



# MODIFICACION N°1

## PLAN OPERATIVO F UPP 73 01

NOMBRE INICIATIVA:	Desarrollo de kits para evaluar la respuesta inmune innata y adaptativa de peces en ecosistemas dulceacuícolas: una oportunidad para llegar al mercado con vacunas efectivas
EJECUTOR:	UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
CODIGO:	PYT-2011-0047
FECHA:	19.01.2012

---

FIRMA POR FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

---

FIRMA POR EJECUTOR (Coordinador Principal)

## CONTENIDO

I. PLAN DE TRABAJO TÉCNICO .....	3
A. Antecedentes Generales .....	3
B. Plan de Trabajo .....	6
C. Costos y Dedicación.....	31
D. Fichas Curriculares.....	35
E. Indicadores Minagri.....	44

## A. PLAN DE TRABAJO TÉCNICO

### A. Antecedentes Generales

#### 1. Nombre Ejecutor (Entidad Responsable)

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

#### 2. Identificación de Agentes Asociados

Nombre	Giro / actividad	RUT	Representante(s) Legal(es)
Laboratorio de Diagnóstico GAM, S.A.	Asesoría, consultoría y comercialización en diagnóstico molecular		Esteban Vicente Huerta Gutiérrez
Activaq S.A	Asesoría, investigación, desarrollo y comercialización de productos biológicos y fármacos veterinarios en el área de salud animal		Geraldine Mlynarz Zylberberg

#### 3. Coordinadores Principal y Alterno

Nombre	Formación / grado académico	Empleador	Función dentro del proyecto
Carmen Mónica Imarai Bahamonde	Bioquímico. Doctor en Ciencias Biológicas	Universidad de Santiago de Chile	Coordinadora Principal
Marcelo Andrés Cortez San Martín	Doctor en Ciencias	Universidad de Santiago de Chile	Coordinador Alterno

#### 4. Duración y ubicación del Proyecto

Duración		Período de ejecución	
Meses	24	Fecha de inicio	01-09-2011
		Fecha de término	31-08-2013
Territorio			
Región (es)		Comuna (as)	
Metropolitana		Estación Central	

5. Estructura de financiamiento		Valor	%
FIA			
Contraparte	Pecuniario		
	No Pecuniario		
	Total contraparte		
TOTAL			

## 6. Resumen ejecutivo (máximo 400 palabras)

Los peces en cultivo están constantemente amenazados por innumerables patógenos que afectan directamente la productividad. La búsqueda de soluciones por parte de la industria farmacéutica y de alimentos de truchas y salmones se traduce en un desarrollo cada vez mayor de vacunas, fármacos e inmunoestimulantes, con una variada oferta de productos que mueve grandes cantidades de recursos. Sin embargo, las vacunas otorgan una protección que fluctúa entre el 40% y 70% en el mejor de los casos, y no existen las herramientas apropiadas y suficientes para evaluar su efectividad en cuanto al tipo de inmunidad que inducen o debieran inducir para proteger, limitando por tanto el desarrollo de estrategias de mejoramiento. Las vacunas son evaluadas por los niveles de protección que inducen frente a un desafío con el patógeno (sobrevivencia) y/o mediante la determinación de anticuerpos totales o neutralizantes. Este tipo de evaluación es parcial porque no se evalúan los efectos sobre la inmunidad celular, que incluyen los mecanismos fundamentales para lograr protección de los individuos y no permite realizar mejoras basadas en el conocimiento de estos mecanismos de protección.

En este proyecto se propone desarrollar kits basados en la cuantificación de citoquinas y en la producción de anticuerpos específicos de linfocitos T de salmónidos para evaluar la respuesta inmune innata y adaptativa en los peces de ecosistemas dulceacuícolas. Estos kits serán utilizados para evaluar la inmunidad desarrollada por vacunas disponibles en el mercado.

En particular, se propone: (i) desarrollar un kit para evaluar la respuesta inmune innata mediante la cuantificación de citoquinas, (ii) producir un kit para la evaluación de la respuesta inmune adquirida mediada por linfocitos T CD4, utilizando anticuerpos policlonales, (iii) desarrollar anticuerpo monoclonal para evaluar la respuesta inmune adquirida mediada por linfocitos T CD8 y (iv) llevar a formato comercializable un anticuerpo monoclonal dirigido contra linfocitos T CD8+.

La estructura de los ejecutores de esta propuesta es clave para concretar la generación de valor del conocimiento científico: un grupo de investigadores expertos en inmunología dedicados al estudio de la inmunidad en peces y una empresa prestadora de servicios de análisis molecular, comprometida desde hace más de 10 años con el desarrollo tecnológico en la industria de la salmicultura.

La propuesta se proyectó a 2 años con el fin de obtener en este periodo los siguientes productos: un kit comercial para evaluación de la respuesta inmune innata de uso en salmones y truchas, un kit comercial para evaluar la respuesta inmune celular (adquirida) mediada por linfocitos T CD4 en salmones y truchas, un método para evaluar la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8+ (citotóxicos), un anticuerpo monoclonal anti-CD8 comercializable para evaluar respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos de salmones y truchas.

7. Propiedad Intelectual

¿Existe interés por resguardar la propiedad intelectual?	Si	<input checked="" type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>
Nombre institución que la protegerá	% de participación			
Universidad de Santiago de Chile	75,5			
ACTIVAQ , S.A.	24,5			

**B. Plan de Trabajo**

1. Objetivos

Objetivo general	
Desarrollar kits comerciales para evaluar la respuesta inmune innata y adaptativa de peces en ecosistemas dulceacuícolas.	
Nº	Objetivos específicos (OE)
1	Desarrollar un kit para evaluar la respuesta inmune innata mediante la cuantificación de citoquinas.
2	Desarrollar un kit para la evaluación de la respuesta inmune adquirida mediada por linfocitos T CD4, utilizando anticuerpos policlonales.
3	Desarrollar anticuerpo monoclonal para evaluar la respuesta inmune adquirida mediada por linfocitos T CD8.
4	Llevar a formato comercializable el anticuerpo monoclonal anti-CD8

2. Resultados esperados (RE)

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicadores de RE			Fecha de Cumplimiento
			Indicador de cumplimiento	Línea base (valor actual)	Meta proyecto (valor deseado)	
1	1.1	Diseño del kit				30-10-2011
1	1.2	Obtención de los plásmidos para cada gen recombinante, secuencia verificada y curvas de calibración rango eficiencia establecido				31-01-2012
1	1.3	Obtención de formatos y tecnologías óptimas para el kit comercial y puesta a punto de protocolos para detección de respuesta innata				31-04-2012
1	1.4	Obtención kit prototipo comercial para evaluar respuesta inmune innata en salmónidos				31-08-2012
1	1.5	Difusión				31-08-2012

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicadores de RE			Fecha de Cumplimiento
			Indicador de cumplimiento	Línea base (valor actual)	Meta proyecto (valor deseado)	
2	2.1	Diseño del kit				31-11-2011
2	2.2	Producción de un lote de anticuerpos policlonales anti CD4+ específicos, isotipo IgG y alto rendimiento				30-07-2012
2	2.3	Obtención de los plásmidos recombinantes, secuencia verificada y curvas de calibración rango eficiencia establecido				30-05-2012
2	2.4	Obtención de formatos y tecnologías óptimas kit comercial y puesta a punto de protocolos para detección de citoquinas				31-01-2013

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicadores de RE			Fecha de Cumplimiento
			Indicador de cumplimiento	Línea base (valor actual)	Meta proyecto (valor deseado)	
2	2.5	Obtención del Kit prototipo comercial para evaluar respuesta inmune adquirida T CD4 en salmónidos utilizando				30-07-2013
2	2.6	Difusión				30-06-2013
2	2.7	Ensayo de evaluación de vacunas basados en la activación de linfocitos T CD4+				30-06-2013

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicadores de RE			Fecha de Cumplimiento
			Indicador de cumplimiento	Línea base (valor actual)	Meta proyecto (valor deseado)	
3	3.1	Clonamiento y expresión del gen CD8 $\alpha$ de Salmo salar				30-11-2011
3	3.2	Obtención de la proteína recombinante CD8 $\alpha$ + purificada				28-02-2012
3	3.3	Inmunización de ratones y obtención de linfocitos respondedores				30-05-2012
3	3.4	Obtención de un anticuerpo monoclonal anti-CD8a+ de salmón				30-10-2012
3	3.5	Producción de un lote de anticuerpos anti-CD8 purificado con calidad certificada.				28-02-2013
3	3.6	Método de evaluación de la activación de linfocitos T citotóxicos CD8+				28-02-2013

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicadores de RE			Fecha de Cumplimiento
			Indicador de cumplimiento	Línea base (valor actual)	Meta proyecto (valor deseado)	
4	4.1	Contar con un proveedor del servicio de producción de los anticuerpos monoclonales				31-01-2013
4	4.2	Producción de un lote de anticuerpos monoclonales anti CD8+ específicos, isotipo IgG y de buen título				30-08-2013
4	4.3	Producción del anticuerpo en formato comercial				30-08-2013
4	4.4	Difusión				30-08-2013
1,2, 4	5	Comercialización				30-08-2014

### 3. Actividades

Nº OE	Nº RE	Actividades	Fecha de inicio	Fecha de término
1	1.1	Definir componentes que se incluirán en el kit para evaluar expresión de los genes Mx, IFN $\alpha$ IFN $\gamma$ mediante PCR tiempo real.	01-09-2011	30-10-2011
1	1.1	Definir formato versátil para ser usado según necesidad de los clientes en relación a la aplicación, número de determinaciones, etc.	01-09-2011	30-10-2011
1	1.1	Lograr el menor costo, manteniendo la calidad de los componentes	01-09-2011	30-10-2011
1	1.1	Definir el envase e insumos en formato apropiado para mantener calidad durante el transporte, y asegurar tiempo de vida útil.	01-09-2011	30-10-2011
1	1.2	Producir plásmidos recombinantes de Mx, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$	01-09-2011	30-12-2011
1	1.2	Verificar las secuencias de los genes mediante secuenciación	01-09-2011	30-12-2011
1	1.2	Obtener protocolos con perfiles térmicos que se reflejen en óptima eficiencia	01-11-2011	31-01-2012
1	1.2	Lograr una eficiencia de las curvas de calibración de PCR en tiempo real para cada plásmido en rango 90-110%	01-11-2011	31-01-2012
1	1.3	Seleccionar tecnología, metodología y/o protocolo óptimo de extracción de RNAs desde tejido de salmónidos	01-02-2012	31-03-2012
1	1.3	Definir protocolos óptimos de PCR en tiempo real para la determinación de la expresión de Mx, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ (concentraciones, perfiles térmicos) a partir del RNA extraído desde tejidos de salmónidos	01-03-2012	31-05-2012
1	1.3	Definir formato óptimo para distintos insumos considerando condiciones de transporte verificando experimentalmente eficacia	01-03-2012	31-04-2012
1	1.4	Elección de los envases óptimos para cada uno de los insumos que formaran parte del kit	01-05-2012	31-06-2012
1	1.4	Diseño y producción de caja y etiquetas de la calidad requerida según condiciones de transporte y almacenamiento definidas	01-06-2012	30-07-2012

1	1.4	Definir protocolos para mantención de insumos y asegurar su calidad por el tiempo que se indique	01-06-2012	30-07-2012
1	1.4	Desarrollo del manual de procedimiento	01-07-2012	31-08-2012
1	1.4	Obtener el kit comercial de evaluación de respuesta inmune innata	01-07-2012	31-08-2012
1	1.5	Difusión a través de medios impresos, web y charlas	01-07-2012	31-08-2012

Nº OE	Nº RE	Actividades	Fecha de inicio	Fecha de término
2	2.1	Definir componentes que se incluirán en el kit para evaluar expresión de citoquinas IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ e IL10 desde población de linfocitos T CD4+ mediante PCR tiempo real	01-10-2011	31-11-2011
2	2.1	Definir formato versátil para ser usado según necesidad de los clientes en relación a la aplicación, número de determinaciones, etc.	01-10-2011	31-11-2011
2	2.1	Lograr el menor costo, manteniendo calidad de los componentes	01-10-2011	31-11-2011
2	2.1	Definir envase e insumos en formato apropiado para mantener calidad durante el transporte, y asegurar tiempo de vida útil.	01-10-2011	31-11-2011
2	2.2	Buscar de proveedores para producción de anticuerpos policlonales anti CD4 y selección por calidad, costos y robustez del servicio	01-11-2011	31-11-2011
2	2.2	Producción de un lote de anticuerpos policlonales con el proveedor seleccionado	01-12-2011	30-07-2012
2	2.2	Analizar el anticuerpo purificado por ELISA para definir especificidad, isotipo y título	01-05-2012	30-07-2012
2	2.2	Determinar la eficacia en ensayo de inmunoseparación magnética de células CD4+ de trucha, corroborando la identidad de las células inmunoseparadas mediante RT-PCR.	01-05-2012	30-07-2012
2	2.2	Definir el método de almacenamiento para máxima estabilidad del anticuerpo	01-07-2012	30-07-2012
2	2.3	Producir plásmidos recombinantes de IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , IL10 y CD4	01-02-2012	30-05-2012
2	2.3	Verificar las secuencias de los genes mediante secuenciación	01-02-2012	30-05-2012
2	2.3	Obtener protocolos con perfiles térmicos que se reflejen en óptima eficiencia	01-03-2012	30-05-2012
2	2.3	Obtener una eficiencia de las curvas de calibración de PCR en tiempo real para cada plásmido en rango 90-110%	01-05-2012	30-05-2012
2	2.4	Seleccionar tecnología, metodología y/o protocolo óptimo para obtención de población de linfocitos T CD4+ desde tejido de salmónidos	01-06-2012	30-09-2012
2	2.4	Seleccionar tecnología, metodología y/o protocolo óptimo para extracción de RNAs desde la población celular TCD4+ para la determinación de expresión de las citoquinas mediante PCR en tiempo real.	01-06-2012	31-01-2013
2	2.4	Definir protocolos óptimos de PCR en tiempo real para la determinación de la expresión de las 4 citoquinas (concentraciones, perfiles térmicos) y para CD4 a partir del RNA extraído desde población celular	01-10-2012	31-01-2013
2	2.4	Definir formato óptimo para insumos considerando condiciones de transporte y evaluar experimentalmente eficacia	01-11-2012	31-01-2013

Nº OE	Nº RE	Actividades	Fecha de inicio	Fecha de término
2	2.5	Elección de los envases óptimos para cada uno de los insumos que formaran parte del kit	01-02-2013	28-03-2013
2	2.5	Diseño y producción de caja y etiquetas de la calidad requerida según condiciones de transporte y almacenamiento definidas	01-03-2013	31-06-2013
2	2.5	Definir protocolos para mantención de insumos y asegurar su calidad por el tiempo que se indique	01-05-2013	31-06-2013
2	2.5	Desarrollo de manual de procedimientos	01-06-2013	30-07-2013
2	2.5	Obtener el kit de evaluación de respuesta inmune adquirida	01-06-2013	30-07-2013
2	2.6	Difusión a través de medios impresos, web y charlas	01-04-2013	30-05-2013
2	2.7	Diseño y realización de un experimento de evaluación de la respuesta inmune adaptativa en truchas o salmones vacunados y controles, comparando dos vacunas de uso actual en el mercado, una de ellas conocida por su excelente nivel de protección.	01-03-2013	30-05-2013
2	2.7	Identificación del estado de diferenciación alcanzado en la población de células CD4+ del bazo de peces tratados y controles utilizando el kit comercial.	01-03-2013	30-05-2013
3	3.1	Obtener por amplificar el gen de la proteína CD8a de salmón del Atlántico	01-09-2011	31-11-2011
3	3.1	Clonar el gen y obtener bacterias transformadas	01-09-2011	31-11-2011
3	3.1	Obtener el plásmido recombinante CD8a+	01-09-2011	31-11-2011
3	3.1	Verificación de la identidad del fragmento clonado por secuenciación	01-09-2011	31-11-2011
3	3.2	Subclonamiento del gen CD8a en un vector de expresión	01-12-2011	28-02-2012
3	3.2	Verificación de la identidad del fragmento subclonado por secuenciación	01-12-2011	28-02-2012
3	3.2	Obtención de bacterias transformantes que expresen la proteína CD8a+	01-12-2011	28-02-2012
3	3.2	Purificación la proteína recombinante CD8a+ mediante resina Ni+ Agarosa y geles de poliacrilamida	01-12-2011	28-02-2012
3	3.3	Inmunización de al menos 5 ratones con la proteína recombinante CD8a+	01-03-2012	30-05-2012
3	3.3	Evaluación de la respuesta en el suero mediante ELISA	01-03-2012	30-05-2012
3	3.3	Selección de los ratones respondedores y obtención de linfocitos inmunes del bazo	01-03-2012	30-05-2012

Nº OE	Nº RE	Actividades	Fecha de inicio	Fecha de término
3	3.4	Fusión celular y cultivo de hibridomas por dilución límite en medio de selección HAT	01-06-2012	30-10-2012
3	3.4	Selección de hibridomas positivos mediante ELISA con la proteína recombinante y citometría de flujo	01-06-2012	30-10-2012
3	3.4	Expansión de hibridomas positivos y almacenamiento	01-06-2012	30-10-2012
3	3.4	Subclonamiento de hibridomas, caracterización y selección de los clones más estables y que producen la mayor cantidad de anticuerpo (evaluación por ELISA y citometría de flujo)	01-06-2012	30-10-2012
3	3.4	Amplificación y secuenciación de los genes que codifican la inmunoglobulina de uno de los hibridomas seleccionados	01-06-2012	30-10-2012
3	3.5	Producción de líquido ascítico	01-11-2012	31-02-2013
3	3.5	Purificación de IgG específicas	01-11-2012	31-02-2013
3	3.5	Determinar especificidad y título del lote de anticuerpo purificado por ELISA y citometría	01-11-2012	31-02-2013
3	3.6	Selección de un método sencillo, sensible y reproducible para la evaluación de la activación de linfocitos T citotóxicos CD8+	01-11-2012	31-02-2013
3	3.6	Estandarización y validación del método de análisis	01-11-2012	31-02-2013
3	3.6	Elaboración del protocolo del método	01-11-2012	31-02-2013
3	3.7	Diseño y desarrollo de un experimento de evaluación de la respuesta inmune adaptativa en truchas o salmones vacunados y controles, comparando dos vacunas de uso actual en el mercado, una de ellas conocida por su excelente nivel de protección.	01-11-2012	31-02-2013
3	3.7	Identificación del estado de activación de la población de células CD8+ del bazo de peces tratados y controles utilizando el anticuerpo comercial.	01-03-2013	30-05-2013
3	3.8	Ensayo de evaluación de vacunas basados en la activación de linfocitos T CD8+	01-03-2013	30-05-2013

Nº OE	Nº RE	Actividades	Fecha de inicio	Fecha de término
4	4.1	Búsqueda de proveedores para producción de anticuerpos monoclonales anti CD8 y selección por calidad, costos, y robustez del servicio	01-12-2012	31-01-2013
4	4.1	Definir estrategia de producción a partir de hibridoma, sobrenadante de cultivo, líquido ascítico, considerando eficiencia, calidad y costos	01-12-2012	31-01-2013
4	4.2	Producción de un lote de anticuerpos monoclonales	01-02-2013	30-07-2013
4	4.2	Caracterización del lote: especificidad e isotipo	01-07-2013	30-07-2013
4	4.2	Determinación de la estabilidad del anticuerpo y de las condiciones de almacenamiento y transporte	01-07-2013	30-07-2013
4	4.3	Determinar el formato para la comercialización de anticuerpos monoclonales anti CD8+; en cuanto al envase, medio y condiciones de transporte y almacenamiento óptimos	01-06-2013	30-07-2013
4	4.3	Diseñar y producir el envase y etiquetas	01-07-2013	30-07-2013
4	4.3	Diseñar hoja técnica	01-07-2013	30-07-2013
4	4.3	Obtener el anticuerpo en formato para comercializar en el mercado nacional e internacional	01-08-2013	31-08-2013
4	4.4	Evento de Lanzamiento de productos	01-07-2013	31-08-2013

4. Hitos Críticos

Nº RE	Hitos críticos	Fecha Cumplimiento
1.2	Obtención de los plásmidos para cada citoquina, secuencia verificada y curvas de calibración rango eficiencia establecido (respuesta innata)	31-01-2012
1.3	Obtención formatos y tecnologías óptimas del kit comercial y puesta a punto de protocolos para detección respuesta innata	31-04-2012
2.2	Producción de un lote de anticuerpos policlonales anti CD4+ específicos, isotipo IgG y alto rendimiento	30-07-2012
2.3	Obtención de los plásmidos para cada citoquina, secuencia verificada y curvas de calibración rango eficiencia establecido (respuesta adquirida)	30-05-2012
2.4	Obtención de formatos y tecnologías óptimas kit comercial y puesta a punto de protocolos para detección de citoquinas	31-01-2013
2.7	Kit comercial evaluado en cuanto a su capacidad de caracterizar el tipo de respuesta adquirida producida por una vacuna	30-05-2013
3.2	Obtención de la proteína recombinante CD8 $\alpha$ + purificada	28-02-2012
3.4	Obtención de anticuerpo monoclonal anti-CD8 de peces salmónidos	30-10-2012
3.5	Producción de un lote de anticuerpos anti-CD8 purificado con calidad certificada	28-02-2013

## 5. Método

Objetivo N° 1	<b>Desarrollar un kit para evaluar la respuesta inmune innata mediante la cuantificación de citoquinas.</b>
<p>Para lograr este objetivo se subcontratará a terceros el servicio de asesorías especializadas para establecer las tecnologías apropiadas para producir a nivel de prototipo un kit comercial para determinar los niveles de expresión de Interferón tipo I (IFN-I), Mx e, Interferón gamma (IFN-<math>\gamma</math>). La técnica de cuantificación ha sido estandarizada. Brevemente, la cuantificación del número de transcritos de las citoquinas se hace mediante PCR de tiempo real (qPCR) utilizando curvas estándares construidas con cantidades conocidas del gen clonado (IFN-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math> y Mx). La reacción de PCR se lleva a cabo usando SYBR Green, perfiles térmicos previamente definidos y un set de partidores diseñados para la amplificación de cada gen en qPCR a partir de RNA total obtenido de bazos de salmón.</p> <p>El prototipo se diseñará para ser producido posteriormente en escala, incluyendo envase, diseño, manual de procedimientos, etc.</p> <p>Para evaluar el kit, se trabajará con muestras de peces obtenidos en centros productivos. Grupos controles y experimentales se sacrificarán y se obtendrán los bazos a partir de los cuales se preparará RNA. Se procederá según lo indicado en el protocolo o manual para cuantificar la expresión de las citoquinas. Los datos se analizarán mediante ANOVA, el número de peces por grupo será de al menos 30 individuos.</p>	

Objetivo N° 2	<b>Desarrollar un kit para la evaluación de la respuesta inmune adquirida mediada por linfocitos T CD4, utilizando anticuerpos policlonales.</b>
<p>Al igual que en el objetivo anterior se subcontratará a terceros el servicio de asesorías especializadas para adaptar el desarrollo científico y establecer los formatos y tecnologías requeridos para el desarrollo de un kit comercial (prototipo listo para ser producido en escala). Los componentes del kit se basarán en investigación básica previamente realizada, a partir de la cual se evaluarán alternativas tecnológicas óptimas. Se producirá antisueros en conejo basados en la estrategia de producción ya probada y evaluada. Los anticuerpos serán purificados en columna de proteína G-Sepharose a partir del suero de los conejos inmunizados. Se analizará la especificidad en western blott utilizando el péptido conjugado a BSA o la proteína recombinante y mediante citometría de flujo con células que expresen la proteína CD4. Además, se evaluará la potencia para inmunoseparar leucocitos T CD4+ de bazo de salmones y truchas. Los ensayos se realizarán en muestras de al menos 10 ejemplares de peces de 5-10. Se espera que el anticuerpo capture un número tal de células que produzcan al menos 5 ug de RNA. Estos anticuerpos se incluirán en el kit, en una concentración que se estandarizará para este lote. Se incluirá en el kit, los componentes en formatos óptimos para evaluar las citoquinas de interés, es decir, IFN-<math>\gamma</math>, TGF-<math>\beta</math>1, e IL-10. Al igual que en el punto anterior, se usarán las condiciones ya estandarizadas en el desarrollo de la investigación previa. Los análisis de cuantificación de la expresión de estas citoquinas se realizarán mediante qPCR cuantitativo. Para evaluar el kit, se trabajará con 30 a 60 peces de grupos controles y experimentales (vacunados). Los peces se sacrificarán y obtendrán los bazos, los que se disgregarán e incubarán con el anticuerpo del kit. Se procederá según lo indicado en el protocolo o manual para cuantificar la expresión de las citoquinas. Los datos se analizarán mediante ANOVA.</p>	

Objetivo N° 3	<b>Desarrollar anticuerpo monoclonal para evaluar la respuesta inmune adquirida mediada por linfocitos T CD8</b>
<p>Se clonará el gen CD8<math>\alpha</math> de <i>Salmo salar</i> en el vector pET y se transformarán bacterias <i>E. coli</i> BL21 para expresar y purificar la proteína, la que se utilizará para inmunizar 5 ratones Balb/c según protocolos clásicos. Se verificará producción de anticuerpos anti-CD8 mediante ELISA y Western blot utilizando la proteína recombinante. Los ratones con el mejor título se sacrificarán y usarán para obtener linfocitos del bazo y realizar la fusión con la línea celular mieloide según protocolos clásicos. Los hibridomas serán seleccionados en medio HAT. Se analizarán los sobrenadantes de los hibridomas obtenidos mediante ELISA para expandir aquellos que den reacción positiva. Los hibridomas seleccionados serán expandidos y criopreservados para su posterior análisis y uso. Se purificará una cantidad suficiente de los anticuerpos de mejor reactividad y se analizará su capacidad de reconocer y diferenciar una población linfocitaria mediante citometría de flujo. La caracterización de las células que los anticuerpos reconocen se realizará en base al tamaño y granulosidad que muestren las células de reactividad positiva en el citómetro, en base a su reactividad negativa con un anticuerpo anti-IgM y la expresión de marcadores de linfocitos T detectados mediante RT-PCR después de la separación de la población positiva por inmunoseparación magnética o cell sorting. Con el mejor anticuerpo se estandarizará un protocolo de cuantificación de linfocitos T CD8+.</p>	

Objetivo N° 4	<b>Llevar a formato comercializable el anticuerpo monoclonal anti-CD8.</b>
<p>El anticuerpo que muestre las mejores características para los ensayos de detección de células CD8+, será purificado en cantidades suficientes para producir un lote de anticuerpos comercializable. Se incluirá un protocolo de uso del anticuerpo para el análisis de células derivadas de salmones y truchas.</p> <p>Se estima que el anticuerpo podrá ser embazado en volúmenes de 50 a 100 reacciones, en un medio de transporte que permita estabilidad a 4°C. Se indicará en una ficha técnica las características de especificidad y un ejemplo de uso.</p> <p>Se elaborará y firmará un acuerdo comercial entre la USACH y Activaq y un acuerdo con distribuidores internacionales para la comercialización del anticuerpo. A nivel nacional se realizará un evento de lanzamiento para dar a conocer el producto y sus usos en la industria de la salmonicultura.</p>	





Nº OE	Nº RE	Actividad/Hito Crítico	2011				2012				2013								
			3		4		1		2		3		4						
			J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N
2	2.1	<b>Diseño del kit de respuesta inmune adquirida</b>				X	X												
2	2.1	Definir componentes que se incluirán en el kit para evaluar expresión de citoquinas IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ e IL10 desde población de linfocitos T CD4+ mediante PCR tiempo real				X	X												
2	2.1	Definir formato versátil para ser usado según necesidad de los clientes en relación a la aplicación, número de determinaciones, etc.				X	X												
2	2.1	Lograr el menor costo, manteniendo calidad de los componentes				X	X												
2	2.1	Definir envase e insumos en formato apropiado para mantener calidad durante el transporte, y asegurar tiempo de vida útil.				X	X												
2	2.2	<b>Producción de los anticuerpos anti-CD4</b>				X	X	X	X	X	X	X	X	X					
2	2.2	Buscar de proveedores para producción de anticuerpos policlonales anti CD4 y selección por calidad, costos y robustez del servicio				X													
2	2.2	Producción de un lote de anticuerpos policlonales con el proveedor seleccionado				X	X	X	X	X	X	X	X						
2	2.2	Analizar el anticuerpo purificado por ELISA para definir especificidad, isotipo y título								X	X	X							
2	2.2	Determinar la eficacia en ensayo de inmunoseparación magnética de células CD4+ de trucha, corroborando la identidad de las células inmunoseparadas mediante RT-PCR.								X	X	X							
2	2.2	Definir el método de almacenamiento para máxima estabilidad del anticuerpo									X								
2	HITO	<b>Producción de un lote de anticuerpos policlonales anti CD4+ específicos, isotipo IgG y alto rendimiento</b>										H							
2	2.3	<b>Producción de los componentes</b>						X	X	X	X								
2	2.3	Producir plásmidos recombinantes de IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , IL10 y CD4						X	X	X	X								





Nº OE	Nº RE	Actividad/Hito Crítico	2011					2012					2013																
			3			4		1			2		3			4		1			2		3			4			
			J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S
3	3.1	<b>Clonamiento y expresión del gen CD8<math>\alpha</math> de <i>Salmo salar</i></b>		X	X	X																							
3	3.1	Obtener por RT-PCR el gen de la proteína CD8 $\alpha$ de salmón del Atlántico		X	X	X																							
3	3.1	Clonar el gen y obtener bacterias transformadas		X	X	X																							
3	3.1	Obtener el plásmido recombinante CD8 $\alpha$ +		X	X	X																							
3	3.1	Verificación de la identidad del fragmento clonado por secuenciación		X	X	X																							
3	3.2	<b>Subclonamiento del gen CD8<math>\alpha</math> en un vector de expresión</b>					X	X	X																				
3	3.2	Verificar la identidad del fragmento subclonado por secuenciación					X	X	X																				
3	3.2	Obtención de bacterias transformantes que expresen la proteína CD8 $\alpha$ +					X	X	X																				
3	3.2	Purificar la proteína recombinante CD8 $\alpha$ mediante resina Ni+ Agarosa y geles de poliacrilamida					X	X	X																				
3	HITO	<b>Obtención de la proteína recombinante CD8<math>\alpha</math>+</b> <b>purificada</b>							H																				
3	3.3	<b>Inmunización de al menos 5 ratones con la proteína recombinante CD8<math>\alpha</math>+</b>								X	X	X																	
3	3.3	Evaluación de la respuesta en el suero mediante ELISA								X	X	X																	
3	3.3	Selección de los ratones respondedores y obtención de linfocitos inmunes del bazo								X	X	X																	
3	3.4	<b>Obtención y evaluación de hibridomas</b>										X	X	X	X	X													
3	3.4	Fusión celular y cultivo de hibridomas por dilución límite en medio de selección HAT										X	X	X	X	X													
3	3.4	Selección de hibridomas positivos mediante ELISA con la proteína recombinante y citometría de flujo										X	X	X	X	X													
3	3.4	Expansión de hibridomas positivos y almacenamiento										X	X	X	X	X													
3	3.4	Subclonamiento de hibridomas, caracterización y selección de los clones más estables y que producen la mayor cantidad de anticuerpo (evaluación por ELISA y citometría de flujo)										X	X	X	X	X													
3	3.4	Amplificación y secuenciación de los genes que codifican la inmunoglobulina de uno de los hibridomas seleccionados										X	X	X	X	X													
3	HITO	<b>Obtención de anticuerpo monoclonal anti-CD8 de</b>																											



Nº OE	Nº RE	Actividad/Hito Crítico	2011			2012						2013								
			3			4			1		2		3		4					
			J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
4	4.1	<b>Contar con un proveedor del servicio de producción de los anticuerpos monoclonales</b>																		
4	4.1	Búsqueda de proveedores para producción de anticuerpos monoclonales anti CD8 y selección por calidad, costos, y robustez del servicio																		
4	4.1	Definir estrategia de producción a partir de hibridoma, sobrenadante de cultivo, líquido ascítico, considerando eficiencia, calidad y costos																		
4	4.2	<b>Producción de anticuerpos monoclonales CD8+ y evaluación de lotes</b>																		
4	4.2	Producción de un lote de anticuerpos monoclonales																		
4	4.2	Caracterización del lote: especificidad e isotipo																		
4	4.2	Determinación de la estabilidad del anticuerpo y de las condiciones de almacenamiento y transporte																		
4	4.2	Producción de un lote de anticuerpos monoclonales anti CD8+ específicos, isotipo IgG y de buen título																		
4	4.3	<b>Producción del anticuerpo en formato comercial</b>																		
4	4.3	Determinar el formato para la comercialización de anticuerpos monoclonales anti CD8+; en cuanto al envase, medio y condiciones de transporte y almacenamiento óptimos																		
4	4.3	Diseñar y producir el envase y etiquetas																		
4	4.3	Diseñar hoja técnica																		
4	4.3	Obtención de un anticuerpo monoclonal anti CD8 en formato para comercializar en el mercado nacional e internacional																		
4	4.4	<b>Difusión</b>																		
4	4.4	Evento de Lanzamiento de productos																		

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

Ejecutor(es) / Asociado(s)	Función y responsabilidad
Carmen Mónica Imarai Bahamonde	Coordinación general de las actividades del proyecto, vinculación con la empresa y asesores, es responsable del presupuesto y su ejecución y de la elaboración de los informes.
Geraldine Mlynarz Zylberberg	Responsable de la marketing y comercialización de los kits y anticuerpos. Responsable del presupuesto de Activaq.
Marcelo Andrés Cortez San Martín	Coordinador alternativo, estar a cargo de la evaluación de vacunas utilizando los productos del proyecto.
Sergio Eduardo Guajardo Leiva	Encargado del trabajo de laboratorio destinado a la producción de los componentes y tecnologías óptimas para los kits y del desarrollo de los manuales de procedimientos.
Sebastián Reyes Cerpa	Encargado del desarrollo de anticuerpos monoclonales, evaluación de los mismos y del desarrollo de nuevos métodos de análisis.
Carolina Pérez Páez (Bioquímico)	Trabajo de laboratorio asociado al desarrollo de los Kits.

7. Actividades de Difusión Programadas (según el proyecto corresponde a esto)

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Perfil de los participantes	Medio de Invitación
Junio-Julio 2013	Puerto Varas	Evento de lanzamiento de los productos	100	Representantes de Productores de salmón, farmacéuticas veterinarias y empresas de alimento.	Publicación en Diario, Página Web CBA, Revista Aqua, Correo electrónico, etc.

## C. Costos y Dedicación

### 1. Cuadro de costos totales consolidado

Ítem	Sub Ítem	Total	Aporte FIA	Aporte contraparte		Total
				Pecuniario	No pecuniario	
Recursos humanos	Coordinadora Principal: Carmen Imarai					
	Coordinador Alterno: Marcelo Cortez					
	Equipo Técnico: Geraldine Mlynarz					
	Equipo Técnico: Sergio Guajardo					
	Equipo Técnico: Carolina Pérez					
	Equipo Técnico: Sebastián Reyes					
	Personal Apoyo y técnico					
	Mano de Obra					
Equipamiento						
Infraestructura (menor)						
Viáticos y movilización						
Materiales e insumos						
Servicios de terceros						
Difusión						
Capacitación						
Gastos generales						
Gastos de administración						
Imprevistos						
<b>Total</b>						

2. Fuentes de financiamiento de contraparte

Agente Participante	Monto en \$		Total
	Pecuniario	No Pecuniario	
USACH			
DIAGNOTECH			
ACTIVAQ			

3. Aportes de contraparte

Ítem	Sub Ítem	Ejecutor USACH	Asociado 1 DIAGNOTECH	Asociado2 ACTIVAQ	Total
Recursos humanos	Coordinador Principal: Carmen Imarai				
	Coordinador Alterno: Marcelo Cortez				
	Equipo Técnico: Geraldine Mlynarz				
	Equipo Técnico: Sergio Guajardo				
	Equipo Técnico: Carolina Pérez Paez,				
	Equipo Técnico: Sebastián Reyes:				
	Personal de apoyo y técnico				
	Mano de Obra				
Equipamiento					
Infraestructura (menor)					
Viáticos y movilización					
Materiales e insumos					
Servicios de terceros					
Difusión					
Capacitación					
Gastos generales					
Gastos de administración					
Imprevistos					
<b>Total</b>					

4. Tiempos de dedicación del equipo técnico.

Nombre	Rut	Cargo dentro del proyecto	Nº de resultado sobre el que tiene responsabilidad	Nº de Meses de dedicación	Período dd/mm/aa - dd/mm/aa	Horas/Mes
Carmen Mónica Imarai Bahamonde		Coordinador	1,2,3,4	24	01/09/2011-31/08/2013	32
Marcelo Cortez San Martín		Coord. alternativo	1,2,3,4	24	01/09/2011-31/08/2013	24
Sebastián Reyes Cerpa		Investigador	3,4	24	01/09/2011-31/08/2013	180
Geraldine Mlynarz		Comercialización de productos y Administración-Finanzas del Proyecto	Todos excepto 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6	24	01/09/2011-31/08/2013	32
Sergio Eduardo Guajardo Leiva		Project Manager	Todos excepto 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 5	24	01/09/2011-31/08/2013	90
Carolina Pérez Páez		Investigador	Todos excepto 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 5	24	01/09/2011-31/08/2013	180



## D. Fichas curriculares

### 1. Ficha del Ejecutor (entidad responsable)

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

### 2. Ficha representante(s) Legal(es) del Ejecutor (entidad responsable)

Nombre	JUAN MANUEL
Apellido paterno	ZOLEZZI
Apellido materno	CID
RUT	
Cargo en la organización	Rector
Género	Masculino
Etnia (2)(clasificación al final del documento)	
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	
Firma del representante legal	

3. Ficha del Asociado N°1. (Repetir esta información por cada asociado)

Nombre o razón social	LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO GAM, S.A. (Diagnotec, S.A.)			
Giro / Actividad	Asesoría, consultoría y comercialización en diagnóstico molecular			
RUT				
Tipo de entidad (1)	Instituciones o entidades Privadas			
Ventas totales (nacionales y exportaciones) de la empresa durante el año pasado, indique monto en UF en el rango que corresponda	<b>Micro empresa</b> (menos de 2400 UF/año)	<b>Pequeña</b> (2.401 a 25.000 UF/año)	<b>Mediana</b> (25.001 a 100.000 UF/año)	<b>Grande</b> (más de 100.001 UF/año)
Exportaciones, año 2010 (US\$)				
Número total de trabajadores				
Usuario INDAP (sí / no)				
Dirección (calle y número)				
Ciudad o Comuna				
Región	Región Metropolitana			
País	Chile			
Teléfono fijo				
Fax				
Teléfono celular				
Email				
Dirección Web	www.diagnotec.cl			

Ficha del Asociado N°2. (Repetir esta información por cada asociado)

Nombre o razón social	ACTIVAQ S.A.			
Giro / Actividad	Asesoría, investigación , desarrollo y comercialización de productos biológicos y fármacos veterinarios en el área de salud animal			
RUT				
Tipo de entidad (1)	Instituciones o entidades Privadas			
Ventas totales (nacionales y exportaciones) de la empresa durante el año pasado, indique monto en UF en el rango que corresponda	<b>Micro empresa</b> (menos de 2400 UF/año)	<b>Pequeña</b> (2.401 a 25.000 UF / año)	<b>Mediana</b> (25.001 a 100.000 UF / año)	<b>Grande</b> (más de 100.001 UF / año)
Exportaciones, año 2010 (US\$)				
Número total de trabajadores				
Usuario INDAP (sí / no)				
Dirección (calle y número)				
Ciudad o Comuna				
Región	Región Metropolitana			
País	Chile			
Teléfono fijo				
Fax				
Teléfono celular				
Email				
Dirección Web				

4. Ficha representante(s) Legal(es) de Asociado(s) N°1. Repetir esta información por cada asociado

Nombre	GERALDINE
Apellido paterno	MLYNARZ
Apellido materno	ZYLBERBERG
RUT	
Cargo en la organización	Gerente
Género	Femenino
Etnia (2) (clasificación al final del documento)	
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	
Firma del representante legal	

5. Fichas de los Coordinadores

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

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

6. Ficha Equipo Técnico. Se deberá repetir esta información por cada profesional del equipo técnico

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

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

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

Nombres	SEBASTIAN ANDRES	
Apellido paterno	REYES	
Apellido materno	CERPA	
RUT		
Profesión		
Empresa/organización donde trabaja	UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE	
RUT de la empresa/organización		
Cargo o actividad que desarrolla en ella		
Si es investigador responda	Horas totales dedicadas al proyecto	Valor total de las horas dedicadas al proyecto (\$)
Dirección laboral (calle y número)		
Ciudad o Comuna		
Región	Metropolitana	
País	Chile	
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Género	Masculino	
Etnia (2) (clasificación al final del documento)		
Tipo (3) (clasificación al final del documento)	Profesional	
Firma		

## E. Indicadores Solicitados por el Ministerio de Agricultura

### 7. Cuantificación e identificación de Beneficiarios directos de la iniciativa

Género	Masculino		Femenino		Subtotal
	Pueblo Originario	Sin Clasificar	Pueblo Originario	Sin Clasificar	
Etnia					
Agricultor micro-pequeño					
Agricultor mediano-grande					50 *
Subtotal					50
Total					50

\*20 empresas salmoneras, 5 Empresas de nutrición y 25 empresas de vacunas

### 8. Indicadores Solicitados por el Ministerio de Agricultura

¿Su proyecto tiene que ver con la venta de algún producto o servicio?				Si	X	No	
Si su respuesta es <b>sí</b> , refiérase a los siguientes indicadores relacionados con el proyecto:							
Indicador	Línea base (valor actual)	Meta proyecto (valor deseado)	Fecha de Cumplimiento				
Nivel de Ventas (\$)*			09/2014				
Costos (\$)			09/2014				
Mano de Obra			09/2014				

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

\*\* : El primer año de ventas luego de terminado el proyecto se considera "etapa de introducción de los productos", por lo que para estimar ventas se consideró el año 1 en régimen a partir del segundo año de terminado el proyecto.

#### (2) Etnia

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

#### (3) Tipo

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