

GOBIERNO DE CHILE
FUNDACION PARA LA
INNOVACIÓN AGRARIA

PROYECTOS DE DESARROLLO E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA 2001

**GENERACIÓN, SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN
BIOTECNOLÓGICA DE PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS
QUIMÉRICOS PARA EL CONTROL AMIGABLE DE
ENFERMEDADES ASOCIADAS AL SECTOR PRODUCTIVO
AGRÍCOLA CHILENO**

**VERSIÓN FINAL
DICIEMBRE 2001**



CONCURSO NACIONAL DE PROYECTOS DE DESARROLLO E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA 2001

FORMULARIO DE PRESENTACIÓN DE PROPUESTAS

La propuesta de proyecto deberá presentarse en este formulario, en tres ejemplares (un original y dos copias) y en disquet. Aquellos postulantes que no cuenten con medios computacionales, pueden transcribir el contenido del proyecto directamente a este cuadernillo.

Antes de iniciar la preparación del proyecto y el llenado del formulario se solicita leer con detención todos los puntos del "Instructivo para la Presentación de Propuestas", a fin de evitar errores que dificultarán posteriormente la evaluación de la propuesta por parte de la Fundación, o que puedan ser motivo de rechazo de la propuesta en las etapas de admisión o evaluación.

El formulario está dividido en secciones, que incluyen cierto espacio para la presentación de la información. Si el espacio en una sección determinada no es suficiente, se podrán agregar hojas adicionales, identificando la sección a la cual pertenecen. Podrá adjuntarse además cualquier otro tipo de información adicional o aclaratoria que se considere importante para la adecuada descripción de la propuesta.





FOLIO DE
BASES

013

CÓDIGO
(uso interno)

BIOT- 01-AC- 58

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO

NOMBRE DEL PROYECTO:

GENERACIÓN, SELECCIÓN Y PURIFICACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS QUIMÉRICOS PARA EL CONTROL AMIGABLE DE ENFERMEDADES ASOCIADAS AL SECTOR PRODUCTIVO Y AGRICOLA CHILENO.

Línea Temática:

AREA ACUICOLA

Rubro:

CONTROL
ENFERMEDADES

Región(es) de Ejecución:

V REGION

Fecha de Inicio:

30-12-01

Fecha de Término:

01-03-04

DURACIÓN:

26 MESES

AGENTE POSTULANTE:

Nombre : UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO

Dirección : AV. BRASIL 2950

Ciudad y Región: V

RUT :

Teléfono : (32) 273292

Fax y e-mail: rector@ucv.cl

Cuenta Bancaria (tipo, N°, banco):

AGENTES ASOCIADOS:

REPRESENTANTE LEGAL DEL AGENTE POSTULANTE:

Nombre: ALFONSO MUGA NAREDO

Cargo en el agente postulante: RECTOR

RUT:

Dirección: AV. BRASIL 2950

Fono: (32) 273292

Firma:

Ciudad y Región: V

Fax y e-mail: (32) 273292 – rector@ucv.cl

COSTO TOTAL DEL PROYECTO

(Valores Reajustados)

: \$

FINANCIAMIENTO SOLICITADO

(Valores Reajustados)

: \$

66

%

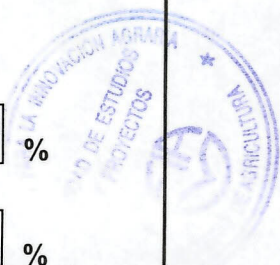
APORTE DE CONTRAPARTE

(Valores Reajustados)

: \$

34

%

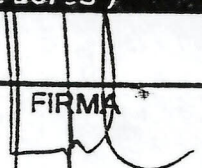


2. EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO

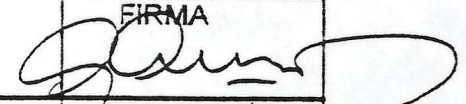
2.1. Equipo de coordinación del proyecto

(presentar en Anexo A información solicitada sobre los Coordinadores)

COORDINADOR DEL PROYECTO

NOMBRE SERGIO MARSHALL GONZALEZ	RUT	FIRMA 
AGENTE UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO		DEDICACIÓN PROYECTO (%/año) 20%
CARGO ACTUAL VICERRECTOR DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS		CASILLA 4059
DIRECCION AV. BRASIL 2950		CIUDAD VALPARAISO
FONO (32) 273444	FAX (32) 273437	E-MAIL vriea@ucv.cl

COORDINADOR ALTERNO DEL PROYECTO

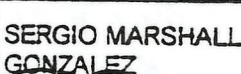
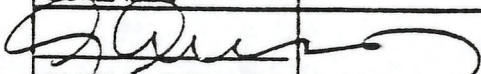
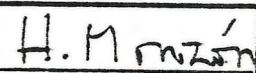
NOMBRE GLORIA ARENAS DIAZ	RUT	FIRMA 
AGENTE UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO		DEDICACION PROYECTO %/AÑO 27%
CARGO ACTUAL PROFESORA JORNADA COMPLETA, INSTITUTO DE BIOLOGIA		CASILLA 4059
DIRECCION AV. BRASIL 2950		CIUDAD VALPARAISO
FONO (32) 273205	FAX (32) 273437	EMAIL garenas@ucv.cl

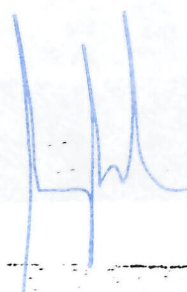


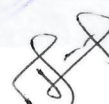


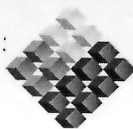
2.2. Equipo Técnico del Proyecto

(presentar en Anexo A información solicitada sobre los miembros del equipo técnico)

Nombre Completo y Firma	RUT	Profesión	Especialidad	Función y Actividad en el Proyecto	Dedicación al Proyecto (%/año)
 SERGIO MARSHALL GONZALEZ		Ph.D	COORDINADOR GENERAL DEL PROYECTO. GENÉTICA.	INVESTIGADOR PRINCIPAL	20%
 GLORIA ARENAS DIAZ		DOCTOR EN CIENCIAS	COORDINADORA ALTERNA DEL PROYECTO. INMUNOLOGÍA	INVESTIGADORA	27%
 VÍCTOR MONZÓN GODOY		LICENCIADO EN BIOLOGIA, DR. EN CS. BIOLÓGICAS.	BIOLOGÍA MOLECULAR. INMUNOLOGÍA	INVESTIGADOR, PURIFICACIÓN PÉPTIDOS.	100%
 MARCELO ARREDONDO ARAYA		INGENIERO PESQUERO, MAGISTER EN GESTIÓN, DIPLOMA EN FINANZAS	INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA	GERENCIAMIENTO TRANSFERENCIA Y NEGOCIOS TECNOLÓGICOS.	18%
N.N. POSTDOCTORADO				INVESTIGADOR BIOLOGIA MOLECULAR	50%







3. BREVE RESUMEN DEL PROYECTO

(Completar esta sección al finalizar la formulación del Proyecto)

Los países en vías de desarrollo necesitan avanzar en la potenciación de la biotecnología para depender cada vez menos de los países que la exportan. Esto trae ventajas económicas y sociales al generar conocimientos propios proyectados hacia áreas aplicadas a nivel local. Una política como esta, permitiría solucionar problemas nacionales con tecnologías de punta, generadas por grupos de investigación científica e industriales que le otorgarían independencia intelectual y productiva al país. Precisamente en Chile donde se ha potenciado en los últimos años la producción de especies marinas cultivables, que tienen un gran atractivo en el consumo mundial, puede surgir un polo biotecnológico de progreso asociado con esta actividad.

Esta propuesta presentada al Concurso de Proyectos de Desarrollo e Innovación en Biotecnología 2001, tiene como propósito generar técnicas biotecnológicas, para obtener moléculas con actividad antimicrobiana que puedan tener una aplicación farmacológica frente a patógenos que afectan productos agrícolas como acuícolas. Estos compuestos corresponden a péptidos nativos y sus quimeras extraídos de la hemolinfa de *Mytilus chilensis*, que es un bivalvo chileno de gran abundancia y muy resistente a enfermedades.

La investigación y desarrollo biotecnológico, se basará en la aplicación de técnicas de genética molecular, en momentos en que se está dando un salto cuántico en la capacidad de modificar información preexistente acelerando procesos naturales (Chicurel, 2001). Una de las técnicas más innovadoras derivadas de éste conocimiento, es la recombinación genética de bloques de secuencias de familias de genes para generar proteínas híbridas funcionales con rangos de acción optimizados, superando a las entidades individuales de las cuales se derivaron (Stemmer, 1994; Craneri *et al.*, 1998).

Las expectativas económicas que registra el descubrimiento de péptidos de naturaleza antimicrobiana, permite suponer en el futuro la instalación de fábricas de fármacos peptídicos. Disponiendo de los péptidos descubiertos es posible en Chile instalar una empresa dedicada a este propósito con una inversión inicial de US\$5.000.000.-, resultando rentable si se dedicara a producir dosis para suministrar en la industria salmonera nacional para combatir enfermedades víricas y bacterianas, tales como, *Piscirickettsia salmonis* y Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV). Si se considera una adopción conservadora del producto en este mercado, es posible que una industria privada logre una TIR cercana al 20%, con flujos netos actualizados de US\$1 millón. La posibilidades de transferencia del producto tecnológico se ven favorecidas por la posibilidad de producir el péptido antimicrobiano con tecnología que puede escalarse a partir de la propia experiencia científica de laboratorio.



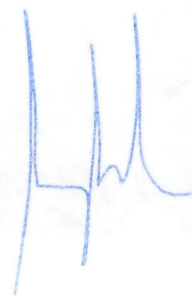
4. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA A RESOLVER

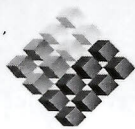
Enfermedades causadas por bacterias hongos y virus son factores limitantes en la optimización económico-social de los cultivos marinos y agrícolas de impacto en la alimentación humana. La estrategia más ampliamente utilizada para contrarrestarlas, tanto en los países desarrollados como en los países productores en vías de desarrollo, ha sido la aplicación incremental, y a veces indiscriminada, de antibióticos y/o pesticidas, incluso a sabiendas de su eventual y fuerte impacto ambiental. Este último se materializa, en el tiempo, en la inducción de resistencias no deseadas ni esperadas en bacterias y hongos para el caso de los antibióticos, y en la contaminación de tierras agrícolas, de aguas de riego o de aguas de cultivos para el caso de los pesticidas. En ambos casos un antecedente adicional es que presentan una difícil biodegradación. Debido a estos problemas, diferentes grupos de investigación están abocados a buscar alternativas que permitan disminuir estos efectos negativos, logrando especies resistentes a enfermedades o bien seleccionando moléculas, que puedan ser usadas de modo más amigable con el hombre y con su entorno.

En este sentido se ha logrado avances al re-descubrir moléculas naturales con efectos antimicrobianos que han sido obtenidas desde diferentes organismos animales y vegetales desde mediados del siglo pasado. La mayoría corresponde a péptidos de naturaleza catiónica, de bajo peso molecular y normalmente enriquecidos en residuos de cisteína o prolina.

Debido al desarrollo tecnológico en diversos campos del saber, donde se destaca el avance de la bioinformática, se ha podido establecer homologías estructurales y funcionales entre estas moléculas individualmente descritas. Esto, obviamente potencia un campo de acción decididamente biotecnológico donde es posible innovar utilizando organismos locales, para la búsqueda de moléculas con actividad antimicrobiana patentables que puedan ser utilizadas en su estado nativo o modificadas genéticamente a partir de elementos descritos en organismos foráneos, para poder enfrentar adecuadamente epizootias y/o para la mejora de especies de interés comercial nacional.

La posibilidad de aplicar exógenamente péptidos heterólogos purificados desde distintos organismos para combatir la acción de patógenos sobre vegetales se basa en el hecho que se ha demostrado que las plantas terrestres han desarrollado sistemas de defensa para combatir los efectos causados por microorganismos. Entre ellos las defensinas, familia de péptidos enriquecidos en cisteína, que causan la inhibición del crecimiento de un amplio rango de hongos a concentraciones micromolares, pero que no causan efectos tóxicos ni en células de plantas ni en mamíferos (Broekaert et al., 1995; 1997, Thevissen et al., 1999) y que guardan una alta relación estructural con las defensinas de insectos (Landon et al 1997). Específicamente, de la maleza *Phytolacca americana*, se ha purificado, caracterizado, clonado y superproducido en *E. Coli* un polipéptido muy activo contra hongos (Liu et al., 2000) que ha resultado homólogo al de *Mirabilis jalapa* (Cammue et al., 1992).





La información acerca de la aplicabilidad de péptidos purificados de invertebrados, sobre peces o plantas terrestres, para combatir infecciones provocadas por bacterias u hongos, respalda la idea que presenta el grupo postulante. Adicionalmente, la creciente y sólida consolidación de la evolución molecular dirigida, como mecanismo de cambios genéticos, da vías de solución innovadoras a un problema que más allá de sus alcances productivos, involucra la calidad de vida del planeta.





5. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Chile idealmente debiera aumentar su capacidad productiva, con el objeto de alcanzar un grado de participación competitiva a nivel internacional, en el ámbito acuícola y agronómico. Es imperativo que en el propio país se desarrolle, socialice y transfiera el conocimiento necesario, como también los expertos y la capacidad de gestión, para proyectar la biotecnología como instrumento de ayuda a la autosustentabilidad futura. En la actualidad, Chile se ve en la necesidad de "importar" la gran mayoría del conocimiento y la aplicación biotecnológica, con el consecuente costo monetario, y a veces sin el nivel de actualización requerido. Más aún y lo que es peor, muchas veces sin que necesariamente se ajuste a las necesidades del país, lo que contribuye a que no se logre la eficiencia esperada.

Por otra parte, el relativo bajo perfil que tiene la biotecnología en el Chile de hoy, significa que el costo-oportunidad para los posibles generadores del conocimiento y operadores de la tecnología es muy alto, y por ende se requiere, en el muy corto plazo, disponer de grupos consolidados que permitan la formación y el entrenamiento en esta área, evitando así que Chile siga dependiendo del entorno internacional. Especialmente en agricultura y acuicultura, ámbitos de tanto potencial y tan particulares con sólida y exitosa implementación y desarrollo.

Estamos convencidos que la única manera de lograrlo es mediante una política agresiva en sinergia con un buen sustento científico. Se establecerían en el más corto plazo plataformas científicas y tecnológicas que permitirían diseñar y establecer mecanismos confiables y amigables con el ambiente para el control de enfermedades de alto impacto en las áreas agrícola y acuícola del país. (Un análisis resumido del desarrollo de la biotecnología en USA, Europa, América Latina y en Chile (**Anexo F.1**)).

Con un enfoque más puntual, nuestra propuesta tiene un aporte biotecnológico que está sustentado en la generación de péptidos antimicrobianos quiméricos a partir de los naturales aislados de un molusco autóctono, de modo que se amplíe el rango de moléculas disponibles y facilitar su manejo. Su obtención se basa en la inducción evolutiva de recombinaciones de bloques de secuencias por la técnica del "DNA shuffling". Como hay prolijos estudios evolutivos sobre las defensinas animales existe un respaldo confiable en la factibilidad exitosa de nuestra idea. Así, la clasificación estructural de proteínas (SCOP) aplicada a la superfamilia de péptidos tipo defensina de diferentes orígenes en USA, logró agrupar en una sola categoría a 20 miembros de péptidos de reconocida acción antimicrobiana, lo que contrasta con la cantidad muy superior de los mismos existente en la base de datos de Suiza.

(<http://scop.berkeley.edu/data/scop.1.007.009.001.000.000.html>23).

Más aún, la base de datos Peptaibol pone bajo una misma categoría a un grupo mayor de péptidos asociados a la gramicidina, que representa tanto a péptidos ciclados como lineales con actividad antimicrobiana. Todo esto, más que representar intentos de clasificar las secuencias ya disponibles, es un excelente indicador que, a pesar de la versatilidad de origen y funciones de éstos péptidos, conservan unidades comunes que pueden ser magnificadas biotecnológicamente.

Adicionalmente el grupo de trabajo proponente ha caracterizado exitosamente péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular y de alta actividad específica contenidos en la hemolinfa de *Mytilus chilensis*, una especie autóctona y muy abundante.

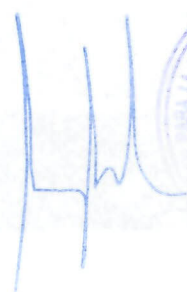
Nuestra experiencia nos ha indicado que las cantidades de péptidos presentes en el material inicial, generalmente son pequeñas lo que hace necesario contar con una gran cantidad de ejemplares para obtener material suficiente utilizado en la purificación y en los ensayos de actividad antimicrobiana. Por otra parte, debido a la complejidad del material de origen, los extractos crudos de hemocitos aislados de la hemolinfa, su purificación requiere una serie de pasos usando sucesivas cromatografías complementarias. Esto hizo, del todo recomendable utilizar técnicas biotecnológicas para optimizar las cantidades logradas.

Dentro de ellas destaca la aplicación de “genética inversa” (reversed genetics) para el aislamiento de péptidos del tipo defensina. En nuestro grupo usamos secuencias codificadoras conocidas para el diseño, construcción y aplicación de iniciadores específicos, que permitieron aislar los genes homólogos de los genomas de moluscos bivalvos por diferentes variantes de la técnica de la PCR. Los ORFs del tipo defensinas obtenidos han sido caracterizados, y sus productos de expresión aislados y caracterizados, desde tres especies de moluscos (*Mytillus galloprovincialis*, *Mytillus chilensis* y *Argopecten purpuratus*) (Marshall, Arenas y Orrego., manuscrito en preparación).

Otro antecedente generado por nuestro grupo, que sirve de aval a la propuesta, es haber detectado en órganos blanco de peces salmonídeos naturalmente infectados con el agente patógeno bacteriano intracelular *Piscirickettsia salmonis*, un significativo aumento de péptidos con actividad antibacteriana con respecto a un control sano (Marshall y Arenas, datos no publicados). Estas moléculas, que pertenecerían al sistema de defensa inmune natural de peces, son una evidencia que sugiere la efectiva participación de ellas en el proceso de respuesta inmune global en estos organismos superiores, lo que se ratifica por recientes reportes científicos (Jia et al., 2000; Smith et al., 2001).

Estas moléculas se proyectan con un gran potencial farmacológico, no solamente para la acuicultura, sino también para el control fitosanitario del área agrícola, otro de los sistemas productivos del país y de la región.

Lo más interesante es que información científica reciente y confiable (Jia et al., 2000; Sharma et al., 2000), ha asociado que péptidos antipatogénicos de organismos heterólogos animales también demuestran la misma actividad contra agentes patógenos de plantas, abriendo así interesantes perspectivas para enfrentar el problema de manejo eficiente de las fastidiosas enfermedades vegetales producidas por bacterias y hongos.



BIBLIOGRAFÍA

Bradford, M.N. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254.

Beck, G. 1998. Macrokinases: Invertebrate cytokine-like molecules?. *Frontiers in Bioscience* 3: 559-569.

Beridze, T. 1986. *Satellite DNA*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.

Bevins C. L. & M. Zasloff. 1990. Peptides from frog skin. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 395-414.

Bingle W. H. et al., 2000. *J. Bacteriol.* 182: 3298-3301

Blum, J.H., Dove, S.L., Hochschild, M., Melnik, J.J. 2001. <http://www.pnas.org/cgi/gca>

Boman, H.G. 1991. Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. *Cell*, 65: 205-207.

Boman, H.G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, 13: 61-92.

Brightbill, H.D. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285: 732 –736.

Broekaert W.F., Terras F.R.G., Cammue BPA and Osborn RW. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108: 1353-1358

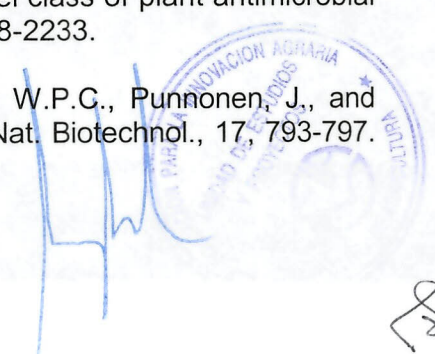
Cadoret, J.P. 1992. Mise au point de méthodes de manipulation embryonnaire de mollusques bivalves. Application en génétique et pathologie infectieuse. Tesis. Obtención del grado de Diploma de Altos Estudios. IFREMER – La Tremblade. Ministerio de Educación Nacional, Francia.

Cadoret, J.P. 1997. Transfert des gènes chez des mollusques bivalves: constructions, transfections, et analyses fonctionnelles de vecteurs d'expression. Tesis. Obtención del grado de Docteur. Université de Montpellier II. Ministerio de Educación Nacional, Francia.

Campalans, M., Rojas, P., Sepúlveda J., Pascual J., Guerrero I., Riquelme C. Y Castro R. 1997. Desarrollo de un programa de detección y tratamiento de enfermedades en moluscos cultivados en Chile. En: Universidad Católica de Valparaíso (Editor) *Estudios y documentos*, Valparaíso, N° 22, pp. 250.

Cammue BPA., De Bolle MFC., Terras FRG., Van Damme PPJ., Rees SB., Vanderleyden J. and Broekaert WF. 1992. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 2228-2233.

Chang, C.-C., Chen, T.T., Cox, B.W., Dawes, G.N., Stemmer, W.P.C., Punnonen, J., and Patten, P.A. Evolution of a cytokine using DNA family shuffling. *Nat. Biotechnol.*, 17, 793-797. (1999)



Charlet , M., S. Chernysh, H. Philippe , C. Hetru , J. Hoffmann & P. Bulet. 1996. Innate immunity. Isolation of several cysteine- rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. Bull. JBC 271: 21808-21813.

Coles, J.A and R.K. Pipe. 1994. Antimicrobial peptide in the skin and secretions of winter flounder J. Biol. Chem. 272: 12008-12013.

Cole, P., Cunningham, G.F., Ross, T. 1997. Activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Fish and Shellfish Immunology, 4: 337-352.

Cramer, A., Rallaird, S-A., Bermudez, E., Stemmer, W.P.C. 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates direct evolution. Nature 391: 288 – 291.

Cheng, T. C. and Rifkin, E. 1970. Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. In: Snieszko, S. F. (Editor), A Symposium of the American Fisheries Society on Diseases of Fishes and Shellfishes, American Fisheries Society, Washington, Special Publication 5: 443-496.

Chicurel, M. 2001. Can organisms speed their own evolution. News Focus. Science 292: 1824 – 1827.

Chisholm, J.R.S. & V.J. Smith. 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. Comp. Biochem. Physiol. 110: 39-45.

Chu, F-L.E. 1988. Humoral defense factors in marine bivalves. In: Fischer, W.S. (Editor), Diseases Processes in Marine Bivalve Molluscs. American Fisheries Society, Washington, Special Publication N° 18, pp. 178-188

Chung ,S. C., Lee, I.H., Kim, E., Kim, S.I., Kim, H.R. 2000. Antibacterial properties and partial cDNA sequences of cecropin-like antibacterial peptides from the common cut-worm *Spodoptera litura*. Compar. Biochem. Physiol. Part C. 125: 287 – 297.

De Bolle MFC, Eggermont K., Duncan R. E., Osborn R W, Terras FRG and Broekaert WF. 1995 Cloning and characterization of two cDNA clones incoding seed-specific antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. Plant Mol. Biol. 28: 713-721

Destoumieux D., Bulet P., Strub J.M., Dorsselaer A. And Bachère E. 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. Eur. J. Biochem. 266: 335-346

Fearon D.T. 2000. Innate Immunity – Beginning to fulfill its promise?. Nature Immunol. N&V. 2: 102-103.

Findlay, C. & V. J. Smith. 1995. Antimicrobial factors in solitary ascidians. Fish Shellfish Immunol. 5: 645- 658.

Fothergill-Gillmore, D. 1999. Procedures for molecular breeding. Exp. Opin. Invest. Drugs 8:(11) 1 –8.

Ganz, T. and R.I. Lehrer. 1998. Antimicrobial peptides of vertebrates. Current Opinion in Immunol., 10: 41-44.



Gallo, R.L., M.Ono, T. Provsic, C. Page, E. Eriksson, M. Klagsburn and M. Bernfield. 1994. Sydecans, cell surface heparan sulphate proteoglycans, are induced by a proline rich antimicrobial peptide from wounds. PNAS, 91: 11035-11039.

González, J. M. & Arenas, G. 1998. Modificación del sistema inmune del ostión del Norte (*Argopecten purpuratus*) afectado por un protozoo X. Noticiario de Biología, 6 (5): 110.

Hansson, L. O., B-Grob, R., Massoud, T., and Mannervik, B. 1999. Evolution of differential substrate specificities in Mu class glutathione transferases probed by DNA shuffling. J. Mol. Biol., 287, 265-276.

Hartford, W.P. 1999. The essential prerequisites for quantitative RT-PCR. Nature Biotech. 17: 835.

Heath, S., Pak, S., Orrego, C., Marshall, S.H. Genetic Monitoring by denaturant gel electrophoresis of *Piscirickettsia salmonis*, a bacterial disease of farmed salmonids. Mutation Analysis. Technical Note. BIO-RAD. Bull. 2451.06/99. 1999.

Heath, S., Pak, S., Marshall, S.H, Prager, E.M, Orrego, C. Monitoring *Piscirickettsia salmonis* by denaturant gel electrophoresis and competitive PCR. DA, 41: 19-29. 2000.

Hemml, H., Takeuchi, O., Kawal, T., Katsho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., 2000. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 408: 740 – 745.

(<http://www.sciencedaily.com/releases/2001/03/010313074239.htm>)

Hubert F., Noël T., and Roch P. 1996. A member of the arthropod defensin family from edible mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Eur. J. Biochem. 240: 302-306.

Hutton, D.M. and V. J. Smith. 1996. Antibacterial properties of isolated amoebocytes from the sea anemone *Actinia equina*. Biol. Bull. 191: 441-451.

Ibrahim M.A.A., & Gotch, F.M. 2000. Making smarter immunotherapies. Nature Immunol. 1: 3-4.

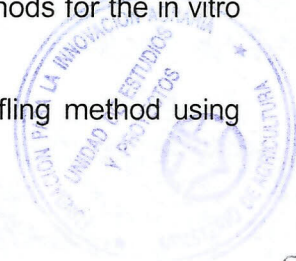
Ifland, A., Tafelmeyer P., Saudan C., Johnson K. 2000. Directed molecular evolution of Cytochrome c Peroxidase. Biochem. 39: 10790 – 10798.

Jia, X, A. Patrzykat, R.H. Devlin, P.A. Ackerman, G. K. Iwama and R.E.Hancock. 2000. Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infections. Appl. Environ. Microbiol. Vol 66, Nº 5, 1928-1932.

Kawabata, S., F. Tokunaga, Y. Kugi, S. Motoyama, Y. Miura, M. Hirata & S. Iwanaga. 1996. Limulus factor D, a 43-kDa protein isolated from horseshoe crab hemocytes, is a serine protease homologue with antimicrobial activity. FEBS Lett. 398: 146-150.

Kikuchi, M., Ohnishi, K., and Harayama, S. 1999. Novel family shuffling methods for the in vitro evolution of enzymes. Gene, 236, 159-167.

Kikuchi, M., Ohnishi, K., and Harayama, S. 2000. An effective family shuffling method using single-stranded DNA. Gene, 243, 133-137.



Handwritten signature in blue ink.

Handwritten signature in blue ink.

Kim, K. 1994. Antimicrobial activity in gorgonian corals (Coelenterata; Octocorallia). Coral Reefs 13: 75-80.

Klien J. 1997. Homology between immune responses in vertebrates and invertebrates: does it exist?. Scan. J. Immunol, 46: 558-564.

Kuchner, K. Amd Arnold, F.H. 1997. Directed evolution of enzyme catalysis. Trends. Biotechnol. 15: 523-530

Lambert, J., Keppi, E., Dimarcq, J-L., Wicker, C., Reichhart, J-M., Dunbar, B., Lepage, P., Dorsselaert, A.V., Hoffmann, J., Fothergill, J., and Hoffmann, D. 1989. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. Proc. Natl. Acad. Sci.USA 86: 262-266.

Landon C. Sodano P., Hetru C., Hoffmann J. and Ptak M. 1997. Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. Protein Sc.. 6: 1878- 1884.

Lehrer, R.I, Ganz, T., Selsted, M.E. 1991. Defensins: Endogenous antibiotic peptides of animal cells. Cell, 64: 229-230.

Lehrer, RI and T. Ganz 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. Current Opinion in Immunology, 11: 23-27.

Lee, T.N.H. and M.F. Singer. 1982. Structural organization of alpha-satellite DNA in a single monkey chromosome. J. Mol. Bio. 161:323-342

Liu, L., Wang, L., Jia, H.P., Zhao, C., Heng, H.H.Q., Schutte, B.C., McCray, P. B., Ganz, T. 1998. Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation. Gene, 222: 237-244.

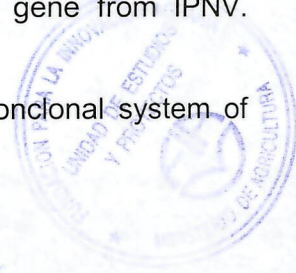
Liu, T.Y., Minetti, C. A., Fortes-Dias, C. L., Liu, T., Lin, L. and Y. Lin. 1994. C-reactive proteins, limunectin, lipopolysaccharide-binding protein, and coagulin. Molecules with lectin and agglutinin activities from Limulus polyphemus. Annals of the New York Academy of Sciences, 712: 146-154.

Liu, Y., Luo, J., Xu, C., Ren, F. , Peng, C., Wu, G. and Zhao, J. 2000 Purification , characterization and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed. Plant Physiol. 122: 1015-1024

Marshall, S.H., Heath, S., Henríquez, V., Orrego, C. 1998. Minimally invasive detection of *Piscirickettsia salmonis* in cultivated salmonis via PCR. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3066-3069.

Marshall S.H., Villalobos P., Araneda P., Reyes M., Maclean N., Orrego C. 2001. Cloning, expression and protective capacity of a truncated version of the VP2 gene from IPNV. (submitted to Journal of Virology)

Medzhitoz R & C. Janeway. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell, 91: 295-298



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

Meyerhof, W., B. Tappeser, E. Korge, and W. Knöchel. 1983. Satellite DNA from *Xenopus laevis*: comparative analysis of 745 and 1037 base pair HindIII tandem repeats. Nucleic Acids Res. 11:6997-7009.

Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Roch P. 1999a. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. Journal of Cell Science. 112: 4233-4242.

Mitta G., Hubert F., Noël T., and Roch P. 1999b. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Eur. J. Biochem. 265: 71-78.

Miteva, M., Andersson, M., Karshikov A., Otting, G. 1999. Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. FEBS Letters 462: 155 – 158.

Modlin, R.L., 2000. A toll for DNA vaccines. N.&V. Nature 408: 659 – 660.

Modlin, R.L., Stenger, S., Hansson, D.A., Niazi, K.R., Dewan, P., Froelich, C., Ganz, T., Krensky, A.M. 1998. Antimicrobial activity of cytolytic T cells is mediated by granulysin. (Annual Meeting of the Professional Research Scientists on Experimental Biology 98, Part 1, San Francisco, California, USA. FASEB Journal, 12: A622.

Montes, J.F., Durfort, M. and J. García-Valero. 1995. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. Cell & Tissue Research, 279: 529-538.

Montes, J. F., Del Rio, J. A., Durfort, M. J. and García-Valero. 1997. The protozoan parasite *Perkinsus atlanticus* elicits a unique defensive response in the clam *Tapes semidecussatus*. Parasitology, 114: 339 –349.

Moore, J. C. et al. 1997. Strategies for the in vitro evolution of protein function: Enzyme evolution by random recombination of improved sequences., J. Mol. Biol. 272, 336-347.

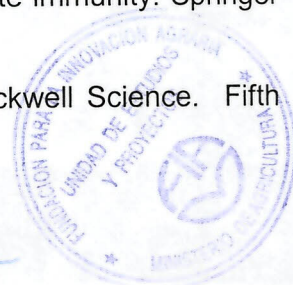
Moore G.L., Maranas C.D., Luftz S., Benkovic S.J. 2001. Predicting crossover generation in DNA shuffling . P.N.A.S. 98: 3226 – 3231

Morvan, A., Bachere, E., Da Silva, P.P., Pimenta, P. and E. Mialhe. 1994. In vitro activity of the antimicrobial peptide magainin 1 against *Bonamia ostrea*, the intrahemocytic parasite of the flat oyster *Ostrea edulis*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3(6): 327-333.

Morvan, A., Iwanaga, S., Comps, M. and E. Bachere. 1997. In vitro activity of the limulus antimicrobial peptide tachyplesin I on marine bivalve pathogens. J. Invertebr. Pathol. 69(2): 177-182.

Muta T., Iwanaga S. 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. Springer Verlag, Berlin. Alemania.

Old, R.W. and S.B. Primrose. Principles of Gene Manipulation. Blackwell Science. Fifth edition, 1994. p. 66.



Osborn, AE. 1996 Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831

Pech, M, T. Igo-Kemenes and H.G. Zachau. 1979. Nucleotide sequence of a highly repetitive component of rat DNA. *Nucleic Acids Res* 7:417-432

Pipe, R.K. 1990. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell and Tissue Res.* 261: 261-268.

Pipe, R.K. 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 16: 11-122.

Pipe, R.K., Coles, J.A. and S.R. Farley. 1995. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. *Techniques in Fish Immunology.* 4: 93-100.

Rapley, R. Editor. 1999. *The Nucleic Acid Protocol Handbook*. Humana Press. ISBN 0 89603 459 3. USA.

Renwrautz, L.R., Daniels, J. and P.D. Hansen. 1985. Lectin-binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 203-210.

Schnapp, D., Kemp, G.D. and V.J. Smith. 1996. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactericidin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur.J. Biochem.* 240 (3): 532-539.

Shafer, W.M. *Methods in molecular biology: Antibacterial peptide protocols*. Nº 78. 115-131 pp. Humana Press. Totowa, New Jersey. 1997.

Schägger, H. and von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochem.* 166:368-379.

Shao, Z., Giver, L., Shao, Z. Affholter, J.A., and Arnold, F.H. 1998. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nat. Biotechnol.* 16: 258 – 261.

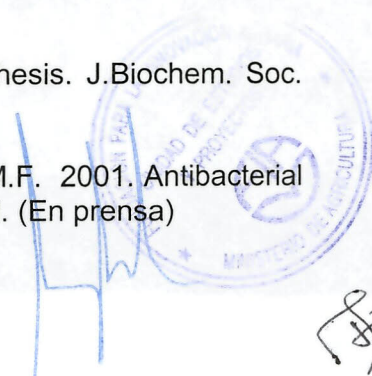
Sharma, A., Sharma, R., Imamura M, Yamakawa M and Machii H. 2000 Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombix mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. *FEBS Letters* 484: 7-11

Simmaco, M., Barra, D., Chiarini, F., Noviello, L., Melchiorri, P., Kreil, G. and K. Richter. 1991. A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata*. *Eur. J. Biochem.* 199: 217-222.

Singh, P.K., Jia, H.P., Wiles, K., Hesselberth, J., Liu, L., Conway, B-A., Greenberg, E.P., Valore, E.V., Welsh, M.J., Ganz, T. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95: 14961-14966.

Smith, C. 1994 Signal transduction in elicitation of phytoalexin synthesis. *J. Biochem. Soc. Trans.* 22:414-419.

Smith, V.J., Fernandes, J.O.M., Jones, S.J. & Kemp. G.D. & Tatner, M.F. 2001. Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* (En prensa)



Stemer, W.P.C. DNA shuffling by random fragmentation and assembly: in vitro recombination for molecular evolution. 1994a. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91: 10747 – 10751.

Stemer, W.P.C. Rapid evolution of proteins in vitro by DNA shuffling 1994b. Nature 370: 389 – 391.

Thevissen K, Terras F.R.G. and Broekaert W.F. 1999 Permeabilization of fungal membranes by plants defensins inhibits fungal growth. Applied and Environmental Microbiology. 65 : 5451-5458

Thoma-Uszynsky S., Stenger S., Takeuchi, O., Ochoa MT, Engele M., Sieling PA., Barnes PF., Rölinghoff, M., Bölskei PL., Wagner, M., Akira, S., Norgard, M.V: Belisle, J.T., Godowski, P.J., B.R. Bloom, Modlin, R.L. 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-Like Receptors. Science 291: 1544-1547

Vasta, G.R. 1991. The multiple biological roles of invertebrate lectins: their participation in nonself recognition mechanisms. In: Warr, G. W and Cohen, N. (editors) Phylogenesis of immune functions. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp 73-116.



6. MARCO GENERAL DEL PROYECTO

- **Péptidos antimicrobianos, un elemento importante en la inmunidad inespecífica de invertebrados y vertebrados y en sistemas de defensa de plantas terrestres.**

Durante las últimas décadas péptidos catiónicos antimicrobianos han sido identificados virtualmente en todos los organismos, incluyendo bacterias, plantas, invertebrados y vertebrados. Ellos otorgan por su rápida acción y su amplio espectro de actividad, protección local no específica contra bacterias, hongos y virus. Se conoce bien en mejillones (*Mytilus edulis*) tres tipos de péptidos antimicrobianos de pequeño tamaño, catiónicos y ricos en residuos de cisteína: 1) las mitilinas, de 34 residuos (Charlet et al, 1996) 2) las miticinas de 40 residuos (Mitta et al, 1999) 3) péptidos miembros de una gran familia de defensinas de artrópodos (Charlet et al 1996, Hubert et al, 1996).

A propósito del interés comercial de especies de invertebrados marinos que son susceptibles a diferentes patógenos microbianos se han realizado en ellos intensos estudios de péptidos antibacterianos, preferentemente en cangrejos y en moluscos (Charlet et al 1996, Mitta et al, 1999). Por otra parte péptidos antibacterianos aislados de vertebrados (*Xenopus laevis*) o de artrópodos (*Limulus*) han sido probados sobre protozoos patógenos y sobre bacterias del género *Vibrio* de ostras y almejas. Su efecto ha provocado una alta disminución en la viabilidad del patógeno de manera dosis-dependiente, sin afectar la estructura ni las capacidades funcionales de las células del hospedero (Morvan et al. 1994; Morvan et al 1997).

En vertebrados otro grupo de péptidos antibacterianos, las magaininas, han sido aisladas de las glándulas de la piel de sapos. Estas tienen sólo 23 residuos aminoácidos y también están enriquecidas en cisteína (Bevins & Zasloff, 1990), actúan sobre bacterias gram-, gram+, hongos y protozoos (Ganz and Lehrer, 1998). En Bombina, se encuentra un tipo de péptido con capacidad antibacteriana, bombinina, con una secuencia estrechamente relacionada con magaininas (Simmaco et al. 1991).

En mamíferos cierto tipo de péptido antibacteriano está localizado en los neutrófilos donde se cree que aumentan la capacidad microbicida intracelular no específica. Un hecho interesante es que un grupo de péptidos de los neutrófilos, las catelicidinas están involucradas en mecanismos de reparación de daño, lo que implica la síntesis de proteoglicanos de membrana, básicamente de la familia de los sindecanos (Gallo et al., 1994). No está establecido si ocurren eventos similares en otros en animales, pero es probable que estos mecanismos de reparación y defensa podrían haber sido favorecidos por la selección natural.

Por otra parte se creía que las cecropinas con alto poder antibacteriano, aisladas de insectos era exclusiva de estos organismos, sin embargo ha sido encontrada en intestino de mamíferos, por lo que se deduce que una fuerte presión selectiva ha actuado sobre estas moléculas (Boman 1991; 1995; Chisholm & Smith, 1995; Kawabata et al., 1996). Aunque en insectos estas moléculas pueden ser inducidas por infección, en la mayoría de otros grupos ellas parecen ser constitutivas (Boman, 1995; Schnapp et al. 1996; Charlet et al. 1996).

Estas cecropinas que han sido evolutivamente conservadas desde los invertebrados hasta los mamíferos, tienen una estrecha similitud con el fragmento activo de una catelicidina que





es un péptido antibacteriano de 6,5 kDa, que está presente en las células sanguíneas de *Carcinus maenas* (Schnapp et al., 1996).

Las defensinas descubiertas al principio de la década de los 80, fueron aisladas y posteriormente secuenciadas. Todas contienen entre 24 y 34 residuos de aminoácidos y actúan sobre una amplia variedad de bacterias gram - y gram +, y hongos (Lehrer et al., 1991). Este hecho produjo un gran adelanto en el dominio de las técnicas que han permitido caracterizar distintos grupo de moléculas con estas características (Findlay & Smith, 1995; Kim, 1994).

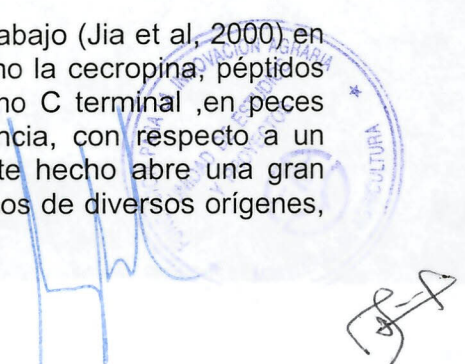
Los peces destacan dentro de los organismos marinos en los cuales se ha estudiado con mayor detalle la presencia y potencialidad funcional de péptidos antibacterianos (Cole et al., 1997). En este trabajo se resume las variantes de péptidos más significativos en este sistema. Las pardaxinas, de lenguados que se asemejan a proteínas funcionalmente equivalentes aisladas de carpas, las escualaminas, aisladas de una variedad de tiburón (dogfish shark) y las pleurocidinas, obtenidas de las secreciones de la piel del rodábalo (winter flounder).

En general en peces, los péptidos antimicrobianos se encuentran tanto en las células mieloides como en las mucosas, situación que es compartida por muchos organismos vertebrados e invertebrados. Se cree que péptidos se operan en una primera línea de defensa, ejerciendo una actividad de amplio espectro contra bacterias patógenas, hongos, virus con envoltura y microparásitos en general. En el caso del rodábalo (*Pleuronectes americanus*), la molécula caracterizada corresponde a un péptido lineal de 25 residuos, con conformación anfipática de alfa-hélice como muchos otros péptidos antimicrobianos (Cole et al., 1997). El péptido fue purificado por métodos de cromatografía líquida de alta presión y se demostró una fuerte actividad frente a *Escherichia coli* en ensayos en placa. Este péptido tiene una gran homología con otros dos péptidos antimicrobianos aislados de organismos muy diferentes desde el punto de vista filogenético, la ceratotoxina, de la mosca de la fruta Mediterránea, y de la dermaseptina, aislada de la piel de un anuro (Lehrer et al., 1999). Se ha determinado tanto la concentración mínima inhibitoria (C.M.I) como la concentración mínima bactericida (C.M.B) de al menos uno de éstos péptidos, la pleurocidina, frente a 11 diferentes bacterias tanto Gram- como Gram+ (revisadas en Modlin, R.L. et al., 1998).

En peces, en nuestro laboratorio se han obtenido resultados preliminares en relación al incremento de estos péptidos en órganos de salmónidos naturalmente infectados con *Piscirickettsia salmonis*, a diferencia de los controles no infectados, donde el nivel es significativamente menor (Marshall y Arenas, datos no publicados). En otros grupos de peces han sido caracterizados y localizados péptidos antimicrobianos con un amplio rango microbicida que actúan como primera línea de defensa en las mucosas (Coles & Pipe 1994). En trucha también han sido caracterizados (Smith et al., 2001).

- **Potencialidad de los péptidos antimicrobianos como fármacos alternativos a los antibióticos clásicos**

Es interesante hacer notar que recientemente se ha publicado un trabajo (Jia et al., 2000) en que se ha probado la eficiencia "in vivo" de péptidos ectópicos como la cecropina, péptidos híbridos de cecropina y metilina y péptidos modificados en extremo C terminal, en peces infectados con *Vibrio anguillarum*, demostrando la alta sobrevivencia, con respecto a un control, de aquellos ejemplares tratados con tales moléculas. Este hecho abre una gran perspectiva para intentar formar un banco de péptidos antibacterianos de diversos orígenes,



para ser probados aislados o sinérgicamente, en su capacidad antimicrobiana frente a diversas cepas patógenas causante de enfermedades tanto en invertebrados como de vertebrados y plantas, incluyendo aquellas que provocan patologías en el hombre.

- **Ventaja comparativa con otras moléculas**

Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido evolutivamente seleccionados, esto último se prueba al haber sido encontrados desde las plantas hasta los vertebrados. Los péptidos antibacterianos han sido bien caracterizados con respecto a su estructura bioquímica y su acción biológica, y han despertado gran interés en sus aplicaciones clínicas, como fuente de nuevas drogas en tratamientos infecciosos.

Su valor en la defensa inespecífica radica en su pequeño tamaño, entre 6 a 20 kDa, que hace que ellos sean sintetizados en tejidos muy simples o en células y que son muy difusibles a los sitios con heridas o infección. Más aún ellos actúan estequiométricamente más que catalíticamente y eso los hace poco tóxicos en las células eucarióticas. En los insectos al parecer aumentan con la infección, pero en la mayoría de otros grupos son constitutivos. Por otra parte su regulación intracelular no compromete cascadas enzimáticas. A esto se agrega el hecho que la síntesis química de péptidos de menos de 20 amino ácidos es en estos tiempos es un procedimiento de laboratorio rutinario.

Hay que destacar la información que existe de las mitilinas. Se ha logrado establecer que su concentración mínima de inhibición bacteriana (CIM) es 2 μ M, basándose en su bajo peso molecular se establece que esa molaridad se logra con cantidades en el orden de miligramos para 10⁶ litros. Además tiene una rápida actividad bactericida, en segundos altera la permeabilidad de la membrana de bacterias gram+ *in vitro*

Estas características, proyectan a los péptidos antimicrobianos como elementos importantes para inducir transformaciones genéticas en los moluscos para generar resistencia a las enfermedades provocadas por microorganismos.

La presencia natural de péptidos antibacterianos en organismos bivalvos no ha sido explorada como un mecanismo alternativo. Este además de ser de aplicación simple, es una alternativa natural novedosa para optimizar las tasas de sobre vida y de calidad del recurso en etapas tempranas de su desarrollo. Por otra parte, la potenciación de dicha alternativa de defensa, al provenir de un sistema endógeno, no supondría efectos negativos sobre el propio recurso y al mismo tiempo permitiría reemplazar el creciente nivel de contaminación que significa el uso indiscriminado de antibióticos en aguas naturales y su impacto mediato impredecible sobre la biota. Por otra parte el manejo dirigido de estas moléculas permitiría diseñar estrategias para exacerbar las respuestas inmunes y genéticas naturales de los distintos sistemas biológicos que se cultivan bajo condiciones controladas, para beneficio de la subsistencia de la alimentación humana.

- **Su aplicación en enfermedades de moluscos en cultivo**

Se sabe que las enfermedades causadas por microorganismos tienen efectos devastadores sobre los moluscos en cultivo, lo que puede producir problemas económicos serios. Las vacunas utilizando antígenos provenientes de organismos patógenos son inapropiadas para los invertebrados puesto que no producen inmunoglobulinas específicas y no tienen linfocitos. Es por esto, que es muy necesario encontrar vías de potenciación de otros aspectos de la defensa en moluscos que limiten sus pérdidas debido a enfermedades. En los invertebrados la inmunidad inespecífica juega un rol crucial en la protección contra la

acción microbiana, disponiendo los moluscos de una serie de repuestas defensivas celulares y humorales, y a la luz de los últimos conocimientos, los péptidos antibacterianos surgen como la respuesta inmunológica más atractiva frente al efecto nocivo de microorganismos en el ambiente marino. Estos péptidos de bajo peso molecular <10 kDa con propiedades antibacterianas han sido descritos desde hace más de 20 años en diferentes animales como insectos, crustaceos, ascidios y en vertebrados (revisión de Boman, 1995), sin embargo en moluscos han sido menos explorados, surgiendo este grupo como organismos con gran potencial en este aspecto ya que han empezado a ser descubiertos, descritos y purificados en el mejillón (*Mytilus edulis*), constituyendo una nueva familia de moléculas con semejanza a las defensinas purificadas de insectos frente a las cuales hay un gran optimismo farmacológico como nuevas drogas para combatir, en forma única o combinada infecciones incluso humanas (Charlet et al. 1996).

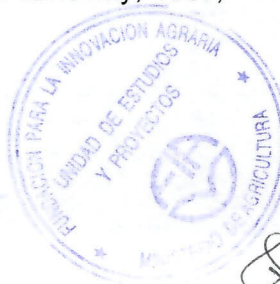
Péptidos antimicrobianos, un elemento importante en los mecanismos de defensa de las plantas terrestres.

Durante la evolución las plantas han desarrollado una variedad de sistemas de defensa para protegerse de potenciales patógenos, entre ellos pequeñas moléculas que inhiben el crecimiento microbiano. Ellas pueden ser inducidas por la activación de grupos de genes que codifican enzimas de vías sintéticas cuando ingresan los patógenos, o bien, pueden ser constitutivas (Smith, 1994; Osborn, 1996). En años recientes se ha demostrado que las defensinas juegan un importante rol en los sistemas de defensa de plantas (Broekaert et al 1995). Las defensinas de plantas son una familia de entre 45 a 54 aminoácidos, usualmente básicos que pueden inhibir el crecimiento de un amplio rango de hongos. Tienen un patrón tridimensional común estabilizado por 8 puentes disulfuros, lo que las relaciona con las defensinas antibacterianas y las drosomicinas, un péptido antifúngico, ambas purificadas de insectos. Estas moléculas inducen flujos iónicos a través de las membranas plasmáticas de la hifas de los hongos. A diferencia de lo que sucede en las defensinas de insectos y mamíferos no forman poros en membranas artificiales, ni cambian las propiedades eléctricas en bicapas lipídicas artificiales (Thevissen et al., 1999.)

Evidencias que justifican la búsqueda y la potenciación de péptidos como mecanismo de defensa en invertebrados marinos.

Se sabe que los invertebrados en general, que carecen de sistemas inmunes adaptativos, han diseñado sistemas de defensa que responden a antígenos comunes en la superficie de microorganismos potencialmente patógenos. La coagulación de la hemolinfa es uno de ellos en lo que se conoce como "*inmunidad innata*".

El descubrimiento de serina-proteasas sensibles a lipopolisacáridos y a (1-->3)-beta-D-glucanos en los hemocitos de una variedad de jaiba (horseshoe crab (*Limulus*), y su posterior demostración de ser responsables de desencadenar la cascada de coagulación, ejemplifica de manera significativa la manera como estos organismos detectan y responden a componentes foráneos. Por otra parte el hecho que los invertebrados constituyan más del 90% de todas las especies en la tierra, asegura la eficiencia y la necesidad de conocer más en detalle estos sistemas "primitivos" de defensa. (Klien, 1997; Medzhitzov & Janeway, 1997; Beck, 1998).

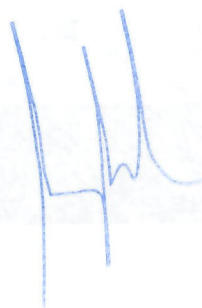


Evolución Molecular Dirigida: Nuevas técnicas para la bioingeniería de proteínas de alta funcionalidad y versatilidad.

En 1970 Miroslav Radman un genetista molecular, ahora en la Université René Descartes de París, Francia, asombró a l mundo científico con una propuesta inusitada: Que las bacterias poseían un programa genético para producir mutaciones, lo que les permitía adaptarse a situaciones extremas aumentando la frecuencia de mutación natural, ayudándolas así a acelerar su propia evolución.

Sin embargo ahora, 3 décadas más tarde, la información acumulada ha permitido la reivindicación del Dr Radman. Se han descubierto las enzimas que verdaderamente generan errores en forma premeditada (DNA Polymesasa IV), lo que la convierte en generadora de mutaciones (Chicurel, 2001). La idea principal detrás de esto es que los organismos, naturalmente, poseen de mecanismos que les permitan aceelera sus procesos evolutivos por exacerbación de su innata variabilidad genética, la que incluso se ha observado a nivel de eucariontes (Susan Rosenberg. 65th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. CSH. 2000. Presentación Oral).

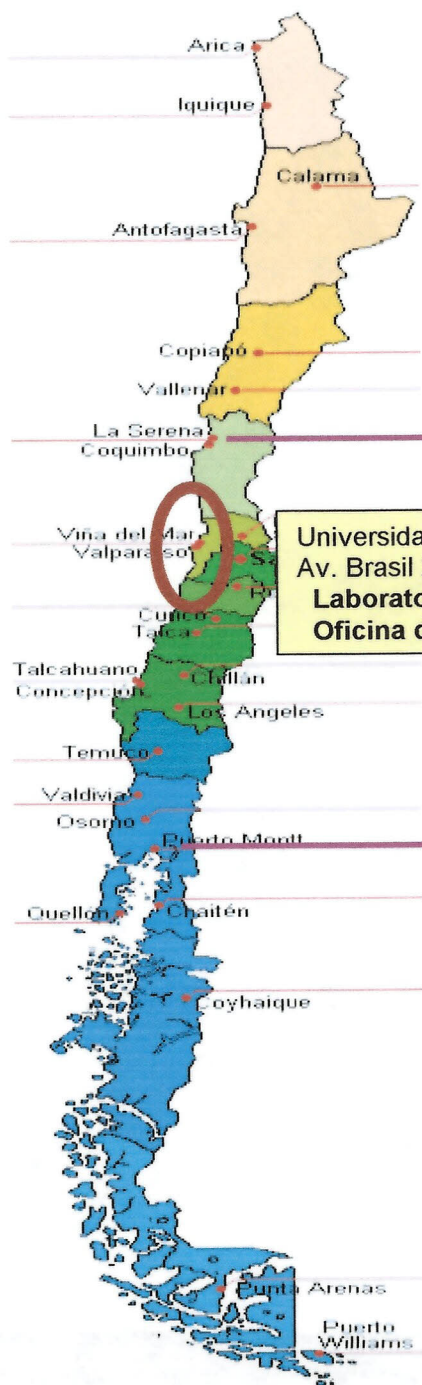
Si esto actividad tiene un sustento natural, con mayor razón se puede pensar en su manipución "in vitro" para una mejor direccionalidad, una mayor eficiencia, y un diseño "a medida" de los productos de evolución inducida. Así nació la tecnología del "DNA shuffling" que basada en la recombinación genética de bloques de secuencias, acoplada a la tecnología de la PCR o Reacción de polimerización en cadena usando polimerasas termoestables, se puede lograr en breves unidades de tiempo, grandes cantidades de recombinantes las que pueden ser seleccionadas por clonamiento (Stermer, 1994a; Stermer 1994b; Kuchner y Arnold, 1997; Shao et al., 1998).





7. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL PROYECTO

El proyecto se ejecutará en la Casa Central de la Universidad Católica de Valparaíso, específicamente en el Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular del Instituto de Biología, encontrándose en el mismo edificio, la Oficina de Transferencia Tecnológica, encargada de vincular el uso de los péptidos en las industrias de bienes de uso y de consumo.



Universidad Católica de Valparaíso
Av. Brasil 2950
Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular
Oficina de Transferencia Tecnológica

Actividades de Transferencia Tecnológica, con sector acuicultor de ostiones y ostras

Actividades de Transferencia Tecnológica, con sector salmonicultor.



8. OBJETIVOS DEL PROYECTO

8.1. GENERAL:

1. Generación biotecnológica de péptidos quiméricos a partir de péptidos antimicrobianos nativos de *Mytilus chilensis*
2. Caracterización, purificación y evaluación del efecto de péptidos quiméricos sobre patógenos asociados a recursos productivos acuícola y agrícola chilenos.

8.2. ESPECÍFICOS:

- 1.- "DNA shuffling" o recombinación genética inducida entre bloques de secuencias codificadoras de genes asociados a defensinas de *Mytilus chilensis*.
- 2.- "DNA shuffling" entre bloques de secuencias codificadoras de genes asociados a defensinas de M.ch. y un clon comercial de cecropina.
- 3.- Caracterización de las secuencias por DGGE y secuenciación.
- 4.- Clonamiento y expresión de los péptidos quiméricos en un sistema modelo.
- 5.- Purificación y caracterización de los péptidos quiméricos por cromatografía en fase reversa por HPLC
- 6.- Caracterización de los péptidos purificados en IEF y 2-D-PAGE.
- 7.- Comparación evaluativa "in vitro" del de péptidos nativos y quimericos sobre bacterias, hongos y virus asociados efecto y actividad específica a patogenias de interés acuícola y agrícola.
- 8.- Evaluación "in vitro" de la eventual toxicidad de péptidos quiméricos seleccionados.



9. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

9.1 Resumen del protocolo experimental

AÑO 1

- Selección de secuencias de defensinas de *Mytilus chilensis* (M.ch.)
- Selección de un clon de cecropina.
- DNA shuffling entre secuencias de defensinas de M.ch.
- DNA shuffling entre las secuencias de defensinas de M.ch. y de cecropina.
- Caracterización de secuencias quiméricas por DGGE
- Secuenciación de DNA y estimación de los eventuales cambios aminoacídicos.
- Selección y clonamiento de las secuencias quiméricas.
- Diseño y construcción de iniciadores para PCR que permitan recuperar los péptidos quiméricos.

AÑO 2

- Expresión de los clones como proteínas de fusión en un sistema comercial de alta eficiencia (PurePro *Caulobacter* Expression System-Invitrogen-USA).
- Purificación de los péptidos quiméricos expresados del sistema *Caulobacter*.
- Caracterización de los péptidos en fase reversa por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).
- Análisis de los péptidos recuperados en HPLC por isoelectroenfoque (IEF) y por electroforesis en geles de poliacrilamida denaturantes en dos dimensiones (2-D-PAGE).
- Evaluación "in vitro" de la actividad antimicrobiana por ensayos en microplacas

AÑO 3

- Evaluación "in vitro" de la potencial citotoxicidad de los péptidos quiméricos
- Selección de los péptidos quiméricos de mayor productividad, rango de acción y actividad específica.
- Evaluación de la acción de los péptidos seleccionados sobre otros agentes patógenos asociados a la acuicultura y agricultura nacional
- Preparación y purificación de uno de los péptidos seleccionados en cantidades pre-preparativas



9.2 Justificación y racionalidad del protocolo experimental propuesto

AÑO 1

- **Selección de secuencias de defensinas de *Mytilus chilensis* (M.ch.)**

Nuestro laboratorio ha podido caracterizar, en forma inédita, tres tipos de defensinas a nivel de secuencias genómicas de M.ch. (Marshall et al., datos no publicados). Para lograrlo, usamos como referencia las secuencias publicadas de dos tipos de defensinas del mitílido europeo *Mytilus galloprovincialis* (M.g.) (Mitta et al., 1999). La actividad antimicrobiana de las defensinas del mitílido local, demuestran ser tanto o más eficientes que las correspondientes al europeo (Arenas et al., datos no publicados). Esto asegura, primero, el acceso a secuencias inéditas de un organismo local y segundo, la eventual potenciación de su acción, vía la generación inducida de productos quiméricos por recombinación de secuencias de un mismo organismo.

- **Selección de un clon de cecropina.**

Dentro de los péptidos antimicrobianos descritos, las cecropinas tienen una alta eficiencia antimicrobiana. Aunque inicialmente aisladas de insectos, han sido encontrada en una amplia gama de organismos, incluyendo a los mamíferos, por lo que se deduce que sobre estas moléculas se ha ejercido una fuerte presión selectiva (Boman 1991; 1995; Chisholm & Smith, 1995; Kawabata et al., 1996). En insectos estas moléculas pueden ser inducidas por infección pero en la mayoría de otros grupos parecen ser constitutivas (Boman, 1995; Schnapp et al. 1996; Charlet et al. 1996). En consecuencia, su uso en la inducción evolutiva por DNA shuffling, puede contribuir a aumentar la diversidad de epítopes funcionales en los quiméricos que se generarán y como consecuencia una mayor actividad específica.

- **DNA shuffling entre secuencias de defensinas de *Mytilus chilensis*.**

Se ha dicho que la mejor manera de manipular el sistema inmune es usando la "sapiencia evolutiva" (Ibrahim y Gotch, 2000) donde el sistema inmune innato juega roles más y más reconocidos en la protección inmunológica (Fearon, 2000). Se sabe que el "DNA shuffling" funciona mejor mientras más homólogos sean los genes involucrados (Forthegill-Gilmore, 1999), existiendo incluso la posibilidad de predecir la generación de recombinantes en el proceso de DNA shuffling (Moore et al., 2001). Esta aproximación experimental usando los genes de las tres modalidades de defensinas de un mismo individuo nos asegura la obtención de recombinantes intraespecíficas.

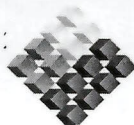
- **DNA shuffling entre las secuencias de *Mytilus chilensis* y de cecropina.**

En concordancia con el punto anterior, el alto grado de conservación evolutiva de las cecropinas, su alta actividad específica como agente antimicrobiano, el hecho de constituir una secuencia genética diferente con epítopes funcionales también diferentes, pero que cumplen una misma función, nos permite sospechar que podremos obtener mayor diversidad funcional, y por ello mayor actividad específica, al generar quimeras intergenómicas.

- **Caracterización de secuencias quiméricas por DGGE.**

En genética molecular, poder determinar mutaciones de una sola base es crucial. Aunque existen muchas técnicas electroforéticas para realizar estos catastros, la mayoría requiere la combinación de más de una técnica. La "Denaturant Gradient Gel Electrophoresis" (DGGE) es una de las aconsejables (Heath et al., 1999, 2000), ella permite detectar





secuencias pequeñas en un solo paso, lo que ocurre en el caso de las secuencias que codifican los péptidos antibacterianos, que no superan los 150 - 200 nucleótidos de largo (Dcode Universal Mutation System- BioRad US Bulletin 2100. BioRad Laboratories. USA), hecho comprobado y estandarizado en nuestro laboratorio.

- **Secuenciación de DNA y estimación de los eventuales cambios aminoacídicos.**

Las predicciones necesarias que nos permitirán proyectar la aplicabilidad de nuestras moléculas quiméricas se sostienen en los siguientes factores: a) Las facilidades de secuenciación existentes en el país a un bajo costo b) el acceso a bases de datos a los métodos de alineamiento de secuencias (CLUSTAL, Intelligenetics, Mountain View Ca. USA; ALIGN (Version 2) ; GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA ; TFASTA- Wisconsin Genetic Software Package-USA) c) la utilización de los software especializados (Sequencher - <http://www.genecodes.co>- Michigan, USA),

- **Selección y clonamiento de las secuencias quiméricas.**

Nuestra capacidad en éste campo ha sido exitosamente comprobada (Marshall, S.H., et al. 1998; 2001) , lo que respalda la posibilidad de poder tomar las decisiones adecuadas en esta propuesta.

- **Diseño y construcción de iniciadores para PCR que permitan recuperar los péptidos quiméricos.**

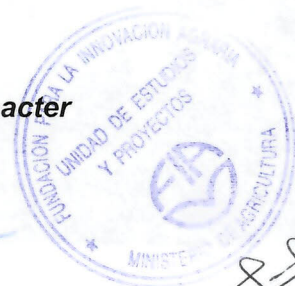
Expresar un péptido antibacteriano clonado en una bacteria y/o en cualquier otro sistema biológico puede, sin lugar a dudas, constituirse en un problema insalvable. Sin embargo, este no ha sido el caso, dado que los ya clonados han sido expresados tanto en levaduras (Destoumieux et al., 1999) como también en bacterias (De Bolle et al., 1995). Nuestra interpretación, es que el mecanismo de acción propuesto para estos péptidos es más "desde fuera" que "desde dentro" lo que podría justificar su carácter inocuo para los sistemas que los producen. Por otra parte se podría pensar que si es exportado al medio por qué no actúa. Para evitar que esto constituya un problema de orden práctico y para prevenir la mayor actividad específica que esperamos obtener en las quimeras, hemos decidido producirlos en forma de proteínas de fusión, para que luego que se externalicen del sistema productor y luego fraccionarlos de la proteína madre por proteólisis dirigida. Tomando en cuenta el hecho que los péptidos para funcionar como agentes antibacterianos requieren de una estructura secundaria y terciaria bien definida. Para ello, diseñaremos partidores para PCR que contengan la o las secuencias para poder incorporar al final del péptido una señal de corte proteolítico o de corte químico , por ejemplo, un codón de metionina para ser escindido por bromuro de cianógeno

AÑO 2

- **Expresión de los clones como proteínas de fusión en un sistema comercial de alta eficiencia (PurePro *Caulobacter* Expression System-Invitrogen-USA)**

El sistema seleccionado, de última generación, fue diseñado para la expresión eficiente, secreción y rápida purificación de proteínas recombinantes de tamaño medio a pequeño (menor de 450 aminoácidos) (Invitrogen. Catálogo 2001. Pag. 83), y su eficiencia ha sido científicamente comprobada (Bingle et al., 2000)

- **Purificación de los péptidos quiméricos expresados del sistema *Caulobacter***

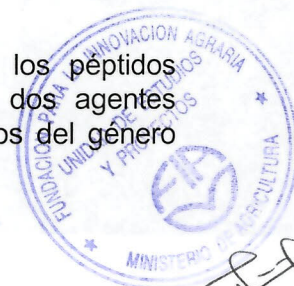


Caulobacter crescentus es una bacteria de fácil manejo que se encuentra en los ambientes acuáticos. Como parte de su ciclo de vida, ella secreta grandes cantidades de una proteína estructural hidrofílica conocida como RsaA (Bingle et al., 2000). El sistema de expresión comercial de BioRad, utiliza esta capacidad para formar una proteína híbrida RsaA-péptido (en este caso) para su recuperación en el medio de cultivo, a diferencia de otras bacterias exportadoras, como *E. coli*, que dejan el producto en el espacio periplásmico, generando una complicación adicional para su purificación. La proteína RsaA de 336 aminoácidos de largo con su péptido blanco fusionado forma agregados altamente hidratados, con un grado de pureza superior al 90%, lo que facilita su purificación simplemente filtrando el medio que la contiene por un tamiz de nylon. El agregado es fácilmente solubilizable para posterior uso y/o mayor purificación. El modelo es barato y de alta producción a diferencia de otras alternativas (Baculovirus).

- **Caracterización de los péptidos por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)**
Utilizaremos los procedimientos clásicos ya estandarizados en nuestro laboratorio para defensinas y cecropinas descritas en "Materiales y Métodos", respaldados por (Hubert et al., 1994)
- **Análisis de los péptidos por Isoelectroenfoque (IEF) y por electroforesis en geles de poliacrilamida denaturantes en dos dimensiones (2-D-PAGE) de los productos.**
Como una manera de ratificar la calidad genética estimada por la secuenciación de los correspondientes DNAs de las quimeras, se determinarán sus puntos isoeléctricos y sus pesos moleculares en geles de segunda dimensión denaturantes en Tris-Glicina 15 %. Adicionalmente, esta técnica nos permitirá evaluar por Western Blots la capacidad inmunogénica de los péptidos quiméricos, usando anticuerpos comerciales contra algunos péptidos naturales, lo que permitirá identificar los epítopes más relevantes de los mismos.
- **Evaluación "in vitro" de la actividad antimicrobiana de los péptidos quiméricos por ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano en microplacas.**
Utilizando los procedimientos estandarizados en nuestro laboratorio, se medirá la capacidad inhibitoria comparativa de los péptidos quiméricos frente a cecropinas y defensinas naturales calculando su CMI frente a cepas bacterianas patogénicas tipo tanto Gram positivas como Gram negativas.

AÑO 3

- **Evaluación "in vitro" de la potencial citotoxicidad de los péptidos quiméricos**
De todos los sistemas disponibles para evaluar citotoxicidad, hemos elegido el kit comercial "CAT-TOX/Liver Stress Gene Assay" de la firma Xenometrix Molecular Toxicology and Information Assays de USA. El procedimiento viene en un kit, de bajo costo, que permite evaluar usando células de hígado humanas en un plazo de 36 horas, la toxicidad de un producto blanco en concentraciones nanomolares. Se basa en la técnica de ELISA usando como indicadores 14 construcciones genéticas integradas a las células de hígado humano que aporta el kit, con el gen reportero CAT (Chloranphenicol Amino Acetil -Transferase).
- **Evaluación de la potencial acción inhibitoria de los péptidos seleccionados sobre otros agentes patógenos asociados a la acuicultura y agricultura nacional.**
Para determinar un eventual mayor rango de acción farmacológico de los péptidos quiméricos, se evaluará la capacidad inhibitoria de los mismos sobre dos agentes patógenos de salmónidos de alto impacto económico en Chile, y de hongos del género



Botritis de alta incidencia en la agricultura del Chile central. En el caso de los salmonídeos, se evaluará la capacidad infectiva de la bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis* (P.s.), o bien del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV sobre la línea celular de riñón de trucha CHSE 214. Para el caso de los hongos, se evaluará la inhibición del crecimiento de cepas tipo disponibles en el INIA – Santiago.

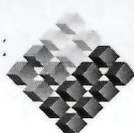
- **Selección de los péptidos quiméricos de mayor productividad, rango de acción y actividad específica.**

Se hará una crítica selección de los péptidos basados en sus respuestas inhibitorias frente a las cepas bacterianas indicadoras, su citotoxicidad y/o su capacidad inhibitoria frente a otros agentes patógenos analizados.

- **Preparación y purificación de un péptido seleccionado en condiciones pre-preparativas.**

Como una manera de evaluar el escalamiento productivo, se llevará el cultivo de uno de los péptidos en el sistema Caulobacter a nivel de cultivo batch de cinco litros.





9.3 Metodología y Procedimientos (descritos con más detalle).

- ❖ Obtención de secuencias codificadoras de defensinas de *Mytilus chilensis*. Utilizaremos los procedimientos estandarizados en nuestra laboratorio para hacer "reversed genetics" (Marshall, Orrego y Arenas, datos no publicados) que consiste fundamentalmente en lo siguiente:

1.- Diseño de iniciadores degenerados para M.ch. basados en las secuencias de defensinas de *Mytilus galloprovincialis*

Se diseñaron y sintetizaron cuatro cebadores (iniciadores) en la dirección "adelante" y dos en la dirección "atrás", para ambas hebras del DNA blanco:

Usando de referencia la secuencia de *Mytilus galloprovincialis*:

ACTGCTGGGTTTGGCTGTCCAAACAATTAT
ACTGCTGGGTTTGGCTGTCCAAACAATTAT
ACTGCTGGGTTTGGCTGTCCAAACAATTAT

T A G F G C P N N Y

Basados en los "motifs" de aminoácidos:

dirección "adelante":

AMINOACIDOS	INICIADOR	DEGENERACION
GFGCPNNY	SEN-A GGTTTGGCTGTCCAAACAATTA A C T T C T C	23/72
TAGFGCPN	SEN-B CTGCTGGGTTTGGCTGTCCAAA C C A C T T C	22/72
TAGFGCP	SEN-C ACTGCTGGGTTTGGCTGTCC A C A C C T T G	20/64
TAGFGCP	SEN-D ACTGCTGGGTTTGGCTG C A C A A C T T G	17/96







Usando de referencia la secuencia de *Mytilus galloprovincialis*:

AGATTGAGGTGCACATGCTATAGATGCGGC
AGATTGAGGTGCACATGCTATAGATGCGGC
AGATTGAGGTGCACATGCTATAGATGCGGC

R L R C T C Y R C G

Basados en los "motifs" de aminoácidos:

dirección "atrás":

AMINOACIDOS INICIADOR DEGENERACION

RCTCYRCG

ANT-A

GGTGCACATGCTATAGATGCGGC

T T G T C

C T

A C

23/128

CTCYRCG

ANT-B

GCACATGCTATAGATGCGGC

T G T CC T

T

C

20/128

2.- Procedimiento estandarizado para amplificación por PCR de secuencias tipo defensinas del genoma de M.ch. usando cebadores degenerados *ad hoc*.

DNA genómico purificado a integridad (Revisados en Rapley et al., 1999) del músculo abductor de M.ch. en reacciones triplicadas conteniendo 50 nanogramos de DNA total por reacción de un volumen final de 12.5 microlitros. Se utilizó 1.0 micro molar de iniciadores por reacción, en una concentración final de 2.5 micromolar de Magnesio, 1.25 micromolar de cada uno de los 4 dNTPs, y 0.025 Unidades por microlitro de Taq Gold polimerasa (Promega) con el siguiente protocolo experimental para la amplificación:

95°C	17 min	1 ciclo	Activación de la Taq Gold
95°C	30 sec		Asociación secuencias a bajo rigor
45°C	30 sec		
72°C	15 sec	3 ciclos	Producto de 124 pares de bases
95°C	30 sec		Asociación secuencias a alto rigor
53°C	30 sec		
72°C	15 sec	30 ciclos	
72°C	4 min	1 ciclo	Extensión final.
10°C	99 horas		

Los productos de amplificación se caracterizan mediante electrofóresis en geles de agarosa neutros (1.2%) en buffer TBE pH 8.3.

❖ Obtención de Secuencias Codificadoras de cecropina de *Bombix mori*

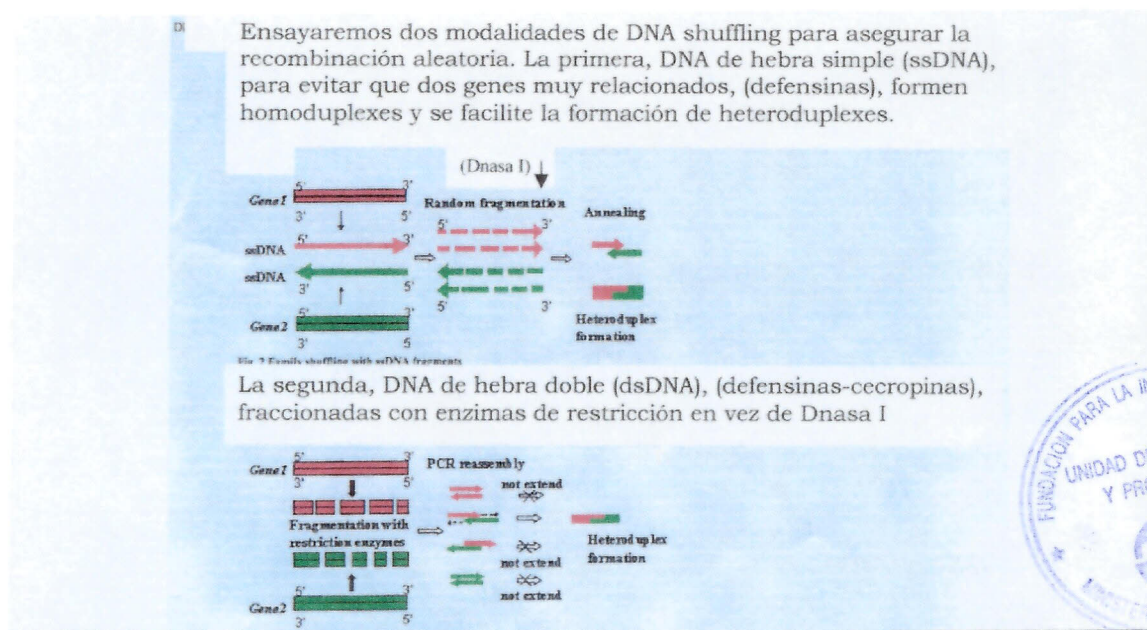




Hemos iniciado contactos con el Laboratorio del Dr Hak R. Kim, del Departamento de Biología de la Universidad de Corea del Sur, en Seul, para conseguirmos todos sus cDNA de cecropinas que lo llevaron a la publicación comparativa de los mismos (Chung et al., 1999).

“DNA shuffling” o recombinación genética inducida entre bloques de secuencias codificadoras de genes asociados a defensinas de M.ch) y “DNA shuffling” entre bloques de secuencias codificadoras de genes asociados a defensinas de M.ch. y un clon comercial de cecropina.

Adaptaremos, en lo que sea necesario, los procedimientos y protocolos establecidos ya en nuestro poder (Moore et al., 2001; Iland et al., 2000; Fothergill-Gillmore, 1999; Cramer et al., 1998; Stermer, 1994a; Stermer, 1994b).



Caracterización de las secuencias por DGGE y secuenciación.

Las secuencias a analizar se someten inicialmente al software Winmelt de BioRad (Trade Mark) para analizar su perfil de denaturación con helicidad fijada al 50%, dado que se debe agregar una secuencia rica en G-C (GC-clamp) como un dominio de alta resistencia a la denaturación como marcador, en cualquiera de los extremos terminales de la molécula, para poder hacer la caracterización por DGGE. Se procede a realizar la amplificación por PCR normal bajo condiciones ya estandarizadas en el laboratorio, por exposición a los iniciadores específicos. Una vez realizada la reacción de amplificación, se realiza una dilución de 1:200 para usarla como sustrato en la reacción de amplificación para generar los GC-clamps. Usando las mismas condiciones de amplificación, y los iniciadores modificados conteniendo el GC adicional para poder generar los “clamps” correspondientes. La precaución que se debe tomar es subir la temperatura de denaturación acorde al tamaño de la secuencia GC adicional, para poder asegurar la formación de hebra simple, sin enlaces intramoleculares de los G-C y favorecer su amplificación. Se reconfirma la formación del amplicón modificado por electroforesis en gel de acrilamida.

La caracterización por DGGE será en geles de gradiente 6% acrilamida, 10-40% de denaturantes (Urea) con el equipo ad hoc bajo condiciones optimizadas en nuestro laboratorio (Heath et al., 1999; 2000). El gel se corre a 165 Volts por 3.5 horas a 56°C. (La temperatura de corrida es una variable a manejar dependiendo de las quimeras). Se tiñe con Bromuro de Etidio y se analiza bajo el sistema GelDoc (BioRad). Las alternativas descritas en las dos referencias anteriores, permitirán versatilizar la caracterización por DGGE de las diferentes secuencias quiméricas obtenidas.

Clonamiento y expresión de los péptidos quiméricos en un sistema modelo.

El kit comercial "PurePro Caulobacter Expression System" permite una alta expresión, eficiente secreción y rápida purificación de proteínas recombinantes en *Caulobacter crescentus*. El vector pXTOPO, codifica una proteína defusión carboxiterminal de 336 aminoácidos de la proteína naturalmente exportable del agente llamada RsaA, que facilita y dirige la secreción de la proteína de fusión al medio externo. Más aún, la fusión RsaA-X facilita la formación de agregados de la proteína híbrida, lo que facilita su purificación y evita el contacto, en nuestro caso, con las bacterias por si el efecto antibacteriano se pudiese hacer evidente sobre las bacterias madres. El vector pCX-Topo tiene en fase con el ORF deseado, el promotor de fuerte de LAC, constitutivo en *Caulobacter*, la fusión C-terminal para secreción eficiente, y dos orígenes de replicación para mantención tanto en *E. coli*, como en *Caulobacter*.

Diseño y construcción de iniciadores para PCR que permitan recuperar los péptidos quiméricos.

Se aplicará la metodología descrita para los péptidos nativos.

Purificación y caracterización de los péptidos quiméricos en fase reversa por HPLC.

Todos los pasos de purificación de HPLC serán realizados en un sistema LaChrom HPLC (Modelo D-7000, Merck) equipado con un detector de arreglo de diodo LaChrom (Modelo L-7455, Merck) y con una bomba LaChrom (Modelo L-7120, Merck). El fluente de la columna será monitoreado por absorción UV a una longitud de onda de 225 nm.

Paso 1. Alícuotas de 1ml de la elución activa de 40% de acetonitrilo de la fracción Sep-pak C-18 serán sometidas a la fase inversa de HPLC, en una columna Sephasil C-18 (250 x 4,1 mm). La elución será llevada a cabo con un gradiente lineal de 5-55% de acetonitrilo en agua acidificada por más de 90 minutos, con un flujo de 0,9 ml/ min. Las fracciones correspondientes a los máximos de absorción serán colectados en tubos de polipropileno, secados en fío y reconstituidos en 0,2 ml de UPW, y probados para la actividad antibacteriana.

Paso 2. Las fracciones activas serán posteriormente cargadas en una columna Sephasil C-18 y la elución se realizará con un gradiente lineal de 20-30% de acetonitrilo en agua acidificada por más de 40 min a un flujo de 0,9 ml/min. Las fracciones serán colectadas en tubos de polipropileno, secados en fío y reconstituidos en 0,2 ml de UPW, y probados para la actividad antibacteriana.

Paso 3. Los péptidos serán purificados en la misma columna de la fase inversa del Paso 1 (Sephasil C-18), usando el gradiente lineal de 20-30% de acetonitrilo en agua acidificada por más de 40 min a un flujo de 0,9 ml/min.



Paso 4. Para verificar la pureza de los péptidos que se obtendrán en el paso anterior, se llevará a cabo un paso adicional. En una columna C-18 de fase reversa más pequeña (150 x 2 mm) se eluirán a un flujo de 0,3 ml/min usando un gradiente lineal de 20-30% de acetonitrilo en agua acidificada por más de 40 min.

Los péptidos quiméricos serán rescatados del medio de cultivo y se concentrarán inicialmente en microfiltros (Ultrafree MC, Millipore) por centrifugación (exclusión por peso molecular en un rango de 3 a 10 kDa). Posteriormente se aplicarán a cromatografías en fase sólida (CFS) que separan por hidrofobicidad, utilizando columnas Sep-Pack C8 y C18 antes de llevarlos a cromatografía en fase reversa (HPLC) siguiendo los protocolos clásicos para defensinas de mitílicos (Mitta et al., 1999a; Mitta et al., 1999b) y cecropinas de insectos (Boman 1991).

Con el fin de determinar los pesos moleculares de los péptidos obtenidos en cada uno de los pasos de purificación las muestras se llevarán a electroforesis en geles de Tris-tricina para detectar péptidos de bajo peso molecular (Schägger & Von Jagow, 1987). Se usarán marcadores estándares de pesos moleculares de 1 a 45 kDa (Sigma). Los geles serán teñidos con Azul de Comassie y dispuestos en la placa convertidora de luz blanca en el equipo Gel Doc 1000 conectado al programa computacional Molecular Analysis para calcular los pesos moleculares de los péptidos en base a su Rf.

Evaluación "in vitro" del efecto y actividad específica de péptidos nativos y quiméricos sobre bacterias, hongos y virus asociados a patogenicidades de interés acuícola y agrícola.

La actividad antibacteriana de las muestras siempre se evaluará con ensayos de turbidez en microplacas sobre el crecimiento bacteriano cuantificado en un lector de microplacas. Con respecto a los ensayos de actividad antifúngica, los hongos patógenos seleccionados se harán crecer en placas de agar dextrosa de papa a 28 °C hasta que los diámetros de las colonias tengan al rededor de 3 cms. (Liu et al., 2000)

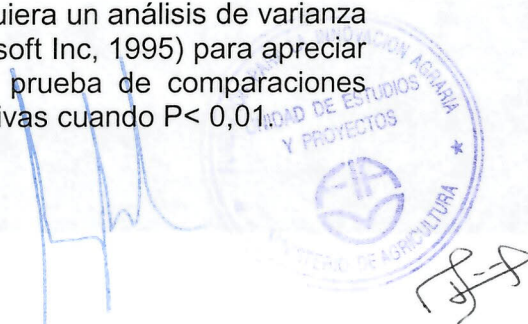
1.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.)

Los valores de C.M.I. serán expresados como un intervalo de (a - b) donde a representa la concentración más alta probada de péptidos en la cuál la bacteria todavía crece y b la concentración más baja que causa el 100% de inhibición. Alícuotas de 10 µl se incubarán a distintos tiempos a 25°C y se plaquearán en agar. El número de colonias formadas se contarán después de una incubación a 37°C durante toda la noche. Como control se usarán 10 µl de agua (Charlet et al. 1996).

2.- Ensayos de la capacidad antibacteriana de péptidos por turbidez en microplacas

Durante los diferentes pasos de la purificación de los péptidos, la actividad antibacteriana será monitoreada en ensayos de inhibición de crecimiento en líquido sobre *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* y *Escherichia coli* D31, las cuales previamente serán incubadas en suspensión a 37 °C y utilizadas para la experimentación al cabo de 18 horas de crecimiento (fase exponencial). Los ensayos de la capacidad antibacteriana de péptidos se mediran en turbidez en microplacas a las 24 horas, leyendo en un lector de microplaca (Multiskan MS) a 620 nm .

Análisis estadístico. En todos los resultados en los cuales se requiera un análisis de varianza (ANDEVA) se utilizará el programa estadístico STATISTICA (Stasoft Inc, 1995) para apreciar diferencias en los tratamientos. Posteriormente se aplicará la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las diferencias serán consideradas significativas cuando $P < 0,01$.



Evaluación "in vitro" de la eventual toxicidad de péptidos quiméricos seleccionados. Se ocupará la misma tecnología utilizada para los péptidos nativos.





10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO

2002

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
1.	1.1 Selección de secuencias de defensinas de <i>Mytilus chilensis</i> .	Aislamiento y caracterización de las secuencias nucleotídicas para defensinas de <i>M. chilensis</i>	7/1/02	30/3/02
1.	1.2	Caracterización de las secuencias peptídicas de las defensinas de <i>M. chilensis</i>	7/1/02	30/3/02
2.	2.1 Selección de un clon de cecropina	A partir de la información publicada obtener secuencia nucleotídica de cecropina	7/1/02	30/3/02
2.	2.2 DNA Shuffling de las secuencias de <i>M. Chilensis</i>	Construcción de secuencias quimeras de <i>M. chilensis</i>	4/3/02	30/4/02
2.	2.3 DNA Shuffling de las secuencias de <i>M. Chilensis</i> y cecropina	Construcción de secuencias quimeras de <i>M. Chilensis</i> y cecropina	4/3/02	30/4/02
3.	3.1 Caracterización de la (o las) secuencia (s) quimérica (s) mediante DGGE	Caracterización de la (o las) secuencia (s) quimérica (s) mediante DGGE	4/3/02	31/5/02
3.	3.2	Caracterización de la secuencia quimérica mediante secuenciación nucleotídica de DNA	4/3/02	31/5/02
3	3.3	Estimación de eventuales cambios aminoacídicos de la secuencia quimera	4/3/02	31/5/02
4.	4.1 Clonaje de las secuencias quiméricas	Clonaje de las secuencias quiméricas en sistema modelo	2/5/02	31/6/02
4.	4.2 Diseño de partidores para el rescate de la quimera	Secuenciación de DNA estimación de eventuales cambios aminoacídicos.	2/5/02	31/6/02
4.	4.3 Expresión de péptido quimérico	Expresión de clones como proteínas de fusión en sistema de alta eficiencia	2/5/02	31/10/02
4.	4.4	Purificación de péptido quimérico desde el sistema de expresión (caulobacter) como proteína de fusión.	2/5/02	31/10/02 HITO: péptido quimera caracterizado molecularmente y expresado



STRESS GENE ASSAY FOR INFORMATIVE, SENSITIVE, LOW-COST TOXICITY ASSESSMENT

**CAT-TOX/LIVER IS THE NEW
MOLECULAR TOXICOLOGY
SCREENING TOOL...**

**FOR FAST, MORE INFORMATIVE
CYTOTOXIC & MOLECULAR
CELL STRESS ANALYSIS.**

- **FAST AND EASY TO USE—
FINAL RESULTS WITHIN 36 HOURS**
- **CAT-ELISA SENSITIVITY DETECTS &
QUANTITATES TOXICITY AT NANOMOLAR
TEST ARTICLE CONCENTRATIONS**
- **PROVIDES A BETTER UNDERSTANDING
OF THE MOLECULAR MECHANISMS OF
TOXICITY USING TRANSFORMED HUMAN
LIVER CELLS**
- **LOW COST SYSTEM OFFERS SIGNIFICANT
SAVINGS IN MATERIALS, LABOR & TIME**

THE CELL STRESS SCREENING TOOL YOU'VE BEEN WAITING FOR

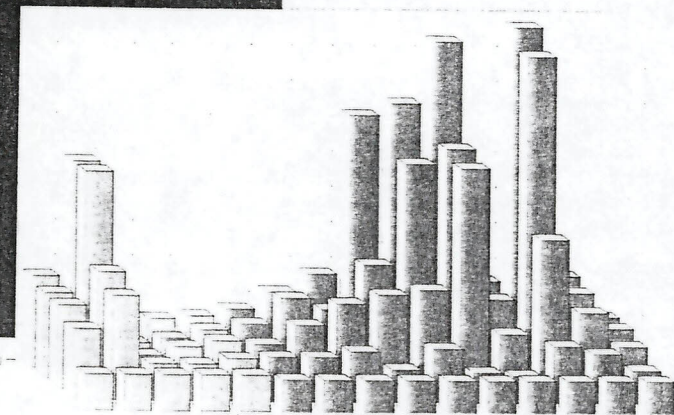
CAT-TOX is a key element of the unique Xenometrix Stress Gene Assay System. This low-cost technique identifies and objectively quantifies the specific genetic responses induced within human cells upon exposure to test articles. Provided in kit form, the CAT-TOX assay is a fast, easy and cost-effective way to obtain information regarding the molecular nature of toxic damage.

THE COMPLETE SCREENING APPROACH WITH FAST RESULTS

Measuring responses to a given compound has traditionally been labor-intensive, time-consuming and expensive. The Xenometrix CAT-TOX stress gene assay provides human liver cells containing 14 unique, stably-integrated CAT-fusion constructs, pre-dispensed and ready to use in a 96-well microtiter plate. ELISA detection gives you results *within one to two days*.

INTEGRATED INTO THE XENOMATRIX™ DATABASE

As a stand-alone tool for new drug development or chemical toxicity testing, the CAT-TOX stress gene assay kit is a valuable addition to your laboratory. Using Xenometrix's three-dimensional graphic software system — the XenoMatrix™ — it becomes even more valuable.



The XenoMatrix™

Data obtained in any one of Xenometrix's battery of toxicology assays can be displayed and examined in the form of a three-dimensional XenoMatrix™. Proprietary Windows® software rapidly collates and transforms assay data into a response "fingerprint" or "profile". XenoMatrixes permit quick compound-to-compound comparisons.

XENOMETRIX





10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2003

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
5.	5.1 Caracterización cromatográfica del péptido quimera	Caracterización cromatográfica en fase reversa por HPLC del péptido quimera.	1/8/02	28/06/03
6.	6.1	Caracterización Electroforética de péptidos quimeras en geles bidimensionales de policrilamida por y por isoelectroenfoque	1/8/02	30/3/03
7.	7.1 Evaluación <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana	Ensayos <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana en microplaca.	1/8/02	30/3/03 HITO: péptido quimera con actividad antimicrobiana caracterizado por HPLC-PAGE e IEF
7.	7.2 Evaluación de la citotoxicidad	Evaluación <i>in vitro</i> de la potencial citotoxicidad de los péptidos quimeras.	2/1/03	3/6/03
7.	7.3 Selección de péptidos quiméricos más eficientes	Selección de péptidos quiméricos con la mayor productividad, rango de acción y actividad específica.	2/1/03	30/6/03
8.	8.1 Evaluación de péptidos sobre patógenos acuícolas	Evaluación de la acción de los péptidos seleccionados sobre otros agentes patógenos asociados a la acuicultura.	1/3/03	30/12/03 HITO: péptido quimera con alta actividad antimicrobiana y patógenos acuícolas y baja citotoxicidad



9.	9.1 Preparación en gran escala de péptido seleccionado	Preparación y purificación en cantidades de un péptido seleccionado.	1/4/03	30/12/03
9.	9.2 Estudios de mercado	Estudio de mercado de empleo de los péptidos descubiertos.	1/6/03	30/12/03
	9.3 Modelo de comercialización.	Modelo eventual de comercialización de los péptidos (licencia de patente, formación empresa biotecnológica, producción y comercialización compartida).	1/8/03	28/2/04





11. RESULTADOS ESPERADOS E INDICADORES

11.1. Resultados esperados por objetivo

Obj. Esp. Nº	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
				Meta	Plazo
1.	Procedimiento de laboratorio para obtener secuencias	Obtención de secuencias	Continuar con aislamiento y purificación de secuencia	Proceso ajustado	30/3/02
2.	Procedimiento de laboratorio para obtener secuencias	Obtención de secuencias	Continuar con aislamiento y purificación de secuencia	Proceso ajustado	30/3/02
3.	Caracterizar y secuenciar péptidos	Secuencia caracterizada.	Caracterizar péptido químico	Una secuencia	31/5/02
4.	Péptido quimérico expresado en sistema modelo	Un modelo de expresión para el péptido	Expresar péptido para posterior producción piloto	Un sistema modelo	31/10/02
5.	Péptido purificado	Un péptido	Caracterizar el péptido	Purificación y un péptido	30/3/03
6.	Péptido purificado, caracterizado	Un péptido	Disponer de un péptido antimicrobiano	Un péptido caracterizado	30/3/03
7.	Un péptido <i>Mytilus chilensis</i> con comprobada capacidad antimicrobiana específica	Un péptido	Disponer un péptido comercial	Identificar péptido más activo	30/6/03
8.	Péptido evaluado toxicológicamente	Un péptido	Péptido aplicado como fármaco en especies animales	Péptido comercial	30/12/03





11.2. Resultados esperados por actividad

Obj. Esp. Nº	Activid. Nº	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
					Meta	Plazo
1	1.1-1.2	Defensinas seleccionadas	Número de defen- sinas	4 defensinas	Dos defensi- nas	30/3/02
2	2.1	Clon de cecropina	Número clon	Un clon	Un clon	30/3/02
1	1.3	Defensinas de <i>Mytilus chilensis</i>	Defensinas	Una defensina	Una defen- sina	30/4/02
2.	2.2	Defensinas de <i>Mytilus chilensis</i> y cecropina	Defensinas	Una defensina	Una defen- sina	30/04/02
3.	3.1	Caracterización de secuencias por DGE	Secuencia nucleotí- dica	Tres secuencias	Una secuen- cia	31/5/02
3.	3.2-3.3	DNA secuenciado. Estimación de cambios aminoacídicos	Secuencia Aminoaci- dica	Tres secuencias	Una secuen- cia	31/5/02
4.	4.1	Secuencias clonadas	Secuencia clonada	Tres secuencias	Una secuencia	31/6/02
4.	4.2	Diseño de recuperación de péptido quimérico	Diseño construido	Un diseño	Un diseño	31/6/02
4.	4.3-4.4	Péptido quimérico expresado	Expresión del péptido	Un péptido	Un péptido	31/10/02
5.	5.1	Péptido purificado y caracterizado por HPLC	Actividad antimicro- biana	90% de actividad	50% de actividad	31/3/03
6.	6.1	Péptidos caracterizados por PAGE eIEF	Actividad antimicro- biana	90% de actividad	50% de activi- dad	31/03/03
7.	7.1	Péptido con capacidad antimicrobiana en microplaca comprobada.	Actividad antimicro- biana	95% de actividad	90% de actividad	31/3/03
7.	7.2-7.3	Selección del péptido con mayor actividad antimicrobiana y baja citotoxicidad para ensayo comercial.	Actividad antimicro- biana y citotoxi- cidad	95% de actividad y citotoxicidad baja	90% de actividad y citotoxi- cidad baja	30/6/03
8.	8.1	Identificación de bacterias y virus patógenos que afectan mortalmente a salmónidos, cuya letalidad es inhibida por el péptido descubierto	Bacterias y virus inhibidos	Inhibición de tres microorganismos predominantes en salmonicultura	Tres microor- ganismos	30/12/03



12. IMPACTO DEL PROYECTO

12.1. Económico

Para evaluar el impacto que puede tener el descubrimiento de péptidos antimicrobianos que puedan ser utilizados como producto farmacéutico para tratar enfermedades causadas por patógenos letales, se puede tomar como referencia la salmonicultura chilena que es la segunda en importancia a nivel mundial, después de Noruega. La industria salmonera chilena tiene pérdidas anuales por 80 a 100 millones de dólares, debido a mortandad causada por el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), y la bacteria *Piscirickettsia salmonis*. El uso de antibióticos en esta industria, origina elevados costos para tratar las enfermedades sin lograr seguridad en el objetivo de evitar la mortalidad de los peces. Si se dispone de un péptido que inhiba en forma específica a estos patógenos, con una eficacia del 95% por ej., y tener la forma de suministrarlo en los organismos con acción permanente, puede transformarse en una solución para la industria valorizada en los millones de dólares en que actualmente incurren en la salmonicultura. Pueden resultar estos péptidos una opción muy competitiva con las vacunas recombinantes que actualmente se intentan incorporar a la salmonicultura, con el objeto de disminuir estas mermas.

Si resultara una solución para la salmonicultura, significa que en el plazo de siete años la industria salmonera ahorra 2,3 mil millones de dólares, es decir, dos exportaciones anuales completas.

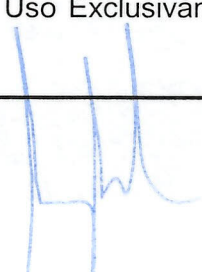
El reciente surgimiento de la aplicación de los péptidos, dado que sólo se obtienen al disponer de técnicas biotecnológicas de última generación, permite visualizar que las posibilidades pueden ser amplias, considerando el éxito que algunos de estos compuestos ya patentados y comercializados tienen en el mercado.

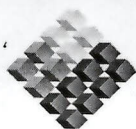
12.2. Social

La utilización de estos péptidos en cualquiera de las industrias donde sea posible aplicarlas, generará una mayor competitividad de los sectores productivos nacionales. Si se considera solamente la salmonicultura, implicará que su desarrollo con proyecciones de triplicar la producción al 2010, tendrá mayor receptividad al generar plazas laborales. Además, Chile se posiciona como líder o a nivel muy competitivo en el contexto mundial en el campo de la biotecnología, por lo que sus científicos, centros de investigación, laboratorios de investigación serán más cotizados y potenciarán la demanda de sus servicios profesionales, lo que llevará a generar trabajos para este segmento.

12.3. Otros (legal, gestión, administración, organizacionales, etc.)

El uso de los péptidos con fines farmacéuticos de uso veterinario estarán reglamentados, al igual que otro producto que necesita de un registro de productos farmacéuticos, por ej. en animales de la acuicultura. La normativa que en este caso afecta, es la Ley 19.283, la cual modifica la ley 18.755, Orgánica del Servicio Agrícola y Ganadero; Decreto N° 139, del Ministerio de Agricultura "Reglamento de Productos Farmacéuticos de Uso Exclusivamente Veterinario" (ver Anexo F.3).





También afecta la Resolución N° 724 del Ministerio de Economía del 01.12.97, por la cual se aprueba el Convenio de Cooperación Institucional entre el SAG y SERNAPESCA, en el ámbito de los productos farmacéuticos de uso exclusivamente veterinario de uso acuícola; D.S. N° 430/91 Ley General de Pesca y Acuicultura; D.F.L N° 1, Ley N° 18.892, de 1992: modifica la estructura orgánica de la Subsecretaría de Pesca y de SERNAPESCA.

El registro de un producto farmacéutico de uso exclusivamente veterinario, corresponde a la incorporación del mismo en un rol oficial de productos para uso en animales, que mantiene el Servicio Agrícola y Ganadero. Las solicitudes pueden ser aceptadas o rechazadas dependiendo si cumplen con los requisitos de inocuidad, efectos secundarios y especificidad.



13. EFECTOS AMBIENTALES

13.1. Descripción (tipo de efecto y grado)

El origen natural de los péptidos y su efecto no acumulativo ni contaminante, permite que pueda ser utilizado en la industria sin agregar efectos colaterales indeseados. Además, se realizarán pruebas de eventuales toxicidades de los péptidos, de manera que los productos seleccionados para fines industriales, estarán liberados de esta propiedad indeseada.

13.2. Acciones propuestas

Los péptidos serán evaluados en cuanto a posible toxicidad, antes de ser seleccionados para fines de uso en alguna industria en que se detecte de utilidad.

13.3. Sistemas de seguimiento (efecto e indicadores)

Las pruebas se realizan in vitro con la metodología de laboratorio descrita en "Metodologías y procedimientos".



16. ANÁLISIS ECONÓMICO DEL PROYECTO

16.1. Criterios y supuestos utilizados en el análisis

Indicar criterios y supuestos utilizados en el cálculo de ingresos (entradas) y costos (salidas) del proyecto

Análisis económico del proyecto

La evaluación económica del proyecto, se realiza considerando como referencia la instalación de una empresa biotecnológica que producirá y comercializará un nuevo producto farmacéutico formulado con el péptido descubierto. Se plantea que este medicamento previene muertes causadas por patógenos en los salmones de cultivo, tales como bacterias y virus patógenos: *Piscirickettsia salmonis* y Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) por ejemplo, que actualmente son responsables de mortandades anuales del 28% de los peces, originando pérdidas económicas entre US\$70 y US\$100 millones cada año.

Al disponer de una solución definitiva para evitar la mortalidad de peces a través del uso de péptidos antimicrobianos de acción específica para los microorganismos identificados, la industria salmonera generaría por ahorro, flujos marginales adicionales de \$2,3 mil millones de dólares en el plazo de siete años, es decir, más de dos exportaciones actuales completas. En el año 2001, se espera que la industria produzca 236.000 toneladas de salmónidos, exportando US\$1.180 millones. En el plazo de 10 años, Chile triplicará esta producción, llegando a 613.000 toneladas en el 2010, generando en ese año más de \$3.000 millones de dólares.

Estas sobresalientes producciones de salmones demandan grandes cantidades de medicamentos. Estos podrían corresponder a dosis inyectables del péptido inmunogénico para suministrar individualmente a los peces, tipo de fármaco que se busca descubrir en este proyecto de desarrollo e innovación biotecnológica. Suponiendo como cierto este resultado final del proyecto, debe considerarse que para las producciones de salmónidos el año 2006, se requerirán 186 millones de peces smolts que deberán ser tratados con el medicamento; 206 millones el 2007, hasta requerirse 284 millones en el año 2011. Estas cantidades de unidades corresponden a la demanda potencial que generaría la industria salmonera chilena para el fármaco peptídico. Sin embargo, se considera que la adopción de la tecnología por parte de la industria es gradual, sin superar el 65% en el año 2011.

En base a estos antecedentes se analiza económicamente el proyecto, para proyectar su factibilidad en el corto, mediano y largo plazo. Considerando antecedentes económicos de compañías farmacéuticas que comercializan productos a la industria salmonera, el negocio funcionaría invirtiendo en Chile US\$5 millones en una planta que sea competitiva y de calidad mundial. Una iniciativa de este tipo, resulta altamente rentable considerando un escenario conservador de ventas del producto. Genera un Valor Actual Neto de \$1.213 millones y una Tasa Interna de Retorno del 22%, valor creíble si se compara con la rentabilidad de la industria farmacéutica donde se registran rentabilidades que bordean el 20%-25%.



Horizonte de evaluación

7 años

Inversión

Para realizar el negocio con el medicamento peptídico utilizándolo comercialmente en la industria salmonera, se considera la creación de una nueva empresa farmacéutica dedicada a la producción y venta del fármaco. El proyecto considera una inversión inicial de US\$5 millones, equivalente a \$3.250 millones, considerando una paridad del dólar de \$650. Esta cifra permite la construcción y puesta en marcha de una planta altamente competitiva, manufacturando productos de calidad mundial.

Generación de los ingresos

El mercado potencial corresponde al número total de peces en proceso de cultivo y que debieran ser protegidos con una dosis peptídica por ejemplar. Estas cantidades se obtienen a partir de las toneladas de salmónidos que se proyectan producir en los próximos años, considerando un peso individual de cosecha de 3 kg. Se aplica una mortalidad promedio del 28%, para estimar la cantidad de smolts necesarios para lograr esos niveles de producción, los que registrarán incrementos anuales del 11% en promedio.

Los ingresos se generan con las ventas proyectadas de dosis unitarias del medicamento peptídico, por parte de la empresa farmacéutica que fabricará y comercializará el producto. Se considera que la compañía sólo abordará una fracción del mercado, el que conservadoramente podrá iniciarse con el 16% en el año 2006, cuando se produciría el lanzamiento del producto, hasta el 65% en el año 2011. Esto equivale a comercializar un mínimo de 29,8 millones y 184,5 millones de dosis como máximo, respectivamente.

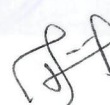
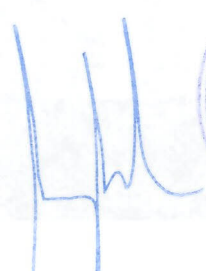
El precio de venta de cada dosis será de 10 centavos de dólar (\$65), que es inferior al precio de una vacuna para peces (US \$0,12). Este valor permite proyectar ventas entre \$1.937 millones en el primer año y \$11.991 millones en el sexto.

Costos

Para establecer los costos o gastos de operación, se consideran valores que tienen actualmente compañías farmacéuticas para producir clases de productos similares. Una dosis del medicamento tiene un costo de \$29, su suministro al pez cuesta \$13 y \$7 adicionales corresponde a materiales empleados para su aplicación.

Gastos de administración y ventas

Se considera un gasto de administración y ventas presupuestado en el 8% de las ventas brutas. Esta es una proporción promedio utilizada en la industria farmacéutica.





**16.2. Flujo de Fondos del Proyecto e Indicadores de Rentabilidad
(calcular el VAN y la TIR dependiendo del tipo de proyecto)**

I. PROYECCIÓN SITUACIÓN SIN PROYECTO

ITEM	AÑOS DE LA PROYECCIÓN					
	1	2	3	4	5	6
1. ENTRADAS						
Subtotal Entradas						
2. SALIDAS						
2.1. Inversiones						
2.2. Gastos de Operación						
2.3. Otros						
Subtotal Salidas						
3. BENEFICIOS NETOS TOTALES (1-2)						
VAN (12%)						
TIR						



17. RIESGOS POTENCIALES Y FACTORES DE RIESGO DEL PROYECTO

17.1. Técnicos

- Existe una reducida probabilidad que el DNA shuffling, no posea la capacidad de generar quimeras de mayor actividad específica que los nativos. Diferentes modelos así lo prueban. Por lo tanto, este es el punto de menor riesgo de la propuesta, sin incluir el clonamiento que técnicamente es realizable.
- El modelo de expresión, y la estrategia para recuperarlos, podría ser un punto discutible:

Porque a pesar de expresarse como proteína de fusión en el modelo *Caulobacter*, pudiese tener un efecto bacteriostático o bacteriolítico por el hecho de ser quimérico y de mayor actividad específica, dentro o como producto exportado. Sin embargo, el producto de exportación es de naturaleza agregable, por lo que evita la solubilidad del péptido y su eventual efecto tóxico sobre las células que lo producen. A pesar de ello, y si fuese el caso, tendríamos que buscar un sistema alternativo de expresión, como el propuesto por Blum *et al* (2000), quienes clonan y expresan como proteínas de fusión en *E. coli*, péptidos que inhiben procesos intracelulares. Esta alternativa viable tiene el inconveniente que el péptido NO se exporta, con el consecuente problema operativo.
- Otra posibilidad de riesgo se presentaría en caso que los quiméricos presenten algún grado de toxicidad para sistemas celulares superiores. Sin embargo, se espera obtener moléculas de alta actividad específica, de tal modo que su dosis y concentración puedan ser inocuas a nivel sistémico.



17.2. Económicos

Si los péptidos descubiertos registran capacidades antimicrobianas reducidas, podrán verse limitadas las posibilidades de aplicación comercial del producto. Dicha situación pone barreras para la transferencia hacia la industria, tal como se ha propuesto ante el evento de total efectividad del producto. La inversión en desarrollo e innovación biotecnológica no tendría rentabilidad privada, sin embargo, si generaría beneficios para el país al desarrollar capacidades científicas con posibilidades de acercarse a descubrimientos económicamente rentables.

Cabe destacar que este desarrollo tecnológico se encuentra en una línea que recién emerge en Chile y a nivel mundial. Si bien podrían no conseguirse los rendimientos económicos esperados, la biotecnología marina comenzará a posicionarse con un foco competitivo en el país. Se generarán técnicas y metodologías que permitirán rápidamente obtener y probar péptidos de otros organismos marinos con capacidad natural para defenderse de enfermedades.

17.3. Gestión

La Universidad Católica de Valparaíso, y en particular el equipo científico, tienen amplia experiencia en proyectos aplicados en la obtención de productos comerciales, y de magnitud considerable. Los riesgos de manejo del proyecto son bajos, ya que también se apoya de un manejo gerencial aportado por la Oficina de Transferencia Tecnológica de la Universidad Católica de Valparaíso. De esta forma, la gestión del proyecto se orienta a la obtención de resultados concretos, traspasables a la industria, basándose en áreas productivas ampliamente conocidas por el quipo de desarrollo e innovación.

17.4. Otros



17.5. Nivel de Riesgo y Acciones Correctivas

Riesgo Identificado	Nivel Esperado	Acciones Propuestas
REDUCIDO POTENCIAL MICRIBIOLÓGICO DEL PÉPTIDO	BAJO	OPTIMIZAR COMBINANDO PÉPTIDOS
POSIBLE TOXICIDAD DEL PÉPTIDO	BAJO	SELECCIÓN DE PÉPTIDOS NO TÓXICOS
GESTIÓN	BAJO	ACERCARSE LO MÁS POSIBLE A LA INDUSTRIA ADQUIRIENDO COMPROMISOS PRODUCTIVOS CON ELLA.



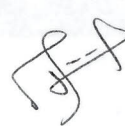
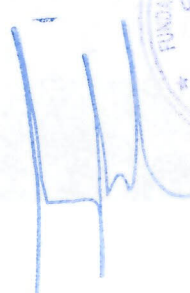
[Handwritten signature]

18. ESTRATEGIA DE TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

La Oficina de Transferencia Tecnológica (OTT) de la Universidad Católica de Valparaíso, es la unidad especializada en vincularse con la industria para buscar un uso de productos y procesos obtenidos como resultados de desarrollo científicos aplicados. Forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios Avanzados, y organiza la gestión tecnológica y de innovación de toda la Universidad. Su experiencia la ha llevado a patentar productos y entregar licencias de explotación para empresas nacionales y extranjeras. Esta es la unidad que se encargará de efectuar la transferencia a la industria de los péptidos que se obtengan en este proyecto de desarrollo e innovación en biotecnología.

Para transferir los péptidos, utilizará como estrategia, patentar bajo la titularidad de la Universidad Católica de Valparaíso, y reconocer como inventores a los científicos involucrados en el descubrimiento. Luego, buscará en distintas industrias las posibles aplicaciones que pueda tener el producto. Una vez identificado los usos, buscará la forma de realizar pruebas a nivel piloto de la efectividad de los péptidos, colocando a disposición de la industria las cantidades de péptidos requeridas. Habiendo probado la utilidad práctica del producto, buscará algún cliente inversionista que pueda interesarse en producir y comercializar el producto a base de estos péptidos, entregando licencia exclusiva o abierta a otros interesados, a cambio de un royalty que recibirá la Universidad, a través de la Oficina de Transferencia Tecnológica.

Al año 2004, probablemente la Oficina de Transferencia Tecnológica haya creado una empresa biotecnológica, la que podrá recibir la licencia exclusiva, por parte de UCV, para explotar comercialmente el producto. La ventaja es que la empresa tendrá un conocimiento avanzado sobre el mercado que pudiera tener el péptido.

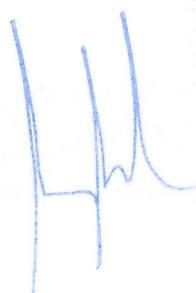


19. CAPACIDAD DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

19.1. Antecedentes y experiencia del agente postulante y agentes asociados

(Adjuntar en Anexo B el Perfil Institucional y documentación que indique la naturaleza jurídica del agente postulante)

La Universidad Católica de Valparaíso destaca en Chile en el ámbito científico, al realizar múltiples proyectos de ciencias aplicadas orientados al desarrollo de productos que resuelvan problemas industriales concretos. En el campo biotecnológico ha avanzado considerablemente, desarrollando productos para la elaboración de vacunas, técnicas de mejoramiento genético, técnicas de reproducción animal, procesos de producción acuícola, entre otros. Ha realizado una veintena de proyectos FONDEF, y se encuentra ejecutando diversos proyectos de transferencia tecnológica, a través de su Oficina de Transferencia Tecnológica. El soporte institucional para cada uno de los proyectos emprendidos es amplio, apoyando en aspectos legales, financieros, de difusión y de relación con el entorno productivo.



19.2. Instalaciones físicas, administrativas y contables

1. Facilidades de infraestructura y equipamiento importantes para la ejecución del proyecto.

Equipos: (En 10 Unidades de laboratorio con una superficie total de 300 metros cuadrados).

2 Salas de Cultivo Celular :

Cámara de flujo Laminar modelo VRL 60 (CONVIRON)

Cámara de flujo Laminar modelo VRL 40 (CONVIRON)

10 Refrigeradores 4°C, -20°C (mantención de medios)

4 Freezers -30°C

2 Incubadores (REVCO) -85°C

Microscopio invertido de epifluorescencia con cámara fotográfica incorporada (NIKON)

10 Set de micropipetas (1 ul – 1000 ul)

Microscopio de Epifluorescencia con cámara fotográfica incorporada (WEISS)

Centrifugas:

Ultracentrifuga L5-65B (BECKMAN)

Centrifuga Refrigerada RC-5B (SORVALL)

3 Centrifugas de sobremesa, velocidad variable, refrigerada (EPPENDORF)

Centrifuga Mikro 22 (HETTICH)

Salas de Acidos Nucleicos:

PRE - PCR

Cámara de flujo Laminar modelo NU 201-330 E (NUAIRE)

MiniCentrifuga

Freezer -20°C

Refrigerador 4°C

2 incubadores termostatados

Micropipetas ad hoc

POST - PCR

3 Termocicladores (Perkin Elmer, Stratagen, Biogen)

4 diferentes Sistemas de Electroforesis en Agarosa y Acrilamida

4 Fuentes de poder ad hoc

Sistema de Electroforesis en Campo Pulsado (PFE) completo (BioRad)

D GENE System for Mutation Detection, completo (para DGGE) BioRad

UV.-Quant Pharmacia, para determinación de concentración de ácidos nucleicos y proteínas

Sala de Cromatografía

HPLC (LACHROM)

Horno L-7350

Bomba L-7120

Detector con arreglo de diodo L-7455

Cámara para extracción en fase sólida (WATERS)

Liofilizador

Concentrador Speed Vac

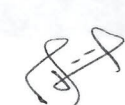
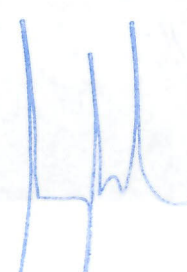


Sala de Bacteriología

Cámara de flujo Laminar modelo serie 37500 (LABCONCO)
Cámara de flujo Laminar modelo NU 201-330 E (NUAIRE)
Autoclave (ALL AMERICAN)
Estufa 20-100 °C (JOUAN)
Estufa 50°C (MEMMERT)
Microscopio contraste de fase con cámara fotográfica incorporada (NIKON)
Refrigerador (MADEMSA)
Incubador LMS (JENCONS)

Sala de Proteínas

Espectrofotómetro 20 Genesys (SPECTRONIC)
Cámaras para electroforesis verticales 1-D y 2-D (BIORAD)
Fuentes de poder (BIORAD)
Secador de geles modelo 583 (BIORAD)
Transiluminador (BIORAD)
Cámara de transferencia semiseca (BIORAD)
Lector de ELISA Multiskan MS (LABSYSTEM)
Lector de imágenes Gel Documentation System
Concentrador Speed Vac (SAVANT)
Systema completo de minigeles y transferencia PHAST Gel System. Pharmacia. 1-D, 2-D, IEF-Ultrasonicador (disruptor de células) (MICROSON)
Sonicador 2200 (BRONSON)
Balanza analítica 120 x 0,0001g (SCIENTECH)
Balanza digital 250 x 0,001g (SCIENTECH)
Freezer horizontal -80 °C (SCIENTEMP)
Freezer vertical -80 °C (REVCO)
Destiladores de agua
Purificador de agua MilliQ modelo Simplicity (MILLIPORE)
Refrigeradores y Freezer -20 °C
PHmetros, agitadores magnéticos, vortex, micropipetas
Computadores con correo electrónico e Internet para búsqueda bibliográfica



2. Capacidad de gestión administrativo-contable

La gerencia administrativa del proyecto, será asumida por el Gerente de la Oficina de Transferencia Tecnológica. Esta Oficina, tiene un sistema administrativo de proyectos, orientado al desarrollo de productos, promoviendo durante el curso de su ejecución, la obtención de resultados concretos, verificables y que queden en condiciones de escalamiento productivo para ofrecerlos en el mercado.

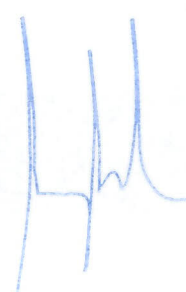
La Oficina de Transferencia Tecnológica, cuenta con el servicio de la Dirección de Finanzas de la Universidad, disponiendo de un sistema contable exclusivo para los proyectos que gestiona. Cuenta con personal designado para efectuar las tareas de ejecución de los proyectos. Sus dependencias, se encuentran en la Casa Central de la Universidad, lo que facilita la interacción con otras unidades de servicio de la Universidad.



20. OBSERVACIÓN SOBRE POSIBLES EVALUADORES

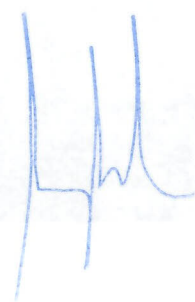
(Identificar a el o los especialistas que estime inconveniente que evalúen la propuesta. Justificar)

Nombre	Institución	Cargo	Observaciones



ANEXO A

ANTECEDENTES DEL EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO



CURRICULUM VITAE RESUMIDO

i. Datos Personales

Marshall	González	Sergio Horacio	
APELLIDO PATERNO	APELLIDO MATERNO	NOMBRES	
5 de Enero de 1946	vrica@ucv.cl	273444	273294
FECHA NACIMIENTO	CORREO ELECTRONICO	FONO	FAX
	Vicerrector de Investigación y Estudios Avanzados		
RUT	CARGO ACTUAL		
V	Valparaíso	Avenida Brasil 2950	
REGION	CIUDAD	DIRECCION DE TRABAJO	

ii. Formación Académica

GRADOS ACADEMICOS (postgrado)	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION
Bachelor Of Arts. B.A.	Brandeis University	USA	1971
Master Of Arts. M.A.	Brandeis University	USA	1972
Ph. D	Harvard University	USA	1981
HONORS	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION
Ryan Fellow, The Albert Ryan Foundation	Harvard University	USA	1979-1981

iii. Trabajo Actual

INSTITUCION Y REPARTICION	Vicerrectoría de Investigación y Estudios Avanzados Universidad Católica de Valparaíso
CARGO - CATEGORIA ACADEMICA	Vicerrector de Investigación y Estudios Avanzados Profesor Titular Instituto de Biología
JORNADA DE TRABAJO (horas/semana)	44 horas/semana
CIUDAD Y REGION	Valparaíso - V Región

iv. Trabajos Académicos asociados

INSTITUCION	CARGO	DESDE	HASTA
Ministerio de Economía Fomento y Reconstrucción.	Consultor del Departamento de Sanidad Pesquera, Sernapesca	1995	
CORFO	Evaluator Técnico de Proyectos del Fondo de Desarrollo e Innovación	1996	
Ministerio de Educación - Chile	Presidente de la Comisión Asesora de Postgrado del Consejo de Rectores de las Universidades Chilenas	1999	2002
Ministerio de Educación - Chile.	Miembro Integrante de la Comisión de Certificación de la Calidad de los Programas de Postgrado en Chile. (En Trámite de Decreto a Nivel de Contraloría General de la República).		
Ministerio de Educación - Chile.	Representante de la Universidad Católica de Valparaíso en el Convenio de Desempeño en Consortio con la Universidad Técnica Federico Santa María para la "Creación de un Programa de Doctorado en Biotecnología"	1999	2002

v. Gestión de Tesis de Pregrado, Especialidades y Postgrado

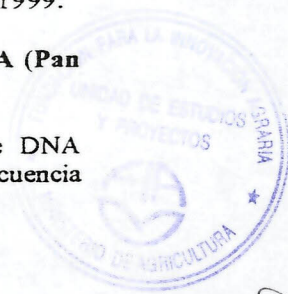
Tesis de postgrado

Tesis de Magíster

1. Evaluación in vitro de un vector para la immortalización de secuencias genéticas en peces salmídeos. Magíster en Ciencias Microbiológicas. UCV. Alumno: Sr. Patricio Villalobos B. 1998.
2. Molecular Diagnosis and Ecology of *Piscirickettsia salmonis*, a bacterial pathogen of salmonids. Master of Arts. San Francisco State University. C.A. USA. Co-Dirección trabajo realizado en laboratorio de Chile. (Sekou Heath). 1999.
3. Clonamiento y expresión de un fragmento del gen VP2 del virus de la necrosis pancreática infecciosa. Magíster en Ciencias Microbiológicas. Alumno: Sr. Patricio Araneda C. (En espera de defensa). 2001.
4. Caracterización del ITS ribosomal del genoma de diferentes aislados naturales de *Piscirickettsia salmonis*. Magíster en Ciencias Microbiológicas. Srta: Vitalia Henríquez Q. (En espera de defensa). 2001.

vi. Gestión de Proyectos Académicos (Nacionales e Internacionales)

1. Direct injection of a genetically modified virus gene into muscle of adult salmonids: An alternative to classic vaccines. **THE EUROPEAN COMMUNITY**. Dr. Sergio Marshall G. Responsable en Chile, Dr. Norman Maclean, responsable en Gran Bretaña. Jefe de Proyecto. 1995-1998.
2. Evaluación de un vector de immortalización en células de peces en cultivo. **Proyecto FONDECYT**. Jefe de Proyecto. 1996-1998.
3. Evaluación Inmunológica de *Piscirickettsia salmonis* **FONDO DE INVESTIGACION PESQUERA**. Jefe de Proyecto. 1996-1997.
4. Desarrollo de una Vacuna de DNA recombinante para controlar *P. Salmonis* en peces salmonídeos. **FONDEF 96 1038**. Jefe de Proyecto. 1997-1999.
5. Optimización de la tecnología de la PCR. **CORYSS Laboratorios**. San Francisco, California. USA. Jefe de Proyecto. 1998-2001.
6. Identification and Detection of Pathogens in Water via Global Molecular Characterization and Flexible Test- Targeting. **SBRD-Department of Commerce. USA**.
7. CDNA Library construction of *Piscirickettsia salmonis* genome. **ALPHARMA- Noruega -DI-UCV**. Co- Investigador. 1999-2002. Jefe de Proyecto. 2000-2002.
8. Programa de Cooperación Chile – Francia para el Laboratorio de Genética Molecular de la Universidad Católica de Valparaíso. **Embajada de Francia en Chile**. Para el Laboratorio de Enfermedades de Organismos Marinos de la Universidad de Montpellier, co-patrocinante de la propuesta FONDEF 1999.
9. Miembro del Comité Ejecutivo Internacional (8 personas en total) para la formación de **PAMBA (Pan American Association of Marine Biotechnology)**. USA – CANADA – CHILE.
10. Convenio de colaboración en transferencia tecnológica para la generación de vacunas de DNA recombinantes para patógenos marinos con la firma **ALPHARMA Inc, Oslo Noruega**. (Consecuencia del Proyecto FONDEF 1038)



11. Lanzamiento de Vacuna para erradicar *Piscirickettsia salmonis* de la industria salmonera chilena. Proyecto FONDEF de Transferencia Tecnológica DOOT 1041. Investigador Alterno. 2001-2003.

vii. Productividad Comercial – PATENTES

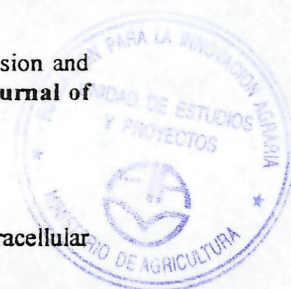
1. Se ha iniciado el trámite para patentar proteínas de uso veterinario para generación de vacunas de aplicación comercial.
 - Inventor: Sergio Marshall G
 - Propiedad: Universidad Católica de Valparaíso
 - Patentamiento en Chile: año 2001
 - Patentamiento vía Internacional PCT año 2002

viii. Productividad Académica (Últimos 5 años)

1. Arenas-Díaz, G., Mercado, L., and **Marshall, S.H.** Bacterial aspartate kinase-like activity in human platelet. *Cell. Mol. Biol. Research. CMBR/MS95-001*. 1996. Volumen 41 (5).
2. **Marshall, S.H.**, Heath, S., Henríquez, V., Orrego, C. Minimally invasive detection of *Piscirickettsia salmonis* in cultivated salmonids via PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3066-3069. 1998.
2. Villalobos, P., Rojas, M.V., Conejeros, P., **Marshall, S.H.** Efficient transfection and expression of a reporter gene-containing plasmid on a fish cell line. *J. Biotech.* <http://ejb.ucv.cl/content/vol2/issue2/full/5/>. 1999.
3. Heath, S., Pak, S., Orrego, C., **Marshall, S.H.** Genetic Monitoring by denaturant gel electrophoresis of *Piscirickettsia salmonis*, a bacterial disease of farmed salmonids. *Mutation Analysis. Technical Note. BIO-RAD. Bull.* 2451.06/99. 1999.
4. Heath, S., Pak, S., **Marshall, S.H.**, Prager, E.M., Orrego, C. Monitoring *Piscirickettsia salmonis* by denaturant gel electrophoresis and competitive PCR. *DA*, 41: 19-29. 2000.
5. Skarmeta, A.M., Henríquez, B., Zahr, M., Orrego, C. and **Marshall, S.H.** Isolation of a virulent *Piscirickettsia salmonis* from the brain of naturally infected coho salmon. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 20(6): 203-205. 2000
6. Arenas, G., Mercado, L. y **Marshall, S.H.** Differential level of polypeptide phosphorylation in *Argopecten purpuratus* larvae by glycine and GABA. *Ciencias Marinas*. En revisión A.1100. 2001.
7. Mercado, L., Itarte, E., **Marshall, S.H.** y Arenas, G. Immunological detection of CK2 activity in *Tapes semidecussatus* (Mollusca, Bivalvia) mantle. *Malacología* 43(1-2) pp. 217 – 222. 2001.
8. Mercado, L., **Marshall, S.H.** y Arenas, G. Prophenoloxidase system in the Haemolymph of *Venus antiqua* clams. *Malacología*. Accepted Manuscript. 1226.2001.
9. Monzón, H., **Marshall, S.H.**, Arenas, G. Antibacterial activity in acid extracted Haemocytes from the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. (To be submitted to *Electronic Journal of Biotechnology - EJB*) 2001.
10. **Marshall S.H.**, Villalobos P., Araneda P., Reyes M., Maclean N., Orrego C. Cloning, expression and protective capacity of a truncated version of the VP2 gene from IPNV. (To be submitted to *Journal of Virology*). 2001.

Manuscripts in preparation

1. Henríquez, V. Orrego, C. **Marshall, S.H.** Biochemical and structural purification of the intracellular pathogen *Piscirickettsia salmonis* from fish tissue culture infected cells.



2. Henriquez, V. Conejeros P., Orrego C., **Marshall, S.H.** Purification and characterization of a chaperonin-like protein of the intracellular bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis* from naturally infected fish organs.
3. **Marshall, S.H.** A new procedure to purify membrane-associated hydrophobic proteins from fish tissues infected with the bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*.
4. Lopez-Becerra E., Orrego C., Arenas G, **Marshall, S.H.** Identification of a novel defensin-like coding sequence in the genome of *Mytilus chilensis*.

Presentaciones a Congresos Internacionales en el último año

Skarmeta, A.M., Henriquez, V., Zahr, M., Orrego, C., **Marshall, S.H.** Characterization and comparative DNA analysis of an infective *Piscirickettsia salmonis* isolated from brain of a naturally infected Coho salmon from Southern Chile. IMBC-International Marine Biotechnology Conference. Townsville, Australia. September 2000.



Handwritten signature in blue ink, appearing to be 'H. M.', located below the stamp.

ANTECEDENTES PERSONALES

ARENAS		DIAZ		GLORIA MARIA	
APELLIDO PATERNO		APELLIDO MATERNO		NOMBRES	
18/06/45	1. MASCULINO 2. FEMENINO	garenas@ucv.cl CORREO ELECTRONICO	56-32-273117	56-32-212746	
FECHA DE NACIMIENTO			FONO	FAX	
INSTITUCION UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO					
DIRECCION AV. BRASIL 2950					

2 ANTECEDENTES ACADEMICOS O PROFESIONALES

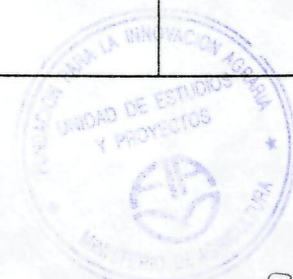
TITULOS Y GRADOS	UNIVERSIDAD	PAIS	AÑO OBTENCION
Títulos.			
Profesor de Biología	Católica de Valparaíso	Chile	1970
Grados Académicos.			
Doctor en Ciencias	Complutense de Madrid	España	1986
Licenciado en Filosofía y Educación	Católica de Valparaíso	Chile	1970

3 TRABAJO ACTUAL

INSTITUCION	UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
CARGO OCUPADO	PROFESOR TITULAR. Instituto de Biología
COMPROMISO CONTRACTUAL CON LA INSTITUCION (Nº Horas/semana)	44 HRS.

4 TRABAJOS ANTERIORES RELEVANTES AL PROYECTO

INSTITUCION	TRABAJOS ANTERIORES		
	CARGO	DESDE	HASTA
U. CATOLICA DEL NORTE – COQUIMBO	PROFESOR ASOCIADO AL PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS DEL MAR	1997	1999
U. SANTIAGO DE COMPOSTELA FAC. DE VETERINARIA – LUGO. ESPAÑA	PROFESOR INVITADO	1997	1997
PROGRAMA ALFA SUBPROGRAMA B1	REPRESENTANTE LATINOAMERICANO PROMOCION DE LA FORMACION DE POSTGRADO EN EL AREA DE FARMACOLOGIA	1996	1997



5 PATENTES

--

6 PUBLICACIONES RELACIONADAS AL PROYECTO (5 principales en los últimos 5 años)

REVISTAS CHILENAS
REVISTAS EXTRANJERAS
"Characterization of CRP-like pentraxins from the South American clam <i>Venus antiqua</i> " Gloria Arenas & Luis Mercado. Manuscrito en revisión. Dev. Comp. Inmunol. 1999.
"The effect of glycine and GABA on polypeptide phosphorylation in <i>Argopecten purpuratus</i> larvae". G. Arenas D & L. Mercado V. Manuscrito en revisión. Biol. Bull. 1999
"Effect of neurotransmitters on protein phosphorylation in <i>Argopecten purpuratus</i> larvae". Gloria Arenas Díaz, Luis Mercado Vianco & Enrique Dupré. Journal of Medical and Applied Malacology , 8(1): 102. 1996.
"Bioactive compounds in the activation of metamorphosis in <i>Mytilus chilensis</i> larvae". Gloria Arenas & Luis Mercado. Journal of Medical and Applied Malacology , 8(1): 105. 1996.
"Casein kinase 2, cellular proliferation marker is present in <i>Tapes semidecussatus</i> (Mollusca, bivalvia)". Luis Mercado, Emilio Itarte & Gloria Arenas. Journal of Medical and Applied Malacology , 8(1): 65. 1996.
LIBROS

7 PARTICIPACION EN PROYECTOS DE INVESTIGACION (5 principales en los últimos 5 años)

"Efecto de inductores de asentamiento y metamorfosis de larvas de moluscos marinos sobre CK 2 como marcador molecular". Fundación Andes. Chile. C-12777/4. 1995. I.P.	1995
TITULO DEL PROYECTO	
INSTITUCION UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO	
CARGO INVESTIGADOR PRINCIPAL	AÑO
PRINCIPALES RESULTADOS Y TRANSFERENCIAS AL SECTOR PRODUCTIVO.	
Estandarización de técnicas para generar marcadores moleculares para evaluar actividad de proliferación celular en moluscos bivalvos marinos.	

"Caracterización estructural y bioquímica de los componentes del sistema inmunitarios de <i>Mytilus chilensis</i> ". 122.713-96. DGIP. I.P.	1996
TITULO DEL PROYECTO	
INSTITUCION UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO	
CARGO INVESTIGADOR PRINCIPAL	AÑO
PRINCIPALES RESULTADOS Y TRANSFERENCIAS AL SECTOR PRODUCTIVO.	
Reconocimiento de estándares del sistema inmunológico para la evaluación de modificaciones ocasionadas por factores bióticos y abióticos.	

"Estudio inmunológico de <i>Piscirickettsia salmonis</i> ". Proyecto FIP 9534-1996. Co. I. TITULO DEL PROYECTO		1996
INSTITUCION UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO		
CARGO INVESTIGADOR ALTERNO		AÑO
PRINCIPALES RESULTADOS Y TRANSFERENCIAS AL SECTOR PRODUCTIVO. Estandarización de técnicas para la obtención de antígenos de <i>P. salmonis</i> . Generación de anticuerpos como herramientas de inmunodetección de antígenos de <i>P. salmonis</i> en tejidos de peces.		

"Purificación e inmunodetección de caseína quinasa 2 en <i>Tapes semidecussatus</i> ". Generalitat de Catalunya. AIRE. CIRIT 1996. Co.I. TITULO DEL PROYECTO		1996
INSTITUCION UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO		
CARGO INVESTIGADOR PRINCIPAL		AÑO
PRINCIPALES RESULTADOS Y TRANSFERENCIAS AL SECTOR PRODUCTIVO. Generación de marcadores moleculares para evaluar actividad de proliferación celular en moluscos bivalvos marinos.		

"Actividad de la proteína quinasa C (PKC) durante la fagocitosis en hemocitos de moluscos bivalvos marinos" 122.741/ 98. IP TITULO DEL PROYECTO		1998
INSTITUCION UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO		
CARGO INVESTIGADOR PRINCIPAL		AÑO
PRINCIPALES RESULTADOS Y TRANSFERENCIAS AL SECTOR PRODUCTIVO. Determinación de parámetros para detectar y evaluar respuestas del sistema inmunológico de moluscos bivalvos.		



MARCELO L. ARREDONDO ARAYA

ANTECEDENTES PERSONALES

*Dirección Laboral : Oficina de Transferencia Tecnológica, UCV
Casa Central, Avda. Brasil 2950*

ANTECEDENTES ACADÉMICOS O PROFESIONALES

Título Profesional

Ingeniero Pesquero, Escuela de Ciencias del Mar, UCV

Postgrados

Diplomado en Finanzas, Escuela de Comercio, UCV

Egresado Magister en Gestión mención control, Escuela de Comercio, UCV

Diploma Consultor Pequeña y Mediana Empresa, Universidad Diego Portales.

Diploma en Diseño y Desarrollo de Productos, Pontificia Universidad Católica de Chile.

ACTIVIDAD LABORAL

1996 a 2001: Gerente Oficina de Transferencia Tecnológica de la Universidad Católica de Valparaíso

1985 a 2001: Consultor de empresas



A handwritten signature in blue ink, located at the bottom right of the page.

DESARROLLO DE ACTIVIDADES LIGADAS A LA TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA

PROYECTOS DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA

*PROYECTO FONDEF D00T1041 "Lanzamiento de vacuna para erradicar
Piscirickettsia salmonis en la industria salmonera".*

Director General

Estado: en ejecución.

*PROYECTO FONDEF D00T1045 "Transferencia de una tecnología de apoyo a la
planificación de inventarios".*

Director Alterno

Estado: en ejecución.

*PROYECTO FONDEF D00T1024 "Transferencia Tecnológica del proceso UCV/VK
para la exportación de limones".*

Asesor en Diseño y Desarrollo de Productos.

Estado: en ejecución.

*PROYECTO FONDEF D00T1066 "Mejoramiento de la producción de recursos
naturales con apoyo de imágenes satelitales".*

Asesor en transferencia tecnológica y negocio de imágenes satelitales.

Estado: en definición estrategia de transferencia tecnológica.

*PROYECTO FONDEF D97T1003 "Transferencia Tecnológica en procesos de
cultivo de salmónidos"*

Gerente

Estado: terminado

*PROYECTO FONDEF D96T1013 "Creación, Implementación y Gestión de una
Oficina de Transferencia Tecnológica"*

Gerente

*Estado: terminado, proyecto concluido con la incorporación de la Oficina de
Transferencia Tecnológica al organigrama UCV.*



Handwritten signature in blue ink. To the right is a circular official stamp of the "MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA" of Uruguay, featuring a star and the text "REPUBLICA DE URUGUAY".

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

PROYECTO FONDEF D00I1045 "Diseño, desarrollo y validación de un modelo actualización docente permanente de tipo virtual en el contexto de la reforma educacional para profesores del área técnico profesional: "objetivos fundamentales transversales y terminales, metodología docente y actualización de contenidos".

Gerente

Estado: en ejecución

PROYECTO FONDEF D99I1055 "Optimización inmunológica y genética de péptidos endógenos antimicrobianos en ostiones (*Argopecten purpuratus*) para aumentar su capacidad exportadora".

Gerente

Estado: en ejecución

ASESORIAS, CONSULTORIAS TECNOLÓGICAS Y ACTIVIDADES DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA.

Asesoría "Diseño y Desarrollo de Productos, factor estratégico para la competitividad industrial de Chile. El caso de proyectos de I+D tecnológicos FONDEF".

Consultoría al Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico FONDEF.

Serie Diseño y Desarrollo de Productos de Alta Tecnología MAA-Consultor.

Estado: asesoría realizada en septiembre-diciembre del 2000.

Asesoría tecnológica "Desarrollo de un Plan de Aseguramiento de Calidad (PAC) para productos pesqueros congelados, en especies jurel, sardina y caballa" Pesquera Galeb -Antofagasta.

Director

Estado: en ejecución

Asesoría OTT-UCV Proyecto FAT - CORFO "Estudio de mercado para una Planta de Fundición de Precisión en Cáscara Cerámica en Antofagasta", solicitado por Consorcio Parque Industrial AGPIA S.A., Antofagasta.

Director

Estado: asesoría terminada



Asesoría OTT-UCV en gestión organizacional "Diseño e implementación de una estrategia para que los pequeños mineros puedan establecer las políticas de su empresa y un complejo minero industrial". Este trabajo se realiza en terreno en la comuna de Petorca.

Director

Estado: asesoría terminada

EDICION DE LIBROS Y MANUALES TECNOLÓGICOS

Dirección general de talleres periódicos de transferencia de tecnologías biológicas para personal de producción y de desarrollo de empresas salmoneras, y editor de la Serie de Manuales de Innovación Tecnológica para la Acuicultura. Los títulos en ambos casos son:

- 1. Manejo de fotoperiodo e inducción de la ovulación en procesos de cultivo de salmones.*
- 2. Conservación y criopreservación de gametos de salmónidos.*
- 3. Biotecnología para la esterilización y producción de monosexo en salmónidos.*
- 4. Alternativas para el mejoramiento genético de salmónidos.*

ASISTENCIA A CURSOS, SEMINARIOS, TALLERES, REALIZADOS EN EL ÁMBITO DE LA TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA

Congresos y Seminarios Nacionales

- Seminario Internacional "La exportación de Servicios: Nuevo desafío Universitario", organizado por el Comité Exportador de Servicios Universitarios de ProChile, 30 septiembre al 1º de octubre de 1999.
- Seminario Internacional "Gestión de la Tecnología y la Innovación", realizado en conjunto por la Universidad de Loyola Maryland y la Universidad Alberto Hurtado de Chile, 12 de agosto de 1999, Santiago Chile.



- *Seminario Visión Empresarial 2000, organizado por Universidad del Desarrollo, septiembre de 1999.*
- *Curso para preparación de proyectos FONDEF, impartido por el Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico - Santiago, abril de 1999.*
- *Curso Taller en negocios Tecnológicos – FONDEF, impartido por el Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico, Santiago, abril de 1999.*
- *Seminario-Taller "Incentivos para el Desarrollo de las Ciencias, la Tecnología y la Innovación en el Sector Productivo Nacional", organizado por la Comisión de Ciencias y Tecnología de la Cámara de Diputados de Chile, enero de 1999.*
- *Encuentro Internacional "Temas fundamentales para el desarrollo universitario", organizado por ALFA/CINDA y Ministerio de Relaciones Exteriores, Santiago, 14 y 15 de septiembre de 1998.*
- *Seminario "Relación Universidad-Empresa. Políticas y Mecanismos para su consolidación", organizado por el Centro Interuniversitario de Desarrollo (CINDA), Santiago, 6 al 8 enero de 1997.*
- *Seminario "Oportunidades de negocios en Perú y Bolivia", realizado por ProChile, Viña del Mar, 25 de marzo de 1997.*
- *"XX Taller de Ingeniería de Sistemas", realizado por la Universidad de Chile, Santiago, 9 al 13 de junio 1997.*
- *Seminario "Valorización de tecnología, negociación de contratos y promoción y marketing de tecnología y de servicios", realizado por la Universidad de Concepción, 21 al 23 de abril 1997.*

Congresos y Seminarios en el Exterior.

- *International Conference on Intellectual Property, the Internet, Electronic Commerce and International Knowledge. Organizado por la Organización Mundial de Propiedad Industrial (OMPI), Sofía-Bulgaria 29 al 31 de mayo del 2001.*
- *Tercer Congreso internacional de Universidades para el Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, organizado por OIUDSMA. Expositor, 18 al 20 de 1999 noviembre, Valencia – España.*



- Curso "Buenas prácticas de cooperación Universidad-Empresa", realizado por el Centro de relaciones con el entorno socio-económico de la Universidad Politécnica de Valencia Seminario "Innovación Tecnológica para el Tercer Milenio" de la Asociación Latino-Iberoamericana de gestión de Tecnología (ALTEC). 27-29 octubre de 1999. Valencia, España.
- "I Foro de desarrollo productivo e integración Provincia de Mendoza y región de Valparaíso", Expositor y Panelista. Mendoza – Argentina, 30 y 31 de agosto 1999.
- Seminario Internacional "En busca de ventajas comparativas: Exportación de servicios universitarios en el Mercosur, una estrategia para el desarrollo". Expositor y Panelista, realizado por ProChile y la Universidad de Buenos Aires, 4 al 6 de noviembre de 1998, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Taller de capacitación para Gerentes de Unidades de interfaz Empresa-Universidad/Institutos de Investigación", realizado por la Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología del Estado de Lara, Barquisimeto, Venezuela, 13 al 15 de octubre de 1998.
- Seminario "Mecanismos para la creación de empresas tecnológicas", realizado por el Programa de Intercambio Universitario entre la Unión Europea y América Latina (ALFA - CINDA). Universidad Estadual de Campinas, Brasil, 27 al 29 de abril de 1998.
- Curso: "Proteu II- Programa de entrenamiento para capacitar gestores de cooperación Empresa-Universidades/Institutos de Investigación, organizado por el Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo (CYTED), Sao Paulo-Brasil, 30 junio al 4 de julio de 1997.



A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized letters.



ANEXO F

TECNOLOGIA DISPONIBLE EN UCV ORGANIZACIÓN TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA

Anexo F.1. Análisis resumido del desarrollo de la biotecnología en USA, Europa, América Latina y Chile.

Anexo F.2. Currículum vitae Oficina de Transferencia Tecnológica

Anexo F.3. Reglamento de Productos Farmacéuticos de Uso Exclusivamente Veterinario.

Anexo F.4. Cromatografía de *Mytilus chilensis*

Anexo F.5. HPLC de *Mytilus chilensis*

Anexo F.6 Serie Manuales de Innovación Tecnológica para la Acuicultura - OTT



Tabla 1. Las empresas biotecnológicas más importantes de América Latina.

País	Empresa	Actividades en Biotecnológica	Empleados
Brasil	Biobras	Producción de enzimas e insulina	>250
Brasil	Valle	Producción de vacunas y fármacos	>250
Argentina	Bio Sidus	Producción de fármacos	>250
México	Pulsar	Desarrollo de plantas transgénicas	>250
Cuba	CIGB ¹	Producción de Interfon y vacunas (Hepatitis B, Meningitis B)	>250
Venezuela	Polar	Kits de diagnóstico	>250
Chile	Bios Chile	Kits de diagnóstico	101-250

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

Cabe recordar que los sectores forestal, ganadero y de producción de pescado son de gran importancia en América Latina

La realidad biotecnológica en Chile.

La realidad del desarrollo biotecnológico mundial, con economías cada día más globalizadas genera para los países en desarrollo la necesidad de invertir en tecnologías de punta. El desafío, la formación de recursos humanos altamente calificados para una industria dinámica y competitiva.

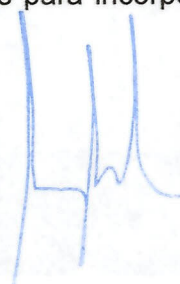
Debido a la estructura económica de Chile, concentrada en la industria explotadora de recursos naturales, la biotecnología surge como una herramienta en el aumento de la competitividad. El potencial de aplicación biotecnológica es enorme en fruticultura, silvicultura, piscicultura, producción vitivinícola y también en la explotación de minerales.

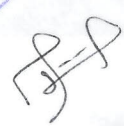
A continuación destacaremos algunas características del emergente sector biotecnológico en Chile:

Grado de aplicación de la biotecnología en Chile.

Según el grado de aplicación de los procedimientos biotecnológicos, en la industria biotecnológica chilena encontramos:

- 18 empresas que han desarrollado productos y/o procesos biotecnológicos avanzados, que los comercializan y que realiza I&D.
- 5 empresas que han desarrollado algún(os) productos y/o procesos biotecnológicos avanzados, que los comercializan y que realiza I&D.
- 30 empresas que posee fondos y/o realiza I&D propios para incorporar y/o adaptar procesos biotecnológicos en su cadena de producción.





Tamaño de las empresas biotecnológicas chilenas.

Caracterizado por la heterogeneidad de las empresas que la constituyen, podemos encontrar en este sector las *empresas biotecnológicas*, que serán aquellas que incorporan técnicas biológicas y/o de ingeniería genética modernas. Bajo este criterio en Chile encontramos 19 empresas biotecnológicas, las que según su volumen de ventas se clasifican en: 2 empresas grandes (Bios Chile S.A. y Tepual S.A.), 12 PYMES y 5 microempresas.

**Tabla 2. Características de las empresas biotecnológicas chilenas
Según rama de productos**

Ramas	Empresas	Empleados	Gastos en I&D	Ventas	Exportaciones En I&D	Mill. 1999	
US\$	Mill.US\$	Mill. US\$					
1999							
Diagnóstico médico y veterinario	5		95	45	0.82	4.45	0.7
Enzimas y químicos finos	5		68	13	0.16	1.72	0.41
Biofertilizantes y biopesticidas	2		16	3	0.14	1.0	0.17
Aplicaciones biotecnológicas en el sector forestal	1		31	8	0.16	0	0
Bioteología ambiental	1		3	2	0.02	0.01	0
Control biológico de plagas	2		22	13	0.11	0.15	0
Ingeniería genética de plantas	3		3	1	0	0	0
TOTAL		19	238	85	1.41	7.33	1.28

Mientras el sector industrial de los países desarrollados lucha por ganar posiciones en biotecnología, en Chile, no obstante su desarrollo científico, sigue siendo un área precompetitiva de desarrollo potencial. Referido a la capacidad de generar empleo, si lo cuantificamos a la escala de EE.UU. (295 empleados en la industria biotecnológica/millón de habitantes), Chile debería dar empleo a 4.130 empleados cifra que según los datos entregados en la Tabla 2, sólo alcanza a 238, lo que representa un déficit del 94 % en la capacidad de generación de empleo el sector.

Financiamiento de proyectos de I&D en las empresas del sector.

Considerando el notorio y acelerado progreso de la biotecnología en el ámbito mundial, las empresas nacionales de este sector requieren de un gran apoyo científico y tecnológico para mantenerse vigentes. En nuestro país no es común que tal apoyo provenga del interior de cada empresa, ya que ello requeriría de un esfuerzo económico significativo para generar su propia estructura de I & D o bien renunciar a ella, con grave perjuicio para su vigencia en un área productiva tan altamente sensible al desarrollo tecnológico.



Las empresas biotecnológicas invirtieron en I&D US\$ 1.41 millones (Tabla 3), así como aquellas empresas que aplican biotecnología moderna realizaron inversiones por US\$ 1.8 millones. Del total de esta inversión en I&D (US\$ 3.21 millones) del sector empresarial, un 33.3% fue financiado por FONTEC y SAG.

Pero las empresas de este sector en Chile, son dependientes y con visión de corto plazo para lograr una entrada rápida en el mercado y poder generar ventas en la fase temprana del desarrollo, basándose generalmente en tecnologías extranjeras, que se venden en Chile vía representación legal de empresas extranjeras o por ajuste rápido e integración de una tecnología en la oferta de servicios de la empresa, no pudiendo realizar una fase de largo plazo en I&D en que puedan desarrollar sus productos hasta la etapa de madurez de mercado.

La situación actual de la industria biotecnológica nacional se puede definir como de pleno crecimiento y evolución tecnológica. Sin embargo, dado que los dos tercios de las empresas biotecnológicas se han desarrollado en los pasados tres años, no se cuenta con datos históricos comparativos en las empresas para proyectar la tendencia de crecimiento de esta industria

Cooperación para el desarrollo de la I&D en el sector biotecnológico.

Si analizamos los tipos de cooperación, menos de la mitad de las empresas cooperan en I&D con otras empresas. En cambio un 85% de las empresas mantienen cooperación con alguna Universidades y/o Instituto Tecnológico nacionales (35% Universidad de Chile, 25% Universidad Católica de Chile, 8% Universidad de Concepción, 13% otras universidades chilenas y 8% INIA), y un 15% con universidades extranjeras. Es importantísimo desarrollar las relaciones internacionales de manera de aprovechar sinérgicamente las experiencias de los países desarrollados.

Otro dato importante es que el 40% de las empresas recurre también a las universidades nacionales para el entrenamiento técnico de los empleados.



OFICINA DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA



Reseña Histórica

La OTT fue puesta en marcha el 4 de noviembre de 1996, naciendo a través del proyecto FONDEF D96T1013 "Creación, implementación y gestión de una Oficina de Transferencia Tecnológica", cuyo Director General es don David Cademártori Rosso, en ese entonces, Vicerrector de Desarrollo.

Luego de dos años de funcionamiento como proyecto, la OTT fue creada por Decreto de Rectoría Orgánico N° 360 del 2 de septiembre de 1998, bajo la rectoría de don Alfonso Muga Naredo, quedando estructurada en el organigrama de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios Avanzados.

Oficina Central

Av. Brasil 2950, Valparaíso
Casa Central – Universidad Católica de Valparaíso

Marcelo Arredondo Araya
Nieves León Álvarez
Rosa Villalobos Pallero

Gerente
Asistente
Secretaria



Proyectos de Transferencia Tecnológica

PROYECTO FONDEF D00T1041

"Lanzamiento de vacuna para erradicar *Piscirickettsia salmonis* en la industria salmonera".

Estado: en ejecución

Año: 2001

PROYECTO FONDEF D00T1045

"Transferencia de una tecnología de apoyo a la planificación de inventarios".

Estado: en ejecución

Año: 2001

PROYECTO FONDEF D00T1024

"Transferencia Tecnológica del proceso UCV/VK para la exportación de limones".

Estado: en ejecución

Año: 2001

PROYECTO FONDEF D00T1025

"Transferencia Tecnológica para la venta de bulbos de liliun limpios de virosis y bulbos de *Leucocoryne* para uso de paisajismo"

Estado: en ejecución

Año: 2001

PROYECTO FONDEF D00T1066

"Mejoramiento de la producción de recursos naturales con apoyo de imágenes satelitales".

Estado: en entrega de definición de la estrategia de transferencia tecnológica.

Año: 2001

FONDEF D97T1003

"Transferencia Tecnológica en procesos de cultivo de salmónidos"

Estado: terminado.

Año: 1997

PROYECTO FONDEF D96T1013

"Creación, Implementación y Gestión de una Oficina de Transferencia Tecnológica"

Estado: terminado, proyecto concluido con la incorporación de la Oficina de Transferencia Tecnológica al organigrama de la Universidad Católica de Valparaíso.

Año: 1996



Proyectos de Investigación y Desarrollo

PROYECTO FONDEF D00I1045

“Diseño, desarrollo y validación de un modelo actualización docente permanente de tipo virtual en el contexto de la reforma educacional para profesores del área técnico profesional: objetivos fundamentales transversales y terminales, metodología docente y actualización de contenidos”.

Estado: en ejecución.

Año: 2001

PROYECTO FONDEF D99I1055

“Optimización inmunológica y genética de péptidos endógenos antimicrobianos en ostiones (*Argopecten purpuratus*) para aumentar su capacidad exportadora”.

Estado: en ejecución.

Año: 2000

PROYECTO FIA C01-1-D-060

“Diversificar el uso del lupino, utilizándolo como fuente proteica en la alimentación de la salmonicultura”.

Estado: en ejecución.

Año: 2001



Talleres de Transferencia Tecnológica

Taller Tecnológico 1:

Manejo de fotoperíodo e inducción de la ovulación en salmónidos
(2 versiones)

25 y 26 de febrero de 1999 – Hostería de Castro. Castro, Chiloé

25 y 26 de mayo del 2000 – Hotel Vicente Pérez Rosales, Pto. Montt.

Taller Tecnológico 2:

Conservación y criopreservación de semen en salmónidos

23 y 24 de abril de 1999. Hostería de Castro. Castro, Chiloé.

Taller Tecnológico 3:

Biotechnología para la esterilización y producción de monosexo en salmónidos

4 y 5 de junio de 1999. Hostería de Castro. Castro, Chiloé

Taller Tecnológico 4:

Alternativas para el mejoramiento genético de salmónidos

27 y 28 de agosto de 1999. Hostería de Castro. Castro, Chiloé

Consultorías Tecnológicas

Consultoría Tecnológica "Desarrollo de un Plan de Aseguramiento de Calidad (PAC) para productos pesqueros congelados, en especies jurel, sardina y caballa" Pesquera Galeb –Antofagasta.

Estado: en ejecución

Consultoría OTT-UCV Proyecto FAT - CORFO "Estudio de mercado para una Planta de Fundición de Precisión en Cáscara Cerámica en Antofagasta", solicitado por Consorcio Parque Industrial AGPIA S.A., Antofagasta.

Estado: consultoría terminada

Consultoría OTT-UCV en gestión organizacional "Diseño e implementación de una estrategia para que los pequeños mineros puedan establecer las políticas de su empresa y un complejo minero industrial". Este trabajo se realiza en terreno en la comuna de Petorca.

Estado: consultoría terminada

[Handwritten signature]



[Handwritten signature]

Edición de Libros y Manuales Tecnológicos

La Oficina de Transferencia Tecnológica, ha editado la Serie Manuales de Innovación Tecnológica para la Acuicultura, cuyos títulos son:

Manual N° 1 :

Manejo de fotoperíodo e inducción de la ovulación en procesos de cultivo de salmónidos

Manual N° 2:

Conservación y criopreservación de gametos de salmónidos.

Manual N° 3:

Biotechnología para la esterilización y producción de monosexo en salmónidos.

Manual N° 4

Alternativas para el mejoramiento genético de salmónidos.

Organización de Eventos y Seminarios

Conferencia Internacional – Vacunación: estrategia preventiva para la salmonicultura, viernes 1° de diciembre del 2000, durante la Feria Internacional Expopesca y Acuicultura 2000, Parque Ferial FISA, Maipú-Santiago.

Lanzamiento Proyecto FONDEF D99I1055 “Optimización inmunológica y genética de péptidos endógenos antimicrobianos en ostiones (*Argopecten purpuratus*) para aumentar su capacidad exportadora, miércoles 31 de mayo del 2000, Casa Central, Universidad Católica de Valparaíso.



Patrocinios y auspicios a eventos y seminarios

Auspicio en 13th. International Pectinid Workshop, realizado por Universidad Católica del Norte y Asociación de Productores de Ostras y Ostiones de Chile entre el 18 al 24 de abril, Coquimbo-Chile.

Vinculaciones de la Oficina de Transferencia Tecnológica

Vinculaciones con la Excm. Embajadora de Noruega en Chile Sra. Mona Elisabeth Brøther.

Vinculaciones con el Excmo. Embajador de Chile en Noruega, Don José Luis Balmaceda.

Asistencia a cursos, congresos y seminarios relacionados con transferencia tecnológica. Gerente OTT

Congresos y Seminarios Nacionales

- Seminario Internacional "La exportación de Servicios: Nuevo desafío Universitario", organizado por el Comité Exportador de Servicios Universitarios de ProChile, 30 septiembre al 1º de octubre de 1999.
- Seminario Internacional "Gestión de la Tecnología y la Innovación", realizado en conjunto por la Universidad de Loyola Maryland y la Universidad Alberto Hurtado de Chile, 12 de agosto de 1999, Santiago Chile.
- Seminario Visión Empresarial 2000, organizado por Universidad del Desarrollo, septiembre de 1999.
- Curso para preparación de proyectos FONDEF, impartido por el Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico - Santiago, abril de 1999.
- Curso Taller en negocios Tecnológicos – FONDEF, impartido por el Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico, Santiago, abril de 1999.



- Seminario-Taller "Incentivos para el Desarrollo de las Ciencias, la Tecnología y la Innovación en el Sector Productivo Nacional", organizado por la Comisión de Ciencias y Tecnología de la Cámara de Diputados de Chile, enero de 1999.
- Encuentro Internacional "Temas fundamentales para el desarrollo universitario", organizado por ALFA/CINDA y Ministerio de Relaciones Exteriores, Santiago, 14 y 15 de septiembre de 1998.
- Seminario "Relación Universidad-Empresa. Políticas y Mecanismos para su consolidación", organizado por el Centro Interuniversitario de Desarrollo (CINDA), Santiago, 6 al 8 enero de 1997.
- Seminario "Oportunidades de negocios en Perú y Bolivia", realizado por ProChile, Viña del Mar, 25 de marzo de 1997.
- "XX Taller de Ingeniería de Sistemas", realizado por la Universidad de Chile, Santiago, 9 al 13 de junio 1997.
- Seminario "Valorización de tecnología, negociación de contratos y promoción y marketing de tecnología y de servicios", realizado por la Universidad de Concepción, 21 al 23 de abril 1997.

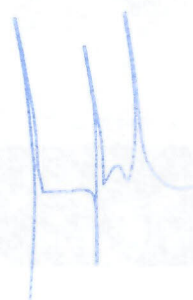
Congresos y Seminarios en el Exterior

- International Conference on Intellectual Property, the Internet, Electronic Commerce and Traditional Knowledge (WIPO) 29 al 31 de mayo 2001. Sofia, Bulgaria
- Tercer Congreso internacional de Universidades para el Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, organizado por OIUDSMA. Expositor, 18 al 20 de noviembre 1999 Valencia – España.
- Curso "Buenas prácticas de cooperación Universidad-Empresa", realizado por el Centro de relaciones con el entorno socio-económico de la Universidad Politécnica de Valencia Seminario "Innovación Tecnológica para el Tercer Milenio" de la Asociación Latino-Iberoamericana de gestión de Tecnología (ALTEC). 27-29 octubre de 1999. Valencia, España.
- "I Foro de desarrollo productivo e integración Provincia de Mendoza y región de Valparaíso", Expositor y Panelista. Mendoza – Argentina, 30 y 31 de agosto 1999.
- Seminario Internacional "En busca de ventajas comparativas: Exportación de servicios universitarios en el Mercosur, una estrategia para el desarrollo". Expositor y Panelista, realizado por ProChile y la Universidad de Buenos Aires, 4 al 6 de noviembre de 1998, Universidad de Buenos Aires, Argentina.



- Taller de capacitación para Gerentes de Unidades de interfaz Empresa-Universidad/Institutos de Investigación", realizado por la Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología del Estado de Lara, Barquisimeto, Venezuela, 13 al 15 de octubre de 1998.
- Seminario "Mecanismos para la creación de empresas tecnológicas", realizado por el Programa de Intercambio Universitario entre la Unión Europea y América Latina (ALFA - CINDA). Universidad Estadual de Campinas, Brasil, 27 al 29 de abril de 1998.
- Curso: "Proteu II- Programa de entrenamiento para capacitar gestores de cooperación Empresa-Universidades/Institutos de Investigación, organizado por el Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo (CYTED), Sao Paulo-Brasil, 30 junio al 4 de julio de 1997.

OFICINA DE TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA
UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAÍSO
AV. BRASIL 2950 – VALPARAISO
FONO: (32) 273291 – 273292
FAX: (32) 273437
E-MAIL: ott@ucv.cl
otttext@ucv.cl
HTTP://WWW.UCV.CL





PROGRAMA DE CONTROL DE FÁRMACOS

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS SECCIÓN 3

Registro de Productos Farmacéuticos

DEPARTAMENTO DE SANIDAD PESQUERA
CHILE

Handwritten signature in blue ink.



Handwritten signature or mark in the bottom right corner.

ÍNDICE :

Pág.

1.-	Alcance y Normativa Legal	02
2.-	Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Acuícola	03
3.-	Aprobación de Series	03
4.-	Aprobación de Importación, elaboración, expendio y uso de Productos sin Registro	05



1.- ALCANCE Y NORMATIVA LEGAL:

Este Manual de Procedimientos incluye aspectos relativos al registro de productos farmacéuticos en animales de la acuicultura y aprobación de uso de productos sin registro.

NORMATIVA LEGAL:

- Ley 19.283, la cual modifica la Ley 18.755, Orgánica del Servicio Agrícola y Ganadero.
- Decreto N°139, del Ministerio de Agricultura "Reglamento de Productos Farmacéuticos de Uso Exclusivamente Veterinario".
- Resolución 724 del Ministerio de Economía del 01/12/97, por la cual se aprueba el Convenio de Cooperación Interinstitucional entre el SAG y Sernapesca, en el ámbito de los Productos Farmacéuticos de uso Exclusivamente Veterinario de uso Acuicola.
- D.S. N°430/91, Ley General de Pesca y Acuicultura.
- DFL N°1 (Ley 18.892) de 1992: Modifica la estructura orgánica de la Subsecretaría de Pesca y de Sernapesca.



2.- REGISTRO DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS DE USO ACUÍCOLA

El registro de un producto farmacéutico de uso exclusivamente veterinario corresponde a la incorporación del mismo en un rol oficial de productos para uso en animales, que mantiene el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

Para el registro, el interesado deberá presentar al SAG una solicitud y adjuntar la información técnica y legal necesaria para realizar su evaluación. Estos antecedentes técnicos y legales conforman el dossier de cada producto farmacéutico.

Cuando se solicite el registro de un producto para uso en especies acuícolas, el SAG requerirá la opinión técnica de Sernapesca, para lo cual remitirá al Departamento de Sanidad Pesquera a nivel central la solicitud y dossier presentado por el interesado.

El Departamento de Sanidad Pesquera evaluará el dossier de acuerdo a lo indicado en el documento Norma Técnica FAR/NT2 del Programa de Control de Fármacos y emitirá un informe al SAG. Para la emisión del informe técnico Sernapesca contará con un plazo no superior a 90 días desde formulado el requerimiento. Este informe podrá indicar la recomendación de registro sanitario, situación pendiente por antecedentes insuficientes o rechazo de la solicitud.

Una vez recibido el informe de Sernapesca, el SAG comunicará al interesado mediante una Resolución la aprobación o rechazo de la solicitud.

3.- APROBACIÓN DE SERIES

Cada partida de productos biológicos registrados, importados o nacionales serán sometidos por parte del SAG, a un control de serie antes de su distribución y expendio.

Las partidas o series, corresponden a la cantidad de un producto obtenido en un ciclo de producción, a través de etapas continuadas y que se caracteriza por su homogeneidad.



Para la aprobación de las series, el interesado deberá declarar al SAG las partidas correspondientes, adjuntando al menos la siguiente información:

- 1.- Individualización del interesado;
- 2.- Identificación del producto;
- 3.- Identificación de la serie;
- 4.- Cantidad de unidades por forma farmacéutica y dosis que la componen;
- 5.- Protocolo del análisis efectuado por el laboratorio de control de calidad del interesado o por el externo autorizado por el SAG;
- 6.- Fecha de elaboración y vencimiento;
- 7.- Número de registro del producto; y
- 8.- Nombre y firma del Director Técnico responsable.

Para la aprobación de series de productos biológicos importados o nacionales, el SAG requerirá la opinión técnica de Sernapesca. Para estos efectos, el SAG remitirá al Departamento de Sanidad Pesquera a nivel central, copia de la solicitud y protocolo de análisis correspondiente al producto biológico.

Sernapesca evaluará los antecedentes de acuerdo a lo señalado en el documento Norma Técnica FAR/NT2 y emitirá al SAG un informe, el cual podrá indicar la aprobación o rechazo de la serie evaluada.

La aprobación o rechazo de una serie se comunica al interesado mediante una Resolución que emite el SAG.



4.- APROBACIÓN DE IMPORTACIÓN, ELABORACIÓN, EXPENDIO Y USO DE PRODUCTOS SIN REGISTRO.

Cuando se solicite la elaboración, uso, importación o expendio de productos farmacéuticos de uso veterinario en especies acuícolas que no están registrados, el SAG remitirá a Sernapesca la solicitud y los antecedentes presentados por el interesado.

El Departamento de Sanidad Pesquera a nivel central, evaluará la información del producto, con el fin de emitir un pronunciamiento oficial. El informe técnico podrá indicar recomendación de aprobación de la solicitud, situación pendiente (por falta de antecedentes del producto o del protocolo) o rechazo de la solicitud.

Considerando el informe de Sernapesca, el SAG comunicará al interesado el resultado de la evaluación de los antecedentes mediante una Resolución, indicando si corresponde, condiciones especiales de uso.

Una vez emitida la Resolución que aprueba el uso del producto, el Departamento de Sanidad Pesquera remitirá a la oficina Regional de Sernapesca correspondiente, los antecedentes y las condiciones bajo las cuales se autorizó el uso del producto.

La Oficina Regional podrá considerar al menos una inspección a las instalaciones en las cuales se está utilizando el producto, con el objeto de constatar el cumplimiento de las condiciones estipuladas en la Resolución.

Efectuada la inspección, el encargado de Sanidad Pesquera remitirá un informe con lo observado a la oficina central.





PROGRAMA DE CONTROL DE FÁRMACOS

NORMA TÉCNICA SECCIÓN 2

Requisitos para la Evaluación de Productos Farmacéuticos de Uso en Acuicultura

DEPARTAMENTO DE SANIDAD PESQUERA
CHILE



INDICE

	Pág.
I.- Registro de Productos Farmacéuticos	02
II.- Aprobación de Series	03
III.- Aprobación de importación, elaboración, expendio y uso de Productos sin Registro	04
IV.- Definiciones	05
Anexo 1	07



I. REGISTRO DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

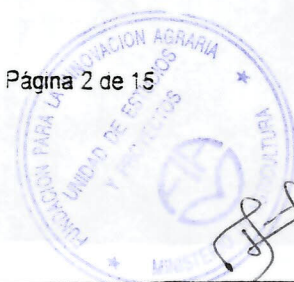
En el marco del convenio de cooperación interinstitucional suscrito con el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), cada vez que se solicite el registro de un producto farmacéutico de uso exclusivamente veterinario para animales acuáticos, el SAG requerirá la opinión técnica del Servicio Nacional de Pesca. Para esto, el SAG deberá enviar a la Dirección Nacional de Semapesca, una copia de toda la información presentada por el interesado.

Los requerimientos de información están contenidos en el Decreto N° 139 del MINAGRI y debe incluir al menos los siguientes aspectos:

- Individualización del Peticionario. Descripción del Producto. Antecedentes Químicos. Proyecto de Rotulado. Folleto de Información Técnica. Periodo de Eficacia. Principios Activos. Metodología Analítica y de Producción, Periodos de Resguardo. Límites Máximos de Residuos (LMR), Ingesta Diaria Admisible (IDA), Antecedentes de otros países (ver Anexo 1).

Para efectos de esta Norma Técnica, los principales tópicos a evaluar por Semapesca corresponden a:

- ✓ **Descripción completa del producto:** debe incluir fórmula cuali-cuantitativa, nombre genérico y de fantasía, forma farmacéutica, vía de administración, clasificación según su uso, país de elaboración, periodo de resguardo, seguridad, eficacia, precauciones de uso y condiciones de almacenamiento. Esta información deberá estar avalada por bibliografía científica.
- ✓ **Proyecto de etiqueta o rótulo:** el texto debe estar en español, sin embargo, se acepta además otro idioma si es un producto de importación; debe indicar nombre genérico y comercial si lo tuviere; forma farmacéutica, contenido, composición de la fórmula; vía de administración; Modo de empleo; Advertencias; Precauciones; condiciones de almacenamiento y conservación, nombre y domicilio del laboratorio productor o importador, fecha de expiración y Número de Registro. El rótulo además, deberá incluir las leyendas "Uso Veterinario" y "Venta bajo prescripción Médico Veterinaria".



- ✓ **Folleto de información técnica:** debe incluir los antecedentes clínicos y farmacológicos del producto, información toxicológica, precauciones de uso, condiciones de almacenamiento y periodo de resguardo recomendado.

II. APROBACIÓN DE SERIES

Además de la evaluación realizada por el SAG, Semapesca confirmará que los resultados de la serie evaluada se ajusten a los parámetros establecidos para el producto que fue aprobado para el registro.



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

III. APROBACIÓN DE IMPORTACIÓN ELABORACIÓN, EXPENDIO Y USO DE PRODUCTOS SIN REGISTRO

Para análisis de las solicitudes relativas a productos sin registro, se evaluarán, entre otros, los siguientes aspectos:

- ✓ Los riesgos que representa el uso del producto, considerando la situación sanitaria del país.
- ✓ La necesidad para el sector de disponer del producto farmacéutico solicitado.
- ✓ La seguridad del producto para los animales acuáticos en los cuales será administrado.
- ✓ El protocolo de ensayo presentado por el interesado, el cual debe ser coherente con los objetivos planteados y contener al menos: Cantidad de ejemplares sometidos al ensayo y su especie, información relativa a la empresa, condiciones de infraestructura y manejo sanitario del establecimiento donde se realizará la experiencia, médico veterinario responsable y duración del ensayo.

Estos aspectos se deberán considerar tanto para las pruebas realizadas en terreno como para los ensayos en condiciones controladas.



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

IV. DEFINICIONES:

- **Producto farmacéutico de Uso exclusivamente Veterinario:** Toda sustancia natural o sintética o mezcla de ellas que, presentada bajo una forma farmacéutica determinada, está destinada a la prevención, diagnóstico, curación, tratamiento y atenuación de las enfermedades de los animales o sus síntomas. Se incluyen en este concepto los productos destinados a medicar los alimentos, a estimular el desarrollo de los animales, los destinados al embellecimiento de los mismos, los desinfectantes de uso ambiental o de equipos y todo otro producto que utilizado en los animales o su hábitat, protege, restaura o modifica sus funciones orgánicas o fisiológicas.
- **Registro:** Procedimiento destinado a verificar la calidad, eficacia e inocuidad de un producto, que consiste en la evaluación de sus antecedentes y de su metodología analítica como apto para su uso en animales y en su incorporación en un rol especial correlativo que mantiene el SAG.
- **Etiqueta o Rótulo:** Representación gráfica que incluye la leyenda que, oficialmente aprobada, se adhiere o inscribe en el envase o prospecto que se incluye dentro o acompaña al producto.
- **Principio Activo:** Sustancia o mezcla de sustancias dotadas de efecto farmacológico específico, o bien, que sin poseer actividad farmacológica, al ser administrada al organismo adquieren dicha propiedad.
- **Excipiente:** Cualquier materia prima utilizada en la manufactura de los productos farmacéuticos de uso veterinario, excluyendo los principios activos.
- **Forma Farmacéutica:** Estado físico o forma en la cual se presenta un producto para facilitar su fraccionamiento, dosificación, administración o empleo.



- **Nombre Genérico de un Producto:** Es la denominación aceptada para éste por la Organización Mundial de la Salud bajo los distintivos y siglas "Denominaciones Comunes Internacionales" o "International Nonproprietary Names" o por farmacopeas oficialmente reconocidas en el país.
- **Fecha de Expiración:** Fecha hasta la cual el laboratorio garantiza que el producto conserva su estabilidad.
- **Productos Biológicos:** Son aquellos para cuya elaboración se recurre a sustancias originadas parcial o totalmente en procesos biológicos. Se incluyen en este rubro las vacunas, los sueros de origen animal, los antígenos, los alérgenos, los antibióticos, las hormonas y las enzimas.
- **Estabilidad:** Mantención de las especificaciones señaladas y aceptadas en la monografía de una forma farmacéutica que aseguran identidad, potencia, calidad y pureza inalterables, desde su preparación hasta la fecha de expiración.
- **Estudio de Estabilidad:** Conjunto de pruebas y ensayos a que se somete un producto, en condiciones preestablecidas y que permitirá pronosticar o establecer su periodo de eficacia.
- **Estudios Farmacocinéticos:** Ensayo "in vivo" que mediante diseños experimentales preestablecidos, permitan verificar la cinética de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los principios activos y sus metabolitos.
- **Monografía:** Descripción técnica y científica de un producto.
- **Potencia:** Actividad terapéutica de un producto para producir un efecto, verificada por ensayos de laboratorio, o por datos clínicos controlados, obtenidos a través de la administración del producto dentro de los límites aceptados y vigentes para cada uno de ellos.





ANEXO 1

Requisitos para la Evaluación de Productos Farmacéuticos de Uso en Acuicultura

I.- Antecedentes Internos Semapesca:

Fecha de Evaluación: _____

Nº de Registro SAG: _____

Nº de Carpeta Semapesca: _____

Nombre del Evaluador: _____

II.- Individualización del Peticionario:

- Titular o Representante Legal:
- Director Técnico Laboratorio:
- Fabricante o Comercializador:
- País de Elaboración:
- Observaciones:



III.- Descripción del Producto:

- Nombre Genérico:
- Nombre Comercial:
- Forma Farmacéutica:
- Clasificación Según Uso:
- Especie Blanco:
- Vía de Administración:
- Dosis / Frecuencia:
- Duración de Tratamiento:
- Período de Resguardo:
- Indicaciones de Uso:
- Contraindicaciones:
- Interacciones con otros Productos:
- Precauciones de Uso:
- Condiciones de Almacenamiento:
- Observaciones:



IV.- Antecedentes de la Solicitud:

1.- Antecedentes Químicos:

- Fórmula cuali-cuantitativa:
- Requisitos de los Ingredientes:
- Farmacopeas en las que son descritos:
- Monografía de componentes:
Para productos biológicos considerar:
Cepa semilla virus / bacteria
Linea celular
- Observaciones:

2.- Proyecto de Rotulado:

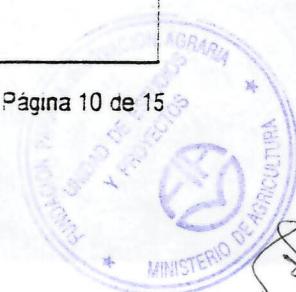
- Nombre Genérico:
- Nombre Comercial:
- Forma farmacéutica:
- Contenido:
- Composición de la Fórmula:
- Vía de Administración:



- Precauciones y Contraindicaciones:
- Condiciones de Almacenamiento y Conservación:
- Nombre y Domicilio del Laboratorio Productor o del Importador:
- Fecha de Expiración:
- Número de Registro SAG:
- Clave de Fabricación:
- Observaciones: Uso y Dosis según Prescripción Médico Veterinaria y Venta bajo Receta Médico Veterinaria.

3.- Folleto de Información Técnica:

- Antecedentes Clínicos:
- Antecedentes Farmacológicos:
- Antecedentes Toxicológicos:
- Precauciones de Almacenamiento:
- Precauciones de Uso:
- Periodo de Resguardo:
- Observaciones:

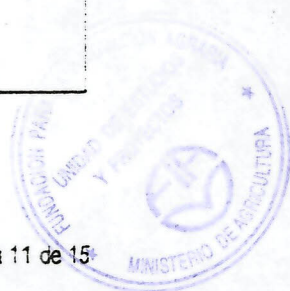


4.- Período de Estabilidad:

- Estudios de Estabilidad:
(Para productos biológicos, en varias series)
- Observaciones:

5.- Otras Evaluaciones:

- Evaluaciones de seguridad en condiciones controladas
- Evaluaciones de seguridad en condiciones de campo
- Estudios de inmunogenicidad/ eficacia en condiciones controladas
- Estudios de inmunogenicidad/ eficacia en condiciones de campo
- Observaciones:



6.- Principios Activos:

- Estándares de los Principios Activos:
- Estándares de las Cepas:
- Observaciones:

7.- Controles de Calidad

- Control de Calidad del producto en proceso
- Control de Calidad del Producto Terminado

8.- Metodología Analítica / de Producción:

Para productos biológicos considerar:

- Preparación y tratamiento de células de origen animal
- Preparación y tratamiento de virus siembra
- Preparación y tratamiento de bacterias siembra
- Producción de antígenos de cultivos virales
- Producción de antígenos de bacterianos
- Concentración
- Mezclas de Producto

9.- Periodos / Límites:

- Periodos de Resguardo:
- Límite Máximo de Residuos (LMR):
- Ingesta Diaria Admisible (IDA):
- Observaciones:

10.- Conservación:

- Naturaleza y contenido del envase:
- Eliminación del producto sin utilizar o desechos:

11.- Antecedentes de Otros Países:

- Licencia de Mandante Extranjero:
- Convenio de Fabricación o Distribución:
- Certificado de Libre Venta / Registro Sanitario:



[Handwritten signature]

▪ Observaciones:

V.- Además Para Productos Nuevos:

- Monografía Clínica y Farmacológica:
- Antecedentes sobre Manufactura y Control de Calidad:
- Estudios Selectivos en Peces:
- Estudios Selectivos en Otros Animales:
- Estudios Farmacocinéticos:
- Estudios Toxicológicos:
- Estudios Clínicos:
- Observaciones:



[Handwritten signature in blue ink]

[Handwritten signature in black ink]

VI.- Asociaciones de Medicamentos:

- Componentes Activos:

- Dosis de cada componente.
Frecuencia de administración y
Duración del tratamiento

VII.- Conclusiones y Observaciones Generales

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

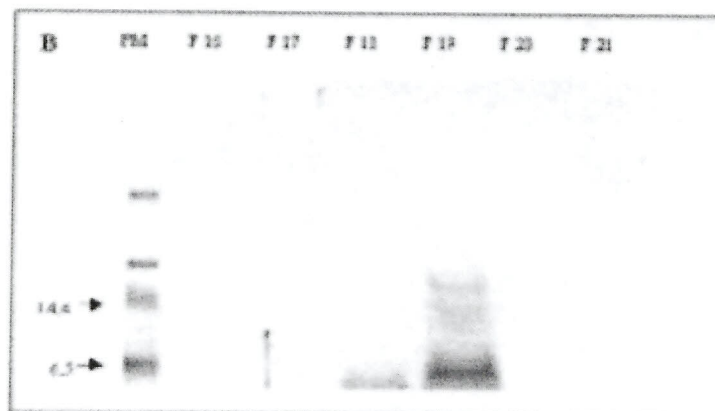
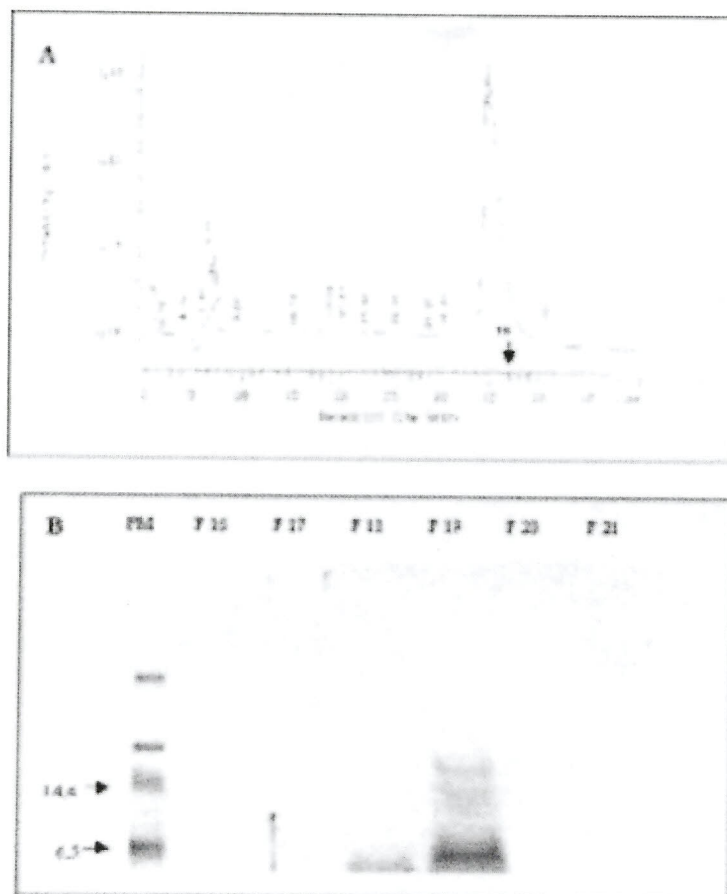


Fig A. Primera etapa de separación por HPLC en fase reversa de la fracción organelo de los hemocitos de *Mytilus chilensis*. El material contenido en la fracción eluída con 40 % de acetonitrilo (ACN) desde los cartuchos de SepPak plus C 18, fue cargado en una columna LiChrospher RP -18 (Merck) y eluída con un gradiente lineal de 5 – 60 % de acetonitrilo. La absorbancia fue monitoreada a 225 nm. Se colectaron cada dos minutos un total de 45 fracciones que se les evaluó la actividad antibacteriana en medio líquido sobre *V. anguillarum*. La flecha indica la fracción (23) que presentó actividad antibacteriana.

B. Gel de Tris tricina / urea para visualizar los péptidos de bajo peso molecular obtenidos en la primera etapa de purificación. Se muestra el perfil de péptidos obtenidos desde la fracción 19 a la 24. Es posible observar la presencia de péptidos de bajo peso molecular que están entre 8 y 4 k Da en varias de las fracciones colectadas.

Handwritten signature in blue ink.



Handwritten signature in black ink.

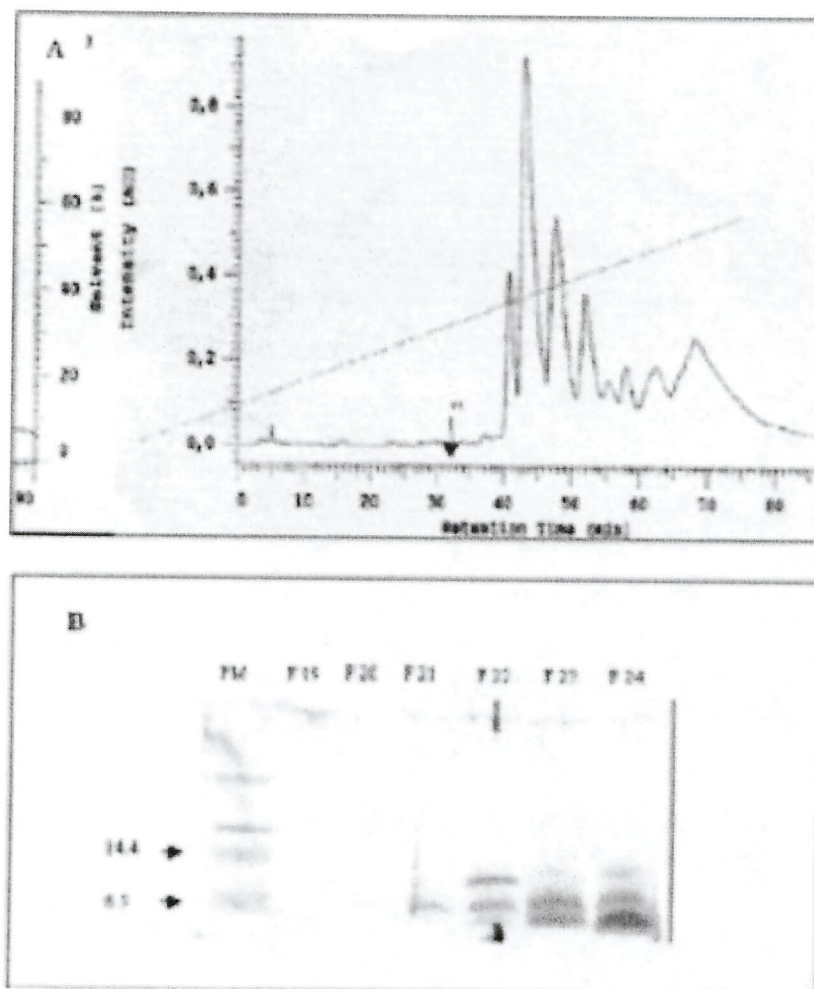
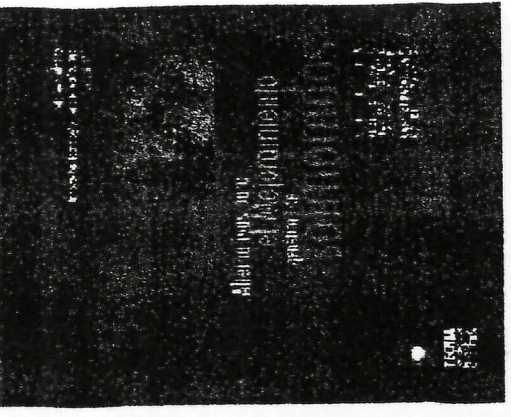
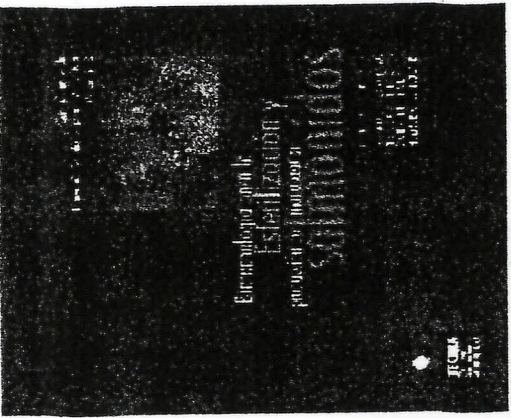
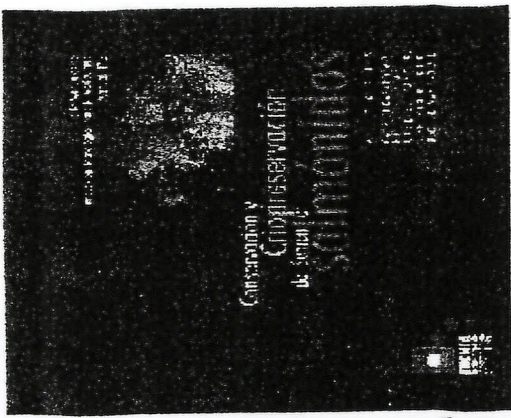
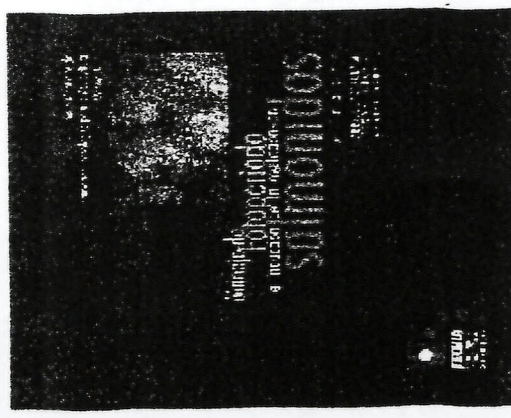


Fig. **A. Segunda etapa de separación por HPLC en fase reversa de la fracción 23.** El contenido de la fracción 23 fue cargado nuevamente en una columna C 18, pero esta vez se aplicó un gradiente bifásico de acetonitrilo que consistió en un primer gradiente de 5- 20 % durante 10 min y posteriormente un gradiente de 20 –40 % por 40 min. Se colectaron 25 fracciones cada dos minutos y se probó su actividad antibacteriana en medio líquido sobre *V. anguillarum*. Se indica con una flecha la fracción que presentó actividad antibacteriana (19).

B. Gel de Tris tricina / urea para visualizar los péptidos de bajo peso molecular obtenidos desde la fracción 23. Se muestra el perfil de péptidos obtenidos desde la fracción 16 a la 21. Es posible observar la presencia de un péptido de bajo peso molecular de 6,5 kDa aproximadamente.

Serie Manuales de Innovación Tecnológica para la Acuicultura



Precios: Un manual: \$3.500.- Dos manuales: \$6.000.- Tres manuales: \$8.500.- Cuatro manuales: \$11.000.- Se incluye el envío de los manuales en su costo. El envío de los manuales en su costo. El envío de los manuales en su costo.

[Handwritten signature]



VENTAS
Oficina de Transferencia Tecnológica
Universidad Católica de Valparaíso
Avda. Brasil 2950, Valparaíso
32-273292 Fax: 32-273437
Email: ott@ucv.cl

Handwritten signature in blue ink.



Handwritten mark or signature in black ink.