

**PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN EN ANIMALES**  
**PROYECTO ASOCIATIVO INTERDISCIPLINARIO PUCV**

**Título del proyecto**

Inmunidad y estrés: Evaluación de riesgo y capacidad de adaptación de los salmones de cultivo a la hipoxia.

**Investigador responsable**

Dr. José Gallardo Matus

**Especie(s) usadas en el estudio**

Salmón del Atlántico (*Salmo salar*).  
Poblaciones domesticadas (cepas): Lochy y Fanad.

**Objetivo del proyecto**

Evaluar el riesgo y la capacidad de adaptación de los salmones de cultivo frente a la hipoxia.

**Objetivos específicos del proyecto**

- Obj Especifico 1: Modelar el efecto de factores ambientales y productivos en la mortalidad de salmones de cultivo a nivel de centro de cultivo usando técnicas modernas de modelamiento predictivo y aprendizaje automático (machine learning).
- Obj Especifico 2: Identificar y comparar la tolerancia a la hipoxia en dos poblaciones domesticadas de salmón del Atlántico mediante estudios de asociación genómico.
- Obj Especifico 3: Comparar mecanismos de respuesta adaptativa a estrés por hipoxia en peces tolerantes y no tolerantes a la hipoxia.

**Describe brevemente la metodología**

*Obtención y mantenimiento de individuos*

Los individuos de las cepas Lochy y Fanad de la especie salmón del Atlántico que serán utilizados en los ensayos serán proporcionados por la empresa chilena Salmónes Camanchaca S.A., la cual participa como empresa asociada en el proyecto. Esta empresa trabaja siguiendo un modelo de sostenibilidad basado en los objetivos de desarrollo sostenible de la ONU. Los ensayos serán realizados en la estación experimental CIAS (Centro de acuicultura sustentable) en el campus Curauma (PUCV), o en las piscicultura que disponga la empresa. Todas ellas autorizadas por el Servicio Nacional de Pesca ya sea como centro de experimentación o como piscicultura para producción de alimento. Todos los sistemas de cultivo utilizados están diseñados para garantizar el bienestar y correcto desarrollo de los peces.

*Evaluación de la tolerancia a la hipoxia: Método LOE (Loss of equilibrium)*

El tiempo pérdida de equilibrio (LOE) es el principal rasgo que será medido en los individuos. Consiste en el tiempo que los individuos permanecen conscientes estando sometidos a una hipoxia controlada hasta que pierden la conciencia. A mayor tiempo de LOE, mayor tolerancia a la hipoxia tendrá el individuo. Previo a cada ensayo de LOE, los peces serán privados de alimento por 48 horas para evitar que el incremento de las demandas de oxígeno debido al metabolismo postprandial no afecte los resultados de los ensayos.

El tiempo de LOE será evaluado en dos oportunidades: (1) 1840 peces juveniles en estadio parr, en agua dulce, de 40 gramos, todos marcados con PIT (Passive Integrated Transponder), 920 de cada población. (2) 920 peces en estado smolt, agua de mar, 120 gramos, marcados con PIT, 460 de cada población. Al final del experimento se extraerá una muestra de ADN de la aleta para análisis del genoma y estudios de asociación genómica.

#### *Evaluación de la respuesta a la Hipoxia*

La respuesta a la hipoxia será medida en 920 peces post-smolt de 180 gramos de peso corporal. Se evaluarán dos tratamientos: Tratamiento Control (24 horas de normoxia, 6 días) y Tratamiento de hipoxia cíclica (9 horas de normoxia diurna y 9 horas de hipoxia nocturna, 6 días). Durante el experimento peces son sacrificados para tomar muestras de tejido branquial y hepático para analizar la expresión de genes y los patrones de metilación del ADN. Al finalizar los experimentos todos los animales serán eutanasiados.

#### **Señale la relevancia del proyecto y su importancia para la sociedad y/o el ambiente**

Los salmones de cultivo son una fuente de alimento de buena calidad, y contribuyen a la seguridad alimentaria a nivel global. El cambio climático está modificando algunos parámetros clave del océano, como la temperatura o el oxígeno disuelto. Estos cambios están impactando de forma negativa en los sistemas de producción de salmones que dependen del océano (p. ej. mayor mortalidad, menor eficacia de antibióticos). Para asegurar la producción alimentaria es necesario evaluar e implementar, en el corto y mediano plazo, acciones de adaptación al cambio climático que reduzcan o mitiguen estos impactos negativos. Con la ejecución de este proyecto se espera (1) obtener un modelo de predicción de riesgo de mortalidad de salmones de cultivo, (2) obtener parámetros genéticos de heredabilidad, genes y variantes genéticas (QTLs) asociados a tolerancia a la hipoxia en salmón del Atlántico y (3) establecer niveles basales de respuesta inmune y tolerancia a hipoxia usando marcadores clásicos de inmunidad y de estrés en salmón del Atlántico.

#### **Justifique el uso del (los) modelo(s) animal(es) en vez de usar modelos alternativos**

El modelo animal a utilizar son dos cepas de salmón del Atlántico *Salmo salar*. Al ser una especie ampliamente cultivada y particularmente muy sensible a la hipoxia, la utilización de individuos vivos en cultivo constituye la mejor alternativa para el objetivo del proyecto la cual es evaluar la tolerancia a la hipoxia con propósitos de selección. Además, se ha observado que existe variación de la tolerancia a la hipoxia entre los peces de estas cepas. Es necesario el uso de individuos parr, smolt y post-smolt para poder obtener data relevante y confiable sobre la tolerancia a la hipoxia, no pudiendo realizarse esta evaluación en cultivos celulares, ni en órganos aislados. No se considera relevante realizar los ensayos en estadios de desarrollo más tempranos (p. ej. Huevos o embriones) porque en estas etapas de desarrollo las consecuencias perjudiciales de los eventos de hipoxia son reducidos; el uso de animales de 40 y 120 gramos permite proyectar lo que ocurrirá frente a un evento de hipoxia en animales pre-smolt, post-smolt y adultos. Tampoco es relevante el uso de modelos animales filogenéticamente inferior debido a la alta variabilidad de la tolerancia a la hipoxia por las diferencias metabólicas entre especies.

Cabe mencionar que uno de los objetivos incluidos en el proyecto es la utilización de modelos alternativos tales como el *machine learning*, los cuales que serán utilizados para identificar y predecir el riesgo de mortalidad por hipoxia de los reproductores, seleccionando como padres a aquellos animales que tengan una mayor tolerancia a la hipoxia. El poder realizar estos ensayos (in vivo y modelado) con éxito, permitirá prevenir, mitigar o reducir a mediano plazo, la mortalidad por hipoxia de la salmonicultura chilena.

### **Estado de conservación de las poblaciones a intervenir**

No aplica pues se trabajará con poblaciones domesticadas cuyo propósito inicial es el consumo humano.

### **Aplicación de los criterios de las 3Rs de Russel y Burch (1959)**

#### *1) Justificación ética en el uso animal (Reemplazar)*

Las dos poblaciones domesticadas de salmón del atlántico constituyen la mejor alternativa disponible, toda vez que se conoce su buena resistencia y adaptación a condiciones de cultivo. Es imposible reemplazar los peces de estas poblaciones para realizar las evaluaciones de tolerancia a la hipoxia, puesto que el objetivo es conocer precisamente su nivel de tolerancia. De tal forma los modelos alternativos de estudio no podrían ser empleados en este ensayo.

#### *2) Las especies y el número de animales a ser utilizados (Reducir)*

El número de peces a utilizar en los ensayos de Tolerancia a la hipoxia por LOE (Loss of equilibrium) corresponden al número recomendado para poder identificar marcadores genéticos (QTL, quantitative trait loci) asociados al rasgo de interés. El número de peces a utilizar en los ensayos de respuesta a la Hipoxia corresponden al número adecuado para que las pruebas tengan potencia estadística suficiente para aceptar o rechazar las hipótesis del ensayo.

#### *3) Uso de técnicas a considerar, tales como la sedación, anestesia y analgesia, incluyendo las dosis y los métodos de uso; técnicas de enriquecimiento ambiental, etc. (Refinar)*

*Anestesia:* Tanto el marcaje de los peces, como el muestreo de órganos y tejidos considera la anestesia de los peces. Dosis y métodos se describen en el protocolo de manejo animal.

*Enriquecimiento ambiental:* No se consideran técnicas de enriquecimiento ambiental toda vez que los peces a usar ya están domesticados a condiciones de cultivo en estanques.

### **Guía de supervisión de animales**

El siguiente protocolo de supervisión de animales se elaboró siguiendo las recomendaciones de la Canadian Council on Animal Care (CCAC).

<https://ccac.ca/en/guidelines-and-policies/the-guidelines/>

### **Protocolo general de supervisión de los animales**

El protocolo general de supervisión considera el monitoreo diario de los sistemas de cultivo y sus componentes, para detectar anomalías que puedan poner el riesgo la salud y bienestar de los peces. Además, diariamente se registrará variables ambientales como el oxígeno y la temperatura para asegurar que se mantiene en rangos adecuados para los peces. Ocasionalmente, se medirá otros parámetros como pH, CO<sub>2</sub>, Amonio, Nitrito, Nitrato o alcalinidad. Asimismo, se verificará el comportamiento de los peces, si se detectan peces aletargados o enfermos, previo o durante los ensayos, estos serán extraídos y eutanasiados para disminuir la posibilidad de un brote infeccioso en el laboratorio. De forma diaria se retirará y registrará cualquier mortalidad que ocurra antes de o durante la realización de los experimentos. Finalmente, se llevará un registro diario de la alimentación entregada a los peces.