

Informe final de resultados. Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura (PGSA)- Sernapesca. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) - UNIVERSIDAD DE CHILE. Dr. Rodrigo Pulgar Tejo (Investigador responsable) - Diciembre de 2018.

RESUMEN DEL PROYECTO

En Chile, el Síndrome Rickettsial del Salmón (SRS) es la enfermedad infecciosa que causa mayores pérdidas económicas en la salmonicultura, transformándose en un peligro para la sustentabilidad de la industria, estimándose pérdidas y gastos para su control de alrededor de US\$700 millones anuales. Hasta ahora los enfoques profilácticos y preventivos que se han probado para combatir SRS han sido insuficientes, por lo que el control de SRS se ha realizado principalmente con estrategias de tratamiento farmacológico basado en el uso antibiótico. En Chile se usan 700 veces más antibióticos que en Noruega para obtener cantidades similares de salmónidos, situación que ha generado fuertes críticas a la industria chilena y los consiguientes perjuicios comerciales. Adicionalmente, esta estrategia orientada al uso de fármacos antimicrobianos dirigidos al patógeno (PDAD) ha desencadenado una grave desventaja, el desarrollo de la resistencia microbiana a los antibióticos y resurgimiento de las enfermedades infecciosas. En respuesta a esto, un prometedor enfoque terapéutico propone perturbar las vías metabólicas moleculares utilizadas por los patógenos intracelulares en los hospederos, mediante el uso de fármacos antimicrobianos dirigidos al huésped (HDDA). Esta estrategia, al reducir la presión selectiva sobre el patógeno, además de prevenir la infección disminuye la probabilidad de desarrollo de resistencia microbiana a los antibióticos convencionales. Para abordar la identificación de estas funciones biológicas en salmones recientemente hemos identificado, mediante estudios de genómica funcional, grupos de procesos biológicos activamente regulados en respuesta a la infección, algunos de ellos específicos de familias resistentes. Entre estos procesos destaca la regulación del metabolismo de hierro, que mediante un proceso de inmunidad nutricional es capaz de limitar la disponibilidad de hierro a *Piscirickettsia salmonis* evitando así la proliferación bacteriana. Esta información y un robusto estado del arte en su conjunto sugiere que la disminución de la disponibilidad de hierro a través de la dieta de los salmones es una prometedora estrategia para combatir la infección con *Piscirickettsia salmonis*. Esta estrategia de uso de quelantes ha sido exitosa para inhibir el crecimiento de diversos patógenos *in vitro* y en modelos animales. Entre los quelantes aprobados por la FDA más utilizados en humanos, por su extremadamente alta afinidad a hierro son deferoxamina, deferiprona y deferasirox. Nuestros resultados preliminares indican que los tres quelantes son inhibitorios para el crecimiento de *Piscirickettsia salmonis in vitro* y de baja citotoxicidad en cultivos celulares de salmónidos. Estos resultados representan una promisoriosa oportunidad para complementar la respuesta fisiológica que los peces despliegan para privar de hierro a *Piscirickettsia salmonis* durante la infección, a través de la disminución de la disponibilidad de hierro en la dieta de los peces.

ANTECEDENTES e ITINERARIO

El presente informe de resultados contempla la descripción de actividades realizadas y resultados asociados a todos los objetivos del proyecto “Modulación de la inmunidad nutricional como estrategia de resistencia de salmones a la infección con *Piscirickettsia salmonis*” durante 2017 y 2018. El itinerario de trabajo ha sido el siguiente:

15 de septiembre de 2017

Envío de postulación - Rodrigo Pulgar

7 de noviembre de 2017

Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura comunica decisión de financiar la propuesta.

8 de noviembre de 2017

Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura envía observaciones del proyecto (sugerencia de modificaciones) entregadas por los evaluadores.

9 de noviembre de 2017

Se realiza una reunión en las instalaciones de Sernapesca (Santiago) por video conferencia con Sernapesca (Valparaíso) entre el investigador responsable (Rodrigo Pulgar-Universidad de Chile) y Fabián Avilés y Soraya Díaz (Sernapesca) para discutir las observaciones realizadas por los evaluadores.

10 de noviembre de 2017

Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura envía al investigador responsable el pre TTR para revisión.

13 de noviembre de 2017

Reunión de coordinación entre los investigadores del proyecto para su ejecución. Asisten: Dra. Dinka Mandakovic, Dra. Verónica Cambiazo, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dr. Rodrigo Pulgar)

9-16 de noviembre de 2017

Los investigadores discuten y dan respuesta a las observaciones realizadas por los evaluadores las cuales son enviadas Fabián Avilés y Soraya Díaz.

20 de noviembre de 2017

Los investigadores envían modificaciones solicitadas al TTR y cartas de apoyo (adjuntas en este informe) al proyecto de parte de miembros de la industria productiva de salmones (Aquadvice y AquaGen), de acuerdo a lo solicitado por los revisores.

21 de noviembre de 2017

Reunión de coordinación entre los investigadores del proyecto para su ejecución. Gestión de compra de insumos y uso de instalaciones/equipos de los laboratorios de la Universidad de Chile involucradas en el proyecto. Diseño y producción de dietas. Asisten: Dra. Dinka Mandakovic, Dra. Verónica Cambiazo, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dr. Rodrigo Pulgar

29 de noviembre de 2017

Postulación a la propuesta a través de Mercado Público.

11 de diciembre de 2017

Firma de contrato por parte de la Dirección del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile y entrega de la documentación requerida.

Reunión entre los investigadores del proyecto para su ejecución. Se inician las actividades experimentales asociadas a los dos primeros objetivos laboratorios de la Universidad de Chile (INTA - Facultad de Ciencia Agronómicas). Asisten: Dra. Dinka Mandakovic, Dra. Verónica Cambiazo, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dr. Rodrigo Pulgar

13 de diciembre de 2017

Entrega a Sernapesca de la boleta de garantía asociada al proyecto.

18 de diciembre de 2017

Reunión entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez) para evaluar primera semana de actividades experimentales en la Universidad de Chile (Facultad de Ciencia Agronómicas). Este día comienzan los experimentos asociados a alimentación de peces con las dietas experimentales (quelante) y controles, con y sin encapsulación.

20 de diciembre de 2017

Presentación del proyecto en el Taller de Difusión “Avances en la investigación del programa para la gestión sanitaria en la acuicultura” realizado en Puerto Varas (Programa adjunto).

26 de diciembre de 2017

Reunión entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez) para evaluar la segunda semana de actividades experimentales en la Universidad de Chile (Facultad de Ciencia Agronómicas).

28 de diciembre de 2017

Entrega de primer informe de avance de resultados a Sernapesca.

2 de enero 2018

Reunión entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Dra. Verónica Cambiazo, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez) para evaluar la tercera semana de actividades experimentales en la Universidad de Chile (Facultad de Ciencia Agronómicas).

10 de enero 2018

Reunión entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez) para evaluar la cuarta semana de actividades experimentales en la Universidad de Chile (Facultad de Ciencia Agronómicas).

17 de enero de 2018

Reunión entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez) para evaluar la quinta semana de actividades experimentales en la Universidad de Chile (Facultad de Ciencia Agronómicas).

18 de diciembre de 2017 al 7 de enero 2018

Dietas entregadas a los peces tres veces al día (9.00 h, 12.30 h y 16.00 h; Lunes a Sábado por Dr. Jurij Wacyk, Med. Vet. Pablo Salgado y/o Ing. Agr. Daniela Ortiz). El 7 de enero todos los peces mueren por falla eléctrica en el centro experimental.

22 de enero de 2018

Se reinicia el ensayo asociado al objetivo 1 del proyecto durante 30 días. Dietas entregadas a los peces tres veces al día (9.00 h, 12.30 h y 16.00 h; Lunes a Sábado por Dr. Jurij Wacyk, Med. Vet. Pablo Salgado y/o Ing. Agr. Daniela Ortiz y días Domingo por Lic. Biotecnología Ignacio Chávez).

30 de enero de 2018

Reunión entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Dra. Verónica Cambiazo, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez) para análisis y discusión de datos.

5 de febrero de 2018

Reunión entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Dra. Verónica Cambiazo, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez) para análisis y discusión de datos.

19 de febrero de 2018

Se incorpora el investigador Alexis Gaete (Ingeniero en Biotecnología) al grupo de trabajo para evaluar aspectos de sensibilidad microbiológica a deferiprona entre cepas de *P. salmonis*.

21 de febrero de 2018

Finalización del ensayo asociado al objetivo 1 del proyecto. Se realiza toma de muestras y análisis finales.

Se realiza reunión entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Dra. Verónica Cambiazo, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez) para análisis y discusión de datos. Se coordinan y comienzan a ejecutar los ensayos asociados al objetivo 2 del proyecto.

22 de febrero de 2018

Se inician las actividades de coordinación del objetivo 3 mediante una reunión con representantes de Aquadvice-Fundación Chile (Puerto Montt). Esta reunión se realiza entre Fernando Díaz Contreras y Nicolas Macaya de Aquadvice-Fundación Chile y Rodrigo Pulgar y Mario Caruffo de Universidad de Chile.

5 de marzo de 2018

Reunión entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Dra. Verónica Cambiazo, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez) para análisis y discusión de datos y para coordinar los siguientes objetivos del proyecto. Se incorpora

el investigador Máximo Coronado (ingeniero en Biotecnología, MSc) al grupo de trabajo para abordar aspectos asociados a los efectos secundarios del consumo del quelante en peces.

19 de marzo de 2018

Reunión entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez) Se realizan análisis y discusión de resultados asociados al objetivo 2. y se coordinan los siguientes objetivos del proyecto

21 de marzo de 2018. Luego de afinar aspectos técnicos y administrativos entre Aquadvice-Fundación Chile y Universidad de Chile se concertan condiciones para dar inicio a los ensayos en Puerto Montt. Esta reunión se realiza entre Fernando Díaz Contreras, Nicolas Macaya y Javier Alcaíno de Aquadvice-Fundación Chile y Rodrigo Pulgar y Mario Caruffo de Universidad de Chile.

26 de marzo de 2018.

Se incorpora al equipo de trabajo la investigadora Dra. Alejandra Lavanderos (Bioquímica) quien evaluará la posibilidad de incorporar aspectos de farmacocinética del quelante en peces, aspecto que no fue previamente incluido en este proyecto, pero por no estar a la fecha reportado y por la relevancia que podría tener conocer este aspecto nos resultó relevante.

30 de marzo de 2018.

Entrega del segundo informe de avance de resultados a Sernapesca.

5 de abril de 2018. **Reunión** por videoconferencia con Fernando Díaz, Nicolás Macaya, Javier Alcaíno de Aquadvice-Fundación Chile para coordinar aspectos logísticos de los ensayos de desafíos en Puerto Montt. En Santiago participan Mario Caruffo, Rodrigo Pulgar y Dinka Mandakovic.

18 de abril de 2018. **Reunión** entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Dra. Verónica Cambiazo, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez) para análisis y discusión de datos y para coordinar los siguientes objetivos del proyecto. Se incorpora la investigadora Madelaine Mejías (ingeniero en Biotecnología) al grupo de trabajo para apoyar en la toma de muestras en terreno durante los desafíos.

30 de abril de 2018. **Reunión** entre los investigadores del proyecto Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, y Rodrigo LLancabure y Nicolás Macaya de Aquadvice para definir detalles de la recepción y aclimatación inicial de los peces.

24 de mayo de 2018. Recepción de peces en las instalaciones de Aquadvice Quillaipe-Puerto Montt. Personal Aquadvice - Universidad de Chile.

28 de mayo de 2018. Inicio de la aclimatación de peces para LD50. Personal Aquadvice - Universidad de Chile.

13 de Junio de 2018. Reunión coordinación para análisis de datos y contingencias Dr. Rodrigo Pulgar y Dr. Mario Caruffo. Inicio de producción y análisis de dietas medicadas. Participan Pablo Salgado, Ignacio Chávez, Madelaine Mejías. Se incorpora al grupo de trabajo como apoyo técnico a la confección de dietas Francisca Vera (Estudiante de Biotecnología Molecular) y Liliana Montt (Ingeniera en Biotecnología Molecular) de la Universidad de Chile.

27 de junio de 2018. Muestreo y entrega de dietas medicadas, comienzo de dietas preventivas (Rodrigo Pulgar, Mario Caruffo, Ignacio Chávez)

9 de Julio 2018. Muestreo y entrega de dietas medicadas, comienzo de dietas tratamiento y desafío experimental SRS (Rodrigo Pulgar, Mario Caruffo, Ignacio Chávez)

13 de Julio de 2018. Muestreo (Rodrigo Pulgar, Mario Caruffo, Ignacio Chávez, Madelaine Mejías)

17-18 de Julio de 2018. Muestreo (Rodrigo Pulgar, Mario Caruffo, Ignacio Chávez, Madelaine Mejías)

25 de Julio de 2018. Muestreo (Rodrigo Pulgar, Mario Caruffo, Ignacio Chávez, Madelaine Mejías)

30 de julio de 2018.

Entrega del tercer informe de avance de resultados a Sernapesca

17 de agosto de 2018. **Reunión** entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Dr. Mario Caruffo, Dra. Dinka Mandakovic, Cambiazo, Med. Vet. Pablo Salgado, Ing. Agr. Daniela Ortiz, Lic. Biotecnología Ignacio Chávez, Madelaine Mejías (ingeniero en Biotecnología) para análisis y discusión de datos y para coordinar los siguientes objetivos del proyecto. Se incorpora la investigadora Javiera Pérez, Karina Díaz y Alejandro Castro (estudiantes de ingeniería en Biotecnología Molecular - Universidad de Chile) al grupo de trabajo para apoyar en los objetivos finales del proyecto.

3 de septiembre de 2018. **Reunión** entre los investigadores del proyecto Dr. Rodrigo Pulgar y Dr. Mario Caruffo (Universidad de Chile) y Rodrigo LLancabure y Nicolás Macaya (Aquadvice) para coordinar entrega de informe final por servicio de desafíos.

4 de septiembre de 2018. **Reunión** entre los investigadores del proyecto (Dr. Rodrigo Pulgar, Dr. Jurij Wacyk, Med. Vet. Pablo Salgado y Ing. Agr. Daniela Ortiz, en a cual se revisan resultados de la puesta a punto de las mediciones de parámetros plasmáticos en suero medidos en el equipo Wiener Lab CM 250 (Chemistry System, adquirido con el presente proyecto. Se valida su uso por comparación con los estándares descritos por Sernapesca.

15 de Octubre de 2018. **Reunión** entre todos los investigadores del proyecto para revisar estado de resultados de todos los sub-grupos de trabajo del proyecto.

29 de Noviembre de 2018. **Reunión** entre todos los investigadores del proyecto para revisar estado de resultados, discusión y conclusión de lo obtenido.

12 de diciembre de 2018. Presentación dictada por el Director del Proyecto (Rodrigo Pulgar) en Puerto Varas invitado por Sernapesca en el contexto del Seminario de Cierre "Un paso más para la Sustentabilidad" del PROGRAMA PARA LA GESTIÓN SANITARIA EN LA ACUICULTURA (PGSA).

31 de diciembre de 2018.

Entrega del cuarto informe de resultados a Sernapesca y entrega de informe final.

ACTIVIDADES Y RESULTADOS

Objetivo 1: Analizar la aceptabilidad, toxicidad y biodisponibilidad de dietas experimentales en salmones. Este objetivo considera las siguientes tres actividades.

1.1 Realizar diseño y producción de dietas experimentales.

En esta etapa se diseñaron y produjeron las dietas controles y experimentales (con quelante). Las dietas se diseñaron en función de composiciones basadas en fórmulas estándares utilizadas hoy en la industria salmonícola nacional (información confidencial) para el peso y talla de los peces con los que se experimentó. El quelante seleccionado para los ensayos fue **deferiprona** (DFP). Este quelante aprobado por la FDA para su uso en humanos (para tratar la intoxicación con hierro o para tratar condiciones de acumulación fisiológica del metal) ha mostrado una alta efectividad y seguridad en humanos. Su selección entre los tres quelantes aprobados para uso en humanos por la FDA [(deferoxamina (DFO), deferiprona (DFP) y deferasirox (DFX)] se debió a que es uno de los dos quelantes de uso oral, lo que permitiría hacer factible su uso como tratamiento en acuicultura, a través de su incorporación a la dieta, a diferencia de DFO (deferoxamina) cuya administración inyectable es incompatible con los manejos productivos en la industria salmonícola en la posología y formato de dosificación recomendada. Por otra parte, entre los quelantes orales deferiprona (DFP) y deferasirox (DFX)] el valor económico del quelante seleccionado es significativamente menor que deferasirox (al menos dos órdenes de magnitud) además que su disponibilidad industrial es significativamente mayor.

La selección de las concentraciones de **deferiprona** a utilizar se determinaron de acuerdo al arte previo, el cual establece que la concentración no tóxica y más eficaz en humanos (y otros animales) es de 75/100 mg/Kg/día. En la figura 1 y tabla 1 se muestran los resultados de farmacocinética de estudios con este fármaco en humanos y aves (animales endotermos). Tomando esto en consideración se generaron tres dietas experimentales para suministrar: 10 mg/Kg/día (baja-1); 50 mg/Kg/día (media-2); 100 mg/Kg/día (alta-3). Cada dieta experimental y controles se generaron en una versión encapsulada (E) y otra no encapsulada (NE), diseñando y produciendo así 8 dietas como se muestra en la tabla 1 y figura 2. Las dietas diseñadas y producidas no presentan diferencias macro estructurales.

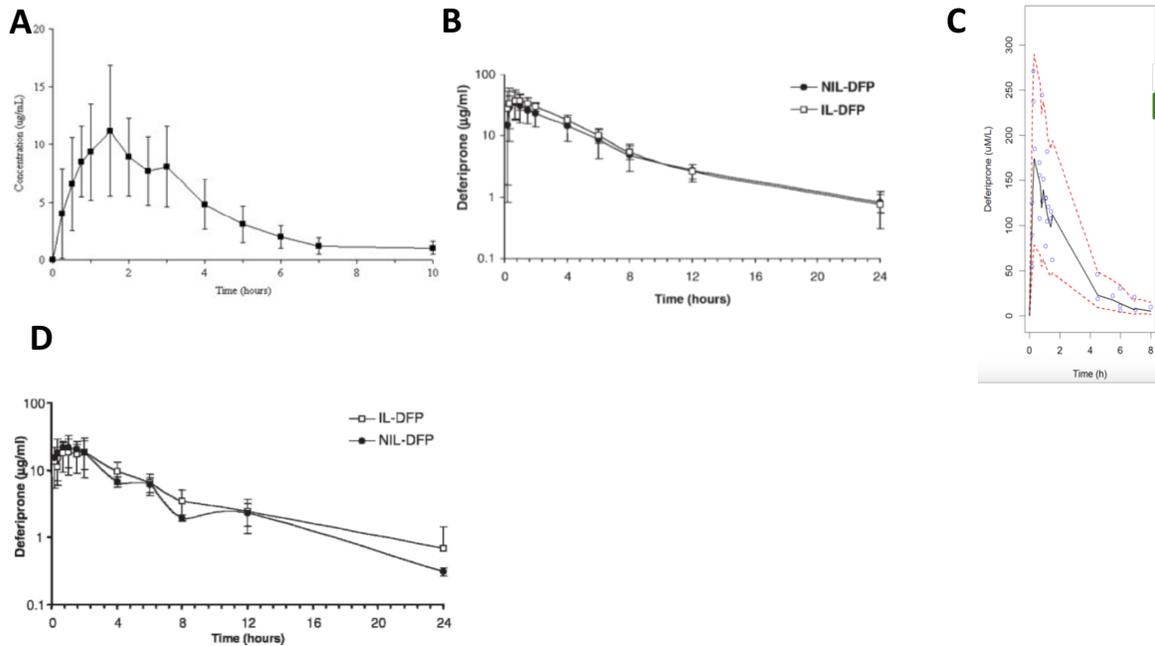


Figura 1. Estudios farmacocinéticos de deferiprona humanos y aves. Se utilizaron distintas concentraciones medias de deferiprona en plasma mediante administración oral en A) humanos (adultos); B) gallinas leghorn; C) humanos (niños); D) paloma.

Tabla 1. Estudio de farmacocinética comparada de deferiprona en diferentes especies, mediante administración oral en plasma. Tmax: Tiempo máximo; Cmax: Concentración máxima.

Concentración Deferiprona	Especie	Número de individuos	Tmax	Cmax	Referencia
80 mg/Kg	<i>Homo sapiens</i> (adulto)	6	1,8 h ± 0,9	12,8 ± 4,00 ug/ml	Song <i>et al.</i> , 2012
50 mg/Kg	<i>Gallus gallus domesticus</i>	20	55 min ± 25,93	36,18 ± 15,32 umol/L	Whiteside et al., 2007(a)
33 mg/ Kg	<i>Homo sapiens</i> (niños)	18	0,37 h ± 0,27	229,5 ± 179,7 umol/L	Bellanti., 2017
50 mg/Kg	<i>Columba livia</i>	20	77 min ± 29,46	21,46 ± 8,03 ug/ml	Whiteside et al., 2007(b)



Figura 2. Muestras representativas de dietas producidas (n=8) y deferiprona base (3-Hydroxy-1,2-dimethyl-4(1H)-pyridone)

Tabla 2. Composición y aporte nutritivo de las dietas empleadas en el ensayo.

Composición [1 Kg]	Quelante no encapsulado (NE)			Quelante encapsulado (EN)			Dietas control	
	Dieta NE 1	Dieta NE 2	Dieta NE 3	Dieta EN 1	Dieta EN 2	Dieta EN 3	Sin capsula	Con capsula
Trigo, harinilla (g)	466,9	466,9	466,9	466,9	466,9	466,9	466,9	466,9
Pescado, harina (g)	416,6	416,6	416,6	416,6	416,6	416,6	416,6	416,6
Pescado, aceite (g)	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5
Trigo, harina flor (g)	20	20	20	20	20	20	20	20
Vit-Min premix (g)	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
Vitamina C (g)	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
Antimicótico (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Aglomerante (g)	0	0	0	0	0	0	0	0
Deferiprona	(10 mg)	50 (mg)	100 (mg)	(10 mg)	50 (mg)	100 (mg)	0	0

La composición de las dietas utilizadas en el ensayo se describe en la tabla 2. Cabe destacar que la dosificación del quelante se realizó en relación al consumo promedio de peces por estanque considerando un 3% de su biomasa, de manera que cada grupo experimental recibió la dosis terapéutica se calculó teóricamente para 10, 50, 100 mg de deferiprona/Kg/día considerando máximo consumo, de esta manera nos aseguramos que se genere una terapéutica de masa, considerando el estanque como unidad experimental. Con estos resultados se da cumplimiento de la primera actividad del objetivo 1.

1.2 Realizar estudio de biodisponibilidad de las dietas experimentales.

La biodisponibilidad del quelante se evaluó de manera indirecta (como se indicó en el proyecto original) mediante la determinación de su efecto, esto es una disminución del contenido de hierro plasmático en peces mediante espectroscopia de fluorescencia de rayos-X por reflexión total (TXRF). Los ensayos de alimentación con el quelante comenzaron el lunes 18 de diciembre y se pretendían al 30 días de pruebas, sin embargo el día 20 (domingo 7 de enero) desde el inicio del ensayo se registró la mortalidad de todos los peces (controles y tratados), lo que se explicó por una falla eléctrica generalizada en el centro experimental y concomitante fallo de los sistemas de emergencia. Debido a esto, se reemplazó el sistema de emergencia eléctrico del centro experimental y se determinó tener un encargado del cuidado de los peces durante todos los días del ensayo (incluyendo los domingos). El día lunes 22 de enero se reiniciaron los ensayos por 30 días como se presupuestó inicialmente, realizando muestreos de sangre (para obtener plasma y medir el contenido de hierro) los días 1, 2, 8, 15 y 30 luego de iniciado el ensayo. El ensayo culmina exitosamente el día 21 de febrero de 2018.

Las formulaciones dietarias se evaluaron usando 40 peces por estanque distribuidos en ocho estanques independientes, uno por dieta. Al inicio del ensayo los peces promediaron un peso de $77,59 \pm 9,29$ g y una longitud de $18,30 \pm 0,88$ cm (tamaños menores a los del primer ensayo), los que fueron distribuidos de manera aleatoria con densidades iniciales que no superen los 20 kg/m³. De esta manera, se cumplen los requerimientos de la farmacopea europea en la evaluación de eficacia y seguridad de productos farmacológicos. Los ensayos se iniciaron utilizando tres diferentes concentraciones de deferiprona (10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg por día) en dos diferentes formatos de administración: deferiprona encapsulada en alginato y no encapsulada, las que fueron incluidas en la dieta en un modelo de doble ciego. Todos los parámetros de cultivo de salmónidos se midieron diariamente durante el ensayo y se mantuvieron dentro de los rangos sugeridos. Los valores promedio de temperatura y pH fue de 16,1 °C y 6,87 respectivamente.

La evaluación de la concentración de hierro en plasma se realizó mediante análisis de espectroscópica de fluorescencia de rayos-X por reflexión total (TXRF) en el INTA de la Universidad de Chile. Los resultados resumidos en la figura 3 indican que sólo la dieta 3, que contiene 100 mg de DFP/Kg/día produjo una disminución significativa del hierro plasmático respecto de la dieta control ya a los 8 días de tratamiento. No hubo diferencias significativas entre las versiones encapsuladas (EN) y no encapsuladas (NE) entre las dietas, indicando que la biodisponibilidad del quelante es adecuada en peces y no requiere de ser encapsulada para mejorar su biodisponibilidad. A pesar de no estar considerado en el diseño inicial, dado el efecto del quelante en los niveles plasmáticos de hierro de los peces y que no se han reportado parámetros farmacológicos de algún quelante de hierro en peces teleósteos (ni en poiquilótermos) hemos incorporado al equipo de trabajo a la Dra. Alejandra Lavanderos (Bioquímica) quien evaluará la factibilidad de determinar la farmacocinética del quelante en peces. Esta información permitiría medir directamente la biodisponibilidad del quelante en los peces. En la figura 4 se muestran espectros tipos de la determinación multielemental en plasma de peces por TXRF.

Con estos resultados se da cumplimiento de la segunda actividad del objetivo 1.

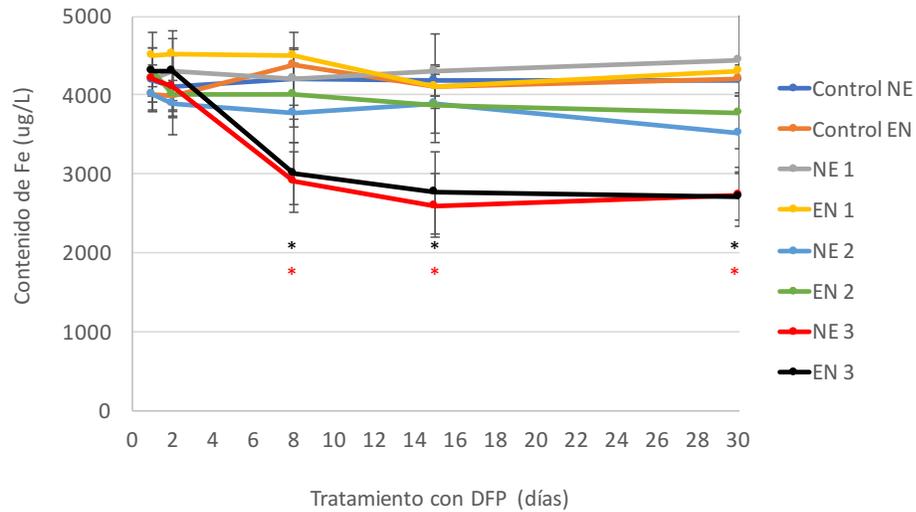


Figura 3. Biodisponibilidad de deferiprona. Se determinó la biodisponibilidad de deferiprona mediante la medición de su capacidad de disminuir el contenido plasmático de hierro. La medición del contenido plasmático de hierro se realizó mediante análisis en TXRF. Se tomaron muestras de al menos tres peces de cada estanque los días 1, 2, 8, 15 y 30 luego de iniciado el ensayo y cada muestra fue medida tres veces. Cada punto representa el promedio de las mediciones con su respectiva desviación estándar. (*) ANOVA de dos vías $p < 0,05$.

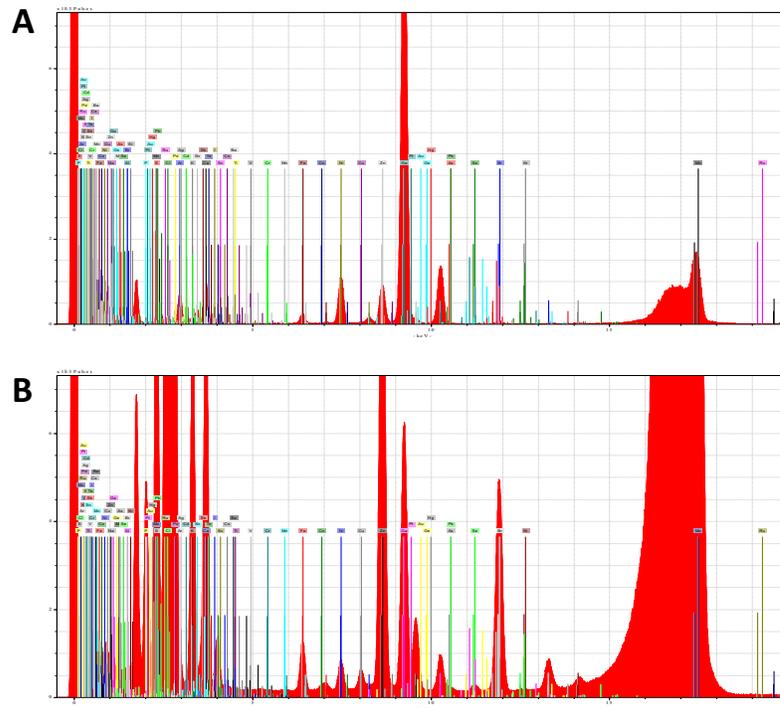


Figura 4. Espectros tipo de multielementos por TXRF. Cada pico (rojo) representa un elemento en la muestra y el área bajo la curva su abundancia. En A, se muestra un espectro característico del disolvente de las muestras (agua ultrapura), mientras que en B, se muestra un espectro representativo de la abundancia elemental del plasma de los peces.

1.3 Realizar estudio de aceptabilidad, toxicidad y efecto de las dietas sobre el contenido de hierro en salmones

Usando el mismo ensayo anterior se evaluó la aceptabilidad y seguridad (toxicidad) de las dietas con la diferentes concentraciones de deferiprona y usando la vías de administración encapsulada, no encapsulada y sus controles.

a) Aceptabilidad. Con el objetivo de determinar si la adición de quelante en la dieta modifica la aceptabilidad de esta, se evaluó el consumo durante el transcurso del ensayo, los peces se alimentaron al 3% en relación a su peso vivo. La inspección visual de los encargados de la alimentación de los peces indican que no se observaron diferencias cualitativas en la aceptación de las dietas (no hubo regurgitación de los pellets), lo cual se corroboró mediante la medición del consumo. Para esto se pesó diariamente la dosis de alimento entregado por estanque en tres reparticiones ((9.00 h, 12.30 h y 16.00 h) diarias. Posteriormente se recuperaba el alimento no consumido (despiche) para calcular el consumo por estanque. Los resultados indican que el consumo máximo fue de 75,3% y el consumo mínimo fue de 67,1%, sin embargo no existen diferencias significativas en el consumo entre peces alimentados con dietas suplementadas con quelante ni respecto a peces alimentados sin suplemento de deferiprona. Es relevante destacar que la concentración más alta de quelante suplementado en la dieta (dieta 3, 100 mg de DFP/Kg), que genera una disminución significativa de hierro plasmático en los peces, no presenta diferencias significativas de consumo respecto de la dieta control, aspecto deseable en su contexto de elemento dietario preventivo/terapéutico. No obstante, cabe destacar que estos resultados nos han permitido definir que la ración debe ser calculada considerando un menor porcentaje de peso vivo (1,5-2%) para promover así un mayor de consumo durante los desafíos con *P. salmonis*. Este resultado destaca la relevancia de los ensayos pilotos realizados durante la primera etapa del proyecto.

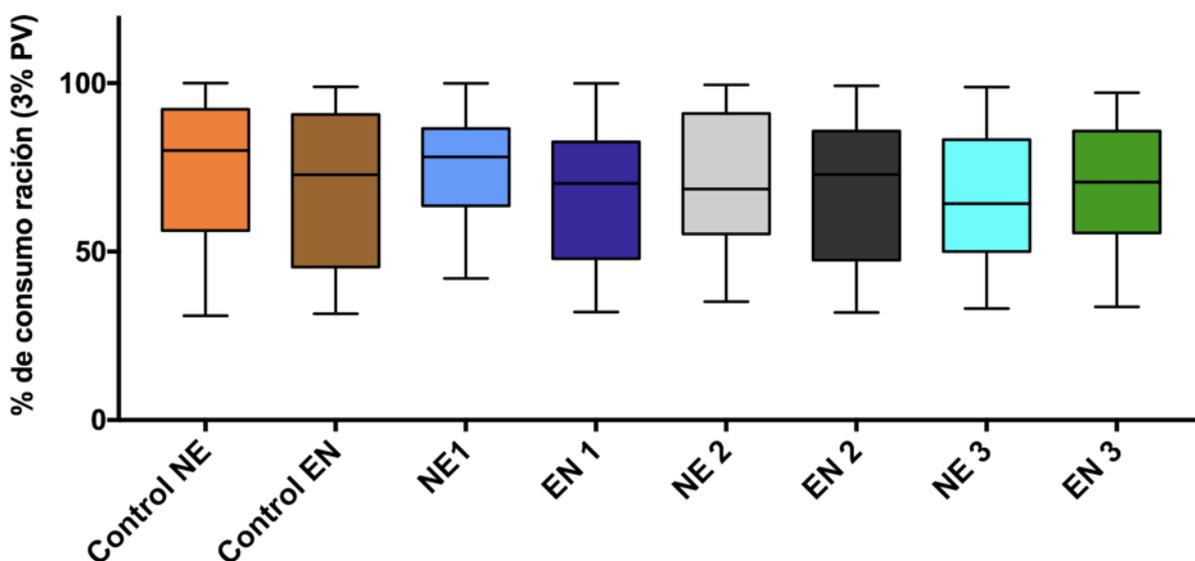


Figura 5. Aceptabilidad de la dieta con quelante. Las dietas suplementadas con diferentes concentraciones de quelantes 10 mg/Kg (dieta 1), 50 mg/Kg (dieta 2) o 100 mg/Kg (dieta 3) no presentan diferencias de consumo en relación al control ni entre ellas. Las columnas representan el promedio de consumo durante el ensayo y las barras la desviación estándar. ANOVA de dos vías $p < 0,05$.

b) Toxicidad. Durante el transcurso del ensayo se registraron cinco mortalidades, uno pez en el grupo control NE, uno pez en el grupo control EN, dos peces en el grupo EN 1 y un pez en el grupo EN 2 como se muestra en la figura 6. Estas mortalidades se

observaron de manera azarosa entre tipos de dieta (suplementada y no con quelante) y formato de entrega (encapsulado y no encapsulado) y se explicaron principalmente por aspectos de accidentales de manejo (caídas) y no guardaron relación con el uso de los quelantes en la dieta. Así entonces, el quelante no mostró efectos sobre la mortalidad de los peces en ninguna de sus concentraciones ni formatos de entrega. Más allá de la mortalidad, con el objetivo de evaluar el posible efecto tóxico del quelante en los peces, al final del ensayo se realizaron necropsias de todos los individuos. No se evidenciaron lesiones macroscópicas que hicieran sospechar que la administración del quelante en la dieta, en todas las concentraciones y formatos ensayados, haya generado un efecto tóxico en los individuos. El resto de los peces se encontraban clínicamente sanos y todos presentaban presencia de alimento a nivel gastrointestinal, indicando que se alimentaron normalmente hasta el final del ensayo (30 días). En la figura 7 se muestran imágenes representativas de las necropsias realizadas a todos los peces muestreados al final del ensayo. Tanto los individuos tratados como los controles se encontraron clínicamente sanos y sólo un individuo del grupo que consumió 10 mg DFP/Kg/día mostró branquias pálidas y signología asociada a anemia, sin embargo al ser un caso aislado no representó a su grupo experimental. Estos resultados en su conjunto indican que el quelante en las concentraciones suplementadas y en los formatos de entrega (tres dosis diarias, encapsuladas y no encapsuladas) no son tóxicas y son seguras como potencial estrategia preventiva/terapéutica en peces.

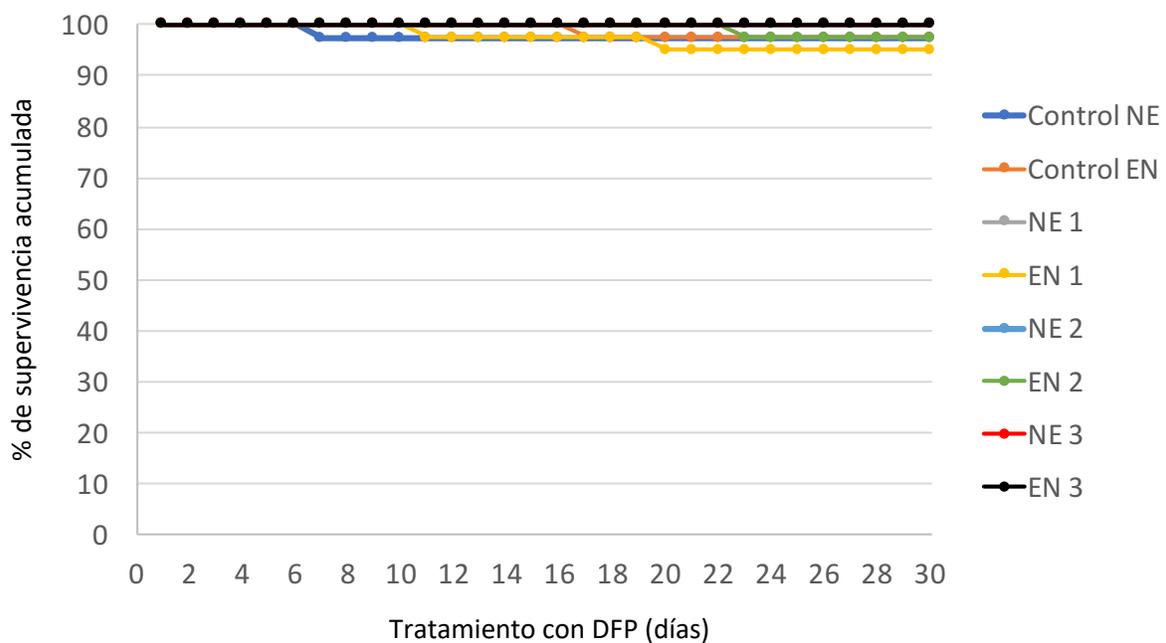


Figura 6. Curva de porcentaje de supervivencia. Curvas de supervivencia acumulada de las diferentes dietas con deferiprona encapsulada EN1: 10 mg/Kg, EN2: 50 mg/Kg, EN3: 100 mg/Kg y deferiprona no encapsulada, NE1: 10 mg/Kg, NE2: 50 mg/Kg, NE3: 100 mg/Kg. No existen diferencias significativas entre los tratamientos y sus respectivos controles ($P > 0,05$ Log-rank Test). Las curvas muestran la mortalidad cuantificada diariamente de los diferentes tratamientos y controles durante el transcurso del ensayo. Las mortalidades registradas no guardan relación con la suplementación del quelante en la dieta.

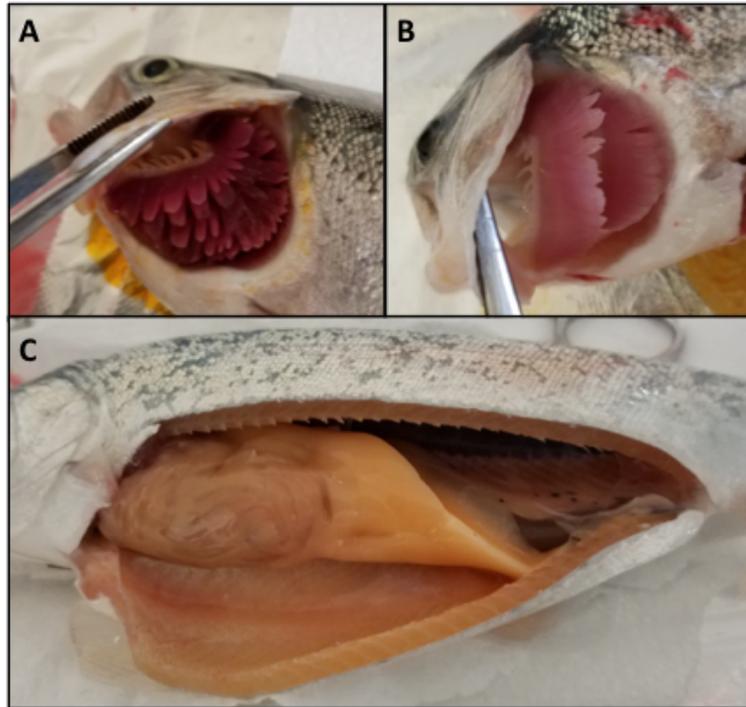


Figura 7. El uso de deferiprona en la dieta no muestra efectos adversos a la necropsia. Imágenes representativas de las necropsias realizadas a todos los individuos al final del ensayo. En A, región cefálica indicando branquias rojas y macroscópicamente sanas. En B, región cefálica indicando las branquias pálidas, compatible con anemia y C, cavidad celomática en la que no se observan alteraciones en los órganos internos.

c) Efecto de las dietas sobre el contenido de hierro en salmones. Con el objetivo de determinar si las dietas suplementadas con quelante tuvieron un efecto sobre el contenido de hierro en los tejidos de los peces al final del ensayo (día 30), además de medir el contenido de hierro en plasma (figura 3) se midió el contenido de hierro en riñón, bazo y corazón, por ser los dos primeros blancos principales de infección de *P. salmonis* y el tercero un órgano clásico de estudio del efecto de deferiprona sobre el contenido del metal. Los resultados (tabla 3 y figura 8) indican que el tratamiento con 100 mg/Kg/día de deferiprona produjo una disminución significativa en el contenido de hierro tisular en los tres órganos estudiados los 30 días de ensayo independiente de la presencia de cápsula. Interesantemente, en la tabla 3 se muestra que la disminución significativa en el contenido de hierro asociada a la actividad de deferiprona es específica para este metal en riñón (también en los otros órganos, datos no mostrados), puesto que otros elementos medidos concomitantemente en las mismas muestras no muestran variaciones significativas, destacando así la especificidad del quelante seleccionado. Estos resultados en su conjunto indican que el quelante en las concentraciones suplementadas y en los formatos de entrega (tres dosis diarias, encapsuladas y no encapsuladas) no son tóxicas y son seguras como potencial estrategia preventiva/terapéutica en peces. Adicionalmente, la concentración de 100 mg/Kg/día de deferiprona genera el efecto deseado independiente de su formato encapsulado o no encapsulado. Por esta razón, se seleccionó esta dosis en su formato no encapsulado (NE 3) como dieta de tratamiento y su respectivo control para los siguientes ensayos. Con estos resultados se da cumplimiento de la tercera y última actividad del objetivo 1.

Tabla 3. Medición multielemental en TXRF de riñón proximal de peces sometidos a dietas suplementadas y no suplementadas con deferiprona, encapsulado y no encapsulado. En celeste se destaca el contenido de hierro. Sólo las dietas NE3 y EN3 mostraron una disminución significativa en el contenido de hierro renal respecto de las otras dietas NE y EN (incluyendo controles), respectivamente. ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

Riñón	Control NE		NE 1		NE 2		NE 3	
	Promedio	Desviación estándar						
Br	0,015	0,003	0,012	0,002	0,013	0,002	0,014	0,002
Ca	0,294	0,050	0,217	0,004	0,256	0,030	0,312	0,085
Cl	3,450	0,794	4,147	0,511	3,798	0,814	3,783	0,320
Cu	0,004	0,001	0,005	0,001	0,005	0,001	0,003	0,000
Fe	0,355	0,073	0,337	0,091	0,289	0,076	0,144	0,035
K	12,309	2,128	11,987	1,119	12,148	2,008	11,028	1,489
Na	18,252	3,270	18,777	2,968	19,115	2,220	17,929	2,343
P	9,215	1,600	9,339	0,901	9,077	1,830	8,699	1,066
Se	0,004	0,001	0,004	0,001	0,004	0,001	0,003	0,000
Zn	0,117	0,020	0,131	0,031	0,128	0,030	0,114	0,013

Riñón	Control EN		EN 1		EN 2		EN 3	
	Promedio	Desviación estándar						
Br	0,014	0,002	0,013	0,002	0,012	0,003	0,013	0,002
Ca	0,275	0,004	0,303	0,075	0,236	0,049	0,333	0,085
Cl	3,624	0,511	3,726	0,332	3,773	0,940	3,829	0,320
Cu	0,004	0,001	0,004	0,001	0,005	0,001	0,004	0,000
Fe	0,322	0,091	0,350	0,030	0,333	0,073	0,156	0,035
K	12,228	1,119	11,668	1,442	12,067	2,128	11,118	1,489
Na	18,683	2,968	18,190	2,328	18,946	3,157	17,929	2,343
P	9,146	0,901	8,957	1,198	9,208	1,571	8,989	1,066
Se	0,004	0,001	0,003	0,000	0,004	0,001	0,004	0,001
Zn	0,122	0,031	0,115	0,013	0,129	0,005	0,121	0,013

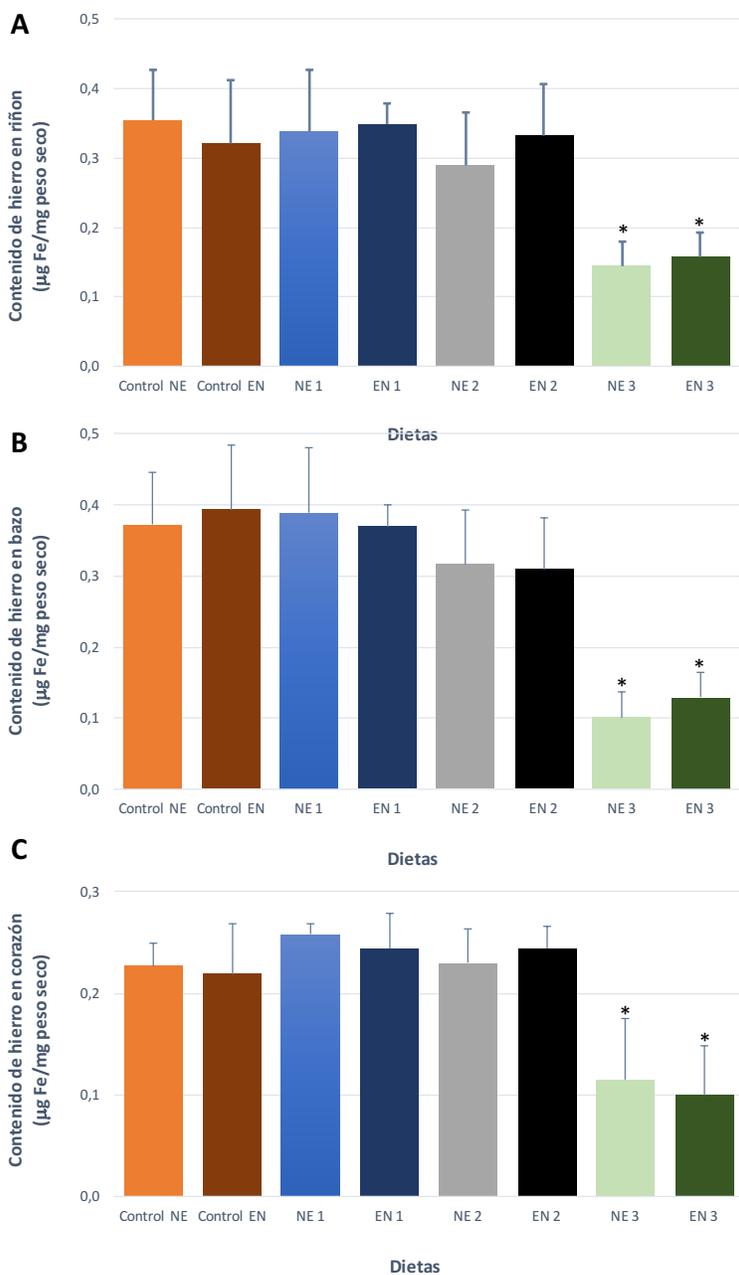


Figura 8. Contenido de hierro en órganos de peces alimentados con las diferentes dietas experimentales. La medición del contenido plasmático de hierro se realizó mediante análisis en TXRF a finalizar los 30 días de alimentación. Se tomaron muestras de al menos tres peces de cada estanque y cada muestra fue medida tres veces. Cada columna representa el promedio de las mediciones con su respectiva desviación estándar en riñón (A), bazo (B) y corazón (C). La dietas suplementadas con 100 mg/Kg (NE 3 y EN 3) mostraron una disminución significativa del contenido de hierro respecto de la condición control independientemente de su formulación encapsulada o no encapsulada en todos los órganos analizados. Concentraciones menores de quelante en la dieta no mostraron diferencias significativas respecto del control ni entre formatos de entrega. (*) ANOVA de dos vías $p < 0,05$.

Objetivo 2: Caracterización de las dietas experimentales de mejor aceptabilidad y biodisponibilidad en salmones.

2.1 Producir y realizar análisis proximal de las dietas seleccionadas. Con el objetivo de caracterizar la línea de base de las dietas seleccionadas para los futuros ensayos se realizó un análisis proximal de la dieta suplementada con 100 mg (NE 3) y su respectivo control NE. Los resultados expresados en base al peso seco de los pellets se resumen en la tabla 4. Como se esperaba, el suplemento con deferiprona en las concentraciones indicadas no genera variaciones en la abundancia de las macromoléculas y características proximales medidas entre las dietas. A pesar de lo anterior, al ser el análisis proximal un ensayo general de caracterización de dietas, nos propusimos profundizar en la caracterización de las posibles variaciones que el suplemento con el quelante pueda generar en las dietas. Para esto se realizaron análisis para conocer los perfiles completos de aminoácidos (tabla 5) y ácidos grasos en las dietas (tabla 6) de las dietas. El perfil aminoacídico muestra la presencia de todos los aminoácidos monitoreados en abundancias relativas diferenciales pero sin diferencias significativas entre dietas. Del mismo modo, el perfil lipídico muestra la presencia de ácidos grasos de entre 14 y 29 carbonos, destacando la presencia de ácidos grasos omega 3 y sin diferencias entre las dietas.

2.2 Determinar contenido de metales por TXRF en las dietas para caracterizar la línea de base. Con el objetivo de caracterizar la línea de base de las dietas seleccionadas para los futuros ensayos se realizó un análisis de la abundancia de minerales de la dieta suplementada con 100 mg (NE 3) y su respectivo control NE. Los resultados expresados en base al peso seco de los pellets se resumen en la figura 9. Los resultados indican la presencia de los microminerales bromo, cobre, hierro, selenio y cinc en ambas dietas, sin diferencias significativas en abundancia entre ellas. Del mismo modo, se detectó la presencia de los macrominerales calcio, cloro, potasio, sodio y fósforo en ambas dietas, sin diferencias significativas de abundancia entre ellas.

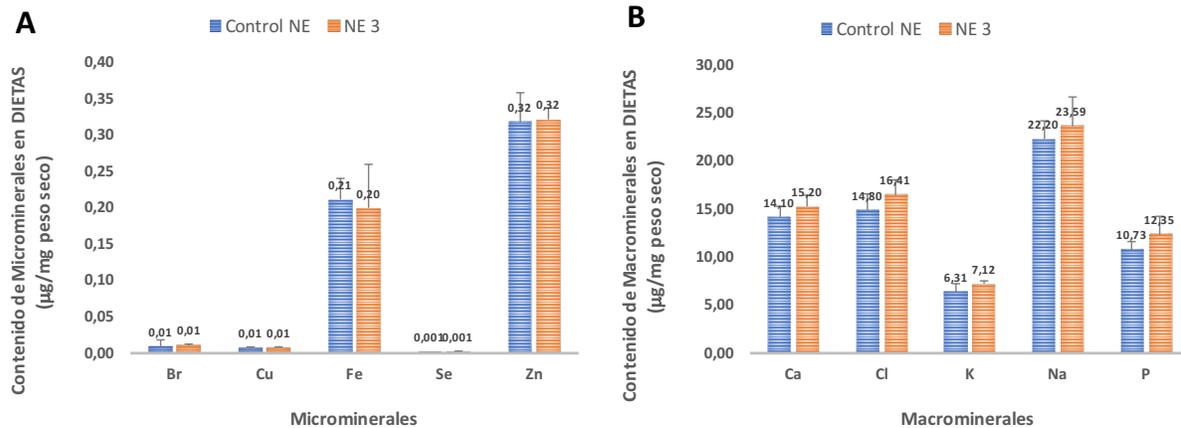


Figura 9. Contenido de micro y macrominerales en dietas experimentales seleccionadas. La medición del contenido de micro (A) y macrominerales (B) en las dietas NE 3 y su respectivo control se realizó mediante análisis en TXRF. Las columnas representan el promedio de la abundancia de los minerales y cada una de las dietas y las barras la desviación estándar. No existen diferencias significativas en minerales entre las dietas. Estos resultados en su conjunto indican que además de la suplementación de deferiprona en la dieta NE 3 no existen diferencias significativas en ninguno de los factores de basales medidos. Con estos resultados se da cumplimiento al objetivo 2 del proyecto.

Tabla 4. Análisis proximal de las dietas seleccionados para los ensayos de desafío con *P. salmonis*.

	Dieta control NE	Dieta 100 mg/Kg (NE 3)
Proteína cruda	48,60	48,70
Humedad	7,20	7,00
Grasa cruda	22,00	21,80
Fibra cruda	0,65	0,69
Ceniza	10,70	10,35

Tabla 5. Perfil aminoacídico de las dietas seleccionados para los ensayos de desafío con *P. salmonis*.

Aminoácidos	Dieta control NE	Dieta 100 mg/Kg (NE 3)
Taurine	0,62	0,62
Hydroxyproline	0,45	0,43
Aspartic Acid	4,17	4,15
Threonine	2,05	2,04
Serine	1,85	1,82
Glutamic Acid	6,55	6,58
Proline	2,20	2,18
Lanthionine	0,03	0,01
Glycine	2,95	2,98
Alanine	2,95	2,93
Cysteine	0,43	0,45
Valine	2,33	2,30
Methionine	1,62	1,65
Isoleucine	2,04	2,02
Leucine	3,70	3,74
Tyrosine	1,69	1,68
Phenylalanine	1,99	2,00
Hydroxylysine	0,08	0,05
Ornithine	0,25	0,24
Lysine	3,78	3,80
Histidine	1,38	1,36
Arginine	2,81	2,81
Tryptophan	0,64	0,65
Total	46,52	46,49

Tabla 6. Perfil lipídico de las dietas seleccionados para los ensayos de desafío con *P. salmonis*. Ácidos grasos tipo Omega-3 están destacados en azul negrita.

Ácido graso	Dieta control NE	Dieta 100 mg/Kg (NE 3)
Myristic (14:0)	7,82	7,73
Myristoleic (9c-14:1)	0,07	0,05
C15:0	0,48	0,44
C15:1n5	0,00	0,00
Palmitic (16:0)	22,42	22,40
Palmitoleic (9c-16:1)	8,13	8,12
Margaric (17:0)	0,32	0,30
10c-17:1	0,05	0,03
Stearic (18:0)	3,85	3,82
Elaidic (9t-18:1)	0,16	0,15
Oleic (9c-18:1)	11,93	11,90
Vaccenic (11c-18:1)	3,11	3,10
Linoelaidic (18:2t)	0,01	0,00
Linoleic (18:2n6)	2,24	2,23
Linolenic (18:3n3)	0,43	0,43
g-Linolenic [C18:3n6]	0,00	0,00
Stearidonic (18:4n3)	0,00	0,00
Arachidic (20:0)	0,54	0,52
Gonodic (20:1n9)	0,30	0,29
C20:2	1,82	1,81
Homo-a-linolenic(20:3n3)	0,09	0,09
Arachidonic [20:4n6]	1,26	1,25
3n-Arachidonic (20:4n3)	0,60	0,60
EPA (20:5n3)	13,75	13,70
Behenoic (22:0)	0,21	0,20
Erucic [22:1n9]	0,31	0,31
C22:2n6	0,32	0,31
Adrenic [C22:4n6]	0,00	0,00
Clupanodonic (22:5n3)	2,10	2,05
DHA (22:6n3)	7,06	7,00
Lignoceric (24:0)	0,13	0,12
Nervonic (24:1n9)	0,47	0,45

Con estos resultados, se dio inicio al tercer objetivo del proyecto, el cual contempló alimentar peces con la dieta NE 3 y su control para evaluar su efecto sobre la infección con *P. salmonis*.

En la figura 9 se muestran las instalaciones del laboratorio de biotecnología en acuicultura de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, donde se realizan los ensayos descritos en condiciones controladas. Se muestran también una muestra representativa de las dietas y peces que son parte del estudio.

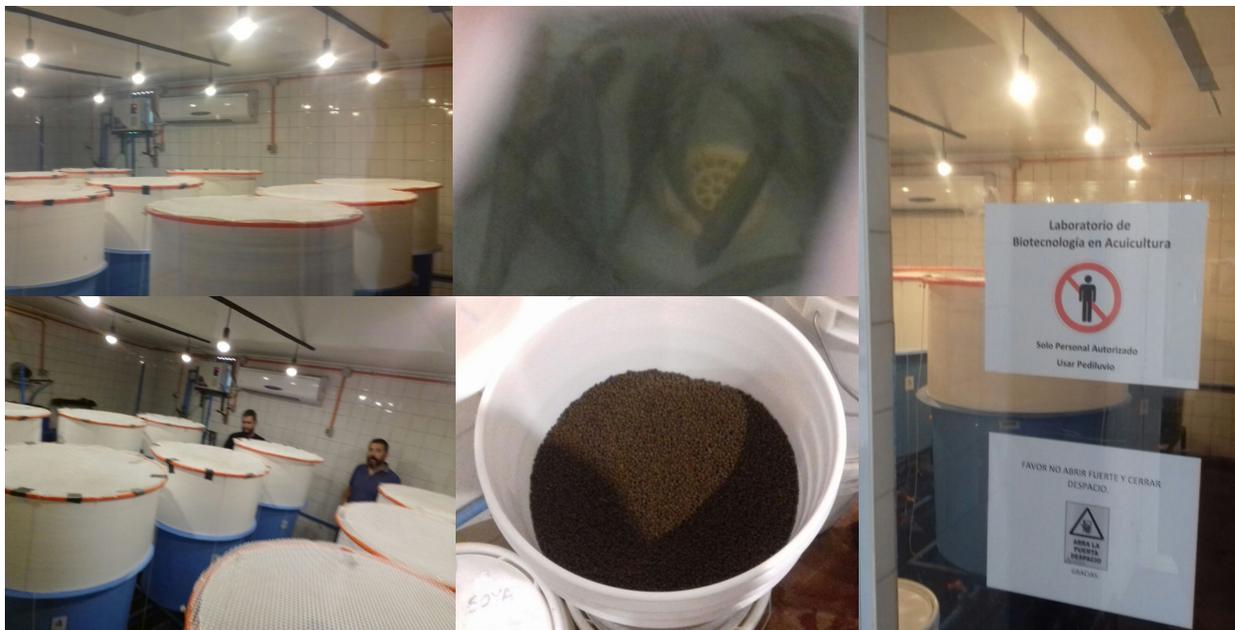


Figura 9. Imágenes representativas de las instalaciones y el equipo en operación.

Objetivo 3. Determinación de la efectividad de las dietas sobre la mortalidad de salmónidos infectados experimentalmente con *Piscirickettsia salmonis*.

3.1 Formulación de dietas medicadas y protocolo de administración

Los peces fueron recibidos en Aquadvisé-Fundación Chile (Quillaipe, región de Los Lagos) desde la Piscicultura Catripulli (Hendrix Genetics) y distribuidos en 6 estanques de 1 m³, con 320 peces sanos cada uno (1920 peces totales). Los peces pasaron por un periodo de aclimatación y evaluación de 29 días, periodo en el cual además se aumentó gradualmente la salinidad del agua, con el objetivo de realizar el desafío contra *Piscirickettsia salmonis* en agua de mar, que es donde se producen los brotes de SRS. Durante este periodo la temperatura del agua fue de $10,57 \pm 1,1$ °C y la saturación de oxígeno $103,9 \pm 4$ %. El peso promedio de los peces al momento de su recepción fue de 57,6 g.

Las dietas medicadas fueron preparadas por el grupo de investigadores (no externalizada) en dependencias del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (Macul, Santiago). Las dietas fueron preparadas del mismo modo como se formularon las dietas para la evaluación de seguridad del objetivo 2 y fueron entregadas a los peces en base al 1% de su peso vivo día durante todo el transcurso del ensayo en tres horarios, 9:00h, 12:00h y 15:00h por operarios de Aquadvisé-Fundación Chile.

Como se definió anteriormente y mostró en los informes anteriores, se seleccionó la dosis de 100 mg/Kg/día de deferiprona (DFP) para los ensayos de determinación de efectividad de estas dietas sobre la supervivencia/mortalidad de salmónidos infectados con *Piscirickettsia salmonis* (ensayos de protección dietaria) ya que de las tres dosis probadas (10, 50 y 100 mg/Kg/día DFP) fue la que mostró la mayor efectividad en reducir el hierro plasmático en el periodo analizado, sin mostrar efectos deletéreos en los peces. Adicionalmente, como observación al segundo informe los revisores sugirieron incluir una segunda dosis de dieta medicada dentro del ensayo (ver informe 2), aspecto que fue incluido en esta etapa, manteniendo la dieta de 100 mg/Kg/día e incluyendo una nueva dieta con una nueva concentración de DFP. Como 100 mg/Kg/día no mostró rasgos de

toxicidad en los peces en los ensayos preliminares, nuestra primera aproximación fue aumentar la dosis de quelante a 200 mg/Kg/día y hacer un ensayo piloto de tolerancia en un subconjunto de peces de la cohorte a utilizar para los ensayos de desafíos. Sorpresivamente, esta nueva concentración presentó dos problemas, una baja capacidad de incorporación a pellet y una limitada aceptabilidad de los peces a esta dieta, encontrándose consumos promedios menores al 10% en el periodo evaluado que terminó al día 5 de iniciada la prueba piloto. Similares resultados se observaron para la dosis de 150 mg/Kg/día. Interesantemente, estos resultados indican que las dosis máximas de seguridad sugeridas por la FDA para consumo humano (100 mg/Kg/día) se encuentran cercanas a los límites de aceptabilidad (tolerancia)/seguridad también para los peces salmónidos. Dado estos resultados y considerando que los datos preliminares (informe 2) mostraron que la dosis de 50 mg/Kg/día de DFP era tolerada y segura al mismo nivel que la dieta de 100 mg/Kg/día, sin efectos sobre la mortalidad de los peces, y que su uso correlacionó con caídas promedio en el hierro plasmáticos y tisulares respecto los peces alimentados con dieta control, decidimos probar esta segunda concentración para los ensayos de desafío con *Piscirickettsia salmonis*. Cabe señalar si bien la disminución en el promedio plasmático y tisular de hierro en peces alimentados con 50 mg/Kg/día de DFP mostraban tendencias claras a la baja, éstas no fueron estadísticamente significativas respecto de la condición control. Sin embargo, observamos que esto se explicó por la alta variabilidad biológica de la respuesta en la cohorte utilizada y por el número de peces usados. En este nuevo ensayo, con un número significativamente mayor de peces, se optó por elegir esta concentración ya que se aleja de los límites de baja aceptabilidad/seguridad que se describe en esta etapa para los peces en agua de mar. En conclusión, para abordar el objetivo propuesto se decidió utilizar tres dietas: dieta control (0 mg/Kg/día DFP), dieta 1 (50 mg/Kg/día DFP) y dieta 2 (100 mg/Kg/día DFP). Además, cómo se propuso también estas dietas se suministrarían antes y después del desafío con *Piscirickettsia salmonis*, generando las condiciones de protocolo preventivo (pre-tratamiento o crónico) y protocolo de tratamiento (tratamiento o agudo), respectivamente. Un esquema del diseño se muestra en la figura 10.



Figura 10. Diagrama de los esquemas de administración de deferiprona utilizados. Protocolo preventivo: las dietas medicadas son suministradas 11 días antes del desafío y hasta el final de este (30 días post-infección). Protocolo tratamiento: las dietas medicadas son suministradas el mismo día del desafío y hasta el final de este (30 días post-infección).

seleccionada de *P. salmonis*. Un día después de la inoculación se da comienzo del protocolo de administración tratamiento y reanudación de la entrega de dieta medicada a los grupos del protocolo preventivo, quedando el diagrama del ensayo según lo descrito en la (Figura 10). El desafío se llevó a cabo en las dependencias de Aquadivise-Fundación Chile mediante inoculación intraperitoneal con 0,1 mL de inóculo (10^5 TCID₅₀/mL) con la misma cepa ensayada en el ensayo de DL₅₀. Los peces fueron trasladados a 24 estanques de 180 L con 70 peces cada uno, quedando separados físicamente los grupos desafiados de los no desafiados (controles) en dos salas independientes con una temperatura del agua de $14,71 \pm 0,3$ y porcentaje de saturación de oxígeno de $103,8 \pm 3,8$. Los peces fueron distribuidos en los estanques asegurándose de que no existieran diferencias significativas en peso ni tamaño al momento de ser desafiados. Un grupo de estanques (azules) fueron utilizado exclusivamente para seguir la mortalidad para los peces alimentados con las diferentes dietas, mientras que otro grupos de estanques (verdes) fueron utilizados para tomar las muestras y hacer los análisis asociados a los futuros objetivos del proyecto.

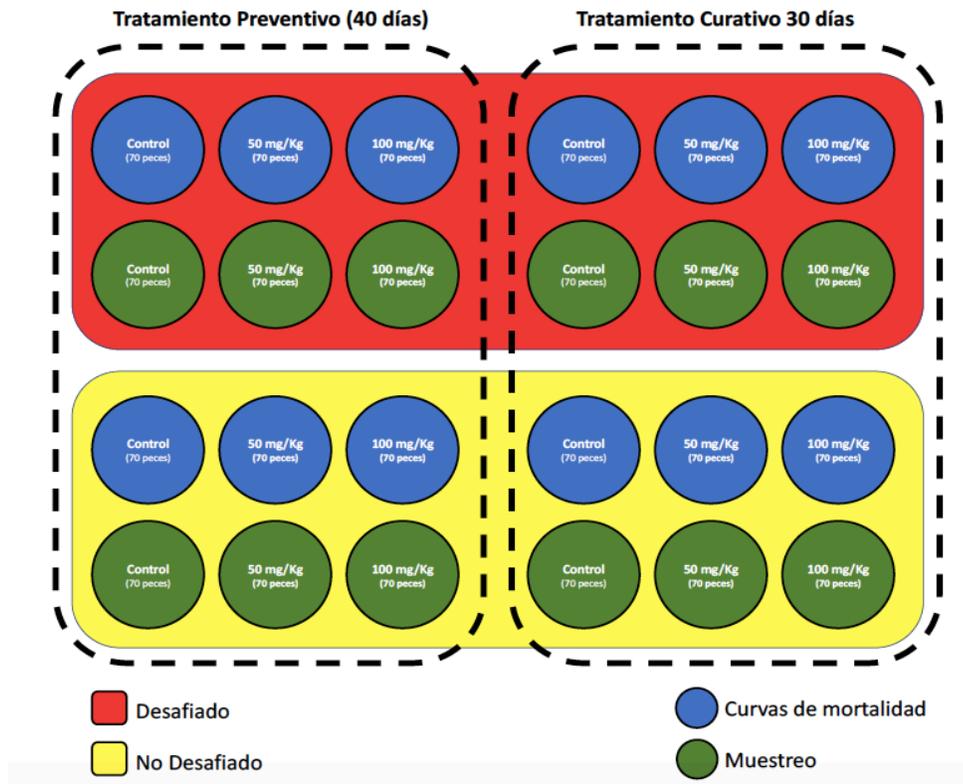


Figura 12. Diseño experimental

Para evaluar el efecto del quelante sobre la supervivencia de los peces se dejaron estanques exclusivos sin muestrear con el objetivo de no afectar las densidades ni estresar a los peces por manejo a lo largo del ensayo, puesto que se ha descrito inmunosupresión asociado a esta práctica. De similar manera se asignaron estanques exclusivos de muestreo con el objetivo de determinar parámetros que permitan explicar las potenciales diferencias en las curvas de mortalidad asociadas al consumo diferencial de DFP. Se definieron 6 puntos de muestreo distribuidos a lo largo de la curva de supervivencia/mortalidad (tomando como referencia los resultados preliminares obtenidos en el DL₅₀) para poder caracterizar la infección en la fase de latencia, exponencial y estacionaria. En cada proceso de muestreo se tomaron al menos 5 peces por estanque tanto del grupo desafiado como no desafiado (60 peces por punto de muestreo) y a cada pez se le extrajo un total de 10 muestras: Sangre (plasma y elementos figurados), hígado, bazo, corazón, riñón anterior, estómago, ciegos pilóricos, intestino y contenido intestinal, obteniendo un total de 600 muestras por cada punto de muestreo. Al ser 6 puntos de muestreos durante la curva de mortalidad y 600 muestras por evento,

se completarán alrededor de 3600 muestras más aquellas asociadas a los puntos de caracterización inicial de la población de peces.

Puesto que se está descrito que la infección con *P. salmonis* produce anorexia y que eventualmente los peces podría no comer todo la dieta medicada, consideramos relevante controlar el consumo diario de alimento para todas las condiciones mediante la medición de la masa del alimento no consumido (despiche). Los resultados de consumo que se muestran en la Figura 4 indican que al quinto día post-desafío los peces controles infectados estaban consumiendo un 100% de la dieta no medicada, mientras que los peces que consumían dieta medicada lo hacían en un 78% para la dieta 1 preventivo, 91% para dieta 1 tratamiento, 74% para dieta 2 preventivo y 87% para dieta 2 tratamiento. Si bien estos valores estuvieron acorde a nuestros datos previos con el objetivo que el ensayo se realizara en condiciones isoenergéticas entre los grupos, a partir del día 6 post-infección modificamos el esquema de entrega de la dieta medicada en dos raciones (09:00 y 12:00), dejando una tercera ración para complementar el alimento medicado no consumido con dieta control (15:00), mejorando así el consumo total de alimento (Figura 13). De esta manera, el consumo de dieta total para el periodo fue de $96,7 \pm 8,5$ % para la dieta control, $79,2 \pm 19,7$ % para la dieta 1 preventivo, $87,1 \pm 8,5$ para dieta 1 tratamiento, $77,2 \pm 19,9$ para dieta 2 preventivo y $84,15 \pm 9,2$ para dieta 2 tratamiento, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ni entre el control y las dietas tratamiento. Todos los resultados que se muestran son los consolidados y revisados hasta el día 18 post-inoculación (18 dpi) correspondiente a la fecha calendario 26 de Julio de 2018.

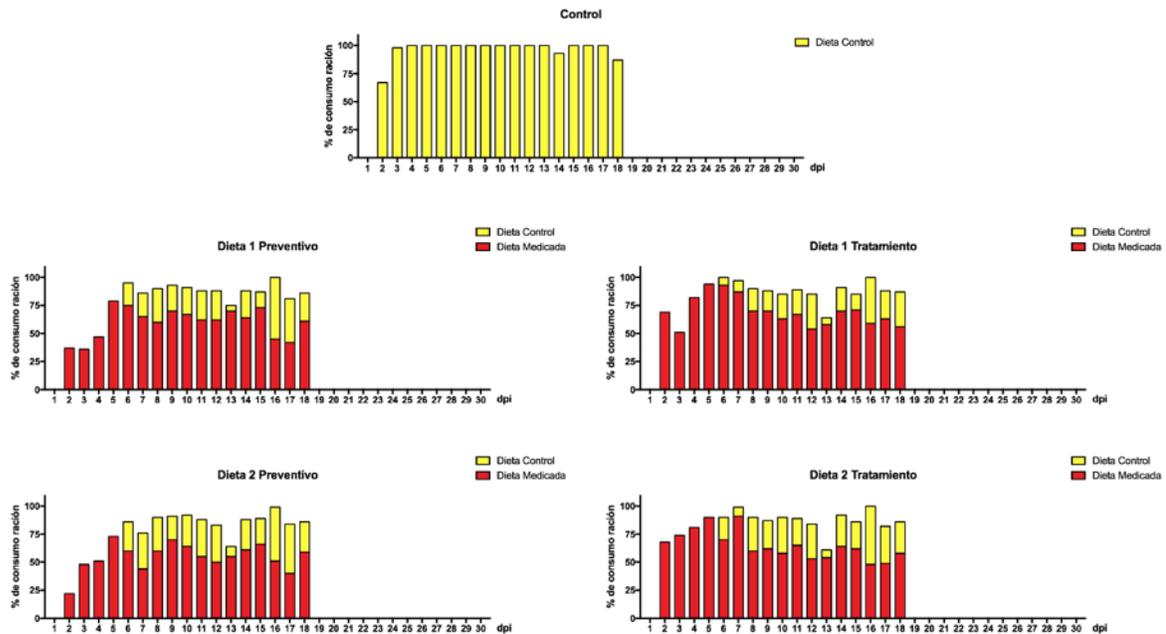


Figura 13. Consumo de dietas por tratamiento/día

3.2.3 Efecto de las dietas medicadas sobre mortalidad de peces desafiados

Al analizar el efecto de las dietas medicadas con DFP sobre la supervivencia de los peces frente al desafío y compararlo con la condición control (peces alimentados con dietas no medicadas) (Figura 14), observamos que a tiempo final (18 dpi), todas los peces alimentados con las dietas medicadas presentan un mayor porcentaje de supervivencia que los peces alimentados con dieta control, con diferentes porcentajes de protección frente al patógeno. Mientras los peces alimentados con dieta control logran supervivencia de 24.6 % (75.4 % de mortalidad acumulada), las dietas medicadas alcanzan: dieta 2 preventivo 34,7 %, dieta 2 tratamiento 39.7 %, dieta 1 tratamiento 39.7% y dieta 1 preventivo 58.1%. Un análisis estadístico de Kaplan-Meier indica que la dieta tratamiento 2 y dieta 1 preventivo presentan supervivencia significativamente mayores que la condición control frente al patógeno. Notablemente, la dieta 1 preventivo presenta un 44,4 % de protección adicional respecto de la condición control. Esto es, casi uno de cada dos peces deja de morir producto de SRS al consumir la dieta 1 de

manera preventiva. Al analizar la eficacia de los tratamientos en términos del porcentaje relativo de supervivencia 60 (RPS60), clásico índice utilizado en la evaluación de eficacia de vacunas en peces (comparación realizada cuando el control llega al 60% de mortalidad), observamos que la dieta medicada que presenta la mejor protección respecto de la condición control es también dieta 1 preventivo, que nos entrega un RPS60 cercano de 54%, lo que es considerado una muy buena eficacia de protección.

Cabe destacar, que en términos de supervivencia el grupo de peces alimentados con dietas medicadas, pero no desafiados (Figura 15) no presentaron diferencias significativas (Kaplan-Meier Log-rank $P > 0,05$) en mortalidad en relación al control, muriendo peces de manera inespecífica y destacando que las mortalidades mostradas en la figura 14 de deben a SRS. Estos resultados demuestran que la hipótesis propuesta inicialmente en este proyecto se cumple en organismos completos, protegiendo significativamente a los peces de SRS y con un importante potencial de aplicabilidad en la industria. Sin embargo, es necesario enfatizar que es relevante determinar cuándo y cuánto administrar el fármaco, como también su mejor estrategia de administración para que su aplicación sea eficiente a nivel industrial. Estos resultados, destacan la relevancia del metabolismo de hierro en el contexto del combate a infecciones de alta complejidad como la SRS.

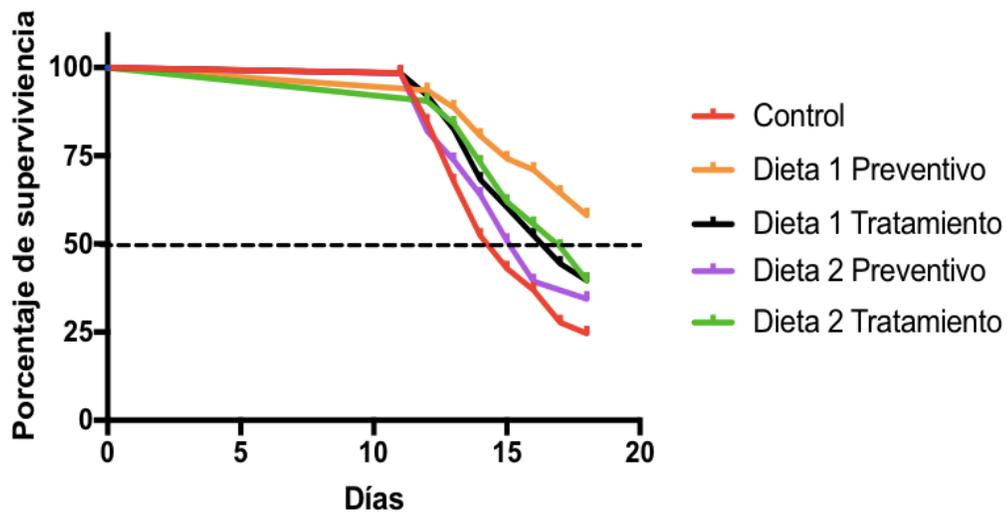
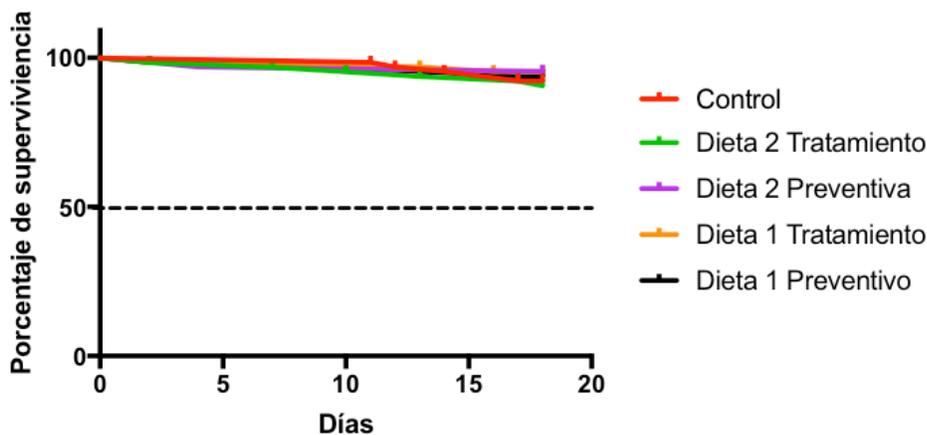


Figura 14. Análisis de supervivencia peces tratados desafiados. La dieta 1 y dieta 2 en su formato de administración tratamiento presentan diferencias significativas en relación al control en la reducción de la mortalidad frente al desafío con *P. salmonis* (Kaplan-Meier Log-rank $P < 0,05$).



Control	Control (B)			
Dieta 1 preventivo	ns	Dieta 1 preventivo		
Dieta 1 tratamiento	ns	ns	Dieta 1 tratamiento	
Dieta 2 preventivo	ns	ns	ns	Dieta 2 preventivo
Dieta 2 tratamiento	ns	ns	ns	ns

Figura 15. Análisis de supervivencia peces tratados y no desafiados. Las dietas medicadas independiente de su protocolo de administración no presentan diferencias de mortalidad en relación al control (Kaplan-Meier Log-rank $P > 0,05$).

3.3 Evaluación de la neutropenia causada por deferiprona en teleosteos

Aunque este objetivo no estaba considerado inicialmente en el proyecto, se acogió la propuesta del comité revisor de abordar el posible efecto de DFP sobre la abundancia de neutrófilos en peces teleosteos. Se ha descrito que el uso de deferiprona en humanos se asocia con el desarrollo de neutropenia y agranulocitosis, con prevalencias de 1,5 - 5,5% en ensayos clínicos (Tricta et al., 2016). Debido a que no existe evidencia de esto en peces y que no existen actualmente las herramientas inmunológicas para medirlo directamente es salmónidos, se evaluó el efecto de deferiprona sobre la población de neutrófilos en teleosteos utilizando como especie modelo a pez cebra (*Danio rerio*), debido a la disponibilidad de líneas transgénicas que presentan sus neutrófilos fluorescentemente marcados (línea transgénica *Tg(mpx:GFP)i114*). En la figura 16 se muestra una imagen representativa de una de las larvas utilizadas en este estudio. Con el objetivo de evaluar neutropenia se montaron dos abordajes experimentales: a) conteo directo de neutrófilos en larvas incubadas con DFP y b) conteo directo de neutrófilos en larvas incubadas con DFP a una noxa localizada (corte de cola).

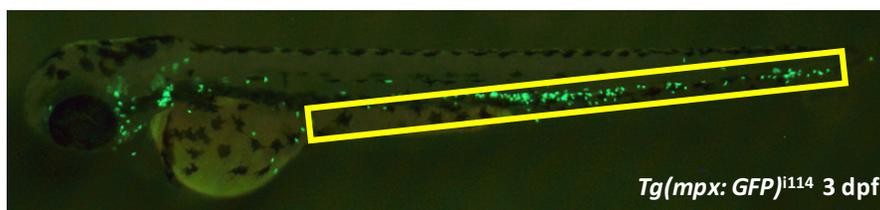


Figura 16. Larva de pez cebra *Tg(mpx:GFP)i114* de 3 días post-fertilización. El rectángulo amarillo indica el tejido caudal hematopoyético, región en la cual se generan los neutrófilos. En verde fluorescente se observan sus neutrófilos.

a) Conteo directo de neutrófilos en larvas incubadas con el quelante

Se utilizaron dos concentraciones 0,25 mM de DFP, correspondiente a la máxima concentración del quelante que no produjo mortalidades de larvas en el periodo ensayado y 0,5 mM de DFP, correspondiente a la mínima concentración del quelante que produjo mortalidades de larvas en el periodo ensayado con el objetivo de evaluar si hay diferencias en el comportamiento de los neutrófilos utilizando una dosis inocua y otra letal por inmersión, mediante cuantificación de los neutrófilos en el tejido caudal hematopoyético. En primer lugar, se realizó la selección de las larvas a los 3 dpf, con el objetivo de seleccionar individuos que presenten el transgen. El criterio utilizado fue larvas que presentaran alrededor de 25 neutrófilos en el tejido caudal hematopoyético. El ensayo se realizó en triplicado con un número de 15 individuos por grupo y monitoreo de neutrófilos al día 2, 3 y 4 a las dos concentraciones de seleccionadas. Como se muestra en la Figura 17, el número de neutrófilos en el tejido caudal hematopoyético no presenta diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones para ninguno de los días evaluados. En aquellos casos que la disposición de neutrófilos o el número no permitiera el recuento se le asignó un valor de 60.

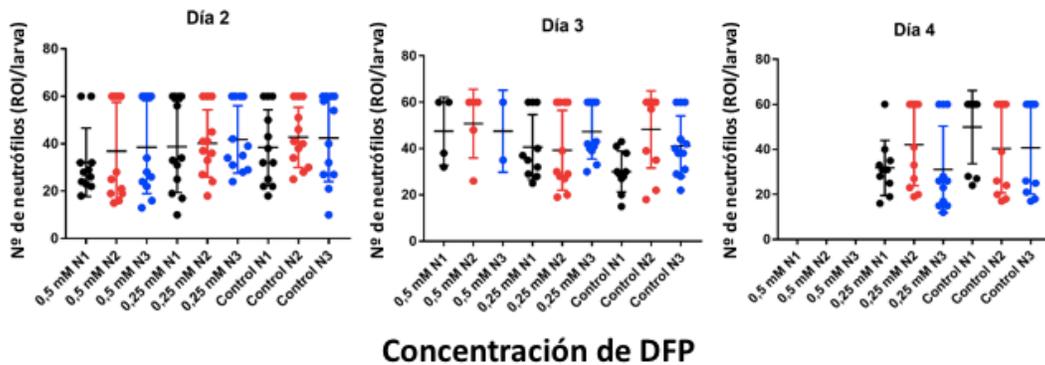


Figura 17. Recuento de neutrófilos en el tejido caudal hematopoyético de larvas incubadas con 0,25 y 0,5 mM de deferiprona al día 2, 3 y 4. Los peces de la concentración 0,5 mM presentaron mortalidades al tercer día por lo que no fue posible evaluar su recuento. No existen diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA $P < 0,05$).

b) Conteo directo de neutrófilos en larvas incubadas con el quelante posterior a una noxa localizada (corte de cola)

Debido a que con el abordaje experimental de recuento de neutrófilos en la región caudal hematopoyética no se encontraron diferencias, sumado a la dificultad del recuento por el número de células, se decidió evaluar el número de neutrófilos que migra a un daño en la aleta caudal comparando larvas tratadas con el quelante versus larvas control. Una muestra representativa de una larva usada en este estudio y una representación esquemática de la zona en que se genera el daño mecánico (corte) se muestran en la Figura 18.

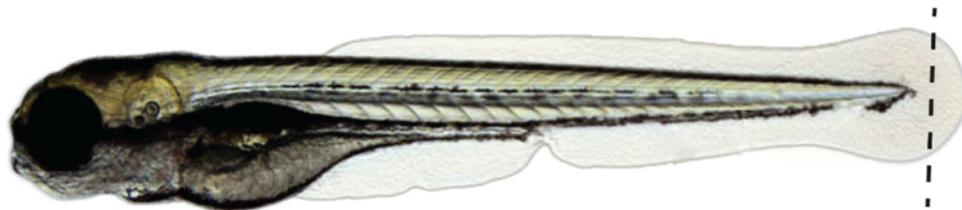


Figura 18. Esquema de corte de aleta caudal. Larva de pez en que la línea punteada indica donde se realiza el corte de cola.

La incubación se realizó solamente con la concentración 0,25 mM del quelante desde el día 4 hasta el día 9 post-fertilización, momento en que se realizó el corte en la aleta caudal. No se utilizó la concentración de 0,5 mM ya que presenta mortalidad a los 3 días posterior a la incubación con el quelante haciendo inviable el monitoreo. Posterior a la noxa localizada se monitoreó en dos puntos 1,5 y 3 horas post daño. Los ensayos se realizaron por triplicado y cada uno de ellos contenía 15 larvas. Se ha descrito que 1 hora post daño migran aproximadamente 3 neutrófilos a la zona del daño y a las 3 horas aproximadamente 8 neutrófilos (Galdames et al., 2014). Por lo que se monitoreó la migración de neutrófilos 1,5 y 3 horas posterior al daño. Los resultados mostrados en la figura 19 indican que el número de neutrófilos que migran a la región del daño recapitulan los resultados descritos en la literatura (Galdames et al., 2014) e indican que no hay diferencias significativas en migración entre las condiciones comparadas. En su conjunto, nuestros resultados indican que la exposición a deferiprona no se asocia con neutropenia en larvas de pez cebra ni con efectos sobre la migración de neutrófilos.

ACTIVIDADES Y RESULTADOS

Objetivo 4. Caracterización de aspectos productivos, fisiológicos y moleculares de los peces sometidos a las diferentes condiciones experimentales (dietas/infección)

4.1 Caracterizar y comparar aspectos productivos relevantes entre las dietas (control y experimental) durante el periodo de desafío.

La figura 20 muestra la curva final de supervivencia de peces alimentados con dieta medicada y desafiados con *P. salmonis*. Los análisis de las curvas de supervivencia muestran los siguientes porcentajes de mortalidad final: Control 92,31%; Dieta 2 Tratamiento 86,15%; Dieta 2 preventiva 83,08%; Dieta 1 Tratamiento 81,5% y Dieta 1 preventiva 63,08%. Los análisis de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier con Wilcoxon test $P < 0,05$, indican que todas las dietas medicadas, excepto la dieta 2 preventiva muestran un nivel significativo de prevención de la mortalidad. En función de las curvas de mortalidad obtenidas durante el LD50, se determinó tomar cinco muestras (M1 a M5, representativas de las diferentes etapas de la curva de mortalidad de los peces debido a SRS. M1: 4 dpi (fase lag 1); M2: 8 dpi (fase lag 2); M3: 16 dpi (fase exponencial; M4: 23 dpi (fase estacionaria 1) y M5: 30 dpi (fase estacionaria 2). La muestra cero (M0) representa a las muestras tomadas justo antes de comenzar el desafío.

Análisis de parámetros productivos (pesos, tasas de alimentación y crecimiento)

Puesto que se mostró en los ensayos anteriores que las concentraciones de quelantes utilizadas para perturbar la disponibilidad de hierro en los peces no eran tóxicas para los peces, como parámetro productivo se midió el peso de los individuos experimentales, el cual fue registrado en tres oportunidades, i) al momento de la llegada de los peces al centro experimental, con el objetivo de determinar la dispersión de estos. Como se muestra en la Figura 21A, no se observaron diferencias significativas entre los grupos y los pesos fueron homogéneos (Kruskal-Wallis Test $P > 0,05$); ii) previo al desafío, con el objetivo de determinar que los grupos experimentales se mantienen homogéneos luego de la aclimatación y que el tratamiento preventivo no generó diferencias en estos 11 días de entrega del quelante. Como se muestra en la figura 21B, no se registraron diferencias significativas entre los grupos (Kruskal-Wallis Test $P > 0,05$) y iii) posterior al desafío, con el objetivo de determinar si la entrega del quelante genera diferencias en los pesos finales (para este análisis sólo se utilizaron los grupos de peces no desafiados, ya que el desafío perse va a generar una disminución en el consumo de alimento). Los resultados resumidos en la figura 21C, muestran una reducción marginal pero significativa en el peso final de los peces alimentados con el quelante, en ambos modelos de entrega (preventivo y tratamiento), así como en las dos dosis utilizadas (dieta 1 y dieta 2). Esta disminución muestra una tendencia dosis y tiempo dependiente, mostrando las mayores concentraciones de quelante (dieta 2) administradas por más tiempo un mayor efecto sobre el peso de los peces. La reducción en peso con la dieta 1 preventiva, que genera los mayores niveles de protección frente a la infección, entre el inicio y el final del ensayo es de un 7,7% comparado con los peces alimentados con la dieta control, peso que no necesariamente tiene impacto en la producción de músculo. Con la datos obtenidos durante el ensayo de desafío se evaluaron también los parámetros productivos SFR (tasa de alimentación específica) y SGR (tasa específica de crecimiento). Como se muestra en la figura 22, los resultados obtenidos tanto en SFR como en SGR recapitulan lo observado en términos de ganancia de peso. Para SFR se observa una disminución dosis y tiempo dependiente para el grupo de peses alimentados con el quelante (preventivo y tratamiento) respecto de los peces alimentados con la dieta control. Sin embargo, a diferencia de lo observado en términos de peso final acá sólo hay una disminución significativa en la dieta 2, mientras que la dieta 1 no presenta diferencias en relación al control, lo que sugiere un rango de optimización potencial de las dosis y entregas de alimentos medicados para disminuir los efectos sobre la pérdida de peso. Futuros estudios debieran enfocarse en optimizar éstos parámetros para transferir esta información a la industria.

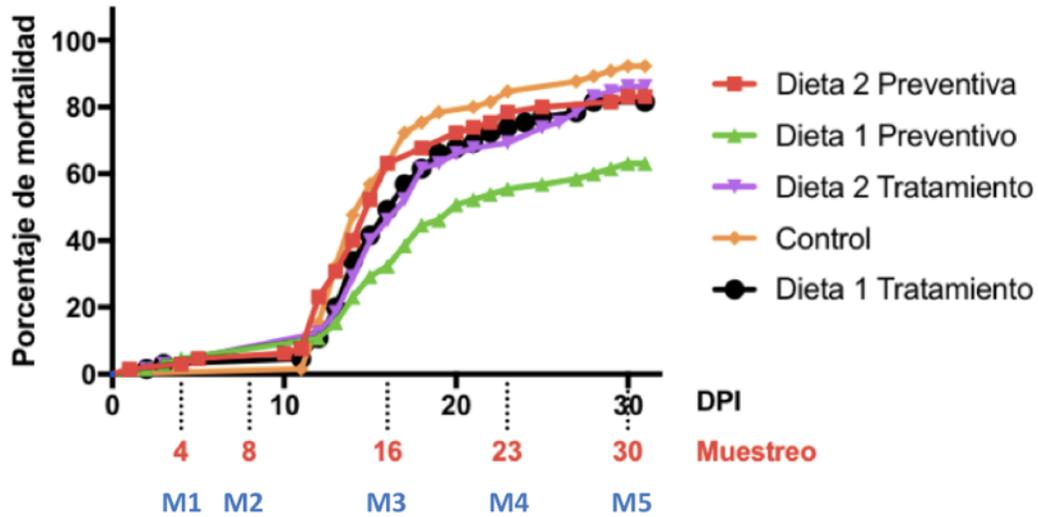


Figura 20. Porcentaje de mortalidad acumulada peces alimentados con dieta medicada y desafiados con *P. salmonis* (toma de muestras). Mortalidades registradas en los peces tratados, desafiados y no muestreados durante los 30 días de ensayo. Dieta 1 Preventiva, Dieta 1 Tratamiento y Dieta 2 Tratamiento presentan una mortalidad significativamente en relación al control no tratado. Análisis de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier con Wilcoxon test $P < 0,05$. Porcentajes de mortalidad final : Dieta 2 preventiva 83,08% ; Dieta 1 preventiva 63,08% ; Dieta 2 Tratamiento 86,15% ; Dieta 1 Tratamiento 81,5% ; Control 92,31%. En función de las curvas de mortalidad obtenidas durante el LD50, se determinó tomar cinco muestras (M1 a M5, representativas de las diferentes etapas de la curva de mortalidad de los peces debido a SRS. M1: 4 dpi (fase lag 1; M2: 8 dpi (fase lag 2); M3: 16 dpi (fase exponencial; M4: 23 dpi (fase estacionaria 1) y M5: 30 dpi (fase estacionaria 2). La muestra cero (M0) representa a las muestras tomadas justo antes de comenzar el desafío.

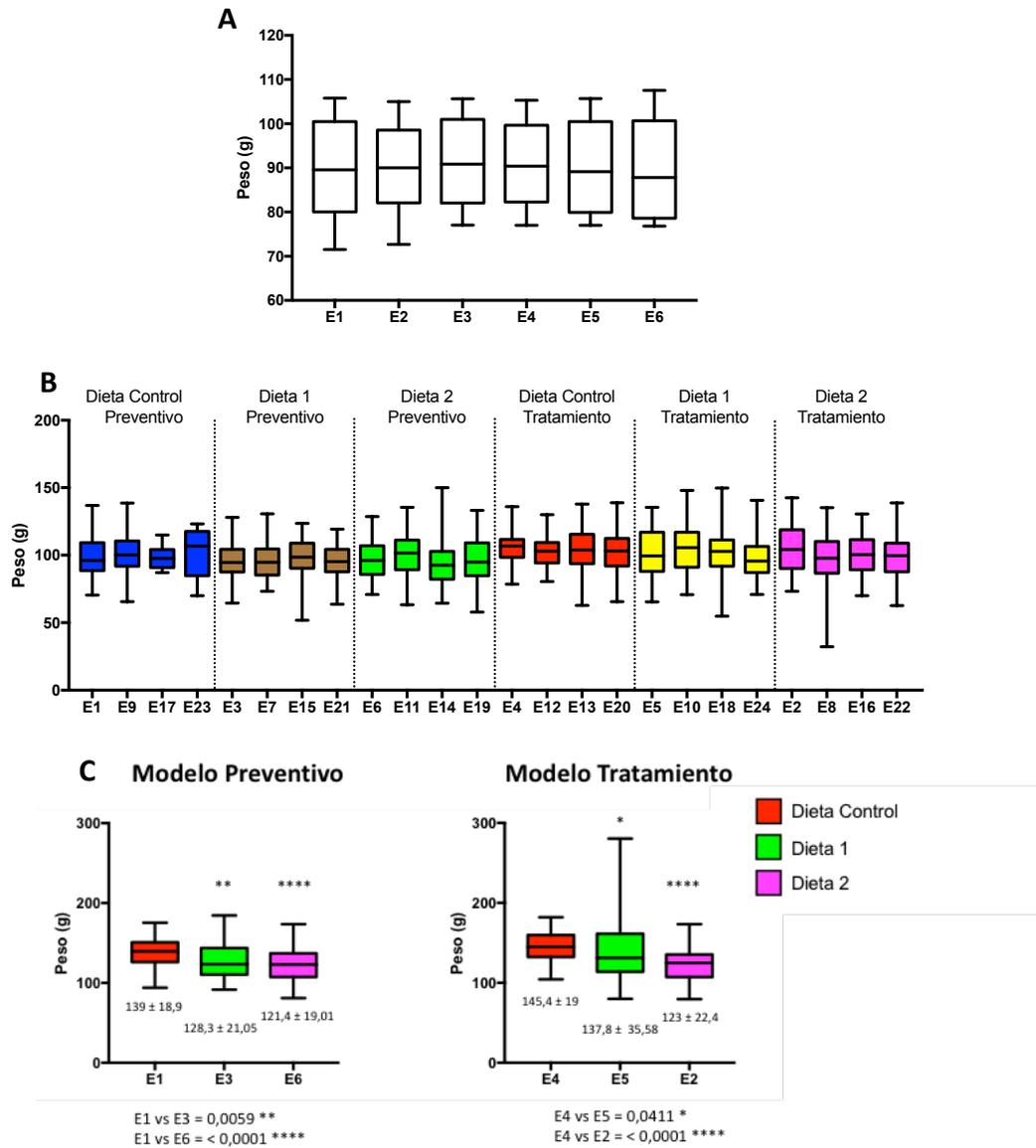


Figura 21. Pesos de peces durante el ensayo. Se realizaron 3 registros de peso de los peces durante el desarrollo del ensayo A: aclimatación, B: Previo al inicio del desafío, C: post-desafío. Las únicas diferencias significativas se registran en el grupo C: post-desafío con un peso significativamente menor para aquellos peces que recibieron dieta medicada con una diferencia que muestra una tendencia dosis tiempo y dependiente (menor peso en dieta 2 que en dieta 1). En el modelo preventivo la dieta 1 muestra una reducción de peso del 7,69% y la dieta 2 del 12,66. En el caso del modelo tratamiento la dieta 1 muestra una reducción de peso del 5,23% y la dieta 2 del 15,41%. Se utilizó el grupo alimentado no desafiado para realizar el análisis. Kruskal Wallis test (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, **** $P \leq 0,0001$).

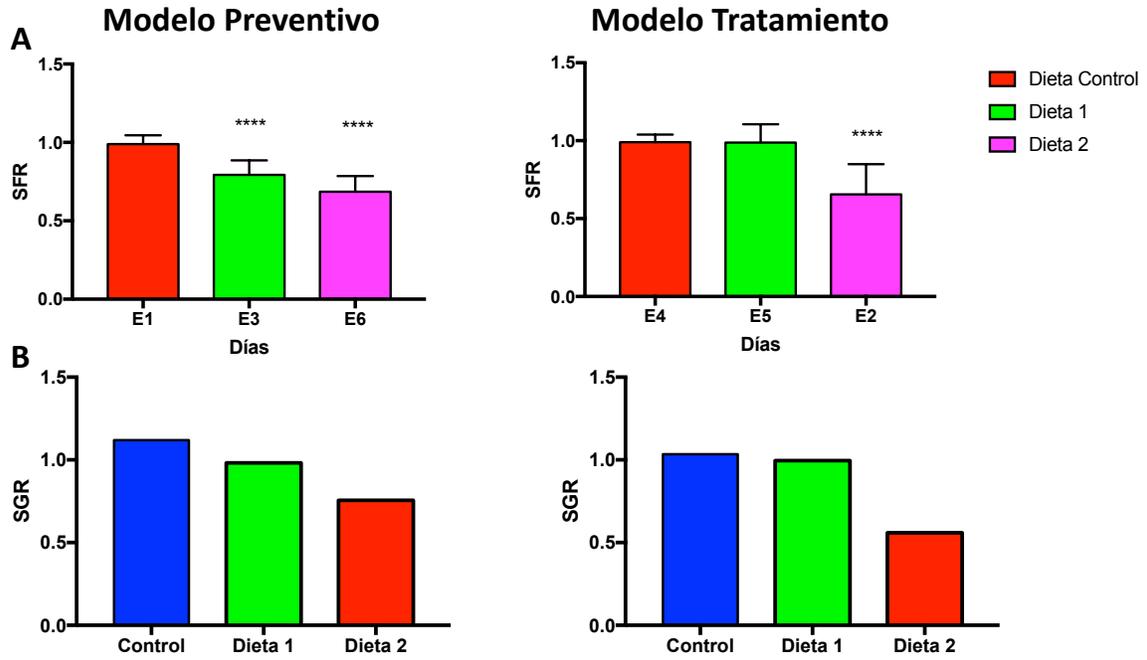


Figura 22. Parámetros Productivos SFR (*Specific feed rate*) y SGR (*Specific growth rate*). A. Evaluación de SFR [(alimento suministrado diariamente/biomasa actual) x 100] en los peces alimentados con la dieta medicada y no desafiados, se observan diferencias significativas en relación al control. B SGR [(ln peso inicial - ln peso final)x100 / días de alimentación] Se observa una tendencia a la baja en la medida que se aumenta la concentración del fármaco en la dieta. Kruskal Wallis test **** P ≤ 0,0001).

4.2 Cuantificación de *Piscirickettsia salmonis* durante el desafío.

Piscirickettsia salmonis es un patógeno intracelular que presenta altos requerimientos de hierro para su replicación intracelular, lo que ha sido demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo*. Para cuantificar la abundancia relativa de este patógeno se realizaron análisis mediante RT-qPCR, usando ARN total extraído de los tejidos de los peces para cada tiempo de muestreo (M0-M5). Para esto se midió la abundancia del transcrito 16S ribosomal de *P. salmonis* y esta fue normalizada por la abundancia del factor de elongación (ELF-1) de salmónidos (housekeeping), pudiendo así determinar la abundancia de la bacteria transcripcionalmente activa (viva) en los tejidos y no trazas de ADN que pudieran ser parte de bacterias ya muertas. Los resultados que se muestran en la figura 23, sugieren que la disponibilidad del quelante DFP entregado en el formato preventivo (dieta 1) inhibe la replicación bacteriana, a través de la baja disponibilidad del metal en los tejidos/órganos (riñón e hígado), y no a través de actividad antibiótica, puesto que es posible cuantificar a la bacteria viva en etapas avanzadas del desafío en ambos órganos (M3 = 16 dpi). Estos resultados, se ven apoyados por el comportamiento transcripcional de los marcadores del estatus celular de hierro mostrados en la figura 27 y 28.

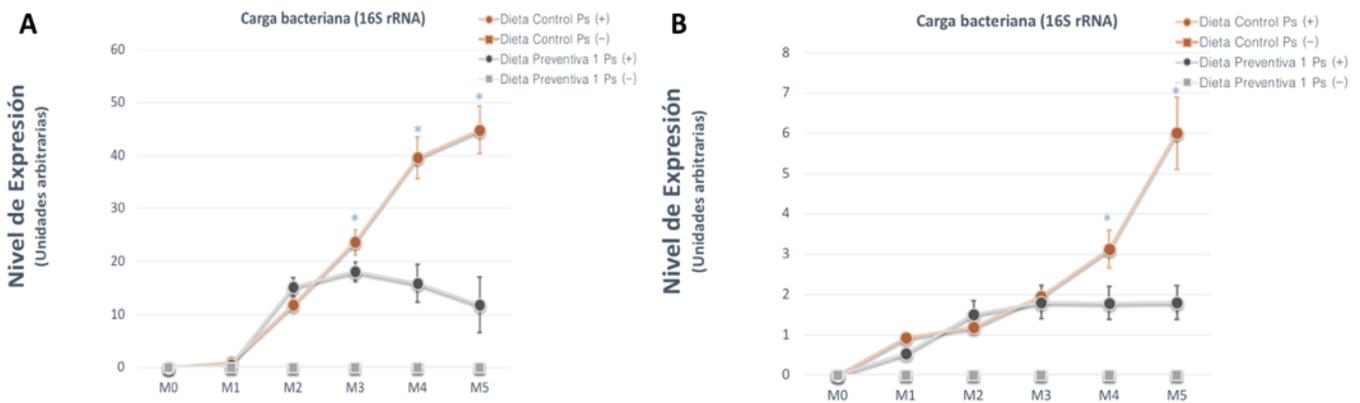


Figura 23. Carga bacteriana *P. salmonis* viable durante el desafío. A. Abundancia relativa de *P. salmonis* en riñón proximal B. Nivel de expresión de *P. salmonis* en hígado. La curva azul representa la supervivencia en el estanque de peces control (sin inóculo bacteriano). Todos los análisis se realizaron mediante RT-qPCR desde usando ARN total extraído de los tejidos para cada tiempo de muestreo. Cada punto representa el promedio de la medición de cinco réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de la abundancia del transcrito 16S ribosomal de *P. salmonis* (Karatas y cols., 2008_ DOI: 10.1111/j.1365-2761.2008.00948.x) normalizado por la abundancia del factor de elongación (ELF-1) (Mandakovic y cols., 2016_ DOI=10.3389/fmicb.2016.00643) de salmónidos (housekeeping). (Student T test * P ≤ 0,01).

4.3 Cuantificar parámetros fisiológicos/bioquímicos en tejidos de salmones (plasma) durante el desafío y determinación de cambios de abundancia relativa de transcritos vinculados al metabolismo de hierro en peces mediante qPCR (riñón proximal, hígado).

4.3.1 Parámetros fisiológicos/bioquímicos en tejidos de salmones durante el desafío (plasma).

Con el objetivo de caracterizar la infección con *P. salmonis* así como el efecto del quelante en los individuos experimentales se tomaron muestras de plasma (5 individuos) en 5 muestreos que describen diferentes etapas dentro de la cinética de infección de *P. salmonis*. Evaluándose diferentes parámetros tales como: albumina, colesterol, creatinina, glucosa, proteínas totales, triglicéridos, urea (Figura 24); creatina quinasa, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa (Figura 25); calcio, hierro, fósforo, magnesio (Figura 26). Esta fue una capacidad no instalada en nuestro equipo de trabajo y para el desarrollo del presente proyecto se montó el análisis de muestras de plasma de truchas mediante el uso del equipo Wiener Lab CM 250. Los valores obtenidos para los diferentes parámetros se encuentran dentro de las magnitudes descritas en el proyecto FIE 2015-V014 "Determinación de parámetros hematológicos, inmunológicos y mecanismos involucrados en las respuestas del hospedero a infecciones prevalentes y co-infecciones". Los parámetros en plasma: albumina, colesterol, proteínas totales no presentaron diferencias significativas en ninguno de los puntos muestreados y aquellos que presentaron diferencias (glicemia, creatinina, triglicéridos, urea) lo hicieron en un punto de muestreo específicos sin un efecto consistente ya sea en los grupos de peces tratados con el quelante y/o desafiados. Todas las enzimas analizadas mostraron algún grado de diferencia significativa en relación al grupo control, sin embargo, sus aumentos no fueron sostenidos sino más bien aislados en los diferentes muestreos realizados. El único parámetro que muestra un aumento sostenido es la enzima aspartato aminotransferasa que en el grupo desafiado se presenta aumentada en el tratamiento dieta 2 preventivo (condición que no presenta protección frente al desafío), en los puntos de muestreo M1, M2, M4 y M5, así como en el grupo dieta 1 preventivo en los puntos de muestreo M1 y M2 (condición que sí presenta protección frente al desafío). Este aumento no se correlaciona con el aumento de otras enzimas hepáticas, sin embargo, al ser este grupo tratado con el quelante previamente este aumento se podría deber al estrés nutricional que sufrieron estos grupos los días iniciales y que posteriormente se solucionó con la suplementación de dieta control. Finalmente, el análisis de minerales en plasma sólo mostró diferencias significativas para el parámetro hierro, el que presentó un aumento en el grupo no desafiado en el muestreo M5 en los tratamientos dieta 1 preventivo y dieta 2 tratamiento, y en el grupo dieta 2 preventivo desafiado en los puntos de muestreo M1 y M4. Estos resultados en su conjunto indican que las concentraciones de quelante y formatos de entrega no muestran efectos significativos sobre los parámetros evaluados, sugiriendo que la protección sobre la infección se manifiesta mediante mecanismos no tóxicos para los peces.

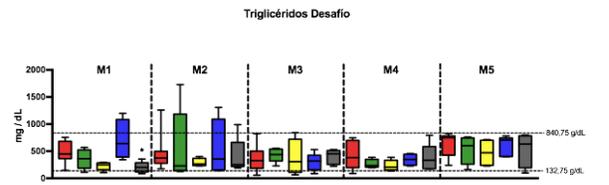
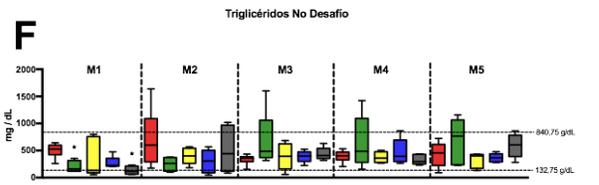
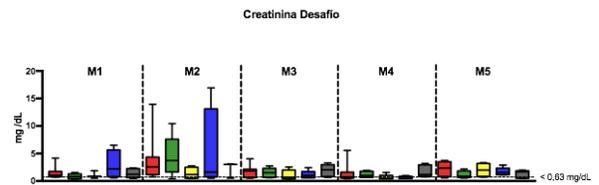
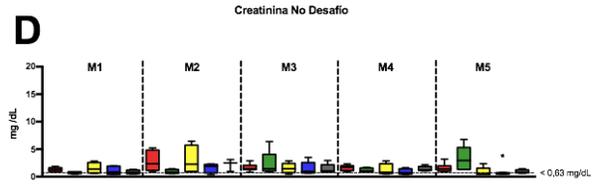
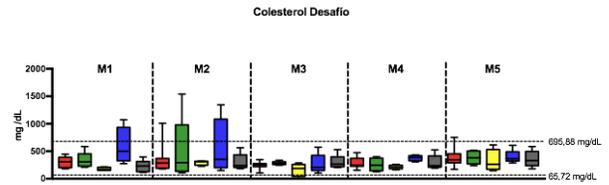
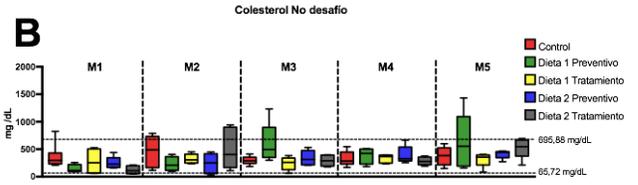
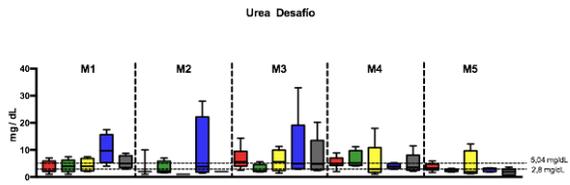
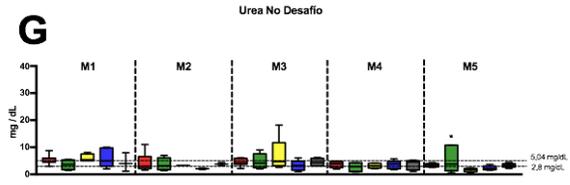
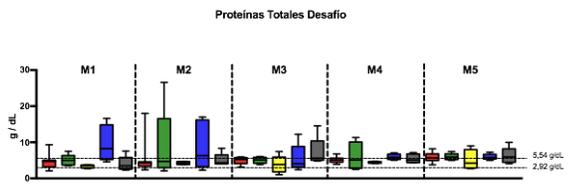
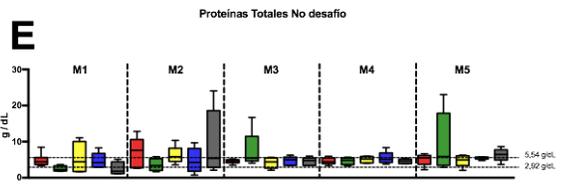
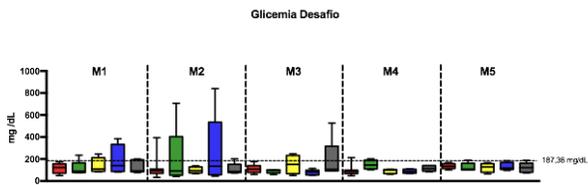
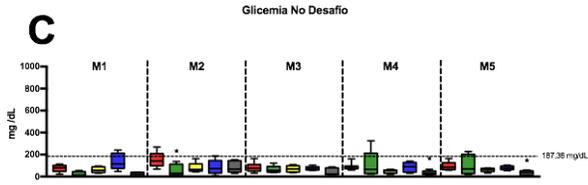
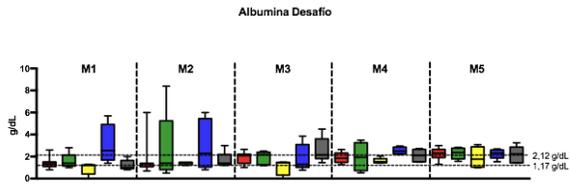
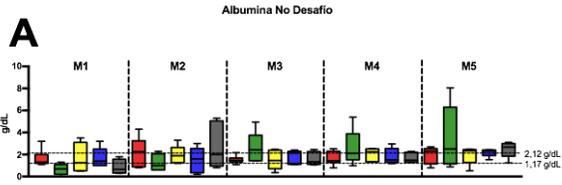


Figura 24. Cuantificación de parámetros en plasma. A) Albumina, B) Colesterol, C) Glicemia, D) Creatinina, E) Proteínas Totales, F) Triglicéridos, G) Urea. La línea punteada muestra los valores referenciales para el parámetro según proyecto FIE 2015-V014 de Sernapesca (disponible en página web de Sernapesca). Análisis estadístico Mann-Whitney comparación en relación al respectivo control del muestreo. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, en caso de no indicarse no existen diferencias significativas.

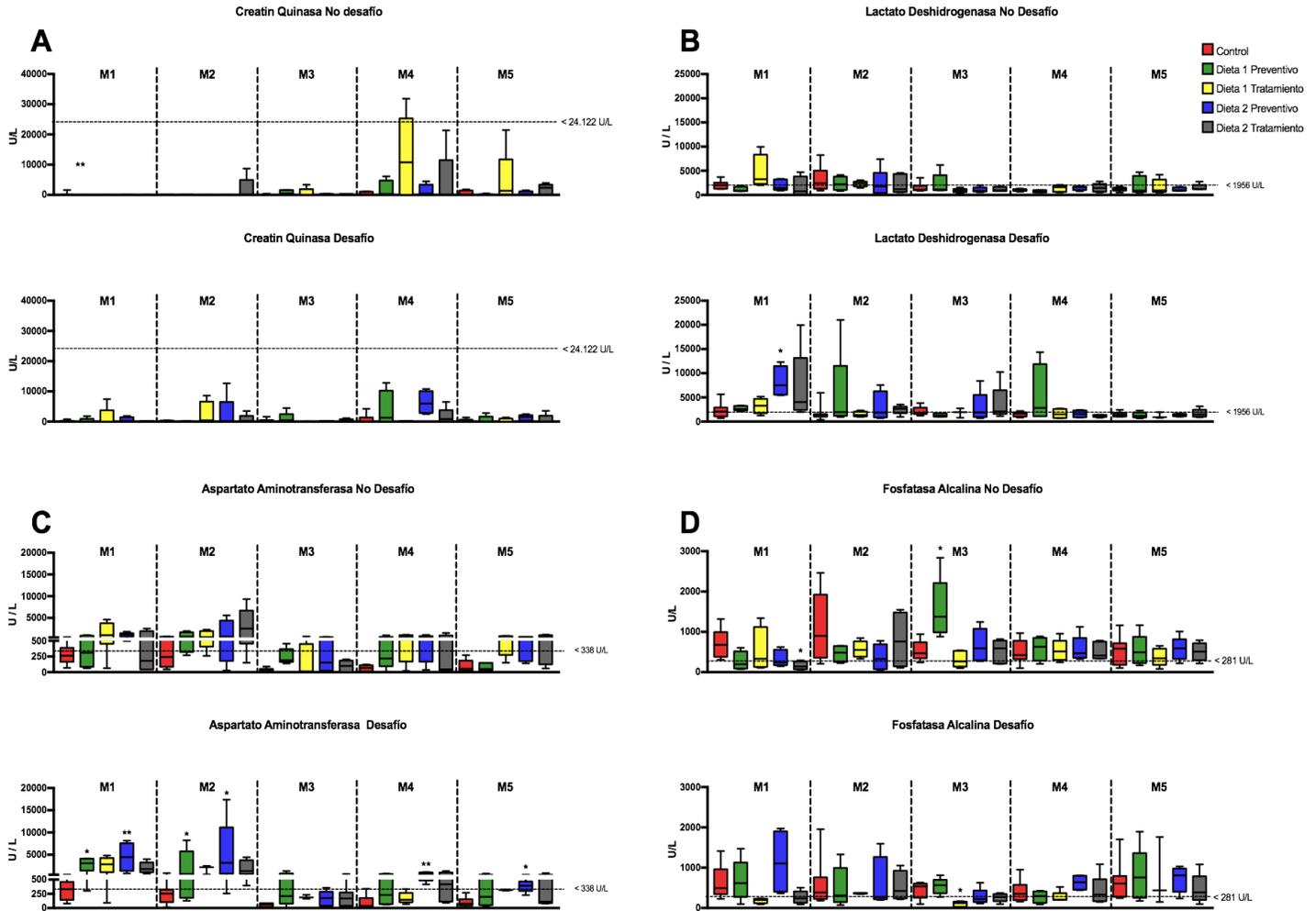


Figura 25. Cuantificación de enzimas en plasma. A) Creatin Quinasa, B) Lactato Deshidrogenasa, C) Aspartato Aminotransferasa, D) Fosfatasa Alcalina. La línea punteada muestra los valores referenciales para el parámetro según proyecto FIE 2015-V014. Análisis estadístico Mann-Whitney comparación en relación al respectivo control del muestreo. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, en caso de no indicarse no existen diferencias significativas.

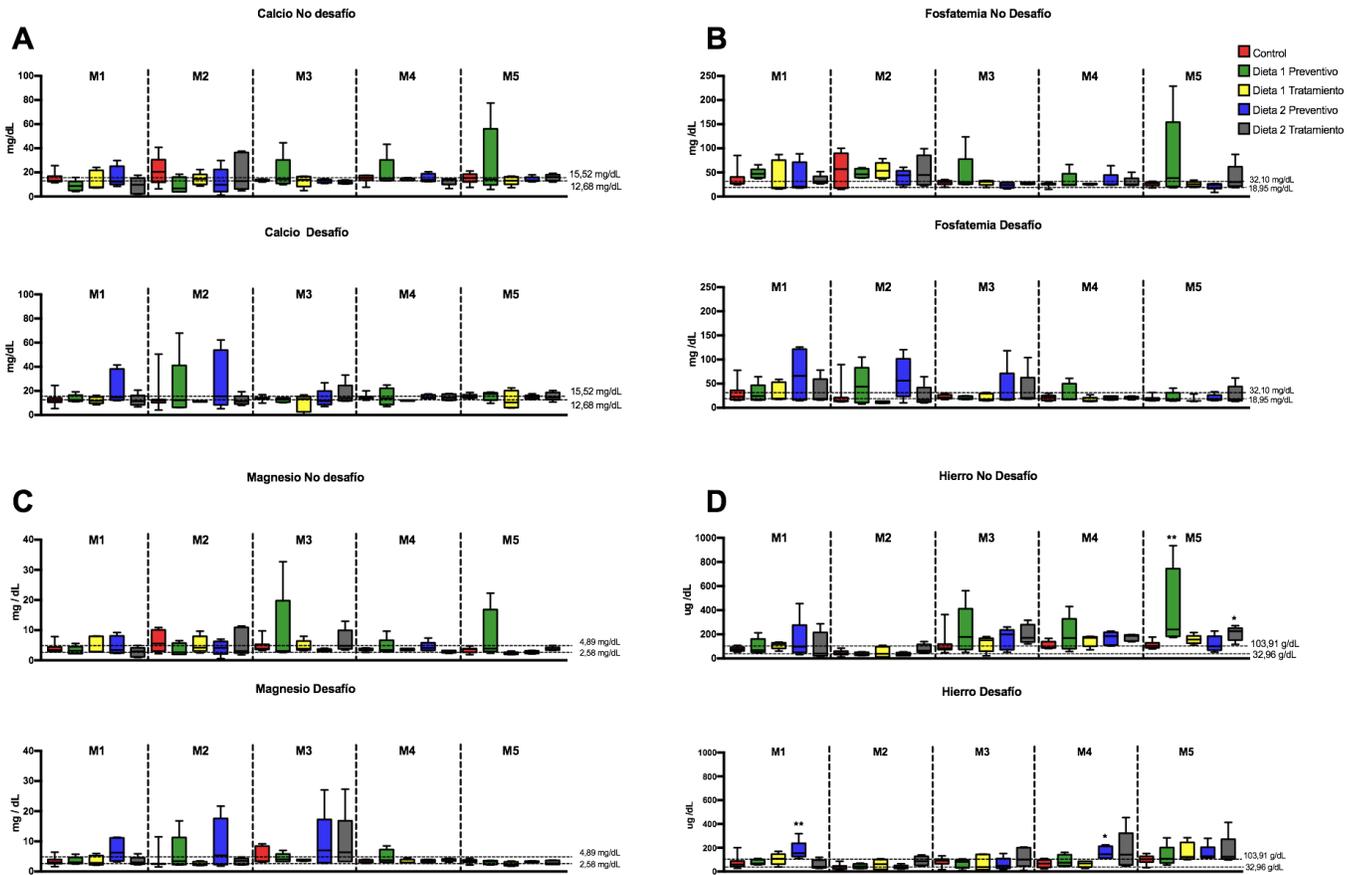


Figura 26. Cuantificación de minerales en plasma. A) Calcio, B) Fósforo, C) Magnesio, D) Hierro. La línea punteada muestra los valores referenciales para el parámetro según proyecto FIE 2015-V014. Análisis estadístico Mann-Whitney comparación en relación al respectivo control del muestreo. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, en caso de no indicarse no existen diferencias significativas.

4.3.2 Análisis de expresión génica en transcritos marcadores del estatus de hierro mediante qPCR (riñón proximal, hígado).

Para determinar si la dieta medicada (dieta preventiva 1) que generó los mejores resultados de protección en el desafío de peces con *P. salmonis* correlaciona con cambios de expresión génica en transcritos marcadores del estatus celular de hierro, se midió la abundancia relativa del receptor de transferrina (A), ferritina (B) y ferroportina, encargados de la entrada, almacenamiento y salida de hierro celular, respectivamente. Esta medición se comparó con la abundancia de los mismos transcritos en los peces alimentados con la dieta control (dieta no medicada) al inicio y al final del desafío, tanto en riñón proximal (principal órgano hematopoyético en peces teleósteos) como en hígado. Como se muestra en las figuras 27 y 28 (abundancia de transcritos en riñón e hígado respectivamente) al inicio del desafío (M1), momento que presenta bajas cargas bacterianas (ver figura 5) es posible ver un claro efecto del quelante en la respuesta transcripcional de los peces. Tanto en riñón como en hígado se observa una respuesta canónica de aumento en la abundancia del receptor de transferrina (orientado a capturar hierro plasmático desde la transferrina), una disminución de la abundancia de ferritina (que acumula hierro y su abundancia correlaciona con el estatus celular de hierro) y disminución en ferroportina, el único exportador de hierro celular descrito a la fecha. Estos resultados sugieren que la célula está “sensando” el déficit de hierro mediado por la baja disponibilidad del metal que se encuentra quelado con DFP (ver esquemas 8D y 9D). Es relevante destacar que en M1, los peces han recibido la dieta control y la medicada preventiva por 15 días y considerando que las cargas bacterianas son bajas, estos resultados representan básicamente la respuesta al cambio dietario. Finalmente, es importante enfatizar que a pesar que los peces que consumen DFP logran “activar” su sistema de captura y “reprimir” sus sistema de salida del metal, la incorporación continua del quelante a través de la dieta de los peces evita que los peces logren aumentar el contenido intracelular de hierro ya sea del agua o de la propia dieta. En M5 los resultados son más erráticos en términos de su capacidad de marcadores del estatus celular de hierro, puesto que representan la respuesta compuesta a una alta carga bacteriana (ver figura 23) y un mayor tiempo de exposición al quelante (41 días). En el caso de riñón, tanto el receptor de transferrina como ferritina muestran aumentos significativos de abundancia en respuesta a la infección para ambos tipos de dieta, aspecto que sólo se verifica para la dieta preventiva el hígado. Ferroportina, por su parte, muestra una disminución significativa de su abundancia en respuesta a la infección para ambos tipos de dietas, contrariamente a lo observado en riñón que su abundancia aumenta en respuesta a la infección, sólo en los peces alimentados con la dieta control. Estos resultados en su conjunto muestran que el quelante de hierro DFP logra impactar en la disponibilidad celular de hierro, logra proteger a los peces de la muerte debida a SRS y se presenta como una atractiva estrategia de control de la enfermedad mediante un fármaco no antibiótico enfocado en el hospedero.

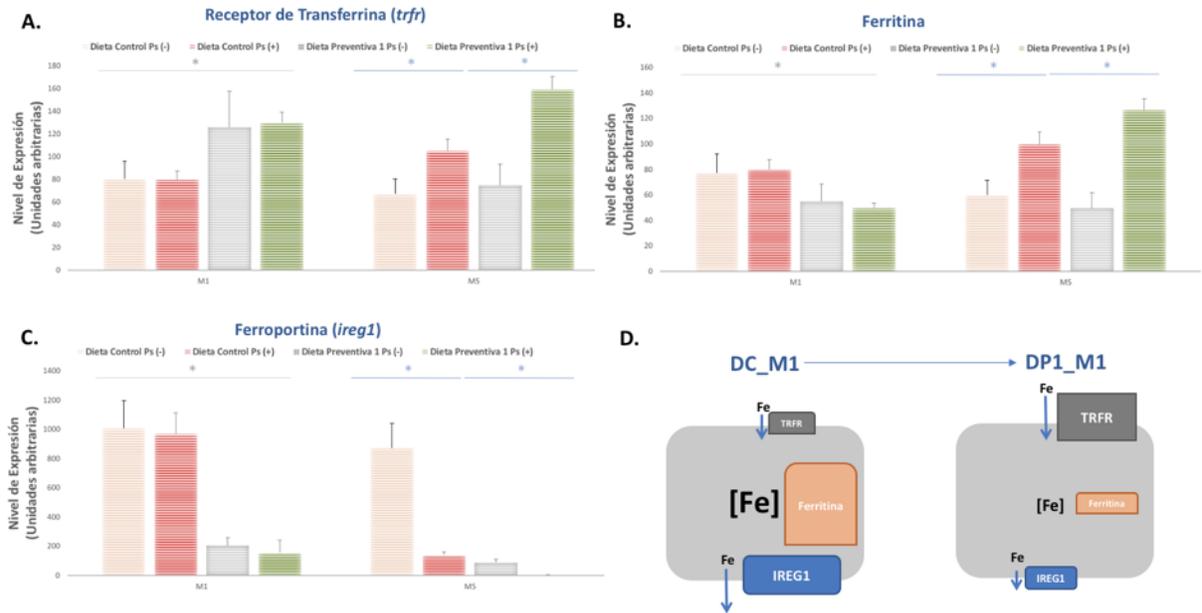


Figura 27. Abundancia relativa de transcritos marcadores del estatus celular de hierro en riñón proximal. Mediante análisis de expresión génica por RT-qPCR se midió la abundancia del receptor de transferrina (A), ferritina (B) y ferroportina, encargados de la entrada, almacenamiento y salida de hierro celular, respectivamente. Cada columna representa el promedio de la medición de cinco réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de la abundancia de cada transcrito normalizado por la abundancia del factor de elongación (ELF-1). Los (*) representan diferencias significativas entre las condiciones comparadas (dieta y/o infección) (ANOVA test, $P \leq 0,01$). En D, se muestra un esquema que representa los cambios de abundancia de transcritos entre la dieta control (DC_M1) y la dieta preventiva 1 (DP1_M1) al inicio del desafío, lo que representa 15 días de exposición a DFP.

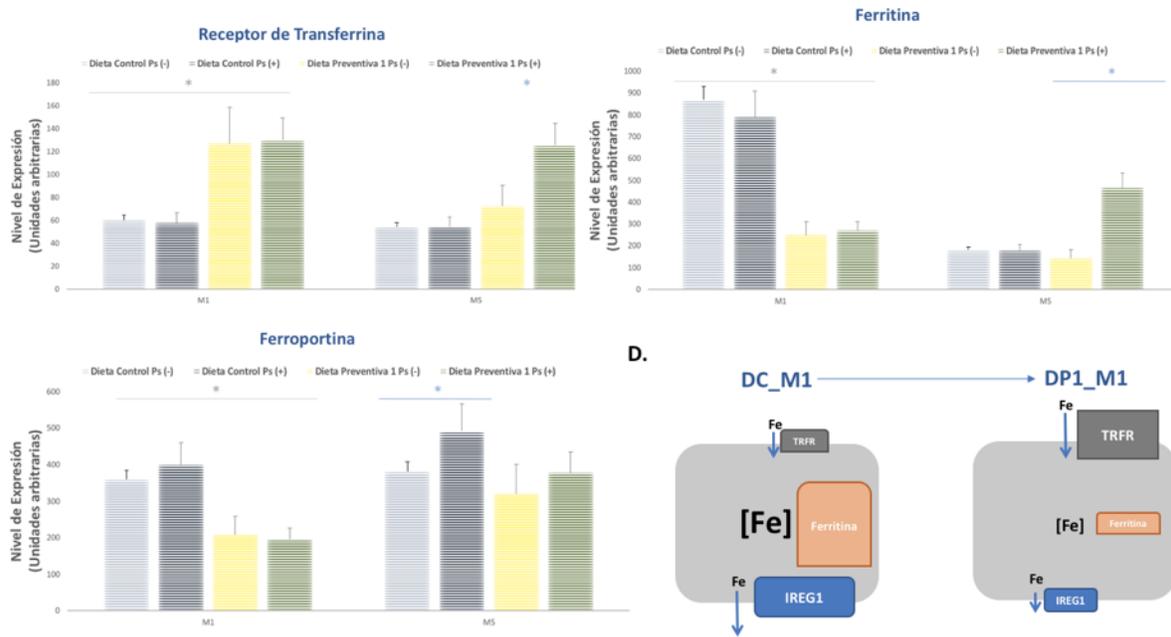


Figura 28. Abundancia relativa de transcritos marcadores del estatus celular de hierro en hígado. Mediante análisis de expresión génica por RT-qPCR se midió la abundancia del receptor de transferrina (A), ferritina (B) y ferroportina, encargados de la entrada, almacenamiento y salida de hierro celular, respectivamente. Cada columna representa el promedio de la medición de cinco réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de la abundancia de cada transcrito normalizado por la abundancia del factor de elongación (ELF-1). Los (*) representan diferencias significativas entre las condiciones comparadas (dieta y/o infección) (ANOVA test, $P \leq 0,01$). En D, se muestra un esquema que representa los cambios de abundancia de transcritos entre la dieta control (DC_M1) y la dieta preventiva 1 (DP1_M1) al inicio del desafío, lo que representa 15 días de exposición a DFP.

CONCLUSIONES

Las estrategias orientada al uso de fármacos antimicrobianos dirigidos al patógeno (Pathogen-directed therapy, "PDT"_antibióticos) han sido efectivas en el pasado pero también han desencadenado graves consecuencias en el intento de combatir infecciones, básicamente por el desarrollo de resistencia microbiana a los antibióticos y resurgimiento de enfermedades infecciosas que ya se creían erradicadas. En respuesta a esto, un enfoque terapéutico moderno propone perturbar los procesos biológicos y moleculares del hospedero que son utilizadas por los patógenos para producir infección, todo esto mediante el uso de fármacos antimicrobianos dirigidos al huésped (Host-directed therapy, "HDT"). La dificultad que presenta este desafío es conocer dichos procesos y elegir adecuadamente la forma de perturbarlas. Para el caso de la relación entre los salmónidos y la bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis*, nuestros estudios de genómica funcional que comparan la respuesta transcripcional (transcriptómica) de peces susceptibles y resistentes a la infección nos permitieron determinar que la regulación adecuada del metabolismo de hierro, mediante un proceso conocido como inmunidad nutricional es capaz de limitar de manera fisiológica la disponibilidad del metal al patógeno y con esto resistir la infección. Con esta información, en el contexto del Proyecto titulado "Modulación de la inmunidad nutricional como estrategia de resistencia de salmones a la infección con *Piscirickettsia salmonis*" del Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura (PGSA)- Sernapesca, se propuso usar un quelante de hierro (deferiprona, "DFP") para evitar la proliferación bacteriana y el desarrollo de la SRS mediante una estrategia farmacológica no antibiótica (HDT) entregada a través de un formato no invasivo, la dieta de los peces.

Los resultados del proyecto en su conjunto muestran que el quelante de hierro fue es un efectivo protector frente a la infección con *Piscirickettsia salmonis* y la muerte por SRS. Este quelante fue capaz de disminuir la disponibilidad y residencia de hierro en los peces cuando fue suministrado a través de la dieta, impactando directamente sobre el contenido del metal en órganos blanco de *Piscirickettsia salmonis*. Estas observaciones mostraron un respaldo molecular a través del comportamiento transcripcional de genes que codifican para proteínas marcadoras del estatus celular del metal y por la reducida carga bacteriana en los tejidos de peces alimentados con el quelante en relación a los peces alimentados con dietas de uso tradicional en la industria. Estos resultados se presentan como una prometedora estrategia para disminuir el impacto de SRS en la industria salmonera nacional de manera sustentable, mediante el uso de una estrategia farmacológica no antibiótica (HDT), enfocada en procesos biológicos claves del hospedero que la bacteria explota para producir la infección.

RECOMENDACIONES A LA INDUSTRIA

Todas las formulaciones de dietas con el quelante DFP mostraron efectos protectores sobre la mortalidad de peces experimentalmente infectados con *Piscirickettsia salmonis* en diferentes magnitudes. Estas diferencias se explican principalmente por la concentración del fármaco disponible y por el formato de entrega (protocolo de alimentación). Esto permite realizar ciertas recomendaciones generales a la industria con el propósito de que ésta pueda transferir esta información a sus procesos productivos. Por ejemplo, se recomienda no usar concentraciones del quelante más altas que las probadas en este estudio puesto que, en pequeños ensayos piloto realizados en el contexto de este proyecto, se observó que concentraciones de 150 y 200 mg DFP/Kg/día son tóxicas en los peces de manera aguda y muestran efectos indeseados sobre el consumo de alimento. Por el contrario, una recomendación es probar dosis incluso menores que las reportadas en este estudio como las más efectivas, esto es usar concentraciones mayores a 10 mg DFP/Kg/día y menores a 50 mg DFP/Kg/día, puesto que es un rango no

probado en los desafíos y nuestros resultados mostraron que la dosis menor 50 mg DFP/Kg/día tuvo mejor efectividad que 100 mg DFP/Kg/día en términos de su capacidad protectora. Esto se explica muy probablemente porque la cantidad ideal de hierro disponible para combatir eficientemente al patógeno se alcanza entre el balance de la necesidades del hospedero para levantar una respuesta inmune adecuada y las del patógeno para replicarse eficientemente dentro de las células del hospedero.

En función de los resultados obtenidos, si se utilizan dosis de 50 mg DFP/Kg/día se recomienda realizar entregas dietarias del fármacos antes de observar los brotes de SRS ya que se demostró una mejor eficacia en el formato de pretratamiento. El momento de inicio de la entrega puede ser decidida en función de datos epidemiológicos (ver otros proyecto del Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura (PGSA)-Sernapesca) o históricos que permitan estimar el inicio de los brotes de SRS.

Se sugiere no utilizar otros quelantes de hierro para alcanzar similares resultados que los mostrados en este informe. La selección de DFP, se realizó en función de varias de sus características, farmacológicas, fisicoquímicas y de viabilidad aplicada, pero principalmente basados en los resultados de 10 años de investigación en que en sistemas de infecciones *in vitro* se han probado una serie amplia de quelantes, algunos de los cuales correlacionan con un aumento de la infección y mortalidad debido a *Piscirickettsia salmonis*, principalmente porque son accesibles molecularmente para la bacteria por lo que pueden cargarse eficientemente con hierro y así replicarse aún más durante la infección.

Finalmente, se recomienda no sumar el uso de este fármaco a las dosis de antibióticos usadas hoy a nivel productivo, sino que más bien usarlo como una herramienta complementaria preventiva que permita bajar las dosis antibióticas entregados de manera curativa (no se evaluaron interacciones). Se espera que el uso de este fármaco en la industria se convierta en una alternativa viable y que permita mejorar la producción de manera más sustentable.

Puerto Montt, 16 de noviembre 2017

Carta de Manifestación de Interés Fundación Chile

Mediante la presente, el Dr. Martin Hevia Werkmeister, RUT 7.011.620-0, Director Ejecutivo Acuicultura de Fundación Chile, RUT 70.300.000-2, manifiesta el interés de la Unidad de Negocios Aquadvice de Fundación Chile, en participar en las actividades de diseño y ejecución de un bioensayo en ambiente controlado del proyecto denominado "Modulación de la inmunidad nutricional como estrategia de resistencia de salmones a la infección con *Piscirickettsia salmonis*" cuyo Director es el Dr. Rodrigo Pulgar Tejo.



Martin Hevia Werkmeister
Director Ejecutivo Acuicultura
Fundación Chile

November, 16th 2016

Evaluation Committee
Santiago
Chile

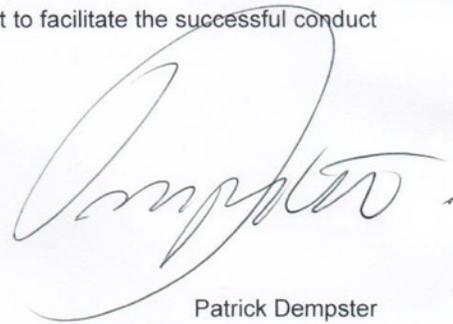
Dear Sirs:

This letter is to support the proposed research project of doctors Pulgar, Cambiazo and Wacyk entitled "Modulación de la inmunidad nutricional como estrategia de resistencia de salmones a la infección con *Piscirickettsia salmonis*". This project is of interest for the salmon industry given the enormous competitiveness loss due to the Salmonid Rickettsial Syndrome (SRS).

The results that will be obtained on the characterization of the salmon iron metabolism and its association to *P. salmonis* resistance could have great impact for the salmon production efficiency. Moreover, since this proposal focused in the salmon and not in the pathogen itself it will contribute to reduce the use of antibiotics by the industry; another aspect of great relevance to the salmon industry in Chile.

Thus, on behalf of AquaGen Chile, I offer our support to facilitate the successful conduct of this project.

Sincerely,



Patrick Dempster
Chief Executive Officer,
AquaGen Chile S.A.

Programa Taller de Difusión

Miércoles 20 de Diciembre de 2017

AVANCES EN LA INVESTIGACIÓN DEL PROGRAMA PARA LA GESTIÓN SANITARIA EN LA ACUICULTURA

Actividad	Responsable	Duración (min)	Hora inicio	Hora fin
Registro e inscripciones		0:30	8:00 am	8:30 am
Palabras de bienvenida e Introducción al Programa para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura	Fabián Avilés, Sernapesca	0:30	8:30 am	9:00 am
Optimización de terapias antimicrobianas usadas para el control de <i>P. salmonis</i>	Dra. Betty San Martín, UCH	0:50	9:00 am	9:50 am
Avances en la Biología de <i>Piscirickettsia salmonis</i> para el desarrollo de mejores estrategias de control	Dr. Sergio Marshall, PUCV	1:10	9:50 am	11:00 am
Coffee break		0:20	11:00 am	11:20 am
CaligusLIFE: biología de <i>Caligus rogercresseyi</i> y su aplicación en estrategias de control de la caligidosis	Dr. Cristian Gallardo, UDEC	0:50	11:20 am	12:10 pm
Respuesta del Hospedador: respuesta fisiológica, inmune y mecanismos de coinfección	Dr. Ricardo Enríquez, UACH	0:50	12:10 pm	1:00 pm
Apoyo a la Gestión y seguimiento de la investigación del PGSA	Jorge Olivares, PUC	0:30	1:00 pm	1:30 pm
Almuerzo		0:45	1:30 pm	2:15 pm
Efectos de la calidad, robustez y bienestar de smolts en la resistencia a <i>P. salmonis</i>	Dra. Claudia Venegas, AVS	0:30	2:15 pm	2:45 pm
An integrated epidemiological approach for the early detection and diagnosis, and control of <i>P. salmonis</i> and <i>C. rogercresseyi</i> transmission in Atlantic farmed salmon in Chile.	Dr. Fernando Mardones, Epivet	0:30	2:45 pm	3:15 pm
Integrated epidemiological studies on Salmon Rickettsial Syndrome and Caligus	Dr. Angus Cameron, Ausvet	0:30	3:15 pm	3:45 pm
Estatus inmune de <i>Salmo salar</i> en condiciones de campo y su relación con la infección por <i>P. salmonis</i>	Dr. Luis Mercado, PUCV	0:30	3:45 pm	4:15 pm
Diversification and evolution of <i>P. salmonis</i> - implications for biobanking, diagnostics and epidemiology	Dr. Joerg Overmann, DSMZ	0:45	4:15 pm	5:00 pm
Coffee break		0:20	5:00 pm	5:20 pm
Modulación de la inmunidad nutricional como estrategia de resistencia de salmones a la infección con <i>Piscirickettsia salmonis</i>	Dr. Rodrigo Pulgar, UCH	0:30	5:20 pm	5:50 pm
Identificación, ponderación y validación en terreno de factores predictivos para el éxito de tratamientos antiparasitarios por inmersión por medio de un panel de expertos	Dr. Gabriel Arriagada, UDEC	0:30	5:50 pm	6:20 pm
Palabras de cierre	Fabián Avilés, Sernapesca	0:05	6:20 pm	6:25 pm
Cóctel de cierre		0:20	6:25 pm	6:45 pm

 Se dispondrá de traducción simultánea en inglés y español durante todo el Taller

 El registro se realizará entre 8:00 y 8:30 por lo que se agradece puntualidad

Informe de Laboratorio Unidad Cultivo Celular

Datos de la muestra	
Número de caso	PM-88150
Muestra	Inóculo
Fecha de ingreso	09-07-2018

Técnica solicitada
- Determinación de: TCID ₅₀ /mL - Método: Karber-Spearman - Agente: <i>Piscirickettsia salmonis</i>

Resultado	
Cepa	TCID ₅₀ /mL
LF89 Batch 1	10 ^{4,75}
LF89 Batch 2	10 ^{5,00}



T.M. *Eugenio Tapia A.*
Unidad Cultivo Celular y Virología
ADL Diagnostic Chile Spa.

Puerto Montt, 25 de Julio de 2018

----- Fin del Informe -----

Informe de pureza y cuantificación para inóculo de *Piscirickettsia salmonis*
Solicitud: PM-88150

A solicitud del cliente, se procedió a entregar inóculos generados a partir de la cepa *P. salmonis* PM-18856, aislada de Trucha arcoíris, el día 09 de Julio de 2018. Se prepararon 200mL de inóculo en total correspondientes a una concentración de 10^5 TCID₅₀/mL y se entregaron en dos batch de 100mL cada uno. Se procedió a realizar controles de calidad respectivos los que incluyen: cultivos bacteriológicos en agar TSA y TSA/s, PCR *P. salmonis*, RT-PCR ISAV, RT-PCR IPNV, PCR *R. salmoninarum*, PCR *F. psychrophilum*, determinación de título mediante recuento bacteriano en placa de agar y mediante TCID₅₀.

RESULTADOS DE PUREZA Y CUANTIFICACIÓN

Tabla 1. Resultados cultivos bacteriológicos.

Análisis	Batch 1 Inóculo 10^5 TCID ₅₀ /mL	Batch 2 Inóculo 10^5 TCID ₅₀ /mL
Cultivo en TSA 18 °C	Negativo	Negativo
Cultivo en TSA 35 °C	Negativo	Negativo
Cultivo en TSA/s 18 °C	Negativo	Negativo
Cultivo en TSA/s 35 °C	Negativo	Negativo

Tabla 2. Resultados de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Análisis PCR	Batch 1 Inóculo 10^5 TCID ₅₀ /mL	Batch 2 Inóculo 10^5 TCID ₅₀ /mL
<i>P. salmonis</i>	Positivo	Positivo
ISAV	Negativo	Negativo
IPNV	Negativo	Negativo
<i>R. salmoninarum</i>	Negativo	Negativo
<i>F. psychrophilum</i>	Negativo	Negativo

Tabla 3. Resultados recuento bacteriano en placa de agar.

Inóculo	Recuento Bacteriano (ufc/mL)
10^5 TCID ₅₀ /mL Batch 1	$5,30 \times 10^6$
10^5 TCID ₅₀ /mL Batch 2	$5,50 \times 10^6$

ufc/mL: Unidad Formadora de Colonia por mililitro.

Tabla 4. Resultados recuento bacteriano mediante TCID₅₀.

Informe adjunto.

Conclusiones: Los cultivos en agar TSA y TSA/s a 18°C y 35°C no evidencian desarrollo bacteriano, así como también los resultados de PCR indican sólo positividad a *P. salmonis*, por lo tanto, se puede decir que los inóculos generados cumplen con los controles de pureza en su preparación. La cuantificación indica que los inóculos presentan una concentración de $5,30 \times 10^6$ ufc/mL y $5,50 \times 10^6$ ufc/mL para los batch 1 y 2, respectivamente.

Maritza Grandón
Unidad de Bacteriología y Micología

27 de Julio de 2018

———— Fin del Informe ————



PROGRAMA PARA LA GESTIÓN SANITARIA EN LA ACUICULTURA (PGSA)

Seminario de Cierre *“Un paso más para la Sustentabilidad”*

Miércoles 12 de diciembre 2018		
8:30-9:00	Inscripción	
	Charla	Expositor
9:00-9:35	Bienvenida. Orientación estratégica del programa para la gestión sanitaria para la acuicultura: Un paso más a la Sustentabilidad.	Alicia Gallardo Lagno, Directora Nacional Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.
9:35-9:55	Relevancia estratégica del programa de gestión sanitaria para la acuicultura: Conocimiento para tomar decisiones.	Arturo Clemenet, Presidente SalmonChile.
MÓDULO 1		
10:00-10:30	Estatus inmune de salmo salar en condiciones de campo y su relación con la infección por <i>P. salmonis</i> y bases para la incorporación de péptidos inmunomoduladores en dieta como nuevos medicamentos contra la piscirickettsiosis.	Luis Mercado, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
10:30-11:00	Caligus Life: Integrando conocimiento para entender el patógeno <i>Caligus rogercreseyi</i> : Cepario, caracterización genómica, ubicación geográfica, ciclos, características de resistencia.	Cristian Gallardo, Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR).
Coffee 11:05-11:30 (20 minutos)		
MÓDULO 2		
11:35-12:05	Optimización de tratamientos frente a <i>Caligus rogercreseyi</i> : Programa de Vigilancia	Gabriel Arriagada, Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR).

Programa Para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura <http://pgsa.sernapesca.cl/>

	potencial, acortamiento de tiempos de respuesta de bioensayos, decisiones informadas y eficientes.	
12:05-12:35	Inmunología y mecanismos involucrados en las respuestas del hospedero a infecciones prevalentes y co-infecciones en peces salmónidos.	Marco Rozas, Laboratorio Pathovet.
Almuerzo Libre 12:40-14:00		
14:00-14:30	Modulación de la inmunidad nutricional como estrategia de resistencia de salmones a la infección con <i>P. salmonis</i> .	Rodrigo Pulgar, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile.
14:30-15:00	Brechas de información cubiertas en relación al patógeno <i>P. salmonis</i> : Cepario, caracterización genómica, ubicación geográfica, ciclos, patogenicidad: Ideas y recomendaciones para vigilancia y control.	Álvaro Labra, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
Coffee 15:05-15:25 (20 minutos)		
15:30-16:00	Patrones de co-ocurrencia y sucesión temporal de enfermedades infecciosas prevalentes en salmónidos en fase marina de cultivo con Piscirickettsiosis.	Álvaro Sandoval, ADL Diagnostic Chile SpA.
16:00-16:30	Final Remarks PGSA Presente y futuro.	Marcela Lara, Coordinadora Ejecutiva de Proyectos, Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.
16:30 a 17:00	Panel de Discusión	
COCKTAIL DE CLAUSURA 17:10-18:00		

Hotel Park Inn by Radisson, Puerto Varas

Programa Para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura <http://pgsa.sernapesca.cl/>

REFERENCIAS PRINCIPALES

Bellanti, Francesco, Giovanni C. Del Vecchio, Maria C. Putti, et al. 2017 Population Pharmacokinetics and Dosing Recommendations for the Use of Deferiprone in Children Younger than 6 Years. *British Journal of Clinical Pharmacology* 83(3): 593-602.

Galdames, J. A., Zuñiga-Traslaviña, C., Reyes, A. E., and Feijóo, C. G. (2014). Gcsf-Chr19 promotes neutrophil migration to damaged tissue through blood vessels in zebrafish. *J. Immunol.* 193, 372-8. doi:10.4049/jimmunol.1303220.

Song, Ta-Shu, Yow-Wen Hsieh, Ching-Tien Peng, et al. 2012 Development of a Fast LC-MS/MS Assay for the Determination of Deferiprone in Human Plasma and Application to Pharmacokinetics. *Biomedical Chromatography: BMC* 26(12): 1575-1581.

Whiteside, Douglas P., Ian K. Barker, Peter D. Conlon, et al. 2007 a Pharmacokinetic Disposition of the Oral Iron Chelator Deferiprone in the White Leghorn Chicken. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 21(2): 110-120.

Whiteside, Douglas P., Ian K. Barker, Peter D. Conlon, et al. 2007b. Pharmacokinetic Disposition of the Oral Iron Chelator Deferiprone in the Domestic Pigeon (*Columba Livia*). *Journal of Avian Medicine and Surgery* 21(2): 121-129.

Tricta F, Uetrecht J, Galanello R, et al. Deferiprone-induced agranulocytosis: 20 years of clinical observations. *American Journal of Hematology.* 2016;91(10):1026-1031. doi:10.1002/ajh.24479.

Renshaw, S. A., Loynes, C. A., Trushell, D. M., Elworthy, S., Ingham, P. W., & Whyte, M. K. (2006). A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood*, 108(13), 3976-3978. Accessed March 27, 2018.