INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN
Proyecto FIA PYT 2012-0022

20 de Enero 2016

I. ANTECEDENTES GENERALES

- Código: PYT-2012-0022
- Nombre del Proyecto: Desarrollo de un sistema basado en inmunoterapia celular para mejorar la respuesta inmune de las vacunas veterinarias: una oportunidad para controlar el riesgo del virus ISA como reservorio en sistemas dulceacuícolas y marinos.
- Región o Regiones de Ejecución: Región Metropolitana
- Agente Ejecutor: Universidad de Santiago de Chile
- Agente(s) Asociado(s): Activaq SA.
- Coordinador del Proyecto: Marcelo Cortez San Martín
- Costo Total Programado:
- Costo Total Real:
- Aporte del FIA Programado:
- Aporte del FIA Real:
- Período de Ejecución Programado: 36 meses
- Período de Ejecución Real: 40 meses

II. RESUMEN EJECUTIVO

Resumen ejecutivo del desarrollo del proyecto, sus objetivos, justificación, resultados e impactos logrados. Debe ser **globalizante**, incorporando aspectos de importancia general dentro del proyecto, y dejando el detalle de la discusión en el Texto Principal. Debe ser corto y específico, no repitiendo las discusiones, análisis y calificaciones específicas contenidas en el Texto Principal.

Durante la ejecución de este proyecto se ha logrado el diseño y síntesis del vector plasmidial, sin embargo éste culmino en una línea celular inestable. Por otro lado el rendimiento en mg de proteína por L de cultivo fue muy bajo. No obstante fue posible establecer un protocolo para generar cuerpos celulares (CC) altamente inmunogénicos. Con los avances logrados fue posible formular 7 vacunas prototipo, 2 del tipo propuesto inicialmente y 5 variantes. Con eso aumenta la posibilidad de comercializar los cuerpos celulares como adyuvante o vacuna potenciada. Las formulaciones contienen entre 10.000 y 100.000 cuerpos celulares y entre 0,1 y 0,01 ug de proteína recombinante/dosis, o bien 1x10E6 partículas virales inactivadas. Los ensayos en peces dieron comienzo el 4 de julio del 2014 iniciando simultáneamente: Seguridad, Potencia y Eficacia. Se puede asegurar que todas las formulaciones probadas, 13 en total incluidos los controles, son seguras en peces y no representan peligro al medio ambiente tras sus pruebas de ecotoxicidad en modelo Daphnias y Peces (Guppys). Durante el periodo de ejecución del proyecto se pudo establecer que las vacunas son inmunogénicas al presentar aumento de IgM anti ISAV en peces vacunados, sobre todos en el Grupo 5 (OD_{650nm} superior a 0.7), sin embargo

interesantemente en peces desafiados los mayores títulos de anticuerpos se observaron en los peces vacunados con una vacuna comercial potenciada con 10^5CC superando ampliamente OD_{650nm} de 1. Con respecto a la Eficacia, los mejores resultados sorprendentemente se obtuvieron con la vacuna formulada con virus inactivado + 10^5CC, siendo el doble de protección que la vacuna comercial testeada. Los RPS mostrados por ambas vacunas fueron de 80%, en contraste la vacuna comercial testeada solo dio un RPS de 40%. Los análisis de la respuesta inmune realizados a los grupos de peces vacunados y vacunados-desafiados mostraron que la vacuna prototipo con cuerpos celulares tiene un perfecto balance en la expresión de citoquinas, siendo remarcable el aumento temprano de IFNγ que probablemente prepara al pez contra la infección viral, al igual que se observa la presencia de expresión para citoquinas inmunoreguladoras, siendo quizás la explicación a una respuesta inmune controlada que protege al pez contra una sobrerreacción de su sistema inmune. Todos los resultados técnicos fueron lo suficientemente solidos y contundentes para ser incluidos en una patente de invención presentada en Diciembre del 2015 ante el INAPI, la cual aunque no estaba contemplada originalmente en la propuesta, se decidió realizar. Esta solicitud facilitará el proceso de transferencia hacia el sector productivo. Este último punto que corresponde al objetivo especifico 4, no ha concluido, quedando en manos de la Universidad de Santiago para que concrete su culminación. Se espera lograr para el 1er trimestre del 2016 la firma de un convenio que permita la explotación del invento y la transferencia de la información.

III. INFORME TÉCNICO (TEXTO PRINCIPAL)

1. Objetivos del Proyecto:

- Descripción del cumplimiento de los objetivos general y específicos planteados en la propuesta de proyecto, en función de los resultados e impactos obtenidos.
- En lo posible, realizar una cuantificación relativa del cumplimiento de los objetivos.
-

Objetivo General

"Desarrollar un sistema basado en inmunoterapia celular para mejorar la respuesta inmune de las vacunas veterinarias que permitan controlar las infecciones por virus ISA en sistemas dulceacuícolas y marinos".

Después de los 40 meses de ejecución del proyecto fue posible desarrollar un sistema basado en inmunoterapia celular, el cual fue incorporado exitosamente en la formulación de una vacuna para el virus ISA. Desde un punto de vista del desarrollo de la tecnología y la difusión de los resultados en el sector productivo y académico se estima que existe un 100% de cumplimiento.

De los objetivos específicos (OE) planteados, los 3 primeros que corresponden resumidamente en: i) el desarrollo de una vacuna piloto; ii) que la vacuna piloto sea segura para el salmón y el medio ambiente y; iii) que la vacuna sea eficaz protegiendo a los peces contra ISAV mediante una potenciación de la respuesta inmune, todos se encuentran cumplidos en un 100%. Estos resultados han sido de gran impacto en la industria, tras el evento de cierre se tiene interés de varias empresas farmacéuticas veterinarias para su aplicación.
En referencia al ultimo OE, iv) Transferencia tecnológica al sector productivo, aunque se han realizado reuniones periódicas con la empresa asociada, Activaq SA para mostrar resultados, se encuentran pendientes de finalizar la firma de convenios y acuerdos de royalty, así como la transferencia total de la información, actividades que serán conducidas por la Universidad frente a la empresa asociada. Para proteger el desarrollo se reunieron los resultados en un documento *ad hoc* y estos fueron presentados ante INAPI en forma de patente a nombre de la Universidad de Santiago de Chile.

A continuación se presenta el cuadro de OE y sus porcentajes de avance al cierre del proyecto

Nº OE	Descripción del OE	% de avance a la fecha
1	Desarrollar *in vitro* una vacuna piloto basada en cuerpos celulares en conjunto con antígenos virales (proteína Hemaglutinina y proteína Fusión) de ISAV en forma de virus inactivado.	100%
2	Lograr una dosis segura para la vacuna piloto con capacidad inmunogénica y baja ecotoxicidad en ejemplares juveniles de salmón del atlántico.	100%
3	Generar una vacuna eficaz en términos de mortalidad, activación de la respuesta inmune y número de copias virales en ejemplares juveniles de salmón de atlántico desafiados con ISAV.	100%
4	Transferir esta tecnología al sector productivo para su registro, y escalamiento productivo y comercial.	50%

2. Metodología del Proyecto:

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada (*aunque sea igual a la indicada en la propuesta de proyecto original*).

1.- Evaluación *ex vivo* de cuerpos celulares.

- **Línea celular y condiciones de cultivo**. La línea celular ASK, ATCC Nº CRL-2747, tipo macrófago, proveniente de *salmo salar L*. (salmón del Atlántico) se cultivó en medio de cultivo Leibovitz's 15 (L-15, Gibco®, Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), suplementado con 4mM de L-glutamina (Corning cellgro®, Mediatech), 10% v/v de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado (Hyclone®, Thermo Fischer Scientific, Logan, Utah, USA), 50 ug/mL de gentamicina (US Biological, Swampscott, MA, USA), 200 IU penicilina/200 µg/mL estreptomicina (Corning cellgro®, Mediatech) y 40 µM β-mercaptoetanol (Gibco®, Life Technologies). Las células fueron incubadas a 18°C.
- **Generación de cuerpos celulares**. Células de salmón derivadas de riñón anterior (ASK) fueron sometidas a un proceso de muerte celular por deprivación de nutrientes para la obtención de cuerpos celulares. El procedimiento se basa en crecer células ASK hasta una confluencia del 90 al 100%. Luego, éstas son sometidas a un shock térmico a 37°C por 30 min. Posteriormente, se descarta el medio de cultivo y la monocapa es lavada con tres volúmenes de PBS, removiendo toda traza de nutrientes. Una vez concluidos los lavados las células son sometidas a un proceso de deprivación, para ello las células son incubadas por una semana en 10mL de PBS 1X para una botella de cultivo T175 o hasta que la monocapa se desprenda. Posteriormente, los cuerpos celulares en suspensión son almacenados a 4°C.
- **Cinética de expresión de citoquinas**. Para evaluar la respuesta que inducen los cuerpos celulares, se realizó una cinética a 24h sobre células ASK *naive* co-incubadas con los cuerpos celulares, para luego determinar el aumento en la expresión de IL-10, IFN-γ, TGF-β a nivel de transcrito. La cinética se realizó en placas de 6 pocillos (SPL) con 100.000 células, a las cuales se realizó 3 tratamientos: poli I:C (1µg/mL), 100 µL cuerpos celulares sumado a virus

inactivado (sobrenadantes desde un pocillo con 50.000 células y MOI 0,1), además como control se utilizó 100 µL PBS 1X.

- **Obtención de RNA**. Para realizar la determinación de la respuesta inmune, se extrajo el RNA total a 0, 6, 12, 18 y 24h post tratamiento con el uso del kit comercial E.Z.N.A. Total RNA Kit II (Omega) según las recomendaciones del fabricante para los posteriores análisis.
- **Microscopía confocal**. Para la detección de cuerpos celulares se analizó por microscopía confocal células ASK con un 80-90% de confluencia las cuales fueron sometidas a deprivación para generar cuerpos celulares. Las células fueron sembradas en placas de 8 pocillos Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (Thermo Scientific), el sobrenadante de las células fue removido, las células se lavaron dos veces con PBS y luego se fijaron con 100 µL de solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min, posterior a ello las células fueron tratados con yoduro de propidio para marcar los núcleos. Rápidamente la solución fue removida lavando con agua tres veces, se secaron por 10 min, y fueron montadas con DABCO (Sigma-Aldrich) y selladas en porta objetos para ser observadas al microscopio confocal Carl Zaiss LSM 510 (Zeiss, Oberkochen, Alemania), con el uso del software LSM image browser.

2.- Ensayo *in vivo* con cuerpos celulares en salmón

- **Aplicación de la tecnología**. Con la tecnología generada se desarrollaron vacunas que poseen distintas formulaciones de los cuerpos celulares, además de controles como virus inactivados con BEI a $1x10^6$ virus/dosis y vacunas comerciales compuesta por ISAV $1x10^7$-$7,5x10^7$ $TCID_{50}$ en parafina líquida. Las distintas vacunas permitirán evaluar el efecto de los cuerpos celulares en la generación de anticuerpos específicos contra ISAV y en la inducción de citoquinas producto de la vacunación. Las formulaciones fueron evaluadas en peces dispuestos en distintos estanques con ejemplares de salmón del Atlántico. Se extrajo bazo, corazón y riñón anterior, además de una muestra de sangre de cada población para evaluar el nivel de citoquinas, carga viral y anticuerpos antes de

iniciar el ensayo, respectivamente. Los peces vacunados de los 13 grupos destinados al estudio de potencia fueron analizados visualmente para determinar efectos no deseados [Rojas, P. H. V. and D. d. P. y. M. P. Universidad de Concepción. Facultad de Medicina Veterinaria (2006). Evaluación de la seguridad de aplicación de una vacuna comercial inyectable contra INP-VIDRIO en salmón del atlántico, durante cuatro meses post vacunación, Universidad de Concepción] y muestreados aleatoriamente en el orden de 5 ejemplares por grupo. Luego del desafío, los otros 13 grupos desafiados también fueron muestreados para determinar el efecto de la infección en la respuesta humoral. Los análisis fueron hechos a 3 peces por grupo y los datos tratados estadísticamente.

- **Vacunación y desafío**. El proceso de pruebas de la vacuna se realizó en sistemas de mantención de peces en agua dulce y tienen los permisos correspondientes para el trabajo con ISAV(Unidad experimental U. Católica de la Santísima Concepción). Para este fin se utilizaron 400 salmones del Atlántico (*Salmo salar*) con un peso promedio de 86,5 g y una longitud promedio de 20 cm los que fueron mantenidos en agua dulce. Ocurrido este proceso se procedió a realizar la vacunación. Para ello, los peces fueron anestesiados por inmersión con 40mg/mL de benzocaína, luego fueron inmovilizados manualmente e inyectados por vía intraperitoneal aplicando 0,1 mL de la correspondiente formulación. Se utilizaron 120 peces por formulación de vacuna, los cuales a su vez fueron divididos en dos grupos, uno para ser utilizado en el desafío y el otro como control de vacunados sin desafiar, los que se mantuvieron en agua dulce, conteniendo 60 peces por estanque de 200 L de agua cada uno. 120 peces correspondientes a los controles (PBS) se distribuyeron equitativamente en cada uno de los estanques de las líneas (sistemas) desafiadas y sin desafiar. Previo a la vacunación se tomaron muestras de 3 peces para ser utilizados como controles (peces sanos y sin vacunar) en los posteriores análisis. Los órganos seleccionados fueron corazón y bazo, almacenados a -80ºC en RNA later (Ambion, Life Technologies), para posteriormente ser utilizados en la determinación de carga viral y para el análisis del perfil de transcritos de marcadores inmunológicos en salmones,

respectivamente. También se tomaron muestras de sangre de los mismos peces, la que después de coagular, fue centrifugada a 3000 x g por 10 minutos para separar el suero del coágulo. El suero se alicuotó y se almacenó a -80ºC para ser utilizado posteriormente en ensayos de ELISA.

- Previo al desafío, se tomaron muestras de bazo, corazón y sangre a 3 peces por grupo experimental, para ser utilizados en los análisis posteriores. Transcurridos 42 días post vacunación se procedió a realizar el desafío con virus ISAV. Para el desafío se utilizó virus obtenido de infección de células de riñón anterior de salmón (SHK-1, del inglés Salmon Head Kidney). El desafío se realizó utilizando peces troyanos. Para esto, los salmones a ser utilizados como troyanos fueron anestesiados con benzocaína e inyectados intraperitonealmente con 0,2 mL de inóculo viral ($1x10^5$-$1x10^6$ virus/dosis). Para el desafío se adicionaron 40 peces troyanos por estanque, quedando una cantidad de 99 peces por estanque incluyendo los 54 peces vacunados y 5 controles.

- Posterior al desafío se realizaron dos muestreos 63 días post vacunación (dpv) y 90dpv. El proceso se efectuó de la misma forma como se indicó anteriormente, colectando corazón, bazo y sangre de tres peces por grupo experimental y grupo control de vacuna. Durante todo el proceso de prueba de la vacuna, se monitoreó la mortalidad para los análisis de supervivencia.

- **Análisis de mortalidad**. Los peces fueron monitoreados diariamente en los distintos grupos de peces. Los datos de mortalidad fueron analizados bajo el análisis de supervivencia mediante el estimador no paramétrico de la función de supervivencia de Kaplan-Meier [Kaplan EL, Meier P.(1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assoc 1958; 53:457-81].
- El análisis de las diferentes formulaciones de vacunas en relación a los peces controles (PBS), se llevó a cabo calculando el porcentaje de supervivencia relativa (RPS) [Amend D F. (1981). Potency testing of fish vaccines. International

Symposium on Fish Biologics: serodiagnostics and vaccines. Dev Biol Stand. 49:447–454]mediante la fórmula siguiente:

(mortalidad acumulada del grupo de vacuna)/(mortalidad acumulada del grupo control) x 100 – 1 = RPS (I)

3.- Determinación de los niveles de anticuerpos específicos contra ISAV

- **Purificación de partículas virales**. Para evaluar la inducción de IgM en los peces vacunados y/o desafiados se purificaron partículas virales para los ensayos de ELISA indirecto. La purificación se realizó a partir de células ASK infectadas con ISAV 752 ($1x10^7$ copias/mL) tras 14 días post infección. Se tomó el sobrenadante celular y se clarificó a 5000rpm en rotor SS-34 (Sorvall) durante 20 minutos a 4°C. El pellet obtenido se descartó y el sobrenadante se ultracentrifugó a 33.000rpm en rotor 70 Ti (Beckman) durante 2 horas a 4°C. El pellet colectado se hidrató con 100 µL de tampón TNE (Tris HCl 10 mM, NaCl 0,1 M, EDTA 1mM, pH 7,5) toda la noche a 4°C. Luego, el pellet fue resuspendido y se depositó sobre 5 mL de un colchón de sacarosa al 20% en tampón TNE frio. La preparación fue ultracentrifugada en rotor 55 Ti (Beckman) a 32000rpm por 2 horas a 4°C.

- Finalmente, el pellet es resuspendido en tampón TNE. La cuantificación de proteínas virales se realizó mediante el método de Bradford y la interpolación de datos con una curva de calibración con BSA (Tabla I). Posterior a la cuantificación se almacena rápidamente a -80°C hasta su uso. Se obtuvo un total de 240 µg de antígeno viral desde 6 botellas T-175 con 10 d.p.i. Cada uno de los 96 pocillos fue sembrado con 1 µg de antígeno viral en 100 µL de PBS e incubado toda la noche a 4ºC para que al fondo del pocillo formen un tamiz.

µg BSA	ABS
0,4	0,2177
0,6	0,2546
0,8	0,2408
1,2	0,2702
1,4	0,3097
1,6	0,3243
1,8	0,3656
2	0,3524

- Tabla I. Curva de calibración con BSA para determinar la cantidad de proteína viral en los pellet obtenido de la centrifugación. Se indica la cantidad de BSA en µg y los valores de absorbancia respectivos para estimar la cantidad.

- **Elisa indirecto**. Se evaluaron los niveles de inmunoglobulina M (IgM) específicos contra ISAV mediante ELISA indirecto para determinar el efecto de cada formulación en la respuesta humoral de los peces frente a la vacunación y a la infección. La valoración de IgM se realizó desde el suero de tres ejemplares obtenidos por cada estanque un día antes de la vacunación, denominado como suero preinmune (-1dpv), además de sueros colectados 21dpv, 42dpv, 63dpv y 90dpv. El suero obtenido de cada pez fue colectado en tubos eppendorf para ser congelados con nitrógeno líquido y transportados en hielo seco hasta ser almacenados a -80°C. Para los ensayos de ELISA se descongelaron los sueros en hielo y se incubaron en una dilución 1:25 por triplicado (1) por 90min a 16ºC en placas de ELISA de 96 pocillos (NUNC Maxisorp) activadas el día anterior (O.N 4ºC) con 1 µg de partícula viral purificada por pocillo. Se dejaron pocillos de la placa sin suero para eliminar posteriormente el ruido de la técnica. Para eliminar la unión inespecífica de los anticuerpos se bloquearon los pocillos con PBS/BSA 2% por 1h a temperatura ambiente. Se utilizó anticuerpo primario IgM monoclonal anti-IgM de salmón del Atlántico generado en ratón (GrupoBios) en una dilución 1:500 (en PBS/BSA 1%) por 90 minutos a 16°C y un anticuerpo secundario generado en cabra 1:2000 (en PBS/BSA 1%) conjugado a HRP por una hora a temperatura ambiente que permite, mediante una reacción colorimétrica, la detección indirecta

de IgM. Después de cada paso las placas se lavaron con PBST (Tween 20 al 0.5 % V/V en PBS). Finalmente se agregó 3,3',5,5'-Tetrametil benzidina (SureBlue TMB Microwell Peroxidase Substrate, KPL) como sustrato de la peroxidasa. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se determinó la aparición de color mediante la medición de la absorbancia a 650nm utilizando el equipo Nanoquant Infinite M200 pro (TECAN, Austria). Los valores de absorbancia del sustrato de la peroxidasa fueron correlacionados con los niveles de IgM presente en el suero de los diferentes grupos de peces para dar origen al gráfico de barras correspondiente a los niveles de IgM logrados tras la vacunación (Figura 7).

- Una vez registrados los valores de absorbancia de cada suero evaluado, estos fueron normalizados entre distintas placas; posteriormente se eliminó la señal de base restando a cada valor obtenido la absorbancia mostrada en los pocillos sin suero. Para comparar los datos se utilizó el programa GraphPad versión 5 (GraphPad Software) con la herramienta de ANOVA no paramétrico (Mann-Whitney) de una cola con un intervalo de confianza de 95% ($p<0,005$). Para evaluar si los resultados presentaron diferencias significativas se realizaron ensayos de t-student. Ver figura 7.

4.- Determinación de la carga viral y transcritos relacionados a la respuesta inmune inducidos en el pez frente a desafíos con ISAV mediante RT-PCR en tiempo real

- **Extracción de RNA**. Para evaluar el título viral presente en los peces se extrajo el RNA total de corazón, órgano recomendado por la Organización mundial de sanidad animal para el diagnóstico de ISAV (OIE, 2009, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.05_ISA.pdf); y por otro lado, para evaluar la inducción de citoquinas producto de la vacunación y/o infección se extrajo el RNA total desde bazo, un órgano linfoide importante en la respuesta inmune del pez. Se dispuso un trozo de corazón o bazo

en un microtubo de 2mL y se agregó 1mL de Trizol® donde fue homogenizado en frio con un rotor-estator. El tejido homogenizado fue tratado con 200µL de cloroformo y mezclado vigorosamente (vortex) por 20°C a temperatura ambiente. Luego la muestra fue centrifugada a 13.200rpm por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa obtenida fue colectada en un volumen de isopropanol frio, donde fue mezclada por inmersión e incubada 30 minutos a temperatura ambiente para precipitar el RNA. Posteriormente, se centrifuga a 13.200rpm por 10 minutos a 4°C y el pellet obtenido es lavado con un volumen de etanol absoluto al 70% en agua libre de nucleasas y finalmente centrifugado a 7600rpm por 5 minutos a 4°C. El RNA obtenido es disuelto en 40µL de agua libre de nucleasas pre-calentada que posteriormente es incubada a 65°C por 10 minutos para la cuantificación por absorbancia a 260/280 nm mediante el equipo Nanoquant Infinite M200 pro (TECAN, Austria). Desde cada purificación de RNA desde tejido se obtuvo entre 0,3 ng/µL a 3,0 ng/µL desde tejido equivalente a dos-tres cabezas de fósforo aproximadamente (datos de cuantificación de RNA ver anexo 1). Para los ensayos de cuantificación relativa se consideró como material de partida 1 µg de RNA. Una vez cuantificado el RNA se almacenó a -80°C hasta su uso.

- **RT-PCR en tiempo real**. La determinación del título viral se llevó a cabo mediante RT-PCR en tiempo real de un solo paso cuantificando el número de copias del segmento 8 de ISAV, F5: 5'-GAAGAGTCAGGATGCCAAGACG-3' y R5: 5'-GAAGTCGATGAACTGCAGCGA-3' que generan un producto de 196pb. Brevemente, 1µg de RNA purificado desde corazón es tratado con DNAsa I según las recomendaciones del fabricante. Para la cuantificación del RNA viral se utilizó el kit KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Kapa Biosystems) en el equipo Eco™ Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA, USA) con el software Eco 5.0. La mezcla de reacción fue: 5 µL de Master mix 2X, 1 µL de partidor F5 (10 µM), 1 µL de partidor R5 (10 µM), 1 µL de agua libre de nucleasas y 2µL de RNA (200ng). El perfil térmico utilizado para amplificar el segmento 8 fue: 12 minutos a 42ºC, un paso de desnaturalización inicial a 95ºC por 3 minutos seguido de 40 ciclos de amplificación (10 segundos a 95°C, 20 segundos a 60ºC y 15 segundos a

72ºC) y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Para obtener la curva de melting se realizó al final del qRT-PCR un ciclo de disociación (1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 95°C).

- **Transcripción reversa**. Para la cuantificación relativa de los mRNAs que codifican para las citoquinas se sintetizó la primera hebra de cDNA mediante transcripción reversa. Brevemente, se trató 1µg de RNA de bazo con DNAsa I (PROMEGA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La mezcla de transcripción reversa se realizó en un volumen final de 25 µL de acuerdo a las especificaciones del fabricante: 5 µL de tampón 5x, 1 µL de oligo dT (500 ng/ µL), 1µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de enzima transcriptasa reversa M-MLV PROMEGA® (Moloney Murine Leukemia Virus), 6,5 µL de agua libre de nucleasas y 11 µL de RNA tratado. Se incubó la mezcla de reacción por 1 hora a 42°C y luego 15 minutos a 65°C para inactivar la enzima. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

- **PCR en tiempo real**. La cuantificación de los transcritos que codifican para las citoquinas se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real utilizando como plantilla los cDNAs generados desde los mRNAs. Brevemente, 1µg de RNA purificado desde bazo es tratado con DNAsa I según las recomendaciones del fabricante. Para la cuantificación del RNA viral se utilizó el kit KAPA SYBR FAST qPCR (Kapa Biosystems) en el equipo Eco™ Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA, USA) con el software Eco 5.0. La mezcla de reacción fue: 5 µL de Master mix 2X, 1 µL de partidor *forward* (10 µM) (tabla II), 1 µL de *reverse* (10 µM) (tabla II), 1 µL de agua libre de nucleasas y 2µL de cDNA. El perfil térmico utilizado para amplificar las citoquinas se indica en la tabla III.
-
- Tabla II. Secuencia nucleotídica de genes evaluados para estudiar el efecto de los prototipos vaccinales en la respuesta inmune de salmones vacunados y desafiados.

•

Gen	Forward (5' -> 3'	Reverse (5' -> 3')	ID Genbank
IL-10	ITAATGACGAGCTGGAGGCTT	AGATGTTTCCGATGGAGTCG	EF165029
IFNγ	CCGTACACCGATTGAGGACT	GCGGCATTACTCCATCCTAA	NM_001123 558
TGF-β	AGCTCTCGGAAGAAACGACA	AGTAGCCAGTGGGTTCATGG	EU082211
CD4	TCCTCATCGAAGGCACCAATGCT A	TCTGACAGGGCCACAGAGTTGA A	NM_00114 6408
eF1α	GGGTGAGTTTGAGGCTGGTA	TTCTGGATCTCCTCAAACCG	NM_00114 1909

- Tabla III. Perfil térmico utilizado para amplificar los genes evaluados en la respuesta inmune de salmones vacunados y desafiados.

Gen	Desnaturalización inicial	40 ciclos			Extensión final
		Desnaturalización	Apareamiento bases	Extensión	
IL-10	90ºC x 3min	90ºC x 30s	60ºC x 30s	72ºC x 30s	72ºC x 10min
IFNγ	90ºC x 3min	90ºC x 30s	60ºC x 30s	72ºC x 30s	72ºC x 10min
TGF-β	90ºC x 3min	90ºC x 30s	60ºC x 30s	72ºC x 30s	72ºC x 10min
CD4	90ºC x 3min	90ºC x 30s	60ºC x 30s	72ºC x 30s	72ºC x 10min
eF1α	90ºC x 3min	90ºC x 30s	60ºC x 30s	72ºC x 30s	72ºC x 10min

- Para la cuantificación de los transcritos relacionados a la respuesta inmune se utilizó el método de cuantificación relativa descrito por Pfaffl, utilizando el factor de elongación eF1α como gen de referencia para la normalización de la expresión de los genes analizados. Las diferencias entre los valores Ct de los amplicones de los genes analizados y los Ct correspondientes al gen de referencia se expresaron como ΔCt. Las diferencias entre los ΔCt de cada tratamiento se compararon con los ΔCt de los grupos control (vacunados con PBS) y esta diferencia se expresó como $2^{-(\Delta\Delta Ct),}$ lo que representa el cambio en los niveles de expresión o expresión relativa normalizada (NRE) [Pfaffl MW. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. May 1;29(9):e45.] y esta fue comparada con la expresión relativa de estos genes del grupo de peces

no tratados, para determinar las diferencias en la expresión respecto a este grupo de peces.

- Principales problemas metodológicos enfrentados.

Durante la ejecución del proyecto, como ocurre con todas las actividades donde se trabaja con seres vivos, la principal dificultad correspondió al trabajo con los salmones. Fue todo un reto lograr conseguir Salmo salar (S. del Atlántico) que estuviera en buenas condiciones de salud, posteriormente trasladarlos, no obstante cuando estaban en proceso de aclimatación sufrieron de un brote de *Yersinia Ruckeri*, la cual dejo a los peces con un mal estatus sanitario. La solución fue aplicar tratamiento de antibióticos a todos los peces, esto trajo como consecuencia el retraso en los ensayos. Posteriormente existieron diversos problemas en el centro de experimentación, principalmente basados en mal manejo de los estanques, pobre calidad del agua y mala alimentación. Esto a pesar de que con el proyecto se contrato un profesional veterinario que estuviera a cargo de supervisar los ensayos.
No obstante lo anterior se logró realizar los ensayos que presentaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de experimentación.

- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta.

Inicialmente el proyecto había sido planteado de tal forma que la célula de salmón fuera transfectada con vectores plasmidiales y éstos de manera inducida lograran la expresión de los genes virales que codifican para HE y Fu del virus ISA. Lamentablemente tras muchos intentos fue imposible lograr una línea estable de células de salmón con esas características, por ese motivo, aunque se logró una suficiente cantidad para hacer dos vacunas piloto, el proyecto se reenfoco para que los cuerpos celulares fueran utilizados como adjuvantes en la formulación de la vacuna piloto. Es así como finalmente se logra un producto en forma de virina (virus inactivado como antígeno+adjuvante) mucho mas barato de producir y que resulta seguro y eficaz protegiendo a los salmones.
Además de esto ultimo, una vez formulados los tratamientos, los ensayos en animales y los posteriores análisis fueron realizados según lo propuesto en la postulación inicial.

3. Actividades del Proyecto:

- Carta Gantt o cuadro de actividades comparativos entre la programación planteada en la propuesta original y la real.

Nº OE	Nº RE	Actividad	Año 2012		Año 2013				Año 2014				Año 2015			
			3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	1.1	1.1.1. Generación de cuerpos celulares cargados con proteínas virales	X	X	X	X	X	X								
1	1.1	1.1.2 Formulación de tres vacunas prototipo	X	X	X	X	X	X								
1	1.2	1.2.1 Formulación de vacuna con cantidad de antígeno conocida						X	X							
2	2.1	2.1.1. Ensayos de evaluación de seguridad y efectos adversos en peces vacunados con dosis máxima							X	X	X					
2	2.2	2.2.1. Ensayo de evaluación de la potencia de la formulación vacunal en peces vacunados mediante inmunogenómica.							X	X	X	X	X	X		
2	2.3	2.3.1. Análisis de ecotoxicidad mediante metodología VICH vigente											X			
3	3.1	3.1.1. Ensayos de evaluación de eficacia en peces vacunados y desafiados con virus ISA para obtener dosis mínima eficaz mediante determinación de RPS.								X	X	X				
3	3.1	3.1.2. Análisis mediante RT-PCR cuantitativo para determinar carga viral en peces vacunados y desafiados, incluyendo controles y placebo.										X	X	X		
4	4.1	4.1.1 Compilación de todos los resultados obtenidos durante el proyecto y escritura del manual de procedimientos para la manufactura de las formulaciones vacunales.												X	X	X
4	4.1	4.1.2. Ejecución de la transferencia tecnológica de los resultados de investigación												X	X	
4	4.2	4.2.1. Determinación de los costos de producción por dosis												X	X	
4	4.3	4.3.1. Venta de las primeras dosis producidas a mediana escala												X	X	

En la Carta Gantt del proyecto es posible observar que la totalidad de las actividades de investigación y desarrollo fueron realizadas (celdas sombreadas). Con respecto al punto 4.1 que corresponde a la transferencia tecnológica, el punto 4.1.1 fue modificado para lograr como resultado una patente presentada ante INAPI en reemplazado de un manual de procedimiento. El punto 4.1.2 fue ejecutado parcialmente a través de las reuniones realizadas con la empresa contraparte Activaq SA donde los resultados fueron mostrados en presentaciones y posterior discusión de

los resultados. Este punto resta ser concluido y será conducido por la Dirección de Gestión Tecnológica de la Universidad de Santiago una vez cerrado el proyecto. Los puntos 4.2 y 4.3 de la propuesta no han sido realizadas, no obstante se estima que una vez realizada la firma de convenios y realizada la trasferencia tecnológica a una empresa que registre y venda vacunas para salmones, se podrá concluir.

- Razones que explican las discrepancias entre las actividades programadas y las efectivamente realizadas.

La principal razón que explica la no realización de las actividades de transferencia, junto con el tiempo que tomo la redacción y presentación de patente en INAPI, van de la mano con el común acuerdo entre el coordinador principal del proyecto y la empresa contraparte de no continuar trabajando en conjunto. Por ese motivo la transferencia será realizada por la institución titular de la patente surgida de esta investigación, La Universidad de Santiago de Chile por medio de su Dirección de Gestión Tecnológica (DGT).

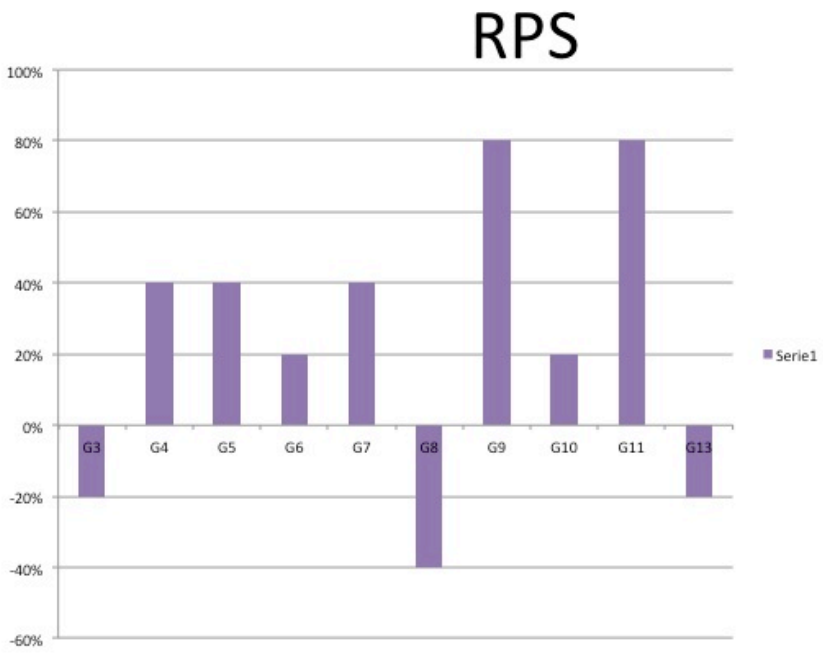
4. Resultados del Proyecto:

- Descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión utilizando gráficos, tablas, esquemas, figuras u otros, que permitan poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones relevantes del desarrollo del proyecto.

En el ultimo informe (Nº5) se informo de la eficacia que presentaron las 12 formulaciones testeadas. Las cuales fueron denominadas desde G1 hasta G13, en la siguiente tabla se describen los principales componentes de cada formulación.

Grupo	Vacuna
G1	ASK 10^4
G2	ASK 10^5
G3	ASK/Tras plas 10^4
G4	ASK/Tras plas 10^5
G5	ASK 10^4+ Vacuna comercial
G6	ASK 10^5+ Vacuna comercial
G7	Vacuna comercial
G8	Virus inac +ASK10^4
G9	Virus inac +ASK10^5
G10	Virus inac
G11	Virus inac+Monta
G13	Virus inac+Monta+ASK10^4

Para poder calcular la eficacia es necesario determinar el RPS o Porcentaje Relativo de Supervivencia. Al realizar el calculo del RPS para las vacunas testeadas fue posible determinar que para las vacunas G9 y G11 se presentan RPS del 80%, un éxito absoluto del ensayo para la vacuna formulada con virus inactivado + CC. En segundo lugar se observan RPS del 40% para las vacunas G4, G5 y G7, equiparando el efecto de una vacuna comercial a las formulaciones que se potencian con CC.



Estos excelentes resultados de eficacia mas los resultados de los análisis de respuesta inmune permitieron elaborar una patente de protección ante INAPI la cual solamente contempla algunos de los grupos ensayados.

Con tal de informar finalmente los resultados del desarrollo obtenido en este proyecto, a continuación, de la misma forma que se presentó en la patente, se procederá a describir los hallazgos obtenidos con los principales grupos, es decir con aquellos que permitirán aplicar los avances en el sector productivo.

El presente desarrollo se refiere a un adyuvante de vacuna que comprende cuerpos celulares y a la vacuna que comprende dicho adyuvante para potenciar la respuesta inmune de salmónidos frente a la infección generada por ISAV.

La vacuna desarrollada comprende virus ISA inactivado y cuerpos celulares generados desde células provenientes de riñón anterior (ASK) de *Salmo salar*, co-formulación que mejora la respuesta inmune de salmónidos frente a la infección con virus ISA y que le otorga protección al pez tras el desafío con el virus en condiciones controladas.

La vacuna comprende de una cantidad en el rango de $1x10^5$ a $1x10^7$ virus/dosis (dosis=0.1mL) de virus ISA inactivado con BEI y una cantidad en el rango de $1x10^4$ a $1x10^6$ cuerpo celular/dosis.

Para obtener cuerpos celulares, células ASK inducidas a muerte celular por tratamiento con calor y deprivación de nutrientes se hicieron crecer hasta una confluencia del 90 al 100%, y se sometieron a shock térmico a 37°C por 30 min, y se descartó el medio de cultivo y lavó la monocapa con tres volúmenes de tampón fosfato salino (PBS), removiendo toda traza de nutrientes. Posteriormente, las células son sometidas a un proceso de deprivación, incubándolas por una semana en 10mL de PBS 1X para una botella de cultivo T175 o hasta que la monocapa se desprendió, y se almacenaron los cuerpos celulares en suspensión, a 4°C, ver Fig. 1.

La vacuna descrita en este informe comprende un aislado ISAV inactivado ($1x10^6$ virus inact./dosis) en conjunto con una cantidad determinada de cuerpos celulares en tampón salino ($1x10^5$ cel./dosis), los cuales son capaces de estimular la formación de interferón gama (INF-g) para promover el estado antiviral en la célula. Se confirma un aumento de linfocitos T reguladores (CD4+), los que están involucrados en la maduración de células de memoria, efectoras y células T citotóxicas (CD8+). Esta programación en la célula presenta una función inmunomoduladora, la cual es observada en el aumento de marcadores como IL-10 y TGF-b. Por lo tanto, la vacuna con cuerpos celulares es capaz de activar las defensas de la célula por medio de un estado proinflamatorio elicitado por IFN-g, y al mismo tiempo, es capaz de controlar la respuesta al levantar los niveles de IL-10 y TGF-b, citoquinas con función anti-inflamatoria capaces de modular de forma autocrina como a células vecinas. Todo esto en conjunto logra producir en el pez una respuesta inmune controlada, protectora y acotada a los antígenos presentes en las vacunas convencionales utilizadas en la industria del salmón, ver Figuras 2A-2C, 3A-3B y 4A-4C.

La tecnología fue puesta a prueba mediante la generación de vacunas constituidas de virus ISA inactivado co-formulado con cuerpos celulares (CellVac-ISAv), virus ISA inactivado (ISAv inact) y una vacuna comercial contra ISAV (Vacuna Comercial). Las pruebas fueron realizadas en laboratorio, donde se dispuso de distintos estanques de agua dulce con ejemplares de salmón del Atlántico. Se extrajo bazo, corazón y riñón, además de una muestra de sangre de cada población para evaluar el nivel de citoquinas, carga viral y anticuerpos antes de iniciar el ensayo. Los peces fueron

inmunizados el día 21 con distintas vacunas a estudiar, y el día 22 se tomaron nuevamente muestras de sangre y órganos. Los peces fueron desafiados 42 días post vacunación con ISAV por medio de cohabitación y al día siguiente se tomaron nuevas muestras de sangre y órganos. El ensayo se extendió 90 días post vacunación y durante este período se hicieron dos muestreos para estudiar la evolución de la respuesta inmune en los peces. Además se registró la mortalidad a lo largo de todo el ensayo. (Fig. 5 y Fig. 6). Se evaluó el título viral a los días 21 y 41 post vacunación (d.p.v). El día 42, los salmones fueron desafiados por cohabitación con ISAV HPR_7b (Genotipo Europeo altamente prevalente en Chile entre 2008-2009) tras ser inoculado intraperitonealmente en salmones troyanos, y a los 63dpv y 90dpv, se determinó nuevamente el título viral para compararlo con grupos vacunados no desafiados.

Asimismo, la formulación de vacuna, cuya dosificación es 100ul (0.1mL) por dosis, comprende $1x10^6$ virus inact./dosis mezclado con $1x10^5$ Cuerpos celulares/dosis utilizando tampón fosfato salino (PBS) como solución diluyente. Para ello los virus inactivados se mezclan en condiciones estériles con la suspensión de células ya cuantificadas hasta llegar a las concentraciones indicadas previamente utilizando PBS autoclavado. La formulación también puede comprender un kit de dos frascos que i) comprende el virus inactivado y liofilizado y ii) suspensión en PBS de cuerpos celulares. La reconstitución de i) utilizando ii) como diluyente permite contar con la formulación acuosa suficiente en cantidad y calidad para ser utilizada como vacuna en especies salmonídeas para ser administradas intraperitonealmente.

Análisis de los niveles de mRNA de citoquinas en células ASK tratadas con prototipo vaccinal de cuerpos celulares.

Una vez establecido el protocolo para la generación de cuerpos celulares, se realizó una cinética de expresión en células ASK nativas a la 0, 6, 12, 18, 24h post tratamiento (h.p.t). Se analizó el perfil de expresión de transcritos de citoquinas producidos por las células en respuesta a PBS (control), al prototipo vaccinal de cuerpos celulares sumado a virus inactivados (CellVac-ISAv) a un MOI de 0,1 UFP/mL, con poly I:C (Fig.2A-2C; Fig.3A-3B y Fig. 4A-4C).

Al realizar el análisis de expresión relativa a nivel de transcritos de IFN-γ en el curso de tiempo, los resultados en células ASK tratadas con Poli I:C muestran que los niveles de IFN-γ aumentan a las 6 h.p.t, observándose una disminución a las 12 h.p.t. (Figura 2C). Para las células ASK tratadas con el prototipo vaccinal de cuerpos celulares (CellVac-ISAv) muestran que los niveles de IFN-γ aumentan a las 6 h.p.t, observándose una disminución gradual entre las 12 y 18 h.p.t. (Figura 2B).

Al realizar el análisis de expresión relativa a nivel de transcritos de IL-10 no muestran diferencias para ninguno de los tratamientos utilizados (Figuras 3A-3B).

Finalmente, al realizar el análisis de expresión relativa a nivel de transcritos de TGF-β, los resultados en células ASK tratadas con Poli I:C muestran que los niveles de TGF-

β aumentan a las 6 h.p.t, observándose un nivel basal a las 12 h.p.t. (Figura 4C). Para las células ASK tratadas con el prototipo vaccinal de cuerpos celulares (CellVac-ISAv) muestran que los niveles de IFN-γ aumentan a las 12 h.p.t, observándose una disminución a las 18 h.p.t. (Figura 4B), sin embargo se observa nuevamente un aumento a las 24 h.p.t. (Figura 4B). Evaluación de prototipo vaccinal de cuerpos celulares (CellVac-ISAv) en peces desafiados con ISAV.

Se determinó la eficacia (Mortalidad) y potencia (inducción de respuesta inmune) en los peces que fueron vacunados con las distintas formulaciones y posteriormente desafiados con ISAV. Los peces fueron inmunizados con las distintas vacunas y a los 42 días post vacunación, los peces fueron desafiados con ISAV por medio de cohabitación y al día siguiente se tomaron muestras nuevamente, el ensayo se extendió 90 días post vacunación. Durante todo el ensayo se midió la mortalidad de cada uno de los grupos analizados. Por otro lado, para realizar los ensayos de potencia se hicieron muestreos a los días 21, 41, 63 y 90 post vacunación de bazo, corazón y riñón y muestra de sangre de cada población para evaluar el nivel de citoquinas, carga viral y anticuerpos, así con estos parámetros poder estudiar la evolución de la respuesta inmune en los peces.

Evaluación de eficacia de prototipo vaccinal de cuerpos celulares (CellVac-ISAv) y comparación con otras formulaciones.
Los resultados de eficacia se muestran en la figura 5 y 6. Es posible observar que el menor porcentaje de mortalidad acumulada corresponde a los peces que fueron vacunados con el prototipo “CellVac-ISAv” (cuerpos celulares más virus inactivado) (Figura 5). Esto puede apreciarse de mejor forma al observar el porcentaje de sobrevida relativa (RPS) en la figura 6, donde se muestra que los peces vacunados solo con ISAv inact (virus ISA) presentan un RPS de 20%, y los peces vacunados con “Vacuna Comercial” (compuesta por ISAV $1x10^7$-$7,5x10^7$ $TCID_{50}$ en adjuvante de parafina líquida) y “Cuerpos Celulares” (solo cuerpos celulares) presentan un RPS del 40%, siendo los peces vacunados con el prototipo vaccinal “CellVac-ISAv” los que presentan un mayor RPS (80%). Evaluación de la potencia producida en peces desafiados y vacunados con el prototipo vaccinal de cuerpos celulares (CellVac-ISAv) y comparación con otras formulaciones.

Determinación de título viral de peces desafiados
Durante el ensayo de vacunación y posterior desafío, se determinó el titulo viral de los peces de los grupos “Control”, “Cuerpos Celulares”, “Vacuna Comercial”, “CellVac-ISAv” y “ISAv inact” a los 21, 41, 63 y 90 dpv. Es importante señalar que el desafío con ISAV fue realizado el día 42 post vacunación. La Figura 7 muestra que el día 63 post vacunación hay un aumento del título viral en todos los grupos de peces desafiados, sin embargo solo los peces del grupo control presentan un título viral sobre las 100.000 copias/mL. En el día 90 post vacunación todos los grupos presentan un aumento del título viral al compararlos con los peces no desafiados, sin embargo este título es menor que el observado al día 63.

Determinación de respuesta inmune humoral

Se determinó como control el suero de los peces correspondiente a los sueros preinmunes (-1 dpv) observándose muestras con absorbancias del orden de 0,5, considerándose este valor como la línea de corte. Valores superiores a la línea de corte proponen la presencia de anticuerpos anti ISAV producidos por la vacunación y/o desafío.

En los peces vacunados se puede observar que a los 21dpv (Figuras 8), la totalidad de los grupos presenta niveles de anticuerpos anti-ISAV bajos, lo mismo ocurre a los 41dpv (Figuras 8) excepto para los peces vacunados con el prototipo “CellVac-ISAv” donde se observa un aumento de IgM específicos contra ISAV. Se observar que a los 63dpv (Figuras 8) hay un aumento en los niveles de anticuerpo de los grupos “Control”, “Cuerpos Celulares”, “Vacuna Comercial” y “ISAv inact” probablemente debidos a la propia infección viral, sin embargo es interesante observar que el grupo “CellVac-ISAv” muestra una disminución de anticuerpos en comparación a los peces no desafiados. Posteriormente, a los 90dpv se detecta un aumento general del título de anticuerpos en los peces evaluados, sin embargo, se observa que en el grupo “CellVac-ISAv” estos anticuerpos solo se mantienen.

Determinación de respuesta inmune celular

Al realizar el análisis de expresión relativa a nivel de transcritos de IFN-γ en los días post vacunación; no se observa cambios de expresión en el grupo “Control”, para los grupos de “Cuerpos Celulares” y “ISAv inact” se produce un aumento de la expresión de 12 veces al día 63. Para el grupo de la “Vacuna Comercial” se observa un aumento de la expresión IFN-γ a los días 21 y 63 de 5 y 25 veces respectivamente. Para el grupo de peces vacunados con el prototipo de “CellVac-ISAv” se observa un aumento de la expresión IFN-γ a los días 41 y 63 de 7 y 32 veces respectivamente (Figura 9 panel IFN-γ).

El análisis de expresión relativa a nivel de transcritos de CD4 en los días post vacunación; se observa una disminución de expresión de CD4 en el grupo “Control” el día 90, para el grupo de “Cuerpos Celulares” se produce un aumento de la expresión de 16 veces al día 63 y 3 veces el día 90.

Para el grupo de la “Vacuna Comercial” se observa un aumento de la expresión CD4 a los días 21 y
63 de 1,5 y 5 veces respectivamente. Para el grupo de peces vacunados con el prototipo de “CellVac-ISAv” se observa un aumento de la expresión CD4 solo al día 63 de 32 veces, y en el caso del grupo vacunado con “ISAv inact” no se observaron cambios en la expresión de CD4 (Figura 9 panel CD4).

El análisis de expresión relativa a nivel de transcritos de IL-10 en los días post vacunación; no se observa cambios de expresión en el grupo “Control”, para el grupo de “Cuerpos Celulares” se produce una disminución de 2 veces el día 21 y luego se observa un aumento de la expresión de IL-10 de 5 veces a los días 63 y 90. Para el grupo de la “Vacuna Comercial” se observa un aumento de la expresión IL-10 a los días 21 y 63 de 5 veces. Para el grupo de peces vacunados con el prototipo de

“CellVac-ISAv” se observa un aumento de la expresión IL-10 los días 41, 63 y 90 el cual es de 2, 7 y 14 veces respectivamente, y en el caso del grupo vacunado con “ISAv inact” se observa un aumento de la expresión IL-10 a los días 21 y 63 de 6 y 7 veces respectivamente (Figura 9 panel IL-10).

Finalmente, el análisis de expresión relativa a nivel de transcritos de TGF-β en los días post vacunación; se observa un aumento de la expresión de TGF-β en el grupo “Control” el día 63, para el grupo de “Cuerpos Celulares” se produce una disminución de 1,2 veces el día 41 y luego se observa un aumento de la expresión de TGF-β de 14 y 8 veces al día 63 y el día 90 respectivamente. Para el grupo de la “Vacuna Comercial” se observa una disminución de 14 veces el día 21 y luego un aumento de la expresión TGF-β el día 63 de 11 veces. Para el grupo de peces vacunados con el prototipo de “CellVac-ISAv” se observa un aumento de la expresión TGF-β los días 63 y 90, este aumento es de 16 y 6 veces respectivamente, y en el caso del grupo vacunado con “ISAv inact” solo se observa un aumento de la expresión TGF-β al día 90 de 9 veces (Figura 9 panel TGF-β).

Para poder comparar los efectos que tiene la formulación del prototipo vaccinal “CellVac-ISAv” y determinar si protege mejor a los peces que la vacuna comercial, se realizó un panel en el cual se incluyen todos los parámetros analizados en este trabajo (Figura 10). Si se compara el conjunto de parámetros obtenidos para el grupo de peces control, vacuna comercial y vacuna prototipo “CellVac-ISAv”. Se obtiene el análisis que ilustra la Figura 10.

Vacuna control: Para IFN-γ no se observan cambios en el transcurso del desafío, en CD4 se observa una disminución del marcador al día 90, para IL-10 no se observan cambios en el transcurso del desafío y para TGF-β se muestra aumento al dial 63. Por otro lado en carga viral se muestra aumento al dial 63, disminución al día 90 (se atribuye que los peces analizados el día 90 son los peces que se encontraban vivos por lo que corresponden a los sobrevivientes del desafío). Ver Figura 9.

Finamente para IgM se observa un aumento al día 63 y 90 producto del desafío con ISAV. Por lo tanto, se puede concluir que se produce una respuesta inmune humoral, pero esta respuesta no es capaz de proteger a los salmones.

Vacuna comercial: Para IFN-γ hay un aumento al día 21 producto de la vacuna, posteriormente se observa un aumento al día 63 de 25 veces en comparación al control, el caso de CD4 hay un aumento al día 21 producto de la vacuna, posteriormente se observa un aumento al día 63 de 5 veces en comparación al control, para IL-10 hay un aumento al día 21 producto de la vacuna, posteriormente se observa un aumento al día 63 de 5 veces en comparación al control y para TGF-β se observa una disminución de la expresión al día 21 en comparación al control. Por otro lado, la carga viral observada en el día 63 es menor que la del control. Finalmente, IgM muestra un aumento al día 63 y 90 generado posiblemente por el desafío con ISAV. Por lo tanto, se puede concluir que hay una respuesta inmune celular temprana (día 21) producto de la vacunación. Se produce una respuesta

inmune humoral al igual que los peces controles desafiados, por lo que este tipo de respuesta no es capaz de proteger. Además, se observa una respuesta inmune celular (por la inducción de IFN-γ y CD4) la cual se intenta regular con citoquinas antiinflamatorias disminuyendo la mortalidad de los peces, sin embargo la inducción de estas citoquinas (IL-10 y TGF-β) no es suficiente, ya que no es sostenida en el tiempo.

Vacuna prototipo CellVac-ISAv: Para IFN-γ hay un aumento al día 41 producto de la vacuna, posteriormente se observa un aumento al día 63 de 32 veces en comparación al control. En el caso de CD4 se observa un aumento al día 63 de 32 veces en comparación al control, para IL-10 hay un aumento al día 21 producto de la vacuna, posteriormente se observa un aumento a los días 63 y 90 de 7 y 14 veces respectivamente en comparación al control y TGF-β muestra un aumento de 6 y 16 veces a los días 63 y 90 respectivamente en comparación al control. Por otro lado la carga viral observada en el día 63 es menor que la del control. Finalmente, IgM muestra un aumento al día 63 y 90 producto del desafío con ISAV. Por lo tanto, se puede concluir que hay respuesta inflamatoria tardía (día 41) producto de la vacunación, compensada con la inducción de IL-10. Se produce una respuesta inmune humoral producto de la vacunación antes del desafío y se produce una disminución de anticuerpos específicos contra ISAV cuando los peces son desafiados. Por otro lado, se observa una respuesta inmune celular (por la inducción de IFN-γ y CD4) la cual se intenta regular con la expresión de citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF-β) sostenida hasta el día 90. La disminución de anticuerpos específicos contra ISAV en el desafío y la expresión de citoquinas antiinflamatorias podría estar provocando la disminución de la mortalidad de los peces de este grupo, de esta manera modulando la respuesta inmune del pez produciendo una protección contra la infección con ISAV.

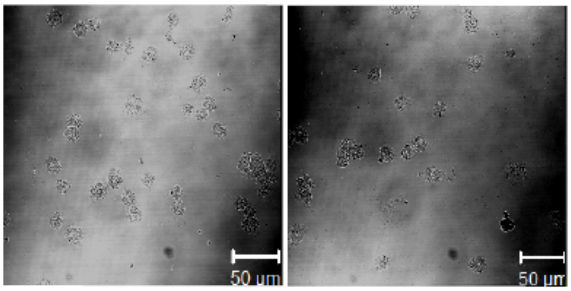


Figura 1A Figura 1B

Figuras 1A y 1B. Visualización de cuerpos celulares derivados de células ASK mediante contraste de fase. Células ASK fueron sometidas a un proceso de muerte por calor y deprivación de nutrientes con el fin de generar cuerpos celulares; y luego 100 µL de suspensión de estos fueron fijadas. Las imágenes fueron adquiridas por microscopía confocal en 40X.

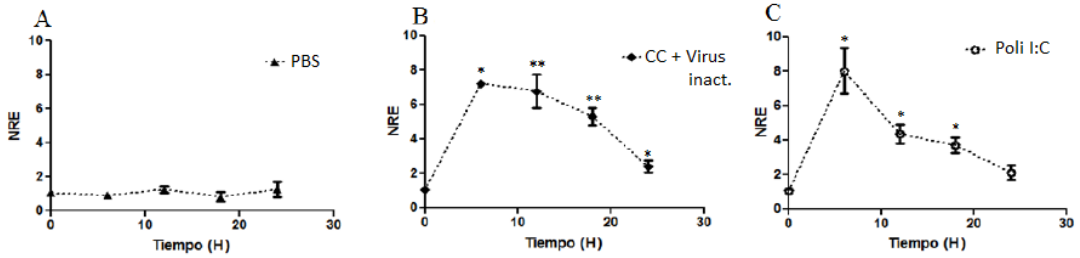


Figura 2A Figura 2B Figura 2C

Figuras 2A-2C. Análisis de los niveles de transcritos de INF-γ en células ASK. La expresión relativa y normalizada (NRE) de INF-γ en células ASK tratadas con PBS (A), cuerpos celulares (CC) + virus inactivado (B) y poli I:C (C) en los tiempos señalados. La expresión relativa de transcritos se determinó mediante qRT-PCR en las células tratadas y se normalizó respecto a la expresión relativa de transcritos en las células estimuladas con PBS. Los resultados son mostrados como el promedio de la expresión relativa y normalizada ± ES. (*) Indica que los valores presentan significancia estadística respecto de las células tratadas con PBS. Las diferencias estadísticas se obtuvieron por ANOVA de una vía no paramétrico (Kruskal Wallis) junto al post test de Dunn, * p<0,05.

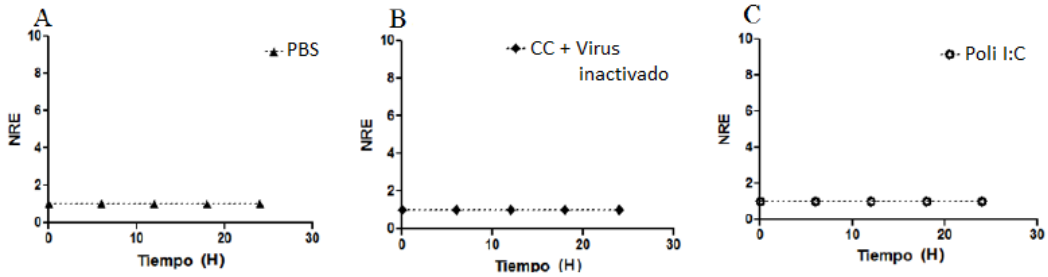


Figura 3A Figura 3B Figura 3C

Figura 3A-3C. Análisis de los niveles de transcritos de IL-10 en células ASK. La expresión relativa y normalizada (NRE) de IL-10 en células ASK tratadas con PBS (A), cuerpo celular (CC) + virus inactivado (B) y poli I:C (C) en los tiempos señalados. La expresión relativa de transcritos se determinó mediante qRT-PCR en las células tratadas y se normalizó respecto a la expresión relativa de transcritos en las células estimuladas con PBS. Los resultados son mostrados como el promedio de la expresión relativa y normalizada ± ES. (*) Indica que los valores presentan significancia estadística respecto de las células tratadas con PBS. Las diferencias estadísticas se obtuvieron por ANOVA de una vía no paramétrico (Kruskal Wallis) junto al post test de Dunn, * p<0,05.

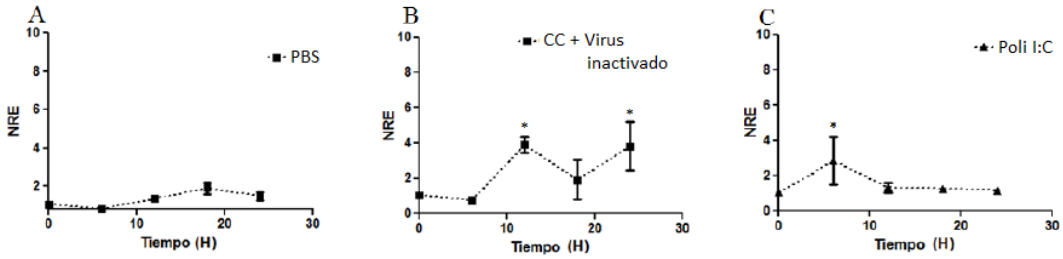


Figura 4A Figura 4B Figura 4C

Figura 4A-4C. Análisis de los niveles de transcritos de TGF-β en células ASK. La expresión relativa y normalizada (NRE) de TGF-β en células ASK tratadas con PBS (A), cuerpo celular (CC) + virus inactivado (B) y poli I:C (D) en los tiempos señalados. La expresión relativa de transcritos se determinó mediante qRT-PCR en las células tratadas y se normalizó respecto a la expresión relativa de transcritos en las células estimuladas con PBS. Los resultados son mostrados como el promedio de la expresión relativa y normalizada ± ES. (*) Indica que los valores presentan significancia estadística respecto de las células tratadas con PBS. Las diferencias estadísticas se obtuvieron por ANOVA de una vía no paramétrico (Kruskal Wallis) junto al post test de Dunn, * p<0,05.

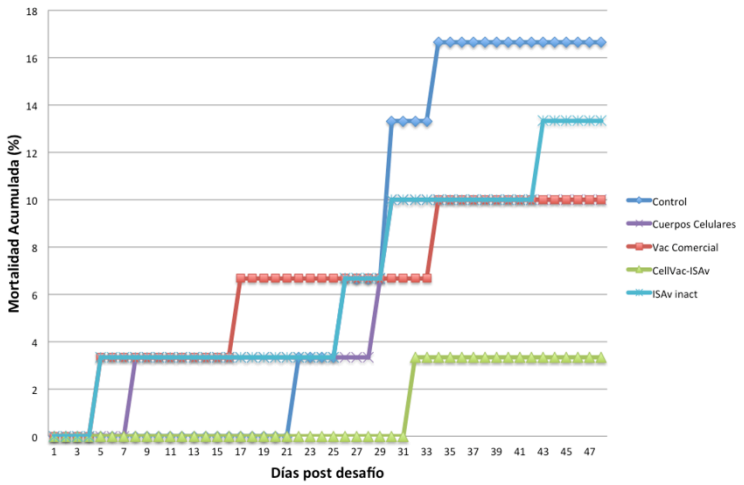


Figura 5. Efecto del cuerpo celular en la eficacia de una virina ($1x10^6$ virus/dosis inactivado con BEI)

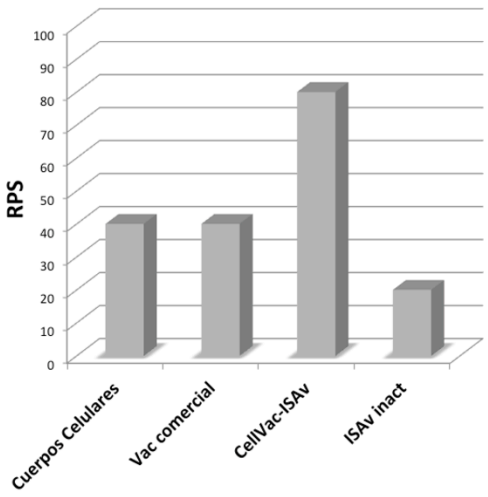


Figura 6. Porcentaje de sobrevida relativa (RPS) de los peces vacunados con los prototipos vaccinales.

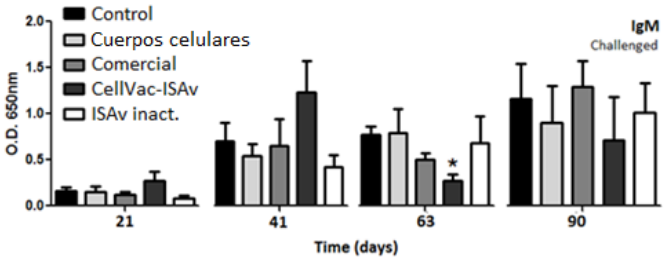


Figura 7. Niveles de IgM en suero inducidos por ISAV. El gráfico de la izquierda indica los grupos de peces sin desafiar. El gráfico de la derecha indica los grupos desafiados.

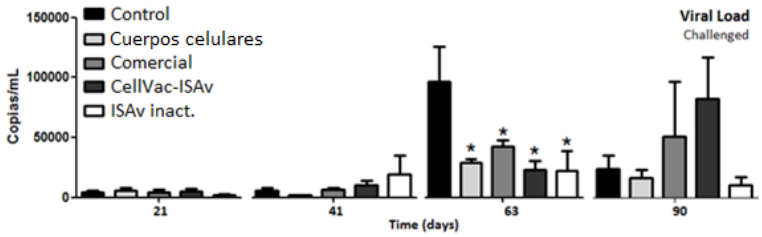


Figura 8. Título viral de ISAV a través del tiempo en el ensayo con los prototipos vaccinales (CellVac-ISAv), virus ISA inactivado (ISAv inact) y vacuna comercial contra ISAV (Vacuna Comercial). Se muestra el titulo viral de los peces vacunados a los 21 y 41 días luego de iniciado el ensayo. Además se muestra el titulo viral de los peces vacunados a los 63 y 90 días sin desafiar y comparando sus niveles con los peces desafiados a 63 y 90 días post vacunación. El número de copias/mL del segmento 8 de ISAV fue determinado mediante qRT-PCR desde 200ng de RNA total extraído de corazón del pez y el valor fue interpolado a los datos de la curva de calibración obtenida. Los resultados son mostrados como el promedio de los valores obtenidos ± ES. (*) Indica que los valores presentan significancia estadística respecto de los peces control. Para comparar los datos fue realizado un análisis de un test de significancia estadística no paramétrico (Mann-Whitney) de una cola con un intervalo de confianza de 95% ($p<0,05$).

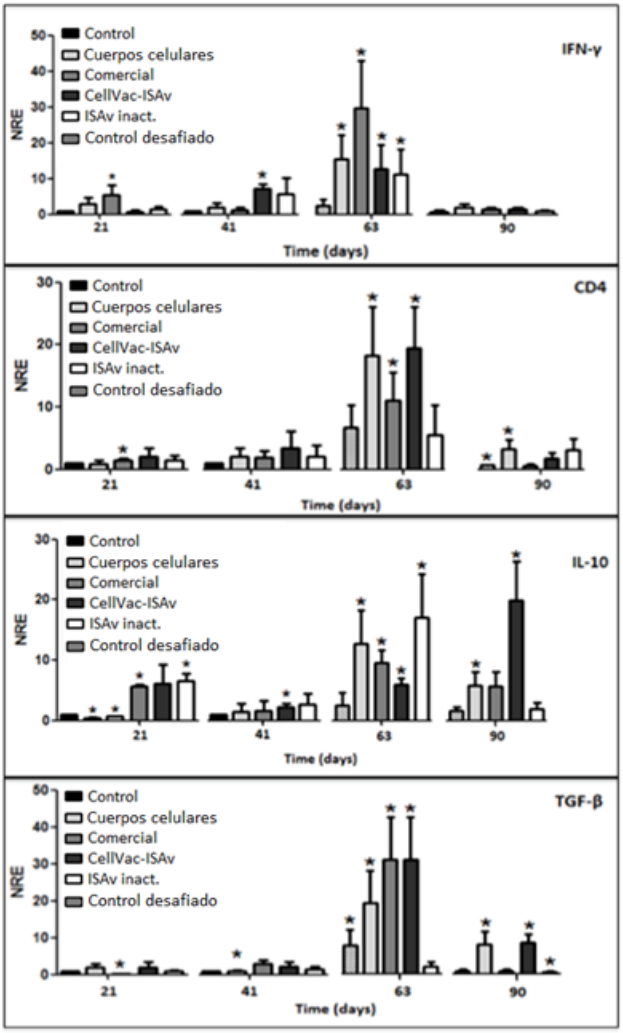


Figura 9. Variación de los niveles de mRNA de IFN-γ, CD4, IL-10 y TGF-β en bazo en función de las distintas formulaciones de vacuna. La expresión a nivel de transcrito de IFN-γ, CD4, IL-10 y TGF-β se evaluó mediante PCR en tiempo real. Se muestra la expresión relativa y normalizada (NRE) de IFN-γ, CD4, IL-10 y TGF-β de los grupos de peces vacunados previo al desafío y de los grupos de peces vacunados y desafiados y se comparó con la expresión relativa del grupo de peces sin tratar. Los valores son mostrados como el promedio de expresión relativa normalizada (NRE) + SE. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante un test de significancia estadística de no paramétrico (Mann-Whitney) entre los grupos de peces vacunados y los peces no tratados. *, $p<0,05$.

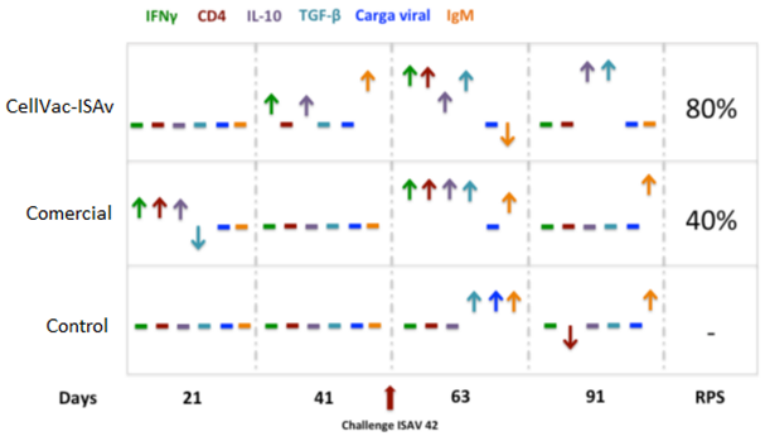


Figura 10. Síntesis de resultados comparativos.

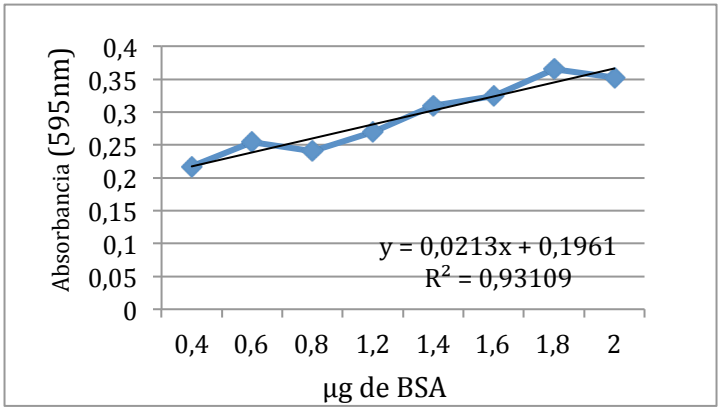


Figura 11. Curva de calibración con BSA para determinar la cantidad de proteína viral en los pellet obtenido de la centrifugación, ver Tabla I.

En los últimos años Chile se ha destacado a nivel internacional en el área de la acuicultura, posicionándose como el segundo país productor a nivel mundial del salmón del Atlántico y la trucha arcoíris, después de Noruega. Como en toda industria de producción animal, uno de los principales problemas a los que se ve enfrentada la acuicultura es el desarrollo de enfermedades de origen viral, las cuales son una de las principales causas de pérdidas económicas del sector. La forma más efectiva de combatir estas enfermedades infecciosas es a través de acciones preventivas que impidan que la enfermedad ocurra. La aplicación de vacunas, especialmente dirigidas a aquellas patologías de origen viral, es una forma efectiva de prevenirlas. El uso de

vacunas en peces, hasta la fecha, no ha demostrado ser suficiente para generar protección, ya que el funcionamiento de su sistema inmune es menos conocido, menos eficiente y tiene una memoria inmune limitada en el tiempo [Gomez-Casado E1, Estepa A, Coll JM. Vaccine. (2011) A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines.Mar 24;29(15):2657-71. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.097]. Debido al enorme impacto que el virus de la Anemia Infecciosa de Salmón (ISAV) ha tenido sobre la salmonicultura y en la economía de nuestro país es primordial enfocar los esfuerzos en contener y minimizar toda posibilidad de brote de este virus [Asche F, Hansen H, Tveteras R.(2009) The Salmon Disease Crisis in Chile. Marine Resource Economics 24(4):405-411].

En el caso del virus ISA, ha sido demostrado que la infección de células derivadas de salmón del Atlántico tales como células ASK - de sus siglas en inglés, *Atlantic Salmon Kidney*, células CHSE-214 y células SHK-1 (*Salmon Head Kidney-1)*, el virus induce muerte celular por apoptosis, mostrando una clara respuesta a este tipo de muerte (actividad de caspasa 3/7, morfología mitocondrial, inducción de genes que responden a IFN de tipo I) [Schiøtz, B. L., Baekkevold, E. S., Poulsen, L. C., Mjaaland, S., & Gjøen, T. (2009). Analysis of host- and strain-dependent cell death responses during infectious salmon anemia virus infection *in vitro*. Virology journal, 6, 91]. También ha sido demostrado que la infección induce autofagia en células ASK, mediante la observación por microscopia electrónica de la formación del autofagosoma y del análisis de marcadores específicos para autofagia (ATG 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12) [Schiøtz, B. L., Roos, N., Rishovd, A. L., & Gjøen, T. (2010). Formation of autophagosomes and redistribution of LC3 upon in vitro infection with infectious salmon anemia virus. Virus research, 151(1), 104-107].

La generación de una vacuna protectora contra patógenos virales en salmónidos implica un gran desafio debido principalmente al poco conocimiento existente de su respuesta inmune antiviral. La presencia de estos patógenos conlleva al reconocimiento de proteínas exógenas y la generación de una respuesta humoral orquestada por la producción de anticuerpos, mayormente contra las proteínas de superficie. Sin embargo, los títulos de anticuerpos generados no alcanzan los niveles necesarios para proteger, sugiriendo que existe una estimulación insuficiente para prevenir la enfermedad [Hetron Mweemba Munang'andu Børge Nilsen Fredriksen, Stephen Mutoloki, Roy Ambli Dalmo, and Øystein Evensen (2013). Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (Salmo salar L) Vet Res. 2013; 44(1): 7].

La virulencia de un virus esta definida por su capacidad comparativa de generar la enfermedad. En general, los factores genéticos del hospedero son los mayores determinantes de susceptibilidad en enfermedades infecciosas en humanos [K. L. Tyler and N. Nathanson, Fields Virology 4th edition (Lippincott, Williams and Wilkins,

Philadelphia, (2001), pp. 199–243]. En el caso de infecciones generadas por el virus Influenza A, virus perteneciente a la misma familia que ISAV (*Orthomyxoviridae*), éste ha demostrado la capacidad de generar en el hospedero, anticuerpos neutralizantes capaces de generar protección. Sin embargo, en el caso de ISAV se ha observado que el efecto de las inmunizaciones con el antisuero de peces infectados con este virus solo es parcialmente protector [Falk K, Dannevig BH (1995). Demonstration of a protective immune response in infectious salmon anaemia (ISA)-infected Atlantic salmon Salmo salar. Dis Aquat Organ;21:1–5.].

Se ha sugerido que para un exitoso *clearence* del virus influenza A, es central el rol de la respuesta inmune adaptativa, donde, no solo es necesaria la generación de anticuerpos específicos contra el virus (respuesta inmune humoral), sino que también es fundamental la participación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II, capaz de activar linfocitos T citotóxicos (CTL) y linfocitos T cooperadores (CD4+ secretoras de IFN-g, respuesta inmune celular) [Kreijtz JH1, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF (2011). Immune responses to influenza virus infection. Virus Res. 2011 Dec;162(1-2):19-30]. Existe evidencia que vincula el tipo de MHC con la resistencia/susceptibilidad por infecciones de ISAV, demostrando que en *salmo salar*, tanto los MHC clase I como MHC clase II proporcionan una resistencia sustancial en la infección, posicionando a la respuesta inmune a nivel celular sobre la respuesta humoral en la supervivencia de salmones frente a desafíos con ISAV [Kjøglum S1, Larsen S, Bakke HG, Grimholt U.(2006) How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Shellfish Immunol. Oct;21(4):431-41].

Una de las mayores complicaciones presentes en los desafíos por ISAV es la excesiva activación de una respuesta inmune pro-inflamatoria [Schiøtz BL1, Jørgensen SM, Rexroad C, Gjøen T, Krasnov A. (2008). Transcriptomic analysis of responses to infectious salmon anemia virus infection in macrophage-like cells. Virus Res.136(1-2):65-74]. La mayoría de las estrategias terapéuticas y preventivas para mejorar el *clearence* de patógenos y células infectadas mediante la estimulación del sistema inmune, llegan en algunos casos a exacerbar el daño tisular a un nivel tal que causan aumento de la mortalidad [Mjaaland S1, Markussen T, Sindre H, Kjøglum S, Dannevig BH, Larsen S, Grimholt U. (2005). Susceptibility and immune responses following experimental infection of MHC compatible Atlantic salmon (Salmo salar L.) with different infectious salmon anaemia virus isolates. Arch Virol. 150(11):2195-216]. Los estudios demuestran que el máximo control de patógenos no necesariamente conduce a minimizar la enfermedad y destacan el rol esencial de los componentes inmunoregulatorios del sistema inmune en limitar o acabar con la patología [Li MO1, Flavell RA. (2008). Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. Immunity.28(4):468-76]. Estos antecedentes nos han llevado a plantear nuevas estrategias de vacunación utilizando cuerpos celulares como inmunoterapia en salmónidos.

La inmunoterapia es un tratamiento enfocado en estimular el sistema inmune de la célula, reprogramando su respuesta frente a diversas enfermedades [Spetz, A.-L., Sörensen, A. S., Walther-Jallow, L., Wahren, B., Andersson, J., Holmgren, L., & Hinkula, J. (2002). Induction of HIV-1-specific immunity after vaccination with apoptotic HIV-1/murine leukemia virus-infected cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 169(10), 5771–9; Mégret, F., Prehaud, C., Lafage, M., Batejat, C., Escriou, N., Lay, S., Lafon, M. (2005). Immunopotentiation of the antibody response against influenza HA with apoptotic bodies generated by rabies virus G-ERA protein-driven apoptosis. Vaccine, 3(46-47), 5342–50]. Actualmente el desarrollo de la inmunoterapia celular ha cobrado una gran relevancia debido a los promisorios resultados que se han obtenido en el desarrollo de vacunas contra el cáncer. Para ello, antígenos tumorales específicos presentes en la superficie de la célula son enfrentados a células presentadoras de antígenos (APC), específicamente a células dendríticas (DCs), para que estas sean re-administradas al paciente y puedan activar la respuesta inmune contra el tumor [Salman, B., Zhou, D., Jaffee, E. M., Edil, B. H., & Zheng, L. (2013). Vaccine therapy for pancreatic cancer. Oncoimmunology, 2(12), e26662; Radford, K. J., Tullett, K. M., & Lahoud, M. H. (2014). Dendritic cells and cancer immunotherapy. Current opinion in immunology, 27C(DC), 26–32].

Existen fuertes evidencias que indican que una infección por patógenos intracelulares como el virus influenza, VIH-1 y CMV induciría muerte celular en sus células blanco [Zhao, X. Q., Huang, X. L., Gupta, P., Borowski, L., Fan, Z., Watkins, S. C., Rinaldo, C. R. (2002). Induction of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD8+ and CD4+ T-cell reactivity by dendritic cells loaded with HIV-1 X4-infected apoptotic cells. Journal of virology, 76(6), 3007-3014; Arrode, G., C. Boccaccio, J. Lule, S. Allart, N. Moinard, J. P. Abastado, A. Alam, and C. Davrinche. 2000. Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8+ T cells by dendritic cells. J. Virol. 74:10018]. Los cuerpos celulares producidos por estas infecciones presentan antígenos en su superficie, los que en mamíferos son procesados por el MHC de clase I con la posterior activación de las células T CD8+ antígeno-específicas. La utilización de cuerpos celulares ya ha demostrado tener la capacidad de producir una respuesta inmune más eficiente frente a VIH-1 que la exposición misma al virus inactivado [Maranon C, Desoutter JF, Hoeffel G, CohenW, Hanau D, Hosmalin A. (2004). Dendritic cells cross-present HIVantigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA;101:6092–7].

En este sentido, cuerpos celulares corresponderían a la porción de la célula que contiene el núcleo y el citoplasma circundante sin sus extensiones (por ejemplo, en el caso de una dendrita, no incluye el axón), y por ello, corresponde a la zona de mayor volumen de la célula que interviene activamente en el metabolismo celular más que en realizar la función específica reconocida para la célula (por ejemplo, la neurona tiene

como función principal, la recepción de estímulos y la axón conducción del impulso nervioso).

En particular, la patente WO9903499 [Laurence Zitvogel, Graca Raposo, Armelle Regnault, Sebastian Amigorena. (1999) Vesicule cellulaire denommee "exosome", leur preparation et utilisation dans la stimulation d'une reponse immunitaire. Inst Nat Sante Rech Med] protege un método para sensibilizar células que presentan antígeno, mediante vesículas de membranas con propiedades inmunogénicas. Particularmente, enseña composiciones que comprenden texosomas (vesículas derivadas de células tumorales) y dexosomas (vesículas derivadas de células dendríticas cargadas con antígenos o no), útiles para tratar cáncer y enfermedades infecciosas, parasíticas o autoinmunes.

Por otra parte, los salmones poseen un sistema inmune adaptativo reconocible, identificándose tipos celulares conservados entre teleósteos y mamíferos. Una respuesta inmune controlada y protectora que no sea nociva y solamente acotada a los antígenos presentes en las vacunas convencionales en la industria del salmón. Estos resultados permiten demostrar que durante la ejecucion de este proyecto ha sido posible el desarrollo de un prototipo de vacuna innovador y que posee atributos que le daran una excelente adpocion en el mercado nacional e internacional.

Adicionalmente en este proyecto se implementaron los metodos requeridos por SAG para demostrar que los productos farmaceuticos veterinarios, no son nocivos para el medio ambiente, esto mediante ensayos de ecotoxicidad.
Los ensayos realizados en ambientes acuaticos se enfocaron en demostrar que el producto en caso de ser derramado accidentalmente no dañara la vida acuatica, como lo es en el modelo Daphnia y Guppy, ambos normados por la OCDE.
Los resultados mostrados en el Informe 5 indicaron que ninguna de las vacunas resulto dañina en Daphnias, al finalizar el proyecto, en este informe final es posible indicar que tampoco lo son para Guppys, causando una muy baja mortalidad, permitiendo estimar que el RQ es ≤100 (Anexo).

- Cuadro comparativo de los resultados esperados en la propuesta de proyecto y los alcanzados finalmente.

De los resultados esperados para el proyecto, se cumplieron todos los que hacen referencia a la investigación y desarrollo del prototipo vacunal. Como se puede encontrar en este informe final y en todos los entregados durante la ejecución de este proyecto fue posible desarrollar y probar 12 alternativas de formulación, de las cuales 7 contenían cuerpos celulares de salmón. Ninguna presento efectos adversos en peces con muy baja puntuación en escala de Speilberg, con nula ecotoxicidad y con una elevada capacidad de generar respuesta inmune la cual se vio reflejada para el

prototipo que contiene virus inactivado y 100.000 cuerpos celulares/dosis con un 80% de RPS, presentando un mejor performance que el visto con la vacuna comercial.
A continuación se muestra el cuadro comparativo donde se observa que el ultimo objetivo, Transferencia tecnológica al sector productivo, no fue concluido.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicadores de Resultados				% de Cumplimiento
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base del indicador (situación actual)	Meta del indicador (al final del proyecto)	
1	1.1	Vacuna piloto basada en cuerpos celulares en conjunto con antígenos virales (proteína Hemaglutinina y proteína Fusión) de ISAV en forma de virus inactivado	Formulación vacunal en fase prototipo	Número de formulaciones experimentales en fase prototipo	0	3 formulaciones experimentales	100
1	1.2	Vacuna piloto titulada de antígenos virales	Concentración de antígeno viral	Copias de virus/dosis de vacuna	$1x10^6$-$7.5x10^9$ virus/dosis	$1x10^7$-$1x10^8$ copias de virus/dosis	100
2	2.1	Dosis vacunal más segura en ejemplares juveniles de salmón del atlántico mantenidos en sistemas dulceacuícola.	Formulación vacunal segura en peces	Efecto adverso de las formulaciones experimentales en la escala de Speilberg (Fórmula de cálculo Speilberg: anexo)	2 en escala de Speilberg	Efecto adverso bajo <0-2 en escala de Speilberg	100
2	2.2	Dosis vacunal que permita generar una respuesta inmune celular en ejemplares juveniles de salmón del atlántico mantenidos en sistemas dulceacuícola.	Formulación vacunal capaz de generar respuesta inmune en peces	Capacidad de la formulación inmunogénica para aumentar la expresión relativa y normalizada (NRE) de CD4 + (marcador de linfocitos) con respecto al control. (Calculo en Anexo)	2 veces la NRE (resultados propios)	La vacuna experimental aumenta al menos 10 veces la expresión de CD4+ (marcador de linfocitos) con respecto al control.	100
2	2.3	Dosis vacunal inocua para el medio ambiente.	Formulación vacunal de baja ecotoxicidad e inocua para el medio ambiente	Coeficiente de Riesgo (RQ) en condiciones nacionales, indicador de la ecotoxicidad. (Fórmula de cálculo de RQ: Anexo)	RQ ≤100	RQ ≤100	100
3	3.1	Dosis vacunal eficaz contra el virus ISA en ejemplares juveniles de salmón del atlántico en términos de Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS).	Formulación vacunal eficaz contra virus ISA	Porcentaje Relativo de Supervivencia (RPS) de los ejemplares juveniles de salmón del atlántico (Fórmula de cálculo de RPS: anexo)	RPS≈40%	RPS≥60%	100
4	4.1	Transferencia tecnológica de la vacuna al sector productivo.	Realización de transferencia tecnológica al sector productivo	Porcentaje de información y material transferido al sector productivo	0	100%	50
4	4.2	Producto competitivo	Costo de producción de la vacuna	Costo de producción por dosis	$5/dosis	$3/dosis	0
4	4.3	Venta de vacuna en el mercado nacional.	Venta de vacunas contra ISAV	Número de dosis vendidas	0	250.000 dosis	0

- Razones que explican las discrepancias entre los resultados esperados y los obtenidos.

Como se declaro mas arriba, la principal razón que explica la no realización de las actividades de transferencia, se debe además de el tiempo utilizado para la redacción y tramites que llevaron a la presentación de unas solicitud de patente, al común acuerdo entre el coordinador principal del proyecto y la empresa contraparte de no continuar trabajando en conjunto. Por ese motivo la transferencia será realizada por la DGT de la USACH, la cual al haber gestionado la solicitud de patente posee la mayoría de la información generada en este proyecto.

5. Fichas Técnicas y Análisis Económico:

- Fichas técnicas y de costos del o los cultivos, rubros, especies animales o tecnologías que se desarrolló en el proyecto (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).
- Análisis económico actualizado, comparando con los análisis de la propuesta de proyecto.
- Análisis de las perspectivas del rubro, actividad o unidad productiva desarrollada, después de finalizado el proyecto.
- Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).

Uno de los principales problemas que enfrenta la salmonicultura en Chile son las enfermedades infecciosas como el virus ISA, IPN, el caligus, SRS y otros. Chile es el segundo productor de salmones en el mundo y debe estar preparado frente a brotes de diversas enfermedades que afectan a las poblaciones salmonídeas de manera periódica. Durante los años 2007-2011, por efectos del virus de anemia infecciosa del salmón (ISAV), se perdieron aproximadamente US$1.000 millones, afectando la mitad de su potencial económico[1]. Esto ha generado la necesidad creciente de entender los factores de virulencia y los mecanismos patogénicos del virus ISAV para evitarlos. Otro de los principales desafíos vaccinales es la utilización de nuevos adjuvantes que mejoren las vacunas y las respuestas inmunes de los peces. Así que, es importante para los productores de vacunas la actualización y la mantención de sus productos vigentes para que sean efectivamente los mismos que actuarán en terreno.

En la actualidad, no existe sistema o tecnología alguna que permita aplicar los avances de la inmunoterapia celular para la mejora de vacunas veterinarias. El proyecto ofrece la investigación y desarrollo que permitirá la generación de nuevas vacunas para peces. El método a utilizar permitirá la generación de vacunas formuladas con cuerpos celulares derivados de lineas celulares de salmon.

La industria salmonera chilena

Durante el 2014 la producción de salmones en Chile llegó a las 808 mil toneladas y la exportación alcanzó los US$4 mil millones[2] con una tasa de crecimiento anual de 6,5%[3]. Pero considerando antecedentes previos, durante el 2007 un brote del virus de la Anemia infecciosa del salmón, generó grandes pérdidas en el sector productivo nacional, convirtiéndose así, en uno de los mayores riesgos para esta industria en que más de la mitad de la producción pertenece al salmón del Atlántico.

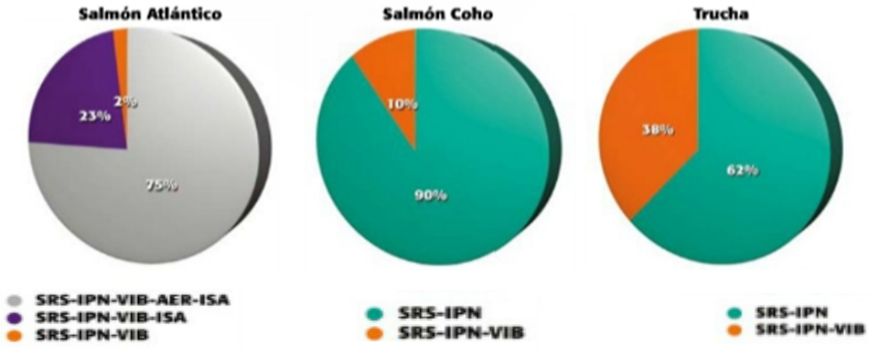
Descripción del mercado de vacunas para salmones en Chile

La vacunación de los salmones es obligatoria en Chile como una medida para prevenir la infección por patógenos como virus, bacterias y hongos. Durante el 2011

[1] http://www.latercera.com/noticia/negocios/2011/03/655-350790-9-industria-salmonera-chilena-perdio-la-mitad-
[2] Aqua: http://www.aqua.cl/2015/02/26/salmonicultura-balance-2014-y-desafios-2015/ Acceso: Febrero 2015
[3] SUBPESCA, 2011

fueron vacunados 270 millones de salmones, un 38% más que los 195 millones de vacunas del 2010. Del total, unos 125 millones fueron destinados a salmón del Atlántico, cerca de 89 millones a trucha Arcoíris y 59,4 millones a salmón Coho. En el salmón del Atlántico la vacuna más utilizada fue la pentavalente que contiene los antígenos de SRS, IPN, Vibrio, Aeromonas e ISA. [4] En 2011 los precios de esas vacunas variaban entre US$ 0,09 y US$ 0,25 la dosis. Las vacunas que contienen antígenos de ISA tienen un precio superior a las otras vacunas normales sin este componente. El 87% del valor de las dosis vendidas correspondió a vacunas inyectables, un 9% a orales y un 4% fueron de inmersión. Si consideramos el precio de US$ 0,25 de las vacunas que contienen el antígeno de ISAV, es posible estimar un mercado de aproximadamente US$ 30 millones para este adjuvante basado en cuerpos celulares, con un mercado total de US$ 50 millones. Considerando que el mercado nacional para insumos de vacunas corresponde a un 10% del valor de mercado de vacunas, es posible estimar un mercado potencial en US$ 5 millones anuales. A continuación, se presenta un detalle de las principales vacunas usadas en la salmonicultura chilena en el 2011.

Figura 1: Principales vacunas usadas en la salmonicultura chilena en el 2011



Fuente: Revista Technopress S.A – No 155, Abril de 2012 – Ultimo acceso – Noviembre 2014.

La eficacia de las vacunas todavía es un desafío para la industria, fluctuando entre el 20% y 60%. Esta baja eficacia se explica en gran parte por el desconocimiento de la respuesta inmune del pez, por lo que las vacunas se diseñan sin conocimiento respecto de la relación entre el hospedero y el patógeno, generando vacunas con características mas bien de formulaciones genéricas.

Es importante destacar, que Sernapesca ordena eliminar o adelantar cosechas de centros cuando se confirma brotes del virus ISA, por lo tanto el único modo de combatir la enfermedad es la prevención, lo cual se ha llevado a cabo por vacunas principalmente. Según datos de Sernapesca, actualmente en Chile existen 59 productos registrados y 15 productos específicos para prevenir la Anemia Infecciosa del Salmón (ISA) que provienen de las empresas Centrovet Ltda., Farmacologia en Aquacultura Veterinaria FAV S.A, Agrovet Ltda., Pharmaq AS Chile Ltda., Novartis y

[4] Revista Technopress S.A – No 155, Abril de 2012. Ultimo acceso: Febrero 2015.

Anasac Chile S.A.[5] En la siguiente tabla, se presenta las vacunas disponibles en el registro del SAG para ISA a Enero de 2015.

Tabla 1: Vacunas para ISA en el registro SAG - Enero de 2015
Fuente: Elaboración propia con datos del SAG – Enero de 2015

Empresa Comercializa-dora	Nombre del producto	Vía de administración
Centrovet Ltda.	Vacuna subunitaria contra Anemia Infecciosa del Salmón, BLUEGUARD ISA INYECTABLE	Emulsión Inyectable
	Vacuna subunitaria contra Anemia Infecciosa del Salmón, BLUEGUARD ISA ORAL	Polvo Liofilizado Oral
	Vacuna inactivada contra Síndrome Rickettsial del Salmón, Necrosis Pancreática Infecciosa, Vibriosis y Anemia Infecciosa del Salmón.	Emulsión Inyectable
	Vacuna inactivada Necrosis Pancreática Infecciosa, Síndrome Ricekttsial del Salmón, Furunculosis, Vibriosis y subunitaria Anemia Infecciosa del Salmón.	Emulsión Inyectable
	Vacuna inactivada contra Síndrome Rickettsial del Salmón, subunitaria contra Anemia Infecciosa del Salmón, BLUEGUARD SRS+ISA ORAL	Polvo Liofilizado Oral
Farmacologia en Aquacultura Veterinaria FAV S.A.	Vacuna inactivada contra Anemia Infecciosa del Salmón, Necrosis Pancreática Infecciosa, Vibriosis, Síndrome Rickettsial del Salmón.	Emulsión Inyectable
	Vacuna inactivada Necrosis Pancreática Infecciosa, Síndrome Ricekttsial del Salmón, Furunculosis, Vibriosis, Anemia Infecciosa del Salmón.	Emulsión Inyectable
Agrovet Ltda.	Vacuna inactivada contra Anemia Infecciosa del Salmón, AGROVAC-ISA	Emulsión Inyectable
	Vacuna inactivada contra Síndrome Rickettsial del Salmón, Necrosis Pancreática Infecciosa, Anemia Infecciosa del Salmón, AGROVAC 3 + ISA	Emulsión Inyectable
	Vacuna inactivada Necrosis Pancreática Infecciosa, Síndrome Ricekttsial del Salmón, Furunculosis, Vibriosis, Anemia Infecciosa del Salmón, AGROVAC 4 + ISA	Emulsión Inyectable
Pharmaq AS Chile Ltda.	Vacuna inactivada contra Anemia Infecciosa del Salmón, ALPHA JECT MICRO 1 ISA	Emulsión Inyectable
	Vacuna inactivada contra Necrosis Pancreatica Infecciosa, Síndrome Rickettsial del Salmón, Furunculosis atípica, Vibriosis, Anemia Infecciosa del Salmón, ALPHA JECT 5-1	Emulsión Inyectable
Novartis	Vacuna inactivada Necrosis Pancreática Infecciosa, Furunculosis, Vibriosis , Anemia Infecciosa del Salmón	Emulsión Inyectable
Anasac Chile S.A.	Vacuna inactivada contra Necrosis Pancreática Infecciosa, Síndrome Rickettsial del Salmón, Furunculosis, Vibriosis, Anemia Infecciosa del Salmón, PROVIDEAN AQUATEC 5 SRS IPN Vibrio ISAv Aeromonas	Emulsión Inyectable
	Vacuna inactivada contra Necrosis Pancreática Infecciosa, Síndrome Rickettsial del Salmón, Vibriosis, Anemia Infecciosa del Salmón, PROVIDEAN AQUATEC 4 SRS IPN Vibrio ISAv	Emulsión Inyectable

En Chile, la principal empresas proveedoras de insumos como adjuvantes es Seppic (Francia), la cual tiene como clientes a todas las empresas productoras de vacunas veterinarias.

Ventajas del producto o servicio

La principal ventaja se conforma por el conocimiento científico, la trayectoria y credibilidad de los investigadores detrás del desarrollo y los contactos comerciales necesarios para llegar a las empresas farmacéuticas. Además que, mediante este avance será posible desarrollar con mayor agilidad vacunas específicas contra patógenos de peces. La tecnología ya está en su etapa de registro de patente, siendo hasta ahora los únicos en el mundo en haber logrado con éxito esta herramienta biotecnológica para salud animal.

[5] Productos biológicos inmunológicos con registro provisional uso en salmónidos. Última modificación: 15 de Enero de 2015.

Barreras de entrada

En el caso de la comercialización del adjuvante para la producción de vacunas, las barreras de entrada es el tiempo de desarrollo de las vacunas que pueden demorar entre 1 y 3 años y los registros a través del SAG, que pueden tardar entre 2 y 4 años, lo que impactará en los ingresos generados a través de los royalty de ventas de las mismas vacunas. Gracias a los avances realizados en este proyecto se espera acortar los tiempos.

6. Impactos y Logros del Proyecto:

- Descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.

Impactos económicos-sociales

Considerando el impacto económico que posee la industria salmonera en nuestro país, esta tecnología se presenta como una gran oportunidad para el desarrollo de nuevas formas de evitar posibles nuevos contagios por ISAV u otros patógenos.

Teniendo en cuenta que durante el 2014, Chile tuvo el índice de mortalidad más bajo de los últimos años, es el momento de mejorar la rentabilidad de la industria post-brote de ISAV. Junto con esto se busca disminuir el costo y aumentar la eficiencia de los métodos de prevención, y además, prever posibles nuevos brotes que pudieran traer cuantiosas pérdidas como ya es sabido y salvaguardar la producción y exportación, que el año pasado alcanzó los US$4.000 millones[6].

Esta nueva metodología puede traer importantes innovaciones en el desarrollo de vacunas, y en la industria biotecnológica, dando cabida a nuevas investigaciones y procedimientos para la potenciación de mejores antígenos e incluso la elaboración de vacunas multivalentes.

Gracias al bajo costo del adjuvante desarrollado en este proyecto se estima que el costo de manufactura de las vacunas para salmones baje en un 50%.

- Indicadores de impactos y logros a detallar dependiendo de los objetivos y naturaleza del proyecto:

Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Formación de empresa o unidades de negocio			
Producción (*por producto*)			
Costos de producción			
Ventas y/o Ingresos			
Nacional			
Internacional			
Convenios comerciales			

Impactos Sociales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial

6 http://www.aqua.cl/2015/01/16/bajar-costos-y-el-uso-de-antibioticos-serian-los-ejes-del-plan-salmonicultor-2015/

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual			
Nuevos empleos generados			
Productores o unidades de negocio replicadas			

Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto		X		Se ha logrado el desarrollo de la primera representante de una nueva generación de vacunas para peces
Proceso		X		Se ha establecido un proceso barato y rápido para generar cuerpos celulares desde células de salmón, método reproducible y eficaz tras pruebas in vitro e in vivo
Servicio				

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes		
Solicitudes de patente	1	Solicitud numero 2015-03697 titulada: Vacuna contra el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) que comprende virus inactivado con adyuvante basado en cuerpos celulares que potencia la respuesta inmune de peces tanto co-formulado como administrado individualmente
Intención de patentar		
Secreto industrial		
Resultado no patentable		
Resultado interés público		

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica		
Generación nuevos proyectos		

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (*Citas, título, descripción*)
Publicaciones		
(Por Ranking)		
Eventos de divulgación científica	2	**Cortez-San Martin M**, Cottet L, Sandoval N, Toro-Ascuy D, Rivas A, Reyes-Cerpa S, Acuña C, Imarai M, Sandino AM, Spencer E. The adjuvant have a key role improving the protection and immune response induced by recombinant protein vaccine against Infectius Salmon Anemia Virus (ISAV) in Atlantic Salmon. 1st International Conference of Fish and Shellfish Immunology. Vigo, España. 25-28 de Junio 2013. Santibañez, Alvaro; Gonzalez-Catrilelbun, Sebastian; Toro-Ascuy, Daniela; Vasquez, Yesseny; Acuña, Claudio; Montoya, Margarita; **Cortez-San Martín, Marcelo**. Utilización de cuerpos celulares para potenciar la respuesta inmune de salmónidos. LVIII Reunion Anual Sociedad de Biología de Chile, XIII Reunion Anual Sociedad Chilena de Inmunología. Puerto Varas, 23 al 25 de Noviembre 2015
Integración a redes de investigación	2	Miembro pleno American Society for Microbiology Miembro pleno American Society for Virology

Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (*Título, grado, lugar, institución*)
Tesis pregrado	1	Sebastian Gonzalez "Desarrollo de un sistema basado en inmunoterapia celular como control del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV)". Obtención del título de Bioquímico. Director: Marcelo Cortez SM y Claudio Acuña. Universidad de Santiago de Chile.
Tesis postgrado		
Pasantías		
Cursos de capacitación		

7. Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

Durante la ejecución del proyecto no existieron problemas a los cuales no se les haya encontrado solución. Desde el punto de vista legal, los ensayos fueron informados al Sernapesca, quien envió durante los procesos de desafío (inoculación con virus ISA) a funcionarios del Servicio, quienes fiscalizaron que las actividades cumplan con las medidas de bioseguridad y manejo exigidos. Desde el punto de vista técnico existieron problemas con el establecimiento de las líneas células de salmón que expresan de manera inducida las proteínas virales. Ante esto se realizo una

modificación al proyecto derivando el desarrollo hacia una vacuna de virus inactivado (virina) que fuera potenciada con cuerpos celulares. Otra de las dificultades encontradas correspondió al trabajo con los animales (salmones), la dificultad de adquirir peces, trasladarlos y finalmente enfrentar un brote post-traslado de *Yersinia ruckerii*, atrasó los experimentos, seguridad, potencia y eficacia de la vacuna, no obstante fue posible realizar posteriormente los ensayos de forma normal. Para supervisar los experimentos, además de ser parte del servicio contratado a la Universidad Católica Santísima Concepción, fue encargada a un veterinario contratado para terreno en conjunto con el proyecto FIA PYT 2012-0023.
Desde el punto de vista administrativo y de gestión, se presento cierta dificultad en la ejecución del proyecto debido a que al ser la USACH, una institución publica, los tramites de compra son llevados por sistema mercado publico y auditados por contraloría interna y contraloría Gral. de la republica. Adicionalmente existió una relativa dificultad en contar con respuestas rápidas de la empresa contraparte en relación a la relación administrativa.
De todas maneras a pesar de los problemas suscitados, para la gran mayoría se encontró solución. Logrando así terminar los principales objetivos del proyecto.

8. Otros Aspectos de Interés

No existen otros aspectos que tocar a criterio del coordinador.

9. Conclusiones y Recomendaciones:

- Desde el punto de vista técnico el proyecto fue todo un éxito, se logro el desarrollo de un nuevo sistema adyuvante basado en inmunoterapia celular, el cual permitirá abaratar costos y potenciar de mejor forma la respuesta inmune de los peces vacunados. El proyecto concluyo con una solicitud de patente y algunos interesados en licenciar el producto, además de el natural interés de la empresa asociada al proyecto para que le sea transferida la información.
- El proyecto en referencia a lo económico, cumplió con lo requerido para completar las actividades mas importantes. La restante transferencia tecnológica no requiere de recursos, de todas formas la asumirá la Universidad de Santiago, por lo que el proyecto finaliza con todos los recursos bien utilizados.
- Sobre la gestión, ésta pudo llevarse a cabo a pesar de las dificultados presentadas al estar sometidos al sistema de mercado publico y ser auditados por la contraloría. No obstante los retrasos en la utilización de recursos, las actividades pudieron llevarse a cabo gracias a la confianza de los proveedores de productos y servicios.

- Este coordinador no tiene recomendaciones, el apoyo de FIA a esta iniciativa fue siempre del 100%, en todos los sentidos este proyecto no hubiera llegado a buen termino de no ser por el personal que apoya los proyectos.

IV. INFORME DE DIFUSIÓN

- Difusión de los resultados obtenidos **adjuntando** las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

  Durante la ejecución del proyecto se realizaron 4 actividades de difusión: Dos presentaciones a congreso, de los cuales uno fue internacional y los eventos de lanzamiento y cierre de proyecto. En todas las circunstancias la idea de aplicar inmunoterapia celular en salmones fue muy bien recogida. En el cierre de proyecto existreorn al menos 2 empresas inetresadas en incorporarl en sus desarrollos.

- Listado (número y detalle) de actividades por instrumento de difusión, como por ejemplo:
  - Presentaciones en congresos y seminarios
- **Cortez-San Martin M**, Cottet L, Sandoval N, Toro-Ascuy D, Rivas A, Reyes-Cerpa S, Acuña C, Imarai M, Sandino AM, Spencer E. The adjuvant have a key role improving the protection and immune response induced by recombinant protein vaccine against Infectius Salmon Anemia Virus (ISAV) in Atlantic Salmon. 1st International Conference of Fish and Shellfish Immunology. Vigo, España. 25-28 de Junio 2013.

- Santibañez, Alvaro; Gonzalez-Catrilelbun, Sebastian; Toro-Ascuy, Daniela; Vasquez, Yesseny; Acuña, Claudio; Montoya, Margarita; **Cortez-San Martín, Marcelo**. Utilización de cuerpos celulares para potenciar la respuesta inmune de salmónidos. LVIII Reunion Anual Sociedad de Biología de Chile, XIII Reunion Anual Sociedad Chilena de Inmunología. Puerto Varas, 23 al 25 de Noviembre 2015.

  - Organización de seminarios y talleres
- -Lanzamiento de proyecto FIA PYT 2012-0022, 28 de agosto 2013, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

- -Cierre de proyecto FIA PYT 2012-0022, 30 de septiembre 2015, Hotel Cumbres, Pto. Varas, Chile

  - Días de campo o reuniones técnicas
  - Publicaciones científicas
  - Publicaciones divulgativas
  - Artículos en prensa

- Páginas web

V. ANEXOS

Entregar los antecedentes como fue indicado para los informes técnicos de avance, pero en este caso la información no corresponde sólo a la actualización sino a la histórica. Por ejemplo, cambios en el equipo técnico, se debe adjuntar la ficha de todos los participantes que participaron en alguna de las etapas del proyecto aunque hayan sido reemplazados.

VI. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Las referencias esta incluidas en el texto.

SOCIEDAD DE BIOLOGIA DE CHILE
desde 1922

SOCHIN

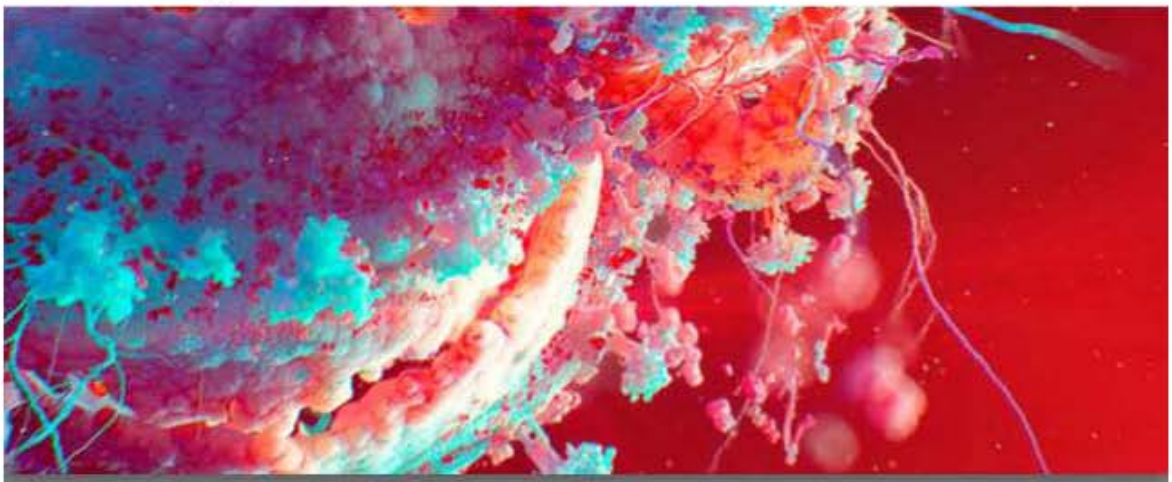
LVIII Reunión Anual
Sociedad de Biología de Chile

XIII Reunión Anual
Sociedad Chilena de Inmunología

23 al 25 DE NOVIEMBRE 2015

Hotel Patagónico-Puerto Varas

www.biologiachile.cl - www.sochin.cl



LVIII REUNIÓN ANUAL
SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CHILE

XII REUNIÓN ANUAL
SOCIEDAD CHILENA DE INMUNOLOGÍA

Hotel Patagónico. Puerto Varas
23 al 25 de Noviembre 2015

91.- UTILIZACIÓN DE CUERPOS CELULARES PARA POTENCIAR LA RESPUESTA INMUNE DE SALMÓNIDOS.

Santibañez, A[1]., Gonzalez Catrilelbun, S.[2].,Toro-Ascuy, D.[3].,Vásquez, Y.[3].,Acuña, C.[1].,Montoya, M.[1].,Cortez-San Martín, M.[3].,[1]Biología, Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.[2]Virología, Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.[3]Virología Molecular, Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. (Sponsored by Mónica Imarai Bahamondes)

Chile es potencia mundial en salmonicultura, sin embargo la elevada tasa de mortalidad generada por patogenos ha provocado pérdidas billonarias en la industria, lo que ha llevado a una continua vigilancia pasiva y al uso de vacunas. Esta última es posible ya que los salmones poseen un sistema inmune adaptativo reconocible, identificándose tipos celulares conservados entre teleósteos y mamíferos. Se desconoce si el uso de inmunoterapia celular, una nueva herramienta que ha demostrado estimular el sistema inmune de pacientes inmunodeprimidos, podría ser aplicada en salmónidos.

En el laboratorio se desarrolló una inmunoterapia celular capaz de mejorar la formulación de vacunas y potenciar la respuesta inmune. Para evaluar la potencia de la formulación en la activación de una respuesta inmune, se realizaron ensayos *ex vivo* en células adherentes derivadas de riñón anterior de salmón del Atlántico. Se cuantificó la expresión relativa de IFN-γ, TGF-β, moléculas involucradas en la activación de macrófagos, linfocitos T $CD8^+$ y muerte celular; y los transcritos de IL-10, y CD4, marcadores con función inmunomoduladora y de proliferación celular. Adicionalmente, se realizaron ensayos *in vivo* en salmones inmunizados con estas formulaciones cuantificando las mismas citoquinas.

Los resultados *ex vivo* muestran un aumento en los niveles de IFN-γ e IL-10, aumento también observado en peces vacunados, sugiriendo que en esta respuesta participarian macrófagos/MHC clase I, favoreciendo un estado de alerta en el pez en ausencia del patógeno, situación observada en una infección natural. Estos resultados demuestran que la inmunoterapia es una alternativa para el desarrollo de nuevas vacunas en salmónidos.

FIA PYT-2012-0022

Estudio Toxicidad aguda en Guppys (*Poecilia reticulata*)

Responsable del Informe Bq.Dr.Marcelo Cortez
Fecha de Informe: 30 de Agosto del año 2015

OBJETIVO GENERAL

Realizar una prueba de toxicidad aguda en peces, donde se ensaya un producto químico en un sistema estático. Esta prueba determina el potencial peligro del producto en el medio ambiente acuático.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar curva dosis-respuesta.
- Calcular CL_{50} a 24 horas con un 95% de confiabilidad.

METODOLOGÍA DE TRABAJO

- Recepción peces.
- Aclimatación durante 12 días.
- Dosificación única.
- Periodo de observación durante 24 horas.
- Observaciones finales.
- Análisis estadístico.
- Emisión informe.

DEFINICIONES

CL_{50}:

Es la concentración de una sustancia obtenida experimentalmente que provoca la muerte de un 50% de la población en un tiempo determinado.

Sistema Estático:

Sistema de prueba en el cual la solución y los organismos a controlar se ponen en un compartimiento y se mantienen allí, mientras dura el estudio, sin la renovación de la solución que se está testeando.

CONDICIONES DE ESTUDIO

A. Peces Experimentales

Especie:

Poecilia reticulata. Se utiliza el pez Guppy, una de las alternativas sugeridas en la norma.

Origen: Los peces se adquirieron a Ing. en Acuicultura Alejandro Andres Friant Mejias Rut. 15.358.112-6, criador profesional de guppys y autorizado por el Sernapesca y el Sag para tales actividades.

Aclimatación:

Los peces Guppys son seleccionados y ubicados en acuarios, durante 12 días antes del estudio.

Edad y Peso:

Peces juvenil con un tamaño de 1 ± 0,5 cm, de largo.

Selección:

Los peces se depositarán aleatoriamente en los acuarios de trabajo desde el acuario de mantención.

Marcaje:

Se deben identificar los acuarios con la etiqueta correspondiente al ensayo, en el cuaderno asociado al numero se debe tabular el como mínimo: Nombre del producto, dosis, fecha de inicio y término del ensayo.

Alojamiento:

De acuerdo a la norma para el mantenimiento se deben utilizar acuarios de un capacidad de al menos un litro por pez. Para realizar el estudio se utilizan acuarios de aproximadamente 20 litros de capacidad, estos acuarios se llenaron con 15 litros de agua.

Alimentación:

Durante el periodo de aclimatación los peces son alimentados con alimento en hojuelas especial para peces, hasta 24 horas previas al inicio del estudio cuando se suspende la entrega de alimento. Los peces no son alimentados durante el periodo de prueba.

B. Condiciones Ambientales:

Calidad del Agua:

- Agua de Ensayo:

Antes de colocar los peces en los acuarios para su aclimatación, se deben realizar mediciones de dureza y pH al agua que se utilizará para aclimatación y ensayo.

La Dureza del agua debe permanecer entre 10 – 250 ppm

- Agua de Dilución:

El agua utilizada para la dilución de la sustancia de prueba, debe ser agua destilada o desionizada certificada por un proveedor autorizado.

Cuarto de experimentación:

La sala donde se mantienen los acuarios debe cumplir con las siguientes condiciones:

- Humedad relativa entre 40 % – 70 %.
- Fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas noche diarias.

Acuarios:

El agua de acuarios de experimentación debe cumplir con los siguientes parámetros ambientales:

- El Oxígeno Disuelto (DO) debe ser de al menos el 60% de saturación.
- La Temperatura del agua de los acuarios se debe mantener a 23 ± 2º C.
- El pH del agua en los acuarios deber tener un valor entre 6.0 – 8.5.

El Oxígeno, Temperatura y pH se deben medir y registrar diariamente, durante todo el periodo del ensayo.

DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Montaje

Se implementan los acuarios verificándose la no existencia de filtraciones de agua. Se instala un sistema de aireación para los acuarios el cual se mantiene durante toda la duración del ensayo. Se introducen los peces aleatoriamente para su periodo de aclimatación.

B. Dosificación

La cantidad de sustancia a suministrar se calcula según la cantidad de agua en los acuarios, para esto se determina la cantidad de producto a medir para colocar en cada acuario y obtener así la concentración requerida. Cada dosis se incorpora al agua de los acuarios directamente simulando el derrame de vacuna durante el proceso de vacunación. Se realizara monodosis incorporando la máxima cantidad de vacuna que se derramaría por volumen de acuerdo a la densidad de peces que es de 30kg/m^3.

C. Frecuencia de Administración

La dosificación es única al inicio del estudio, luego del periodo de aclimatación. Las observaciones clínicas de los peces se mantienen por 24 horas.

D. Duración del Estudio

Luego de la administración de la dosis se hace seguimiento, teniendo como posibles desenlaces: la muerte de los peces y la ausencia o presencia de alteraciones observables. Este estudio tuvo un periodo de observación de 24 horas.

E. Grupo Control

Se establece un grupo control de 10 peces sometido a las mismas condiciones experimentales que los grupos que recibieron la sustancia de prueba. Asimismo, se registran cambios conductuales y físicos de este grupo, con el fin de identificar claramente las posibles alteraciones producidas por la sustancia de prueba.

EVALUACIÓN

A. Observaciones Clínicas

Supervivencia: Se hacen observaciones de supervivencia.

Signos clínicos toxicológicos: Se realizan observaciones, tales como, cambios conductuales con respecto al nado, cambio de color y posicionamiento dentro del acuario.

B. Condiciones Ambientales

Previas al Ensayo:

- **Calidad del agua:** Previo al ensayo, se realizan mediciones de cloro, dureza y pH al agua a utilizar, para asegurarse que se encuentre en óptimas condiciones para el desarrollo de la especie de trabajo.

Durante el Ensayo:

- **Temperatura:** La temperatura puede ser medida tanto en el agua de los contenedores de ensayo como en el ambiente y debe ser registrada a las 24 horas.

- **pH:** Se deben realizar mediciones de pH, a las 24 horas. Estas mediciones se realizan en los contenedores de prueba de todas las dosis testeadas y en controles.

- **Oxígeno Disuelto (OD)**: Se deben realizar mediciones de Oxígeno Disuelto en los controles y en todas las concentraciones testeadas, a las 24.

Resultados

Sustancia de Prueba	Nivel de dosis (µL de la solución stock: 1 dosis=100 µL)	**Mortalidad/Total** 24 horas	**% Mortalidad**
Grupo Control	0.0 µL/L	0/10	0
G1	60µL/L	0/10	0
G2	60µL/L	0/10	0
G3	60µL/L	1/10	10
G4	60µL/L	0/10	0
G5	60µL/L	1/10	10
G6	60µL/L	0/10	0
G7	60µL/L	0/10	0
G8	60µL/L	0/10	0
G9	60µL/L	1/10	10
G10	60µL/L	0/10	0
G11	60µL/L	0/10	0
G12	60µL/L	0/10	0
G13	60µL/L	0/10	0

CE_{50} > a dosis efectiva en salmones

A las 24 , solo se observo mortalidad en los grupos G3, G5 y G9, esta solo correspondió al 10% del grupo.
El Control negativo (0.0mg/L) en este caso correspondió a Suero Fosfato Salino (PBS).

Todos los parámetros ambientales evaluados durante el ensayo (T° y pH), se encontraron dentro de los valores de referencia, sugeridos por la norma de trabajo.

Coeficiente de riesgo (RQ)

No es posible denominar una CE_{50} debido a que en cada una de las sustancias testeadas los resultados demostraron no ser tóxicos para peces a dosis máxima considerada para el estudio de

vacunas. Para este caso se considera que no habría un potencial riesgo ambiental para cada una de las sustancias testeadas por lo que se considera un RQ inferior a 1.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Al finalizar el estudio, y analizar la mortalidad de los guppys, se concluye que para cada una de las sustancias testeadas, la mayoría aparenta no ser toxica para un ensayo de toxicidad aguda en peces, considerando como dosis máxima la dosis empleada en vivo en salmones.

La Concentración Experimental Media (CE_{50}) para la prueba de Toxicidad Aguda en guppys no es posible calcularla debido a que no se ha normado aún sobre dosis de sistemas biológicos como vacunas por lo tanto no es posible emplear la normativa de la OECD en cuanto a las unidades consideradas como dosis máxima.
Por lo tanto podemos definir tan sólo NOEC como superior al doble de una dosis efectiva en salmones.

Según las observaciones se puede inferir que las sustancias de prueba designadas como G1 a G13 no son retenidos en guppys.

Todos los parámetros ambientales evaluados durante el ensayo (T° y pH), se encontraron dentro de los valores de referencia, sugeridos por la norma de trabajo.

Referencias (PROTOCOLOS CONSIDERADOS EN EL DISEÑO Y DESARROLLO DE LA PRUEBA)

- OECD, OECD Guideline for testing of chemicals: Fish Acute Toxicity Test, OECD 203, July 1992.
- EPA, Ecological Effects Test Guidelines: Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and marine. OPPTS 850.1075, April 1996.
- EPA, Good Laboratory Practice Standards. Act 40 CFR Part 160 & Part 172, 1989.
- NIH, Guide for the care and use of laboratory animals. Publication 86-23, 1985.

- WHO (OMS), Council for International Organizations of Medical Sciences, Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, Suiza, 1985.

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FACULTAD DE QUIMICA Y BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

DESARROLLO DE UN SISTEMA BASADO EN INMUNOTERAPIA CELULAR COMO CONTROL DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMON (ISAV)

SEBASTIAN ALBERTO GONZALEZ CATRILELBUN

Director de Tesis: Dr. Marcelo Andrés Cortez San-Martín

Co-director de Tesis: Dr. Claudio Antonio Acuña Castillo

Bioquímico

[redacted]

2013

AGRADECIMIENTO

Esta tesis fue realizada gracias al financiamiento del proyecto FIA PYT-2012-0022 "Desarrollo de un sistema basado en inmunoterapia celular para mejorar la respuesta inmune de las vacunas veterinarias: una oportunidad para controlar el riesgo del virus ISA como reservorio en sistemas dulceacuícolas y marinos".

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FACULTAD DE QUÍMICA Y BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

DESARROLLO DE UN SISTEMA BASADO EN INMUNOTERAPIA CELULAR COMO CONTROL DEL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN (ISAV).

SEBASTIÁN ALBERTO GONZÁLEZ CATRILELBÚN

Director de Tesis: Dr. Marcelo Andrés Cortez San-Martín
Co-director de Tesis: Dr. Claudio Antonio Acuña Castillo

Bioquímico

Santiago – Chile

2013

PROGRAMA

9.30	Palabras de bienvenida
10.00	Introducción Proyectos Área Acuícola
10.30	Presentación Proyecto FIA PYT 2012-0023 Margarita Montoya Kunsting
11.10	Presentación Proyecto FIA PYT 2012-0056 Mario Tello Reyes
11.50	Presentación Proyecto FIA PYT 2012-0022 Marcelo Cortez San Martín
12.30	Cóctel de cierre

Fundación Innovación Agraria
www.fia.cl - www.fia.cl/contactanos

Universidad de Santiago de Chile y Centro Biotecnología Acuícola
Fono: (562) 271 81164 - www.cba.usach.cl

Activaq: (562) 236 3022
contacto@activaq.cl
www.activaq.cl

Laboratorios Ximena Polanco
CASA MATRIZ: (562) 25524394
secretaria@xpolanco.cl

SUCURSAL: (562) 25524394
ventas@xpolanco.cl - www.xpolanco.cl

www.quimicaybiologia.usach.cl

COLABORADORES

Laboratorios Ximena Polanco
Un compromiso de seriedad... Desde 1988

ActivaQ

centro de biotecnología acuícola

APOYADO POR

FIA Fundación para la Innovación Agraria

UdeSantiago de Chile

DIFUSIÓN Y CIERRE DE PROYECTOS

TECNOLOGÍAS PARA EL MUNDO ACUÍCOLA

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

30 de Septiembre 2015
09.00 a 13.00 hrs.

DIRECTORA
MARGARITA MONTOYA KUNSTING
margarita.montoya@usach.cl

Bioquímica de la Universidad de Santiago de Chile y Doctor en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile. Investigadora del Laboratorio de Bioenergética y Estrés Oxidativo, Centro de Biotecnología Acuícola, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. Su línea de investigación se centra en estudio de los mecanismos bioenergéticos de la célula, bajo distintas condiciones fisiológicas.

CONTROL DEL ESTRÉS EN SALMONES

Desarrollo de una formulación a base de extractos de plantas destinado al control del estrés y a mejorar la sobrevida de salmones durante el proceso de esmoltificación.

(PROYECTO FIA PYT 2012-0023)

Durante el proceso productivo del salmón, los peces viven una serie de eventos que resultan altamente estresantes que producen una serie de alteraciones fisiológicas en los peces. Es así, como altos niveles de estrés son capaces de afectar significativamente al sistema inmune de los salmones, produciendo una importante inmunosupresión, la cual podría ser uno de los responsables de la baja efectividad de las vacunas y la aparición de patógenos cada vez más agresivos y abundantes en la salmonicultura.

Intervenir en el control del estrés durante el cultivo del salmón, podría generar mejoras sustantivas en la sobrevida de estos peces. Con este proyecto, generamos un formulado de bajo costo en base a extractos de plantas con capacidad antioxidante, reguladora del sistema nervioso e inmunoestimulante, que ha mostrado ser capaz proteger sobre el 90% a Salmo salar frente a infección por Yersinia ruckeri. Además, el formulado produjo un aumento significativo en el crecimieto de los salmones. Por otro lado, los peces mostraron también mejoras significativas en en sus barreras antioxidantes, lo que indica que se encuentran mejor preparados para enfrentar nuevos desafíos. De esta forma, este formulado permite obtener peces de mejor calidad, que a la larga sean peces con mejor calidad en su carne.

Este nuevo formulado, posee la ventaja adicional de ser un producto natural, amigable con el medio ambiente. Los mercados mundiales están cada vez más exigentes, requiriendo una producción con menor uso de medicamentos y tratamientos. Este formulado apunta en esa dirección, lo que permitiría generar un producto de mejor calidad y de mejor entrada en mercados de alta exigencia.

DIRECTOR
MARIO TELLO REYES
mario.tello@usach.cl

Bioquímico y Doctor en Bioquímica de la Universidad de Chile. Investigador y Jefe del Laboratorio de Metagenómica Bacteriana, Centro de Biotecnología Acuícola, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. Su línea de investigación está comprometida en investigar como los microorganismos modulan la fisiología de los salmónidos.

PROTEÍNA INMUNOESTIMULANTE

Plataforma para la producción in situ de proteínas con actividad estimulante de la respuesta inmune en Salmónidos.

(PROYECTO FIA PYT 2012-0056)

La inmunoestimulación de los salmonónidos es una estrategia fundamental para prevenir enfermedades causadas por patógenos virales y bacterianos. Un sistema de inmunosetimulación ideal debería ser de fácil administración, de bajo costo y estimular la respuesta inmune contra virus y/o bacterias patógenas. Los probióticos reúnen muchas de estas características sin embargo carecen de la capacidad de estimular la capacidad natural del pez de combatir infecciones virales.

Durante los últimos tres años hemos trabajado en la generación de un suplemento alimenticio basado en un probiótico con la capacidad de producir in situ proteínas con actividad inmunoestimulante que incrementen la capacidad natural del pez de depurar infecciones virales.

Este trabajo nos llevó a desarrollar LL-Pro, un suplemento alimenticio que estimula a las células de Salmones y truchas y permite reducir in vivo la carga viral de los peces hasta en un 75%. Este producto permitirá a la industria salmonicultora tener un suplemento alimenticio de bajo coste, que permita controlar infecciones virales prevalentes y/o prevenir la presencia de brotes en los centros de producción.

DIRECTOR
MARCELO CORTEZ SAN MARTÍN
marcelo.cortez@usach.cl

Bioquímico de la Universidad de Santiago de Chile y Doctor en Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela. Investigador Principal del Laboratorio de Virología Molecular del Centro de Biotecnología Acuícola de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile. Su línea de investigación esta ligada a la biotecnología y al control de patógenos virales en animales de producción mediante la aplicación de herramientas de punta en Biología Molecular.

NUEVA VACUNA CONTRA VIRUS ISA

Desarrollo de un sistema basado en inmunoterapia celular para mejorar la respuesta inmune de las vacunas veterinarias: una oportunidad para controlar.

(PROYECTO FIA PYT 2012-0022)

Chile llegó a disputar con Noruega el primer y segundo lugar de la producción mundial de salmónidos, hasta ocurrida la crisis del salmón causada por el virus de la Anemia Infecciosa del Salmon (ISAV). Aunque los niveles de producción se han recuperado, el riesgo de enfermedades infecciosas al que están expuestos los sistemas intensivos de cultivo se mantiene vigente.

Una de las herramientas más potentes para el control de las infecciones es la prevención de la enfermedad mediante la aplicación de vacunas, especialmente con las virales, que no tienen tratamiento. En la mayoría de los casos el desarrollo de vacunas eficientes para el control de las infecciones virales no es fácil, sobre todo en los peces, tanto por la variabilidad de los virus, como por la complejidad de su infección, así como la naturaleza de la respuesta inmune. Esto se ha visto reflejado con el bajo nivel de protección que tienen las vacunas en condiciones de terreno.

Durante la ejecución de este proyecto se la logrado desarrollar un método para aplicar la inmunoterapia celular a la generación de una nueva formulación vaccinal para salmónidos. Específicamente se ha logrado la formulación de una vacuna piloto para controlar el virus ISA, la cual es segura en los salmones y medioambiente acuático, y además permite inmunoestimular a los peces para resistir la infección de un virus ISA tras un desafío en condiciones controladas.

Este producto es el primero que incorpora elementos de inmunoterapia celular al desarrollo de productos para salmonicultura y es el primero que permite demostrar que es posible aplicar un nuevo modelo de vacuna que excluye el uso de adjuvantes oleosos, lo que resulta en un producto con menos efectos adversos en los peces.

En la ejecución de este proyecto trabajo un grupo de investigadores multidisciplinario, con carreras consolidadas, pero sobre todo comprometidos con el desarrollo tecnológico del país y apoyados por instituciones de renombre.

PROGRAMACIÓN

14:30
Palabras de bienvenida
Oscar Bustos Castillo, Vicerrector de Investigación, Desarrollo e Innovación, Universidad de Santiago de Chile
Fernando Bas Mir Director Ejecutivo, Fundación para la Innovación Agraria

14:45
Presentación Proyecto FIA PYT-2012-0033
Laura Almendares Calderón

15:05
Introducción Proyectos Área Acuícola
Ruben Avendaño-Herrera, experto en Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuícola

15:25
Presentación Proyecto FIA PYT-2012-0022
Marcelo Cortéz San Martin

15:45
Presentación Proyecto FIA PYT-2012-0023
Margarita Montoya Kunsting

16:05
Presentación Proyecto FIA PYT-2012-0056
Mario Tello Reyes

16:25
Cierre ceremonia
Cóctel

Vicerrectoría de Investigación Desarrollo e Innovación
Universidad de Santiago de Chile

PROYECTOS UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

CONVOCATORIA 2011-2012
CEREMONIA DE LANZAMIENTO

28 de agosto, 2013

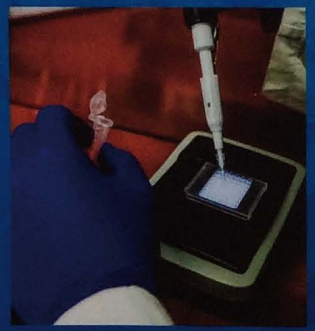
UdeSantiago de Chile

FIA
Ministerio de Agricultura
Gobierno de Chile

Director Marcelo Cortéz San Martín

marcelo.cortez@usach.cl

Bioquímico de la Universidad de Santiago de Chile y Doctor en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad de Santiago de Compostela, España. Investigador Principal del Laboratorio de Virología Molecular, Centro de Biotecnología Acuícola, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. Su línea de Investigación es la biología molecular de virus animales.



NUEVA VACUNA CONTRA VIRUS ISA

Desarrollo de un sistema basado en inmunoterapia celular para mejorar la respuesta inmune de las vacunas veterinarias: una oportunidad para controlar el riesgo del virus ISA como reservorio en sistemas dulceacuícolas y marinos
(Proyecto FIA PYT-2012-0022)

Actualmente, las vacunas para salmonidos, por ejemplo contra el virus ISA, agente causante de la anemia infecciosa del salmón, producen una baja protección contra enfermedades virales, incluso presentan efectos secundarios y adversos que dan cuenta de una respuesta inmune exacerbada debida a un proceso inflamatorio que estaría siendo perjudicial para los animales vacunados.
En este proyecto se aborda una problemática crucial para poder controlar las infecciones por el virus ISA y, además, establecer una plataforma para el desarrollo de vacunas eficaces contra diversas enfermedades de salmónidos. La propuesta es desarrollar una nueva generación de vacunas que potencien la respuesta inmune tanto innata como adquirida de los salmones para aumentar su eficacia y protección.
Como resultado, se espera desarrollar un sistema de expresión de proteínas virales en líneas celulares (in vitro) para así obtener una vacuna piloto, segura, inmunogénica y de baja toxicidad en ejemplares juveniles de salmón del atlántico. La vacuna eficaz en términos de mortalidad, activará la respuesta inmune y protegerá contra el virus ISA. Finalmente, esta plataforma será transferida al sector productivo para su registro, y escalamiento productivo y comercial.

CONTROL DEL ESTRÉS EN SALMONES

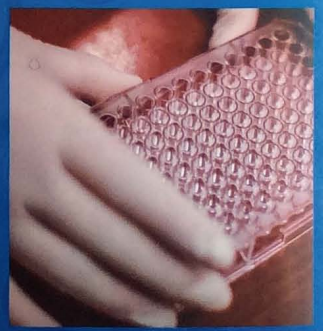
Desarrollo de una formulación a base de extractos de plantas destinado al control del estrés y a mejorar la sobrevida de salmones durante el proceso de esmoltificación
(Proyecto FIA PYT-2012-0023)

Durante el proceso de esmoltificación (cambio de agua dulce a salada) los peces sufren una serie de cambios fisiológicos, morfológicos, bioquímicos y de comportamiento. En esta etapa, se producen altos niveles de estrés que afectan significativamente al sistema inmune de los salmones, produciendo una importante inmunosupresión, la cual podría ser uno de los responsable de la baja efectividad de las vacunas y la aparición de patógenos cada vez más agresivos y abundantes en la salmonicultura.
Intervenir en el control del estrés durante el periodo de esmoltificación, podría generar mejoras sustantivas en la sobrevida de estos peces. Gracias a este proyecto se podrá aplicar una terapia de bajo costo utilizando extractos de plantas con capacidad antioxidante y reguladora del sistema nervioso, permitiendo controlar el estrés de los salmones y permitiéndoles una óptima entrada al mar.
Como resultado, se podrán obtener las herramientas terapéuticas para poder intervenir y mejorar las condiciones generales de los salmones durante la esmoltificación, mejorar las condiciones sanitarias y la eficiencia de los cultivos. Esperamos reducir significativamente la mortalidad y también el nivel de estrés. Por otra parte, permitirá la entrada de la industria de plantas medicinales a la acuicultura.

Directora Margarita Montoya Kunsting

margarita.montoya@usach.cl

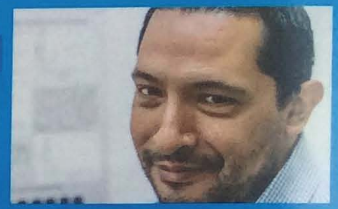
Bioquímica de la Universidad de Santiago y Doctor en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile. Investigadora del Laboratorio de Bioenergética y Estrés Oxidativo, Centro de Biotecnología Acuícola, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. Su línea de investigación se centra en estudio de los mecanismos bioenergéticos de la célula, bajo distintas condiciones fisiológicas.



PROTEÍNA INMUNOESTIMULANTE

Plataforma para la producción in situ de proteínas con actividad estimulante de la respuesta inmune en salmónidos
(Proyecto FIA PYT-2012-0056)

Las bacterias ácido lácticas (LAB) se han identificado en diversas especies comerciales de peces, crustáceos y mariscos. Actualmente su principal aplicación en acuicultura es como probióticos, mediante la identificación de microorganismos que después de ser cultivados in vitro son re-administrados a través de la dieta, sin embargo, el uso de LAB como vehículos de liberación de proteínas biológicamente activas ha sido menos explorado.
Gracias al apoyo de este proyecto, mediante técnicas de biología molecular en el Centro de Biotecnología Acuícola de la Universidad de Santiago de Chile, los investigadores han logrado incorporar genes para la liberación de proteínas con propiedades inmunoestimulantes sobre los salmones, logrando optimizar la respuesta inmune contra diversos virus.
De esta manera, las bacterias ácido lácticas podrían funcionar como un nuevo vehículo de inmunoestimulación en acuicultura, inocuo para el ser humano y medio ambiente, de bajo costo de producción, de administración oral y aplicable contra patógenos bacterianos y virales. Como resultado se espera realizar la producción y comercialización de la tecnología.



Director Mario Tello Reyes

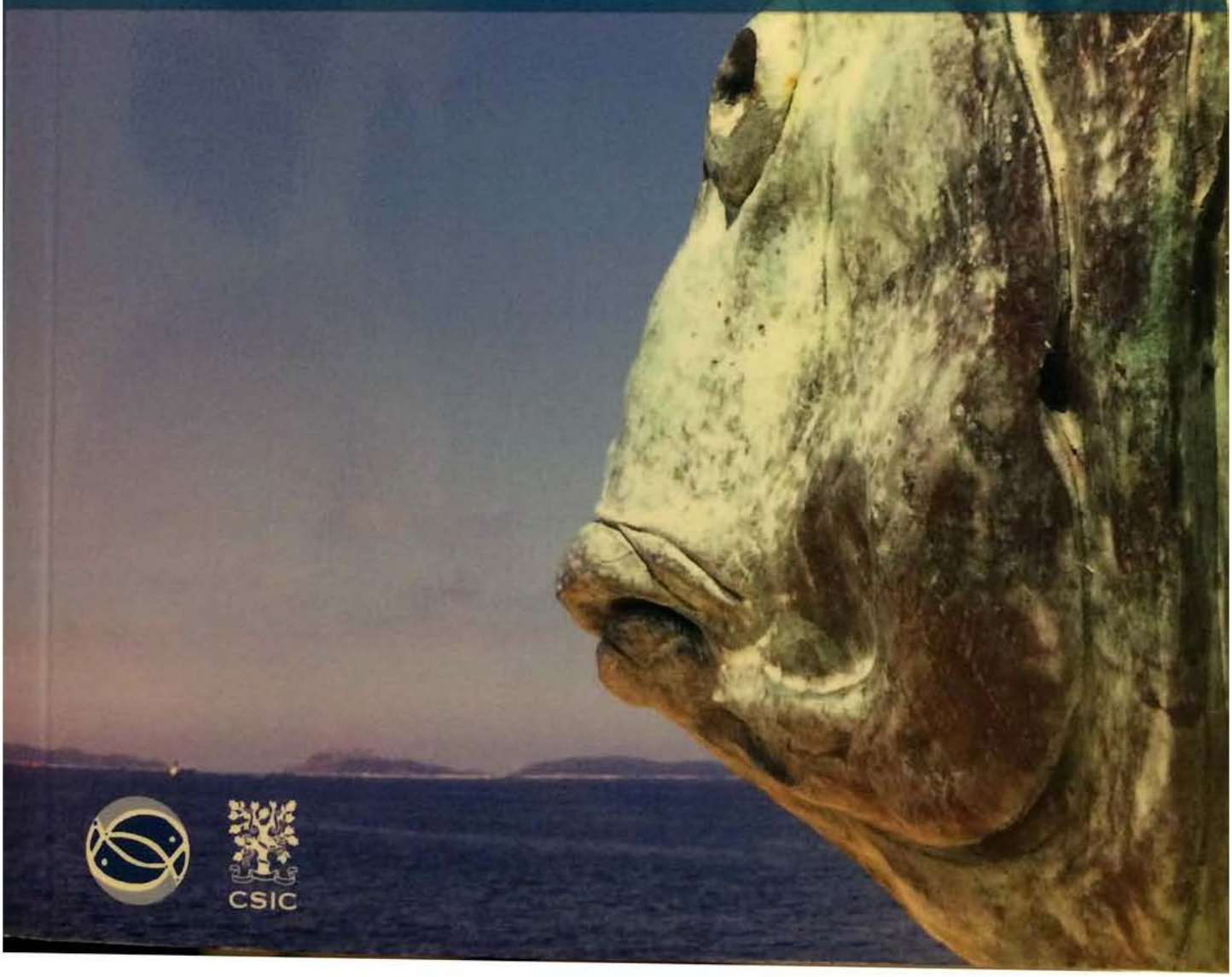
mario.tello@usach.cl

Doctor en Bioquímica de la Universidad de Chile. Investigador del Laboratorio de Bacteriología, Centro de Biotecnología Acuícola, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. Su principal línea de investigación son los compuestos Bioactivos producidos por microorganismos.

1ST INTERNATIONAL CONFERENCE OF FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY

June 25-28, 2013. Vigo, Spain

BOOK OF ABSTRACTS



CSIC

Immunomodulation

THE ADJUVANTS HAVE A KEY ROLE IMPROVING THE PROTECTION AND IMMUNE RESPONSE INDUCED BY RECOMBINANT PROTEIN VACCINE AGAINST INFECTIOUS SALMON ANEMIA VIRUS ISAV IN ATLANTIC SALMON

Cortez-San Martin M[1], Cottet L[1], Sandoval N[1], Toro-Ascuy D[1], Rivas A[1], Reyes-Cerpa S[1], Acuña C[2], Imarai M[3], Sandino AM[1,4], Spencer E[1]

[1]Laboratorio de Virologia, Centro de Biotecnologia Acuicola, Facultad de Química y Biologia, Universidad de Santiago de Chile. [2]Laboratorio de Bioterapias, Centro de Biotecnologia Acuicola, Facultad de Química y Biologia Universidad de Santiago de Chile. [3]Laboratorio de Inmunología, Centro de Biotecnologia Acuicola, Facultad de Química y Biologia Universidad de Santiago de Chile. [4]ACTIVAQ SA, Chile

The infectious salmon anaemia virus (ISAV), belongs to the family Orthomyxoviridae, mainly affects Atlantic salmon (*Salmo salar*) causing high mortality rates. In Chile the outbreaks of this virus caused a great economic crisis with billionaire losses for the aquaculture industry. The several policies of management and biosecurity require the constant vigilance to kept the control of the disease and the new outbreaks, due to the high prevalence of a nonvirulent genetic variant called HPR0 that could give rise to the emergence of highly virulent strains. ISA virus has two surface glycoproteins called hemagglutinin (HE) and fusion protein (FU), and a matrix protein (M) required for virion structure and a nucleoprotein (NP), responsible of viral RNA binding for viral packaging. There are several reports of ISA virus vaccines, however the importance of adjuvants to enhance the survival of infected fish has not been studied. This study describes in Atlantic salmon, the levels of protection and immune response of four vaccines based on the use of HE, FU, M and NP recombinant proteins, but using different type of adjuvants. The challenge of the vaccinated groups was by cohabitation with fish injected intraperitoneally with ISA virus. After the challenge the relative percent survival (RPS) values observed for MI, Cc, MI+Cc and A vaccines was to 29,9%, 23,1%, 14,6% and 57,3%, respectively. These results confirm that the A vaccine decreases considerably the mortality rates compared to control group or the MI+Cc vaccine. The analysis of the humoral response based in the detection of specific IgM for ISAV, showed that all vaccines produce increased of IgM, except the A vaccine, which showed only a slight increase of anti ISAV antibodies. The analysis of the genes expression related to immune response by qRT-PCR, showed that the A vaccine was able to induce the relative expression of the IFN-γ, TGF-β and IL-10, but not CD4. Noteworthy after the challenge, the IFN-γ and especially CD4 show high increase of relative expression which may explain the high proteccion showed by A vaccine. This study is the first to demonstrate the efficacy of vaccines based on recombinant proteins of ISAV and immune responses after vaccination and subsequent challenge with ISAV in Atlantic salmon.