHK1 durante diferentes periodos de exposición (cada 6 horas durante 72 horas). Mediante PCR en tiempo real se evaluará la expresión de los genes Mx[8-13] y PKR[14, 15] los cuales son indicadores biológicos cuya expresión se incrementa en presencia de Interferón I funcional[8, 9, 13] Para estos se extraerá mRNA [1]de cultivos estimulados con extractos proteicos provenientes de <i>L. lactis</i> productor de Interferón I, y <i>L. lactis</i> silvestre (Control). La Razón entre el nivel de expresión entre la condición con y sin tratar será el indicador a utilizar EMx(e)/EMx(se). Para evaluar la capacidad de conferir un estado resistente a la infección viral, se evaluará el título viral de IPNV mediante inhibición de la formación de placas de lisis sobre cultivos de células CHSE214 expuesta a sobrenadantes de cultivos de <i>L. lactis</i> inmunoestimulante obtenidos a diferentes concentraciones de bacterias. El grado de protección se establecerá como la razón entre el título viral [16] obtenido versus el título observado en cultivos CHSE214 sin tratar $Ripnv=UFP(es)/UFP(c)$.</p>	

Objetivo N° 3	Validar <i>in vivo</i> , sobre <i>Salmo salar</i> , las propiedades terapéuticas e inmunoestimulantes de la cepa de <i>Lactococcus lactis</i> productora de Interferón I.
<p>Se estimará el grado de estimulación de los peces evaluando la expresión de Mx y PKR en los tejidos inmunológicos (Riñón, Bazo) y en Sangre. Grupos de 60 peces de 10 gr serán alimentados durante 5 días con 10^7 UFC [17] por día de <i>L. lactis</i> productor de Interferón I. Una vez iniciado el experimento cada 5 días se sacrificarán 5 peces, de los cuales se extraerá mRNA de los tejidos indicados[1]. Mediante real time se evaluará la expresión de Mx y PKR. La resistencia a la infección será evaluada en grupos de 60 peces, los cuales serán alimentados previamente con 10^7 UFC/día de <i>L. lactis</i> productor de interferón I. Luego de esto los peces serán inyectados intraperitonealmente con $1,5 \times 10^{-5}$ PFU/g de IPNV[16]. Se evaluará la sobrevida de los peces durante un periodo máximo de 2 meses. Se determinada el porcentaje de sobrevida como indicador de sensibilidad al virus. Como control se utilizará peces alimentados con <i>L. lactis</i> silvestre. La inocuidad del tratamiento será determinada en grupos de 60 peces los cuales serán alimentados con 2×10^7 UFC/día[17-19] durante 5 días, luego se evaluará la sobrevida de los peces durante un periodo máximo de 60 días. <i>L. lactis</i> serán crecidos en medio Elliker suplementado con sacarosa 0,5% o lactosa 0,5% (en el caso de usar el sistema NICE)[7].</p>	

Objetivo N° 4	Realizar la transferencia tecnológica para la producción y comercialización de las cepas de <i>Lactococcus lactis</i> productoras de Interferón I.
<p>Un paso crítico para alcanzar una producción de bajo costo consiste en incrementar las densidades de los cultivos de <i>L. lactis</i>, el cual depende del pH del Medio. Estimaciones basadas en las tasas de crecimiento reportadas indican que con una OD de 1,5 se pueden producir 60 millones de dosis por m³. Se ensayarán en cultivos de pequeña escala (1L) las condiciones de crecimiento para alcanzar una OD de 1,5 usando el medio M17. Se determinarán los equivalentes de NaOH para mantener el pH a 6,8 durante todo el cultivo y el tiempo necesario para alcanzar esa DO. Mediante recuento bacteriano se contarán las UFC en placas con medio M17. Se establecerán protocolos de liofilización a pequeña escala para la determinación del mejor agente criopreservante, Ej: leche u otros. Se evaluará el porcentaje de sobrevida mediante el recuento de UFC sobre medio M17. Las condiciones de crecimiento establecidas serán usadas para incrementar la escala de producción a piloto (40-50 L). Utilizando el servicio proveído por la empresa VacciMed SA. Se evaluará la sobrevida y UFC totales presentes por gr. de cultivo liofilizado. Los protocolos establecidos y validados a escala piloto serán transferidos a la empresa ActivaQ. Se espera alcanzar una producción de 10 millones de dosis por M3 inicial de cultivo. Cultivos madres de las cepas de <i>Lactococcus lactis</i>.</p>	

12. Carta Gantt (Trimestral)

Nº OE	Nº RE	Actividad/Hito Crítico	2012		2013				2014				2015	
			Jul-Sep	Oct-Dic	Ene-Mar	Abr-Jun	Jul-Sep	Oct-Dic	Ene-Mar	Abr-Jun	Jul-Sep	Oct-Dic	Ene-Mar	Abr-Jun
1	1	Síntesis de Fragmentos de DNA	X											
1	1	Implementación de Técnicas de Biología Molecular	X	X										
1	1	Construcción de plasmidios		X	X									
1	1	Transformación del plasmidio en <i>Lactococcus lactis</i> y selección por capacidad de crecer en sacarosa o lactosa			X	X								
1	1	Evaluación y cuantificación de la presencia de Interferón I en cultivos de <i>L. lactis</i> recombinantes				X	X							
2	2	Implementación de cultivos celulares			X									
2	2	Implementación de cultivos de <i>Lactococcus lactis</i> recombinantes con el plasmidio productor de Interferón I.			X	X								
2	2	Verificación de la presencia de Interferón I en el sobrenadante de cultivo incubado con <i>Lactococcus lactis</i> que contiene el plasmidio productor de Interferón I.				X	X							
2	2	Evaluación de la estimulación de Mx y PKR en cultivos celulares incubados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I.					X	X						
2	2	Evaluación de la actividad antiviral de los cultivos celulares incubados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I.					X	X	X					

Nº OE	Nº RE	Actividad/Hito Crítico	2012		2013				2014				2015	
			Jul-Sep	Oct-Dic	Ene-Mar	Abr-Jun	Jul-Sep	Oct-Dic	Ene-Mar	Abr-Jun	Jul-Sep	Oct-Dic	Ene-Mar	Abr-Jun
3	3	Evaluación de la inmunoestimulación en Peces alimentados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I.								X	X	X		
3	3	Evaluación de la seguridad del producto									X	X		
3	3	Desafío con virus IPN a peces alimentados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I.								X	X	X		
4	4	Ajuste de las condiciones de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> para el escalamiento de productivo									X	X		
4	4	Validación a escala piloto de las condiciones de crecimiento establecidas										X	X	
4	5	Transferencia de los protocolos de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> productor de Interferón I.												X
4	5	Transferencia de las cepas generadas												X
4	6	Lanzamiento del proyecto		X										
4	6	Actividades de difusión a nivel nacional 1					X	X						
4	6	Actividades de difusión a nivel nacional 2									X	X	X	
4	6	Actividades de difusión a nivel internacional									X	X	X	
4	6	Seminario con empresas salmonicultoras												X
														X

13. Función y responsabilidad del ejecutor(es) y asociado(s) en el desarrollo del proyecto

Ejecutor(es) / Asociado(s)	Función y responsabilidad
Universidad de Santiago de Chile	Administración del proyecto, gestión financiera y contable.
ActivaQ S.A.	Escalamiento productivo y comercialización de <i>L. lactis</i> productores de Interferón I.
Mario Tello Reyes	Coordinador del proyecto, Controlar los avances de resultados de todas las áreas, Bacteriología, Virología, Biología Molecular, Transferencia tecnológica. Director de Bacteriología y Biología Molecular: Desarrollar el Obj1, Proveer de cultivos de <i>L. lactis</i> . Dirigir al profesional de Apoyo.
Ana María Sandino	Director de área Virología e Inmunología. Desarrollar el Obj2, analizar los resultados de expresión de genes en el objetivo 3. Coordinar al profesional de apoyo. Coordinar ensayos ex vivo e in vivo.
Javiera Alejandra Norambuena	Profesional Apoyo en Bacteriología y Biología Molecular. Realizar las construcciones de los vectores que permitan la expresión de Interferón I. Evaluar la expresión de Interferón I, Evaluar el efecto sobre cultivo celulares, y peces, y optimizar las condiciones de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> .
Profesional Apoyo en Virología e Inmunología	Profesional encargado del área de Manejo de Peces, en conjunto con los otros proyectos FIA de la USACH.
Geraldine Mlynarz	Gestionar escalamiento productivo y coordinar difusión para comercialización. Responsable del presupuesto de ActivaQ S.A.
Tesista Microbiología y Biología Molecular	Asistir al profesional de apoyo en la respectiva área.
Tesista Virología e inmunología	Asistir al profesional de apoyo en la respectiva área.

14. Actividades de Difusión Programadas

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Perfil de los participantes	Medio de Invitación
Octubre-2012 a Diciembre 2012	Puerto Montt	Lanzamiento	50	Empresario	Carta, Web
Julio a Diciembre-2013	Pucón	Seminario Nacional	300	Científico	Web, Correo
Abril a Julio 2014	USA	Seminario Internacional	1000	Científico	Web, Correo
Abril a Diciembre-2014	Chillán	Seminario Nacional	300	Científico/Empresarial	Web, Correo
Enero a Junio-2015	Puerto Montt	Seminario con empresas salmonicultoras	50	Empresario	Carta, Web

C. Dedicación

15. Tiempos de dedicación del equipo técnico*.

Nombre	Rut	Cargo dentro del proyecto	Nº de resultado sobre el que tiene responsabilidad	Nº de Meses de dedicación	Período dd/mm/aa - dd/mm/aa	Horas/Mes
Mario Tello Reyes		Coordinador Principal	1; 2; 3; 4; 5; 6	36	Agosto-2012-Julio-2015	116
Ana María Sandino García		Coordinador Alterno	2; 3; 6	36	Agosto-2012-Julio-2015	20
Geraldine Mlynarz		Escalamiento y Transferencia tecnológica	4; 5; 6	36	Agosto-2012-Julio-2015	18
Javiera Alejandra Norambuena		Profesional asistencia Área Microbiología y Biol. Mol.	1; 2; 3; 4	30	Agosto-2012-Enero 2015	176
Equipo técnico a contratar		Profesional asistencia Área Microbiología, Pruebas en Peces	3	18	Agosto-2013-Enero 2015	58,67

*Equipo Técnico: Todo el recurso humano definido como parte del equipo de trabajo del proyecto. **No incluye RRHH de servicios de terceros.**

16. Flujo de horas de dedicación al proyecto por trimestre del equipo técnico

Recurso Humano	Año 2012				Año 2013				Año 2014				Año 2015				Total
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Mario Tello Reyes	0	0	232	348	348	348	348	348	348	348	348	348	348	348	116	0	4.176
Ana María Sandino	0	0	40	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	20	0	720
Geraldine Mlynarz	0	0	36	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	18	0	648
Javiera Alejandra Norambuena	0	0	352	528	528	528	528	528	528	528	528	528	176	0	0	0	5.280
Equipo técnico a contratar	0	0	0	0			117,3	176	176	176	176	176	58,7	0	0	0	1.056

D. Fichas curriculares

17. Ficha del Ejecutor (entidad responsable)

Nombre o razón social	Universidad de Santiago de Chile (USACH)			
Giro / Actividad	EDUCACIÓN			
RUT				
Tipo de entidad (1)	Universidad Nacional			
Banco de la cuenta corriente				
Número de cuenta corriente				
Ventas totales (nacionales y exportaciones) de la empresa durante el año pasado, indique monto en UF en el rango que corresponda	Micro empresa menos de 2400 UF/ año	Pequeña 2.401 a 25.000 UF / año	Mediana 25.001 a 100.000 UF / año	Grande más de 100.001 UF / año
Exportaciones, año 2010 (US\$)				
Número total de trabajadores				
Usuario INDAP (sí / no)				
Dirección (calle y número)				
Ciudad o Comuna				
Región	Región Metropolitana			
País	Chile			
Teléfono fijo				
Fax				
Teléfono celular				
Email				
Dirección Web	www.usach.cl			

18. Ficha representante Legal del Ejecutor (entidad responsable)

Nombre	Juan Manuel
Apellido paterno	Zolezzi
Apellido materno	Cid
RUT	
Cargo en la organización	Rector
Género	Masculino
Etnia (2)(clasificación al final del documento)	
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional
Firma del representante legal	

19. Ficha del Asociado N°1.

Nombre o razón social	ActivaQ S.A.			
Giro / Actividad	Asesoría, consultoría, capacitación, investigación, desarrollo, producción, representación y comercialización de productos biológicos y fármacos veterinarios y prestación de servicios en el área de salud animal			
RUT				
Tipo de entidad (1)	Empresas productivas y/o de procesamiento			
Ventas totales (nacionales y exportaciones) de la empresa durante el año pasado, indique monto en UF en el rango que corresponda	Micro empresa (menos de 2400 UF/ año)	Pequeña (2.401 a 25.000 UF / año)	Mediana (25.001 a 100.000 UF / año)	Grande (más de 100.001 UF / año)
Exportaciones, año 2011 (US\$)				
Número total de trabajadores				
Usuario INDAP (sí / no)				
Dirección (calle y número)				
Ciudad o Comuna				
Región	Metropolitana			
País	Chile			
Teléfono fijo				
Fax				
Teléfono celular				
Email				
Dirección Web	www.activaq.cl			

20. Ficha representante Legal del Asociado N°1.

Nombre	Geraldine
Apellido paterno	Mlynarz
Apellido materno	Zylberberg
RUT	
Cargo en la organización	Gerente General
Género	Femenino
Etnia (2) (clasificación al final del documento)	
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional
Firma del representante legal	

21. Fichas del Coordinador Principal

Nombres	Mario César Gerardo	
Apellido paterno	Tello	
Apellido materno	Reyes	
RUT		
Profesión	Bioquímico	
Empresa/organización donde trabaja	USACH	
RUT de la empresa/organización		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador Asociado	
Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	Metropolitana	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	Masculino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	
Firma		

22. Ficha del Coordinador Alterno.

Nombres	Ana María	
Apellido paterno	Sandino	
Apellido materno	García	
RUT		
Profesión	Bioquímico	
Empresa/organización donde trabaja	USACH	
RUT de la empresa/organización		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Profesor Titular	
Si es investigador responde	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	Metropolitana	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	Femenino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	
Firma		

22.Ficha Equipo Técnico Profesional 1.

Nombres	Geraldine	
Apellido paterno	Mlynarz	
Apellido materno	Zylberberg	
RUT		
Profesión	Ingeniero Agrónomo	
Empresa/organización donde trabaja	ACTIVAQ S.A.	
RUT de la empresa/organización		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Gerente General	
Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	Metropolitana	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	Femenino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	
Firma		

22.Ficha Equipo Técnico Profesional 2.

Nombres	Javiera Alejandra	
Apellido paterno	Norambuena	
Apellido materno	Morales	
RUT		
Profesión	Bioquímico	
Empresa/organización donde trabaja	No Aplica	
RUT de la empresa/organización		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Profesional Bioquímico, Área Bacteriología - Biología Molecular.	
Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	Metropolitana	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	Femenino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	
Firma		

23. Cuantificación e identificación de Beneficiarios directos de la iniciativa

Género	Masculino		Femenino		Subtotal
	Pueblo Originario	Sin Clasificar	Pueblo Originario	Sin Clasificar	
Agricultor/Productor micro-pequeño		25		25	50
Agricultor/Productor mediano-grande		5		5	10
Subtotal	30		30		60
Total	30		30		60

E. Indicadores Solicitados por el Ministerio de Agricultura

24. Indicadores Minagri

¿Su proyecto tiene que ver con la venta de algún bien o servicio?				Si	X	No	
Si su respuesta es sí , refiérase a los siguientes indicadores relacionados con el proyecto:							
Selección de indicador ¹	Indicador	Descripción del indicador ²	Fórmula de indicador	Línea base del indicador ³	Indicador al término del proyecto ⁴	Indicador a los 3 años de finalizado el proyecto ⁵	
X	Ventas	Ventas por Línea de Productos Inmunoestimulantes	\$/año	0	pesos (31-07-2015)	pesos	
	Costos	--	\$/unidad	--	--	--	
	Empleo	--	Jornadas hombre/año	--	--	--	

*Nivel de ventas, costos y mano de obra deben estar enfocados exclusivamente al alcance del proyecto propuesto.

(1) Tipo de entidad

Empresas productivas y/o de procesamiento
Personas Naturales
Universidades Nacionales
Universidades Extranjeras
Instituciones o entidades Privadas
Instituciones o entidades Públicas
Instituciones o entidades Extranjeras
Institutos de investigación
Organización o Asociación de Productores
Otras (especificar)

¹ Marque con una X, el o los indicadores a medir en el proyecto

² Señale para el indicador seleccionado, lo que específicamente se medirá en el proyecto

³ Completar con el valor que tiene el indicador al inicio del proyecto

⁴ Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar al final del proyecto

⁵ Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar al cabo de 3 años de finalizado el proyecto

(2) Etnia

Mapuche
Aimará
Rapa Nui o Pascuense
Atacameña
Quechua
Collas del Norte
Kawashkar o Alacalufe
Yagán
Sin clasificar

(3) Tipo

Productor individual pequeño
Productor individual mediano-grande
Técnico
Profesional
Sin clasificar

Bibliografía

1. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed, ed. C.S.H. Laboratory. 1989, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Bermudez-Humaran, L.G., et al., *Controlled intra- or extracellular production of staphylococcal nuclease and ovine omega interferon in Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **224**(2): p. 307-13.
3. Koivula, T., M. Sibakov, and I. Palva, *Isolation and characterization of Lactococcus lactis subsp. lactis promoters*. Appl Environ Microbiol, 1991. **57**(2): p. 333-40.
4. van Asseldonk, M., et al., *Cloning of usp45, a gene encoding a secreted protein from Lactococcus lactis subsp. lactis MG1363*. Gene, 1990. **95**(1): p. 155-60.
5. Machielsen, R., et al., *Molecular description and industrial potential of Tn6098 conjugative transfer conferring alpha-galactoside metabolism in Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(2): p. 555-63.
6. Papagianni, M., N. Avramidis, and G. Filioussis, *High efficiency electrotransformation of Lactococcus lactis spp. lactis cells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol*. BMC Biotechnol, 2007. **7**: p. 15.
7. Mobitec_Inc. *NICE® Expression System for Lactococcus lactis*. 2010 [cited; Available from: http://www.mobitec.de/us/products/bio/04_vector_sys/index.php?nisin.html].
8. Ooi, E.L., et al., *Innate immunomodulation with recombinant interferon-alpha enhances resistance of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) to infectious hematopoietic necrosis virus*. Dev Comp Immunol, 2008. **32**(10): p. 1211-20.
9. Ooi, E.L., et al., *Biological characterisation of a recombinant Atlantic salmon type I interferon synthesized in Escherichia coli*. Fish Shellfish Immunol, 2008. **24**(5): p. 506-13.
10. Jensen, I., et al., *Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon*. Fish Shellfish Immunol, 2002. **13**(4): p. 311-26.
11. Jensen, I. and B. Robertsen, *Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus*. Fish Shellfish Immunol, 2002. **13**(3): p. 221-41.
12. Saint-Jean, S.R. and S.I. Perez-Prieto, *Interferon mediated antiviral activity against salmonid fish viruses in BF-2 and other cell lines*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. **110**(1-2): p. 1-10.
13. Sun, B., et al., *Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon*. J Virol, 2011. **85**(17): p. 9188-98.
14. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
15. Xu, C., et al., *Alpha interferon and not gamma interferon inhibits salmonid alphavirus subtype 3 replication in vitro*. J Virol, 2010. **84**(17): p. 8903-12.
16. Reyes-Cerpa, S., et al., *IPNV modulation of pro and anti-inflammatory cytokine expression in Atlantic salmon might help the establishment of infection and persistence*. Fish Shellfish Immunol, 2012. **32**(2): p. 291-300.
17. Balcazar, J.L., et al., *Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (Salmo trutta)*. Br J Nutr, 2007. **97**(3): p. 522-7.
18. Min, L., et al., *Immunogenicity of Lactobacillus-expressing VP2 and VP3 of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout*. Fish Shellfish Immunol, 2012. **32**(1): p. 196-203.
19. Li-Li, Z., et al., *Expression of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) VP2-VP3 fusion protein in Lactobacillus casei and immunogenicity in rainbow trouts*. Vaccine, 2012.