

PROYECTO DE ASISTENCIA TÉCNICA

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

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

✓ **Laboratorio de Genética e Inmunología:**

Dr. Luis Mercado Vivanco; Inmunólogo y Profesor Titular

✓ **Laboratorio de Genética y Genómica aplicada**

Dr. Jose Gallardo; Genetista y Profesor adjunto

Dra. Débora Torrealba; Biólogo e Investigador Postdoctoral

Paula Valenzuela; Biotecnóloga y estudiante Doctorado: Responsable de Muestreos de campo.

✓ **Departamento de Estadística, Facultad de matemáticas, Pontificia Universidad Católica de Chile**

Dr. Jonathan Acosta; Matemático

OBJETIVO

Objetivo general: Desarrollar una estrategia preventiva global de control de patógenos basada en fortalecer el sistema inmune innato y la respuesta al estrés en salmón del Atlántico.

Objetivo específico: Caracterizar la respuesta inmune innata y la tolerancia al estrés en condiciones de campo.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La evaluación de la inmunidad y estrés se realizará en peces de los grupos PGR (Resistentes) y PRD (Producción) como se describe en la figura 1. Empezando por la etapa de vacunación en abril 2021 y finalizando en la etapa cosecha aproximadamente en junio 2022. Los muestreos iniciarán en el mes de Abril justo antes de la vacunación. En cada muestreo se colectarán muestras de órganos de 15 peces del grupo PGR y de 15 peces del grupo PRD. Este muestreo se repetirá a los días 7, 14 y 21 post-vacunación. Para que el experimento

Diseño experimental año 2021/2022

30 peces x 15 muestreos x 4 órganos = **1.800**

Músculo + Branquia + Riñón cefálico + Bazo

Grupo PGR

Vacunas

15

15

15

15

Smoltificación

15

15

15

15

Estrés agudo

15

15

15

15

Estrés crónico

15

15

15

15

Abril Mayo Junio Julio Agosto Sept Oct Nov Dic Enero Febre Marzo

15

15

15

15

Grupo PRD

Caso 1
Vacunas = día 7, 14, 21 posterior al evento.

Caso 2:
Esmoltificación: día 7 previo y 0, 7 y 15 posterior al evento.

Caso 3: estrés agudo
día 0, 3 y 7 posterior al evento.

Caso 4: estrés crónico
Día 0, 7, 14, 21 posterior al evento

Petrohue **Mañihueco**

PROTOCOLO PARA COLECCIÓN DE MUESTRAS

Animales por muestreo:

- Músculo - 15 del grupo PGR
- Branquia - 15 de grupo PRD
- Bazo
- Riñón cefálico
- Sangre (optativo)
- Plasma (optativo)

1. Preparar tubos eppendorf de 2 mL con 500-800 μ L de RNA later. Dependiendo de la disponibilidad de RNAlater, lo que se debe asegurar es que cubra completamente la muestra.
2. Seleccionar los peces a muestrear y aislarlos.
3. Sacrificar a los peces muestreados con una sobredosis de benzocaína (dilución 20 mL en 100 mL de agua).

Sangre y Suero:

4. Extraer sangre desde la vena caudal utilizando una jeringa según su tamaño. Para peces menores de 50 gramos utilizar una jeringa de 1 mL y aguja de 25 g. Para peces superiores a 50 gramos usar una jeringa de 3 mL y aguja de 21 g. La sangre se recolecta en tubos de 2 mL.

4.1 Obtención de suero: Incubar la sangre a temperatura ambiente por 30 minutos y luego centrifugar a 3.000 g por 10 minutos. Recuperar el suero y almacenar a -20°C (Idealmente -80°C).

La extracción de sangre y obtención de suero, es optativa. Pero idealmente se puede tomar en un tercio de los animales.

Bazo y Músculo:

5. Realizar una incisión en zona ventral a lo largo de la región troncal. El corte sólo debe ser lo suficientemente profundo para abrir el músculo, pero no tocar los órganos internos.
6. Tomar el bazo con una pinza y con la ayuda de un bisturí extraerlo. Depositarlo en una superficie (podría ser vidrio, previamente limpio con etanol 70%). Cortar cubitos de tamaño mínimo 0,5-0,7 cm x 0,5-0,7 cm* app (como una lenteja), depositarlo en RNA later y almacenar**. Al menos se debe guardar 3 muestras del órgano x individuo y por tubo.

Branquia:

7. A continuación, proceder a retirar un arco branquial con la ayuda de una tijera quirúrgica. Tomar una muestra de aproximadamente 1 cm x 1 cm*, no es necesario quitar el cartílago. Preferir arcos branquiales exteriores, depositarlo en RNA later y almacenar**. Al menos 3 muestras x individuo.

Riñón cefálico:

8. Finalmente se quita la cabeza haciendo un corte justo detrás del opérculo en zona anterior. Retirar órganos internos y dejar limpia la zona para visualizar riñón. En la zona anterior se forma la "punta flecha" del riñón cefálico. Tomar una muestra de

aproximadamente 1 cm x 1 cm*, depositarlo en RNA later y almacenar**. Al menos 3 muestras x individuo.

9. Para muestras histológicas realizar el mismo procedimiento, pero se deposita en solución fijadora.

*** Para todos los órganos se deben tener 3 muestras por tubo. No obstante, queda a criterio del operador si el tamaño del órgano permite tomar esas 3 muestras. Como mínimo debe haber una muestra con el tamaño sugerido.**

**** El almacenaje depende de la situación y el acceso a un refrigerador. Hay que considerar que el fabricante informa que el RNA later permite una conservación del RNA durante 1 día a temperatura ambiente, 1 mes a 4°C e indefinidamente a -20°C.**

Las muestras en RNA later serán utilizadas para análisis transcripcional y proteómico.

Materiales:

- | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| - Hoja de bisturí | - RNA later |
| - Mango de bisturí | - Benzocaína 20% |
| - Tijeras quirúrgicas | - Fijador para muestras histológicas* |
| - Pinzas | |
| - Tubos 2 ml tipo eppendorf | |
| - Jeringas 1 mL o 3 mL | |
| - Aguja 25 – 21 g | |

Reactivos:

*Recomendación para visualizar morfología y/o probable IF.

RESUMEN DE ANÁLISIS POST MUESTREOS

- 1) Análisis molecular de expresión de genes de estrés e inmunidad innata. En la tabla 1 y 2 se resumen los principales marcadores asociados a estrés e inmunidad que se analizarán en el proyecto.

Marcadores asociados a estrés Órganos diana : Branquia - Músculo				
Órgano	Hacinamiento	Térmico	Manipulación	Hipoxia
Branquia	Pump Na ⁺ K GHR Annexin 1	Pump Na ⁺ K HSP90 HSP70	Pump Na ⁺ K	Pump Na ⁺ K HIF-1α
Músculo	REDD1 KLF15 GR	HSP90 HSP70	GR	HIF-1α

Tabla 1. Análisis moleculares de expresión de genes seleccionados de estrés en los órganos Branquia y Músculo.

Marcadores asociados a estatus inmunidad innata Órganos diana : Branquia – Músculo – Bazo y Riñón anterior	
Tipo M1 Macrófagos con efecto proinflamatorio, prooxidativo destructor de patógenos	Tipo M2 Macrófagos con efecto sanador, reparador, anti inflamatorio y antioxidante, inmunosupresor.
iNOS - TNF alpha Cox 2 - IL-1b-beta IL-8 - IFNgamma IFNgamma R1/R2 - IL-12 CD56 - eomes Catelicidina/Hepcidina	Arginasa2 IL-10 TGF-beta Anexina 1 IKkB

Tabla 2. Análisis molecular de expresión de genes seleccionados de inmunidad innata en los órganos Branquia, Músculo, Bazo, riñón cefálico.

- 2) Análisis global de expresión de genes: El análisis se realizará mediante el uso de un microarreglo que permitirá observar la expresión diferencial de 45.000 genes.

RESULTADOS COMPROMETIDOS

Caracterización de la respuesta inmune y tolerancia a estrés usando marcadores clásicos de inmunidad y de estrés y mediante análisis de expresión global de genes.