

PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN EN ANIMALES

PROYECTO INMUNIDAD Y ESTRÉS SALMONES

Título del Proyecto: Desarrollo de una estrategia preventiva global de control de patógenos basada en fortalecer el sistema inmune innato y la respuesta al estrés.

Investigador responsable

Dr. José Gallardo Matus

Especie(s) usadas en el estudio

Salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

Objetivo del proyecto

Desarrollar una estrategia preventiva global de control de patógenos basada en fortalecer el sistema inmune innato y la respuesta al estrés.

Objetivos específicos del proyecto

- Obj Especifico 1: Caracterizar la respuesta inmune innata y la tolerancia al estrés en condiciones de campo.
- Obj Especifico 2: Evaluar el efecto de directentes factores de producción y estrés sobre el color del filete.

Describe brevemente la metodología

Objetivo 1

El experimento consiste en coleccionar y analizar muestras de diferentes tejidos y organos desde peces de producción cultivados en una Piscicultura de agua dulce y en un centro de engorda en agua de mar, ambos pertenecientes a la empresa salmones Camanchaca. La empresa Salmones Camanchaca S.A., trabaja siguiendo un modelo de sostenibilidad basado en los objetivos de desarrollo sostenible de la ONU. Todos sus centros de cultivo están autorizados por el Servicio Nacional y están diseñados para garantizar el bienestar y correcto desarrollo de los peces. Además, desde el año 2021, la empresa cuenta con una Política de Bienestar Animal, cuyo objetivo principal es optimizar la salud y bienestar de los peces durante todo su ciclo productivo. También sus centros de cultivo cuentan con la concertificación Best Aquaculture Practices (BAP).

Los muestreos se realizarán idealmente desde dos estanques o jaulas de cultivo (replicas) con el objetivo de caracterizar la respuesta inmune y de estrés de los peces en tres etapas: 1) Vacunación, 2) Transferencia desde agua dulce al agua de mar 3) Durante un evento de estrés en el mar. En cada etapa se considera realizar 4 muestreos de 30 peces (15 por réplica) espaciados por intervalos de 7 días. Las muestras a coleccionar serán músculo, branquias, riñón cefálico, bazo, sangre y plasma. Los peces serán sacrificados con una sobredosis de benzocaína (dilución 20 mL en 100 mL de agua). Las muestras serán almacenadas en tubos eppendorf de 2 mL con 1 mL de RNA later o lo necesario para asegurar que cubra completamente la muestra. Posteriormente las muestras se trasladan a la Universidad para su posterior análisis. El análisis incluye evaluar la expresión diferencial de genes y proteínas usando técnicas *ad hoc* como el RT-qPCR, el análisis de transcriptoma usando Microarreglos de ADN, las pruebas de ELISA, entre otras.

Objetivo 2

El experimento consiste en recolectar y analizar muestras de diferentes tejidos y órganos desde un ensayo que se realizará en las instalaciones experimentales de la empresa SKRETTING. La mitad de los peces pertenecen a la empresa salmones Camanchaca y corresponden a peces de la cepa Lochy la otra mitad pertenece a la empresa SKRETTING y corresponden a la cepa Aquagen. Algunos de los peces serán marcados con chip de radiofrecuencia para hacer trazabilidad.

El experimento evaluará cuatro dietas experimentales con diferentes niveles de astaxantina (80 y 100 ppm), con y sin antioxidantes, en dos grupos de peces post-smolt (cepas Aquagen y Lochy) bajo condiciones controladas. Todos los grupos recibirán un desafío de estrés, excepto la mitad de los estanques en los grupos de 80 ppm de astaxantina con y sin antioxidante que no recibieron desafío (control). Los peces serán sometidos a estrés dos semanas antes del final del ensayo para evaluar su efecto sobre la pérdida de color. El ensayo se llevará a cabo durante cuatro meses, con peces de peso inicial de 170 gramos aproximadamente y de 700 gramos aproximadamente hacia el final del ensayo. Se realizará cuatro muestreos durante el período, en los tiempos T0=día 53, T1=día 96, T2=día 104 y T3=día 110.

En total se definieron seis tratamientos para la combinación de dietas con o sin estrés: A=Dieta C + estrés; B= Dieta A + estrés; C= Dieta B + estrés; D= Dieta B; E= Dieta A; F= Dieta D + estrés. Entre el periodo T2 y T3, se retirará el estrés y se permitirá a los peces recuperarse por 7 días. El primer muestreo (T0) se llevará a cabo después de los periodos de cuarentena y adaptación y antes de la administración de las dietas con astaxantina. Luego de este muestreo, se administrarán las cuatro dietas con astaxantina a dos concentraciones de 80 (dietas A y B) y 100 ppm (dietas C y D), con y sin antioxidante en los grupos B y D. Entre el periodo T1 y T2, se someterá a los peces a un estrés durante 7 días, excepto en la mitad de los tanques (n=8) de los grupos con dietas de 80 ppm (A y B).

El número de peces muestreados por tanque variará en función del objetivo de análisis y del tiempo de muestreo: T0: 2 peces x estanque; T1: 12 peces x estanque; T2 y T3: 9 peces por estanque. Las muestras a coleccionar serán músculo, branquias, riñón cefálico, bazo, sangre y plasma. Los peces serán sacrificados con una sobredosis de benzocaína (dilución 20 mL en 100 mL de agua). Las muestras serán almacenadas en tubos eppendorf de 2 mL con 1 mL de RNA later o lo necesario para asegurar que cubra completamente la muestra. Posteriormente las muestras se trasladan a la Universidad para su posterior análisis. El análisis incluye evaluar la expresión diferencial de genes y proteínas usando técnicas ad hoc como el RT-qPCR, el análisis de transcriptoma usando Microarreglos de ADN, las pruebas de ELISA, entre otras.

Adicionalmente, la empresa salmones Camanchaca contratará un servicio externo para medir el color del filete por análisis de imágenes (máquina) y manual (Salmofan), también se cuantificará de astaxantina, luteína y zeaxantina (química y HPLC), lípidos (HPLC), grasa (%) y humedad (%).

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. Los eventos de estrés ocurren de manera habitual en los sistemas de cultivo de salmones y eso afecta a los peces en diferentes niveles, pudiendo en algunos casos causar la muerte. Existen evidencias que las poblaciones o cepas de salmón tienen un comportamiento diferencial de crecimiento y de respuesta al estrés. También existen evidencias de que los antioxidantes en el alimento pueden prevenir ciertas consecuencias perjudiciales del estrés. Finalmente, el color del salmón se produce por la acumulación de un pigmento que se entrega en el alimento llamado astaxantina, el cual también posee efectos antioxidantes, por lo que se ha sugerido que peces expuestos a estrés pierden color, pues lo utilizarían para defenderse del estrés.

Con la ejecución de este proyecto se espera se pretenda evaluar y comparar como diversos factores de producción afectan al color del salmón, entre los que se encuentran, la cepa, el sexo, las dietas con antioxidantes y la concentración de Astaxantina en el alimento.

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 los eventos de estrés, la utilización de individuos vivos en cultivo constituye la mejor alternativa para el objetivo del proyecto la cual es evaluar el efecto del estrés, las dietas y los antioxidantes en el color del salmón. Además, se ha observado que existe variación en el comportamiento de estas poblaciones, por lo que su inclusión es relevante. A diferencia del objetivo 1, el experimento se realizará en condiciones de cultivo en tierra para limitar posibles efectos de otros factores. Es necesario el uso de peces smolt y post smolt para poder obtener datos relevantes y confiables sobre la respuesta al estrés, 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 estrés son reducidas; el uso de animales de 120 – 700 gramos permite proyectar lo que ocurrirá frente a un evento de estrés en condiciones de campo. Tampoco es relevante el uso de modelos animales filogenéticamente inferiores debido a la alta variabilidad de la tolerancia al estrés por las diferencias metabólicas entre especies.

Estado de conservación de las poblaciones a intervenir

No aplica pues se trabajará con poblaciones domesticadas cuyo propósito final 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 estrés, puesto que el objetivo es conocer y comparar precisamente su nivel de respuesta frente a un estresor. 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 corresponden al número recomendado para poder identificar diferencias de color asociados a los tratamientos y factores que se analizarán. El número de peces a utilizar en los ensayos corresponden al número adecuado para que las pruebas tengan una 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 en 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, CO₂, 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.