

INFORME TECNICO Y DE GESTIÓN FINAL

EJECUTOR:

Nombre	UNIVERSIDAD DE SANTIAGO
Giro	EDUCACIÓN
Rut	
Representante Legal	Juan Manuel Zolezzi

NOMBRE DEL PROYECTO: Plataforma para la producción in situ de proteínas con actividad estimulante de la respuesta inmune en Salmónidos

CODIGO: PYT 2012-0056

Nº INFORME: FINAL

PERIODO: desde 15 de Agosto de 2012 hasta 30 Septiembre de 2015

NOMBRE Y FIRMA COORDINADOR PROYECTO

Nombre	Mario Tello Reyes
Rut	
Firma	

I. RESUMEN EJECUTIVO

El presente proyecto **Plataforma para la producción *in situ* de proteínas con actividad estimulante de la respuesta inmune en Salmónidos**, proponía el desarrollo de un sistema que permita la estimulación del sistema inmune de Salmónidos mediante la administración de bacterias ácido lácticas que secretaran péptidos inmunoestimulantes. Un sistema de estas características disponible para la Salmonicultura, permitiría aumentar la competitividad de esta industria pues reduciría los costos asociados al proceso de vacunación, pérdidas debido a patógenos virales y/o bacterianos, y permitiría una rápida respuesta frente a brotes, pues al estar enfocado en el sistema inmune del pez prescindiría del desarrollo de estudios específicos del patógeno, necesarios previo al desarrollo de vacunas. Además facilitaría la aplicación debido a su bajo costo de producción y su administración oral junto con el alimento, reduciría el stress ocasionado los procesos de inmunoestimulación actualmente utilizados. Para del desarrollo de este proyecto se escogió como péptido inmunoestimulante a Interferón I de *Salmo salar* y como bacteria ácido láctica a *Lactococcus lactis*. La funcionalidad de este sistema se evaluaría por la capacidad de estimular *in vivo* e *in vitro* la respuesta antiviral medida a través de la expresión de genes marcadores (Mx y PKR) y por la capacidad de conferir resistencia a la mortalidad ocasionada por la infección con IPNV. Durante el desarrollo del proyecto se clonó en un vector carente de resistencia a antibiótico (pNZ8149) un casete que contiene el gen de interferón, con el péptido de secreción USP45 bajo el control del promotor P1. Mediante este sistema se logró producir 913 ng de Interferón I por dosis (10^7 UFC) superando en un 82 % la meta propuesta. El interferón producido por *Lactococcus lactis* logró por dosis estimular *In vitro* la expresión de los genes marcadores en: 252 veces para Mx, 63 veces para PKR y reducir la carga viral 300 veces superando en 12,6 y 6,2 y 3 veces las metas propuestas respectivamente. *In vivo*, la administración de *Lactococcus lactis* productor de interferón junto con el alimento logró estimular la respuesta inmune de los peces en 85000 veces en bazo y 10 en riñón. Esta estimulación decae rápidamente una vez que se deja de administrar la bacteria. También se determinó que *In vivo*, la administración de *Lactococcus lactis* productor de interferón reduce la carga viral hasta en un 80%, mostrando ser un sistema exitoso y efectivo de estimulación de la respuesta antiviral en salmónidos. La capacidad de conferir resistencia a la mortalidad ocasionada por IPNV fue evaluada mediante ensayo de desafío, sin embargo no se pudo concluir su efecto pues las cepas de virus IPN no ocasionaron mortalidad en los peces utilizados. Pruebas pilotos de escalamiento productivo mostraron la factibilidad de producir a gran escala y a precios competitivos el producto. En fermentaciones se alcanzado un total de 150 millones de dosis/m³, a un precio estimado de 0.03 pesos la dosis. Los resultados de este proyectos fueron difundidos en dos reuniones científicas nacional, dos reuniones científicas internacionales y una actividad con productores de Salmónidos, teniendo buena aceptación por parte de los concurrentes. Estudios realizados por la USACH indican que el producto obtenido por el desarrollo del proyecto es factible de ser protegido mediante una patente. Por lo tanto se está resolviendo el envío de la patente previo al licenciamiento a la empresa ActivaQ. Como conclusión se puede indicar que el proyecto alcanzó la mayor parte de los objetivos propuestos originalmente, logrando desarrollar un producto de interés para la Salmonicultura nacional, el cual está siendo protegido por parte de la USACH, y que posteriormente será licenciado a la empresa contraparte del proyecto.

II. TEXTO PRINCIPAL

1. Breve resumen de la propuesta, con énfasis en objetivos, justificación del proyecto, metodología y resultados e impactos esperados.

La salmonicultura es una de las actividades económicas más importantes para Chile. En 2014, este rubro se posicionó como la tercera actividad económica, logrando un valor de exportaciones equivalente a 4.200 millones de dólares (<http://www.subpesca.cl/prensa/601/w3-article-88695.html>)[1]. A pesar de que Chile es considerado el segundo productor mundial de Salmónidos, su participación en el mercado ha disminuido en los últimos 8 años, pasando del 35% en 2008 al 27% en 2014[2], solo superado por Noruega el cual ha ocupado entre el 42% y 52% del mercado en este periodo. Esta reducción ha sido ocasionado principalmente por la presencia de brotes de patógenos virales y bacterianos, que ocasionan grandes mortalidades. Como ejemplo, en 2008 el brote de virus ISA provocó el cierre del 90% de los centros productores. En la actualidad SRS e IPNV son responsables de $\approx 90\%$ de las mortalidades secundarias en Salmon Atlántico. La alta prevalencia de infecciones bacterianas y virales se debe en parte a la poca efectividad que muestran las vacunas utilizadas en Salmonicultura, las cuales muestran una protección máxima de 4 meses, necesitando de sucesivas aplicaciones para mantener un adecuado nivel de inmunoestimulación. El stress asociado al proceso de vacunación también disminuye su efectividad. Por otra parte el sistema inmunológico del pez muestra una memoria inmunológica de corto plazo. El elevado costo del proceso de vacunación, desincentiva la aplicación periódica de las vacunas, lo cual contribuye a la generación de nuevos brotes[3]. Esto implica que para la adecuada protección de los salmónidos es necesario contar con un sistema que permita una inmunoestimulación de amplio espectro, sucesiva, tanto de la respuesta inmune primaria como secundaria, de fácil aplicación, de bajo costo de producción y de rápida respuesta frente a nuevos patógenos. El presente proyecto planteaba crear una plataforma para la expresión de proteínas con actividad inmunoestimulante sobre Salmónidos. Esta plataforma estaría dada por el uso de bacterias ácido lácticas (*Lactococcus lactis*) que mediante la incorporación de un plasmidio carente de resistencia a antibióticos permitiría la expresión y liberación de péptidos inmunoestimulante. Para validad esta plataforma se escogió a Interferón I de *Salmo salar* como péptido pues confiere una actividad antiviral de amplio espectro (respuesta inmune antiviral), por otra parte *Lactococcus lactis* al actuar como probiótico, también estimularía la respuesta inmune antibacteriana. Para desarrollar este proyecto se propuso como objetivo general “Desarrollar una plataforma que permita la expresión *in situ* de proteínas recombinantes con propiedades terapéuticas sobre *Salmo salar*, específicamente la expresión de Interferón I por su propiedad inmunoestimuladora, de modo de, optimizar la eficiencia del uso de antibióticos y de vacunas aplicadas actualmente.” Como objetivos específicos se propusieron: 1.-Establecer en *Lactococcus lactis* un sistema de expresión y liberación de Interferón I por sus propiedades inmunoestimulantes sobre *Salmo salar*. 2.-Validar *in vitro* las propiedades biológicas y funcionalidad del Interferón I producido por la cepa recombinante de *Lactococcus lactis*. 3.- Validar *in vivo*, sobre *Salmo salar*, las propiedades terapéuticas e inmunoestimulantes de la cepa de *Lactococcus lactis* productora de Interferón I, y 4.- Realizar la transferencia tecnológica para la producción de las cepas de

Lactococcus lactis productoras de Interferón I, con fines de comercialización. Para realizar el OE1 se propuso diseñar un vector carente de resistencia a antibiótico, en el cual se clonaría el gen de Interferón I optimizado codogénicamente a *Lactococcus lactis*, fusionado al péptido líder de la proteína USP45 para permitir su secreción. Se utilizaría un promotor constitutivo y la expresión de la proteína se evaluaría mediante western-blot o ELISA. El OE2 se lograría evaluando en cultivo celular la capacidad del interferón I producido por *Lactococcus lactis* de inducir la expresión de genes de respuesta a Interferón (Mx y PKR) y de reducir la replicación viral. La expresión de Mx y PKR se evaluaría mediante RT-Q-PCR y el efecto sobre la replicación mediante la cuantificación (RT-Q-PCR) de la carga viral en infecciones con IPNV. El OE3 evaluaría el efecto de la administración en la dieta de *Lactococcus lactis* productor de interferón sobre la expresión de Mx y PKR, carga viral y sobrevivencia a la infección viral con IPNV. La inducción de la expresión de Mx y PKR se evaluaría en los órganos inmunológicos (Bazo y Riñón) mediante el uso de RT-Q-PCR. El efecto antiviral se evaluaría sobre la capacidad de reducir la carga viral en los órganos inmunológicos del Salmón evaluada mediante RT-Q-PCR y mediante ensayos de desafío utilizando peces (*Salmo salar*) infectados con IPNV. Para lograr el OE4 se contemplaría evaluar la factibilidad de realizar escalamiento productivo de *L-lactis* productor de Interferón I, evaluar la capacidad de liofilizados de *Lactococcus lactis* productor de interferón de inducir in vitro la expresión de Mx y PKR (Evaluada por RT-Q-PCR), realizar tres actividades de difusión y realizar transferencia tecnológica a ACTIVAQ mediante licenciamiento.

Los principales resultados a obtener en el proyecto serían: 1.- Obtener una plataforma que permita estimular el sistema inmune de salmónidos mediante la administración de *Lactococcus lactis* productores de péptidos inmunoestimulantes, 2.- Un prototipo de probiótico que incremente la sobrevida de Salmónidos a infecciones virales y/o reduzca su carga viral, 3.- Licenciamiento a ActivaQ para la producción y/o comercialización del prototipo generado. El impacto esperado en el área de la Salmonicultura es desarrollar un probiótico inmunoestimulante que permite disminuir las mortalidades ocasionadas por brotes de diversos virus, y reducir la inmunosupresión ocasionada por la prevalencia de virus IPNV en salmónidos cultivados, logrando ocupar al cabo de 5 años, el 5% de un mercado aproximado de . US\$8.500.000

2. Cumplimiento de los objetivos del proyecto:

- **Descripción breve de los resultados ESPERADOS VERSUS LOS OBTENIDOS, comparación con los objetivos planteados, y razones que explican las discrepancias (ANÁLISIS DE BRECHA)**
- **Descripción breve de los impactos obtenidos**

El primer objetivo específico "Establecer en *Lactococcus lactis* un sistema de expresión y liberación de Interferón I por sus propiedades inmunoestimulantes sobre *Salmo salar*" planteaba desarrollar un vector de expresión carente de resistencia a antibióticos, capaz de expresar la proteína interferón I en *Lactococcus lactis*. Durante su ejecución se esperaba como resultado esperado (RE1) Una plataforma que permita la expresión y liberación de Interferón I, la cual proponía dos indicadores, uno I_b/I_o que evaluaba la expresión de Interferón mediante geles de agarosa, y el segundo que evaluaba la cantidad de interferón producido. Para el caso del primer indicador se esperaba alcanzar un valor >10 y para el segundo indicador alcanzar una cantidad igual o superior a $500 \text{ ng}/10^7 \text{ UFC}$. Para lograr este objetivo se propuso originalmente construir un vector carente de resistencia a antibiótico, reemplazando en el plasmidio pNZ8148 el casete de resistencia a Cloranfenicol por un sistema genético que permitiera utilizar sacarosa como fuente de carbono. A pesar de los múltiples intentos no fue posible clonar el casete para metabolizar sacarosa en pNZ8148 y además la cepa hospedera mostró cierta capacidad de utilizar sacarosa como única fuente de carbono. Para sortear este problema se optó por el vector comercial pNZ8149 que no contiene resistencia a antibióticos y permite su selección en la cepa NZ3900, utilizando lactosa como única fuente de carbono. El gen de interferón fue sintetizado *in vitro*, optimizado para su expresión en *Lactococcus lactis* junto con el péptido líder USP45 y el promotor P1. El gen de interferón I sintetizado *in vitro* fue clonado exitosamente en pNZ8149. Para permitir su detección se agregó mediante PCR una cola de Histidina (6x HisTag) en el carboxilo terminal. Usando esta construcción bajo condiciones de inducción de la expresión con Nisina 10 nm , se logró un valor de I_b/I_o equivalente a 81 superando en 8,1 veces la meta propuesta. La cuantificación mediante ELISA permitió determinar que se logró producir una cantidad de 913 ng de interferón, superando en 1,8 veces la meta propuesta.

El segundo Objetivo planteaba "Validar *in vitro* las propiedades biológicas y funcionalidad del Interferón I producido por la cepa recombinante de *Lactococcus lactis*". Este Objetivo planteaba como Resultados esperados (RE2) "Proteínas recombinantes producidas por *Lactococcus lactis* con propiedades inmunoestimuladoras, activa biológicamente y funcionalmente *ex vivo*". Para evaluar el cumplimiento de este resultado esperado se utilizarían como indicadores la capacidad de "Estimulación de la respuesta a interferón en cultivo celular de salmón", la "Bioactividad del interferón sobre la expresión de los genes Mx y PKR", y la "Resistencia a la infección por IPN virus". Para el primer indicador se propuso para el gen Mx y PKR una meta de 20 E, lográndose obtener para Mx un valor de 252 E y para PKR un valor de 63 E, ambos valores superan las metas propuestas. En el caso del segundo indicador se propuso como meta valores de 6 UA tanto para Mx como para PKR., lográndose obtener valores de 13 UA para Mx y 11 UA para PKR. Como se aprecia en ambos casos de

superó la meta propuesta. Para el tercer indicador, se planteó una reducción de la carga viral equivalente a un 99,9% es decir la carga viral debía reducirse en al menos 1000 veces en aquellos cultivos pre-tratados con interferón. Nuestros resultados mostraron que bajo las condiciones analizadas en el proyecto se logró reducir como máximo la carga viral en un 99,7% lo que equivale a alcanzar la meta propuesta en un 99,79%. A pesar de no alcanzar la meta propuesta, se logró reducir efectivamente la carga viral en los cultivos tratados con Interferón producido por *Lactococcus lactis*. Este valor máximo se logró luego de 168 horas de cultivo, tiempo en el cual se puso fin al experimento, sin embargo, la progresión de la infección viral en los cultivos tratados con interferón indicaba que la carga viral debería disminuir aún mas, esto implica que probablemente la meta propuesta se lograría después de las 168 horas post infección.

El tercer objetivo específico planteaba “Validar *in vivo*, sobre *Salmo salar*, las propiedades terapéuticas e inmunoestimulantes de la cepa de *Lactococcus lactis* productora de Interferón I” para este objetivo específico se planteó como resultado esperado obtener “Cepas recombinantes de *Lactococcus lactis* que luego de ser administradas oralmente a *Salmo salar*, permitan la expresión de interferón *in situ* inmunoestimulándolo”, para evaluar el cumplimiento de este resultado esperado, se establecieron dos indicadores: 1.- “Inmunoestimulación del pez”, la cual sería evaluada por la capacidad de estimular la expresión de Mx y PKR, y 2.- Generar “resistencia a la infección por IPNV”. Se planteó como meta estimular la expresión de Mx y PKR en 20 veces y generar una resistencia a la infección que permitiera la sobrevivencia de al menos un 65%. Nuestros experimento permitieron estimular como máximo la respuesta de Mx en 85000 veces, y la respuesta a PKR en 10 veces. Para el caso de Mx se alcanzó el valor propuesto, superándolo varias veces. Para el caso de PKR se logró la estimulación solo 10 veces, aunque menor a lo esperado, el gen de PKR codifica para una enzimas cuyos niveles de inducción de expresión son mucho menores a Mx. El producto del gen Mx se requiere que interactúe directamente con el RNA viral por lo tanto su nivel de inducción debe ser mayor para contrarrestar la replicación viral. En literatura, para PKR se observan niveles de inducción *in vivo* entre 6 y 30 veces, por esa razón en la formulación del proyecto se escogió valor intermedio de 20 como meta propuesta. Basado en esto a pesar de no lograr el valor propuesto se considera exitosa la estimulación de PKR.

Respecto a la resistencia a infecciones por IPNV, se planteó el indicador de sobrevida como una prueba directa de la funcionalidad del producto para evitar muertes ocasionadas por infecciones virales. Se propuso IPNV, pues es un virus ubicuo, de impacto en la acuicultura, y factible de ser manejado en laboratorio. Otros indicadores para evaluar la resistencia a infecciones virales podría ser el efecto de la bacteria productora de interferón sobre el título viral. Se desarrollaron tres experimentos de desafío en el cual no se logró mortalidad producto de la infección viral, esto a pesar de realizar experimento de animalización para incrementar la virulencia de los aislados de IPNV. Cómo no se logró producir mortalidad con IPNV en peces, se procedió a usar como marcador alternativo el efecto de la administración de la bacteria productora de interferón sobre el título viral en peces infectados con IPNV. Usando esta aproximación se logró reducir en un 80% la carga viral, lo que equivale a una reducción de 5 veces. Experimentos utilizando vacunas orales han mostrado una reducción de 12,25 veces en la carga viral como consecuencia del proceso de vacunación[4]. Considerando que

esta reducción se logra con un solo tratamiento, es esperable que la aplicación de 2 tratamientos podría disminuir la carga viral en 25 veces superando los resultados de vacunas orales o inyectables [4].

Respecto al objetivo específico 4 “Realizar la transferencia tecnológica para la producción de las cepas de *Lactococcus lactis* productoras de interferón I, con fines de comercialización” se estableció como resultado esperado la “Producción a escala piloto de *Lactococcus lactis* productor de Interferón I” Se establecieron dos indicadores: 1.- Escalamiento productivo piloto, 2.- Evaluación de la producción y actividad de interferón producido por *Lactococcus lactis*, 3.- Transferencia a ActivaQ de protocolos y cepas para el crecimiento a escala piloto de *Lactococcus lactis* productor de Interferón I, y 4.- Difusión de resultados. El primer indicador proponía alcanzar una densidad de cultivo a 600 nm de 1,5, para producir 10 millones de dosis por m³ de medio cultivado. Nuestros resultados de escalamiento usando el servicio de la empresa Biopolis nos permitieron alcanzar una OD de 14,2 lo que se traduce en alrededor de 150 millones de dosis por m³, superando ampliamente la meta propuesta (Anexo I). Respecto al segundo indicador se propuso lograr una expresión de Interferón que alcance unos 500 ng por dosis, el cual se traduciría en una señal de interferón de al menos 10 veces superior respecto a la bacteria no productora de interferón. Con actividades de estimulación (E) para Mx y PKR superiores a 20 y con una bioactividad tanto para Mx o PKR superiores a 6UA. La administración del liofilizado no logró estimular la respuesta de Mx y solo estimulo la respuesta a PKR en 3 veces. La cantidad de interferón producido no pudo ser evaluado por la carencia de anticuerpos contra Interferón I, los cuales recién están disponibles a partir de Enero de 2016. La ausencia de estímulo por parte de la bacteria liofilizada probablemente se deba a los efectos metabólicos del proceso de liofilización sobre la bacteria que impide que exprese adecuadamente el interferón I al interior del tracto gastrointestinal. Por otra parte la fermentación de la bacteria se realizó en ausencia de Nisina, y se dejo solo a cargo del promotor P1. Probablemente la actividad del promotor P1 no es suficiente para alcanzar los niveles de interferón necesarios para alcanzar un efecto biológico. Nuestros resultados también apuntan a que sería necesario estimular con Nisina la expresión de Interferón durante el proceso de fermentación.

El tercer resultado esperado proponía como indicador obtener al menos una “Autorización para la comercialización de *Lactococcus lactis* productor a Interferón I”. Por normativa de la USACH, toda licencia de algún producto desarrollado en la universidad de Santiago, tiene que pasar por un proceso de protección de propiedad intelectual. El 31 de Diciembre se presento en la INAPI la solicitud de patente N° 3797-2015, titulada "Bacteria ácido láctica transformada para producir IFN, plasmidio, alimento probiótico para peces que la comprende, método para inmunoestimular peces y método para preparar alimento probiótico", en la cual la empresa ActivaQ tiene una participación del 20%. El último resultado esperado del cuarto objetivo específico contempla las actividades de difusión. Se plantearon inicialmente difundir los resultados obtenidos en 2 presentaciones nacionales cada uno con más de 300 participantes, 1 presentación internacional en una reunión que congregara a más de 1000 personas, y un seminario en el cual participarán empresas dedicadas al cultivo de salmones. Todas las metas propuestas en este ítem se cumplieron a cabalidad.

3. Aspectos metodológicos del proyecto:

3.1.- Descripción de la metodología efectivamente utilizada.

Objetivo 1: Establecer en *Lactococcus lactis* un sistema de expresión y liberación de Interferón I por sus propiedades inmunoestimulantes sobre *Salmo salar*. Mediante síntesis *in vitro* de DNA, enzimas de restricción y clonamiento en el vector pNZ8149, se generó una construcción que contiene: 1.- el origen dependiente de la proteína A (RepA), 2.- El gen de Interferón I de *S. salar* (optimizado al uso de codones de *L. lactis*), bajo el promotor P1 (constitutivo) de *L. lactis* y fusionado en marco con el péptido líder de la proteína USP45. 3.- Una cola de Histidina fusionada al carboxilo terminal del interferón (3.5.1, 3.5.2, 3.5.3). El plasmidio se transformó mediante electroporación sobre *L. lactis* NZ3900 y seleccionado por su capacidad de conferir crecimiento en medio M17 suplementado con lactosa 0,5% (3.5.4, 3.5.5, 3.5.6, 3.5.7). Se evaluó la producción de Interferón I mediante western blot y ensayos de ELISA, utilizando extractos de proteínas totales de *L. lactis* conteniendo el gen de Interferón I, versus extractos de proteínas de *L. lactis* carentes del plasmidio (3.5.8, 3.5.9, 3.5.10, 3.5.11).

Objetivo2: Validar *in vitro* las propiedades biológicas y funcionalidad del Interferón I producido por la cepa recombinante de *Lactococcus lactis*. A partir de cultivos de *Lactococcus lactis* NZ3900 que expresa Interferón I se prepararon extractos proteicos del citoplasma los cuales fueron utilizados para estimular cultivos de células de Salmón CHSE214 a diferentes cantidades (10, 100 y 500 ng) . Mediante RT-PCR en tiempo real se evaluó la expresión de los genes Mx y PKR los cuales incrementan su expresión en presencia de Interferón I funcional. Estos datos se utilizaron para calcular los valores de E_{PKR} y E_{Mx} que miden el grado de Estimulación de respuesta a interferón I por cada ml que contiene 10^7 UFC de bacteria. La funcionalidad del interferón también se determinó calculando su Bioactividad (UA) respecto a la inducción de la expresión de Mx y/o PKR. Como control negativo se utilizó extractos proteicos provenientes de *Lactococcus lactis* NZ3900 y como control positivo células estimuladas con poli I:C (3.5.12, 3.5.13).

Para determinar si el interferón recombinante confiere un estado resistente a la infección viral, se evaluó el efecto del interferón sobre el título viral de IPNV en cultivos de células CHSE214. La células fueron pretratadas con interferón y posteriormente infectados con IPNV a una moi de 0,1. El título viral se evaluó mediante RT-qPCR. Como control negativo se uso extractos proteicos de *Lactococcus lactis* NZ3900, y como control positivo poli I:C. El grado de protección se estableció como el porcentaje de inhibición de replicación de IPNV $I^{IPNV} = 100 - Ripnv \times 100$ donde Ripnv es la razón entre el título viral obtenido en las células tratadas con interferón versus el título observado en cultivos CHSE214 sin tratar ($Ripnv = UFP(es)/UFP(c)$) (3.5.14, 3.5.15, 3.5.16).

Objetivo 3: Validar *in vivo*, sobre *Salmo salar*, las propiedades terapéuticas e inmunoestimulantes de la cepa de *Lactococcus lactis* productora de Interferón I. Se estimó el grado de estimulación de los peces evaluando la expresión de Mx y PKR en los tejidos inmunológicos (Riñon, Bazo). Grupos de 15 peces de 10 gr fueron alimentados durante 5 días con 10^7 UFC por día de *Lactococcus lactis* productor de Interferón I (3.5.17).

Una vez iniciado el experimento se sacrificaron peces 1, 3 y 10 días post tratamiento a los cuales se extrajo RNA total de los tejidos indicados. Mediante real time se evaluó la expresión de Mx y PKR (3.5.18).

La resistencia a la infección se evaluó mediante ensayos de desafío (3.5.21) y analizando la carga viral presente en los órganos inmunológicos (bazo y riñón) en peces tratados con la bacteria productora de interferón e infectados con IPNV (3.5.19, 3.5.22, 3.5.23). En ambos casos grupos de 15 peces, fueron alimentados durante 5 días con 10^7 UFC/día de *L. lactis* productor de interferón I. Para los ensayos de desafío se realizaron experimentos de animalización para incrementar la virulencia del aislado utilizado (3.5.20).

Objetivo4. Realizar la transferencia tecnológica para la producción de las cepas de *Lactococcus lactis* productoras de interferón I, con fines de comercialización. Un paso crítico para alcanzar una producción de bajo costo consistió en incrementar las densidades de los cultivos de *Lactococcus lactis*, el cual depende del pH del Medio. El escalamiento a escala piloto fue realizado en la compañía Bipolis SA, la cual optimizó las condiciones de cultivo (3.5.25). Se analizó la sobrevivencia de las bacterias liofilizadas mediante el método de la microgota (3.5.26). A partir del liofilizado se prepararon extractos proteicos mediante sonicación (3.5.27). Estos extractos fueron utilizados para estimular *in vitro* células CHSE214, evaluando la expresión de Mx y PKR, mediante RT-qPCR. Los valores de expresión fueron utilizados para calcular E_{Mx} , E_{PKR} , UA_{Mx} y UA_{PKR} (3.5.28). Los liofilizados fueron también utilizados para estimular *in vivo* la expresión de Mx y PKR. Grupos de 10 peces de 20 gr fueron tratados con alimentos suplementado con 10^7 UFC de la bacteria productora de interferón liofilizada. Luego de 5 días de tratamiento, los peces fueron sacrificados a los días 1, 3 y 10 post infección. A partir de los órganos inmunológicos se extrajo RNA total, el cual fue utilizado para realizar reacciones de RT-qPCR (5.3.29).

3.2.- Principales problemas metodológicos enfrentados

3.2.1.- Generación de una plataforma basada en la construcción de un plasmidio que confiere la capacidad de crecer en sacarosa como única fuente de carbono. Una de las primeras actividades consistía en desarrollar un nuevo vector que confiriera la capacidad de crecer en presencia de sacarosa. A pesar de que el casete necesario para metabolizar sacarosa fue sintetizado *in vitro* exitosamente, el casete no pudo ser clonado en el vector pNZ8148. Solo se logró obtener clones que contenían alguna de las regiones del casete que confiere la capacidad de metabolizar sacarosa. Por otra parte aunque en literatura se reporta que *Lactococcus lactis* no puede metabolizar sacarosa, determinamos que bajo las condiciones que se realizaron estos estudios, la cepa NZ9000 crece eficientemente usando sacarosa como única fuente de carbono, situación que imposibilitó generar el nuevo plasmidio, siendo reemplazado por el vector pNZ8149.

3.2.2 Bajos niveles de expresión de proteínas. Originalmente se pensó (basado en la literatura) que *Lactococcus lactis* era un buen productor de proteínas recombinantes, donde sería posible visualizar la sobreexpresión de proteínas mediante SDS-PAGE teñidos con azul de coomasie o plata, tal como ocurre en *Escherichia coli*. Sin embargo los niveles de expresión de proteínas resultaron bajos (aun cuando se optimizó codogénicamente el gen de interferón). No se pudo observar diferencias a nivel del patrón de proteínas expresadas en las bacterias que contenían el sistema productor de interferón respecto a aquellas que no lo tiene. Esta situación razón por la cual fue necesario usar otro método, como western blot e inducción con nisina para incrementar la detección. La ausencia de anticuerpos contra interferón de salmón obligó a modificar el gen de tal manera de introducir un epítipo en el carboxilo terminal que pudiera ser reconocido por anticuerpos disponibles comercialmente.

3.2.3.- Susceptibilidad de peces a la infección con IPNV. El proyecto planteaba determinar mediante ensayos de desafío la actividad antiviral in vivo de la bacteria productora de interferón. A pesar de los varios intentos realizados, y de ensayos de animalización, no se logró obtener mortalidades que pudiesen ser atribuibles a la infección viral, razón por la cual no pudo ser evaluada la capacidad de *Lactococcus lactis* productor de interferón de generar resistencia a la mortalidad ocasionada por el virus IPN.

3.2.4 Funcionalidad del interferón producido por los liofilizados y Detección de Interferón en liofilizados. No se logró obtener actividad inmunoestimuladora a partir de extractos proteicos de las bacterias liofilizadas. El liofilizado estuvo detenido en la aduana de Chilena por un periodo superior a dos meses. Mediciones de la viabilidad del liofilizado arrojan una reducción de las UFC de al menor un orden de magnitud. Es probable que el proceso de liofilización altere la producción de interferón. Por otra parte el diseño original contemplada un Interferón sin cola de Histidina. Esta construcción fue la que se envió a fermentar, se esperaba tener anticuerpos contra interferón (proveídos por el laboratorio de Mónica a Imarai en la USACH, sin embargo ellos presentaron retrasos en la producción del anticuerpo, lo que impidió la cuantificación del interferón presente en los liofilizado.

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

3.4.1. La primera adaptación metodológica efectuada fue clonar el casete productor de interferón en el vector pNZ8149. Esta estrategia fue propuesta inicialmente como una alternativa en el caso de no resultar la construcción del vector propuesto originalmente. Se utilizó pNZ8149 pues es un vector que replica en *Lactococcus lactis* y no contiene genes de resistencia a antibióticos, lo que permite su aplicación en el conjunto con alimentos.

3.4.2. Como fue indicado anteriormente, contrario a lo esperado la sobreexpresión en *Lactococcus lactis* no logro producir cantidades de proteínas detectables mediante SDS-PAGE teñidos con Azul de coomasie o plata. Además la ausencia de anticuerpos contra el interferón de Salmo salar obligo a modificar el gene y agregar una cola de histidina la permita detectar la producción de proteína recombinante ya sea por western blot o Elisa. Esta aproximación permitió detectar y cuantificar la cantidad de interferón producido. También se detecto una baja cantidad de interferón producido en el extracelular, lo que obligo a usar el interferón intracelular para realizar los ensayos utilizando cultivo celular.

3.4.3 En la resistencia a la infección viral in vitro se propuso como indicador a R_{ipnv} , este indicar resulto engorroso de interpretar y se decidió cambiar a I^{IPNV} el cual evalúa el porcentaje de resistencia e incorpora a R_{ipnv} . I^{IPNV} es equivalente a $100-R_{ipnv} \times 100$. Este indicador permitió establecer que el interferón recombinante producido por *Lactococcus lactis* logra proteger en un 99,7%.

3.4.4 La susceptibilidad a la infección por IPNV se evaluaría mediante cambios en la mortalidad ocasionada por el virus. Debido a que no se logró producir una mortalidad asociada al virus, se evaluó el efecto antiviral evaluando la cantidad de partículas virales en órganos inmunológicos de salmón. De ser exitoso nuestro producto se debería observar una menor cantidad de virus en aquellos peces tratados con la *Lactococcus lactis* productor de interferón. Tal como fue esperado estos peces mostraron una menor cantidad de partículas virales (reducción del 80%). Comparado con vacunas contra IPNV, la reducción observada en nuestro proyecto es menor, sin embargo dos tratamientos de 5 días cada uno podrían reducir la carga viral observada a valores inferiores a los presentes en peces vacunados con IPNV logrando así ser un producto equivalente al disponible actualmente.

3.4.5 Funcionalidad biológica del interferón producido por los liofilizados. Como fue indicado, no se logró obtener un efecto in vitro usando extractos proteicos provenientes de las bacterias liofilizadas. Se estimó que el proceso de liofilización sumado a la reducción de las UFC podría ser el responsable de esta ausencia de actividad inmunoestimuladora. Se decidió cambiar de aproximación y probar directamente en peces. La incorporación del liofilizado en el alimento daría tiempo a la bacteria para que recupere su metabolismo y produzca suficiente interferón para estimular la respuesta inmunológica. Como se esperaba se logró una baja

inmunoestimulación de Mx y PKR en riñón. La baja en la intensidad de la inmunoestimulación podría ser responsabilidad de la reducción de las UFC iniciales del liofilizado.

- **3.5.- Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.**

3.5.1 Diseño del casete de Interferón I optimizado codogénicamente.

Para lograr generar un casete que permita la expresión y exportación de Interferón I en *Lactococcus lactis*, se diseñó *in silico* una secuencia que contiene el gen IFN-I de *Salmo salar*, fusionado en marco con la secuencia que codifica el péptido señal Usp45 de *Lactococcus lactis*. La construcción además contiene el promotor constitutivo P1 de *Lactococcus lactis*. La secuencia está flanqueada por los sitios de restricción *NcoI* en el extremo 5' y *XbaI* en el extremo 3'. La secuencia de IFN fue optimizada codogénicamente para ser expresada en *Lactococcus lactis*. La secuencia silvestre de Usp45 de *Lactococcus lactis* se obtuvo de la base de datos del Centro Nacional de Información en Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Acceso GenBank: M35374. La secuencia silvestre del gen de IFN-I de *Salmo salar* se obtuvo de la base de datos del Centro Nacional de Información en Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), acceso GenBank: NM_001123710.1. La secuencia del promotor P1 de *Lactococcus lactis* se obtuvo de la base de datos del Centro Nacional de Información en Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (CP004884.1 1775802-1775887). El servicio de síntesis y optimización codogénica fue realizado en la empresa Genscript (<http://www.genscript.com/>).

3.5.2 Clonamiento del casete de Interferón en pNZ8149

En una primera etapa, se transformó el plasmidio pUC57/P1-Usp45-IFN (plasmidio en que Genscript envió el casete sintetizado *in vitro*) en *E. coli* MC1061. A partir de las transformantes se preparó DNA plasmidial, mediante el método de lisis alcalina usando el kit Favorgene. El plasmidio (aproximadamente 3 µg) fue digerido con la enzima *XbaI* (10 U, 37 °C durante 1 hora en un volumen final de 20 µl). Este procedimiento permitió linealizar el plasmidio. Luego de purificar el plasmidio linealizado mediante el kit Gel/PCR purification (Favorgene), el DNA fue nuevamente digerido con la enzima *NcoI* (10 U, 37 °C durante 1 hora en un volumen final de 20 µl). La segunda digestión permitió la liberación del casete, generando un fragmento con extremos cohesivos para *NcoI* y *XbaI*.

El plasmidio pNZ8149 fue preparado de manera similar, digiriendo aproximadamente 3 µg de plasmidio pNZ8149, primero con 10 U de *XbaI* y luego *NcoI*.

El casete conteniendo el gen de interferón y el plasmidio pNZ8149, ambos digeridos con *XbaI* y *NcoI* fueron ligados durante toda la noche a 4 °C con 400 U de ligasa T4 (New England Biolabs). La ligación se realizó en una proporción inserto:vector, 3:1. Posterior a la ligación la muestra fue dializada contra H₂O destilada usando membrana de diálisis de 0,02 µm (Millipore). La ligación fue transformada sobre células electrocompetentes de *Lactococcus lactis* NZ3900, y seleccionadas sobre placas Elliker suplementada con lactosa 0,5%. Los clones recombinantes se identificaron mediante PCR de colonia, usando los primarios pNICEF 5' TTA GAT ACA ATG ATT TCG TTC GAA GG 3' y pNICER 5' CAA GCC TTG GTT TTC TAA TTT TGG 3'. La identidad de los clones fue corroborada mediante secuenciación.

3.5.3 Adición de la cola de Histidina

Este plasmidio fue posteriormente modificado para, dar origen a pLACINFSS-1 agregando la secuencia que codifica para el péptido GGGHHHHHH en el extremo carboxilo del gen de interferón mediante PCR inverso utilizando los partidores primero pNZIFN-HisF 5' TCT TAA TAA AGA ATT CAT AGT CTA GAG AGC TCA AGC 3' y pNZIFN-HisR 5' TTA TTA AGA CGA ATT CTT AAT GAT GAT GAT GAT GAT GTC CAC CTC CAT ACA TTT GTG CAG CAA GAA T 3'. El partidor pNZINF-HisR, hibrida en el extremo 3' del gen de interferón I (optimizado codogénicamente), y reemplaza el codón de término por una secuencia que codifica para el péptido GGGHHHHHH. Seguido de esta secuencia, el partidor incorpora un codón de término y un sitio para la enzima de restricción *EcoRI*. Por otra parte el partidor pNZINF-HisF hibrida en el plasmidio pNZ8149 en la región correspondiente al sitio *XbaI* e Incorpora un sitio *EcoRI* en su extremo 5'. Luego de la amplificación el producto de PCR fue digerido con la enzima *EcoRI*, purificado mediante sistemas comerciales y ligados con la enzima T4-ligasa. El producto de ligación fue luego transformado en *Lactococcus lactis* NZ3900.

3.5.4 Preparación de *Escherichia coli* MC1061 electrocompetentes:

Para la preparación de células electrocompetentes se creció un precultivo de 5 ml de *Escherichia coli* MC1061 en medio LB (Luria Bertani) a 37 °C con agitación a 180 rpm durante toda la noche. Luego, el precultivo se utilizó para inocular 100 ml de medio LB, que fue crecido a 37 °C con agitación a 180 rpm hasta una OD₆₀₀ de 0,6. Luego de alcanzar la densidad óptica, el cultivo fue depositado en tubos de centrífuga de 50 ml y centrifugado a 4.500 rpm durante 15 min a 4 °C. Luego de descartar el sobrenadante el pellet se lavó tres veces con 40 ml de una solución fría de glicerol al 10%. Finalmente, después de la última centrifugación, el pellet fue resuspendido en 2 ml de glicerol 10% frío y guardado a -80 °C en alícuotas de 100 µl.

3.5.5 Transformación de *Escherichia coli* MC1061.

La transformación de *Escherichia coli* MC1061 fue realizada mediante electroporación. Aproximadamente 50 µl de *Escherichia coli* MC1061 electrocompetentes fueron mezclados con 2-15 µl de DNA (plasmidial o ligación dializada) en una cubeta de electroporación de 2 mm previamente enfriada en hielo. Luego de aplicar a las cubetas un pulso de 2,5 kV, las células fueron recuperadas a 37 °C en 1 ml de medio LB durante 1 hora con agitación. Para la selección de los transformantes, las células electroporadas fueron sembradas en placas LB Ampicilina (100 µg/ml), las cuales se cultivaron a 37 °C durante toda la noche.

3.5.6 Preparación de células electrocompetentes *Lactococcus lactis*.

La preparación de células de *Lactococcus lactis* NZ3900 electrocompetentes se realizó según el siguiente protocolo: La bacteria *Lactococcus lactis* fue separada en placa M17-Lactosa 0,5%, para luego crecer una colonia en 5 ml de medio SG-GM17 (Medio M17 que contiene sacarosa 0,5 M, Glicina 2,5%, y glucosa 0,5%, agregada después de la esterilización del medio SG-M17) durante la noche a 30°C sin agitación. El cultivo se inoculó en 40 ml de medio SG-GM17 y se creció durante la noche a 30 °C sin agitación. Al día siguiente este cultivo se

inoculó en 400 ml de medio SG-GM17 y se creció hasta una OD600 entre 0,2 y 0,3. Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 6.000 rpm durante 20 min a 4 °C en tubos de centrifuga de 50 ml. El pellet fue lavado tres veces con amortiguador de lavado frio (sacarosa 0,5M, glicerol 10%, 4 °C). En el primer lavado se utilizó un volumen de 50 ml por tubo. En el segundo lavado el amortiguador fue suplementado con EDTA a una concentración final de 50 mM en un volumen final de 40 ml por tubo. El tercer lavado utilizó 20 ml de amortiguador de lavado. En cada paso el pellet fue colectado mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 20 min a 4 °C y resuspendido mediante vortex en el amortiguador correspondiente. Después del último lavado el pellet fue resuspendido en 3 ml de amortiguador de lavado, y alicuotado en fracciones de 200 µl, las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

3.5.7 Electrotransformación de *Lactococcus lactis*.

Los plasmidios y/o reacciones de ligación fueron transformados en *Lactococcus lactis* por electroporación a 2000 V en cubetas de 2 mm. Previo a la transformación, las reacciones de ligación fueron dializadas contra H₂O destilada durante 30 minutos, usando membranas de diálisis (Millipore 0,2 µm). Luego de la transformación, las células fueron recuperadas en 1 ml de medio M17-Lactosa 0,5% durante 2 horas a 30 °C sin agitación, para posteriormente sembrar y seleccionar las transformantes en placas de medio M17-Lactosa 0,5%. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 24 horas. Las colonias obtenidas fueron repicadas en placas Elliker lactosa 0,5%. Se escogieron las colonias capaces de crecer en este medio produciendo el viraje del indicador púrpura de bromocresol desde azul a amarillo, indicativo de la capacidad de usar lactosa como única fuente de carbono.

3.5.8 Evaluación de la producción de Interferón intracelular mediante western blot.

La presencia de Interferón I en el citoplasma de *Lactococcus lactis* fue evaluada mediante Western blot. Para esto se creció un cultivo de *Lactococcus lactis* NZ3900 pLacINFSS-1 a 30°C, sin agitación. Luego de alcanzar una densidad óptica a 600 nm de entre 0,6 y 0,8, el cultivo fue inducido con nisina 10 ng/ml durante 2 h. Posteriormente las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 6.000 rpm durante 20 min a 4°C. El pellet bacteriano fue resuspendido en 1 ml de PBS 1X suplementado con Inhibidor de proteasas 1 mM. La concentración de proteínas totales fue determinada por el método de Bradford. Luego las proteínas fueron separadas de acuerdo a su masa mediante electroforesis en geles desnaturantes de poli(acrilamida) (Gel concentrador: 8% Acrilamida/Bisacrilamida 29:1, pH 6,8; Gel separador: 10% Acrilamida/Bisacrilamida 29:1, pH 8,8). Se cargaron 10 µg de extractos de proteínas totales de *Lactococcus lactis* NZ3900 pLacINFSS-1 y *Lactococcus lactis* NZ3900 pNZ8149 (control) en un gel de poli(acrilamida) (Concentrador 8%, Separador 10%) (Tricina 10%), junto al estándar de proteínas BenchMark™ His-tagged Protein Standard. Las muestras fueron sometidas a electroforesis durante 90 min a 100 V y las bandas de proteína fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa a 300 mA durante 2 h a 16°C. Posteriormente la membrana se bloqueó durante 1 hora con una solución de BSA 2 % y se lavó 3 veces con PBS 1X-Tween 20 (0,5%). Después se incubó con una dilución 1/5000 del anticuerpo policlonal anti-His (Abcam) durante 1 hora a 37 °C y se lavó tres veces con PBS 1X-Tween 20 (0,5%). Después se incubó con una solución 1/5000 del anticuerpo policlonal anti rabbit IgG conjugado a peroxidasa de rábano durante 1 hora a 37 °C. Luego se lavó 3

veces con PBS 1X-Tween 20 (0,5%) y se reveló incubando durante 8 min con 10 ml de una solución de revelado quimioluminiscente, que contiene luminol y amortiguador peróxido de hidrógeno. Posteriormente la membrana se expuso a un film fotográfico durante 30 seg, para luego revelar con amortiguador de revelado y de fijación. La intensidad de las bandas fue cuantificada mediante densitometría usando el programa ImageJ a partir de las imágenes de los films de western blot.

3.5.9 Evaluación de la producción de Interferón extracelular

La presencia de Interferón en el sobrenadante de los cultivos de *Lactococcus lactis* se evaluó mediante dot blot. Cultivos de clones de *Lactococcus lactis* NZ3900 pLacINFSS-1 fueron crecidos sin agitación en medio M17 lactosa 0,5% hasta una densidad óptica a 600 nm de entre 0,6 y 0,8. Una vez alcanzada la densidad óptica los cultivos fueron inducidos con nisina 10 ng/ml durante 2 h. Posteriormente el pellet se separó del sobrenadante por centrifugación a 6.000 rpm durante 20 min a 4 °C. Las proteínas presentes en el sobrenadante fueron precipitadas con ácido tricloroacético (10% final). Luego de incubadar durante 30 min en hielo, las proteínas precipitadas fueron colectadas por centrifugación a 9.000 rpm durante 30 min a 4 °C. El pellet obtenido fue lavado dos veces con Acetona y secado a temperatura ambiente durante 30 min. El pellet fue resuspendido en 1 ml de PBS 1X suplementado con Inhibidor de proteasas 1 mM. La concentración de proteínas totales fue determinada por el método de Bradford, obteniendo extractos con concentraciones entre 12 y 24 ng/μl. Los extractos de proteínas totales del sobrenadante se cargaron en una membrana de nitrocelulosa, en fracciones de 10 μl hasta completar 1 μg de proteína total. El dot blot fue revelado mediante quimioluminiscencia utilizando como primer anticuerpo un policlonal anti-His (Abcam) (dilución 1/5.000) y como segundo anticuerpo un policlonal anti rabbit IgG conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1/5.000). Previo a la aplicación del primer anticuerpo, la membrana cargada con las muestras fue bloqueada durante 1 hora con una solución de BSA 2%. Después del bloqueo y de la aplicación de cada anticuerpo, la membrana se lavó 3 veces con PBS 1X-Tween 20 (0,5%). Tanto el primer como el segundo anticuerpo fueron hibridados durante 1 hora a 37 °C. El dot blot fue revelado incubando durante 8 minutos la membrana con 10 ml de solución de revelado quimioluminiscente (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate) y exponiendo a film fotográficos durante 30 segundos.

3.5.10 Cuantificación de la cantidad de Interferón producido por *Lactococcus lactis*.

Para la cuantificación de la concentración de Interferón presente en el extracto citoplasmático, se utilizó la siguiente fórmula:

$$IFN = \frac{OD\ 450 - 0,0685}{0,0035}$$

Donde IFN es la concentración Interferón en nM, OD450 es la absorbancia a 450 nm del ensayo de ELISA. El ensayo de ELISA se realizó utilizando entre 1 y 0,1 u μg de extracto citoplasmático. Las placas fueron activadas durante toda la noche a 4°C utilizando amortiguador PBS 1X en presencia del extracto citoplasmático. Los pocillos fueron bloqueados con BSA 2% en amortiguador PBS 1X durante 1 hora a 25 °C. Se utilizó como

primer anticuerpo policlonal anti-His Tag preparado en conejo (AbCam). El primer anticuerpo se incubo a 37 °C durante 1 hora a una dilución de 1/5.000 en PBS 1X-Tween 20 0,5%. El segundo anticuerpo utilizado fue un policlonal Anti IgG de conejo, preparado en cabra, conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), el cual se incubó a una dilución de 1/5.000 durante 1 hora a 37 °C. Entre cada paso las placas fueron lavadas 3 veces con 200 µl PBS 1X-Tween 20 0,5%. La presencia de anticuerpo unido fue determinada mediante revelado con 100 µl de la solución de revelado comercial TMB one-solution (promega). Luego de 15 minutos de incubación a 37 °C, la reacción se detuvo agregando 100 µl de HCl 1N. El producto obtenido se cuantificó por medición de absorbancia a 450 nm. La normalización respecto a la dosis se logró calculando la razón entre la cantidad total de ηg de interferón presentes en el extracto dividido por la cantidad de dosis a partir de la cual se preparó el extracto.

3.5.11 Preparación de extractos de *Lactococcus lactis* productor de Interferón recombinante.

Los extractos conteniendo el Interferón recombinante fueron preparados a partir de cultivos de la cepa de *Lactococcus lactis* NZ3900 conteniendo el plasmidio productor de IFN (pLACINFSS-1). Esta cepa fue crecida en 40 ml de medio M17-Lactosa 0,5% a 30°C sin agitación. El crecimiento de la bacteria en el medio de cultivo fue evaluado mediante espectrometría, registrando la densidad óptica del cultivo a 600 nm. Luego de alcanzar una densidad óptica entre 0,6-0,8 los cultivos fueron inducidos con 10 ηg/ml de nisina, durante 2 horas. Las células se colectaron mediante centrifugación, y fueron resuspendidas en 1 ml de amortiguador fosfato salino (PBS)-Inhibidor de proteasas (1 mM). Para su ruptura, las células resuspendidas fueron mantenidas en hielo y sonicadas (ultrasonic processor, Sonic Vibracell) durante 2 minutos repartidos en 8 pulsos (130 watts, 20KHz, 100%, vástago Cv188 de 2 mm) de 15 segundos con intervalos de 1 minuto entre ellos. Después del tratamiento, el debrís celular fue separado por centrifugación (13.000 rpm, durante 10 min a 4 °C). El sobrenadante fue removido y almacenado a -20°C. La concentración de proteínas totales fue determinada por el método de Bradford y la concentración de IFN presente en el citoplasma se determinó mediante ELISA, con anticuerpos contra la cola de histidina.

3.5.12 Evaluación *in vitro* de la actividad inmunoestimulante de Interferón recombinante.

La determinación de la actividad inmunoestimulante del interferón recombinante se evaluó por la capacidad de inducir la expresión de los genes Mx y PKR. Ambos genes son parte del sistema antiviral activado por Interferón I y actúan como marcadores esta respuesta.

Cultivos de la línea celular de embrión de salmón CHSE-214 fueron crecidos hasta una confluencia del 80%, para luego ser tratadas durante 24 horas con diferentes dosis de Interferón recombinante (10, 100 y 500 ηg) provenientes de extractos citoplasmáticos de la cepa productora de Interferón. La concentración de proteínas totales se igualó a la condición donde se tiene mayor cantidad de proteínas totales la cual también corresponde a la condición con mayor cantidad de IFN (500 ηg). El ajuste para igualar la cantidad de proteínas totales se realizó agregando extractos de proteínas totales proveniente de la cepa de *Lactococcus lactis* que contiene el plasmidio pNZ8149 (Extracto control).

Como control negativo se utilizó PBS y extractos de *Lactococcus lactis* NZ3900, *Lactococcus lactis* NZ3900 conteniendo el plasmidio pNZ8149 (Vector). El control positivo consistió en la incubación con poli I:C (10 µg/ml), el cual fue transfectado con 3 µl de reactivo de transfección FuGENE (Promega), bajo las instrucciones establecidas por el fabricante. Después de la estimulación, las células fueron cosechadas, se extrajo el RNA total usando el kit E.Z.N.A. total RNA kit (Omega biotek) y se realizó cuantificación de la expresión de Mx y PKR mediante RT-qPCR.

3.5.13 Cuantificación de la expresión de Mx y PKR

Los cambios en la expresión de Mx y PKR fueron cuantificados y evaluados mediante RT-qPCR. Una vez extraído el RNA, su integridad fue evaluada mediante geles de agarosa (1%, TAE 1X) y su cantidad determinada mediante absorbancia a 260 nm, utilizando el equipo Tecan Infinite 200 PRO o un lector de multipocillos Synergy™ 2.0 (Biotek). La reacción de RT fue realizada a partir de 1 µg de RNA total utilizando 100 Unidades de transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen, USA) y 4 pmoles de oligo-dT 18 mer. La reacción de RT fue desarrollada primero a 25 °C durante 10 minutos, luego a 42 °C durante 1 hora y finalmente inactivada por desnaturación a 65 °C durante 10 minutos. La reacción de Q-PCR se desarrolló utilizando el kit SYBR Fast Universal Q-PCR kit (Kapa Biosystem USA), en 20 µl, utilizando 2 µl de la reacción de RT. Para detectar y cuantificar Mx se utilizó los partidores Mx-Fw: 5' TGT AAC ACG ATG CCC TCT CG 3' y Mx-Rv: 5' GAC GTC AGG GGA GCC AAT C 3'. El programa térmico utilizado consistió en 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C. La expresión de PKR se cuantificó utilizando los partidores PKR-Fw: 5' CAA TGA CCG ATT CCA GCT CC 3' y PKR-Rv: 5' CCC TTA TTT ATG CTAA TCC AG 3'. Para PKR se utilizó un programa similar al utilizado con Mx, variando la temperatura de apareamiento a 54 °C.

Como normalizador se utilizó el RNA ribosomal de 18S (partidores 18S-Fw: 5' CCT TAG ATG TCC GGG GCT 3' y 18S-Rv: 5' CTC GGC GAA GGG TAG ACA 3'). El programa de amplificación utilizado contempló 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C.

Las reacciones de qPCR fueron realizadas en duplicado en un equipo Stratagene Mx3000P. El grado de estimulación de Mx y PKR por parte del interferón I utilizado, se determinó normalizando las veces de inducción por la cantidad de dosis necesarias para producir la cantidad de interferón usado en el ensayo. La bioactividad se calculó de una manera similar, pero normalizando respecto a 50 ng de interferón.

3.5.14 Evaluación de la actividad antiviral *in vitro* del Interferón recombinante

Se determinó el efecto del interferón recombinante producido por *Lactococcus lactis* sobre la carga viral de IPNV. Para esto, se prepararon cultivos de la línea celular SHK-1 (Sigma-Aldrich) hasta confluencia de 80% en medio L15 suplementado con glutamina 4 mM y suero fetal bovino 5%. Estos cultivos fueron incubados con extractos citoplasmáticos de *Lactococcus lactis* que contienen 10, 100 y 500 ng de IFN durante 24 h. La concentración de proteínas totales también se igualó a la condición donde se tiene mayor cantidad de IFN (500 ng/ml) con el extracto de proteínas de la cepa control de *Lactococcus lactis* que comprende el

plasmidio pNZ8149. Como control positivo se utilizó Poli I:C 10 ng/ml el cual fue transfectado de acuerdo a lo indicado anteriormente.

Terminado el tiempo de incubación, se infectó con virus IPN a una M.O.I de 0,1 y posteriormente se extrajo el sobrenadante de cultivos a las 0, 6, 24, 48, 72, 120 y 168 horas post infección y se cuantificó la carga viral. El efecto del interferón se estableció normalizando la cantidad de partículas virales del sobrenadantes respecto a la infección sin la adición de interferón ($R_{ipnv} = UFP_{(es)}/UFP_{(c)}$). El porcentaje de inhibición se calculó usando la siguiente fórmula $I^{IPNV} = 100 - R_{ipnv} \times 100$.

3.5.15 Cuantificación de carga viral en sobrenadantes de cultivo.

La carga viral presente en los sobrenadantes de cultivo fue determinada bajo la siguiente metodología. A partir del sobrenadante colectado mediante micropipeta, se extrajo RNA total desde los sobrenadantes usando el kit EZNA total RNA (Omega Biotek). La reacción de RT y Q-PCR fue desarrollada utilizando el sistema SYBR Fast One-Step q-RT-PCR (Kappa Biosystems), 1 µg de RNA total y los partidores VP2F 5' GAA GTC TTT CTG AGG TGG AGA G 3' y VP2R 5' ATT CCT TTG GTC ACT AGT TGG T 3', que amplificaron un segmento de 100 pb. Para expresar nuestro resultado en número de copias de genes virales, se estableció una curva de calibración, basada en el gen VP2 clonado en el vector pGEM-T. Para construir la curva de calibración se utilizó un rango entre 1×10^2 a 1×10^8 copias del constructo.

3.5.16 Preparación de Virus IPN y determinación del título viral.

El virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) se propagó en monocapas de células CHSE-214 crecidas en medio MEM suplementado con 2% con suero fetal bovino. La infección se realizó a una M.O.I de 0,1 unidades formadora de placa por célula (UFP/célula). Luego de 1 h de adsorción, las células fueron lavadas con medio MEM y puestas nuevamente en medio MEM suplementado con 2% con suero fetal bovino. Posteriormente se incubó nuevamente a 16 °C hasta observar la presencia de un efecto citopático visible, aproximadamente 48 a 72 horas post infección.

El título viral presente en el sobrenadante del medio de cultivo fue determinado mediante el método de placas de lisis. Para esto, a partir del medio proveniente de los pocillos infectados se prepararon diluciones seriadas con el medio MEM, desde 10^{-1} a 10^{-11} . Posteriormente las diluciones de los sobrenadantes fueron utilizadas para infectar células CHSE 214. Luego de 1 h de adsorción las células fueron lavadas dos veces con PBS y mantenidas por 72 h en medio semisólido que contiene MEM suplementado y 0,5% p/v de agarosa de bajo punto de fusión. Posteriormente, para fijar las células se agregó 1 mL de formamida al 37% v/v y se incubó durante otros 30 min. Para revelar la presencia de placas de lisis se removió la agarosa y se agregó 1 mL de cristal violeta (cristal violeta 1%, etanol 20%) en cada pocillo. Luego de 30 minutos de incubación se eliminó el exceso de cristal violeta y se realizó la cuantificación de las placas de lisis formadas.

3.5.17 Mezcla de bacterias ácido lácticas con el alimento.

Las bacterias fueron administradas a los peces junto con el alimento, para esto las bacterias fueron colectadas mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El pellet fue lavado con un 1 ml de medio M17, y nuevamente colectado por centrifugación a 6.000 rpm

durante 10 minutos a 4 °C. El pellet lavado fue resuspendido en medio M17 en un volumen equivalente a un 1/10 del volumen del cultivo original. La suspensión de bacterias fue mezclada con aceite comestible en una proporción 2:1, y emulsionada mediante vortex. La emulsión obtenida se mezcló con el alimento y se homogeneizó por agitación en un contenedor de plástico. Para el cálculo de del volumen de cultivo necesario a utilizar en la preparación del alimento se utilizó la siguiente fórmula:

$$V_u = \frac{N_p \times D \times FP}{CIB}$$

$$CIB = f OD^{600}$$

Donde Vu es el Volumen de cultivo utilizado, Np es el número de peces a alimentar con la bacteria, D corresponde a la dosis administrada por cada peces (10^7 UFC), FP es el factor de pérdida producido al mezclar la bacteria con el alimento (generalmente 10), CIB es la concentración inicial de bacterias presentes en el cultivo (UFC/ml). CIB es función de la densidad óptica del cultivo y es calculado a partir de la curva mostrada en la Figura.

Los cultivos utilizados fueron preparados de la siguiente manera: Aislados de colonia de las cepas productoras de interferón o de la cepa conteniendo el plasmidio sin inserto (pNZ8149), fueron utilizados para inocularon 10 ml de Medio M17 lactosa 0,5%. Este pre-cultivo fue incubado a 30 °C durante toda la noche, sin agitación. Luego este precultivo se utilizó para inocular 40 ml de medio Medio M17 lactosa 0,5%. Este segundo cultivo fue incubado a 30 °C, sin agitación hasta que su densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor entre 0,6 y 0,8. Una vez alcanzada esta densidad, el cultivo fue inducido con Nisina 10 ng/ml a 30 °C durante dos horas. Posteriormente este cultivo fue almacenado a 4 °C durante todo el periodo de alimentación de los peces.

3.5.18 Evaluación de la actividad inmunoestimulante *in vivo*

La evaluación de la actividad inmunoestimulante *in vivo* se realizó determinando el efecto de la administración de la bacteria productora de interferón sobre la inducción de los genes para Mx y PKR, en los principales órganos inmunológicos de salmónidos: bazo y riñón anterior. En el experimento se prepararon tres grupos de 15 peces (de 10 g cada uno), los cuales fueron alimentados al 1% durante 5 días. El primer grupo fue alimentado con alimento suplementado con 10^7 UFC de bacteria productora de interferón. El segundo grupo se alimento con 10^7 UFC de *Lactococcus lactis* NZ3900 transformado con el plasmidio pNZ8149 y el tercer grupo recibió alimento sin suplementar.

Luego, 5 peces de cada grupo fueron sacrificados al día 1, 3 y 10 post tratamiento. Los órganos inmunológicos bazo y riñón anterior fueron extraídos, recolectados en tubos criogénicos y almacenados en nitrógeno líquido. A partir de cada órgano inmunológico se extrajo RNA total, usando TRISURE (Bioline) o el kit E.Z.N.A Total RNA (Omega Biotek) y

posteriormente se cuantificó el RNA total de cada extracción mediante absorbancia a 260 nm. La integridad del RNA fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa.

La reacción de RT-qPCR fue desarrollada de la misma manera que la utilizada para evaluar la expresión de Mx y PKR en cultivo celular. Brevemente, el RNA total fue usado para realizar reacciones de transcripción reversa utilizando 1 µg de RNA total, 4 pmoles de partidores dirigidos a la cola Poli-A y 100 Unidades de transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen USA). Las reacciones de cuantificación de la expresión de los genes Mx y PKR fueron realizadas utilizando SensiMix SYBR Hi-ROX One-Step (Bioline). La expresión de los genes fue normalizada respecto a la condición control, que corresponde a la dieta con *Lactococcus lactis* con el plasmidio pNZ8149 y la expresión del gen de 18S utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ descrito por Pfaffl[5].

3.5.19 Resistencia a Infección por IPNV.

La resistencia a la infección por IPNV fue evaluada mediante ensayos de desafío y mediante la reducción de la carga viral en los órganos inmunológicos de los peces.

3.5.20 Animalización de virus IPN.

La animalización se realizó en dos etapas. En la primera, se utilizaron tres cepas de virus IPN (IPNV_N2, IPNV_414P2 y IPNV_23R-15i), que fueron utilizados para infectar cultivos celulares de CHSE-214 crecidos en botellas T175 hasta el desprendimiento de la monocapa. El sobrenadante de estos cultivos fue concentrado, desde 40 ml hasta 1,5 ml para cada cepa. La concentración del virus se realizó utilizando PEG al 10%. Después de precipitar durante la noche a 4 °C los virus se concentraron mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 90 min a 4°C. Posteriormente el pellet se lavó y resuspendió en 1 ml de medio MEM. Después de titular el virus mediante el método de placa de lisis, se inyectó intraperitonealmente 10^8 UFP/pez. En el ensayo se utilizaron 12 peces *Salmo salar* de 20 g cada uno. La mortalidad se siguió por un periodo de dos semanas.

A partir de los peces muertos, se recuperaron los órganos bazo, hígado y riñón. Estos órganos se depositaron en tubos y posteriormente fueron homogenizados utilizando un equipo OMNI TM125-220 dispuesto a 10.000 rpm. La homogenización se realizó en presencia de 500 µl de medio de cultivo MEM. Posteriormente el homogenizado fue centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante obtenido fue separado y mezclado con Fungizona y Gentamicina (Concentración final de 40 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente).

El proceso de animalización se repitió por segunda vez. Para esto, los extractos de los órganos provenientes de los peces muertos por infección con IPNV se utilizaron para infectar células CHSE-214 usando una dilución 1/100 o 1/500. Luego del desprendimiento de la monocapa aproximadamente 72 horas post infección, el virus fue titulado mediante placas de lisis y concentrado usando polietilén glicol 10%, y resuspendido en 1 ml de MEM. A partir de extracto concentrado del virus se inyectaron 10^8 UFP por pez. En la segunda animalización se utilizaron 3 peces por cada virus usado. La mortalidad de cada infección fue registrada durante un periodo de dos semanas.

3.5.21 Ensayos de desafío.

El virus IPN cepa 23R-15i (de mayor mortalidad en la segunda animalización) fue propagado en cultivo de células CHSE-214, las cuales fueron crecidas en botellas t175. Después de 72 horas, cuando se desprendió la monocapa, el medio de cultivo fue centrifugado para eliminar los restos celulares. A partir del sobrenadante obtenido se determinó el título viral mediante el método de placas de lisis. Luego, grupos de 15 peces *Salmo salar* de 10 g fueron infectados con 10^8 PFU de virus, y se les siguió la mortalidad en el tiempo.

3.5.22 Efecto de la administración de *Lactococcus lactis* productor de Interferón sobre la replicación viral de IPN.

El efecto de la administración de bacterias productoras de interferón sobre la replicación *in vivo* de IPNV se determinó evaluando la carga viral de IPNV en los órganos inmunológicos de peces tratados y no tratados con *Lactococcus lactis* NZ3900 pLACINFSS-1. Para esto se prepararon 3 grupos de 10 peces de 10 gr (*Salmo salar*). Un grupo fue alimentado durante 5 días al 1% de su peso, con alimento suplementado con 10^7 UFC de la cepa productora de IFN. Los otros dos grupos funcionaron como controles y fueron alimentados al 1% con alimento suplementado con 10^7 UFC de *Lactococcus lactis* NZ3900 pNZ8149 y alimento sin suplementar. Al día siguiente, después del período de alimentación, los peces fueron infectados con 10^8 PFU de virus IPN. Los peces fueron sacrificados al día 6, 15 y 32 post infección y sus órganos inmunológicos, Bazo y Riñón anterior, fueron utilizados para extraer RNA total y realizar RT-qPCR

3.5.23 Determinación de la carga viral *in vivo*.

La carga viral *in vivo* fue determinada mediante RT-qPCR a partir de RNA total obtenido desde los órganos inmunológicos de los peces. El RNA total fue extraído utilizando TRISURE (Bioline) o el kit E.Z.N.A Total RNA (Omega Biotek). La integridad del RNA se evaluó por geles de agarosa y su concentración se determinó mediante absorbancia a 260 nm. La reacción de RT-qPCR se realizó a partir de 1 μ g de RNA total mediante el kit SensiMix SYBR Hi-ROX One-Step (Bioline), bajo el mismo protocolo descrito para la determinación de carga viral en cultivo celular.

3.5.24 Evaluación de la residencia de *Lactococcus lactis* en el tracto gastrointestinal.

Por otra parte, se evaluó la permanencia de *Lactococcus lactis* en el tracto gastrointestinal (TGI) de salmónidos. Para esto se alimentó al 1% (p/p) durante 10 días 15 ejemplares de *Onchorynchus mykiss* (Trucha Arcoiris) de 50 gramos cada uno, con 10^7 UFC de *Lactococcus lactis* que contiene el plasmidio pMV158GFP que permite la expresión la proteína fluorescente verde (GFP). Esta cepa fue cultivada en medio M17 suplementado con Maltosa al 2% para permitir la expresión de la proteína GFP codificada en el plasmido. Como control se alimentaron 15 ejemplares de *O. mykiss* (50 gr) con una cepa de *Lactococcus lactis* que no expresa la proteína GFP.

Terminado el período de alimentación, se retiraron 2 peces desde el día 0 (último día de alimentación) hasta el día 6. Los peces fueron anestesiados con benzocaina y muertos por desnucamiento rápido, posteriormente a partir de cada uno se extrajo el intestino

inmediatamente y se recuperó las heces fecales, que fueron mantenidas a -20°C hasta su observación. Posteriormente, las heces fueron mezcladas con amortiguador PBS 1X en proporción 1:2 y se colocó sobre un portaobjetos un volumen de 10 µl de la suspensión. La muestra se incubó a 30 °C durante 30 min para favorecer la evaporación del agua en la muestra y se agregó 5 µl de solución DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano) preparada en glicerol 90%. Luego se colocó un cubreobjeto sobre la muestra, retirando el exceso de estabilizante y se selló con esmalte. Las muestras fueron posteriormente visualizadas en un Microscopio Confocal (Zeiss) con un Láser de Argón que proyecta una Luz Incidente de 488 nm y un filtro ajustado que permite una emisión entre 505 y 550 nm. La profundidad del campo fue de 1 µm y el equipo se ajustó a un aumento de 40x, con un zoom de 2,4. Los resultados indicaron que la bacteria administrada en la dieta permanece durante 4 días en el TGI de salmónidos (Figura 5A).

Asimismo, a partir de la resuspensión de heces en PBS 1X en proporción 1:2, se midió la emisión de fluorescencia. Para esto se midieron volúmenes de 100 µl de las muestras desde el día 0 al 6, de cada suspensión en triplicado para las suspensiones de heces con *Lactococcus lactis* pMV158GFP y *Lactococcus lactis*. Las muestras fueron depositadas en una microplaca de fluorescencia, excitadas a una longitud de onda de 480/20 y detectadas a una longitud de onda de emisión de 540/40. Los valores de Intensidad de fluorescencia, expresados como unidades arbitrarias de emisión de fluorescencia, fueron calculados restando el valor de emisión de la muestra control a la muestra que contiene *Lactococcus lactis* pMV158GFP.

3.5.25 Escalamiento

El escalamiento de la producción de *Lactococcus lactis* productor de Interferón se realizó en la empresa Biopolis SA. Las condiciones iniciales fueron establecidas para la cepa de *Lactococcus lactis* sin el plasmidio productor de interferón y utilizando medio BRFS/MRS 1:1 glucosa 0,5% pH 6,3. El cultivo fue realizado en un fermentador Applikon con una agitación de 100 rpm, a una temperatura de 37 °C, bajo condiciones de anaerobiosis durante un periodo de 15 horas. Una vez optimizado el crecimiento, mediante ajuste de pH. Las condiciones fueron utilizadas para crecer la cepa de *Lactococcus lactis* productora de interferón, pero reemplazando la glucosa por lactosa 30 g/l a un pH de 5,3

3.5.26 Viabilidad de células liofilizadas

Con el objetivo de cuantificar la bacteria liofilizada enviada desde la empresa Biopolis, que realizó el escalamiento del cultivo para la cepa de *Lactococcus lactis* productor de IFN, se realizó un cultivo en placa y se determinó la UFC del liofilizado a través de la técnica de Microgota. Para cumplir este objetivo, se realizaron dos resuspensiones con 10 y 50 mg de bacteria liofilizada en 1 ml de medio M17. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas, desde una dilución 10⁻² hasta una dilución 10⁻⁶ para ambas condiciones. Posteriormente, las diluciones fueron sembradas en placa M17-Lactosa 0,5% en un volumen de 3 µl, en triplicado. Las placas fueron incubadas a 30°C durante la noche, y al día siguiente se realizó el conteo de la colonias crecidas en las microgotas de cada dilución.

3.5.27 Preparación de extractos citoplasmáticos de la cepa liofilizada

Con el objetivo de preparar extractos citoplasmáticos de la cepa liofilizada productora de IFN, se resuspendieron 50 mg del liofilizado que contiene la bacteria en 1 ml de amortiguador PBS 1X-Inhibidor de proteasas 1 mM. Posteriormente la resuspensión se sometió a 8 ciclos de sonicación de 15 segundos, con pausas de 2 min en hielo entre cada ciclo, en un sonicador Ultrasonic Processor (modelo Sonics Vibracell), de 130 W a 20 kHz, con un vástago modelo CV188 de 2 mm. Posteriormente, el producto de sonicación se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue transferido a otro tubo, que fue almacenada a -20 °C hasta su uso.

3.5.28 Inmunoestimulación *in vitro* usando liofilizados

Se evaluó la inducción de Mx y PKR en cultivos celulares a partir de extractos citoplasmáticos de la cepa liofilizada productora de IFN. Para cumplir este objetivo, se estimó la concentración del IFN contenido en los extractos citoplasmáticos de la cepa liofilizada, comparando con el IFN cuantificado desde extractos citoplasmáticos de la cepa de *Lactococcus lactis* que expresa IFN marcado con Histag que fue cuantificado por ELISA y que preparado en las mismas condiciones. Posteriormente se prepararon cultivos celulares de la línea celular CHSE-214 en medio MEM, suplementado con Suero Fetal Bovino 2% y Glutamina 4mM en placas de 6 pocillos hasta una confluencia de 80%. Luego se agregó extracto, que de acuerdo a la estimación, permitió realizar incubaciones con concentraciones de 10, 100 y 500 ng/ml de IFN del liofilizado. Como control positivo se transfectó con Poli I:C 10 ng/ml, y como control negativo la cepa de *Lactococcus lactis* que contiene el plasmidio pNZ8149 y PBS 1X

3.5.29 Inmunoestimulación *in vivo* usando liofilizados

Se evaluó la inducción de Mx y PKR en los órganos inmunológicos Bazo y Riñón anterior en peces alimentados con la cepa liofilizada productora de IFN. La bacteria se resuspendió en 40 ml de medio M17 y ajustó a una densidad óptica a 600 nm de 1,2 (10^7 UFC). Posteriormente, 1,8 ml de la suspensión bacteriana fueron concentradas por centrifugación a 6000 rpm por 20 min, hasta un volumen de 180 µl, para posteriormente administrar 10^7 UFC por cada pez. Los peces fueron alimentados en tres grupos de 10 ejemplares de *Salmo salar* de 20 g, a una tasa de alimentación del 1%. El primer grupo alimentado con 10^7 UFC de la cepa productora de IFN. El segundo grupo control fue alimentado con 10^7 de la cepa de *Lactococcus lactis* que contiene el plasmidio pNZ8149 y el tercer grupo fue alimentado con alimento normal. Los peces fueron alimentados durante 5 días y posteriormente se extrajeron los órganos inmunológicos Bazo y Riñón, a los días 1, 3 y 10.

4. Descripción de las actividades PROGRAMADAS y tareas EJECUTADAS para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas, y razones que explican las discrepancias. (ANÁLISIS DE BRECHA).

Nº O E	Nº RE	Actividades	Análisis
1	1	Síntesis de Fragmentos de DNA	Esta actividad consistió en el diseño de un casete que permitiera la expresión de Interfeón I, bajo el promotor P1 y en marco con el péptido líder de la proteína USP45 para facilitar la exportación del IFN al espacio extracelular. Esta actividad se realizó de la misma manera que estaba planificada, con leves retrasos debido a que los fondos de parte de FIA llegaron algunos meses desfasados
1	1	Implementación de Técnicas de Biología Molecular	Las técnicas de biología molecular se implementaron sin problemas. Extracción de DNA, digestión con enzimas de restricción, electroforesis de proteínas en geles desnaturante, tinción con comasiee, plata, electroforesis de ácidos nucleicos, western blot, ELISA son todas técnicas implementadas para el desarrollo de este proyecto. No se apreciaron diferencias importantes entre la actividad planificada y su desarrollo.
1	1	Construcción de plasmidios	La metodología propuesta originalmente propuesta para construir los plasmidios consistía primero en reemplazar en el vector pNZ8148 el casete de resistencia a antibióticos por un segmento de DNA que contiene los genes necesarios para metabolizar sacarosa. Este fragmento de DNA se amplificaría por PCR a partir del DNA cromosomal de la cepa <i>Lactococcus lactis</i> KF147. Mediante PCR no se pudo amplificar este segmento por lo tanto se decidió enviarlos a sintetizar a Genscript basado en la secuencia reportada en el genomas de <i>Lactococcus lactis</i> KF147. Mediante PCR y enzimas de restricción se intento clonar en el el case de sacarosa en el sitio de multiple clonamiento de pNZ8148. Ninguno de los clones obtenidos arrojó tener la secuencia del casete de sacarosa completo. Se intentó reemplazar el casete de resistencia a cloranfenicol por el case de crecimiento en sacarosa, pero se dio un resultado parecido. Se evaluó la capacidad de <i>Lactococcus lactis</i> de crecer usando sacarosa como única fuente de carbono en ausencia del casete proveniente de la cepa KF147. Como se observó que era capaz de crecer, se optó por clonar el casete productor de interferón en el vector pNZ8149, que confiere la capacidad de crecer en lactosa a la cepa NZ3900. Como fue indicado anteriormente, para facilitar su detección posteriormente se adicionó mediante PCR una cola de histidina.

1	1	Transformación del plasmidio en <i>Lactococcus lactis</i> y selección por capacidad de crecer en sacarosa o lactosa	La estrategia originalmente planteada es seleccionar sobre placas de medio M17 suplementado con sacarosa. Por los antecedentes expuestos anteriormente, la transformación se llevó a cabo mediante electroporación de la cepa NZ3900 y se plaqueó sobre medio Elliker suplementado con lactosa. Bajo estas condiciones se obtuvieron colonias amarillas, los cuales es un indicativo de <i>Lactococcus lactis</i> NZ3900 transformado con un plasmidio que le confiere la capacidad de metabolizar lactosa. Los protocolos montados fueron exitosos y la actividad marchó de acuerdo a lo esperado, con excepción de los plazos estipulados retrasados por los inconvenientes encontrados.
1	1	Evaluación y cuantificación de la presencia de Interferón I en cultivos de <i>L. lactis</i> recombinantes	La cuantificación de la presencia de Interferón se había planificado realizar mediante SDS-PAGE teñidos con azul de coomasie o plata. No fue posible observar una banda atribuible a la sobreexpresión del gen de interferón. La ausencia de anticuerpos contra interferón llevo a modificar el gen de interferón I de tal manera de agregar una cola de histidina que pudiese ser detectada mediante western blot. Finalmente gracias a la adición de esta cola de histidina se pudo detectar la presencia de interferón producido por <i>Lactococcus lactis</i> mediante el uso de western blot , dot blot, y la cuantificación se realizó mediante ensayos de ELISA.
2	2	Implementación de cultivos celulares	Los cultivos celulares de las líneas CHSE214 y SHK1 se implementaron de acuerdo a los planificado.
2	2	Implementación de cultivos de <i>Lactococcus lactis</i> recombinantes con el plasmidio productor de Interferón I.	Los cultivos de <i>Lactococcus lactis</i> productor de interferón se montaron de acuerdo a lo planificado, usando medio M17 suplementado con lactosa 0,2%. Se adiciono Nisina 10 η g/ml como inductor de la expresión del gen de interferón.
2	2	Verificación de la presencia de Interferón I en el sobrenadante de cultivo incubado con <i>Lactococcus lactis</i> que contiene el plasmidio productor de Interferón I.	La detección de la presencia de Interferón I en el sobrenadante se planificó originalmente mediante SDS-PAGE teñidos con azul de comasie o plata. Como ninguno de los dos métodos arrojó un resultado positivo se evaluó mediante ensayos de dot blot a partir de sobrenadante precipitados con TCA al 10% final. <i>Lactococcus lactis</i> secreta una muy pequeña cantidad de interferón por lo tanto fue necesario concentrar el sobrenadante del cultivo con TCA 10%. A pesar de concentrar, la cantidad de interferón presente en el extracto es muy pequeña por lo tanto no se podía cargar directamente en un gel de poliacrilamida. Por lo tanto se recurrió a la técnica de dot blot usando anticuerpos que reconocen la cola de histidina y anticuerpos conjugados a HRP que reconocen el anticuerpo contra la cola de histidina. Esta nueva técnica resultó mucho más sensible que las anteriormente ensayadas.

2	2	Evaluación de la estimulación de Mx y PKR en cultivos celulares incubados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I.	La evaluación de la estimulación de Mx y PKR se realizó de acuerdo a lo planificado. Cultivos de células CHSE-214 fueron tratados durante 24 horas con diferentes cantidades de interferón (10, 100 y 500 ng) durante 24 horas. La expresión de Mx y PKR fue evaluada mediante RT-qPCR a partir de RNA total extraído de los cultivos de células CHSE-214 tratados.
2	2	Evaluación de la actividad antiviral de los cultivos celulares incubados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I.	Esta actividad se desarrolló de acuerdo a lo planificado. Cultivos de células CHSE-214 fueron pretratados con 10, 100 y 500 ng de interferón durante 24 horas, luego fueron infectados a una moi de 0,1 con virus IPNV y se siguió la carga viral presente en sobrenadantes durante un periodo de 168 horas. La carga viral fue evaluada mediante RT-qPCR. Las diferencias con el protocolo establecido originalmente guardan relación con la extensión de la cinética y la cantidad de interferón utilizado.
3	3	Evaluación de la inmunoestimulación en Peces alimentados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I.	Esta actividad se llevó a cabo de acuerdo a lo planificado, sin embargo a diferencia de la actividad propuesta originalmente se redujo el número de peces, para adecuar el experimento a la infraestructura disponible. Otra diferencia respecto a la actividad propuesta originalmente guarda relación con los tiempos de muestreo. De acuerdo al plan operativo se sacarían muestras de peces cada 5 días, durante un periodo de 1 mes. En el protocolo implementado las muestras fueron tomadas 1, 8 y 15 días post tratamiento.
3	3	Evaluación de la seguridad del producto	A diferencia de lo propuesto originalmente donde se establecía que la seguridad iba a ser evaluada en grupos de 60 peces los cuales serían alimentados con 2×10^7 UFC/día durante 5 días, y evaluados en su sobrevivencia durante un periodo máximo de 60 días. En el proyecto se utilizaron los peces tratados con <i>Lactococcus lactis</i> productor de interferón, los cuales no mostraron mortalidad. También se realizó un análisis necrótico luego del sacrificio. Este análisis arrojó que no hay diferencias en el aspecto y morfología de los órganos internos de los peces tratados respecto al control sin tratar.
3	3	Desafío con virus IPNV a peces alimentados con <i>Lactococcus lactis</i> productores de Interferón I	El ensayo de desafío se llevó a cabo de acuerdo a lo planificado reduciendo el número de peces para ajustarlos a las condiciones disponibles en el laboratorio. Al no observar mortalidad asociada a la infección viral, se decidió evaluar la carga viral en los peces tratados con la bacteria productora de interferón. Esta metodología permitió identificar que la administración de <i>Lactococcus lactis</i> productor de interferón durante 5 días previo a la infección con IPNV logra reducir la carga viral en al menos 12 veces después de 20 días de la infección.

4	4	Ajuste de las condiciones de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> para el escalamiento productivo piloto	El ajuste de las condiciones de crecimiento para el escalamiento productivo se realizó en la compañía Biopolis, la cual se dedica a producir cultivos lácteos a grandes escalas (1500 litros). Se prefirió esta estrategia respecto a la estandarización en el laboratorio, pues se pretende que la compañía Biopolis sea la encargada de producir a gran escala el prototipo producido en este proyecto
4	4	Validación a escala piloto de las condiciones de crecimiento establecidas	En el proyecto original se estableció que la escala piloto utilizada sería de 50 litros, sin embargo la compañía Biopolis S.A., realiza el ajuste en escala de 1 L y esas condiciones son aplicadas a fermentadores de 1500 litros. La bacteria fue posteriormente liofilizada y su funcionalidad evaluada mediante ensayos sobre cultivos celulares de salmón y en peces a través de la alimentación con 10^7 UFC/pez.
4	5	Transferencia de los protocolos de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> productor de Interferón I	Por protocolo interno de la USACH, es necesario proteger intelectualmente mediante una solicitud de patente la tecnología y/o producto generado por el proyecto. Este paso es previo a la transferencia oficial de los procedimientos establecidos para el crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> productor de interferón. Se logró enviar una solicitud de patente en Diciembre de 2015, con la tecnología desarrollada en el presente proyecto.
4	5	Transferencia de las cepas generadas	Por protocolo interno de la USACH, la transferencia de las cepas serán entregadas a ActivaQ luego de establecido un acuerdo de licenciamiento a ActivaQ para la producción y comercialización de la bacteria genera en este proyecto.
4	6	Lanzamiento de proyecto	El lanzamiento del proyecto se realizó de acuerdo a lo establecido por FIA
4	6	Actividades de difusión a nivel nacional 1	Realizada de acuerdo a lo establecido en el proyecto
4	6	Actividades de difusión a nivel nacional 2	Realizada de acuerdo a lo establecido en el proyecto
4	6	Actividades de difusión a nivel internacional	Realizada de acuerdo a lo establecido en el proyecto
4	6	Seminario con empresas Salmonicultoras	Realizada de acuerdo a lo establecido en el proyecto

5. **Resultados del proyecto: descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión; utilizando gráficos, tablas, esquemas y figuras y material gráfico que permitan poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.**

Esta sección el informe se deberá abordar conforme a los siguientes aspectos:

5.1 Resultados parciales obtenidos

El principal resultado parcial obtenido tiene relación a los ensayos de desafío que no pudieron ser llevados a cabo con mortalidades asociados a la infección viral. También se observa como resultado parcial la ausencia de cuantificación de Interferón en liofilizados. Actualmente se está trabajando para detectar el interferón mediante el uso de anticuerpos contra Interferón de *Salmo salar*. Esto imposibilitó el cálculo de E_{mx} o E_{PKR} o las UA asociadas a Mx o PKR.

- 5.2 Logro de Hitos. Se deberá hacer un completo y detallado análisis y reflexión en cuanto al avance, cumplimiento o eventual atraso del hito definido para el periodo. (ANÁLISIS DE BRECHA DE HITOS)

Hitos críticos	Fecha programada de cumplimiento	Cumplimiento (SI / NO)
Generación de Plasmidio Recombinante	Abril, 2013	SI
Generación de Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> capaces de expresar Interferón In Vitro.	Agosto, 2013	SI
Lograr un efecto inmunoestimulador y protector contra la infección viral del Interferón I producido por <i>Lactococcus lactis ex vivo</i> .	Julio, 2014	SI
Validar en peces el efecto inmunoestimulador y protector contra infecciones de IPN del alimento suplementado con <i>Lactococcus lactis</i> productor de Interferón I	Septiembre 2014	Si
Lograr la densidad de cultivo y producción de Interferón requerida (OD600 = 1,5)	Enero, 2015	SI

Todos los hitos del proyecto se cumplieron a pesar de los retrasos observados en alguno de ellos. Debido al retraso inicial del proyecto la mayor parte de los hitos se lograron en una fecha posterior a la propuesta originalmente. Sumado a esto están las dificultades propias de iniciar un proyecto sin experiencia previa. En particular el cuarto hito crítico mostró un retraso de 1 año. Las razones que explican este retraso son varias: 1.- Como los hitos están encadenados, el retraso en una etapa anterior repercute en el inicio y desarrollo de la nueva etapa. Por otra parte los experimentos de desafío y animalización tomaron varios meses en su realización, sin tener resultados positivos.

5.3 Actualizar análisis económico con y sin proyecto

La demanda por los inmunoestimulantes orales para salmones está conformada por las empresas productoras de salmón localizadas en Chile. En 2015 la producción alcanzó aproximadamente 800.000 toneladas brutas, siendo estimado un escenario similar para 2016. Para 2030 Chile debería producir alrededor de 1.200.000 toneladas de Salmónidos. Este mercado está conformado por más de 60 empresas, donde las 10 principales tienen un 77,0% de participación en la producción en el 2015, destacando Marine Harvest en primer lugar, luego Salmones Multiexport, Empresas AquaChile, Cermaq, Pesquera los fiordos, Camanchaca, Blumar, Australis Seafood, Salmones Humboldt y Cooke Aquaculture[6]. En 2014, la estructura de la industria en términos de producción puede verse en la tabla 1:

Tabla 1 Ingresos y volúmenes de producción en 2014 [7]

Nombre empresa	Ingreso por exportación (MM US\$) (7 USD/Kg)	Volumen exportado (tons)
Marine Harvest	472,5	67.500
Salmones Multiexport	379.4	54.200
Empresas AquaChile	364.0	52.000
Cermaq	343.0	49.000
Pesquera los fiordos	329.0	47.000
Total	1,887.9	269.700
Total Industria	3,672	524.610

El principal costo en la producción de salmones es el alimento (70% aprox.). Basado en la tasa de conversión de los Salmónidos (1,54)[8], el tamaño de este mercado en Chile fue de aproximada 1.200.00 tons. durante el 2015, cifra que significó un aumento del 70% respecto de las 700.000 tons. comercializadas en el 2010. De acuerdo al Anual Report de Ewos, empresa dedicada a la venta de alimento a la industria salmonera, y la cual tiene un área de negocios especializada en alimentos medicados, el porcentaje de “Functional Feed”, respecto al total de las ventas aumentó de un 16% en 2008 a un 25% en 2009, 35% en 2010, y a un 40% en 2011[9,10]. Estas cifras están claramente influenciadas por el efecto del virus ISA en nuestro país, donde se ha verificado el aumento por la demanda de aditivos alimentarios como forma de protección sanitaria en desmedro del uso de antibióticos que ha se visto disminuida en los últimos años. Por ejemplo, considerando que las ventas de alimento en la industria durante el año 2010 fueron equivalentes a US\$529 millones, las ventas de alimentos medicados el año 2010 se podrían estimar en US\$185 millones.

Mercado de los Inmunoestimulantes orales: Los alimentos medicados de acuerdo a entrevistas con la industria presentan un delta de precio respecto de los alimentos sin aditivos de entre un 6 a 10%, esto daría un mercado aproximado para los aditivos de alimentos de entre US\$30 y 40 millones al año. Este mercado incluye los inmunoestimulantes, probióticos, vitaminas, minerales, entre otros aditivos alimentarios. Por otro lado, si consideramos el precio promedio de estos aditivos de US\$100 de gasto en aditivo por tonelada de alimento comercializado, y en promedio el 30 a 40% de los alimentos comercializados son medicados, dada la tendencia de la industria salmonera a bajar el uso de antibióticos y aumentar el uso de estos aditivos considerados más saludables y no dañinos al medio ambiente, se estima un mercado para los aditivos de entre US\$21,9 a 28,8 millones. Por lo tanto, se estima el mercado de los inmunoestimulantes entre US\$10 a 15 millones de dólares en Chile, con tasas

de crecimiento equivalentes a la tasa con que crece el mercado de los alimentos medicados, es decir, un 40% en el 2011 (Annual Report Ewos 2010).

A pesar de esto no se dispone en la actualidad de un alimento funcional que estimule específicamente la respuesta antiviral. Esto ha provocado que los brotes de enfermedades virales sean un gran riesgo para la Salmonicultura. Como ejemplo en 2008 el brote de virus ISA provocó el cierre de más del 90% de los centros productores. Actualmente el virus IPNV es considerado endémico, sin embargo se estiman que es responsable de pérdidas equivalentes a 120 millones de USD (12% de la producción)[11,12] ya sea por su efecto directo o por la inmunosupresión que provoca[13,14]. En el escenario con proyecto, si estimamos que se puede aumentar la sobrevida en un 20% de lo que se reduce la carga viral, es posible reducir las pérdidas en 24 millones de dólares anualmente.

5.4 Análisis de impacto logrado a la fecha medido y diferenciando en al menos los siguientes aspectos: descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias; ventas y/o anuales (\$), nivel de empleo anual (JH), número de productores o unidades de negocio que pueden haberse replicado y generación de nuevas ventas y/o servicios; nuevos empleos generados por efecto del proyecto, nuevas capacidades o competencias científicas, técnicas y profesionales generadas.

Proyecto ha impactado de varias maneras, desde el punto de vista de formación de recursos humanos, ha permitido formar un profesional Bioquímico, Un Magister en Bioquímica, y un futuro Doctor en Biotecnología, con un total de 5 empleos entre personal técnico y administrativo. El proyecto permitió abrir una línea completamente nueva en la Universidad de Santiago, relacionada al uso de Bacterias ácido láctica como vehículos de secreción de péptidos inmunoestimulantes. Hasta donde conocemos somos el único grupo en el País que trabaja directamente en esta línea. También nos permitió establecer contacto con el Doctor Bermúdez-Humaran (INRA-FRANCIA) con el cual se postuló a un proyecto de cooperación internacional de formación de redes (CBA-USACH, INRA). Desde el punto de vista académico, la línea de investigación aplicada generada por el proyecto, es uno de los tópicos que se enseña a los estudiantes del Doctorado en Biotecnología de la USACH. Desde la perspectiva del ampliar a otras problemáticas la estrategia planteada en el proyecto FIA, en 2013 el CBA-USACH gano un concurso de formación de consorcios tecnológicos para formar un centro de Sanidad Acuícola. Dos subproyectos de esta iniciativa están basados en la experiencia ganada durante el desarrollo del proyecto FIA PYT20120056. Producto del proyecto también se generó una solicitud de patente para proteger la propiedad intelectual sobre la creación de sistemas inmunoestimulantes para salmónidos basado en bacterias ácido lácticas. También producto del proyecto se han presentado dos presentaciones a congresos científicos nacionales, dos presentaciones a congresos científicos internacionales y un seminario de difusión con Salmonicultores. La tecnología propuesta en el proyecto FIA PYT20120056 ha mostrado ser atractiva para los productores de salmones. Este apoyo se ve reflejado en la participación en los seminarios de difusión y en el apoyo de los miembros del Consorcio de Sanidad Acuícola al desarrollo de dos proyectos que usan *Lactococcus lactis* como vehículo de liberación de citoquinas y antígenos para salmones o sus patógenos, los cuales deberían terminar en productos dentro del plazo de dos años. Actualmente se está preparando las licencias para la comercialización y una publicación en una revista indexada donde se muestren los resultados obtenidos. Las bacterias generadas ya fueron depositadas en el Centro Chileno de Recursos Microbianos (INIA-Chillán).

5.5 Resultados e impactos

El presente proyecto propone el desarrollo de un sistema de expresión y liberación de Interferón I de *Salmo salar* en *Lactococcus lactis*. El interferón producido en *Lactococcus lactis* debería ser funcional logrando estimular *in vitro* la expresión de Mx y PKR y reducir la carga viral de IPN. *In vivo* se esperaba que la administración de esta bacteria permitiera estimular en los órganos inmunológicos del salmón la expresión de Mx y PKR, y además reducir la mortalidad ocasionada por el virus. Finalmente la bacteria productora de interferón debería ser factible de ser producido a escala piloto conservando sus propiedades.

El primer resultado a obtener fue generar una construcción que permita en *Lactococcus lactis*, la expresión y secreción de Interferón I de *Salmo salar*. Después de varios intentos el casete productor de interferón I de *Salmo salar* fue clonado en pNZ8149 (**Metodología en 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3, 3.5.4, 3.5.5, y 3.5.6**). Mediante secuenciación se logró comprobar la generación de la construcción esquematizada en la **Figura 1A**. Esta construcción fue transformada sobre *Lactococcus lactis* NZ3900 (**Metodología 3.5.7**), confiriendo la capacidad de crecer en medios conteniendo lactosa como única fuente de carbono **Figura 1B**.

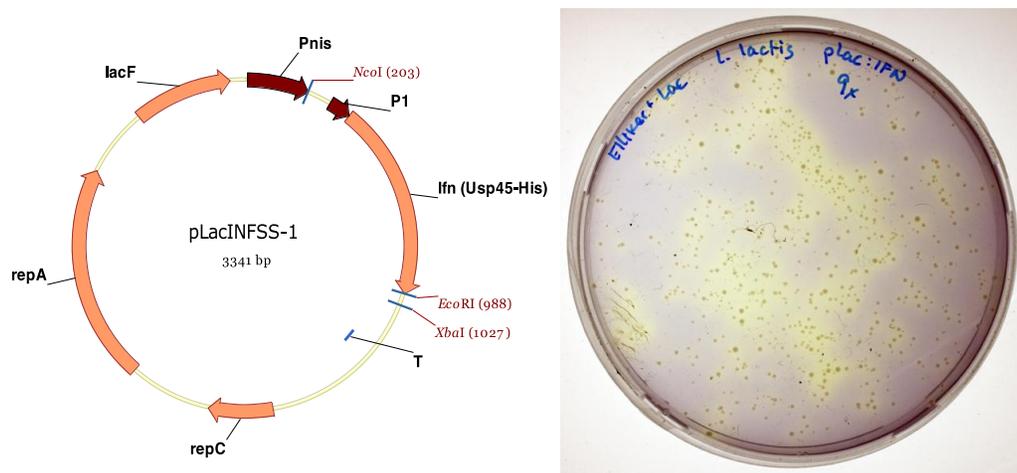


Figura 1: Construcción pLACINFSS-1. El panel izquierdo muestra el esquema de la construcción pLACINFSS.1, se aprecia el gen de IFN I, el promotor P1 y el péptido señal USP45. El panel de la derecha muestra el crecimiento de *Lactococcus lactis* NZ3900 transformada con el plasmidio pLACINFSS-1. El color amarillo es indicador de la metabolización de la lactosa.

El siguiente paso en el desarrollo del proyecto fue determinar si efectivamente la bacteria que contiene el plasmidio productor de interferón es capaz de inducir la expresión de interferón el cual debería ser detectado en el citoplasma de las bacterias o en el sobrenadante. Los primeros intentos fueron realizados mediante SDS-PAGE utilizando azul de coomassie o tinción con plata. Se esperaba que al igual que *Escherichia coli*, la proteína recombinante se visualizara fácilmente. Utilizando esta estrategia no fue posible obtener una señal atribuible al interferón. Por esto se decidió modificar el Interferón agregando una cola de histidina para

facilitar su detección usando anticuerpos comerciales. Usando esta estrategia la presencia del interferón pudo ser efectivamente determinada, tanto en mediante western blot (**Figura 2**) para el caso del interferón intracelular como dot blot (**Figura 3**) para sobrenadantes de medio de cultivo (**Metodología 3.5.8 y 3.5.9**).

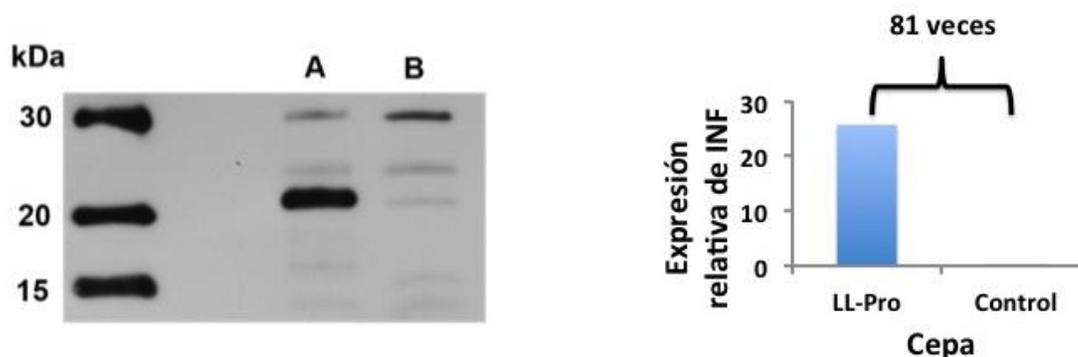
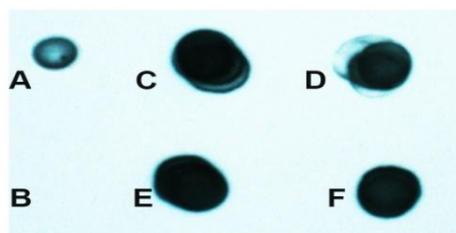


Figura 2: Expresión de Interferón. El panel izquierdo muestra el Western blot utilizando extractos de la cepa de *Lactococcus lactis* NZ3900 conteniendo el plasmidio pLACINFSS-1 (A) y la cepa control *Lactococcus lactis* NZ3900 pNZ8149 (B). L, corresponde al Ladder Histag (Life technologies). El panel derecho muestra la cuantificación mediante densitometría (ImageJ) de la banda de 21 kDa. La intensidad en cada carril fue normalizada respecto a la banda de aproximadamente 25 kDa. Se observa una diferencia de 81 veces entre la expresión de la cepa de *Lactococcus lactis* conteniendo el plasmidio productor de interferón (LL-Pro) y el control.



Figuras 3: Dot blot de extractos sobrenadantes de cultivos de *Lactococcus lactis* NZ3900 recombinante productora de IFN. En la figura se muestra el control positivo de dot blot (A) que corresponde a Levosucranasa-Histag. C,D,E y F muestra el resultado del dot blot usando los sobrenadantes de cuatro clones conteniendo el plasmidio productor de interferón. B muestra el resultado del sobrenadante usando extractos extracelulares de *Lactococcus lactis* NZ3900 conteniendo el plasmidio pNZ8149.

La cuantificación de la intensidad de la señal del interferón presente en el citoplasma indicó que en las bacterias productoras de interferón existe una señal 81 veces más intensa que la observada en el carril conteniendo los extractos de la cepa control (**Metodología 3.5.10 y 3.5.11**). Este resultado superó en 8,1 veces la meta propuesta. La cuantificación por el mismo método no pudo ser realizada para el interferón presente en el sobrenadante, principalmente

por la gran volumen de extracto que es necesario agregar a una SDS-PAGE para lograr la detección del Interferón.

Una vez lograda la detección del Interferón, se procedió a su cuantificación. La técnica elegida fue ensayos de ELISA. Un problema que existió fue la carencia de un estándar de interferón para poder comparar. Para soslayar este problema se utilizó un extracto de una proteína recombinante con cola de histidina, de concentración conocida. Utilizando la masa de esta proteína se estableció una curva entre OD450 observada y concentración molar de las colas de Histidina. Como la masa de Interferón es conocida, se pudo transformar la concentración molar de colas de histidina en concentración de interferón expresada en ng/μl. Los resultados utilizando este método muestran que la cepa conteniendo el plasmidio productor de interferón logra producir alrededor de 913 ng de Interferón por dosis (10^7 UFC) (**Figura 4**). Este valor supera en un 82% la meta propuesta de 500 ng de interferón por dosis (**Metodología 3.5.10 y 3.5.11**).

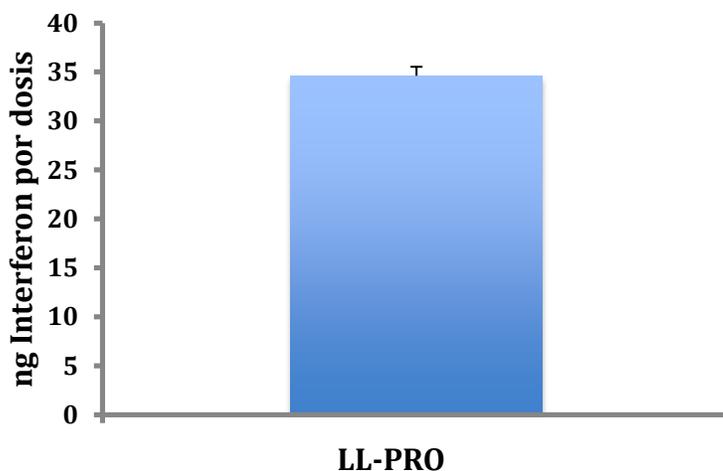


Figura 4: Producción de Interferón: La figura muestra la cuantificación mediante ELISA de la expresión de interferón presente en la cepa productora de interferón (LL-PRO). Los valores obtenidos fueron normalizados de tal manera de expresar en ng de interferón por cada 10^7 UFC (una dosis).

Muchas proteínas especialmente pertenecientes a animales necesitan estar modificadas para ser funcionales. Estas modificaciones son realizadas durante el proceso de síntesis en la célula que la produce. Las bacterias a diferencia de las células eucarióticas carecen de los sistemas de modificación posttraduccional necesarios para producir la proteína funcional. Por esta razón siempre es necesario evaluar la funcionalidad de la proteína cuando ésta se produce en modelos bacterianos como *Escherichia coli* o *Lactococcus lactis*. Para validar la funcionalidad del Interferón producido en *Lactococcus lactis* se propuso evaluar la capacidad de extractos enriquecidos en esta proteína de inducir la expresión de los genes de respuesta a Interferón Mx y PKR.

Respecto a Mx nuestros resultados muestran que el Interferón producido por LL-PRO es capaz de inducir la expresión de Mx de una manera dosis dependiente, incrementando su expresión entre 7 y 330 veces (**Figura 5**). Nuestros resultados también indican que el Interferón producido por LL-PRO es capaz de inducir la expresión de PKR entre 16 y 37 veces (**Figura 6**). El menor nivel de inducción es acorde con la función biológica de PKR, mientras Mx actúa impidiendo el ensamblaje del virus por unión a la molécula de nucleoproteína, PKR es una enzima siendo necesaria una pequeña cantidad para producir el efecto biológico (**Metodología 3.5.12 y 3.5.13**).

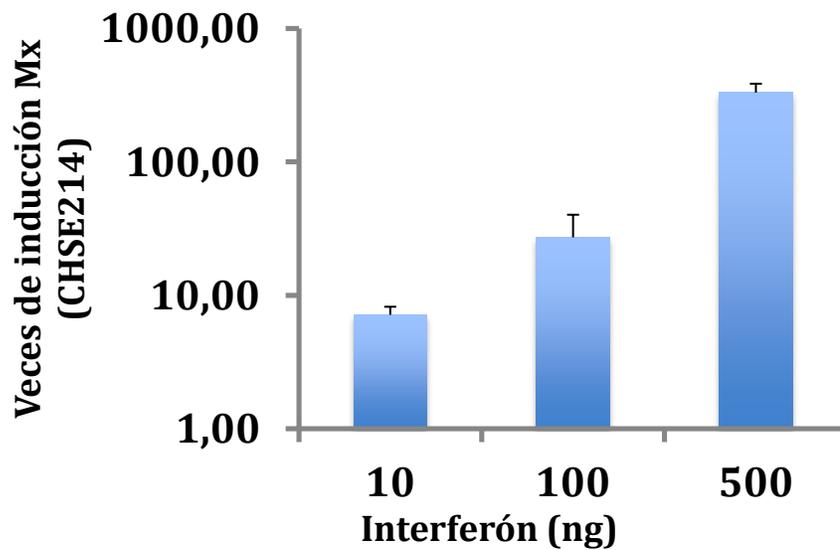


Figura 5: Estimulación de Mx. La figura muestra la estimulación de Mx a diferentes cantidades de Interferón. Los experimentos fueron conducidos sobre cultivo de células CHSE-214 y normalizados respecto a la inducción por parte del control negativo.

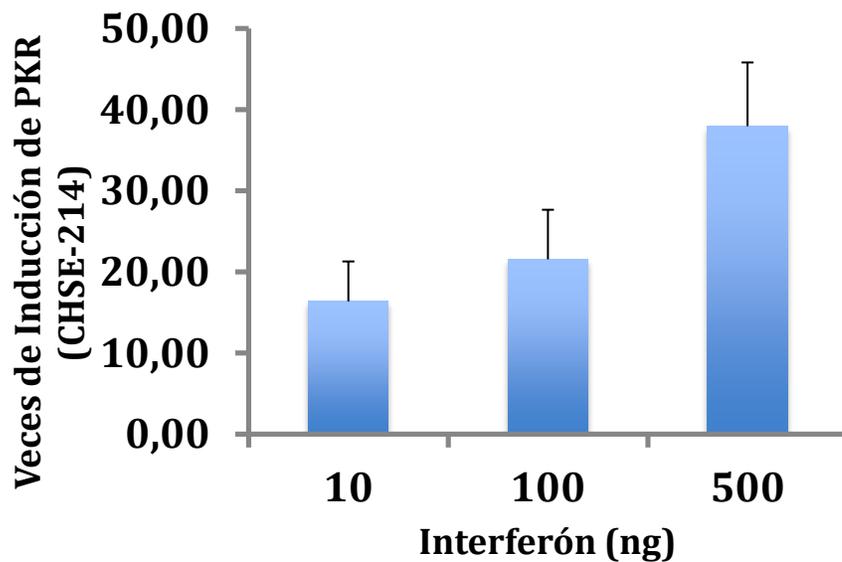


Figura 6: Estimulación de PKR. La figura muestra la estimulación de PKR a diferentes cantidades de Interferón. Los experimentos fueron conducidos sobre cultivo de células CHSE-214 y normalizados respecto a la inducción por parte del control negativo.

En relación a los indicadores de actividad de Interferón, para Mx se logró un nivel de estimulación por dosis (E_{Mx}) entre 248 y 652 E_{Mx} , estos valores superan al esperado (20 E_{Mx}) en al menos 10 veces. A diferencia de lo observado en el caso anterior no se aprecia una relación dosis- efectos (**Figura 7**). Para el caso de PKR, se lograron valores de inducción por dosis (E_{PKR}) entre 1493 y 69 (**Figura 8**). Estos valores superan los valores propuestos en el proyecto (20E) y los obtenidos en los descritos en el informe anterior. En esta ocasión a menor concentración de Interferón se observa proporcionalmente una mayor inducción de PKR. Probablemente al ser PKR una enzima, su mecanismo de inducción es bastante controlado requiriéndose grandes cantidades de Interferón para incrementar levemente la expresión de este gen.

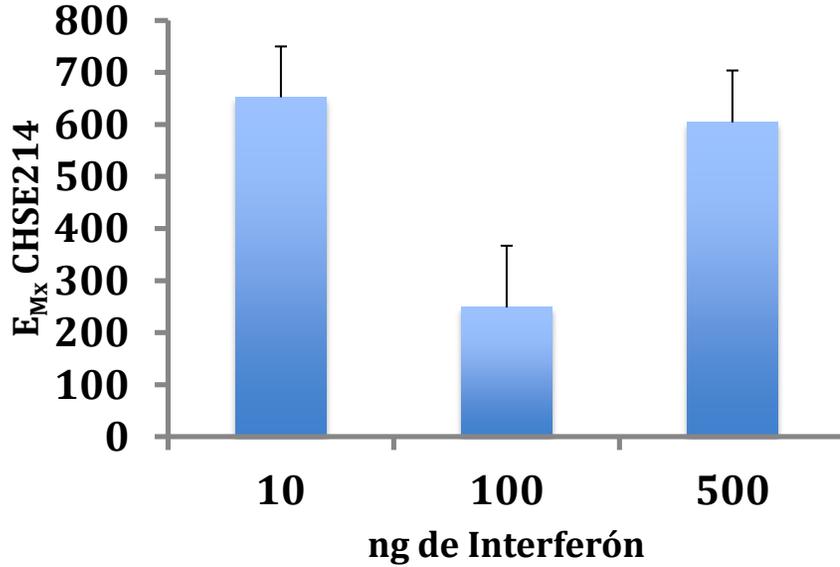


Figura 7: Estimulación de Mx por dosis. La Figura muestra la estimulación de Mx por dosis de LL-PRO usada, las veces de inducción se encuentran normalizadas respecto al control negativo.

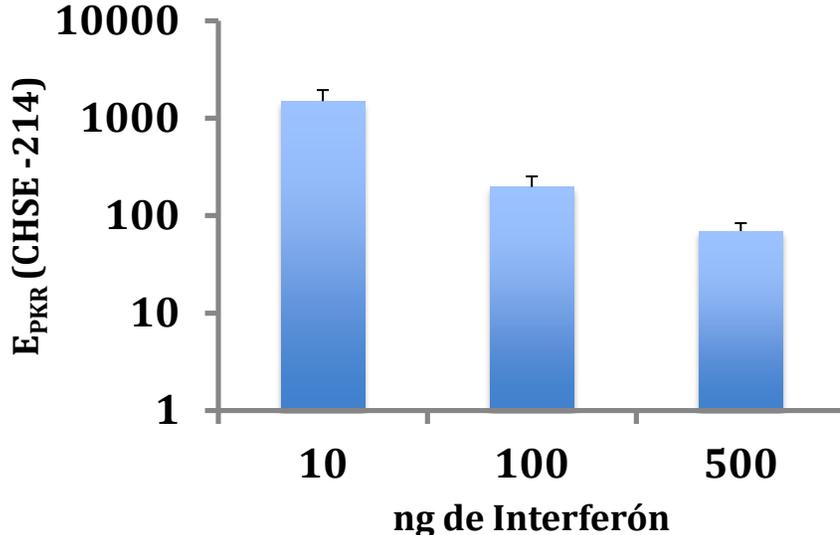


Figura 8: Estimulación de PKR por dosis. La Figura muestra la estimulación de PKR por dosis de LL-PRO usada, las veces de inducción se encuentran normalizadas respecto al control negativo. Se utilizó una escala logarítmica en E_{PKR} .

La bioactividad del interferón (UA_{INF}) también fue evaluada. Definida en este proyecto como el Logaritmo natural de las veces de inducción de Mx o PKR respecto a 50 ng de interferón, se

evaluó este parámetro 10, 100 y 500 ng de interferón. Para Mx se obtuvieron valores entre 13 y 35 UA (Figura 9). Este valor se encuentra sobre el valor esperado de $6UA_{Mx}$. Respecto a la Bioactividad del Interferón para inducir PKR se lograron valores 81 y 3 UA_{PKR} (Figura 10). Al igual que en el caso anterior las UA_{PKR} disminuyen a medida que aumenta la cantidad de Interferón, alcanzado el valor propuesto cuando la cantidad de Interferón es menor a 100 ng. Nuestros resultados indican que respecto a PKR la cantidad óptima implica el uso de reducidas cantidades de Interferón.

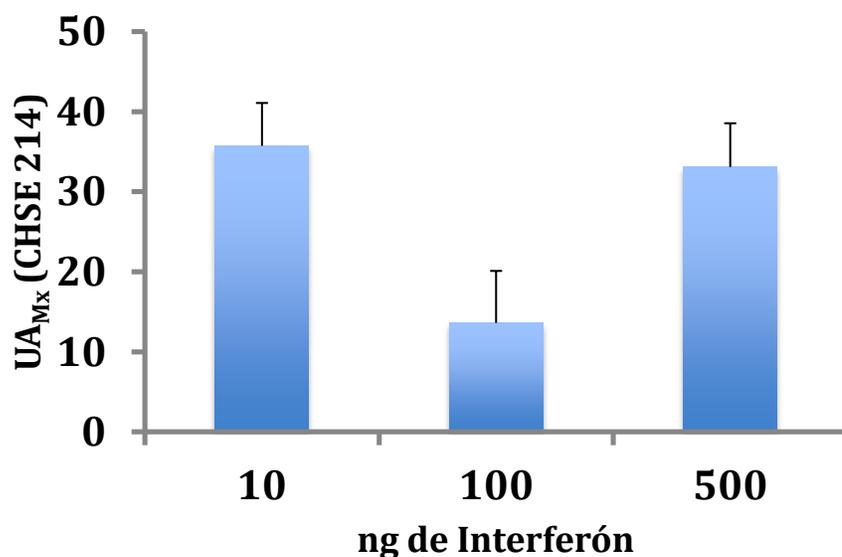


Figura 9: Actividad específica del Interferón sobre Mx: La figura muestra la actividad específica del interferón sobre la inducción de Mx en células CHSE-214. La actividad fue normalizada respecto al control negativo.

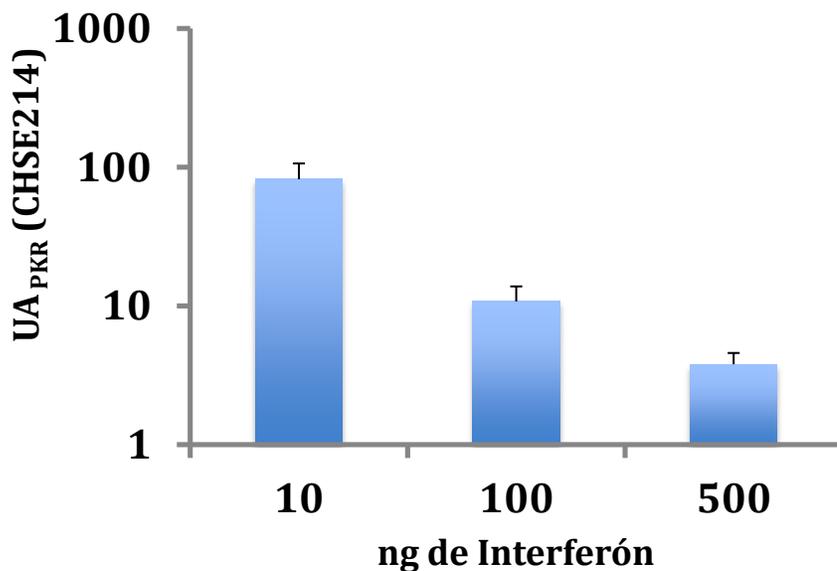


Figura 10: Actividad específica del Interferón sobre PKR: La figura muestra la actividad específica del Interferón sobre la indicción de PKR en células CHSE-214. La actividad fue normalizada respecto al control negativo.

La actividad antiviral del Interferón producido por *Lactococcus lactis* también fue evaluada midiendo el efecto de 10, 100 y 500 ng sobre la cinética de replicación viral por un periodo de 168 horas. Como control positivo de actividad antiviral se utilizó Poli I:C el cual actúa simulando una infección viral. El efecto del Interferón y poli I:C se hace evidente después de las 24 horas, alcanzando la máxima diferencia a las 168 horas donde a 500 ng de Interferón se logra disminuir la carga viral a la cantidad equivalente a la existente al inicio del experimento (**Figura 11**). Después de 168 horas, la carga viral ha disminuido a un 0,21% con 500 ng de IFN (disminución de un 99,79 %), a un 0,8% con 100 ng (disminución de 99,2 %) y a un 1,9% con 10 ng (disminución de un 98,1 %)(**Figura 12**). En el gráfico de la figura 12, el tiempo 0 corresponde a las partículas virales en el inicio de la infección viral. Con 500 ng de Interferón, luego de 168 horas, se logra un valor de R_{IPNV} de 0,9979, lo que representa un avance de un 99,79% respecto a lo propuesto en el proyecto. (**Figura 13**). La carga viral fue determinada mediante QPCR, pues permite realizar un mayor número de análisis por unidad de tiempo (**Metodología 3.5.14, 3.5.15.y 3.5.16**).

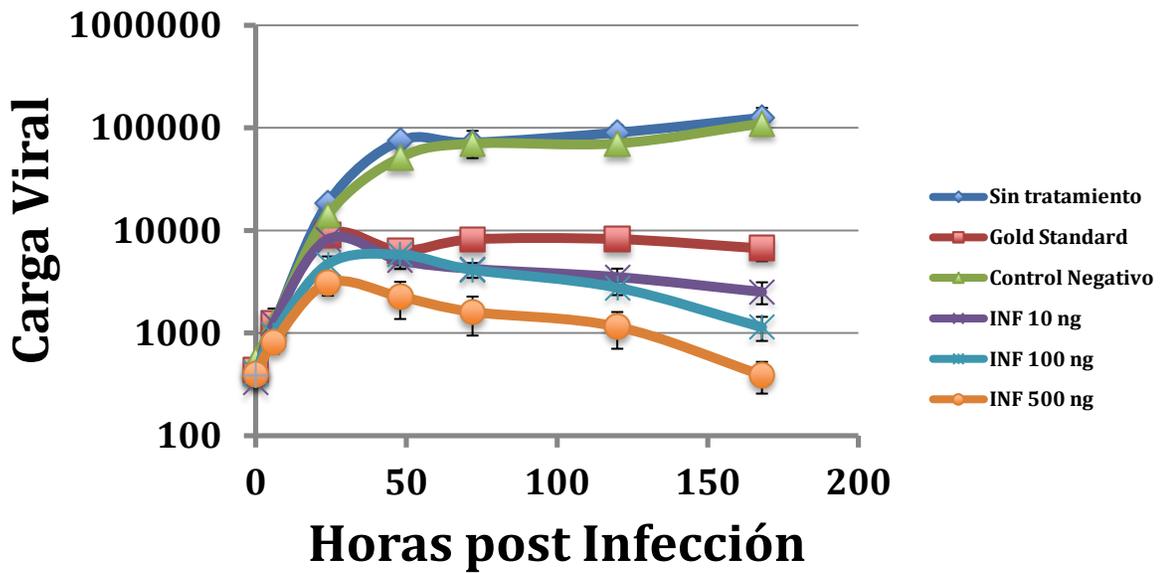


Figura 11: Cinética de infección viral. La figura muestra la cinética de infección viral de células SHK-1 infectadas con IPNV. Las células fueron tratadas con varias cantidades de Interferón y muestras de medio de cultivo fueron tomadas cada ciertas unidades de tiempo. Se aprecia un efecto dosis dependiente. Como Gold Standard Antiviral se uso Poli I:C.

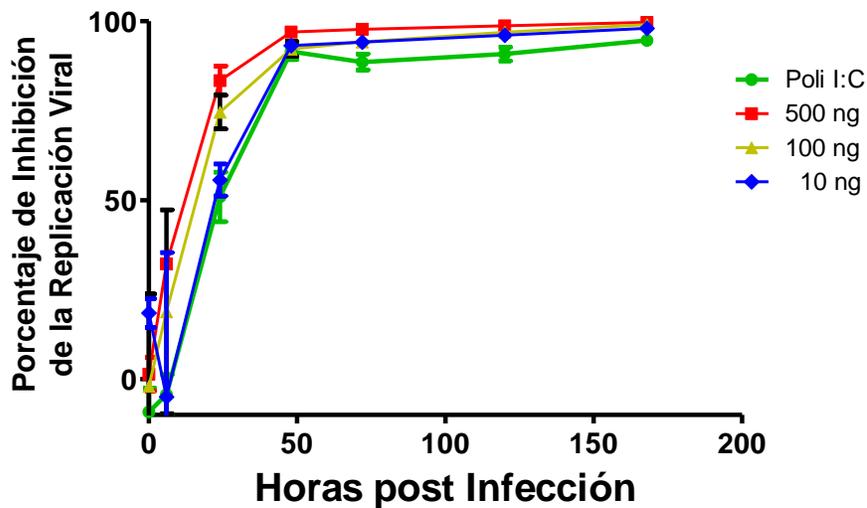


Figura 12: Cinética de la inhibición de la Replicación viral: La Figura muestra la cinética de inhibición de la replicación viral de células SHK-1 pretratadas con diferentes dosis de Interferón.

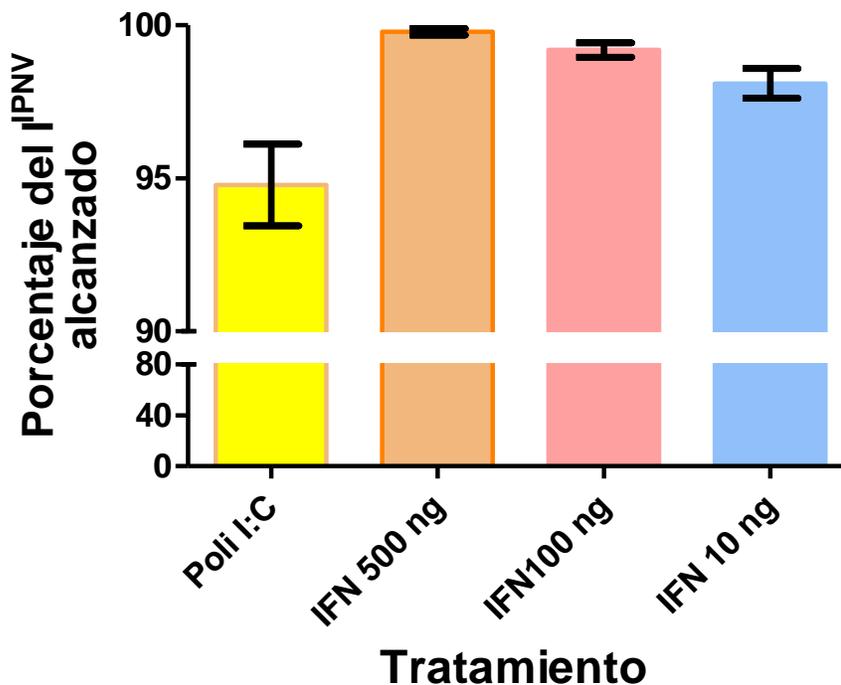


Figura 13: Porcentaje del I_{IPNV} alcanzado. La Figura muestra el porcentaje de I_{IPNV} alcanzado respecto a la meta propuesta, luego de 168 horas.

Una vez establecida la funcionalidad *in vitro* del Interferón generado se procedió a evaluar *in vivo* las propiedades de la bacteria productora de Interferón recombinante. Al igual que en cultivo *in vitro* se evaluaron los niveles de expresión de Mx y PKR como indicadores de la capacidad de la bacteria productora de interferón de estimular la respuesta antiviral en el pez. Tres grupos de 10 peces (peso promedio de 10 gramos) fueron alimentados con 10^7 UFC de la cepa de *Lactococcus lactis* productora de Interferón durante un periodo de 5 días. Como control se utilizó el mismo diseño experimental; sin embargo, en este caso se administró *L. lactis* con el plasmidio pNZ8149 y alimento sin bacterias. Cada grupo fue sacrificado al día 1, 3 y 10 post tratamiento. De cada conjunto de peces se extrajo RNA de los órganos inmunológicos bazo y riñón anterior. Este RNA fue usado para realizar reacciones de transcripción reversa las cuales a su vez de usaron para cuantificar la expresión de Mx y PKR mediante qPCR. La expresión de los genes fue normalizada respecto a la condición control, la cual corresponde a la dieta *L. lactis* con el plasmidio pNZ8149. No se registró mortalidad a causa del tratamiento administrado y el análisis necrótico de los peces sacrificados no mostró diferencias entre los distintos grupos analizados. Nuestros resultados mostraron que la máxima estimulación de Mx se logra en el bazo a un día post tratamiento con la cepa productora de interferón alcanzando un nivel de estimulación equivalente a 85.000 veces. Posteriormente, la estimulación de Mx decae rápidamente, alcanzando 1,5 veces a los 10 días post tratamiento (**Figura 14**). El valor al día 1 post tratamiento supera en 4250 veces al propuesto al inicio del proyecto. En riñón se observa un efecto inverso, en el cual disminuye la

expresión de Mx al primer día post tratamiento de 5,4 veces, y luego ésta se incrementa hasta alcanzar un valor de 4,5 veces al día 10 post infección (**Figura 15**) (**Metodología 3.5.17, 3.5.18**). No está claro el por qué existe tal diferencia en la estimulación de bazo y riñón: una posible explicación estaría determinada por el flujo de Interferón a través del torrente sanguíneo el cual se inicia desde los intestinos, continuando por el bazo y finalmente circulando por el riñón. Es interesante observar la aparente contra regulación que existe entre bazo y riñón, pues podría prolongar el efecto protector de LL-PRO al estimular en tiempos distintos a ambos órganos. Otra alternativa que podría explicar la diferencia de inducción en bazo y riñón, es la potencial residencia de *L. lactis* en ambos órganos. En experimentos relativos a encontrar bacterias residentes, se ha encontrado una abundancia mayor en bazo que en riñón, lo que podría explicar la mayor inducción observada en bazo.

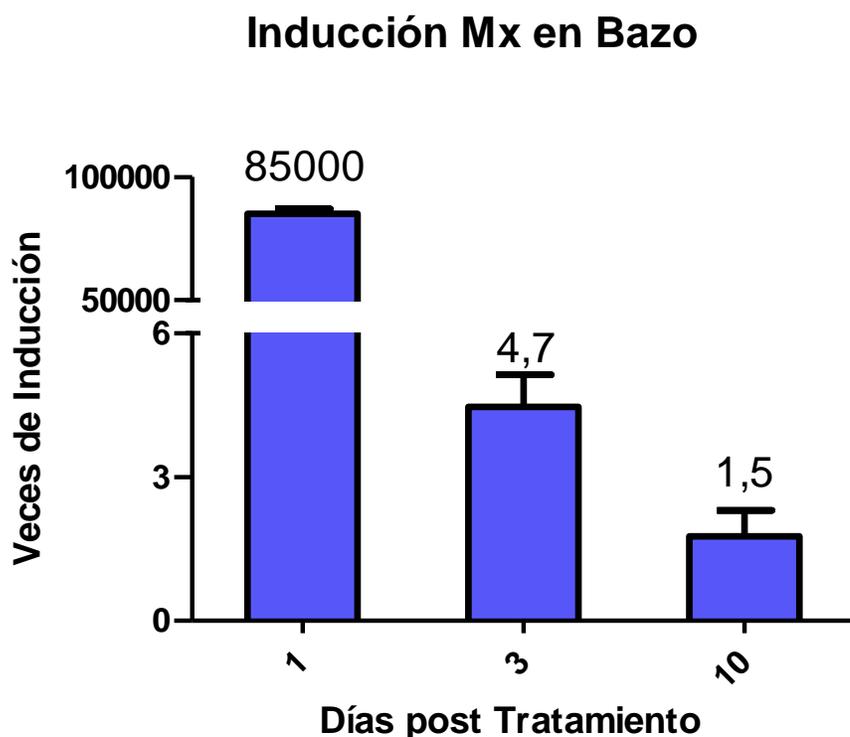


Figura 14: Inducción de Mx en Bazo. La Figura muestra las veces de inducción de Mx en bazo a 1, 3 y 10 días post tratamiento (10^7 UFC de LL-PRO durante 5 días). La expresión de Mx fue normalizada respecto a la expresión de Mx en bazo extraído de peces alimentados con 10^7 UFC de *L. lactis* conteniendo el plasmidio pNZ8149.

Inducción Mx en Riñón

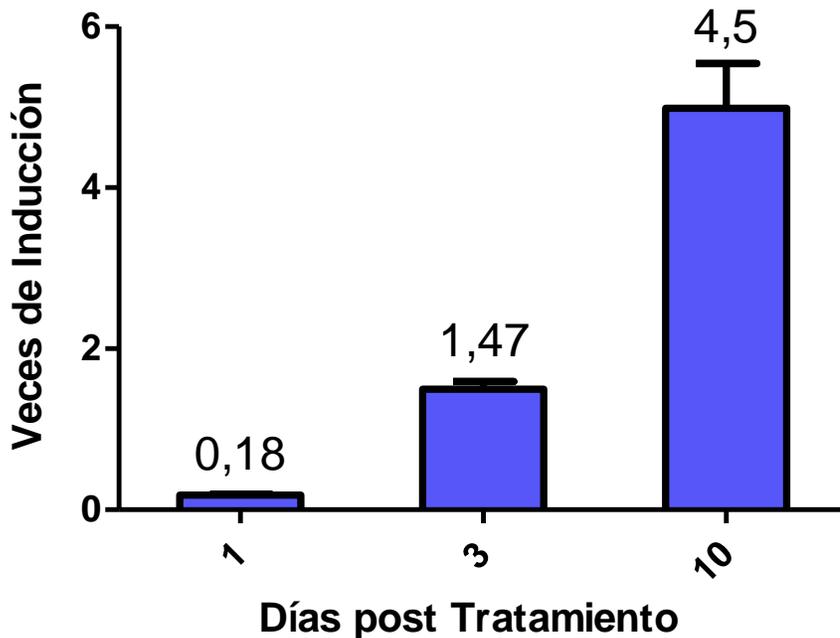


Figura 15: Inducción de Mx en Riñón. La Figura muestra las veces de inducción de Mx en riñón a 1, 3 y 10 días post tratamiento (10^7 UFC de LL-PRO durante 5 días). La expresión de Mx fue normalizada respecto a la expresión de Mx en Bazo extraído de peces alimentados con 10^7 UFC de *L. lactis* conteniendo el plasmidio pNZ8149.

En relación a PKR, se observa que el máximo de estimulación en bazo ocurre al día tres post tratamiento con un incremento promedio de 9,1 veces (**Figura 16**). En riñón se observa una moderada represión, alcanzando un valor máximo de 0,38 veces y un valor mínimo de 0,6 veces al tercer día (**Figura 17**). Este es un cambio bastante modesto en relación a lo esperado, pero es posible que el máximo de inducción de PKR se encuentre en forma posterior a los 10 días de post tratamiento analizados.

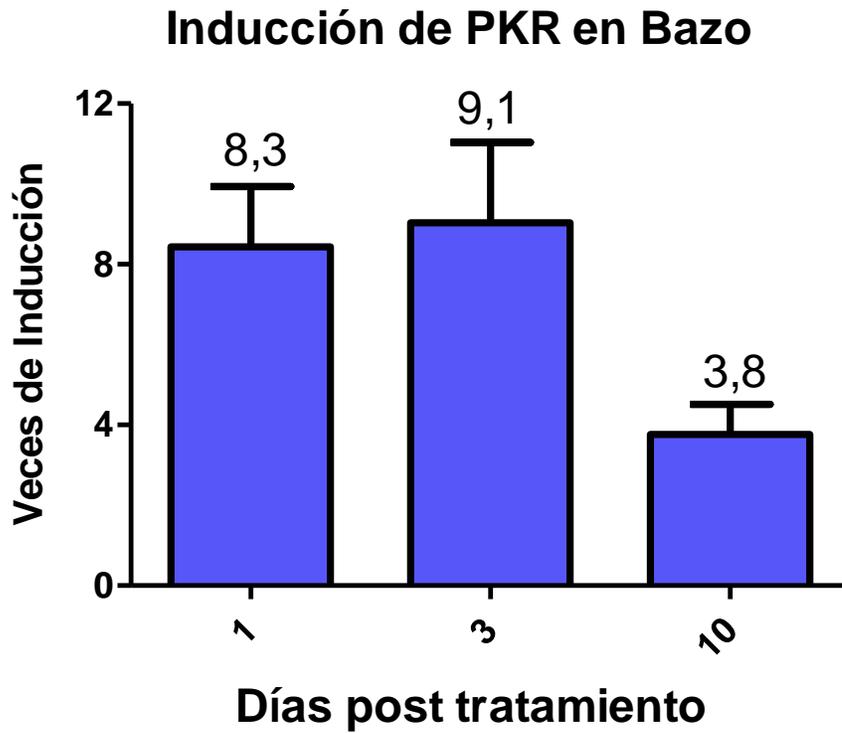


Figura 16: Inducción de PKR en bazo. La Figura muestra las veces de inducción de PKR en bazo a 1, 3 y 10 días post tratamiento (10^7 UFC de LL-PRO durante 5 días). La expresión de Mx fue normalizada respecto a la expresión de Mx en bazo extraído de peces alimentados con 10^7 UFC de *L. lactis* conteniendo el plasmidio PNZ8149.

Inducción de PKR en Riñón

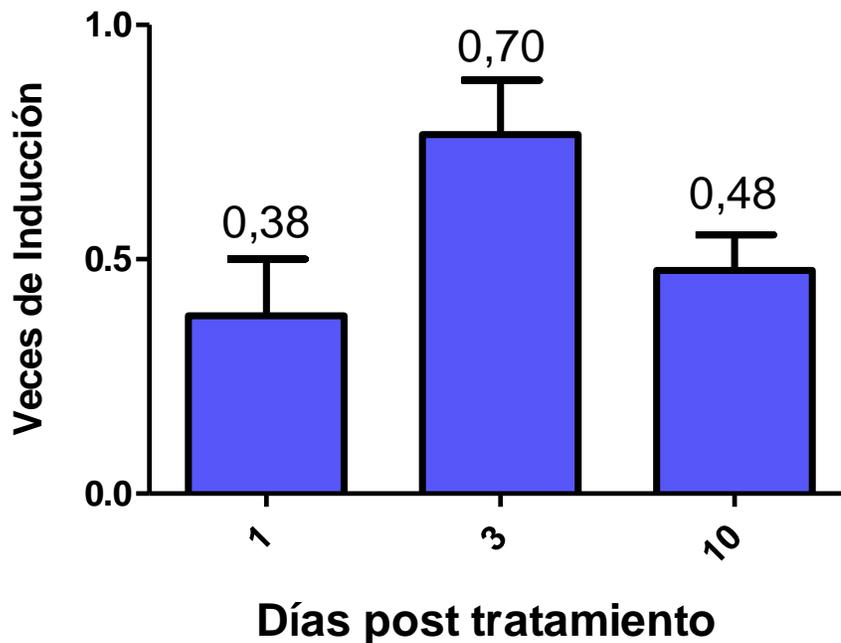


Figura 17: Inducción de PKR en riñón. La Figura muestra las veces de inducción de PKR en riñón a 1, 3 y 10 días post tratamiento (10^7 UFC de LL-PRO durante 5 días). La expresión de Mx fue normalizada respecto a la expresión de Mx en bazo extraído de peces alimentados con 10^7 UFC de *L. lactis* conteniendo el plasmidio PNZ8149.

Una vez determinado el efecto *in vivo* de la bacteria productora de interferón sobre la expresión de los genes antivirales se iniciaron las pruebas de desafío. Originalmente se planteó analizar el efecto antiviral directamente evaluando el incremento de la sobrevivencia. Este experimento no resultó tan sencillo, elevadas mortalidades de los controles sin infección sumado a ausencia de mortalidad asociada a la infección viral imposibilitaron determinar si la administración de *Lactococcus lactis* productor de Interferón aumenta la sobrevivencia a la infección por IPNV. Dado este escenario se decidió cambiar de estrategia y esta vez evaluar si la administración de *Lactococcus lactis* productor de interferón logra reducir la carga viral en los órganos inmunológicos. Experimentos preliminares indicaron que 5 días de tratamiento con 10^7 UFC logran reducir la carga viral en un 45% en bazo (**Figura 18**) y un 75% en riñón (**Figura 19**), al día 6 post infección. Experimentos realizados por un periodo de tiempo más largo 60 días post infección mostraron resultados similares (**Figura 21 y 22**) (**Metodología 3.5.19, 3.5.20, 3.5.21, 3.5.22 y 3.5.23**)

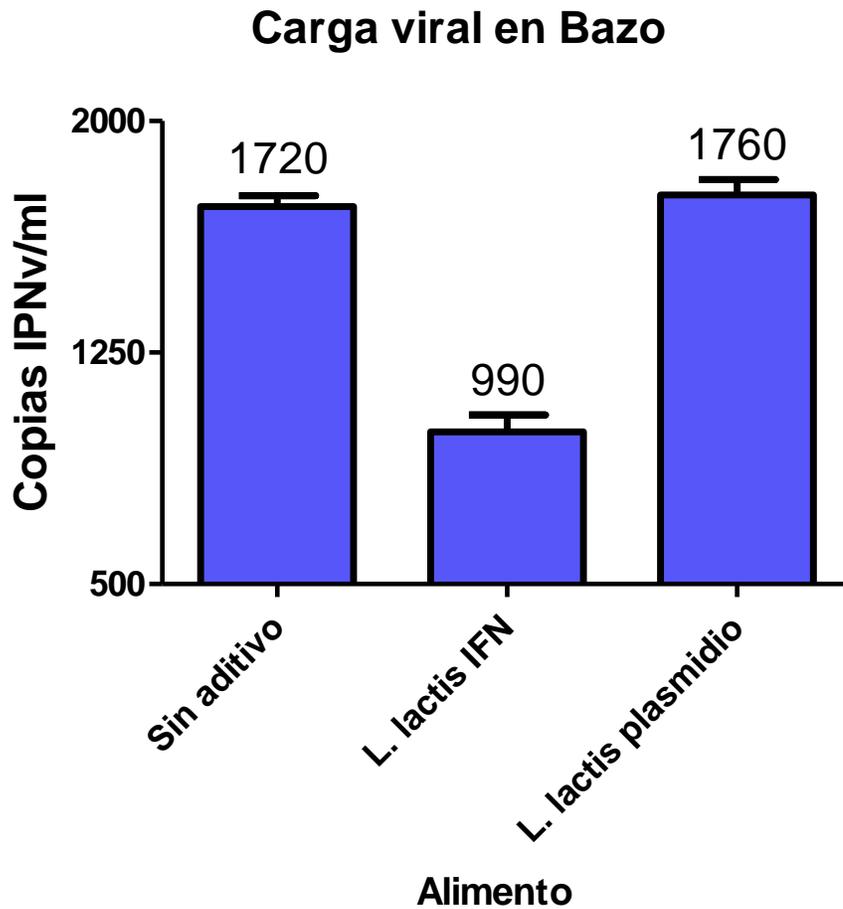


Figura 18: Efecto de las administración de *Lactococcus lactis* productor de interferón sobre la carga viral en bazo, al 6 día post infección. El gráfico muestra las copias/ug de virus IPN en diferentes condiciones de alimentación. Alimento sin suplementar con *Lactococcus lactis* (Sin Aditivo), Alimento suplementado con 10^7 UFC de *Lactococcus lactis* productor de interferón (L. lactis IFN) y Alimento suplementado con 10^7 UFC de *Lactococcus lactis* pNZ8149.

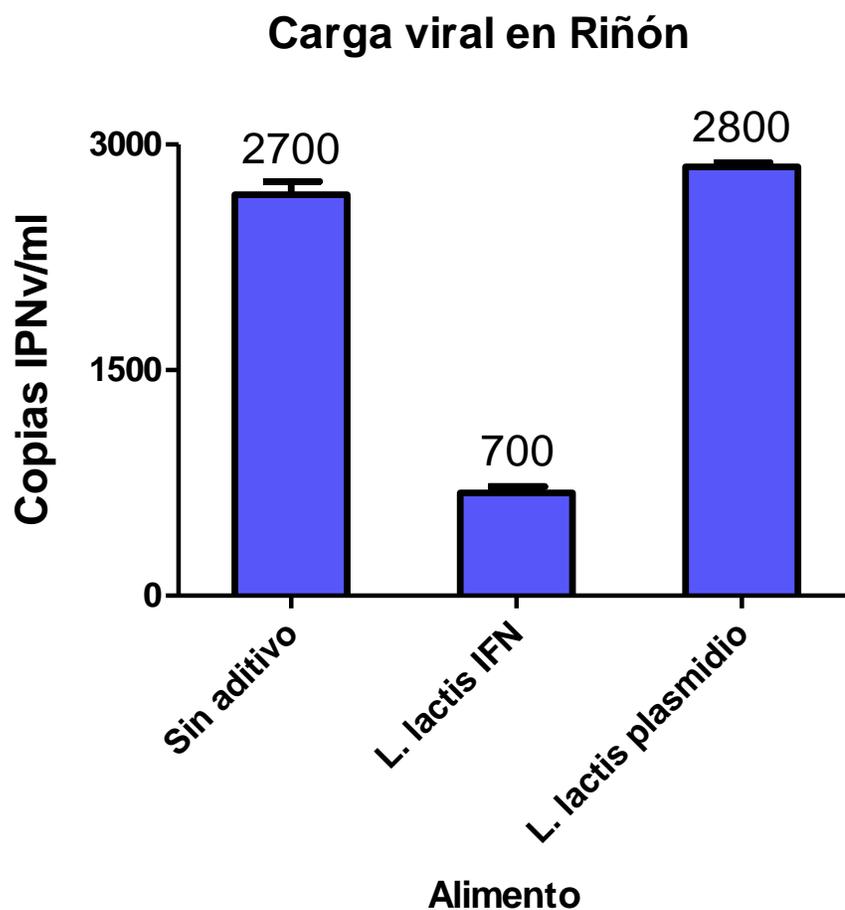


Figura 19: Efecto de las administración de *Lactococcus lactis* productor de interferón sobre la carga viral en Riñón al 6 día post infección. El gráfico muestra las copias/ug de virus IPN en diferentes condiciones de alimentación. Alimento sin suplementar con *Lactococcus lactis* (Sin Aditivo), Alimento suplementado con 10^7 UFC de *Lactococcus lactis* productor de interferón (L. lactis INF) y Alimento suplementado con 10^7 UFC de *Lactococcus lactis* pNZ8149.

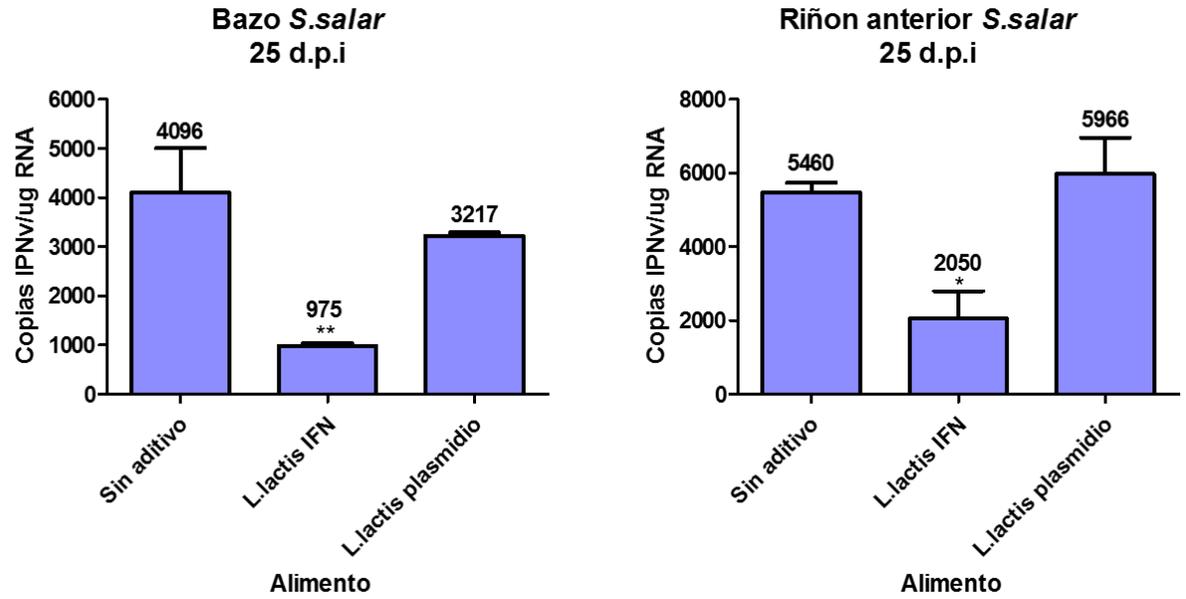


Figura 20. Detección de IPNV en peces tratados con *L.lactis* productor de interferón día 25 postinfección. El gráfico muestra las copias/ug de virus IPN en diferentes condiciones de alimentación. Alimento sin suplementar con *Lactococcus lactis* (Sin Aditivo), Alimento suplementado con 10^7 UFC de *Lactococcus lactis* productor de interferón (L. lactis INF) y Alimento suplementado con 10^7 UFC de *Lactococcus lactis* pNZ8149. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía no paramétrico (Kruskal Wallis) y un post test de comparación múltiple de Dunn. * $P < 0.05$.

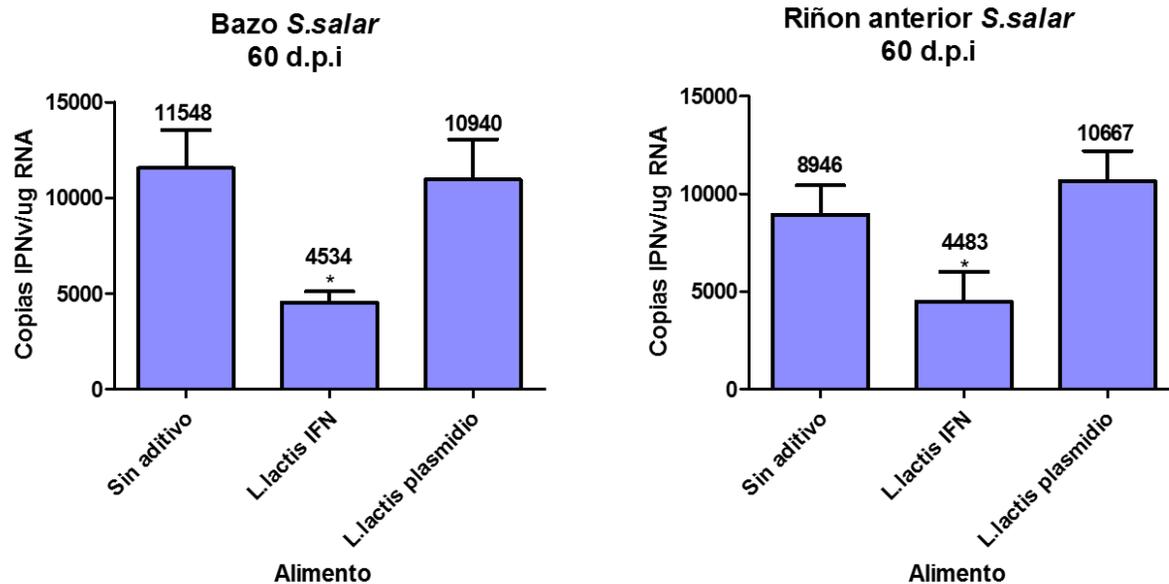


Figura 21. Detección de IPNV en peces tratados con *L.lactis* productor de interferón día 60 post infección. El gráfico muestra las copias/ug de virus IPN en diferentes condiciones de alimentación. Alimento sin suplementar con *Lactococcus lactis* (Sin Aditivo), Alimento suplementado con 10^7 UFC de *Lactococcus lactis* productor de interferón (L. lactis INF) y Alimento suplementado con 10^7 UFC de *Lactococcus lactis* pNZ8149. Los resultados fueron analizados con ANOVA de una vía no paramétrico (Kruskal Wallis) y un post test de comparación múltiple de Dunn. * $P < 0.05$.

Una vez determinado que la administración in vivo de *Lactococcus lactis* productor de interferón confiere un estado de resistencia a la infección viral, se procedió a escalar las condiciones de cultivo. Se contactó a la empresa Biopolis SA (España) con amplia experiencia en la fermentación de bacterias. Se solicitó ajustar las condiciones de crecimiento de tal manera de optimizar la biomasa. El ajuste del pH y medio de cultivo permitió lograr una OD máxima a 600 nm, de 14,2, lo que equivale a 150 millones de dosis por m^3 , superando los 10 millones de dosis por m^3 a la meta propuesta.

Se intentó cuantificar la cantidad de interferón mediante ELISA. No se obtuvieron resultados, probablemente porque el proceso de liofilización afecta la síntesis de proteínas. Por otra parte experimentos con diferentes cantidades de extractos citoplasmáticos de la bacteria liofilizada (enviada desde Biopolis), no mostraron efectos sobre la inducción de la expresión de Mx o PKR (**Metodología 3.5.27 y 3.5.28**). Cuantificación de la viabilidad de las células después de 3 meses de almacenamiento indicó que se había reducido en dos órdenes de magnitud (**Figura 22**) (**Metodología 3.5.26**). Dado que la liofilización pudo afectar la producción de interferón, se decidió administrar el liofilizado a los peces junto con el alimento (**Metodología 3.5.29**). Esto permitiría a las bacterias recuperarse y expresar el interferón. Nuestros resultados mostraron que el liofilizado logra inducir la expresión de Mx principalmente en Riñón (4 veces, al tercer día). Para PKR se observó un incremento en la expresión, aunque

los valores del control también se mostraron elevados especialmente 1 día después de terminado el tratamiento (Figura 23, 24, 25, 26 y 27).

En relación a la comercialización se logró enviar una solicitud de patente nacional N°: 3797-2015: "Bacteria ácido láctica transformada para producir IFN, plasmidio, alimento probiótico para peces que la comprende, método para inmunoestimular peces y método para preparar alimento probiótico" Este paso es previo al inicio al licenciamiento a la empresa ACTIVAQ.

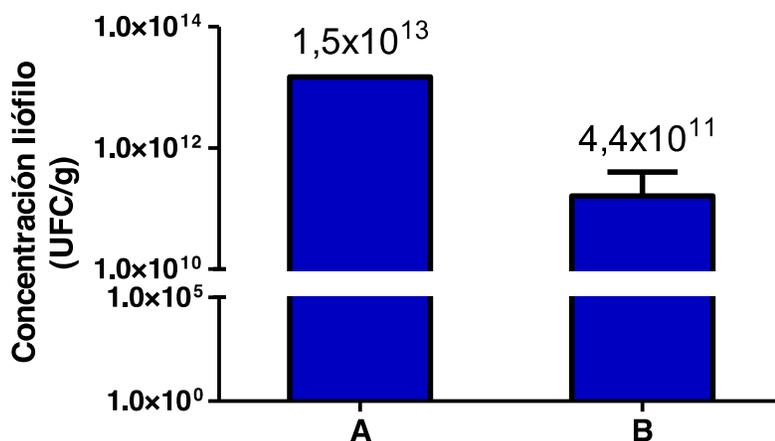


Figura 23. Concentración de UFC en liofilizado. La figura muestra la concentración de unidades formadoras de colonia (UFC) presentes en el liofilizado de *Lactococcus lactis* productor de interferón. En A se muestra la concentración informada por Biopolis y en B, la concentración determinada después de tres meses de almacenamiento.

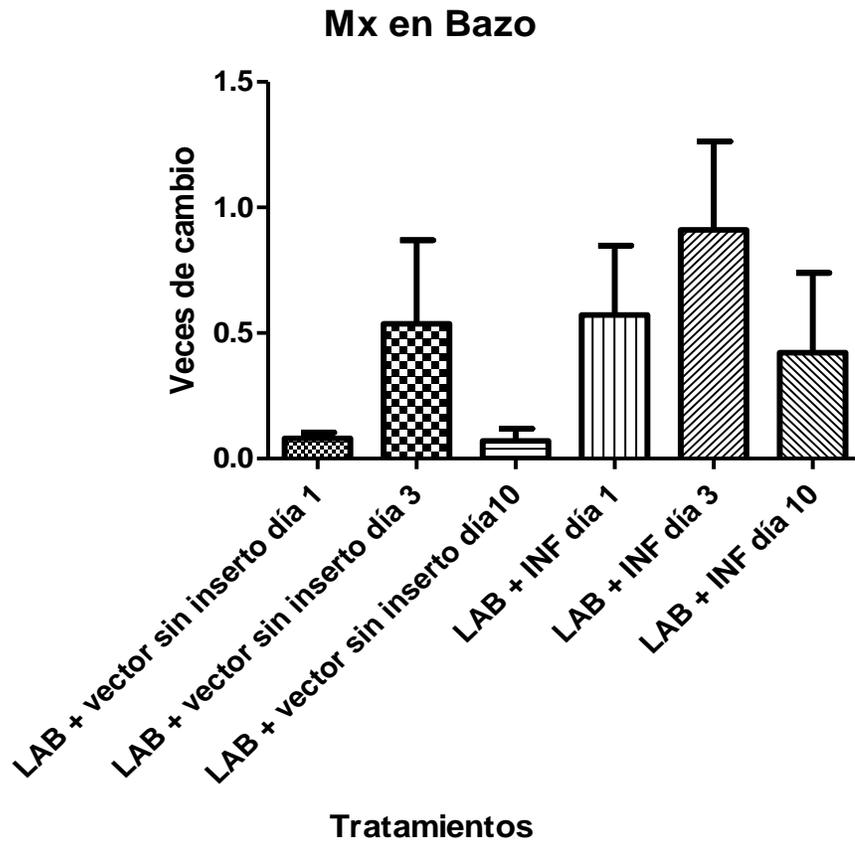


Figura 24. Estimulación de Mx en Bazo. La figura muestra la expresión de Mx en Bazo relativa a los peces tratados con alimento normal. Se evaluó la expresión a 1, 3, y 10 días terminado el tratamiento.

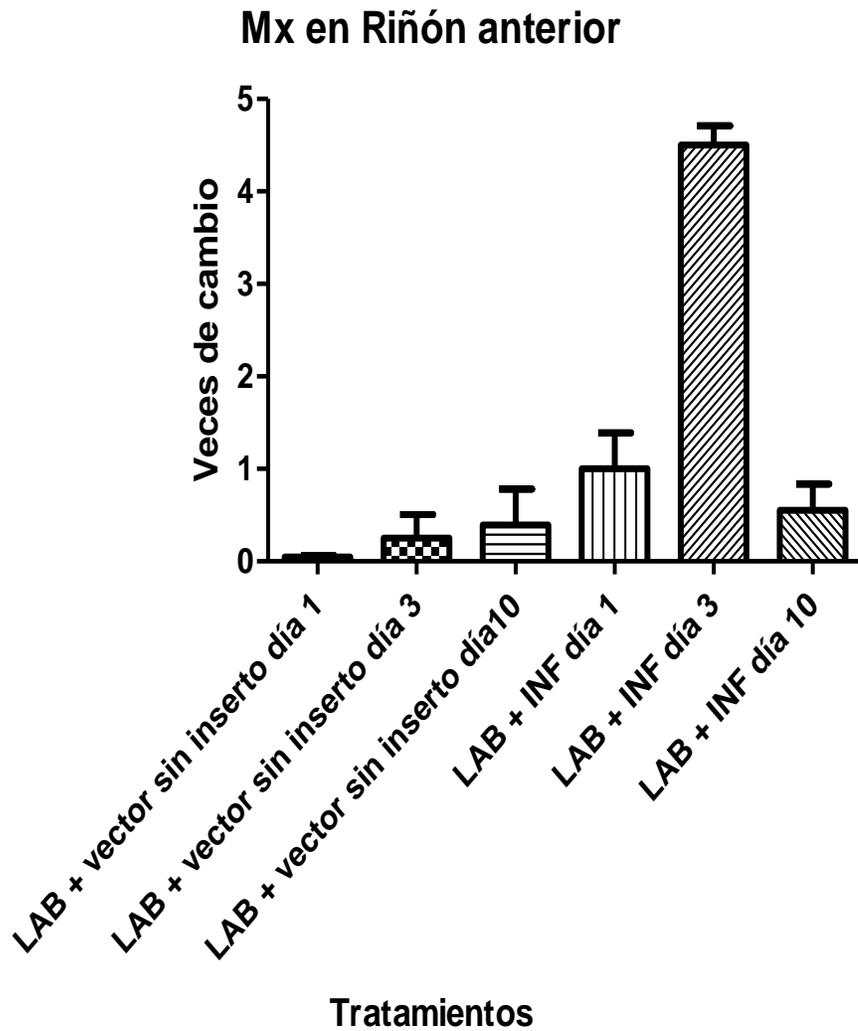


Figura 25. Estimulación de Mx en Riñón. La figura muestra la expresión de Mx en Riñón relativa a los peces tratados con alimento normal. Se evaluó la expresión a 1, 3, y 10 días terminado el tratamiento.

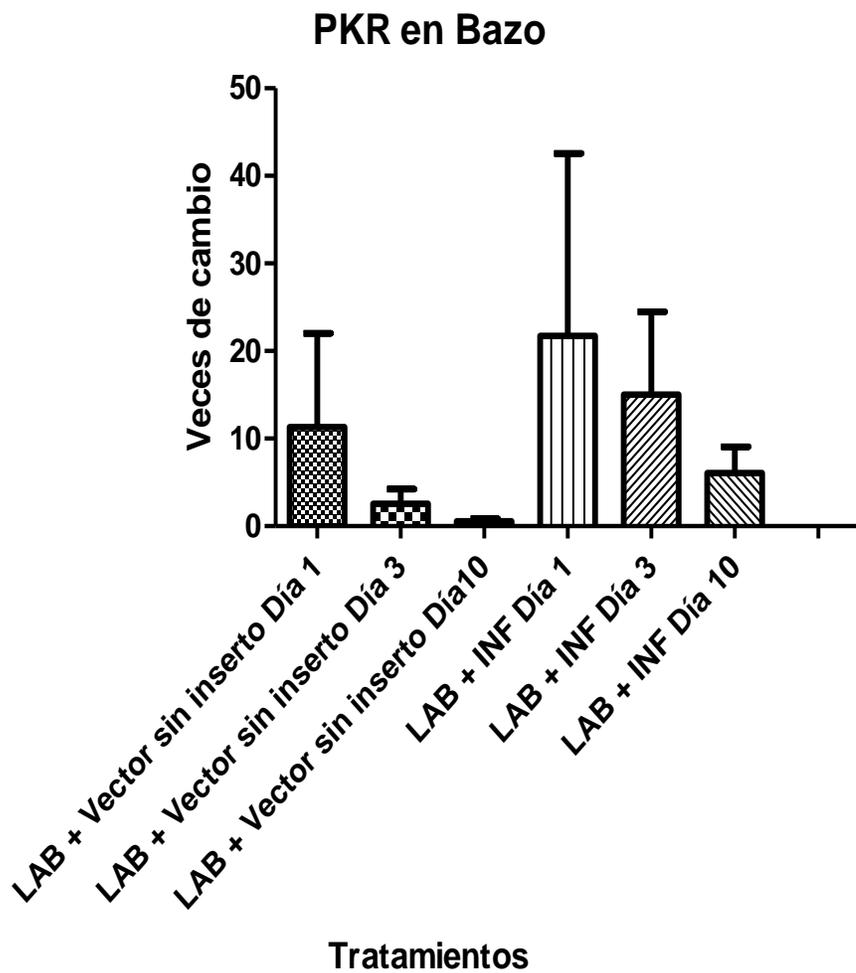


Figura 26. Estimulación de PKR en Bazo. La figura muestra la expresión de PKR en Bazo relativa a los peces tratados con alimento normal. Se evaluó la expresión a 1, 3, y 10 días terminado el tratamiento.

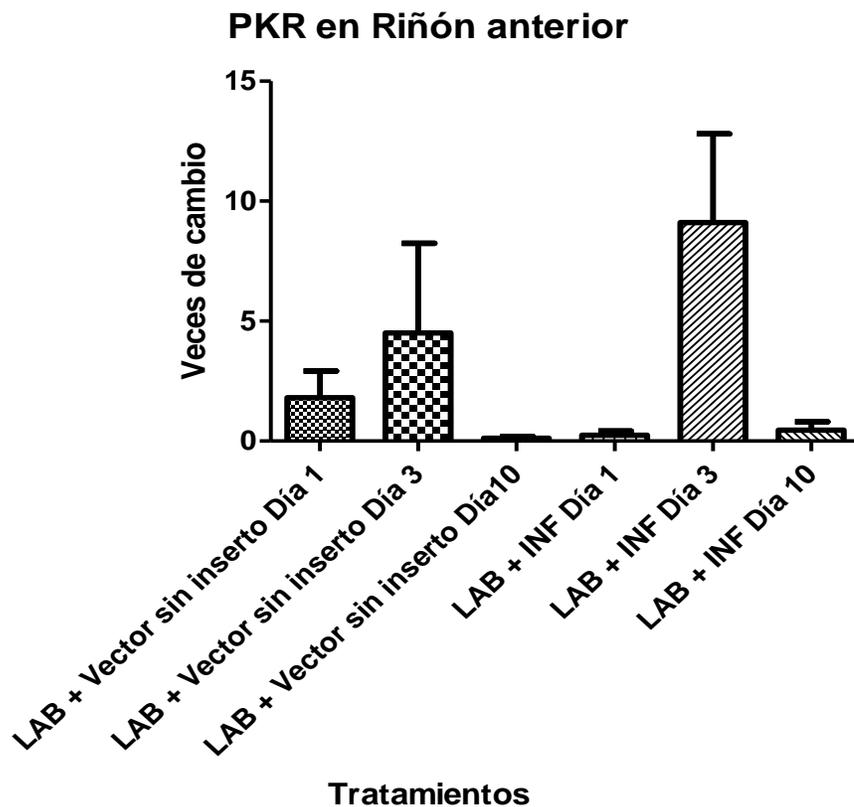


Figura 27. Estimulación de PKR en Riñón. La figura muestra la expresión de PKR en Riñón relativa a los peces tratados con alimento normal. Se evaluó la expresión a 1, 3, y 10 días terminado el tratamiento.

Después de evaluar el efecto biológico de la administración de la cepa de *Lactococcus lactis* productora de IFN, se evaluó la capacidad de la bacteria de resistir la barrera gastrointestinal y establecer su residencia en el tracto gastrointestinal (TGI) (**Metodología 3.5.24**). Los resultados de análisis de las heces de salmónidos microscopía confocal (**Figura 28**) indican que la bacteria permanece por un período de 4 días en el TGI. Este resultado es coherente la fluorescencia de las muestras de heces (**Figura 29**), donde se detectó fluorescencia hasta el día 4 post tratamiento.

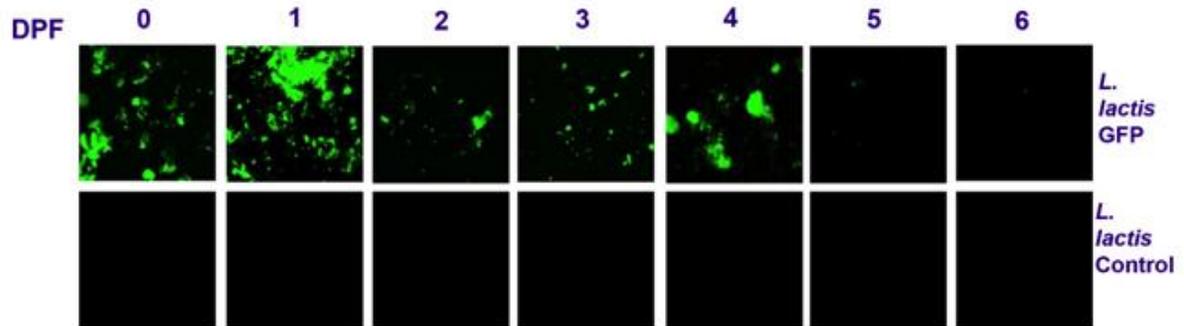


Figura 28. Observación de *Lactococcus lactis* en heces fecales. La figura muestra la observación mediante microscopía confocal de *Lactococcus lactis* que contiene el plasmidio pMV158GFP, presente en las heces. El día 0 corresponde a la muestra del último día de alimentación. Luego desde el día 1 al 6, se administró alimento normal. DPF: Días post-alimentación (Tasa de alimentación al 1%). La fila superior corresponde a *L. lactis* pMV158GFP. La fila inferior a *L. lactis* control.

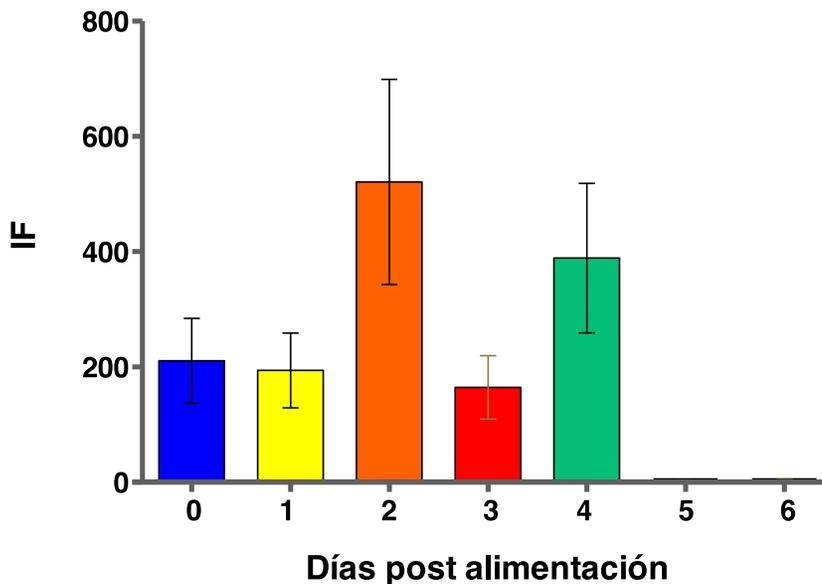


Figura 29. Cuantificación de fluorescencia en heces fecales. La figura muestra la cuantificación de la fluorescencia a 540 nm presente en las heces de peces alimentados con *Lactococcus lactis* pMV158GFP y medidas hasta 6 días posterior al término del proceso de alimentación de los peces. La intensidad de fluorescencia (IF) se expresa en unidades arbitrarias.

6. **Fichas técnicas y análisis económico del cultivo, rubro, especie animal o tecnología que se desarrolló en el proyecto, junto con un análisis de las perspectivas del rubro después de finalizado el proyecto.**

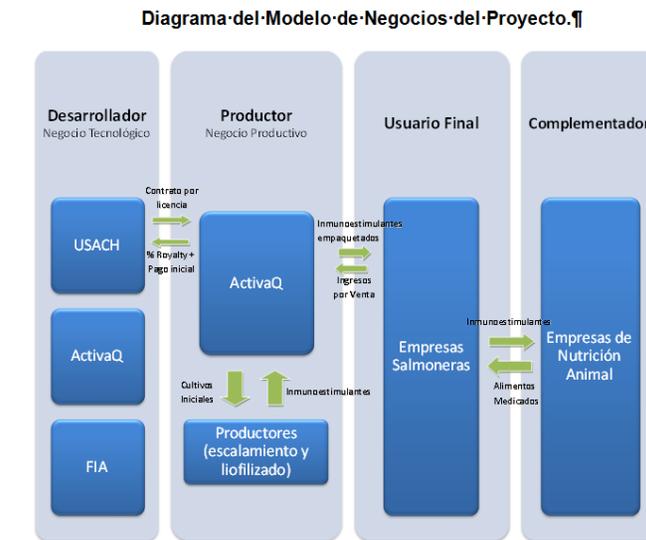
Actualización de Fichas Técnicas elaboradas

Se seguirá el mismo modelo de negocio establecido en el proyecto original.

Una vez desarrolladas las etapas de investigación, ensayos y pruebas en laboratorio, se realizará el empaquetamiento y transferencia tecnológica a la empresa ActivaQ.

Para esto ya se realizó una solicitud de patentamiento por parte de la USACH respecto al producto obtenido en este proyecto. ActivaQ será la desarrolladora de los cultivos iniciales, que serán entregados a las empresas maquiladoras para su producción en escala y posterior liofilización.

El producto seco empaquetado con marca ActivaQ será entregado a la empresa comercializadora para su venta a empresas salmoneras. La empresa asociada ActivaQ será la encargada de la comercialización del producto a las empresas productoras de salmónes, localizadas principalmente entre la X y XII Región. Las empresas salmoneras entregarán este producto a las empresas de alimentos como Ewos, Nutreco, i-mar, etc. para que sea añadido al alimento. No se descarta que este producto pueda ser exportado y administrado en salmónes de otros países productores como son Noruega, Escocia, Dinamarca, EE.UU o Canadá, o en su defecto licenciado a una empresa productora de inmunoestimulantes en el extranjero. En el siguiente diagrama se propone el modelo de negocios del proyecto. **Estrategia de productos:** Se considera el desarrollo de un producto seco, liofilizado, comercializado en paquetes de 5, 10, y 50 kilos que serán comercializados en el mercado chileno de manera directa con la marca ActivaQ. En el extranjero la comercialización se hará a través del licenciamiento del paquete tecnológico o de la exportación del producto seco, lo que se evaluará en una segunda etapa. **Estrategia de precios:** La estrategia propuesta es la igualar el precio promedio de los inmunoestimulantes más específicos presentes en el mercado y ganar cuota de mercado a través de demostrar la efectividad de los inmunoestimulantes propuestos. El precio por tratamiento propuesto es de US\$0,18 el tratamiento de 7 dosis que se compara con el precio promedio de la dosis de vacuna tradicional. El costo estimado de producción de un tratamiento basado en el prototipo generado es de 0,21 pesos (0,0003 USD). Estos valores dejan un amplio margen de ganancias que pueden ser usado para posicionarse en el mercado y disminuir los costos de tratamiento actualmente usados.



Estrategia de posicionamiento y difusión: Para la introducción del producto se hará durante el proyecto pruebas que permitan validar el producto, lo cual servirá para difundir el producto en el resto del mercado. Además, se complementará con el posicionamiento que se hará a través de la participación en seminarios especializados de la industria salmonera como AquaNor, y otros; la publicación de artículos en revistas especializadas como Aqua, y la aparición en prensa a través de gestión con medios de la empresa ActivaQ y la solicitud de reuniones de presentación y venta con las empresas salmeras que actualmente son parte del portafolio de clientes de ActivaQ: Pacific Star, Landcatch, y cultivos marinos Chiloé, por nombrar algunos. También se hará un trabajo de difusión orientada a las empresas de alimentos que actualmente son parte de la red de ActivaQ para que éstas recomienden a sus clientes, la adición de los inmunoestimulantes en sus alimentos. **Estrategia de distribución:** La distribución de estos productos la realizará de manera directa la empresa asociada ActivaQ para lo cual utilizará dos modos de comercialización: 1) Venta de producto de manera directa; 2) Venta del producto como parte de un programa de manejo integral sanitario que incluye además consultoría y otros servicios anexos que ofrece ActivaQ a sus actuales clientes productoras de salmón.

FICHA TECNICA

LL-PRO

Soluciones Innovadoras para la Industria Acuícola



PRESENTACIÓN

Investigadores del Laboratorio de Meta-genómica Bacteriana perteneciente a La Universidad de Santiago han desarrollado **LL-PRO** es un suplemento alimenticio de naturaleza probiótica, con el fin de aportar con una solución para la Industria Salmonera Nacional, este complemento busca fortalecer a los peces ya sea Salmones o Truchas las especies de mayor demanda a nivel mundial, ante la infección de diferentes patógenos infecciosos, principalmente virales que afectan los peces en centros de cultivos.

¿QUÉ SON LOS PROBIÓTICOS?

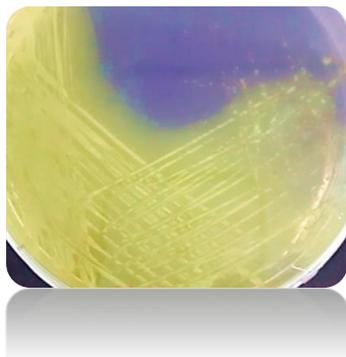
Etimológicamente el término probiótico deriva del griego “pro” que significa “a favor” y “biótico” que significa “vida”. **LL-PRO** se une a una larga historia de probióticos dirigidos a diferentes organismos, ya sea como en este caso enfocado a la prevención de enfermedades de peces, hasta el tratamiento y prevención de afecciones humanas.

A principios de 1900, el ruso Metchnikoff, premio Nobel y profesor del Instituto Pasteur postula que las bacterias ácido lácticas (LAB, por sus siglas en inglés) ofrecían beneficios para la salud de sus consumidores. Este científico afirmó que “la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles”.

Posteriormente, Henry Tissier, observó que los niños con diarrea tenían en su intestino un escaso número de bacterias “bifidas”. Tissier sugirió que la administración de estas bacterias en pacientes con diarrea podía facilitar el restablecimiento de una flora intestinal sana. No fue hasta 1965 cuando se divulgó el término “probiótico” acuñado por Lilly y Stilwell, que lo definieron como “aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros microorganismos”.

La investigación sobre probióticos se ha desarrollado notablemente, llegándose a caracterizar cultivos concretos que justifican las propiedades saludables atribuidas a su consumo. La Organización Mundial de la Salud propone una definición más sencilla: “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada confieren un efecto beneficioso sobre la salud del huésped”. Muchas de estas bacterias probióticas han sido catalogadas por la FDA (Food and Drug Administration) como Generalmente Reconocidas como seguras (GRAS, por sus siglas en inglés).

CARACTERÍSTICAS



LL-PRO es consta de una Bacteria Ácido Láctica también clasificada como GRAS que capaz de sintetizar moléculas estimulantes del sistema Inmune de los peces confiriendo a estos un grado mayor de resistencia a diferentes patógenos infecciosos, principalmente a virus, causantes de una gran cantidad de muertes sobretodo en la etapa. Esta bacteria es capaz de alojar en el intestino de los peces durante alrededor de 5 días, pero sus efectos se ven prolongados 10 días posteriores a la alimentación con esta.

VENTAJAS

Las principales ventajas de utilizar **LL-PRO** son:

- La fácil administración en comparación con otros métodos de vacunación, ya que solo necesitas ser adicionada al alimento que se les esté administrando a los peces.
- Estimula el sistema Inmune en los peces, fortaleciéndolo la respuesta ante el ataque de Infecciones principalmente virales.
- Esta Bacteria al ser GRAS proporciona seguridad biológica, es decir, no es causante de enfermedades ni lesiones para las personas que lo manipulan ni para los peces, no origina infecciones.

DOSIS A ADMINISTRAR

La dosis de administración de **LL-PRO** es 10^7 UFC/pez diarios, las cuales son adicionadas alimento independiente la cantidad de este. Las bacterias son tratadas con un recubrimiento oleoso y se realiza una emulsión, esta se agrega al alimento mediante la mezcla mecánica de estos.

CONSERVACIÓN

El cultivo de **LL-PRO** es almacenado en un frasco estéril, sin aeración a 4°C, y su duración es de una semana (7 días).

7. Problemas enfrentados durante la ejecución proyecto (legal, técnico, administrativo, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

Descripción de problemas	Consecuencia para el cumplimiento de objetivos	Ajustes realizados para abordar problemas
El primer problema enfrentado en el desarrollo del proyecto guardo relación con la tardanza de la llegada de los fondos, 4 meses después de haber iniciado el proyecto. Esto implicó que la Bioquímico Javiera Norambuena renunciara al proyecto. Implicó además no poder adquirir todos los insumos presupuestados en el periodo establecido.	A pesar de esta dificultad, el proyecto avanzó de acuerdo a lo planificado pero se redujo el tiempo de reacción para futuros imprevistos.	Se contrató al Bioquímico Carlos Muñoz en reemplazo de Javiera Norambuena. Se han comprado los reactivos e insumos a deuda del proyecto.
Según lo establecido en las reuniones de negociación las actividades de difusión debían ser realizadas en conjunto entre los tres proyectos FIA adjudicados a la USACH y ActivaQ. Hasta el momento el presente proyecto es el único al cual se han transferido los fondos.	Se produjo el retraso en la realización de la ceremonia de lanzamiento.	Se esperó a la espera de que llegara de los fondos de los otros proyectos para iniciar esta actividad.
La amplificación por PCR a partir de DNA de la Cepa <i>L. lactis</i> KF147 del casete que permite el crecimiento de <i>L. lactis</i> en sacarosa resultó infructuosa.	Se retrasó el término de esta actividad, relacionada con las construcción del plasmidio.	Se envió a sintetizar a la compañía Genescript el casete que permite el crecimiento de <i>L. lactis</i> en Sacarosa.
No se pudo detectar la presencia de interferón recombinante mediante SDS-PAGE teñido con azul de coomassie o plata.	Retraso en el término de la actividad relacionada con la validación de <i>L. lactis</i> como sistema productor y de liberación de Interferón.	Se implementaron técnicas de western blot para la detección y cuantificación.
Falta de coordinación con los otros proyectos FIA adjudicados a la USACH.	No se ha podido cumplir con la realización del lanzamiento.	Se ha logrado establecer una fecha para el lanzamiento en agosto de 2013. En este eventos participaran autoridades de FIA, USACH y Sernapesca.
No fue posible detectar INF-I. El análisis minucioso de del problema y de las	Debido a la necesidad de generar nuevas construcciones se retrasó el	Esto obligo a adquirir nuevamente Nisina, colocar el gen de INF-I

secuencias indicó que tres posibles causas: a) Falta de traducción debido a un deficiente inicio de traducción, b) Sistema de detección poco sensible, c) Inductor (Nis) degradado.	clonamiento del casete de sacarosa en el vector pNZ8148. Actualmente se están generando las construcciones en <i>E. coli</i> para ser transformadas en <i>L. lactis</i> .	directamente bajo el promotor Nis y adquirir un sistema de detección más sensible (Western blot quimiluminicente). Estas tres medidas lograron producir y secretar INF-I a concentraciones de 100 ng por 10 ⁷ UFC.
La detección y cuantificación de la expresión del gen INF-I de <i>Salmo salar</i> ha cursado sin problema, sin embargo al detección de la expresión de Mx y PKR ha tenido problemas técnicos. Los primeros utilizados resultan en una amplificación inespecífica.	Este inconveniente ha impedido probar la funcionalidad del INF-I recombinante con los genes comprometidos en el proyecto en el plazo estipulado.	Se han enviado a sintetizar nuevos partidores.
Se presentaron mutaciones en el gen de interferón.	A 100 ng de interferón el Interferón proveniente del plasmidio pNZ8149 presenta 4 veces menos actividad.	Se re-clonará el gen de interferón. Usando corte con enzima de restricción en vez de PCR.
Solo se redujo a un 10% la cantidad de IPNV en infecciones de células CHSE214.	No se logró la meta propuesta, probablemente debido que la replicación viral solo se evaluó hasta 48 horas después de iniciar la infección.	Se incrementará el tiempo de observación hasta 10 días.
En riñón no se observa un efecto. Se iniciaron los ensayos de desafío con IPNV.	La ausencia de estimulación en riñón puede ser normal, o producto del uso de una ventana de tiempo muy corta para el análisis.	Se repetirá el experimento evaluando la expresión de Mx y PKR y Bazo y Riño, al 6, 9, 12 y 15 días post iniciado el tratamiento.
Los controles sin tratamiento no mueren a causa del virus, aun cuando han transcurrido dos meses y se incrementara 100 veces la dosis de virus IPN.	No se puede evaluar si el producto confiere protección contra el virus IPN, pues los peces controles no mueren a consecuencia de la inyección del virus.	Se están consiguiendo peces más pequeños y susceptibles al virus, además se está animalizando el virus en el laboratorio de la Dra. Ana María.
La falta de la construcción que expresa Interferón en pNZ8149, impide seguir adelante. Además los retrasos en el pago a	No se ha podido iniciar el escalamiento a nivel piloto (1500 l). No se ha podido evaluar la	Se está reclonando el Interferón en pNZ8149. Se está gestionando el pago a Biopolis.

<p>Biopolis por parte de la USACH, dificulta el envío desde Biopolis de los cultivos liofilizados.</p>	<p>sobrevida del <i>L. lactis</i> en el liofilizado después de un prolongado periodo de almacenamiento.</p>	
<p>El uso del indicador Resistencia tal como fue definido originalmente dificulta la comprensión de la actividad inhibitoria de la replicación viral que posee IFN, imposibilitando el cálculo directo del porcentaje de avance.</p>	<p>No se pudo calcular adecuadamente el porcentaje de avance del proyecto, informando que solamente se alcanzó un 33 % de avance.</p>	<p>Se modificó el indicador de Resistencia a la Infección viral por uno que refleje el porcentaje de inhibición de la replicación viral, el cual contempla el indicador previamente propuesto.</p> $I^{IPNV} = 100 - R_{IPNV} \times 100$ <p>Bajo esta fórmula el indicador previamente propuesto de R_{IPNV} de 0,001 corresponde a un 99,9 % de inhibición de replicación viral. Bajo este nuevo indicador se alcanzó un 99,79% de la meta propuesta.</p>
<p>Durante el verano, entre enero y mayo de 2015 se realizaron trabajos de modificación de la infraestructura de laboratorio de peces. Estos trabajos produjeron una serie de inconvenientes que redundaron en un alto estrés en los peces, lo cual pudo ser la causa del fallecimiento de los controles, por lo tanto no se pudieron realizar las pruebas.</p>	<p>No se ha podido evaluar si LL-PRO funciona <i>in vivo</i> para reducir la mortalidad ocasionada por el virus IPNV retrasando el cumplimiento del RE3. Sin embargo, se logró determinar que la administración de LL-PRO reduce la carga viral de los peces, resultado bastante promisorio, pues aunque no se ha logrado probar que reduzca la mortalidad, nuestros resultados si indican que los peces reducen su carga viral. Esto indicaría que los peces debiesen disminuir su susceptibilidad al stress, impidiendo que infecciones virales latentes comiencen su ciclo de replicación ocasionando la mortalidad.</p>	<p>Se está repitiendo el experimento de curva de supervivencia, pero también se evaluará el efecto de disminución de carga viral a distintos días post infección.</p>

<p>Los protocolos de crecimiento de las bacterias están siendo transmitidos a ActivaQ. Se está a la espera del licenciamiento para la producción. Problemas de la burocracia interna de la Universidad han impedido terminar este proceso.</p>	<p>Retraso en el término de etapa.</p>	<p>Se ha iniciado un estudio de factibilidad de protección de la propiedad intelectual sobre la cepa de <i>Lactococcus lactis</i> productora de Interferón.</p>
<p>No se logró iniciar la última actividad de difusión pues estábamos a la espera de los resultados de la capacidad de LL-PRO para reducir la mortalidad a causa de la infección por IPNV, y el estudio de protección de propiedad intelectual.</p>	<p>Retraso en el término de este resultado específico.</p>	<p>Para cumplir con los tiempos del proyecto, una vez obtenido los resultados de sobrevida se planea realizar una actividad de difusión a través de periódicos. La Universidad de Santiago tiene convenio con el periódico "Las últimas noticias" y "La segunda" para sacar insertos que ayuden a la difusión de los resultados obtenidos por académicos de la Universidad. Alternativamente, se puede realizar una actividad de difusión con salmonicultores pero una vez terminados los ensayos de desafío y los estudios de protección de propiedad intelectual.</p>
<p>Liofilizados no estimulan la actividad antiviral in vitro.</p>	<p>No se puede estimar la capacidad de inmunoestimular.</p>	<p>Se realizó el ensayo in vivo suponiendo que es necesario reactivar el metabolismo de <i>Lactococcus lactis</i> después de la liofilización.</p>

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

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Perfil de los participantes	Medio de Invitación
Marzo-2013	USACH	Lanzamiento	50	Investigadores y Empresarios asociados al área de desarrollo del proyecto	Redes sociales, invitación directa, medios de la USACH (radio Usach), medios especializados (Mundo acuícola) (Anexo II)
Julio-2013	Chile	Difusión Revista Mundo Acuícola	>1000	Científicos y empresarios biotecnólogos	Libro Editorial (Anexo III)
Diciembre-2013	Chile	Difusión en Congreso nacional	300	Científicos y empresarios biotecnólogos	Libro resumen (Anexo IV)
Diciembre-2014	La Serena Chile	Difusión en Congreso nacional	300	Científicos y empresarios biotecnólogos	Libro resumen (Anexo V)
Noviembre-2014	Colombia	Difusión en Congreso internacional	>1000	Microbiólogos y biotecnólogos	Libro resumen (Anexo VI)
Septiembre-2015	Puerto Montt	Difusión con salmonicultores	10	Invitaciones, Afiches, Material de respaldo	Correo electrónico y afiches (Anexo VII)
Diciembre-2015	Chillán	Depósito de Bacterias en cepario Internacional			Certificado de Depósito (Anexo VIII)
Diciembre-2015	Santiago	Solicitud de Patente			Formulario de Inscripción (Anexo IX)

9. Productores participantes

Antecedentes globales de participación de productores

REGIÓN	TIPO PRODUCTOR	GÉNERO FEMENINO	GÉNERO MASCULINO	ETNIA (INDICAR SI CORRESPONDE)	TOTALES
RM	PRODUCTORES PEQUEÑOS		1		1
	PRODUCTORES MEDIANOS-GRANDES				
	PRODUCTORES PEQUEÑOS				
	PRODUCTORES MEDIANOS-GRANDES				

Antecedentes específicos de participación de productores

NOMBRE	UBICACIÓN PREDIO			Superficie Hàs	Fecha ingreso al proyecto
	Región	Comuna	Dirección Postal		
ActivaQ	RM			NA	Agosto 2012

10. Conclusiones

El presente proyecto planteó como objetivo desarrollar una plataforma para la producción *in situ* de proteínas inmunoestimulantes en Salmónidos. A pesar de los retrasos observados en el cumplimiento de muchas etapas, las mayor parte de las actividades fue desarrollada, logrando las metas propuestas. En términos generales el proyecto ejecutado logró desarrollar su objetivo final que es producir una cepa de *Lactococcus lactis*, carente de resistencia a antibióticos que pueda actuar como antiviral, reduciendo la carga viral en peces infectados. De los resultados obtenidos en el proyecto es posible concluir que:

- 1.- *Lactococcus lactis* puede actuar como una plataforma eficiente para la producción de citoquinas o péptidos inmunoestimulantes en Salmónidos.
- 2.- El interferón I recombinante, producido en *Lactococcus lactis* es funcional, logrando estimular la respuesta inmune antiviral *in vitro*, reduciendo la carga viral
- 3.- La administración de Interferón vía liberación *in situ* al interior del tracto gastrointestinal de los peces, permite estimular la respuesta inmune antiviral sistémica.
- 4.- *Lactococcus lactis* productor de interferón puede ser producido a escala industrial a precios competitivos.
- 5.- La administración de *Lactococcus lactis* a Salmónidos es segura.
- 6.- El máximo efecto inmunoestimulante se logra dentro de la primera semana post administración.
- 7.- El uso de *Lactococcus lactis* como sistema de producción de otras citoquinas o interleukinas se abre como una promisorio herramienta para modular la respuesta inmune en Salmónidos.

11. Recomendaciones

Basado en el desarrollo del proyecto se recomienda optimizar las condiciones de almacenamiento y administración de liofilizados de tal manera de incrementar su sobrevivencia al proceso de almacenamiento

12. Otros aspectos de interés



Directora Laura Almendares Calderón

Ingeniero Agrónomo, Magíster en Ciencias Agropecuarias Dra Ciencias Políticas. Investigadora del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad Tecnológica de la Universidad de Santiago de Chile. Su línea de investigación se centra en la innovación en el área de alimentos.



RECUBRIMIENTO COMESTIBLE DE LA TUNA

Desarrollo de una tecnología para reemplazar la piel del fruto de la tuna (Opuntia ficus-indica) por un recubrimiento que permita mantener las funciones fisiológicas, microbiológicas y organolépticas del fruto fresco.
(Proyecto PYT-2012-0033)

La tuna posee una pulpa apetitosa y es equilibradamente dulce y jugosa. Sin embargo, la piel espinesa de este fruto y la necesidad ineludible de pelarlas antes de comerlas desincentiva significativamente su consumo. Hasta ahora, no se han desarrollado tecnologías que agreguen valor a este fruto, lo que es una desventaja respecto a otras especies en que hay significativos avances.

Este proyecto ofrece el desarrollo de una tecnología para reemplazar la piel original de la tuna por un recubrimiento comestible, con un envase potenciador, que permita mantener la vida y las características del fruto fresco y así validarla como una alternativa productiva y comercial.

Como resultado, se incorporará en el mercado una nueva tecnología en la producción de tunas, aumentando la demanda por frutos recubiertos. Por parte de los exportadores y productores se esperan mejores expectativas de rentabilidad para establecer nuevas plantaciones de tunas y mejores perspectivas de suelos con limitaciones. Los consumidores tendrán acceso a un fruto atractivo y novedoso, listo para consumir, donde no existe riesgo de pinchazo.

PROGRAMACIÓN

14:30

Palabras de bienvenida

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

14:45

Presentación Proyecto FIA PYT-2012-0033

Laura Almendares Calderón

15:05

Introducción Proyectos Área Acuícola

Ruben Avedaño-Herrera, experto en Patología de Organismos Acuáticos y Biotecnología Acuicola

15:25

Presentación Proyecto FIA PYT-2012-0022

Marcelo Cortés San Martín

15:45

Presentación Proyecto FIA PYT-2012-0023

Margarita Montoya Kunsting

16:05

Presentación Proyecto FIA PYT-2012-0056

Mario Tello Reyes

16:25

Cierre ceremonia
Cóctel

PROYECTOS

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

CONVOCATORIA 2011-2012

Ceremonia de Lanzamiento 28 de Agosto, 2013



Vicerrectoría de Investigación Desarrollo e Innovación
Universidad de Santiago de Chile

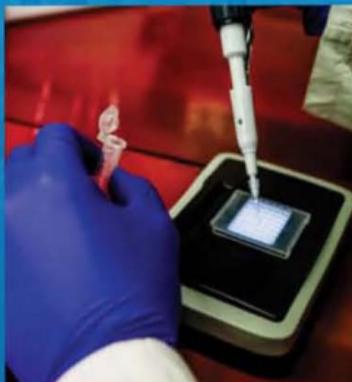


FIA
Fundación para la
Innovación Agraria
Subvenciones de Chile



Director Marcelo Cortez San Martín

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



NEUEVA VACUNA CONTRA VIRUS ISA

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

Actualmente, las vacunas para salmonidos, por ejemplo contra el virus ISA, agente causante de la anemia infecciosa del salmón, producen una baja protección contra enfermedades virales, incluso presentan efectos secundarios y adversos que dan cuenta de una respuesta inmune exacerbada debida a un proceso inflamatorio que estaria siendo perjudicial para los animales vacunados.

En este proyecto se aborda una problemática crucial para poder controlar las infecciones por el virus ISA y, además, establecer una plataforma para el desarrollo de vacunas eficaces contra diversas enfermedades de salmónidos. La propuesta es desarrollar una nueva generación de vacunas que potencien la respuesta inmune tanto innata como adquirida de los salmones para aumentar su eficacia y protección.

Como resultado, se espera desarrollar un sistema de expresión de proteínas virales en líneas celulares (in vitro) para así obtener una vacuna piloto, segura, inmunogénica y de baja toxicidad en ejemplares juveniles de salmón del atlántico. La vacuna eficaz en términos de mortalidad, activará la respuesta inmune y protegerá contra el virus ISA. Finalmente, esta plataforma será transferida al sector productivo para su registro, y escalamiento productivo y comercial.

CONTROL DEL ESTRÉS EN SALMONES

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

Durante el proceso de esmoltificación (cambio de agua dulce a salada) los peces sufren una serie de cambios fisiológicos, morfológicos, bioquímicos y de comportamiento. En esta etapa, se producen altos niveles de estrés que afectan significativamente al sistema inmune de los salmones, produciendo una importante inmunosupresión, la cual podría ser uno de los responsable de la baja efectividad de las vacunas y la aparición de patógenos cada vez más agresivos y abundantes en la salmonicultura.

Intervenir en el control del estrés durante el periodo de esmoltificación, podría generar mejoras sustantivas en la sobrevivida de estos peces. Gracias a este proyecto se podrá aplicar una terapia de bajo costo utilizando extractos de plantas con capacidad antioxidante y reguladora del sistema nervioso, permitiendo controlar el estrés de los salmones y permitiéndoles una óptima entrada al mar.

Como resultado, se podrán obtener las herramientas terapéuticas para poder intervenir y mejorar las condiciones generales de los salmones durante la esmoltificación, mejorar las condiciones sanitarias y la eficiencia de los cultivos. Esperamos reducir significativamente la mortalidad y también el nivel de estrés. Por otra parte, permitirá la entrada de la industria de plantas medicinales a la acuicultura.



Directora Margarita Montoya Kunsting

Ingeniero Agrónomo, Magister en Ciencias Agropecuarias Dra Ciencias Políticas, Investigadora del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad Tecnológica de la Universidad de Santiago de Chile. Su línea de investigación se centra en la innovación en el área de alimentos.



PROTEÍNA INMUNOESTIMULANTE

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

Las bacterias ácido lácticas (LAB) se han identificado en diversas especies comerciales de peces, crustáceos y mariscos. Actualmente su principal aplicación en acuicultura es como probióticos, mediante la identificación de microorganismos que después de ser cultivados in vitro son re-administrados a través de la dieta, sin embargo, el uso de LAB como vehículos de liberación de proteínas biológicamente activas ha sido menos explorado.

Gracias al apoyo de este proyecto, mediante técnicas de biología molecular en el Centro de Biotecnología Acuicola de la Universidad de Santiago de Chile, los investigadores han logrado incorporar genes para la liberación de proteínas con propiedades inmunoestimulantes sobre los salmones, logrando optimizar la respuesta inmune contra diversos virus.

De esta manera, las bacterias ácido lácticas podrían funcionar como un nuevo vehículo de inmunostimulación en acuicultura, inocuo para el ser humano y medio ambiente, de bajo costo de producción, de administración oral y aplicable contra patógenos bacterianos y virales. Como resultado se espera realizar la producción y comercialización de la tecnología.



Director Mario Tello Reyes

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





Sociedad de Microbiología de Chile

XXXV

Congreso Chileno de Microbiología

26-30 de noviembre 2013

Maitencillo - Chile / Hotel Marbella Resort

Libro de Resúmenes:

Conferencias plenarias - Simposios- Mesa redonda
Trabajos de incorporación - Comunicaciones libres Orales y Paneles



Expresión heteróloga de péptidos inmunoestimulantes de *Salmo salar* en una bacteria ácido láctica.

Heterologous expression of immunostimulating peptides from *Salmo salar* in a lactic acid bacteria.

Muñoz, C¹., Arriaza, F²., Espinoza, C²., Sandino, AM²., Tello, M².

¹Biología, Facultad de Química y Biología, Universidad De Santiago De Chile.

²Biología, Química y Biología, Universidad De Santiago De Chile.

Introducción: Las proteínas inmunoestimulantes ejercen un potente efecto modulando sobre la respuesta inmune. La administración de éstas en forma recombinante ha permitido su uso terapéutico para combatir infecciones virales o incrementar la respuesta inmune contra bacterias patógenas. En acuicultura no se dispone de sistemas de producción heteróloga de proteínas inmunoestimulantes funcionales que permitan su uso terapéutico. Las bacterias ácido lácticas, son organismos GRAS ("Generally Regarded as Safe"), que en virtud de esta clasificación han sido utilizadas como sistemas de vacunación y liberación de moléculas terapéuticas. **Hipótesis:** Una bacteria ácido láctica puede ser usada para expresar y secretar proteínas inmunoestimulantes funcionales en *Salmo salar*. **Metodología:** Mediante biología sintética se diseñó y sintetizó un gen codificante para una proteína inmunoestimulante de *Salmo salar* optimizada codogénicamente, con un péptido de secreción y una cola de 6xHis. El gen fue clonado en un vector de expresión. La producción de la proteína heteróloga se determinó a través de Western blot y su funcionalidad fue determinada mediante bioensayos. **Resultados:** La bacteria ácido láctica logró producir y secretar la proteína heteróloga. La proteína se ubicó principalmente en la fracción citoplasmática. Los bioensayos mostraron que esta proteína es funcional al estimular la expresión de genes inmunológicos. **Conclusión:** La bacteria ácido láctica es un eficiente sistema de producción heteróloga de proteínas inmunoestimulantes funcionales de *S. salar*.

Financiado por Proyecto FIA PYT 2012-0056.



USO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PARA LA LIBERACIÓN *IN SITU* DE CITOQUINAS ANTIVIRALES EN SALMÓNIDOS



LACTIC ACID BACTERIA AS VEHICLE TO *IN SITU* DELIVERY OF ANTIVIRAL CITOKINES IN SALMONIDS

González, Josué^{1,2,3}, Muñoz, Carlos^{1,2,3}, Arriaza, Francisco^{1,2,3}, Leyton, Rodrigo^{1,2,3}, Espinoza, Carolina^{1,2,3}, Sandino, Ana María^{2,3}, Tello, Mario^{1,2,3}.

¹Laboratorio de Metagenómica Bacteriana, Centro de Biotecnología Acuicola, Departamento de Biología, Química y Biología, Universidad De Santiago De Chile. ²Laboratorio de Virología, Centro de Biotecnología Acuicola, Departamento de Biología, Química y Biología, Universidad De Santiago De Chile. ³Biología, Ictio Biotechnologies, General del Canto N° 460, Providencia, Santiago, Chile.

RESUMEN

Introducción: En mamíferos y peces las citoquinas antivirales tienen un potente efecto sobre la replicación viral. En Humanos la administración citoquinas antivirales se utiliza terapéuticamente contra diversos virus. En acuicultura, la aplicación a gran escala de citoquinas antivirales se ve impedida por el alto costo de purificación, por lo tanto es necesario desarrollar sistemas alternativos de liberación. Las bacterias ácido lácticas (LAB) son bacterias Gram-positiva, **GRAS** (*generally regarded as safe*), habitualmente presentes en el tracto gastrointestinal de los salmonídeos. En mamíferos, estas bacterias se han utilizado para la liberación *in situ* de citoquinas y péptidos inmunizantes. En este trabajo planteamos como **Hipótesis** En Salmónidos, las bacterias ácido lácticas pueden actuar como vehículo de liberación *in situ* de citoquinas antivirales, produciendo la estimulación de la respuesta inmune innata. **Metodología.** Mediante técnicas de DNA recombinante se generó una cepa de LAB productora de citoquina antiviral. Las propiedades inmunoestimulantes de esta cepa fueron estudiadas *in vivo*, administrando una dosis oral a Trucha arcoiris. La inmunoestimulación se evaluó cuantificando por QRT-PCR los mRNA de genes Mx y PKR en Bazo y Riñón. Como control de expresión se utilizó rRNA 18s y para evaluar toxicidad se registró la mortalidad y las características morfológicas de los órganos. **Resultados.** La administración de la LAB productora de citoquinas antivirales no tuvo efectos sobre la sobrevivencia de los peces, registrándose una mortalidad de 0%. En Bazo, la expresión de Mx y PKR aumentó 3,5 y 4 veces, respectivamente. En riñón, los niveles de expresión de estos genes no mostraron cambios. El análisis de la expresión de PKR mostró resultados similares. Los órganos inmunológicos no mostraron cambios en su morfología luego del tratamiento. **Conclusiones:** La administración oral de una LAB productora de citoquinas antivirales se presenta como una alternativa terapéutica no invasiva y de bajo coste en la industria salmonera para el tratamiento profiláctico de infecciones virales.

INTRODUCCIÓN

El control de enfermedades constituye un gran problema en la industria acuícola, con costos asociados a los US\$100 millones (Datos SERNAPESCA, 2013). En acuicultura, los cultivos intensivos presentan una alta tasa de transferencia de agentes infecciosos, lo cual se traduce en una alta cantidad de uso de vacunas. Diversas estrategias han sido investigadas para modular la composición de la microbiota intestinal en especies de cultivo, con el objetivo de lograr un mejor crecimiento, o bien para incrementar la respuesta inmune y resistencia a enfermedades. Las bacterias ácido lácticas (LAB) son microorganismos utilizados en la industria alimenticia. Su estado de organismo **GRAS**, las convierte en un atractivo sistema para la expresión de proteínas y generación de vacunas (García-Fruitós E., 2012; Bermúdez-Humarán L., 2009). La modulación del sistema inmune es uno de los beneficios más requeridos de los probióticos, por lo que en el último tiempo los estudios han sido enfocados en los efectos inmunomoduladores de los probióticos (McBeath A.J.A, *et al* 2012). Este trabajo presenta a las bacterias ácido lácticas como un modelo de protección inmunogénico no invasivo y aplicable a gran escala en la salmonicultura, capaz de incrementar los sistemas de inmunización actuales.

Agradecimientos y Financiamiento: Proyecto FA Código: PYT2012-0056; Proyecto CORFO INNOVA 13 CTI-21527

MATERIALES Y MÉTODOS

Una bacteria ácido láctica generada por clonamiento fue utilizada para estudiar sus propiedades inmunoestimulantes. Durante 5 días, se administró oralmente la construcción a trucha arcoiris y a salmón del atlántico. Posteriormente, la totalidad de individuos fue sacrificada y a cada ejemplar se le extrajo bazo y riñón. Se obtuvo cDNA de cada muestra a partir de RNA, y éste fue analizado mediante qPCR.

RESULTADOS

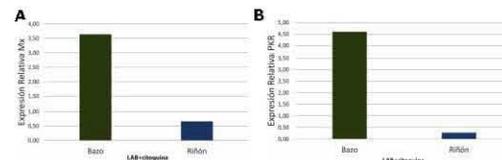


Figura 1: Expresión relativa obtenida mediante PCR en tiempo real. Estimulación en bazo de (A) Mx y (B) PKR con distintos suplementos orales en *Oncorhynchus mykiss*.

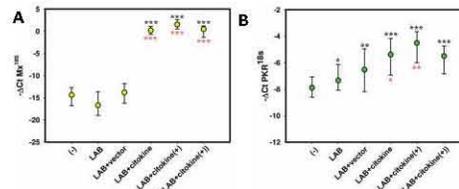


Figura 2: -ΔCt obtenidos mediante PCR en tiempo real. Estimulación en bazo de (A) Mx y (B) PKR con distintos suplementos orales en *Salmo salar*.



Figura 3: Extracción de órganos. Los órganos inmunológicos no mostraron cambios en su morfología luego del tratamiento

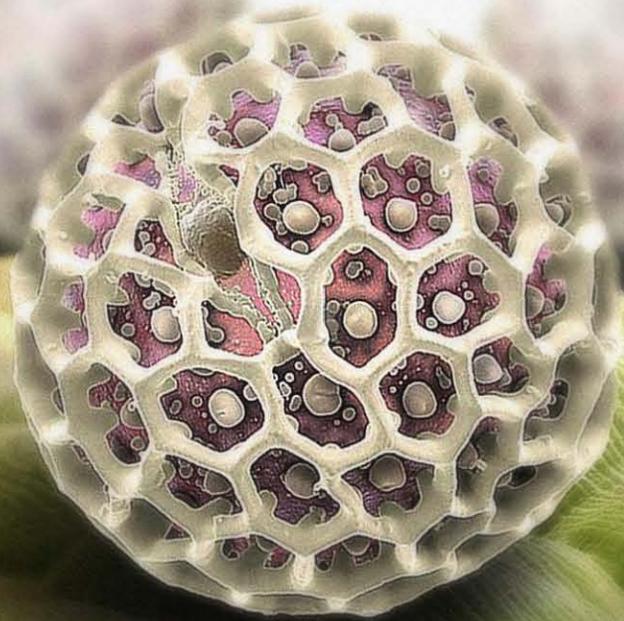
CONCLUSIONES

La administración oral de LAB productora de citoquinas antivirales se presenta como una alternativa terapéutica no invasiva y de bajo coste en la industria salmonera.

BIENVENIDAS Y BIENVENIDOS AL

XXXVI

CONGRESO CHILENO
DE **MICROBIOLOGÍA**



2-5 Diciembre 2014

Hotel Club La Serena - La Serena

WWW.SOMICH.CL

Uso de Bacterias ácido lácticas para la liberación *in situ* de Citoquinas antivirales en Salmónidos.

Lactic Acid Bacteria as vehicle to *in situ* delivery of antiviral cytokines in Salmonoids.

González, Josué^{1,2}, Muñoz, Carlos^{1,2}, Sandino, Ana María^{3,2}, Tello, Mario^{1,2}, ¹Laboratorio de Metagenómica Bacteriana, Centro de Biotecnología Acuicola, Departamento de Biología, Química y Biología, Universidad De Santiago De Chile. ²Biología Ictio Biothechnologies, General del Canto N° 460, Providencia, Santiago, Chile. ³Laboratorio de Virología, Centro de Biotecnología Acuicola, Departamento de Biología, Química y Biología, Universidad De Santiago De Chile. (Patrocinado por Dr. Mario Tello Reyes).

Introducción: En mamíferos y peces las citoquinas antivirales tienen un potente efecto sobre la replicación viral. En Humanos la administración de citoquinas antivirales se utiliza terapéuticamente contra diversos virus. En acuicultura, la aplicación a gran escala de citoquinas antivirales se ve impedida por el alto costo de purificación, por lo tanto es necesario desarrollar sistemas alternativos de liberación. Las bacterias ácido lácticas (LAB) son bacterias Gram-positiva, GRAS (generally regarded as safe), habitualmente presentes en el tracto gastrointestinal de los salmónidos. En mamíferos estas bacterias se han utilizado para la liberación *in situ* de citoquinas y péptidos inmunizantes. En este trabajo planteamos como **Hipótesis** En Salmónidos, las bacterias ácido lácticas pueden actuar como vehículo de liberación *in situ* de citoquinas antivirales, produciendo la estimulación de la respuesta inmune innata. **Metodología:** Mediante técnicas de DNA recombinante se generó una cepa de LAB productora de citoquina antiviral. Las propiedades inmunoestimulantes de esta cepa fueron estudiadas *in vivo*, administrando una dosis oral de 1×10^7 UFC/día a Trucha arcoiris. La inmunoestimulación se evaluó cuantificando por QRT-PCR los mRNA de genes Mx y PKR en Bazo y Riñón. Como control de expresión se utilizó rRNA 18s y para evaluar toxicidad se registró la mortalidad y las características morfológicas de los órganos. **Resultados:** La administración de la LAB productora de citoquinas antivirales no tuvo efectos sobre la sobrevivencia de los peces, registrándose una mortalidad de 0%. En Bazo, la expresión de Mx y PKR aumentó 3,5 y 4 veces, respectivamente. En riñón, los niveles de expresión de estos genes no mostraron cambios. El análisis de la expresión de PKR mostró resultados similares. Los órganos inmunológicos no mostraron cambios en su morfología luego del tratamiento. **Conclusiones:** La administración oral de una LAB productora de citoquinas antivirales se presenta como una alternativa terapéutica no invasiva y de bajo costo en la industria salmonera para el tratamiento profiláctico de infecciones virales.



**XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y
4 Congreso Colombiano de Microbiología**

CERTIFICAN QUE

Sr. Carlos Muñoz, Sr. Jesus Gonzalez, Sr. Rodrigo Leyton, Sr. Francisco Arriaza, Sra. Carolina Espinoza, Ph.D. Ana Maria Sandino, Ph.D. Mario Tello 1

PARTICIPARON CON EL TRABAJO TITULADO:

LACTIC ACID BACTERIA AS A VEHICLE FOR IN SITU DELIVERY OF ANTI-VIRAL CYTOKINES IN SALMONIDS

EN CATEGORÍA POSTER

Cartagena, Colombia
Noviembre 5 al 8 de 2014

HOWARD JUNCA
Presidente
Asociación Colombiana de Microbiología y
Asociación Latinoamericana de Microbiología

LILIANA MARCELA OCHOA GALEANO
Directora
Escuela de Microbiología
Universidad de Antioquia

— DIFUSIÓN Y CIERRE DE PROYECTOS —
TECNOLOGÍAS PARA EL MUNDO ACUÍCOLA

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

30 de Septiembre 2015

09.00 a 13.00 hrs.



LUGAR

Hotel Cumbres

INFORMACIONES

www.quimicaybiologia.usach.cl

— COLABORADORES —

PROGRAMA

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

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

Universidad de Santiago de Chile y Centro Biotecnología Acuícola

Activaq

www.activaq.cl

Laboratorios Ximena Polanco

www.xpolanco.cl

www.quimicaybiologia.usach.cl

— DIFUSIÓN Y CIERRE DE PROYECTOS —
TECNOLOGÍAS PARA EL MUNDO ACUÍCOLA

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

30 de Septiembre 2015

09.00 a 13.00 hrs.



— COLABORADORES —



— APOYADO POR —



DIRECTORA
MARGARITA MONTOYA KUNSTING

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

CONTROL DEL ESTRÉS EN SALMONES

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

(PROYECTO FIA PYT 2012-0023)

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

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

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



DIRECTOR
MARIO TELLO REYES

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

PROTEÍNA INMUNOESTIMULANTE

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

(PROYECTO FIA PYT 2012-0056)

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

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

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



DIRECTOR
MARCELO CORTEZ SAN MARTÍN

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

NUEVA VACUNA CONTRA VIRUS ISA

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

(PROYECTO FIA PYT 2012-0022)

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

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

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

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

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



CERTIFICADO DE DEPÓSITO

La Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM), en su estatus de **Autoridad Internacional de Depósito (IDA)**, certifica que la cepa *Lactococcus lactis* es un cultivo puro y viable en el tiempo, el cual se encuentra depositado bajo el código de acceso **RGM2265**, en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos, por un periodo de 30 años a contar desde la fecha de depósito y de acuerdo a los requerimientos que establece el Tratado de Budapest, sobre el reconocimiento internacional de depósitos de microorganismos para fines de procedimientos en materia de patentes.

Se consigna que este depósito fue realizado con fecha 30 de Diciembre del año 2015 por la **Universidad de Santiago de Chile** a través de sus investigadores Sres. **Mario Tello y Carlos Muñoz**.

Se establece que la CChRGM se hace responsable del mantenimiento de la cepa en condiciones óptimas por el plazo mencionado, así como de la entrega de información y suministro de muestra, previa solicitud de él depositante.

Jorge Castro Ponce
Curador de la Colección Chilena de
Recursos Genéticos Microbianos



FPI - 40

SOLICITUD DE REGISTRO DE PATENTES

12 TIPO DE SOLICITUD <input checked="" type="checkbox"/> INVENCIÓN <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> DIBUJO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> ESQUEMA DE TRAZADO O TOPOGRAFÍA DE CIRCUITOS INTEGRADOS <input type="checkbox"/> DIVISIONAL <input type="checkbox"/> N° SOLICITUD ORIGEN	PRIORIDAD 31 N° _____ 32 FECHA ____ ____ ____ 33 PAIS _____ 31 N° _____ 32 FECHA ____ ____ ____ 33 PAIS _____ 31 N° _____ 32 FECHA ____ ____ ____ 33 PAIS _____	DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA <input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES <input type="checkbox"/> DIBUJOS <input checked="" type="checkbox"/> PODER <input type="checkbox"/> CESION <input type="checkbox"/> DOCUMENTO(S) DE PRIORIDAD <input checked="" type="checkbox"/> LISTADO DE SECUENCIAS <input type="checkbox"/> CERTIFICADO DEPOSITO MATERIAL BIOLÓGICO <input type="checkbox"/> DIVULGACIÓN INOCUA <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN SOLICITUD INTERNACIONAL PCT <input type="checkbox"/> INFORME DE BUSQUEDA PCT <input type="checkbox"/> EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL PCT
--	--	--

PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

CAPÍTULO I

CAPÍTULO II

86	N° SOLICITUD INTERNACIONAL PCT:	FECHA: ____ ____ ____
87	N° PUBLICACIÓN INTERNACIONAL PCT:	FECHA: ____ ____ ____
51	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)	
54	TÍTULO O MATERIA DE LA SOLICITUD Bacteria ácido láctica transformada para producir IFN, plasmidio, alimento probiótico para peces que la comprende, método para inmunostimular peces y método para preparar alimento probiótico	

71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)
TIPO 1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica		CIUDAD _____ REGIÓN _____ PAIS CHILE E-MAIL _____ TELÉFONO _____
		SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>

72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social MUÑOZ MUÑOZ, Carlos Humberto
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)
TIPO 1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica		CIUDAD _____ REGIÓN _____ PAIS CHILE E-MAIL _____ TELÉFONO _____
		SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>

74	REPRESENTANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social ESTUDIO VILLASECA Y CIA.
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)
		CIUDAD _____ REGIÓN RM PAIS CHILE E-MAIL _____ TELÉFONO _____
		SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>

De conformidad con el Art. 44 de la Ley N° 19.039 sobre Propiedad Industrial, declaro/declaramos que los datos consignados en este formulario son verdaderos

N° DE PODER
(N° de Custodia Inapi)

23014

USO EXCLUSIVO INAPI
RECEPCIÓN



USO EXCLUSIVO INAPI

Fecha			N° Solicitud
Fecha Publicación			
N° de Registro		Fecha de Registro	

ANEXO SOLICITUD DE PATENTES
OTRO/S, SOLICITANTE/S, INVENTOR/ES, Y OTRA/S PRIORIDAD/ES

PRIORIDAD

31	N°	_____
32	FECHA	__ __ __
33	PAIS	_____

31	N°	_____
32	FECHA	__ __ __
33	PAIS	_____

31	N°	_____
32	FECHA	__ __ __
33	PAIS	_____

71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		
71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		
71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social TELLO REYES, Mario César Gerardo		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS CHILE	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input checked="" type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		
72	INVENTOR O CREADOR	DIRECCIÓN (Calle, Número)		
RUT:	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		

14. Bibliografía Consultada

1. SERNAPESCA. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura retira propuesta para instalación de salmonicultura en Tortel. In: Web. 2015.
2. Kontaly. Balance mundial de las capturas y cosechas de salmónidos en 2014. *Aqua*. 2015;184: 16. Available: <http://www.aqua.cl/wp-content/uploads/sites/3/2015/05/AQUA-184.pdf>
3. Ramstad A, Romstad AB, Knappskog DH, Midtlyng PJ. Field validation of experimental challenge models for IPN vaccines. *J Fish Dis*. 2007;30: 723–31. doi:10.1111/j.1365-2761.2007.00858.x
4. Allnutt FCT, Bowers RM, Rowe CG, Vakharia VN, LaPatra SE, Dhar AK. Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast. *Vaccine*. 2007;25: 4880–4888. doi:10.1016/j.vaccine.2007.04.068
5. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29: e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45
6. Marine Harvest. Salmon Industry Handbook [Internet]. 2015. Available: <http://www.marineharvest.com/globalassets/investors/handbook/2015-salmon-industry-handbook.pdf>
7. Aqua. Marine Harvest Group lidera la producción mundial de salmón Atlántico. In: Aqua [Internet]. 2015. Available: <http://www.aqua.cl/2015/07/06/mhg-lidera-la-produccion-mundial-de-salmon-atlantico/>
8. Aqua. La evolución del FCR en la industria del salmón de Chile [Internet]. 2015. Available: <http://www.aqua.cl/2015/01/12/salmonicultura-los-valores-actuales-de-factor-de-conversion-de-alimentos/>
9. Ewos. THE VALUE OF GROWTH. SPOT LIGHT. 2011: 7. Available: http://www.ewos.com/wps/wcm/connect/34a9cad4-bb4f-4c7c-9120-d74c9c0e8fe0/Spotlight+4.pdf?MOD=AJPERES&CONVERT_TO=url&CACHEID=34a9cad4-bb4f-4c7c-9120-d74c9c0e8fe0
10. Cermaq-Ewos. STABLE MARKET SHARE SECURES VOLUME GROWTH AND PROFITABILITY. In: WEB. 2011.
11. SERNAPESCA. Informe Sanitario 2013. 2013.
12. Fraunhofer. Comunicado de Prensa. 2014. Available: http://www.fraunhofer.cl/content/dam/chile/es/documents/Comunicado_AquaSur_2014_esp.pdf
13. Reyes-López FE, Romeo JS, Vallejos-Vidal E, Reyes-Cerpa S, Sandino AM, Tort L, et al. Differential immune gene expression profiles in susceptible and resistant full-sibling families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Dev Comp Immunol*. 2015;53: 210–21. doi:10.1016/j.dci.2015.06.017
14. Cortez-San Martín M, Rivas-Aravena A, Guajardo S, Castillo MT, Jashes M, Sandino AM, et al. Simultaneous detection of the IPN and ISA viruses in outbreaks of clinical disease and mortality in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *J Fish Dis*. 2012;35: 461–5. doi:10.1111/j.1365-2761.2012.01359.x