



CERTIFICACIÓN APROBATORIA DE TESIS DOCTORAL

Comité de Bioética y Bioseguridad

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Valparaíso, 22 de noviembre de 2021

En mi condición de Presidente del Comité de Bioética y Bioseguridad de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, declaro que se ha realizado la evaluación ético científica del proyecto de tesis doctoral, denominado **“Caracterización Genómica de la Edad de la maduración de la cepa Lochy de Salmón del Atlántico (Salmo salar)”**, realizado por la alumna tesista **Patricia Margarita Rivera** y dirigido por el profesor **José Gallardo**, de la Escuela de Ciencias del Mar, de la PUCV. Ha sido presentado ante el Comité de Bioética y Bioseguridad que represento, y en base al formulario de postulación y protocolos, se ha considerado que la experimentación se realizará de acuerdo a las especificaciones contenidas en el “Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados”, CONICYT/ANID (2018)".

En pleno acuerdo a los protocolos de estudio, metodologías y normas vigentes, se distinguen en la presente investigación los aspectos siguientes:

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

Caracterizar genómicamente la edad de maduración en machos de la cepa Lochy de salmón del Atlántico para identificar individuos con genotipos de maduración temprana y tardía que permitan prevenir los efectos perjudiciales de maduración en el campo.

IDONEIDAD DEL EQUIPO

La alumna tesista es Patricia Margarita Rivera estudiante del Doctorado en Acuicultura. El profesor guía es José Gallardo, perteneciente a la Escuela de Ciencias del Mar, PUCV.

Los otros participantes del equipo son María Angélica Rueda, Investigadora Postdoctoral de la PUCV, con amplia experiencia en análisis de datos - La Ing. Bioquímica Nicole Delgado, Investigadora del Laboratorio de Genética y Genómica de organismos acuáticos de la PUCV, quien desarrolla análisis genómicos y composición de microarreglos.

METODOLOGIA DE TRABAJO Y MUESTRA A ESTUDIAR

Para el objetivo específico 1, se propone secuenciar el ARN de cerebro, gónada e hígado de 48 salmones machos (24 maduros, 24 inmaduros) para analizar los cambios de expresión global de genes por las implicancias que estos órganos tienen en el proceso de maduración y, efectuar comparaciones entre animales de maduración temprana y no maduros para cada tejido. Para el objetivo 2 se propone realizar un estudio de asociación genómico (GWAS) con el ADN que será extraído a partir de muestras tomadas de la aleta dorsal de aproximadamente 1400 salmones machos (entre maduros y no maduros) provenientes de un centro de cultivo marino, cuando se





realice su procesamiento en planta. Todas las muestras serán enviadas a secuenciar y atravesarán una etapa de análisis de datos y bioinformática.

ESPECIE USADA EN EL ESTUDIO

Salmon del Atlántico

USO DE MODELO ANIMAL

La selección de individuos en base a la genética de los animales, aplicada a nivel comercial, requiere la diferenciación y localización de regiones que gobiernan los caracteres de interés para la industria, para cumplir tal objetivo se requiere una gran cantidad de información de los genomas de los individuos (ADN y ARN) que no se puede conseguir sino directamente de las muestras biológicas.

CRITERIOS DE LAS 3RS DE RUSSELL Y BURCH (1959)

Reemplazo: dada la naturaleza de la investigación, la cantidad de animales requeridos para análisis genómicos y la aplicabilidad industrial del cultivo de salmón del atlántico, no se puede sustituir animales por modelos informáticos o por animales con una menor percepción del dolor

Reducción: La cantidad de animales requerida para el cumplimiento de los objetivos de estudio es la mínima que podría usarse de acuerdo con otros estudios, sin embargo, como el muestreo de madurez en planta depende de la cantidad existente de maduros e inmaduros, los 1400 peces pueden verse reducidos según las condiciones de campo.

Refinamiento: El proceso de crianza de los animales en la empresa de origen se desarrolla con todas las reglas de bienestar animal desde la incubación en agua dulce hasta el deceso de los peces en las plantas de procesamiento, usando técnicas para minimizar el dolor y la angustia en caso de que se tengan que evaluar los rendimientos o parámetros de cultivo en general, y para pruebas de control de calidad en planta o para investigaciones de tipo científico.

CONDICIONES DE MANEJO ANIMAL

Protocolo de supervisión animal, se anexa.

EL LUGAR DEL ALMACENAMIENTO DE LOS DATOS

La responsable de custodiar la información es la candidata a Doctora, Margarita Rivera. El lugar de almacenamiento de los datos al término de la investigación es en bitácoras de campo, en computador personal y medios digitales (repositorio github). El acceso de los datos no será protegido con clave.

RELEVANCIA CIENTIFICA Y SOCIAL DE LA INVESTIGACION

Tasas de madurez precoz de salmón del atlántico de 64% en cultivos en mar y 80% en sistemas RAS, apuntan a este fenómeno como un grave problema para los entornos acuícolas, registrándose pérdidas entre \$11 a \$24 millones en la salmonicultura. El problema se ha manejado mediante la manipulación de fotoperíodos para modificar la percepción estacional de luz en los peces, retrasando la reproducción; sin embargo, el fenómeno persiste en cultivos. Recientemente se ha descubierto el importante papel que juegan algunos genes (sdY, vgl 3) sobre el fenómeno. No obstante, aún se debate si estos genes actúan de la misma forma en peces silvestres o domesticados. El aporte de la tesis propuesta apunta a contribuir en este ámbito al encontrar regiones genómicas que puedan





PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO

estar contribuyendo a la diseminación de la maduración temprana en los cultivos y aportar con una base científica a los recientes hallazgos de otras investigaciones sobre este rasgo poligénico.

Los documentos presentados por la alumna tesista de doctorado, ya analizados por el **Comité de Bioética y Bioseguridad**, para la elaboración de la presente certificación son los siguientes:

1. Proyecto de tesis.
2. Ficha de antecedentes bioéticos y de bioseguridad PUCV.
3. Protocolo de supervisión en animales. Y Protocolo de manejo animal.
4. Currículum de la Investigadora Responsable.

En base a lo anteriormente expuesto, el **Comité de Bioética y Bioseguridad** de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso ha concluido el presente proceso de certificación, aprobando la evaluación bioética solicitada por la alumna tesista Patricia Margarita Rivera. Por último, la tesista se compromete a entregar toda la información de esta investigación que sea requerida por este Comité.

Cordialmente,

JUAN CARLOS GENTINA

Presidente Comité de Bioética y Bioseguridad
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso



PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN Y MANEJO DE ANIMALES

- **El título del proyecto:** “Caracterización genómica de la edad de maduración en la cepa Lochy de *Salmo salar*”

- **Nombre de investigadores principales y otras personas autorizadas**

- Dr. José Gallardo, Profesor Adjunto de la Escuela de Ciencias del Mar

- **Fecha propuestas de inicio y de término del estudio**

22 de noviembre del 2021 al 15 de diciembre del 2022

- **Objetivos del proyecto y su metodología con base en su relevancia para la salud humana y animal, el avance del conocimiento y el bien de la sociedad.**

GENERAL

Caracterizar genómicamente la edad de maduración en machos de la cepa Lochy de salmón del Atlántico para identificar individuos con genotipos de maduración temprana y tardía que permitan prevenir los efectos perjudiciales de maduración en el campo.

ESPECÍFICOS

- Comparar la expresión global de genes en peces machos de maduración temprana y, no maduros de la cepa Lochy cultivados en agua dulce.
- Identificar polimorfismos de nucleótido simple (SNP) asociados a la edad de maduración en la cepa Lochy en peces cultivados en agua de mar

- **Justificación ética en el uso animal (Remplazar).**

Dada la naturaleza de la investigación, la cantidad de animales requeridos para análisis genómicos y la aplicabilidad industrial del cultivo de salmón del atlántico, no se puede sustituir animales por modelos informáticos o por animales con una menor percepción del dolor

- **Las especies y el número de animales a ser utilizados (Reducir).**

La cantidad de animales requerida para el cumplimiento de los objetivos de estudio es la mínima que podría usarse de acuerdo con otros estudios, sin embargo, como el muestreo de madurez en planta depende de la cantidad existente de maduros e inmaduros, los 1400 peces pueden verse reducidos según las condiciones de campo. Es necesario indicar que estos peces serán utilizados como alimento y por tanto no constituyen un número extra de animales a utilizar.

- **Descripción detallada de los procedimientos utilizados en los animales y su clasificación según nivel de invasividad.**

Para el primer objetivo específico, los peces provendrán del Centro de Mejora Genética y Reproducción de la empresa “Salmones Camanchaca”, donde la crianza de los salmones se desarrolla en agua dulce con el objetivo de producir animales reproductores (generar semen y huevos). Los reproductores son supervisados a diario para detectar anomalías en los estanques de cultivo que puedan poner en riesgo la salud y bienestar de los peces. Además, diariamente (3 veces por día) se registran variables ambientales (O₂, pH, T°, CO₂) para asegurar una adecuada calidad de agua de cultivo, se alimentan los peces y se verifica el comportamiento de los mismos para comprobar si existen animales enfermos, mortalidad o, si requieren, algún tratamiento sanitario.



Para el objetivo específico 2, los peces provendrán de centros de cultivo de engorda en el mar de la misma empresa donde igualmente los peces son supervisados diariamente, alimentados, controlados sanitariamente y en el tiempo de cosecha son sacrificados.

• Técnicas de refinamiento a considerar:- sedación, anestesia y analgesia, incluyendo las dosis y los métodos de uso; técnicas de enriquecimiento ambiental, etc. (Refinar)

Cabe recalcar que en el primer caso (reproductores) los animales son sacrificados con sobredosis de anestésico, para evitar el sufrimiento animal. En el segundo caso son adormecidos con hielo y luego sacrificados con un golpe automático en la cabeza.

Para la extracción de muestras, los peces serán anestesiados en un contenedor por separado con sobredosis del anestésico benzocaína al 20% (BZ-20, Verterquímica); previo a su manipulación, los animales serán seleccionados en base a su estadio de maduración.

• Protocolo de supervisión y criterios de punto final.

Dado que no existe experimentación controlada, solo se va a lcentro de cultivo y se extrae muestra sacrificando a los peces no se considera protocolos de supervición por parte de los investigadores.

• Método de eutanasia, acorde a la especie.

Para la eutanasia en *Salmo salar* se aplicará una dosis triple de anestésico en el agua. Este procedimiento es mejor que la inyección individual, ya que evita la manipulación y estrés del animal. Previo a la eutanasia los peces estarán en ayuno por 24 horas para aumentar la absorción del anestésico por el intestino y piel. El efecto del anestésico es rápido y no produce sufrimiento ni estrés al pez. Se verificará la muerte de los mismos cuando hay ausencia de movimiento frente a estímulos mecánicos Cuando los peces no presenten movimiento, se procederá a la extracción de los animales del medio para la toma de muestras de los tejidos descritos. Estos procedimientos tardarán alrededor de 1 minuto por pez.

• Cualquier otra información considerada importante, necesaria y pertinente.

La mortalidad y los residuos orgánicos son retirados a diario de todos los estanques de la empresa y colocados en un contenedor hermético, debidamente identificados. Posteriormente, los desechos son retirados por una empresa que se encarga de la gestión de residuos orgánicos y sustancias peligrosas.

Los muestreos se realizarán en las instalaciones de la empresa “Salmones Camanchaca”, con sus respectivas normas de bioseguridad. Que consiste en el adecuado proceso de desinfección al ingreso a las instalaciones de los estanques y usar indumentaria adecuada para evitar la diseminación de posibles patógenos o enfermedades.

En el muestreo no se usarán químicos con potencial riesgo biológico, sino únicamente el anestésico descrito anteriormente que no presenta riesgo para la salud humana; sin embargo, para su manipulación se usará en todo momento guantes y mascarilla. No se emplearán compuestos potencialmente cancerígenos, mutagénicos o teratogénicos.

Todo material empleado en el estudio será previamente esterilizado y generalmente se usan nuevos insumos en cada ensayo y todo desecho generado en el muestreo será debidamente etiquetado y procesado.

Todos los procedimientos serán supervisados continuamente por el profesor guía y el responsable técnico de la empresa “Salmones Camanchaca”.

