



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**CLONACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN DE
PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Aeromonas
veronii*: SU IMPLICACIÓN EN ADHESIÓN Y SU
POTENCIAL COMO VACUNAS DE ADN PARA PECES**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Roberto Carlos Vázquez Juárez

La Paz, B.C.S. Diciembre del 2003

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 15 del Mes de Diciembre de 2003, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

"Clonación molecular y caracterización de proteínas de membrana externa de *Aeromonas veronii*: su implicación en adhesión y su potencial como vacunas de ADN para peces"


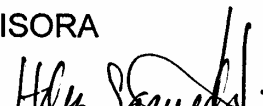


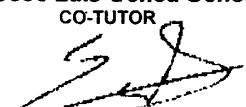
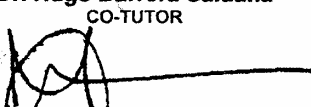

Presentada por el alumno:

Roberto Carlos Vázquez Juárez

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

 Dr. Felipe Ascencio Valle DIRECTOR DE TESIS	 Dra. Norma Hernández Saavedra CO-TUTOR
 Dr. José Luis Ochoa Ochoa CO-TUTOR	 Dr. Hugo Barrera Saldaña CO-TUTOR
 Dr. Jean Marc Egly CO-TUTOR	 Dra. Marta Gómez Chiarri CO-TUTOR
 DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO	

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

El presente trabajo de investigación se desarrolló principalmente en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana de la Unidad de Patología Marina del CIBNOR y en la U.L.I.E.G. de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., bajo la supervisión del Dr. Felipe Ascencio Valle y Dr. Hugo Barrera Saldaña, respectivamente.

El comité tutorial y revisor de tesis estuvo integrado por:

Dr. Felipe Ascencio Valle (Director)

Dra. Norma Hernández Saavedra (Tutor)

Dr. José Luis Ochoa Ochoa (Tutor)

Departamento de Patología Marina

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)

La Paz, B.C.S., México

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña (Tutor)

Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (U.L.I.E.G.)

Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.)

Monterrey, N.L., México

Dra. Marta Gómez Chiarri (Tutor)

Department of Fisheries, Animal and Veterinary Science

University of Rhode Island

Kingston, RI, USA.

Dr. Jean Marc Egly (Tutor)

Institute of Genetic and Molecular and Cellular Biology (IGMCB)

Strasbourg, France.

El comité sinodal estuvo integrado por:

Dr. Felipe Ascencio Valle Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Norma Hernández Saavedra Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. José Luis Ochoa Ochoa Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña Universidad Autónoma de Nuevo León

Dr. Humberto Mejía Ruíz Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Angel Campa (suplente) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Directora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Las *Aeromonas* móviles (*A. veronii*, *A. hydrophila* y *A. caviae*) son de las bacterias más comunes en ambientes acuáticos en todo el mundo. Con mayor frecuencia se han identificado como el agente etiológico de la septicemia hemorrágica bacteriana y otras condiciones ulcerativas en peces cultivados. Por otra parte, estas bacterias han sido implicadas en gastroenteritis y una variedad de infecciones extraintestinales en humanos. Por lo tanto, además de impactar negativamente en la industria del cultivo de peces, representan un riesgo en salud humana.

La vacunación se ha establecido como un método efectivo para la prevención de enfermedades infecciosas de peces cultivados; sin embargo, actualmente no existen vacunas disponibles contra las *Aeromonas* móviles.

La habilidad de un patógeno para adherirse y subsecuentemente infectar un hospedero susceptible es un paso primordial en el desarrollo de la enfermedad. Por ende, aquellas moléculas de adhesión producidas por las bacterias patógenas son importantes factores de virulencia y candidatos apropiados para el desarrollo de vacunas.

Con la finalidad de diseñar y construir una vacuna efectiva, segura y económica, contra las *Aeromonas* móviles, la presente tesis se enfocó en tres tareas: A) identificación de proteínas de superficie de *A. veronii* (adhesinas), implicadas en la adhesión a células epiteliales; B) clonación y caracterización molecular de los genes que codifican para dichas adhesinas y C) construcción de vacunas de ADN con los genes clonados como componentes antigénicos y evaluación de su potencial para la protección de peces contra infecciones por *A. veronii*. Los principales resultados se resumen en tres partes:

1) *Omp38 y Omp48: potenciales adhesinas.* Se identificaron dos proteínas de membrana externa (OMPs) de *A. veronii* de 38 y 48 kDa, que se denominaron Omp38 y Omp48, que mostraron afinidad por componentes de mucosas (mucina y lactoferrina) y por proteínas de la matriz extracelular (colágena y fibronectina). Esta propiedad está comúnmente asociada a adhesinas bacterianas. Anticuerpos policlonales contra Omp38 y Omp48 inhibieron significativamente la adhesión de *A. veronii* a células epiteliales *in vitro*, e inhibieron de manera cruzada, la adhesión de otras especies de *Aeromonas* y *Vibrio*. Además, Omp38 y Omp48 inhibieron competitivamente la adhesión de *A. veronii*. Estos resultados sugieren que ambas proteínas funcionan como factores de adhesión en *A. veronii* y que otras especies de *Aeromonas* y *Vibrio* poseen proteínas en su superficie con determinantes antigénicos conservados.

2) *Clonación de los genes omp38 y omp48.* Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron fragmentos de los genes *omp38* y *omp48*. Para clonar los genes completos se construyeron y tamizaron librerías genómicas y sub-genómicas de *A. veronii*. Sin embargo, debido a la posible toxicidad de los genes hacia la cepa de *E. coli* hospedera, éstos se tuvieron que clonar por medio de PCR inversa. Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas indican que Omp38 y Omp48 tienen características típicas de porinas bacterianas, incluyendo ausencia de cisteína, alto contenido de glicina, bajo contenido de prolina, punto isoeléctrico ácido y un péptido líder altamente hidrofóbico en su extremo N-terminal, con sitio de reconocimiento, [Ala-X-Ala], para la peptidasa señal I. Omp38 es similar a las porinas PhoE, OmpC y

OmpF de bacterias entéricas y posee una estructura secundaria teórica constituida por 8 asas y 16 láminas β antiparalelas, con residuos conservados importantes para la estructura-función de las porinas. Omp48 es similar a la familia de porinas LamB y su modelo de conformación secundaria consiste de 9 asas y 18 láminas β antiparalelas.

3) *Evaluación de las vacunas de ADN.* Para la construcción de las vacunas de ADN, denominadas pOMP38P y pOMP48P, se subclonaron los genes *omp38* y *omp48* en el vector de expresión pcDNA3.1, bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus. Se evaluó su efecto protector contra infecciones experimentales por *A. veronii* en cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), que es un recurso con potencial para la acuicultura regional. Como un ensayo preliminar, se analizó la expresión *in vitro* de Omp38 y Omp48 en células eucariotas a partir de pOMP38P y pOMP48P, la cual fue muy baja. Los peces vacunados intramuscularmente con las vacunas de ADN presentaron escasos, pero significativos niveles de anticuerpos anti-Omp38 y anti-Omp48 en suero, 4 y 6 semanas después de la vacunación, comparado con los peces vacunados con el plásmido pcDNA3.1 “vacío” o con solución de fosfatos. Los peces vacunados con pOMP38P, pOMP48P, o una mezcla de ambos, y retados con *A. veronii*, registraron un porcentaje relativo de supervivencia entre 50-60%. Los principales daños histológicos en bazo, hígado y riñón, que sufrieron los peces como consecuencia de la infección, se observaron en 40% de los peces inmunizados y en 80% en los peces control. Los resultados indican que la vacunación de cabrilla arenera con una sola dosis de vacunas de ADN que codifican para Omp38 u Omp48 no genera una respuesta humoral fuerte, pero confiere protección parcial contra infecciones experimentales con *A. veronii*.

Con esta investigación se amplía el conocimiento sobre los mecanismos de adhesión de *A. veronii* y establece, por vez primera, el potencial de los genes que codifican para OMPs de bacterias Gram-negativas como componentes antigénicos de vacunas de ADN para el control de infecciones bacterianas de peces cultivados.

Palabras clave: Proteínas de membrana externa, vacunas de ADN, *Aeromonas* spp., adhesión, porinas, clonación, peces, respuesta inmune.

ABSTRACT

Motile Aeromonads (*A. veronii*, *A. hydrophila*, and *A. caviae*) are among the most common bacteria in aquatic environments throughout the world. Frequently, these bacteria have been identified as the etiological agents of bacterial hemorrhagic septicemias and other ulcerative conditions in cultivated fish. Furthermore, motile Aeromonads have been implicated in human gastroenteritis and a variety of extra-intestinal infections, including arthritis, meningitis, wound and urinary tract infections, and septicemia. Therefore, in addition to the negative impact in the fish farming industry, these bacteria represent a risk to human health.

Although vaccination is established as an effective method for preventing of infectious diseases in cultivated fish, no vaccines against motile Aeromonads are available.

The ability of a pathogen to attach to, and subsequently infect a susceptible host is a primary step in the development of disease. Consequently, adhesion factors produced by bacterial pathogens, which facilitate contagion, are important elements in bacterial virulence, and therefore, are suitable targets for vaccine development.

For designing and constructing an effective, safe, and economical vaccine against motile Aeromonads, this thesis focused on the following procedures: A) Identification of surface proteins from *A. veronii*, involved in adhesion of bacteria to epithelial cells (adhesins); B) Molecular cloning and characterization of the genes encoding for adhesins; and C) Construction of DNA vaccines that include the cloned genes as antigenic components and evaluation of their potential to protect fish against *A. veronii* infections. The main findings are summarized in three parts:

1) *Omp38 and Omp48: potential adhesins.* Two *A. veronii* outer membrane proteins (OMP) of 38 and 48 kDa, named Omp38 and Omp48, showed affinity for mucosal components (mucin and lactoferrin) and extracellular matrix proteins (collagen and fibronectin). This binding property is commonly associated with bacterial adhesins. Polyclonal antibodies directed against Omp38 and Omp48 significantly inhibited adhesion of *A. veronii* to epithelial cells *in vitro*, and cross-inhibited adhesion of other *Aeromonas* and *Vibrio* species. Also, Omp38 and Omp48 competitively inhibited *A. veronii* adhesion. These results suggest that Omp38 and Omp48 act as adhesion factors in *A. veronii*, and that other *Aeromonas* and *Vibrio* species have surface proteins with conserved epitopes.

2) *Cloning of omp38 and omp48 genes.* Fragments of *omp38* and *omp48* were amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR). To clone entire genes, *A. veronii* genomic and sub-genomic libraries were constructed and screened. However, because of possible toxicity of the genes to *E. coli* hosts, they have to be cloned by inverse PCR. Amino acid sequences deduced from nucleotide sequences indicate that Omp38 and Omp48 possess typical characteristics of bacterial porins, including the lack of cysteine residues, high glycine content, low proline content, an acidic isoelectric point, and a highly hydrophobic leader peptide at the N-terminus with the conserved cleavage site [Ala-X-Ala] for signal peptidase I. Omp38 showed similarity to PhoE, OmpC, and OmpF porins from enteric bacteria and display a theoretical secondary structure consisting of 8 loops and 16 anti-parallel β strands with conserved amino acid residues relevant for porin structure-

function. Omp48 showed similarity to the LamB porin family and its secondary structure model consists of 9 loops and 18 anti-parallel β strands.

3) *Evaluation of DNA vaccines.* For construction of pOMP38P and pOMP48P DNA vaccines, *omp38* and *omp48* genes were subcloned in pcDNA3.1 expression vector, under control of cytomegalovirus early promoter. The protective effect of DNA vaccines against experimental *A. veronii* infection in spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*), a potential resource for regional aquaculture, was evaluated. In preliminary assays, expression of Omp38 and Omp48 in eukaryotic cells *in vitro* from pOMP38P and pOMP48P was very low. Fish vaccinated intramuscularly with DNA vaccines showed slight, but significant anti-Omp38 and anti-Omp48 serum antibody levels 4 and 6 weeks after vaccination, compared to fish vaccinated with “empty” pcDNA3.1 vector or phosphate-buffered saline. Fish vaccinated with pOMP38P, pOMP48P, or a mixture of them, and then challenged with *A. veronii*, exhibited a relative percent survival from 50-60%. The main histological damage in the spleen, liver, and kidney in fish, as a consequence of *A. veronii* infection, were observed in 40% of the immunized fish and 80% of the control fish. These results indicate that vaccination of spotted sand bass with a single dose of DNA vaccines encoding Omp38 or Omp48 failed to induce a strong humoral immune response, but conferred partial protection against *A. veronii* experimental infection.

This research expands the body of knowledge concerning *A. veronii* adhesion mechanism, and established for the first time, the potential of genes coding for OMP from Gram-negative bacteria, as antigenic components of DNA vaccines for the control of bacterial infections in cultured fish.

Keywords: Outer membrane proteins, DNA vaccines, *Aeromonas* spp., adhesion, porins, cloning, fish, immune response.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este logro a mis amados padres,

María de Jesús Juárez
(la que se ríe bien bonito)

y

José Vázquez Vázquez
(mi jefecito)

*Por darme una gran Familia, una educación y ganas de vivir y ser feliz.
Dios los mantenga a mi lado por mucho tiempo.*

A mis compadres y hermanos

José Manuel (Pepe), Ricardo (Ricas), Benito (Benó), Jorge (Boscán), Héctor (Zurdo), Enrique (Chino) y Jorge Armando (Jorgín).

*Nada más de decir sus nombres se me inflama el pecho.
Cada día que pasa los quiero más.*

A Juany

*Estoy orgulloso de ti hermanita mía.
Tienes un gran corazón. Gracias por quererme tanto.*

A mis cuñadas y todos mis sobrinos

Todos juntos han traído más felicidad a la gran Familia.

A Juanita Zapata

Mi prima y amiga que está en el cielo.

A Ricardo, Mauri, Ale y Abril

*Mi querida familia chiquita.
Gracias por todo.*

A mi querida novia

Itzel Sifuentes Romero
Un ángel que llegó del cielo.

A Monterrey y a la música

AGRADECIMIENTOS

Esta parte de la tesis resultó ser la más difícil de escribir. Por un lado, es tanta la gente que me ha ayudado de una u otra forma, que tengo miedo omitir a alguien por descuido. De antemano, les ofrezco una disculpa. Por otra parte, no encuentro las palabras para plasmar mi gratitud. Nuestro vocabulario se torna limitado al tratar de expresar acertadamente esta sensación de profundo agradecimiento hacia tanta, tanta gente.....

Un agradecimiento especial a mi director de tesis, Dr. Felipe Ascencio Valle, que me dio todas las facilidades y libertades para llevar a cabo mi trabajo de investigación. Gracias por los consejos brindados para mi formación doctoral y para mi nueva etapa como investigador que está por comenzar. Gracias por ser un buen amigo.

Mi entera gratitud a los miembros de mi comité tutorial y revisor de tesis: Dra. Marta Gómez Chiarri, Dra. Norma Hernández Saavedra, Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, Dr. José Luis Ochoa Ochoa y Dr. Jean Marc Egly, por compartir conmigo su experiencia, por sus sugerencias y críticas, y por estimularme para sacar adelante este trabajo. Gracias también al Dr. Humberto Mejía por aceptar ser parte del comité de sinodales, por sus comentarios y porque siempre me ha apoyado.

Las contribuciones de la Dra. Marta Gómez-Chiarri (University of Rhode Island) a esta tesis son fundamentales. Le estoy profundamente agradecido por transmitirme su experiencia en vacunas de ADN, por sus atinadas sugerencias en la elaboración de los manuscritos, por su hospitalidad durante mi estancia en su laboratorio y por ser una gran persona y buena amiga.

Gracias al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, por haber depositado su confianza en mí y en mi proyecto de tesis, por su amistad y por empujarme siempre a dar lo mejor de mi mismo, con lo cual me gané un lugar en la U.L.I.E.G. de la Facultad de Medicina de la UANL. Además de los conocimientos en Biología Molecular, ahí encontré grandes amigos que me enseñaron a hacer ciencia y al mismo tiempo divertirme (o viceversa): Dra. Agnes Revol, Claudio Moreno Rocha, Víctor Treviño e Iván Coliman.

Al CONACYT le agradezco por otorgarme la beca No.121100. Gracias también a las organizaciones que me beneficiaron con su distinción y apoyo para mi formación académica: Academia Mexicana de Ciencias, American Chemical Society, U. S. National Academy of Sciences, American Society for Microbiology, University of Rhode Island Foundation y la UNESCO.

Gracias a la Dra. Thelma Castellanos Cervantes, Directora del Posgrado del CIBNOR, por su apoyo y respaldo que me permitieron llevar mi trabajo de tesis a buen término.

En el CIBNOR encontré apoyo siempre que lo necesité, gracias a mucha gente que hace su trabajo eficientemente y con fina atención. Agradezco al personal de Posgrado, Administración, Biblioteca, Informática y Redes.

Una parte de la escritura de esta tesis se generó en el estimulante ambiente de la University of Texas Medical Branch (*UTMB, Department of Microbiology and Immunology*), durante una estancia en el laboratorio del Dr. Alfredo G. Torres, excelente científico, persona y amigo quien además de enseñarme algunos aspectos de mutagénesis y adhesión bacteriana, enriqueció mi trabajo con valiosos comentarios y sugerencias. Gracias a él y a Susy Oaxaca, Anita Torres-Oaxaca, Dr. Ignacio Martínez (Nacho), Chris Tutt y Khoa Nuygen por brindarme su gran amistad y hospitalidad.

Gracias a la colaboración con la Dra. Silvie Dumas del CICIMAR, pude contar con los peces y las instalaciones necesarias para la evaluación de las vacunas. Ella, al igual que los estudiantes de la UPIMA (Renato, Alfonso, Mariana, Romeo, Martín, Pablo, etc.), siempre me brindaron su ayuda y estuvieron al pendiente de mis organismos.

Agradezco enormemente el entusiasmo, el apoyo y las facilidades prestadas por Gaby Roldán, de la Unidad Pichilingue de la UABCS para la realización de los bioensayos de inmunoprotección.

Agradezco a los amigos que con sus conocimientos me ayudaron a hacer mi trabajo experimental menos pesado: Tony Guzmán (cultivo de células, inmunización y toma de muestras), Arturo Sierra (cultivo de células y producción de anticuerpos anti-Igs de peces) y Carmen Rodríguez (Histología); y a los amigos que me asistieron en los bioensayos y en el manejo de los peces: Edgar Rueda, Toño Luna, Edilmar Cortés, Gabriel Aguirre.

Agradezco la ayuda para la secuenciación de proteínas por parte del Dr. Ronald J. Doyle (q.e.p.d.) (University of Louisville, USA), Dr. Lourival D. Posanni (Instituto de Biotecnología de la UNAM) y Dr. Jean Marc Egly (Institute of Genetic and Molecular and Cellular Biology, France).

Agradezco a todos mis compañeros y amigos del CIBNOR, alumnos de Doctorado, de Maestría y de la Unidad de Patología Marina, quienes con su amistad y buen humor siempre han estado prestos para apoyarme. Durante este tiempo que hemos crecido juntos, con éxitos y fracasos, han dejado huella en mí para siempre.

Le agradezco al Dr. Angel Campa por compartir conmigo su cubículo, por el café, por las amenas charlas y por su gran amistad; al igual que a María de Jesús Romero (La Chula) por la fe que siempre me ha manifestado y por sus palabras de aliento.

Gracias a mis amigos “los vaqueros”, Edgar (Chapito) y Jaime (Holpe) y a “los cable-guys”, Roxana (Rosita) y Manuel (Lobo), por las convivencias, por su buen humor y por su valiosa amistad.

Un agradecimiento a mis camaradas de la carrera de Biología Marina de la UABCS, Pablo, Edgar, Chava y Tere, Chucho e Irma, Pedro, Armando, Juan Pedro y Caroline, Paty, Susy, Marcelo, a quienes encontré un poco más viejos (me refiero a los señores), pero afortunadamente con la misma sonrisa jovial de antaño.

Doy las gracias a la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. donde se asentaron las bases de mi formación profesional, en especial a mis mentores y amigos: Dr. Benito Pereyra Alférez y Jorge Miguel Saldaña Acosta (el Chuco).

Agradezco a esos grandes amigos (puro Monterrey!) que aunque lejos en tiempo y/o distancia, siempre han estado conmigo: Jaibol, Tuga, Rolando y Faby, Sigifredo y Silvia (Adrián, Perla y Fredy), Damián, Noe, Arturo Meza, Lupillo, Trino, Yuca, Turín, Tongo, ...

Un agradecimiento de todo corazón a la distinguida gran Familia Rojas Contreras que ha sido mi familia aquí en La Paz. Ellos son dignos representantes de la de la familia sudcaliforniana y ejemplo de calidez y hospitalidad.

Todo mi agradecimiento a mi novia Itzel Sifuentes por apoyarme incondicionalmente, por su cariño y por estimularme a seguir creciendo. Gracias también a la señora Blanca Romero por su amistad, sus palabras de apoyo y sus bendiciones.

Maurilia y Ricardo, mis grandes amigos. Sin Ustedes, simplemente nada de esto hubiera sido posible. Les estoy eternamente agradecido y espero corresponderles con creces lo mucho que han hecho por mí.

MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!

***Some people achieve their goals because they are destined to,
Others achieve because they are determined to.***

PREFACIO

Esta tesis esta basada en los siguientes artículos y manuscritos, que serán referidos por sus números romanos (I-IV):

- I. **Vázquez-Juárez, R.C.**, Barrera-Saldaña, H.A., Hernández-Saavedra, N.Y Gómez-Chiarri, M. and Ascencio, F. (2003). Molecular cloning, sequencing and characterization of *omp48*, the gene encoding for an antigenic outer membrane protein from *Aeromonas veronii*. *Journal of Applied Microbiology* **94**: 908-918.
- II. **Vázquez-Juárez, R.C.**, Romero-Geraldo, M.J. and Ascencio, F. (2004). Adhesive properties of a LamB-like outer membrane protein and its contribution to *Aeromonas veronii* adhesion. *Journal of Applied Microbiology*. (En prensa).
- III. **Vázquez-Juárez, R.C.**, Barrera-Saldaña, H.A., Gómez-Chiarri, M., Hernández-Saavedra, N.Y. and Ascencio, F. (2003). Gene cloning and characterization of *Omp38* from *Aeromonas veronii*: a potential adherence factor. (Manuscrito en consideración).
- IV. **Vázquez-Juárez, R.C.**, Gómez-Chiarri, M., Barrera-Saldaña, H.A., Hernández-Saavedra, N.Y., Dumas, S. and Ascencio, F. (2003). Evaluation of DNA vaccination of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) with two major outer-membrane protein-encoding genes from *Aeromonas veronii*. (Manuscrito en consideración).

Parte de la información generada se presentó en el siguiente congreso internacional:

- V. **Vázquez-Juárez, R.C.**, Hernández-Saavedra, N.Y Gómez-Chiarri, M., Barrera-Saldaña, H.A. and Ascencio, F. (2003). Cloning and characterization of *omp38* and *omp48* from *Aeromonas veronii* for the construction of fish DNA vaccines. **Internacional Marine Biotechnology Conference** 2003. September 21-27, 2003. Chiba, Japan.

Secuencias depositadas en el GenBank:

- VI. **Vázquez-Juárez, R.C.**, *et al.* (2003). *Aeromonas veronii* *Omp38* protein precursor (*omp38*), complete cds. AF538867. GenBank (NCBI).
- VII. **Vázquez-Juárez, R.C.** *et al.* (2003). *Aeromonas veronii* *Omp48* protein precursor (*omp48*), complete cds. AF538866. GenBank (NCBI).

ÍNDICE

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS.....	i
CONFORMACIÓN DE COMITÉS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
PREFACIO.....	x
ÍNDICE.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABLAS	xv
ABREVIATURAS	xvi
I. INTRODUCCION.....	1
1. LAS <i>AEROMONAS</i>	1
1.1. Descripción del género	1
1.2. <i>Aeromonas veronii</i> : patógeno de humanos y peces.....	1
1.3. La adhesión bacteriana en la patogénesis	3
1.4. Proteínas de membrana externa.....	4
2. EL CULTIVO DE PECES MARINOS.....	5
2.1. Relevancia económica.....	5
2.2. Las enfermedades infecciosas de peces.....	6
2.3. Métodos de control: vacunas para peces	8
3. VACUNAS DE ADN	11
4. SISTEMA INMUNE DE PECES TELEOSTEOS.....	14
4.1. Respuesta humoral no específica	16
4.2. Respuesta celular no específica.....	18
4.3. Respuesta humoral específica	19
4.4. Respuesta celular específica	20
4.5. Respuesta inmune a las vacunas de ADN.....	20
5. JUSTIFICACIÓN.....	22
6. HIPÓTESIS.....	24
II. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo general.....	25
2.2. Objetivos específicos	25
III. METODOLOGÍA	26
IV. RESULTADOS.....	28
1. Identificación y purificación de las principales OMPs de <i>A. veronii</i>	28
2. Contribución de <i>Omp38</i> y <i>Omp48</i> a la adherencia de <i>A. veronii</i>	30
2.1. Interacción con glicoproteínas.....	30
2.2. Adhesión a células epiteliales	31
3. Clonación de los genes <i>omp38</i> y <i>omp48</i>	34
3.1. Amplificación de fragmentos génicos por PCR.....	34
3.2. Construcción y tamizaje de una librería genómica de <i>A. veronii</i>	37
3.3. Southern blot.....	37

3.4. PCR inversa y secuenciación génica.....	37
4. Caracterización del gen <i>omp38</i>	40
5. Caracterización del gen <i>omp48</i>	44
6. Construcción de vacunas de ADN.....	47
6.1. Amplificación y subclonación de <i>omp38</i> y <i>omp48</i> en <i>pcDNA3.1</i>	47
6.2. Expresión <i>in vitro</i> de <i>Omp38</i> y <i>Omp48</i> en células eucariotas.....	50
7. Vacunación genética de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	51
7.1. Respuesta inmune humoral	52
7.2. Inmunoprotección contra <i>A. veronii</i>	52
V. DISCUSIÓN	56
1. <i>Omp38</i> y <i>Omp48</i> : potenciales adhesinas de <i>A. veronii</i>	56
2. Clonación y caracterización molecular de <i>omp38</i> y <i>omp48</i>	60
3. Diseño, construcción y evaluación de vacunas de ADN para peces.....	63
VI. CONCLUSIONES.....	66
VII. REFERENCIAS.....	68
ANEXOS.....	82
ANEXO I.....	83
ANEXO II	95
ANEXO III.....	105
ANEXO IV.....	117
ANEXO V	127
ANEXO VI.....	130
ANEXO VII	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo general de la metodología empleada en este trabajo.	26
Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% (A) y Western blot (B) de las proteínas precipitadas del sobrenadante de cultivo de <i>A. veronii</i>	28
Figura 3. SDS-PAGE al 12% de las proteínas de membrana externa (OMPs) de <i>A. veronii</i> expresadas bajo diferentes condiciones de cultivo.	29
Figura 4. Interacción de Omp38 y Omp48 con glicoproteínas.	31
Figura 5. Adhesión de <i>A. veronii</i> a células HeLa.	32
Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de proteínas tipo LamB de diferentes especies bacterianas.	34
Figura 7. Productos de amplificación por PCR del gen <i>omp48</i> con diferentes combinaciones de oligonucleótidos.	35
Figura 8. Fragmentos del gen <i>omp38</i> amplificadas por PCR con diferentes combinaciones de oligonucleótidos.	36
Figura 9. Representación esquemática del proceso de la PCR inversa.	39
Figura 10. Productos de amplificación por PCR inversa.	40
Figura 11. Secuencia nucleotídica del gen <i>omp38</i> de <i>A. veronii</i> y su secuencia de aminoácidos deducida.	41
Figura 12. Gráfica de hidrofobicidad Kyte-Doolittle de Omp38.	43
Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de Omp38 con porinas de estructura conocida.	43
Figura 14. Modelo teórico de estructura secundaria de Omp38.	44
Figura 15. Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del gen <i>omp48</i> de <i>A. veronii</i>	45
Figura 16. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de Omp48 con LamB de <i>E. coli</i>	47

Figura 17. Amplificación de los genes <i>omp38</i> y <i>omp48</i> por PCR y vectores de expresión construidos.	49
Figura 18. Diagrama esquemático de la construcción de las vacunas de ADN.	50
Figura 19. Análisis de la expresión de Omp38 y Omp48 en células HeLa.	51
Figura 20. Detección de anticuerpos anti-Omp38 y anti-Omp48 en suero de peces vacunados con los plásmidos pOMP38P y pOMP48P.	52
Figura 21. Principales daños histológicos observados en peces infectados.	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales bacterias patógenas de peces.....	7
Tabla 2. Vacunas bacterianas para peces.....	9
Tabla 3. Mecanismos de defensa de peces frente a bacterias.	15
Tabla 4. Secuencia de aminoácidos del N-terminal y péptidos internos de Omp38 y Omp48.	30
Tabla 5. Efecto inhibitorio de carbohidratos y glicoproteínas en la unión de Omp48 a Mucina, Lactoferrina y Colágena.	32
Tabla 6. Adhesión de <i>Aeromonas</i> spp. a células HeLa en presencia o ausencia de antisuero anti-Omp48 o de Omp48.	33
Tabla 7. Adhesión de <i>Aeromonas</i> spp. y <i>Vibrio</i> spp. a células HeLa en presencia o ausencia de antisuero anti-Omp38 o de Omp38.	33
Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias conservadas y N-terminal de Omp48.	35
Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados a partir de N-terminal y péptidos internos de Omp38.	36
Tabla 10. Oligonucleótidos usados para la PCR inversa.	38
Tabla 11. Similitud de Omp38 con porinas bacterianas relacionadas.	42
Tabla 12. Similitud de Omp48 con maltoporinas de la familia LamB.....	47
Tabla 13. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes <i>omp38</i> y <i>omp48</i>	48
Tabla 14. Mortalidad acumulada y porcentaje relativo de supervivencia de peces inmunizados con las vacunas de ADN y retados con <i>A. veronii</i>	53
Tabla 15. Porcentaje de peces con alteraciones histológicas en diversos tejidos.	53

ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxiribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
°C	Grados Celsius
CMV	Citomegalovirus
dNTPs	Mezcla de Desoxiribonucleótidos Trifosfatados
EDTA	Acido etilen-diamino-tetracético (siglas en inglés)
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (siglas en inglés)
<i>et al.</i>	y colaboradores (abreviación en latín)
h	Hora (s)
Ig	Inmunoglobulina
kDa	Kilodaltones
kpb	Kilopares de bases
l	Litro
LPS	Lipopolisacáridos
M	Concentración molar
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (siglas en inglés)
mM	Concentración milimolar
mg	Miligramo (s)
µg	Microgramo (s)
min	Minutos
ml	Mililitros
µl	Microlitro (s)
ng	Nanogramo (s)
OMPs	Proteínas de membrana externa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
Pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
PRS	Porcentaje relativo de supervivencia
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sodio (siglas en inglés)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (siglas en inglés)
s	Segundos
spp	Especies
%	Porcentaje

I. INTRODUCCIÓN

1. LAS *AEROMONAS*

1.1. Descripción del género

El género *Aeromonas* es un grupo complejo de bacterias ubicuas que han sido frecuentemente aisladas de muestras clínicas, ambientales y de alimentos. Son bacterias Gram-negativas con forma de bacilos ($0.5\mu \times 1.0-1.5\mu$), no esporuladas, algunas presentan flagelo polar y/o lateral monotrico. Son aeróbicas y anaeróbicas facultativas, heterótrofas, producen oxidasa y catalasa, fermentan glucosa y otros carbohidratos con la producción de ácido y gas, reducen nitratos a nitritos, y producen numerosas exoenzimas, incluyendo gelatinasa, caseinasa, elastasa, lipasa, lecitinasa y desoxiribonucleasa. Su temperatura de crecimiento se encuentra en el rango de 4-41°C, con un óptimo de 22-30°C (Janda y Abbott, 1998).

En términos generales, las *Aeromonas* se han dividido en dos grupos: las *Aeromonas* mesófilas móviles, representado por *A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. caviae*, que normalmente se encuentran en los ecosistemas acuáticos; y el grupo de las *Aeromonas* psicrófilas no móviles, cuya especie prototipo, *A. salmonicida*, es un patógeno obligado de peces (Austin y Adams, 1996; Janda y Abbott, 1998). Debido a lo heterogéneo de sus características bioquímicas, genéticas y serológicas, su posición taxonómica ha sido muy inestable. El género *Aeromonas* tradicionalmente se había clasificado dentro de la familia Vibrionaceae, sin embargo, Colwell *et al.* (1986) establecieron en base a su secuencia de ARNr 16S que este grupo constituye una familia separada: la Aeromonadaceae.

1.2. *Aeromonas veronii*: patógeno de humanos y peces

Aunque la relevancia clínica de las *Aeromonas* es controversial, algunos miembros del género son considerados patógenos primarios u oportunistas de humanos, e importantes patógenos de numerosas especies de peces y otros animales como reptiles y anfibios (Janda, 1991; Austin y Austin, 1999; Janda y Abbott, 1998; Simmaco *et al.*, 1998). Cinco especies han sido asociadas con enfermedades en humanos: *A. hydrophila*, *A. veronii*

biotipo *veronii*, *A. veronii* biotipo sobria, *A. caviae*, *A. jandaei* y *A. schubertii* (Janda y Abbott, 1996; 1998).

Ambos biotipos de *A. veronii* son considerados como patógenos emergentes y se han descrito como los agentes etiológicos de infecciones gastrointestinales en humanos (Hickman-Brenner *et al.*, 1987; Stelma *et al.*, 1988), y un amplio espectro de infecciones extraintestinales, incluyendo septicemia, meningitis, infecciones de heridas, infecciones del tracto urinario y artritis séptica (Neves *et al.*, 1990; Joseph *et al.*, 1991; Abbot *et al.*, 1994; Kirov y Sanderson, 1996; Hsueh *et al.*, 1998; Janda y Abbott 1998; Steinfeld *et al.*, 1998, Mencacci *et al.*, 2003). Debido al cuadro clínico que genera y a su característica particular de ser positiva para la ornitín-descarboxilasa, *A. veronii* biotipo *veronii* ha llegado a ser erróneamente identificada en muestras clínicas como *Vibrio cholerae*, ocasionando con esto una subestimación de su impacto epidemiológico (Abbot *et al.*, 1994)

Por otra parte, *A. veronii* es el agente causal de la septicemia hemorrágica de peces cultivados en aguas templadas, conocida como septicemia de las *Aeromonas* móviles, la cual se caracteriza por una diseminación generalizada del tipo bacteremia, seguida por la elaboración de toxinas y necrosis de los tejidos. La septicemia de las *Aeromonas* móviles se caracteriza externamente por la presencia de pequeñas lesiones en la superficie de los peces (ocasionando la pérdida de escamas), hemorragias locales en agallas y ano, úlceras, abscesos, exoftalmia y distensión abdominal. Internamente se llega a presentar fluido seroso en la cavidad peritoneal, hiper-anemia de las vísceras e hinchazón del riñón e hígado (Austin y Adams, 1996; Austin y Austin, 1999). Histológicamente la condición es caracterizada por una septicemia necrotizante generalizada, capilares hiper-anémicos y hemorrágicos, con un alto nivel de macrófagos y otros leucocitos. Las lesiones son generalmente áreas focales o zonas de necrosis licuefactiva aguda y son particularmente aparentes en el bazo y en el riñón, donde el tejido hematopoyético puede estar completamente destruido. En el riñón, las células epiteliales tubulares se encuentran desprendidas hacia el interior del lumen y sólo el glomérulo se mantiene intacto, rodeado por una congregación de tejido tubular y hematopoyético necrotizado (Roberts, 1993).

Al igual que *A. salmonicida* y *A. hydrophila*, *A. veronii* es cada vez más reconocida como un importante problema económico para la industria acuacultora por la mortalidad y

morbilidad que producen en peces de importancia comercial (Austin y Austin, 1999). Además de esto, representa un problema de salud pública, debido al riesgo potencial de infección en humanos por consumo de peces contaminados.

1.3. La adhesión bacteriana en la patogénesis

La adhesión a un sustrato adecuado es el primer paso del proceso patogénico que permite la colonización del hospedero por parte del microorganismo. Para la mayoría de los microorganismos, la capacidad de adherirse a la mucosa epitelial es esencial para la colonización y el desarrollo subsecuente de la enfermedad. Los factores de adhesión o adhesinas son proteínas, lípidos o glicoconjugados bacterianos involucrados en las primeras etapas de colonización, a través de la interacción entre la bacteria y la superficie celular del hospedero. Se ha demostrado que muchos tipos de fimbrias y hemaglutininas de varios patógenos, incluyendo a *E. coli* enterotoxigénica, *Neisseria gonorrhoeae* y *Bordetella pertussis*, funcionan como adhesinas (Ofek y Doyle, 1994).

Para adherirse a la superficie epitelial de sus hospederos, además de las interacciones hidrofóbicas y las fuerzas electrostáticas no específicas, las bacterias utilizan proteínas de su superficie con afinidad específica por proteínas del plasma, por componentes de la matriz extracelular y por constituyentes de la mucosa epitelial. En algunos casos se ha demostrado que existe correlación entre la virulencia de las bacterias patógenas y su capacidad para adherirse a estas glicoproteínas (Westerlund y Korhonen, 1993; Carnoy *et al.*, 1994; Dubreuil *et al.*, 2002).

Numerosos factores de virulencia han sido descritos y caracterizados en *Aeromonas* spp., principalmente toxinas, sin embargo, se sabe poco de aquellos involucrados en adherencia. A pesar de que se ha propuesto que su capacidad adhesiva esta asociada con su potencial patogénico, las adhesinas de *Aeromonas* spp. han recibido poca atención en comparación con la de otras bacterias adherentes. El mecanismo de adhesión de estas bacterias parece ser un proceso complejo que involucra la expresión de varios factores de manera secuencial o simultánea. Algunos elementos de *Aeromonas* spp. que se han propuesto como factores de adhesión, incluyen al antígeno O de los lipopolisacáridos (LPS) (Merino *et al.*, 1996), el flagelo polar o lateral (Rabaan *et al.*, 2001; Gavin *et al.*, 2002) y el

pili tipo IV (Kirov *et al.*, 1999). Sin embargo, la existencia de cepas carentes del antígeno O de los LPS o cepas carentes de fimbrias entre los diversos aislados clínicos, que siguen presentando propiedades adhesivas, sugiere la presencia de factores de adherencia alternativos en estas bacterias (Sakazaki y Shimada, 1984; Nishikawa *et al.*, 1991, 1994; Kirov *et al.*, 1995).

1.4. Proteínas de membrana externa

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas contiene una variedad de proteínas transmembranales. Algunas de estas proteínas de membrana externa (OMPs), llamadas porinas, se presentan de manera abundante formando canales hidrofílicos que funcionan como tamices moleculares para permitir la difusión de pequeños solutos a través de la membrana externa, y también sirven como receptores de bacteriófagos y bacteriocinas. De acuerdo a la selectividad de los solutos que pasan a través de las porinas, éstas pueden ser específicas, como en el caso de LamB, o no específicas, como OmpC y OmpF (Jeanteur *et al.*, 1991; Nikaido, 1992). Las OMPs tipo porinas son altamente inmunogénicas, debido a sus determinantes antigénicos que se encuentran expuestos en la superficie de las bacterias. Las porinas están antigénicamente relacionadas debido a la considerable similitud que presentan en sus estructuras primaria y secundaria (Jeanteur *et al.*, 1991).

A algunas OMPs de *A. hydrophila* y *A. caviae* se les han atribuido propiedades como potenciales factores de adhesión (Fang *et al.*, 1998; Rocha-de-Souza *et al.*, 2001). Igualmente, esto se ha propuesto en otros importantes enteropatógenos tales como *V. cholerae* (Sperandio *et al.*, 1995), *E. coli* enterohemorrágica (McKee *et al.*, 1995), *Yersinia pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* (Paerregaard *et al.*, 1991).

Por otra parte, el potencial antigénico de las OMPs de diversas especies patógenas ya ha sido demostrado. Entre algunos ejemplos se incluyen OMPs de *Pseudomonas aeruginosa* (Gilleland *et al.*, 1988), *Salmonella typhimurium* (Matsui y Arai, 1990; Tabaraie *et al.*, 1994), *Neisseria meningitidis* (Nurminen *et al.*, 1992), *A. hydrophila* (Fang *et al.*, 2000; Rahman y Kawai, 2000) y *A. salmonicida* (Dodsworth *et al.*, 1993; Hirst y Ellis, 1994; Lutwyche *et al.*, 1995; Bricknell *et al.*, 1999). Debido a estas características, las

OMPs son consideradas como candidatos adecuados para el desarrollo de vacunas contra bacterias patógenas Gram-negativas.

2. EL CULTIVO DE PECES MARINOS

2.1. Relevancia económica

Desde 1990 ha sido nulo o muy poco el cambio en el nivel de la explotación de los recursos marinos. Algunas de las principales reservas de peces han sido explotadas considerablemente, impidiendo su expansión. Actualmente una gran cantidad del aporte de los recursos piscícolas para consumo humano a nivel mundial es a través de los peces de cultivo y esta tendencia va en aumento. Mientras que la captura de peces silvestres se ha estancado en aproximadamente 90 millones de toneladas anuales, la cantidad de peces cultivados se incrementó de 10 millones de toneladas en 1984 a más de 20 millones de toneladas en 1996 y se ha estimado que para el año 2010 la producción total por acuicultura alcanzará los 35-40 millones de toneladas de peces y mariscos (FAO, 1997; 1999; Feidi, 2000). A pesar de estas cifras, existe todavía un rezago en la producción mundial de peces marinos, siendo ésta de apenas el 2-3% del total de las especies producidas por acuicultura (FAO, 1997; 1999). Por otra parte, se ha estimado que la demanda de peces y mariscos para consumo humano será de 140-150 millones de toneladas en año 2010 y hasta 270 millones de toneladas en el 2050; y se espera que la acuicultura mundial de peces marinos aporte una cantidad importante de estos requerimientos (Feidi, 2000; Wijkstrom, 2003).

Si bien los países asiáticos continúan con el dominio en la producción mundial de organismos por medio de acuicultura con más del 80%, el cultivo de peces marinos se está expandiendo hacia regiones importantes de América, incluyendo el sur de los Estados Unidos, México, y otros países del Caribe y Latinoamérica, lo cual repercutirá positivamente en la producción mundial (FAO, 1997; 1999). Algunas especies de peces marinos con potencial económico en América Latina son los huachinangos (*Lutjanus* spp.), el dorado (*Coryphaena hippurus*), los jureles (*Seriola* spp., *Carnax* spp.), la cobia (*Tachycentrum canadum*), los meros (*Epinephelus* spp.), las cabrillas (*Paralabrax* spp.), y los lenguados (*Paralichthys* spp.) (Benetti *et al.*, 2001). En México, el cultivo de peces

marinos es una práctica incipiente a pesar de que tiene un gran potencial, por lo que varias instituciones de investigación se han enfocado al desarrollo científico y tecnológico del cultivo de especies locales de importancia comercial. En particular, la región Noroeste del país cuenta con numerosos recursos ya que en el Golfo de California se localizan 866 especies de peces, que corresponden a más del 55% de todas las familias conocidas (Van der Heiden, 1985). En la península de Baja California y en estados como Sonora y Sinaloa, se están realizando desde 1990 estudios básicos y cultivos piloto de pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*), botete (*Sphoeroides annulatus*), pargo rayado (*L. aratus*), pargo colorado o huachinango (*L. peru*) y cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) con la finalidad de probar su factibilidad comercial bajo un sistemas de cultivo intensivo (Barrera-Guevara *et al.*, 1994; Rodríguez-Ortega *et al.*, 1994). La cabrilla arenera, especie endémica de la costa Noroeste, ha sido la especie más estudiada, en vista de que reúne las características biológicas y etológicas deseables para su cultivo, además de que tiene un alto valor comercial (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995). La pobre explotación de este recurso, a pesar de su abundancia y de que es considerada como pescado de primera calidad (Van der Heiden, 1985), no obedece a la falta de mercado, sino más bien a la falta de oferta. Dada la baja utilización del recurso por parte de la pesca comercial, se ha sugerido su cultivo como una alternativa de explotación (Arvizu *et al.*, 1990, Avilés-Quevedo *et al.*, 1995). A este respecto, se están evaluando posibilidades que van desde su cultivo intensivo con producción de semilla, hasta la captura de juveniles y su engorda para alcanzar tallas comerciales (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995; Cadena-Roa y Roldan, 1995)

2.2. Las enfermedades infecciosas de peces

Las enfermedades infecciosas ocasionadas por agentes patógenos como virus, bacterias y otros parásitos, ocurren naturalmente como eventos esporádicos en las poblaciones silvestres de peces. Sin embargo, cuando éstas se presentan en el cultivo intensivo de peces, pueden causar serios problemas que van desde un lento crecimiento, y la reducción de la tasa de fertilidad (aunque sin presentar manifestaciones patológicas), hasta la aparición de severas epizootias, caracterizadas por altas mortalidades. Esta

susceptibilidad es una consecuencia del estrés al que son sometidos los organismos bajo este tipo de cultivo (Austin y Austin, 1999). Entre las enfermedades infecciosas que afectan a los peces en cultivo, destacan las ocasionadas por bacterias. Los principales patógenos bacterianos de peces se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales bacterias patógenas de peces.

Gram-negativas: Familia, Especie		
Enterobacteriaceae	Vibrionaceae	Aeromonadaceae
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Vibrio ordalii</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
<i>Proteus retzgeri</i>	<i>Vibrio salmonicida</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	
<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Vibrio viscosus</i>	
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
	<i>Vibrio harveyi</i>	
	<i>Photobacterium damsela</i>	
Pasteurellaceae	Cytophagaceae	Flavobacteriaceae
<i>Pasteurella piscicida</i>	<i>Flexibacter psychrophilus</i>	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Flexibacter columnaris</i>	<i>Flavobacterium branchiophila</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Flexibacter maritimus</i>	<i>Flavobacterium columnaris</i>
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>		
<i>Pseudomonas chlororaphus</i>		
Gram-positivas: Familia, Especie		
Streptococcaceae	Micobacteriaceae	Nocardiaceae
<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>	<i>Nocardia asteroides</i>
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Nocardia kampachi</i>
<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>	
Micrococcaceae	Carnobacteriaceae	Aerococcaceae
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Aerococcus viridans</i>

Tomada de Inglis *et al.* (1993).

Algunos son considerados patógenos primarios, es decir, son capaces de infectar peces bajo mínimas condiciones de estrés, mientras que otros son patógenos secundarios, los cuales sólo pueden invadir peces altamente estresados y/o que ya han sido previamente infectados. Estas bacterias tienen como hospedero a numerosas especies de peces de importancia comercial, y tienen amplia distribución mundial, ya que crecen en un amplio

rango de temperaturas. Las principales enfermedades bacterianas en peces marinos de zonas tropicales son ocasionadas por especies de los géneros *Aeromonas* y *Vibrio* (Inglis *et al.*, 1993; Austin y Austin, 1999).

Estas bacterias pueden estar asociadas a numerosas patologías, pero tres de ellas son arquetípicas: *i*) la septicemia, caracterizada por la presencia de bacterias en virtualmente todos los órganos; *ii*) necrosis dérmica y muscular (dermomionecrosis) que generalmente culmina en úlceras, producida por las toxinas y proteasas bacterianas que ocasionan la necrosis local de los tejidos; y *iii*) lesiones proliferativas crónicas, caracterizadas por la presencia de necrosis continua principalmente de tejido hematopoyético como el riñón. Estos tipos de patologías pueden ocurrir simultáneamente en el curso de una infección bacteriana, pero generalmente una u otra es predominante, dependiendo de la naturaleza del patógeno y de las circunstancias de la infección (Inglis *et al.*, 1993).

Se ha estimado que el diez por ciento de todos los animales acuáticos cultivados se pierden tan sólo a causa de las enfermedades infecciosas (Newman, 1993, Austin y Austin, 1999). En consecuencia, uno de los problemas más críticos que enfrentan los acuicultores en la actualidad es el control de estas enfermedades, las cuales frenan el desarrollo de la acuicultura o llegan a ser económicamente devastadoras.

2.3. Métodos de control: vacunas para peces

Una de las principales medidas para mantener y prosperar la acuicultura de peces es el mejoramiento de la salud de los animales y el control de las enfermedades infecciosas. Tradicionalmente, las enfermedades infecciosas se controlan de diversas maneras, incluyendo el uso de antibióticos (compuestos antimicrobianos), la selección genética de cepas tolerantes a enfermedades y estrés, el control biológico, el mejoramiento de la calidad del agua y el uso de dietas nutritivas enriquecidas y complementadas con probióticos. Sin embargo, estas prácticas no brindan protección completa contra las enfermedades infecciosas. Además, los antibióticos producen efectos co-laterales indeseables, como acumulación en la carne de los animales, generación de agentes patógenos resistentes a los antibióticos y contaminación del ambiente acuático (Newman, 1993; Austin y Austin, 1999).

Puesto que la prevención de las enfermedades es mucho más deseable que la intervención para detener y revertir el proceso infeccioso una vez que ha comenzado, el uso de vacunas es la medida profiláctica más prometedora (Newman, 1993; Vinitnantharat *et al.*, 1999). Además de los beneficios profilácticos, las vacunas representan un beneficio ecológico al favorecer la disminución del uso de antibióticos. Un ejemplo claro es el caso de Noruega, donde en 1987, después de que la vacunación se convirtió en una estrategia común para el control de las enfermedades bacterianas, el uso de 47 toneladas de antibióticos para producir 56,000 toneladas de salmón, se redujo a 0.57 toneladas de antibiótico con una producción de 460,000 toneladas de salmón en 1999 (Vinitnantharat, 2001).

Como resultado del intenso crecimiento de la acuicultura en todo el mundo, en la actualidad existe un gran número de vacunas bajo experimentación. Sin embargo, sólo unas pocas han sido aprobadas para su uso comercial en acuicultura. En la Tabla 2 se presentan las vacunas para peces comercialmente disponibles y las que están bajo investigación (Newman, 1993; Vinitnantharat, 2001). La mayoría de los esfuerzos en el desarrollo de vacunas han sido dirigidos principalmente contra la vibriosis (causada por *V. anguillarum* y *V. ordalii*), la furunculosis (*A. salmonicida*) y contra otras enfermedades causadas por *Renibacterium salmoninarum*, *Yersinia ruckeri* y *Flexibacter columnaris*.

Tabla 2. Vacunas bacterianas para peces.

Comercialmente disponibles	Bajo experimentación
<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Vibrio sp.</i>
<i>Vibrio anguillarum</i> serotipo O1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Vibrio anguillarum</i> serotipo O2	<i>Edwardsiella tarda</i>
<i>Vibrio ordalii</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Flexibacter columnaris</i>
<i>Vibrio salmonicida</i>	<i>Flexibacter maritimus</i>
<i>Pasteurella piscicida</i>	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>
<i>Vibrio viscosus</i>	<i>Flavobacterium columnaris</i>
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Renibacterium salmoninarum</i>
<i>Lactococcus garvieae</i>	
<i>Streptococcus sp.</i>	

Tomada de Vinitnantharat (2001).

Las investigaciones en este campo están orientadas hacia la identificación de las moléculas antigénicas y a entender mejor la respuesta inmune de los peces (Trust *et al.*, 1996; Leong *et al.*, 1997; Ellis, 1999; Scapigliati *et al.*, 2002). Todo ello enfocado hacia el desarrollo de estrategias de vacunación más factibles que ofrezcan mejores niveles de protección y de espectro más amplio, mayor duración de la inmunidad, procedimientos de aplicación más sencillos y económicamente más accesibles (Lorenzen, 1999; Heppell y Davis, 2000).

La composición de las vacunas bacterianas para peces es muy variada. Las más comúnmente usadas consisten de células completas inactivadas (muertas) por calor o químicamente, conocidas como bacterinas. Algunas formulaciones de este tipo han funcionado satisfactoriamente para generar inmunidad contra bacterias patógenas como *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii*, *V. salmoninarum*, *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas salmonicida*. Sin embargo, para otras bacterias patógenas, este tipo de vacunas no ha funcionado adecuadamente, probablemente por alteración química de los antígenos de superficie, la cual llega a ocurrir durante el proceso de inactivación de las bacterias. Además, los costos de producción de estas vacunas son relativamente altos (Austin y Austin, 1993; Newman, 1993).

Otros tipos de vacunas están constituidos por extractos celulares solubles inactivados (toxoides), lisados celulares, o por componentes subcelulares semipurificados, por ejemplo, lipopolisacáridos. Estas vacunas, aunque son consideradas muy seguras, sufren de otras desventajas, tales como características moleculares indefinidas y baja inmunogenicidad, aunque son relativamente fáciles de fabricar (Austin y Austin, 1993; Newman, 1993).

Las vacunas vivas, hechas a base de patógenos cuya virulencia ha sido atenuada por modificación genética, ofrecen grandes ventajas en términos de inmunogenicidad. Por ejemplo, una simple inoculación de una vacuna viva a una dosis modesta, puede, en el mejor de los casos, replicarse hasta llegar a una gran dosis y durante el curso de esta replicación, expresar la mayoría de los antígenos que se presentan durante la infección de manera natural. Además, el procesamiento y la presentación de estos antígenos son más similares a los que ocurren naturalmente. Así mismo, debido a que las vacunas vivas son

organismos viables, estos pueden ser modificados genéticamente para expresar antígenos heterólogos, y así, proveer protección para más de un agente infeccioso. Sin embargo, la principal desventaja de estas vacunas es la posibilidad de que exista reversión a la forma virulenta por parte de la bacteria (Austin y Austin, 1993; Leong, 1993).

Otras vacunas están constituidas por subunidades, es decir, consisten de un componente o fracción específica del patógeno. La ventaja de éstas es que son químicamente definidas y más estables, por lo cual pueden ser modificadas o diseñadas para estimular la respuesta inmune apropiada y pueden ser producidas por síntesis directa o por la tecnología del ADN recombinante. Por último, son muy seguras pues no existe posibilidad de reversión a virulencia. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos, los antígenos capaces de generar un efecto protector aún no han sido identificados plenamente (Leong, 1993; Newman, 1993).

3. VACUNAS DE ADN

Las dos propiedades más importantes de las vacunas, es decir, elevada antigenicidad y ausencia de efectos colaterales adversos, tienden a ser incompatibles. Aunque las vacunas vivas atenuadas estimulan una fuerte respuesta inmune, éstas pueden representar un peligro debido a la virulencia residual o reversión de la misma. Contrario a esto, mientras que las vacunas inactivadas pueden ser más seguras, usualmente son pobres inmunógenos. Por lo tanto, la tendencia actual en el desarrollo de vacunas es reemplazar estas vacunas con nuevas tecnologías más seguras y efectivas, tales como las vacunas de ADN (Heppell y Davis, 2000).

En un principio se observó que la administración directa de ADN plasmídico (ADN “desnudo”) en el músculo esquelético de ratones permitía la expresión de un gen recombinante clonado en el plásmido (Wolf *et al.*, 1990). A partir de esta observación, se definió el concepto de vacunas de ADN, en el cual los antígenos podrían ser liberados por medio de moléculas de ADN plasmídico, de manera que los antígenos para los cuales se pretende generar la respuesta inmune, fueran sintetizados directamente en el organismo blanco u hospedero (Tang *et al.*, 1992). Poco tiempo después, la eficiencia de las vacunas de ADN fue demostrada (Ulmer *et al.*, 1993).

Las vacunas de ADN o vacunas genéticas son conceptualmente muy simples. Un vector de ADN plasmídico se construye para expresar un gen que codifique para un antígeno de un patógeno, ya sea un virus, una bacteria o un parásito. Los plásmidos usados como vacunas de ADN consisten de: (a) el esqueleto del plásmido o vector, el cual posee sitios para la inserción de genes; (b) una unidad de transcripción compuesta de la integración funcional de un promotor transcripcional viral potente, el gen “antigénico” de interés y una secuencia de poliadenilación para la terminación de la transcripción; (c) un gen de resistencia a antibiótico para su manipulación y selección *in vitro*; y (d) un origen de replicación para su propagación en bacterias. El plásmido es propagado en bacterias, aislado, purificado e introducido en el tejido del hospedero, usualmente en el músculo. Una vez que el plásmido se localiza en el núcleo de la célula del hospedero, la proteína antigénica es sintetizada. Posteriormente, la proteína antigénica expresada es reconocida por el sistema inmune hospedero y se despierta una respuesta contra dicho antígeno (Ulmer *et al.*, 1996; Donnelly *et al.*, 1997; Gregoriadis, 1998; Mor, 1998).

Una de las ventajas de las vacunas de ADN es que la proteína antigénica es sintetizada en el interior de las células del hospedero en una conformación nativa y es procesada y presentada al sistema inmune en una forma similar a una infección intracelular. En consecuencia, las vacunas de ADN son capaces de generar una amplia respuesta inmune humoral y celular. En la respuesta celular, el antígeno puede ser procesado y presentado a los linfocitos T a través del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I, por sus siglas en inglés), para inducir la proliferación de linfocitos T citotóxicos y células T productoras y secretoras de citocinas. Por otra parte, la respuesta humoral ocurre cuando el antígeno es secretado y es endocitado y procesado por las células presentadoras de antígeno y transportado a los nódulos linfoides para presentarlo a las células B, a través del MHC-II para la producción y secreción de anticuerpos. Las vacunas de ADN también presentan ventajas inmunológicas sobre los métodos tradicionales de vacunación. Estas pueden despertar una respuesta inmune celular y humoral de larga duración, sin necesidad de refuerzos adicionales, similar a la respuesta generada por las vacunas vivas, pero sin el riesgo de infección por reversión a la forma virulenta del agente atenuado. Desde un punto de vista práctico, las vacunas de ADN ofrecen muchas ventajas sobre las vacunas clásicas.

Puesto que todas las vacunas de ADN requieren procesos de producción idénticos, éstas son relativamente económicas y fáciles de producir. También se pueden producir fácilmente vacunas multivalentes mezclando diferentes plásmidos o incluyendo en un mismo vector varios genes que codifiquen para diversos antígenos que se expresen colinealmente. Además, el ADN es una molécula muy estable, por lo cual no necesita ser mantenida en un ambiente frío durante su transportación o almacenamiento. En forma resumida, las vacunas de ADN ofrecen las ventajas de una respuesta inmune fuerte y de larga duración, alta seguridad y bajo costo de producción, sobre las vacunas vivas atenuadas, inactivadas o constituidas por subunidades (Ulmer *et al.*, 1996; Donnelly *et al.*, 1997; Gregoriadis, 1998; Mor, 1998; Donnelly *et al.*, 2000).

A partir del artículo de Anderson *et al.* (1996), en otros trabajos se ha demostrado el potencial de esta novedosa estrategia de inmunización para la protección de peces contra infecciones virales, incluyendo el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa y el virus de la septicemia hemorrágica viral (Lorenzen *et al.*, 1998; Corbeil *et al.*, 1999). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de la factibilidad de estas vacunas contra patógenos bacterianos en peces. Una excepción es el trabajo de Gómez-Chiarri *et al.* (1996), donde se sugiere el potencial de las vacunas de ADN para generar protección inmunológica en peces contra *Renibacterium salmoninarum*.

En contraste, existe un mayor número de reportes acerca de la efectividad de las vacunas de ADN en otros modelos animales, principalmente en mamíferos, en donde se ha demostrado la inducción de una respuesta de anticuerpos y/o protección contra infecciones bacterianas. Esta respuesta se ha obtenido contra antígenos de superficie como en el caso de *Chlamydia trachomatis* (MOMP), *Salmonella typhi* (OmpC), *Pseudomonas aeruginosa* (OprF), *Borrelia burgdogfei* (OspA), o bien, contra otras proteínas inmunodominantes que además participan en el proceso infeccioso, como las de *Mycobacterium tuberculosis* (hsp65, Ag85A, B, C, AhpC), *Clostridium tetani* (toxoides), *P. aeruginosa* (exotoxina A), *M. bovis* (MPB83), *Porphyromonas gingivalis* (rgpA) o *Brucella abortus* (GroEL) (Anderson *et al.*, 1996; Kowalczyk y Ertl, 1999; Pal *et al.*, 1999; Chambers *et al.*, 2000; Shiau *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2001; Yonezawa *et al.*, 2001; Leclercq *et al.*, 2002).

4. SISTEMA INMUNE DE PECES TELEOSTEOS

Los teleósteos son los peces evolutivamente más avanzados y los más explotados por el hombre, tanto en pesquerías como en biotecnología marina (acuicultura), ya que muchas especies marinas y dulceacuícolas son utilizadas en granjas de cultivo de peces y otras están en proceso de adecuación para tal efecto.

Los peces teleósteos son el grupo más grande de vertebrados (alrededor de 20,000 especies), que surgieron hace aproximadamente 300 millones de años y comparten una organización del sistema inmune muy similar a la de otros vertebrados. Esto incluye la presencia de linfocitos funcionales, complejo principal de histocompatibilidad, receptores de antígenos en células T, y citocinas (Scapigliati *et al.*, 2002). Esta característica hace de los teleósteos un modelo interesante para el estudio de la filogenia del sistema inmune de los vertebrados. Como vertebrados ectotérmicos, poseen un sistema inmune bien desarrollado que cuenta con un timo, cuya complejidad aumenta con el grado de evolución de la especie, y un sistema vascular y linfático separados. Sin embargo, carecen de ganglios linfáticos y de médula ósea y en su lugar, el tejido linfohematopoyético del riñón, bazo y timo realizan las funciones de ambos (Dalmo *et al.*, 1997). En los teleósteos, al igual que en mamíferos, se ha descrito una respuesta inespecífica (innata) y otra específica (adquirida), capaces de actuar frente a los distintos patógenos bacterianos (Tabla 3).

En el caso de los teleósteos, la importancia relativa de la inmunidad innata y de la adquirida en el conjunto de su sistema difiere respecto a los vertebrados homeotermos. La primera es particularmente importante en todos los poiquilotermos, porque su inmunidad adquirida se desarrolla más lentamente. En mamíferos y aves, el tiempo necesario para crear una defensa es de 48 horas, mientras que en los peces puede variar de 7 a 14 días, dependiendo de la temperatura ambiental. Por tanto, el animal necesita algún mecanismo para retrasar el establecimiento y desarrollo de los patógenos hasta que se produzca la respuesta específica. Esto explicaría, en parte, el hecho de que los peces conserven un gran número de mecanismos de defensa humorales no específicos que pueden encontrarse en invertebrados (Alexander e Ingram, 1992).

Tabla 3. Mecanismos de defensa de peces frente a bacterias.

Factores de la respuesta humoral: No específica	Factores de la respuesta celular: No específica
(a) Inhibidores <i>i.</i> Transferrina <i>ii.</i> Inhibidores de proteasas (α 1-antiproteasa; α 2-macroglobulina) <i>iii.</i> Lectinas (b) Líticos <i>i.</i> Péptidos antibacterianos <i>ii.</i> Proteasas <i>iii.</i> Lisozima <i>iv.</i> CRP (reacciona con fosforilcolina, activa complemento) <i>v.</i> Complemento (lítico, proinflamatorio, quimiotáctico)	(a) Neutrófilos Estallido respiratorio (O_2^- , H_2O_2 , OH^*) Lisozima (b) Macrófagos Enzimas hidrolíticas (lisozima) Estallido respiratorio NO ($+O_2^- \rightarrow$ peroxinitrito $\rightarrow OH^*$)
Específica	Específica
Anticuerpos <i>i.</i> Anti-adhesinas <i>ii.</i> Anti-toxinas <i>iii.</i> Anti-invasinas <i>iv.</i> Activación de la ruta clásica del complemento	Macrófagos activados: Linfocitos T antígeno específicos ↓ Citocinas ($INF\gamma$, TNF) ↓ Activación de macrófagos (Estallido respiratorio y actividad bactericida mejorados)

Tomada de Ellis (1999). CRP, proteína C-reactiva; $INF\gamma$, interferón gama; TNF, factor necrótico de tumor; NO, óxido nítrico; O_2^- , anión superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; OH^* , radical libre hidroxilo.

La primera barrera de defensa que poseen los peces frente a patógenos es de tipo físico y la forman las escamas y las células queratinizadas. Las secreciones mucosas, que incluyen proteasas, lisinas y aglutininas, constituyen la segunda línea de defensa de la respuesta inmune. Una vez que el agente infeccioso ha superado estas primeras barreras, la sangre y la linfa pueden constituir su medio de transporte hasta su destino final. A este nivel, entran en acción sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano como las transferrinas, proteasas, lectinas, sustancias líticas e inhibidores enzimáticos. La mayoría de los agentes patógenos potenciales serán destruidos por los elementos inespecíficos, mientras que otros tan sólo serán frenados el tiempo suficiente para que se produzca la respuesta específica (Ellis, 1999).

4.1. Respuesta humoral no específica

El suero, mucus y huevos de peces contienen una variedad de sustancias (predominantemente proteínas o glicoproteínas) que de manera diversa inhiben inespecíficamente el crecimiento de microorganismos patógenos.

Transferrina. La transferrina es una proteína que se encuentra en el plasma de vertebrados y que tiene elevada afinidad por el hierro. Las bacterias requieren hierro como co-factor para numerosos sistemas enzimáticos, sin embargo, la disponibilidad de hierro en el hospedero es altamente restringida al estar unido a la transferrina. Por lo tanto, la capacidad antimicrobiana de la transferrina obedece a su habilidad de reducir la concentración de hierro disponible para los patógenos y evitar su crecimiento en los tejidos (Ellis, 1999).

α 2-macroglobulina. El plasma de los peces contiene inhibidores de proteasas, principalmente α 2-macroglobulina (α 2M). Muchas bacterias producen toxinas proteolíticas, las cuales digieren proteínas de los tejidos del hospedero como una fuente de aminoácidos. En trucha arcoiris, se ha observado que la α 2M inhibe la actividad proteolítica de las proteasas de *A. salmonicida* (Ellis, 1987). La diferencia en la actividad inhibitoria de la α 2M entre dos especies diferentes de trucha está correlacionada con su capacidad de sobrevivir a infecciones por *A. salmonicida*, lo cual sugiere que la α 2M juega un papel en la defensa contra esta infección (Freedman, 1991).

Lectinas. Las lectinas son glicoproteínas de origen no inmune, las cuales reconocen específicamente e interaccionan con carbohidratos. Estas se han encontrado en huevos, suero y moco de numerosas especies de peces (Ellis, 1999). Aunque se ha demostrado que las lectinas son capaces de aglutinar numerosas bacterias patógenas de peces, su importancia en mecanismos de defensa aún no se ha establecido. En mamíferos las lectinas tienen propiedades de opsonización y activación del complemento (Arason, 1996). Una lectina con afinidad por N-acetilgalactosamina aislada de *Trichogaster trichopterus* fue capaz de opsonizar células de *A. hydrophila*, y hacerla susceptible a la lisis por el sistema del complemento (Fock *et al.*, 2001).

Péptidos antibacterianos. Estos son péptidos de bajo peso molecular con la habilidad de romper membranas bacterianas, por lo cual, constituyen una de las primeras

líneas de defensa de diversas especies contra bacterias patógenas. En peces se han aislado de secreciones de la mucosa de la piel e intestino; aunque se han descubierto relativamente pocos. Los péptidos antimicrobianos misgurina y pleurocidina, que presentaron actividad contra un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, se encontraron en el dojo (*Misgurnus anguillicaudatus*) y en el lenguado (*Pleuronectes americanus*), respectivamente (Cole *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997). Se clonó el gen que codifica para la pleurocidina del lenguado y se encontró que éste se expresa predominantemente en piel y tejido intestinal (Douglas *et al.*, 2001) y se demostró que la pleurocidina sintética es capaz de proteger al salmón contra infecciones por *Vibrio anguillarum* (Jia *et al.*, 2000). También se observó que el pez gato (*Parasilurus asotus*), en respuesta a un daño en su epidermis, secreta un potente péptido antibacteriano, la parasina I (Park *et al.*, 1998). Recientemente, a partir de secreciones de la piel de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), se aisló otro péptido con elevada actividad antimicrobiana, la oncorincina III (Fernandes *et al.*, 2003).

Proteasas. Se ha demostrado que el moco de la piel de varias especies de peces contiene proteasas con actividad tipo tripsina. Estas proteasas se han sugerido como un mecanismo de defensa ya que son capaces de destruir bacterias Gram-negativas, como *V. anguillarum* (Hjelmeland *et al.*, 1983). En el salmón del Atlántico, además de localizarse en la piel, la tripsina se encontró en las agallas e intestino (Braun *et al.*, 1990)

Lisozima. La lisozima es una enzima que hidroliza los enlaces $\beta(1-4)$ existentes entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina, los cuales son componentes del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias. En bacterias Gram-positivas actúa directamente, mientras que en bacterias Gram-negativas, la lisozima es efectiva una vez que el complemento y otras enzimas han eliminado la membrana externa y dejado al descubierto la capa de peptidoglicano de la bacteria. La lisozima se ha encontrado en mucus de peces, suero (monocitos y neutrófilos) y principalmente en tejidos ricos en leucocitos, como el riñón o en sitios donde el riesgo de infección bacteriana es alto, tales como la piel, las agallas, el tracto alimenticio y en los huevos (Ellis, 2001).

Proteína C-reactiva (PC-r). La PC-r es una proteína que reacciona con la fosforilcolina, el cual es un componente de amplia distribución presente en las superficies de bacterias, hongos y parásitos. Su nombre radica en que en presencia de Ca^{2+} , ésta

reacciona y precipita al polisacárido-C, un componente de la pared celular de *Streptococcus pneumoniae*. La PC-r es un componente normal del plasma, cuyos niveles son incrementados hasta veinte veces durante procesos infecciosos. También ha sido localizada en moco de piel de peces y en ovario. La PC-r es capaz de unirse a superficies bacterianas (aglutinación) y activar el sistema de complemento, de tal forma que activa las defensas líticas y fagocíticas (Ellis, 2001).

Complemento. El complemento es un sistema complejo y secuencial de proteínas del plasma (sensibles a temperatura), que participa en el daño a membranas y lisis de antígenos celulares. Los peces teleósteos poseen ambas rutas de activación del complemento, la alterna (RAC) y la clásica (RCC). La actividad de la RAC es muy elevada en suero de peces comparada con la del suero de mamíferos, lo cual sugiere que esta ruta es más importante en peces que en mamíferos. Los lipopolisacáridos bacterianos pueden activar la RAC y culminar en la lisis de la bacteria. La actividad bactericida del complemento es atribuida principalmente a la activación de la RAC (Yano, 1996).

4.2. Respuesta celular no específica

Las principales células involucradas en mecanismos de la inmunidad celular no específica contra bacterias son los neutrófilos y los macrófagos, que comúnmente tienen capacidad fagocítica. Estas células pueden fagocitar bacterias y matarlas principalmente por medio de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el estallido respiratorio. Estos productos incluyen al anión superóxido (O_2^-), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical libre hidroxilo (OH^\bullet), los cuales tienen potente actividad bactericida. Los macrófagos también pueden producir óxido nítrico (NO), el cual puede formar potentes agentes bactericidas como el peroxinitrito y el radical OH^\bullet . Al igual que en los mamíferos, la fagocitosis consta de los siguientes pasos: quimiotaxis, adherencia, ingestión, destrucción del patógeno y expulsión del material de desecho por exocitosis (Secombes, 1996; Ellis, 2001).

La defensa anaerobia implica la acción de diversos enzimas microbicidas, como la lisozima, y otros enzimas contenidos en los gránulos citoplasmáticos y en los lisosomas. Los fagocitos responden a estímulos que aumentan su capacidad para fagocitar y destruir

los patógenos. Entre las sustancias que pueden activar a los fagocitos, se incluyen linfocinas, opsoninas (como los anticuerpos) y otros componentes humorales. Sustancias estimulantes exógenas como los glucanos también pueden estimular a los fagocitos (Sveinbjørson y Seljelid, 1994; Secombes, 1996).

4.3. Respuesta humoral específica

Cuando los peces son expuestos a un antígeno, al igual que los vertebrados superiores producen anticuerpos específicos con propiedades biológicas como la aglutinación, precipitación, opsonización y activación del complemento. En la respuesta humoral específica en los peces, a diferencia de la de los mamíferos, la producción de anticuerpos es dependiente de la temperatura (Miller y Clem, 1984). La respuesta secundaria o memoria inmunológica de los teleósteos comparte con la de los mamíferos el aumento del título de anticuerpos, la aceleración de la respuesta y el aumento de la sensibilidad al antígeno. Sin embargo, carece de una de las características propias de los mamíferos, como es el hecho de que no se produzca el cambio a otros tipos de inmunoglobulinas (Igs), es decir, no se pasa a un rápido predominio de la Ig de bajo peso molecular (IgG) (Wilson y Warr, 1992). Entre las especies de peces examinadas hasta la fecha, todas parecen producir una clase dominante de inmunoglobulina, una molécula tetramérica similar a la IgM de los mamíferos; aunque algunas especies también producen una inmunoglobulina de más bajo peso molecular, cuya función aún no está determinada (Kaattari y Piganelli, 1996). Además del suero, los peces producen anticuerpos en mucosa de intestino, agallas y piel (Davidson *et al.*, 1993, 1997, Lumsden *et al.*, 1995, Joosten *et al.*, 1997). Sin embargo, carecen de anticuerpos secretorios similares a los IgA de mamíferos, los cuales son resistentes a la degradación proteolítica del intestino. Son muy pocos los estudios que describan la presencia de Igs en el mucus intestinal de peces, siendo posible que los anticuerpos no jueguen un papel importante en la prevención de la adhesión bacteriana al lumen del intestino, en contraste con su papel en piel y agallas (Lumsden *et al.*, 1995). Se ha propuesto que anticuerpos específicos contra proteínas de superficie de *A. hydrophila* podrían prevenir su adhesión y penetración a células epiteliales y, en caso de evadir esta línea de defensa, los anticuerpos podrían opsonizar a la bacteria y eliminar ésta

vía fagocitosis (Fang *et al.*, 2000). Por otra parte, la actividad bactericida del suero es atribuible a la activación de la ruta clásica del complemento, a través de anticuerpos específicos unidos a la superficie de la bacteria (Kaattari y Piganelli, 1996).

4.4. Respuesta celular específica

Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales específicos contra inmunoglobulinas de peces se ha demostrado la existencia de linfocitos B en muchas especies de teleósteos. Estos poseen subclases de linfocitos con funciones similares en muchos aspectos a la de los linfocitos B y T descritos en los mamíferos (Manning y Nakanishi, 1996; Scapigliati *et al.*, 1996). Los fagocitos presentan, además de su función típicamente fagocítica, la capacidad de interactuar con los linfocitos. Pese a ser células inespecíficas, median en la respuesta inmune de otras células específicas realizando dos funciones: la presentación antigénica y la estimulación de los linfocitos T. Se ha demostrado la correlación directa entre la captación antigénica y la degradación por parte de los macrófagos, con la subsiguiente inducción de una respuesta inmune específica contra dicho antígeno. El procesamiento del antígeno implica una serie de procesos bioquímicos que dan lugar a la exposición de epítopes. Estos epítopes son reconocidos por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). En mamíferos, las moléculas del MHC de clase I y II juegan un papel crucial en la presentación de proteínas antigénicas extrañas, a las células T citotóxicas y las células T cooperadoras, respectivamente. Los datos actuales sugieren la existencia de un sistema MHC funcional en los peces. Por otra parte, se ha demostrado que los monocitos y los macrófagos de peces teleósteos estimulados con LPS, liberan factores solubles con actividad interleuquinica o mitógenos, capaces de activar a las células T (Manning y Nakanishi, 1996; Scapigliati *et al.*, 2002).

4.5. Respuesta inmune a las vacunas de ADN

Aunque ya se ha descrito la eficacia de las vacunas de ADN para peces en el control de patógenos virales (Anderson *et al.*, 1996; Lorenzen *et al.*, 1998; Corbeil *et al.*, 1999) y bacterianos (Gómez-Chiarri *et al.*, 1996), a diferencia del modelo de mamíferos, se sabe

muy poco acerca de los mecanismos de respuesta inmune que son generados por las vacunas de ADN en peces.

Al igual que en mamíferos, la inmunidad humoral específica en peces involucra el reconocimiento y unión de antígenos solubles circulantes por parte de las células B, las cuales responden produciendo y secretando anticuerpos específicos hacia el antígeno. La inmunidad específica mediada por células involucra el reconocimiento del antígeno por parte de las células T, el cual es presentado en la superficie celular en asociación con moléculas del MHC, con lo cual se dispara la proliferación de linfocitos T citotóxicos y linfocitos T secretores de citocinas. En mamíferos, las células T CD4 y CD8 reconocen los antígenos presentados por las moléculas MHCII y MHCI, respectivamente. Sin embargo, no está demostrado plenamente si esto ocurre en peces puesto que no hay reactivos (marcadores) disponibles para identificar moléculas tipo CD4 y CD8 (Manning y Nakanishi, 1996); aunque evidencia reciente sugiere que los peces tienen linfocitos que expresan moléculas CD8 (Hansen y Strassburger, 2000).

En peces, se ha demostrado que la vacunación genética induce una respuesta de anticuerpos específicos, tanto con genes reporteros (Kanellos *et al.*, 1999a), como con “genes antigénicos” (Anderson *et al.*, 1996; Lorenzen *et al.*, 1998; Corbeil *et al.*, 1999) y, al igual que en mamíferos, esta respuesta es dosis-dependiente, siendo incompleta cuando se usan dosis bajas de ADN (Kanellos *et al.*, 1999b). El tipo de inmunoglobulinas producidas en peces por medio de inmunización genética no se ha determinado, sin embargo, la avidez de los anticuerpos parecer ser similar en la inmunización tanto con ADN como con proteínas (Kanellos *et al.*, 1999b). En trucha arcoiris, se detectaron anticuerpos contra la proteína G del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) a los 23 días de la inyección con el plásmido que codifica para dicha proteína y el título mayor se registro a las 3 a 8 semanas, el cual se mantuvo por varias semanas después (Anderson *et al.*, 1996). Pocos estudios han valuado la respuesta de anticuerpos hacia la vacunación con ADN. En los casos donde a pesar de los altos niveles de protección, no se han detectado anticuerpos neutralizantes en los peces vacunados, se ha sugerido que otros mecanismos como la activación de células T, están participando en la protección (Anderson *et al.*, 1996; Lorenzen *et al.*, 1998). Aunque no está plenamente demostrado, algunas evidencias

indirectas apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, la activación de la expresión del gen Mx después de la administración intramuscular del plásmido que codifica para la proteína G, sugiere la producción de interferon como una respuesta específica a dicho antígeno (Boudinot *et al.*, 1998). Los genes Mx codifican para proteínas que confieren protección no específica contra infecciones virales en mamíferos. Además, se ha observado que la expresión de las moléculas MHCII es activada por las vacunas de ADN en el sitio de inyección (Boudinot *et al.*, 1998). La expresión de estos genes es indicativa de reclutamiento de células inmunocompetentes activadas, como células B, macrófagos y células T. Las células T citotóxicas específicas también parecen ser un mecanismo de respuesta inmune en la vacunación genética. En ensayos de co-inyección donde un plásmido que codifica para la luciferasa fue inyectado con o sin la vacuna de ADN que codifica para la proteína G, se observó que esta vacuna redujo la persistencia de la luciferasa de manera significativa. Esto se interpretó como una evidencia indirecta de una respuesta citolítica específica contra células que expresaban la proteína G viral (Heppell *et al.*, 1998).

5. JUSTIFICACIÓN

Con aproximadamente 11,500 kilómetros de línea de costa, México tiene un gran potencial para la acuicultura y la biotecnología marina en general. Sin embargo, en lo referente al cultivo intensivo de peces marinos no ha habido una gran prosperidad (Paniagua-Michel y Lizárraga-Partida, 1995).

Atendiendo a esta necesidad, diversas instituciones académicas de la región Noroeste de nuestro país, incluyendo al CIBNOR, han venido desarrollando investigaciones orientadas al establecimiento de sistemas de cultivo intensivo de peces marinos con la finalidad de ofrecer alternativas factibles que permitan el aprovechamiento racional de este importante recurso. Diversas especies de peces con potencial económico, entre las que se encuentran el pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*), botete (*Sphoeroides annulatus*), pargo rayado (*L. aratus*), pargo colorado o huachinango (*L. peru*) o cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) han sido evaluadas. La cabrilla arenera, especie endémica de la costa Noroeste, ha sido la especie

más estudiada, en vista de que reúne las características biológicas y etológicas deseables para su cultivo, además de que tiene un alto valor comercial (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995). La pobre explotación de este recurso, a pesar de su abundancia y de que es considerada como pescado de primera calidad (Van der Heiden, 1985), no obedece a la falta de mercado, sino más bien a la falta de oferta.

Un factor limitante que se ha presentado comúnmente en todos los casos es el alto índice de mortalidad ocasionado principalmente por bacterias patógenas, lo cual es una consecuencia directa del estrés al que son sometidos los peces bajo los sistemas de cultivo intensivo. Diversas especies bacterianas han sido identificadas como las causantes de estas epizootias, entre las que destacan las especies del género *Aeromonas* y *Vibrio* (Barrera-Guevara *et al.*, 1994; Rodríguez-Ortega *et al.*, 1994; Arvizu *et al.*, 1990; Avilés-Quevedo *et al.*, 1995; Cadena-Roa y Roldan, 1995)

La eficiencia de la vacunación como medida de prevención de enfermedades bacterianas y virales en acuicultura, y como una alternativa para el indeseable uso de antibióticos está plenamente demostrada. En los países desarrollados donde la piscicultura ya se ha establecido como una industria sólida y rentable, el empleo de la vacunación como método profiláctico ha contribuido al incremento en los niveles de producción de peces y a la disminución de las pérdidas económicas ocasionadas por enfermedades infecciosas (Vinitnantharat *et al.*, 1999, 2001)

Como resultado del intenso crecimiento de la acuicultura a nivel mundial, se justifica la exploración de nuevas tecnologías más efectivas, seguras y económicas para desarrollar nuevas vacunas como lo son las vacunas de ADN (Heppell y Davis, 2000).

Aeromonas veronii es un modelo de estudio interesante e importante pues además de ser un patógeno de peces también representa un riesgo en salud pública como causante de gastroenteritis y una variedad de infecciones extraintestinales en humanos (Austin y Austin, 1999; Janda y Abbott, 1998). En la actualidad no se cuenta con una vacuna contra infecciones ocasionadas por especies del género *Aeromonas*.

La identificación de factores de virulencia, como lo son los factores de adhesión, servirá para la evaluación y utilización de los mismos en el desarrollo de vacunas contra éste y otros patógenos de peces. Por lo tanto, con este estudio se pretende además de

contribuir al conocimiento científico, proponer a mediano plazo nuevas alternativas para el control de infecciones bacterianas, que repercutan positivamente en la incipiente industria del cultivo de peces marinos en nuestro país.

6. HIPÓTESIS

La adhesión de las bacterias patógenas a las células del hospedero es un paso importante e imprescindible en las primeras etapas del proceso de infección. Las proteínas de membrana externa (OMPs) son abundantes y poseen regiones expuestas en la superficie bacteriana. Estas propiedades les permiten interactuar con superficies y moléculas del ambiente externo y además, las hacen altamente antigénicas e inmunodominantes. Dadas estas características, es probable que las OMPs de *Aeromonas veronii* puedan funcionar como factores de adhesión. Por otra parte, vacunas de ADN hechas a base de los genes que codifican para las OMPs con propiedades adhesivas, podrían estimular una respuesta inmune y generar protección en peces contra infecciones por *A. veronii*.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El propósito de este estudio es determinar si las proteínas de membrana externa (OMPs) de *Aeromonas veronii* participan como factores de adhesión a células epiteliales y evaluar su potencial inmunogénico como componentes de vacunas de ADN para peces contra infecciones por *A. veronii*.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar y aislar las principales OMPs de *A. veronii*
2. Evaluar la interacción de las OMPs con diversas glicoproteínas, incluyendo algunas proteínas de la matriz extracelular, mucina y lactoferrina.
3. Determinar la contribución de las OMPs a la adhesión de *A. veronii* a células epiteliales *in vitro*.
4. Clonar y caracterizar los genes que codifican para las OMPs de *A. veronii* implicadas en adhesión.
5. Construir vectores de expresión que codifiquen para las OMPs de *A. veronii*, a fin de generar las vacunas de ADN.
6. Evaluar la expresión de las OMPs de *A. veronii* en células eucariotas (*in vitro*), a partir de los vectores de expresión construidos.
7. Determinar la respuesta inmune humoral de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), generada por la administración intramuscular de las vacunas de ADN.
8. Evaluar la protección inmunológica contra infecciones experimentales con *A. veronii* en peces (*P. maculatofasciatus*) inmunizados con las vacunas de ADN.

III. METODOLOGÍA

El material y los métodos utilizados para cumplir los objetivos planteados en este trabajo de investigación se describen detalladamente en los Anexos I-IV. En la Figura 1 se presenta un diagrama de flujo general, donde se esquematiza el proceso experimental de esta tesis.

Figura 1. Diagrama de flujo general de la metodología empleada en este trabajo. 

En primer término, se aislaron, purificaron y caracterizaron las principales proteínas de membrana externa (OMPs) de *Aeromonas veronii*, Omp38 y Omp48, y se estudió su implicación en la adhesión a glicoproteínas y células epiteliales. Posteriormente, se clonaron y caracterizaron los genes que codifican para estas proteínas. Con los genes *omp38* y *omp48* se construyeron vacunas de ADN y se analizó su expresión *in vitro* a partir de estos vectores. Finalmente, se evaluó la capacidad las vacunas de ADN para conferir protección inmunológica a *Paralabrax maculatofasciatus* (cabrilla arenera) contra infecciones experimentales con *A. veronii*.

Los números romanos (I-IV) corresponden a los anexos que se encuentran al final del documento y se refieren específicamente a los artículos y manuscritos donde se describe, de manera detallada, la metodología empleada en cada caso. Abreviaturas: OMPs, proteínas de membrana externa; oligos, oligonucleótidos; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; ELISA, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima; PRS, porcentaje relativo de supervivencia.

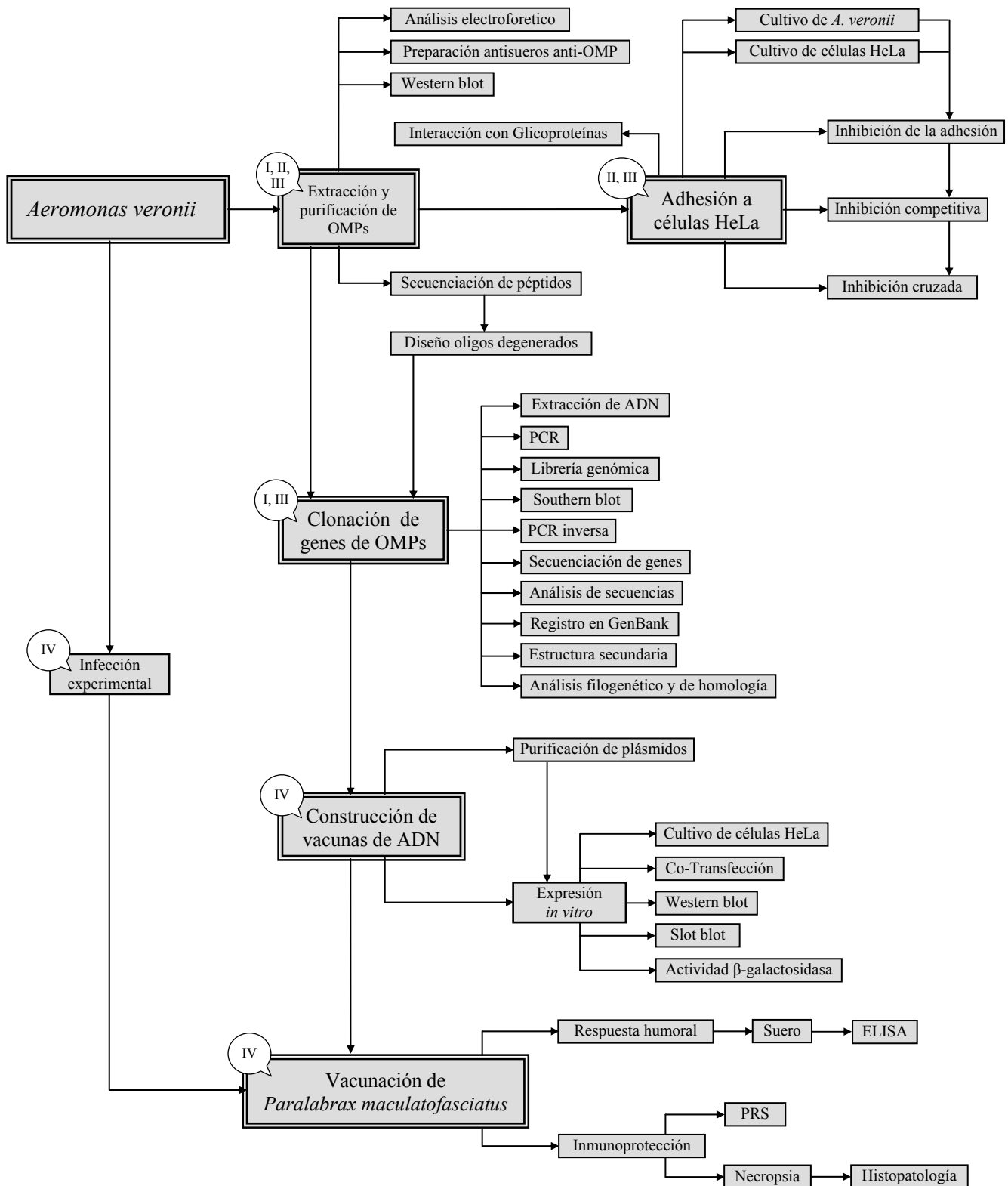


Figura 1. (Ver pie de figura en la página anterior).

IV. RESULTADOS

1. Identificación y purificación de las principales OMPs de *A. veronii* (Anexos I y II)

La afinidad de bacterias patógenas por mucina o lactoferrina, se ha descrito como un mecanismo potencial para favorecer su adhesión a las superficies epiteliales del hospedero y para la adquisición de hierro, respectivamente. En un estudio preliminar se investigó si *A. veronii* producía proteínas afines a mucina y lactoferrina. Para esto, se analizó la fracción proteica del sobrenadante de cultivo, obtenida por medio de precipitación con sulfato de amonio al 80% (F80). El análisis por medio de Western blot reveló la presencia de dos proteínas con afinidad por mucina y lactoferrina, con pesos moleculares aproximados de 38 y 48 kDa (Figura 2).

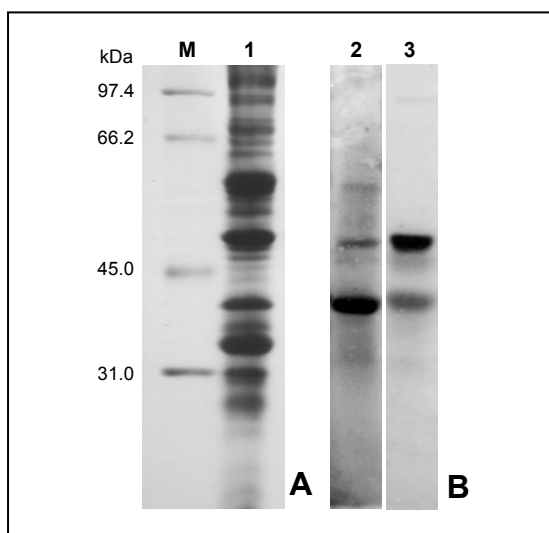


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% (A) y Western blot (B) de las proteínas precipitadas del sobrenadante de cultivo de *A. veronii*. M, marcador de peso molecular expresado en kilodaltons (kDa); carril 1, proteínas de la F80 (tinción con azul de Coomassie); carriles 2 y 3, proteínas de la F80 transferidas a membranas de PVDF e incubadas con mucina y lactoferrina marcadas con peroxidasa, respectivamente.

Estas proteínas se purificaron por medio de electroelución y se determinó su secuencia amino terminal (N-terminal), la cual fue: A (M/V) V Y D K D G para la proteína de 38 kDa y V D F H G Y M R para la de 48 kDa. La búsqueda de secuencias similares en las bases de datos por medio de BLAST (Altschul *et al.*, 1997), indicó que presentaban

similitud con proteínas de membrana externa (OMPs) tipo porinas de otras bacterias entéricas de las familias Enterobacteriaceae y Vibrionaceae, principalmente. En particular, la porción N-terminal de la proteína de 38 kDa presentó similitud con OmpC y OmpF de *E. coli*, las cuales son porinas que forman canales no específicos para moléculas hidrofílicas y están asociadas con la regulación de la osmolaridad de la bacteria (Jeanteur *et al.*, 1991; Nikaido, 1992). Por su parte, la región N-terminal de la proteína de 48 kDa es similar a la de LamB de *E. coli*, que es una porina específica cuya expresión es inducida por la presencia de maltosa (malto porina) en el medio de cultivo (Jeanteur *et al.*, 1991; Nikaido, 1992).

Para corroborar la información generada por el análisis de las secuencias N-terminales de las proteínas de 38 y 48 kDa obtenidas en los sobrenadantes, se aislaron las OMPs totales de *A. veronii*. De acuerdo al perfil proteico obtenido por medio de electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelado con tinción de Coomassie, se encontró que *A. veronii* expresa un grupo de OMPs en el rango de 20 a 80 kDa, tanto a 37°C como a 22°C de temperatura de crecimiento. Las principales OMPs, cuantitativamente hablando, fueron precisamente las de 38 y 48 kDa, las cuales se denominaron Omp38 y Omp48. La presencia de maltosa en el medio de cultivo no tuvo efecto en el nivel de expresión de Omp48, contrario a lo esperado para una posible malto porina (Figura 3, carriles 1-4).

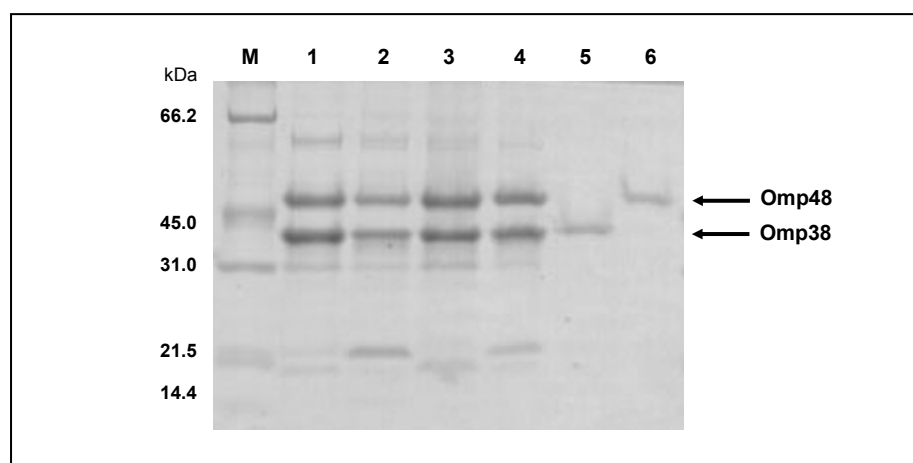


Figura 3. SDS-PAGE al 12% de las proteínas de membrana externa (OMPs) de *A. veronii* expresadas bajo diferentes condiciones de cultivo. M, marcador de peso molecular expresado en kilodaltons (kDa); carril 1,

bacterias cultivadas en caldo LB (37°C); carril 2, caldo LB mas maltosa al 1% (37°C); carril 3, caldo LB (22°C); carril 4, caldo LB mas maltosa al 1% (22°C); carril 5, Omp38; carril 6, Omp48.

Las proteínas Omp38 y Omp48 se purificaron por medio de electroelución (Figura 3, carriles 5 y 6) y se determinó la secuencia de aminoácidos nuevamente de su porción N-terminal, así como por primera vez la de algunos de sus péptidos internos (Tabla 4). De acuerdo a las secuencias, se corroboró que Omp38 y Omp48 corresponden a las proteínas afines a mucina y lactoferrina, identificadas inicialmente en la F80. Además, el análisis BLAST de las secuencias de los péptidos, nuevamente reveló que Omp38 y Omp48 son proteínas relacionadas a la familia de porinas tipo LamB, OmpC y OmpF.

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos del N-terminal y péptidos internos de Omp38 y Omp48.

Proteína	Péptido	Secuencia de aminoácidos
Omp38	N-terminal	VDFHGYMR
	Péptido 1	LGNEAETYGEVQLGQEA YNK
	Péptido 2	DGSLELG YDYAR
	Péptido 3	FINWGVLPVGDK
	Péptido 4	VYASYLSDSGQFRPDANGVK
Omp48	N-terminal	AMIYDKDG
	Péptido 1	VQANYYGDSNDPNPLTQAD
	Péptido 2	VALNNTWSAIAK
	Péptido 3	QEGQIIYSNSFGGFK
	Péptido 4	DNTAGSSYEDMVVETLLGVQYAFT

2. Contribución de Omp38 y Omp48 a la adherencia de *A. veronii* (Anexos II y III)

2.1. Interacción con glicoproteínas

Se ha demostrado que la capacidad de numerosos patógenos bacterianos de unirse a proteínas de la matriz extracelular y otras glicoproteínas del hospedero promueve el potencial de colonización, contribuyendo así a la patogenicidad. Por medio de un ensayo de unión en fase sólida (en placas de ELISA), se encontró que Omp48 y Omp38 son capaces de unirse de manera significativa a proteínas de la matriz extracelular tales como fibronectina y colágenas (incluyendo la tipo I y IV, las cuales son las más abundantes), así como mucina y lactoferrina (Figura 4).

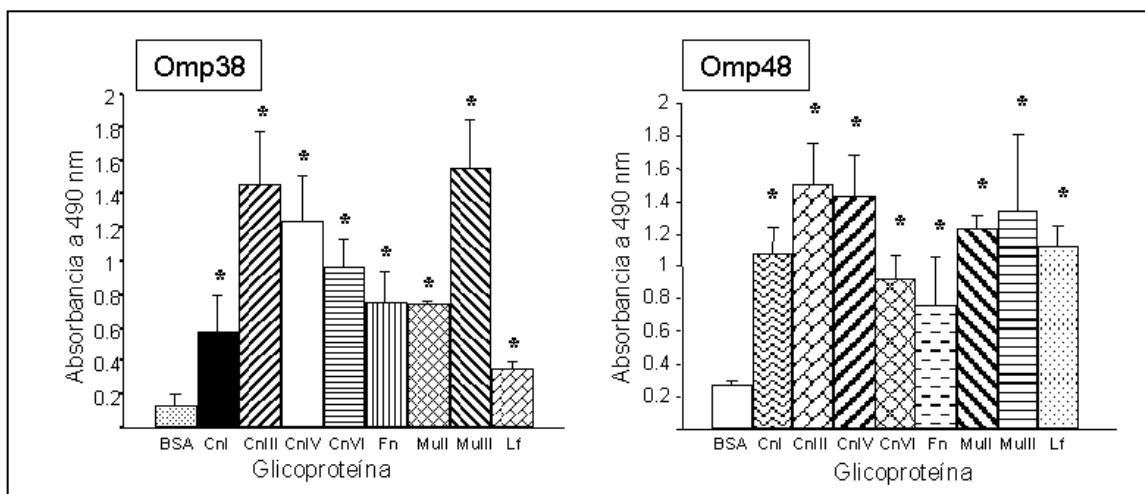


Figura 4. Interacción de Omp38 y Omp48 con glicoproteínas. BSA, pozos cubiertos con Albúmina sérica bovina como control negativo; CnI, CnIII, CnIV, y CnVI, Colágenas tipo I, III, IV, y VI; Fn, Fibronectina; MuII, Mucina tipo II (cruda); MuIII, Mucina tipo III (parcialmente pura); Lf, Lactoferrina. (*, $P < 0.05$).

En el caso de la Omp48 se observó que la unión a mucina, lactoferrina y colágena fue inhibida significativamente respecto al control y de manera específica por las glicoproteínas homólogas y, en menor grado, por glicoproteínas heterólogas. Además, la unión fue inhibida por diversos carbohidratos que son componentes comunes de las glicoproteínas, tales como galactosa, fucosa, manosa, ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico, NANA) y dextrán sulfato, entre otros (Tabla 5).

2.2. Adhesión a células epiteliales

Se estudió la posibilidad de que Omp38 y Omp48 contribuyan a la capacidad de *A. veronii* para adherirse a células epiteliales *in vitro*. El grado de adhesión de *A. veronii* a monocapas de células HeLa disminuyó significativamente respecto a los controles, en más de un 40%, cuando las bacterias fueron pre-tratadas con anticuerpos policlonales anti-Omp38 (dilución 1:10) o anti-Omp48 (dilución 1:10 y 1:100). La inhibición fue debida específicamente a los anticuerpos policlonales anti-OMP presentes en el suero, ya que las bacterias tratadas con suero de conejo no inmunizado (dilución 1:10) no presentaron inhibición de la adhesión (Figura 5). También se observó alrededor de un 60% de inhibición competitiva al incubar a las células HeLa con las proteínas Omp38 u Omp48, previamente al ensayo de adhesión (Figura 5).

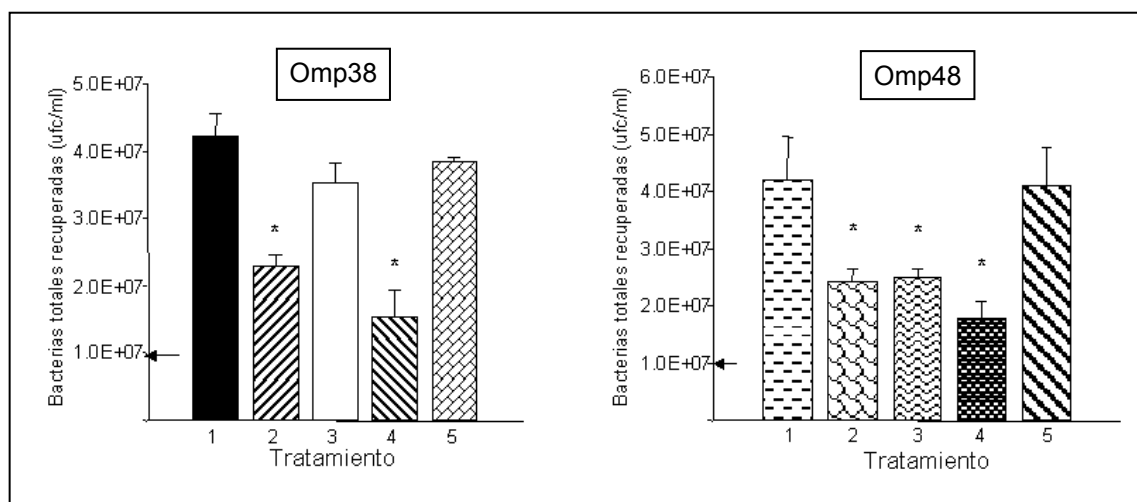


Figura 5. Adhesión de *A. veronii* a células HeLa. Antes del ensayo de adhesión, las bacterias y las células fueron tratadas como sigue: (1) bacterias y células sin tratamiento; (2) bacterias incubadas con antisuero anti-Omp38 o anti-Omp48, diluido 1:10; (3) con antisuero anti-Omp38 o anti-Omp48, diluido 1:100; (4) células incubadas con Omp38 u Omp48, 50 μ g/pozo; (5) bacterias incubadas con suero de conejo diluido 1:10. Las flechas indican la cantidad de inóculo inicial (*, $P < 0.05$).

Tabla 5. Efecto inhibitorio de carbohidratos y glicoproteínas en la unión de Omp48 a Mucina, Lactoferrina y Colágena.

Inhibidor	Porcentaje de inhibición		
	Mucina	Lactoferrina	Colágena
Control (sin inhibidor)	0	0	0
Carbohidratos:			
Galactosa	46	46	35
Glucosa	0	12	0
Fucosa	15	22	16
Manosa	27	20	43
NANA	25	21	0
Ramnosa	11	16	15
Dextrán	23	15	49
Dextrán sulfato	12	52	64
Glicoproteínas:			
Colágena	0	42	30
Fetúina	14	0	0
Fibronectina	0	0	0
Heparina	80	0	12
Lactoferrina	28	90	31
Mucina	103	11	9

Por otra parte, utilizando los mismos ensayos de inhibición de la adhesión con anticuerpos policlonales e inhibición competitiva con las proteínas purificadas, se demostró la capacidad de inhibir (inhibición cruzada) hasta un 50% la adhesión de otras especies de *Aeromonas* como *A. hydrophila* y *A. caviae*, e incluso la adhesión de especies heterólogas como *Vibrio vulnificus* y *V. parahaemolyticus* con Omp38 (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Adhesión de *Aeromonas* spp. a células HeLa en presencia o ausencia de antisuero anti-Omp48 o de Omp48.

Tratamiento	% de bacterias recuperadas de las células HeLa	
	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
Sin antisuero*	100±7.4	100±4.4
Anti-Omp48 (1:10)	54.1±1.4 ^a	56.6±3.3 ^a
Anti-Omp48 (1:100)	57.3±3.8 ^a	61.0±1.7 ^a
Omp48 (50µg)	49.5±3.3 ^a	52.0±1.7 ^a
Suero de conejo (1:10)	95.8±2.2 ^b	92.4±8.1 ^b

*La cantidad de bacteria recuperada de las células HeLa en ausencia de antisuero fue considerada como el 100% de adhesión. ^a $P < 0.05$; ^b $P > 0.05$

Tabla 7. Adhesión de *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp. a células HeLa en presencia o ausencia de antisuero anti-Omp38 o de Omp38.

Tratamiento	% de bacterias recuperadas de las células HeLa			
	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Sin antisuero*	100±7.4	100±4.4	100±8.3	100±4.3
Anti-Omp38 (1:10)	54.9±1.7 ^a	52.5±2.6 ^a	62.4±5.3 ^a	59.7±2.2 ^a
Anti-Omp38 (1:100)	85.4±3.5 ^a	80.5±5.7 ^a	87.4±2.6 ^b	83.2±4.3 ^a
Omp38 (50µg)	45.6±2.5 ^a	43.3±6.7 ^a	57.7±7.2 ^a	61.5±6.1 ^a
Suero de conejo (1:10)	95.7±2.2 ^b	92.4±8.1 ^b	94.3±5.1 ^b	92.0±2.8 ^b

*La cantidad de bacteria recuperada de las células HeLa en ausencia de antisuero fue considerada como el 100% de adhesión. ^a $P < 0.05$; ^b $P > 0.05$

3. Clonación de los genes *omp38* y *omp48* (Anexos I y III)

3.1. Amplificación de fragmentos génicos por PCR

A partir de la secuencia N-terminal de *Omp48* y de regiones altamente conservadas (Consenso 1 - 4) dentro de la familia de las porinas tipo LamB (Figura 6), se diseñó un grupo de oligonucleótidos degenerados (Tabla 8) para la amplificación de regiones parciales del gen *omp48* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

	N-terminal
lamBas	VDFHGYFRSGVGVSTDGSMTGLSDNAKQKVGRLGNEADTYGEIQLGSEVFNKDGKTFYVDSMVAMTSNGSNDWESTES
lamBec	VDFHGYARSGIGWTGSGGEEQQCFQTTGAQSKYRLGNECETYAEELKLGQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVAQQNDWEATDP
lamBst	VDFHGYARSGIGWTGSGGEEQQCFQATGAQSKYRLGNECETYAEELKLGQEVWKEGDKSFYFDTNVAYSVNQQNDWESTDP
lamBkp	VDFHGYARSGIGWTGSGGEEQQCFKATGAQSKYRLGNECETYAEELKLGQELWKEGDKSFYFDTNVAYSVNQEDDWESTSP
lamBye	-HFHGYARSGIGWTGSGGEEQQCFKTTGAQSKYRLGNECETYAEELKLGQELWKEGDKSFYLDTNVAYSVSQRDDWESTDP
	Consenso 1 Consenso 1'
lamBas	KFQCTSANGTALDGCENKEDATFALRQFNVQAKGLLGFAPAEATLWAGKRYQRHDVHISDFYWNISGRGAGIEGIQAG
lamBec	-----AFREANVQGNLIEWLPGSTIWAGKRFYQRHDVHIMDFYWDISGPGAGLENDVIG
lamBst	-----AFREANVQGNLIEWLPGSTIWAGKRFYQRHDVHIMDFYWDISGPGAGLENDVIG
lamBkp	-----AFREANIQGNLIDWLPGSTLWAGKRFYQRHDVHIMDFYWDISGPGAGLENDVIG
lamBye	-----AFREANVQGNLIESFPGSTMWAGKRFYQRHDVHIMDFYWDISGPGAGLEAIDLIG
	Consenso 2
lamBas	PGKVSFAWVRND---RSGTNVDGT-YNDEMNVN--TLDLRYAGIPLWQDGSLEVGVDYAIANPSDAQKDSANAQYKNAK
lamBec	FGKLSLAATRSEAGSSSFAFNNIYDYTNETANDVFDVRLAQMEINPGGTLELGVDYGRANLRDNYRLVDGAS----K
lamBst	FGKLSLAATRSEAGSSYTFSSQNIYDEVKDTANDVFDVRLAGLQTNPDGVLELGVDYGRANTTDGYKLADGAS----K
lamBkp	FGKLSLAATRSEAGSSYTFSSDDTKKYAAKTANDVFDIRLAGLETNPGGVLELGVDYGRANPQDDYRLEDGAS----K
lamBye	FGKLSVAATRSEAGSSAWIN-NQRKADAKTINDVYDIRLAGLETNPGGSLEFGVDYGRANTQDDYSLAPNAS----K
	Consenso 3
lamBas	DGVMLTAEALTQIGLGGFNKTVLQYGTGYSKTFFA-FWGDRSWYG-----AEAKDGADGFRIINHGI
lamBec	DGWLFTAHTQSVLKGFNKFVVQYATDSMTSQGK-GLSQGS--GVAFDNE-----KFAYN--INNNGHMLRILDHGAI
lamBst	DGWMFTAHTQSMLKGYNKFVVQYATDAMTTQGK-GQARGSDGSSSFTTEELSDGTKINYNKVINNNNGMWRILDHGAI
lamBkp	DGWMWTEHTQS IWGGFNKFVVQYATDAMTWSNS-GHSQGT-----IDNNGSMIRVLDHGAM
lamBye	DGVLLTAHTQSMMGGFNKFVVQYATDSMTSWSNS-GHSQGT-----VNNNGHMLRVIDHGAI
	Consenso 4
lamBas	PMGNSWEMGHQLVYGVGNMWDNDKWTMSVVARPMYKWD-DFNKTI FEGGYFKDKN-----KSTNGTSEEDAG
lamBec	SMGDNDMMYVGMY--QDINWDNDNGTKKWTVGIRPMYKWT-PIMSTVMEIGYDN-----VESQRTGDKNNQ
lamBst	SLGDKDWLMMYVGMY--QNDWDNDNGTEWWTVGVRPMYKWT-PIMSTLLEVGYN-----VKSQQTGDRNNQ
lamBkp	DFNDDWGLMYVAMY--QELDLDSKNGSTWYTVGVRPMYKWT-PIMSTQLEIGYDN-----VKSQRTSENNNQ
lamBye	NLAEKWDMMYVALY--QDTDWNNNGTTWYVGVPRPMLQMELPIMSTLLEIGYNN-----VKSQRTGKRNGQ
	Consenso 4
lamBas	YKLTTLAQAWSAGSSFWARPEIRVFASYLAQDKKEMKGN-----AFNNGTADDTWNFRGVQAEAWW
lamBec	YKITTLAQWQAGDSIWSRPAIRVFATYAKWDEKKGWYDYGADNANNFGKAVPADFNNGSFRGRGDSDEWTFGAQMEIWW
lamBst	YKITTLAQWQAGDSIWSRPAIRIFATYAKWDEKKGWYIKDG--DNI SRYAAATNSGIS--TNSRGRGDSDEWTFGAQMEIWW
lamBkp	YKITTLAQWQAGNSVWSRPAIRIFATYAKWDEWNGWY-----SNTSGLQTKDSSGSGAFTSSRGDDSEVTFGAQMEVWW
lamBye	YKLTTLAQWQAGDSIWSRPAIRVFATYANWDEKKGWYNN---VDKSPDNGLAQNGTIG--TDSRGRGDSDEWTFGAQF----

Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de proteínas tipo LamB de diferentes especies bacterianas. Abreviaturas (clave de acceso al GenBank): lamBas, *A. salmonicida* (Q44287); lamBec, *E. coli* (P02943); lamBst, *Salmonella typhimurium* (P26466); lamBkp, *Klebsiella pneumoniae* (P31242); lamBye, *Y. enterocolitica* (Q56850). Las regiones altamente conservadas (consenso) están sombreadas y los aminoácidos usados para el diseño de oligonucleótidos están subrayados.

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias conservadas y N-terminal de *Omp48*.

Proteína		Oligonucleótido		
Región	Secuencia	Nombre	Sentido	Secuencia
N-term.	VDFHGYMR	MR	Directo	GT(G/T)GA(C/T)TCCACGGCTA(C/T)ATGCG
Cons. 1	WAGKRFYQRH	AV1	Reverso	TGGCG(C/T)TGGTAGAA(G/A)CGCTT(G/A)CCGGCCCA
Cons. 1'	DFYYWDISG	AV1A	Reverso	CC(A/T)GAGATGTCCCAGTAGTA(G/A)AA(G/A)TC
Cons. 3	GFNKFVVQY	AV3	Reverso	TACTGCACCACGAA(C/T)TGTT(G/A)AA(G/A)CC
Cons. 4	TLAQWQAG	AV4	Reverso	CCGGCCTGCCACTGCTG(G/T)GCCAG(G/A)GT

Se obtuvieron al menos tres productos de amplificación específicos (amplicones) que se presentan en la Figura 7, los cuales se clonaron en el plásmido pGEM-T y se determinó su secuencia nucleotídica.

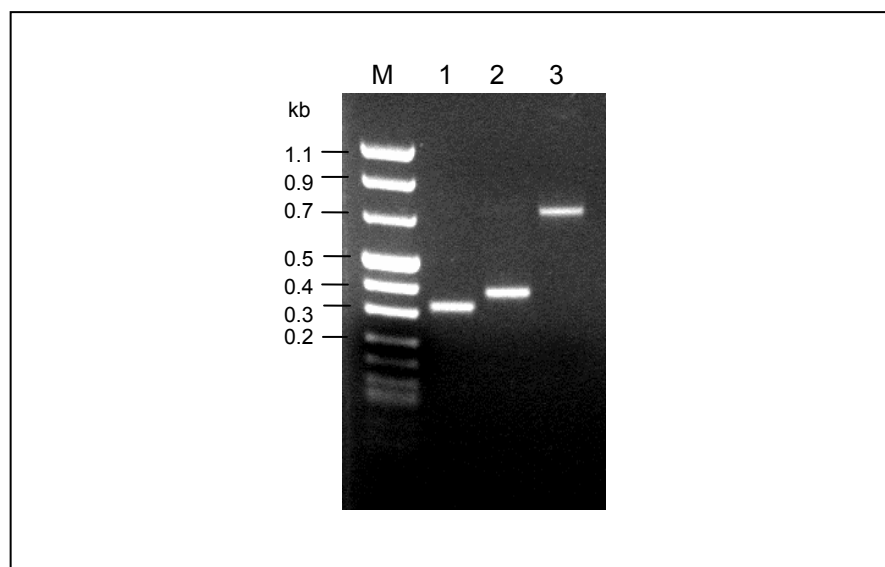


Figura 7. Productos de amplificación por PCR del gen *omp48* con diferentes combinaciones de oligonucleótidos. M, Marcador de talla molecular expresado en kilo pares de bases (Kb); carril 1, MR-AV1; carril 2, MR-AV1A; carril 3, MR-AV3.

En la secuencia de nucleótidos de los amplicones se localizó un marco de lectura abierto (ORF) que por medio de análisis BLAST, reveló similitud con porinas LamB. Además, algunos de los péptidos internos de *Omp48* previamente secuenciados se localizaron dentro de la secuencia de aminoácidos deducida. Con esto se confirmó que los amplicones correspondían a regiones parciales del gen *omp48*.

Por otra parte, para la amplificación de regiones parciales del gen *omp38* se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de las secuencias N-terminal y de péptidos internos de Omp38 obtenidos previamente (Tabla 9).

Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados a partir de N-terminal y péptidos internos de Omp38.

Proteína		Oligonucleótido		
Péptido	Secuencia	Nombre	Sentido	Secuencia
Nter38	AMIYDKDG	Por1F	Directo	GC (C/A) ATGATCTA (C/T) GA (C/T) AA (G/A) GA (C/T) GG
Pep.1	VQANYYGD	Por2F	Directo	GT (G/A) CAGGC (C/T) AACTACTACGG (C/T) GA
Pep.3	QEGQIIY	Por4F	Directo	CA (G/A) GA (G/A) GG (C/G) CAGATCATCTA
Pep.3	QEGQIIY	Por4R	Reverso	TAGATGATCTG (C/G) CC (T/C) TC (T/C) TG
Pep.4	YEDMVVET	Por5R	Reverso	GT (T/C) TC (G/C) AC (G/C) ACCATGTC (T/C) TCGTA

Utilizando diversas combinaciones de estos oligonucleótidos se obtuvieron una serie de amplicones (Figura 8) que se clonaron en el plásmido pGEM-T y se determinó su secuencia nucleotídica.

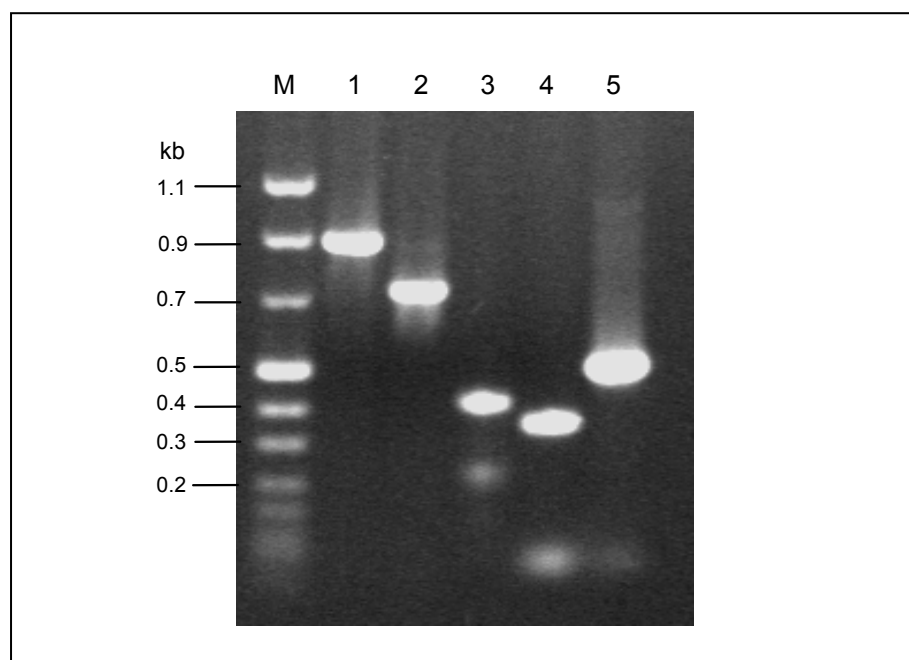


Figura 8. Fragmentos del gen *omp38* amplificadas por PCR con diferentes combinaciones de oligonucleótidos. M, Marcador de talla molecular expresado en Kb; carril 1, Por1F-Por5R; carril 2, Por2F-Por5R; carril 3, Por1F-Por4R; carril 4, Por2F-Por4R; carril 5, Por4F-Por5R.

De acuerdo al análisis del ORF localizado en estas secuencias, los amplicones corresponden a regiones parciales del gen *omp38*, ya que se localizaron los péptidos internos en la secuencia de aminoácidos deducida. Además, el análisis de las secuencias por medio de BLAST nuevamente mostró similitud con la familia de porinas OmpC y OmpF.

3.2. Construcción y tamizaje de una librería genómica de *A. veronii*

Posteriormente, utilizando el vector pBS-SK II, se construyó una librería de ADN genómico de *A. veronii* digerido parcialmente con la enzima *Sau3A*. La librería se tamizó con los amplicones correspondientes a regiones parciales de *omp38* y *omp48* como sondas moleculares para localizar y clonar los genes completos. Sin embargo, después de numerosos intentos, no se lograron obtener clonas positivas y cuando se disminuyó la astringencia en la hibridación, se obtuvieron falsas clonas positivas.

3.3. Southern blot

Posteriormente se realizó un análisis Southern blot con el ADN genómico de *A. veronii* digerido con diversas enzimas de restricción. Las tallas de los fragmentos de restricción que hibridaron con la sonda del gen *omp48* fueron: 5.6 kb (*Bam*HI); 5.6 kb (*Bgl*II); 6.8 kb (*Eag*I); 5.8 kb (*Sma*I); 2.0 kb (*Eco*RV); 8.0 kb (*Hind*III); 5.1 kb (*Pst*I); 3.0 kb (*Sph*I); 8.5 kb (*Cla*I) y 2.3 kb (*Bgl*I). Algunas de las regiones del ADN digerido correspondiente a estos fragmentos se utilizaron para construir librerías sub-genómicas, sin embargo, nuevamente ninguna de las colonias tamizadas reaccionó con la sonda.

Por otra parte, para el gen *omp38*, sólo se obtuvieron señales de hibridación de aproximadamente 2.2 kb (*Bam*HI), 1.6 kb (*Eag*I) y 1.7 kb (*Sma*I).

3.4. PCR inversa y secuenciación génica

Existiendo la posibilidad de que los productos de los genes fueran tóxicos para la cepa hospedera, *E. coli* DH5 α , se decidió clonar a los genes por medio de la PCR inversa.

Esta técnica se ha utilizado para determinar la secuencia nucleotídica que flanquea a regiones de secuencia conocida (Ochman *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2000).

En primera instancia se diseñaron oligonucleótidos adecuados para PCR inversa (Tabla 10), es decir, se ubicaron en los extremos de la secuencia conocida de cada uno de los genes y se orientaron en sentido opuesto como lo ilustra la Figura 9.

Tabla 10. Oligonucleótidos usados para la PCR inversa.

Gen	Nombre	Secuencia
<i>omp38</i>	Por6	ACACTGCTGGTTCTTCCTACG
	Por8	GTCACCGTAGTAGTTAGCCTGAAC
<i>omp48</i>	AV5	GAAGTACCGACACCGGGACGC
	AV6	ATCCATGCTGGGTGGCTTCAAC

Con la finalidad de preparar el ADN molde para la PCR inversa, se digirió el ADN genómico de *A. veronii* con diversas enzimas de restricción. Para asegurar que los fragmentos de restricción (que incluían a cada uno de los genes) tuvieran el tamaño apropiado para ser amplificados por PCR inversa, se tomó en consideración el resultado obtenido en el Southern blot. De esta manera, para el gen *omp48* se digirió el ADN con *SphI* o *EcoRV*, y para el gen *omp38* se digirió el ADN con *BamHI* o *SmaI*; cuyos fragmentos de hibridación oscilaron entre 1.7 y 3.0 kb. Además, fue posible saber previamente el tamaño esperado del fragmento de amplificación.

Después, el ADN digerido se ligó intramolecularmente para circularizar los fragmentos de restricción. Para favorecer que los fragmentos de restricción se ligan consigo mismos (ligación intramolecular), la ligación se llevó a cabo con el ADN altamente diluido (1-10 ng/ml). Por último, estos fragmentos circularizados fueron precipitados para concentrarlos y se usaron como ADN templado para la PCR inversa (Figura 9).

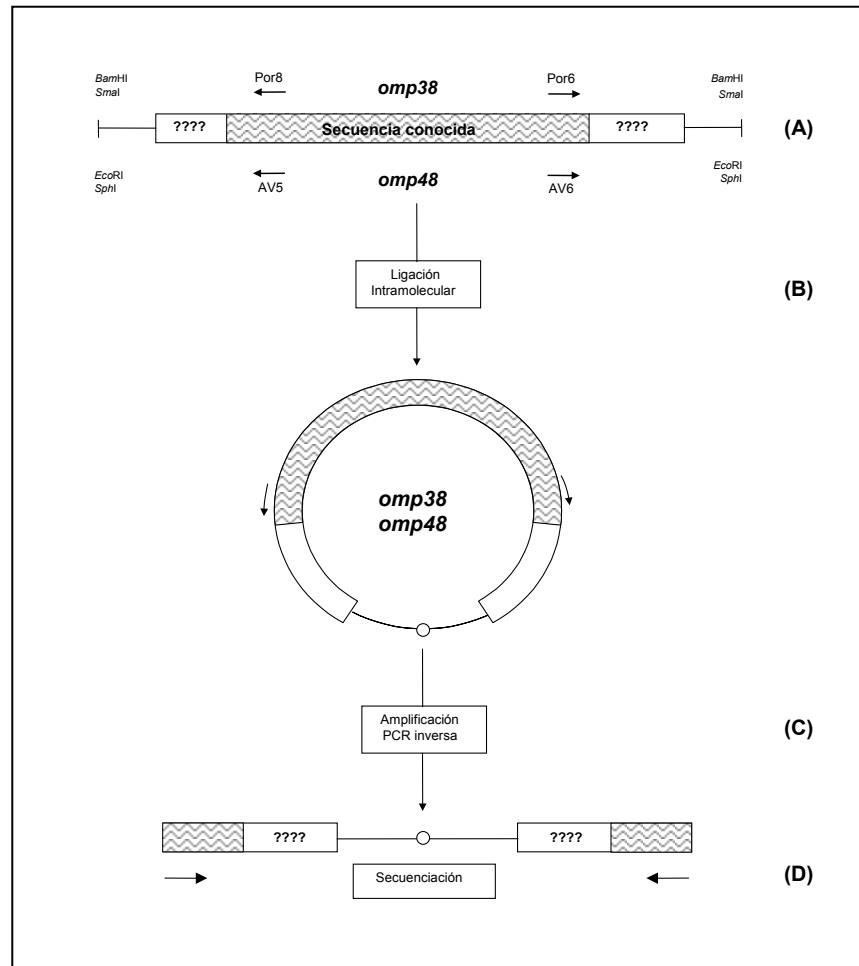


Figura 9. Representación esquemática del proceso de la PCR inversa. (A) El ADN genómico de *A. veronii* se digirió, por separado, con *Sph*I o *Eco*RV para *omp48*, y con *Bam*HI o *Sma*I para *omp38*. (B) Los fragmentos de restricción se ligaron consigo mismos (ligación intramolecular). (C) Los productos de ligación se usaron como ADN molde para la amplificación de las regiones desconocidas de ambos genes. (D) Se determinó la secuencia nucleotídica de los amplicones obtenidos. Las parejas de oligonucleótidos Por8-Por6 y AV5-AV6, se usaron para amplificar *omp38* y *omp48*, respectivamente.

Usando los oligonucleótidos AV5 y AV6 en la PCR inversa, se obtuvieron productos de amplificación de 2,300 pb (*Sph*I) y 1,350 pb (*Eco*RV), para el gen *omp48*. De manera similar, con los oligonucleótidos Por6 y Por8 se obtuvieron productos de 1,300 pb (*Bam*HI) y 800 pb (*Sma*I), para el gen *omp38* (Figura 10).

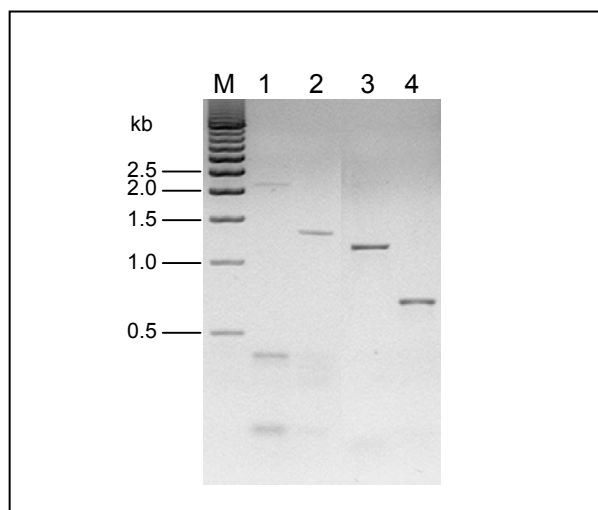


Figura 10. Productos de amplificación por PCR inversa. Fragmentos obtenidos a partir de ADN genómico digerido con *SphI* (carril 1) y *EcoRV* (carril 2), para *omp48*; y con *BamHI* (carril 3) y *SmaI* (carril 4), para *omp38*; M, Marcador de talla molecular expresado en Kb.

Se determinó la secuencia nucleotídica de estos amplicones y, con ello, se obtuvo la secuencia codificante completa de ambos genes, incluyendo una pequeña porción de región no codificante río arriba y río abajo. La secuencia nucleotídica de *omp38* y *omp48*, así como su secuencia de aminoácidos deducida se presentan en las Figuras 11 y 15, respectivamente.

4. Caracterización del gen *omp38* (Anexo III)

La región codificante de *omp38* consiste de 1,047 nucleótidos que codifican para una proteína primaria de 349 aminoácidos. La secuencia N-terminal y de péptidos internos de Omp38 fue localizada y, con la excepción de dos residuos de aminoácidos en dos péptidos internos, coincidieron casi perfectamente con la secuencia de aminoácidos deducida (Tabla 4 y Figura 11).

Los primeros 60 nucleótidos codifican para un péptido de 20 aminoácidos correspondiente al péptido líder (secuencia señal), conformado por residuos básicos y una región altamente hidrofóbica (Figura 12). El sitio de reconocimiento de la peptidasa señal, Ala-X-Ala (Ala-Asn-Ala) se localizó en la posición 18 a 20 (Figura 11).

```

SmaI-cccgggtcgagggcaggggagaagcag -301
-300 tcgggtcagccccggcctttgcacatatgttatgagggaacagggggttgcaataaacac -241
-240 caaaaaagaggggattcaggcagagagtatcgctgtaaactgtttccctgatggggcaaac -181
-180 attgtgagattcagctcacaattttccctgtgactatggttttcataaaaagttccaag -121
-120 ttttttcattgcggttcgaaaacccgggtgatagtctcggcgcatagtgatgcaaagaa -61
-60 catcgctaacacagggataacaaggacttagtgtttaattacagtaggcattggaaact -1
1 atgaaaaagacaattctggctattgctatcccggctctgtttgcatccgcccgtaacgct 60
  M K K T I L A I A I P A L F A S A A N A
61 gctgtcgtttacgacaaaagacggcacctcttttgatatctacggccgtgttcaggctaac 120
  A V V Y D K D G T S F D I Y G R V Q A N
121 tactacggtgacagtgataacccccaatctctcactcaagctgatacacaggggtgatgca 180
  Y Y G D S D N P N P L T Q A D T Q G D A
181 gagctcggtacctcccgtctgggtggtaagttgcgctgaacaacacactgg 240
  E L I G T S R L G W S G K V A L N N T W
241 tccgctatcgccaagaccgagtggaagtagcagccgaaaactctgacgactccaaattt 300
  S A I A K T E W Q V A A E N S D D S K F
301 aagtctcgtcatatctatgctggttttgatggcaccagtagcggcaagatcatcttcggc 360
  K S R H I Y A G F D G T Q Y G K I I F G
361 cagaccgacaccggttctacgacgtgctggaagcaaccgatatcttcaacgagtggggc 420
  Q T D T A F Y D V L E A T D I F N E W G
421 agctacggtaacttctacgacggctcgaagaaggccagatcatctactccaacagcttc 480
  S Y G N F Y D G R Q E G Q I I Y S N S F
481 ggtggcttcaagggcaactgtcctaccagaccaatgacaatgaagccgtcaaagtggt 540
  G G F K G K L S Y Q T N D N E A V K V A
541 gatggttggtgtaactccttactaccgaattccctggcatcaagcgcaactacggttac 600
  D V G G N S F T T E F P G I K R N Y G Y
601 gcagcttccgcccgttacgactttgacttcggtctgggctgaacgcccgttatgcttac 660
  A A S A G Y D F D F G L G L N A G Y A Y
661 tccgacctcgagagcaccaccaataccaactgggtgagaagtcggagtgggctctgggc 720
  S D L E S T T N T N T G E K S E W A L G
721 gcacactacgccatcaacggcttctacttcgctggtggtttacaccgaaggcgatctgaag 780
  A H Y A I N G F Y F A G V Y T E G D L K
781 aacgacaccactggctacaaggggtgaaggtcgtggctacgagctggctgcttccctaac 840
  N D T T G Y K G E G R G Y E L A A S Y N
841 gttgatgcctggaccttctggtggttacaacttcaaggaaggcaaggacaacactgct 900
  V D A W T F L A G Y N F K E G K D N T A
901 ggttcttctacgaagacatggttgacgaaacctgctggcgtagcgtacgtacgtttcact 960
  G A S S Y E D M V D E T L L G V Q Y A F T
961 tccaagttgaaagcctacaccgagtacaataacccaggggtatcgacaagatgcagcagcag 1020
  S K L K A Y T E Y K I Q G I D K M D E
1021 ttcactggtgccctgcaatacaacttctaactctagcctctgcgctgatttagttgatgaa 1080
  F T V A L Q Y N F *
1081 cggccaagcttgcttgccggttctgttttttgccccttactacttttctcctctggc 1140
  -----> <-----
1141 cctgcgccatatacaggtgtcttcttggcccccttggttctcctctggtaaatcgctaga 1200
1201 ttattcaattggtgaagcagattggccgacaggggaaggatgcctttgatcgatttcacc 1260
1261 cccccagtggcgcacgctggcacagcagttgctgagcggcgccccagcgtgttcgcy 1320
1321 gtcgtcaatggcagccgctcatcgcatgcttcgggaacaaccaagttggtgctggccc 1380
1381 ttggcaatcaccactatgagctcaccctgcccggcaccgttattgaccggg-SmaI

```

Figura 11. Secuencia nucleotídica del gen *omp38* de *A. veronii* y su secuencia de aminoácidos deducida. Las secuencias N-terminal y de los péptidos internos se presentan en negritas itálicas. El posible sitio de unión a ribosoma (RBS) y el péptido líder estas subrayados. El asterisco indica el codón de término. Las líneas punteadas convergentes indican la secuencia palindrómica.

Un potencial sitio de unión a ribosoma se localizó inmediatamente río arriba del codón de inicio. Además, río abajo del codón de término de traducción se localizó una

secuencia palindrómica característica de los terminadores de transcripción independientes de Rho (Figura 11). La proteína Omp48 madura (sin péptido líder) consiste de 329 aminoácidos. La composición aminoacídica de Omp38 es característica de las porinas bacterianas no específicas, incluyendo un pI ácido (4.17), alto contenido de glicina (12.2%), bajo contenido de prolina (0.9%) y carece de cisteínas. También posee una fenilalanina al final del extremo carboxilo terminal, la cual esta presente en todos los miembros de la super-familia de porinas bacteriana (Jeanteur *et al.*, 1991).

En el análisis de similitud se encontró que Omp38 posee baja identidad (25-30%) con las porinas PhoE, OmpC y OmpF de bacterias entéricas, comparada con el considerable porcentaje de identidad (75%) con la Porina II de *A. hydrophila* (Jeanteur *et al.*, 1992; Nogueras *et al.*, 2000) (Tabla 11).

Tabla 11. Similitud de Omp38 con porinas bacterianas relacionadas.

Organismo	Proteína	% Identidad	% Similitud	No. de acceso
<i>Aeromonas veronii</i>	Omp38	---	---	AF538867
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Porina II	75	84	AF183931
<i>E. coli</i>	PhoE	30	42	AAB08661
	OmpF	24	38	2OMF
	OmpC	25	40	NP_288795
	OmpN	26	42	AAC38644
	OmpK37	29	45	CAA09666
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OmpK36	27	42	1OSM_A
	OmpK35	27	42	CAA09665
	PhoE	28	42	Q47490
<i>Enterobacter cloacae</i>	PhoE	29	41	S36606
<i>Salmonella typhi</i>	PhoE	29	42	Q01605
<i>Citrobacter freundii</i>	OmpF	27	40	O33980
<i>Serratia marcescens</i>	OmpC	27	42	NP_405004
<i>Yersinia pestis</i>	OmpL	26	43	Q52581
<i>Photobacterium profundum</i>	OmpU	27	42	NP_230282

Se elaboró un modelo teórico de estructura secundaria de Omp38 utilizando el algoritmo predictivo GOR (Southampton Bioinformatics Data Server). También se consideró el análisis de hidrofobicidad (Kyte y Doolittle, 1982) (Figura 12) y el alineamiento comparativo de Omp38 con PhoE y OmpF de *E. coli*, y OmpK36 de

Klebsiella pneumoniae (Figura 13), cuyas estructuras tridimensionales ya han sido determinadas (Cowan *et al.*, 1992; Dutzler *et al.*, 1999).

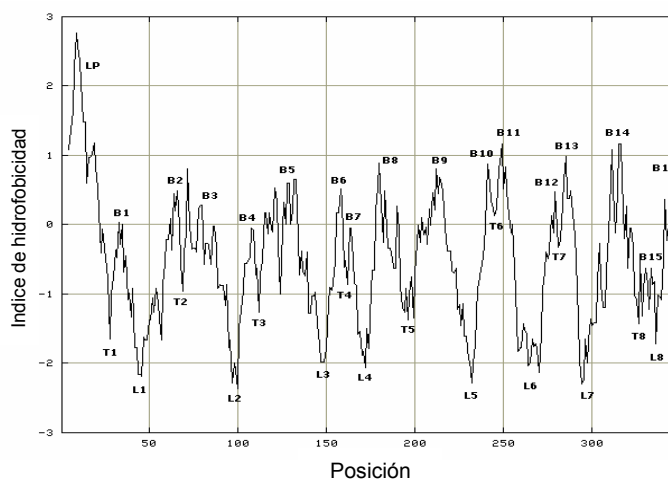


Figura 12. Gráfica de hidrofobicidad Kyte-Doolittle de Omp38. El tamaño de las ventanas utilizadas fue de nueve aminoácidos. Se indica el péptido líder (LP), las láminas β antiparalelas transmembranales (B1-B16), las asas externas (L1-L8) y las vueltas periplásmicas (T1-T8).

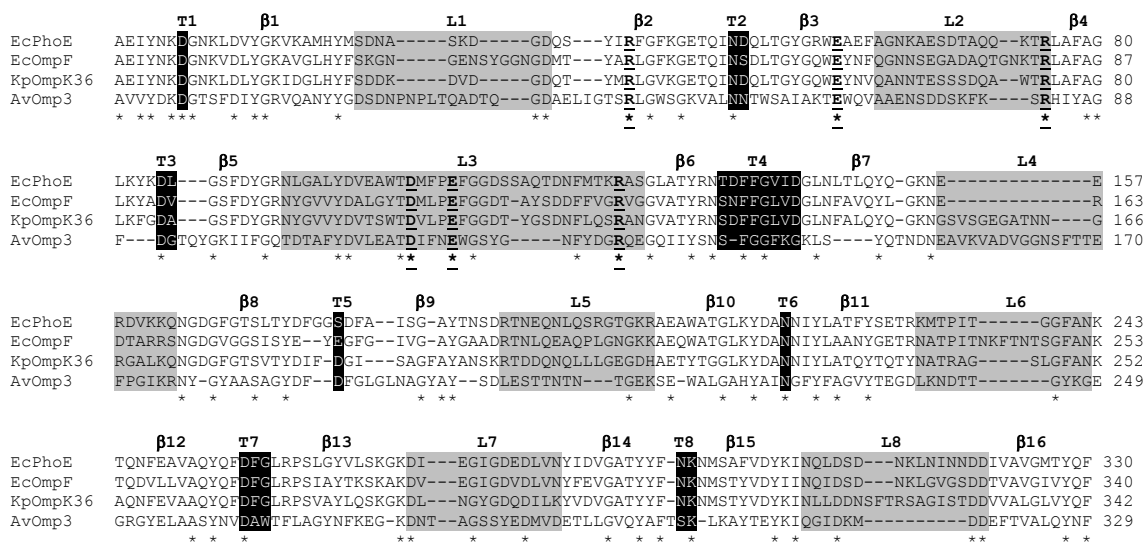


Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de Omp38 con porinas de estructura conocida. Se indican las láminas β antiparalelas transmembranales (B1-B16), las asas externas (L1-L8) y las vueltas internas (T1-T8). PhoE (EcPhoE) y OmpF (EcOmpF) de *E. coli*; OmpK36 (KpOmpK36) de *K. pneumoniae*. Los aminoácidos conservados se indican con asteriscos y aquellos implicados en la estructura-función de las porinas están subrayados. Las claves de acceso al GenBank se encuentran en la Tabla 11.

El modelo consiste de 16 láminas β antiparalelas transmembranales con vueltas pequeñas al interior del periplasma y 8 asas expuestas en la superficie bacteriana (Figura 15). Además, Omp38 posee los residuos conservados Arg47, Arg83, Arg129, Glu67, Glu118 y Asp114 (Figuras 13 y 14), que están presentes en la mayoría de las porinas bacterianas y son relevantes para su estructura-función (Cowan *et al.*, 1992).

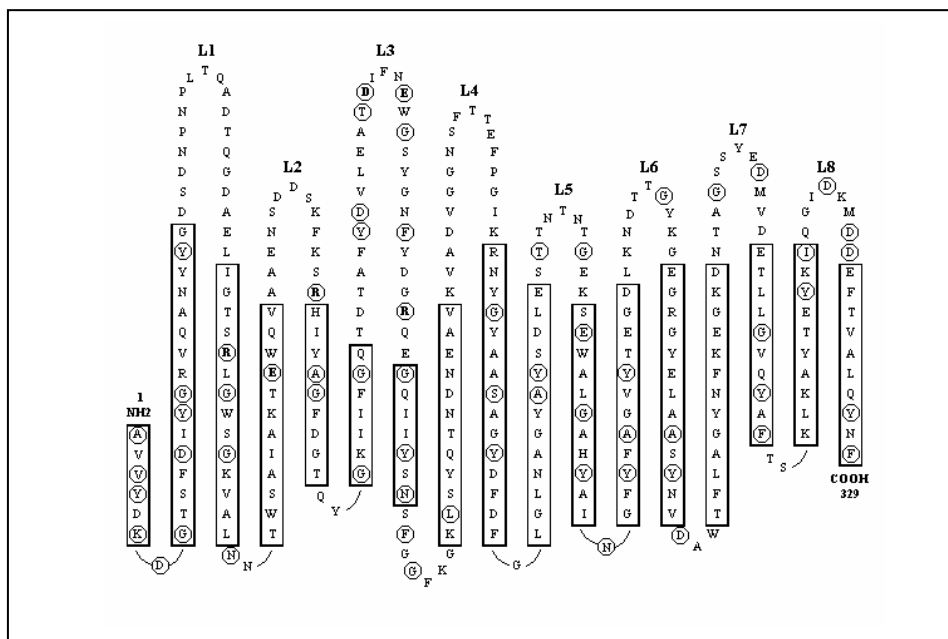


Figura 14. Modelo teórico de estructura secundaria de Omp38. Los aminoácidos conservados están en círculos y aquellos implicados en la estructura-función de las porinas están en negritas. Se indican las láminas β antiparalelas transmembranales (en recuadros), y las asas externas (L1-L8).

5. Caracterización del gen *omp48* (Anexo I)

El análisis de la secuencia del gen *omp48* reveló un marco de lectura abierta (ORF) de 1,287 nucleótidos que codifica para una proteína primaria de 426 aminoácidos. La secuencia N-terminal y de péptidos internos de Omp48 determinadas previamente se localizaron perfectamente en la secuencia de aminoácidos deducida (Tabla 4 y Figura 15).

```

-24 ctctctcagcgggaataaggaaaatgaaaatgaaagcaaagtggctcccgatcgctgca 36
      M K M K A K W L P I A A
37 gcagtaaccgcagccctggcttcccaagccgcttcgcccgttgatttccacggctacatg 96
      A V T A A L A S Q A A F A V D F H G Y M
97 cgttccgggtgtcggtacttccgataaacggcagcctgcaaacctattccaaggcgaaaagtc 156
      R S G V G T S D N G S L Q T Y S K A K V
157 ggtcgtctgggcaatgaagccgagacctacggcgaagtccagctagggtcaagaggcttac 216
      G R L G N E A E T Y G E V Q L G Q E A Y
217 aacaaggacggcaagtctttctacgtagactccatgtttgcaatggtttctggtcagcaa 276
      N K D G K S F Y V D S M F A M V S G Q Q
277 ggtcgcgactgggaaagcactagcggtagtgatgccgactttgccctgcgccaattcaac 336
      G R D W E S T S G S D A D F A L R Q F N
337 gtccaaggcaaaggcgtgctgggcttcgcgcccgaagccactctgtgggcccgtgaagcgt 396
      V Q A K G V L G F A P E A T L W A G K R
397 tactataacgtcacgacatccacatctccgacttctactactgggatgtgtctggtgcc 456
      Y Y Q R H D I H I S D F Y Y W D V S G A
457 ggtgctgggtgtagaaaaatccaggtcgggtccgggcaagctctcttttgcgatggctgcgt 516
      G A G V E N I Q A G P G K L S F A W L R
517 aacgaccctgggatgattacgatcagttttaggtggtgtggtgtcgacaagcgtggt 576
      N D P W D D Y D Q F V G G V G V D K R V
577 gatacggacgtactggacctgcgttatgccggatcccgcctgtggaaagacggctccctg 636
      D T D V L D L R Y A G I P L W K D G S L
637 gagctgggatagactacgcccgcggtaacctgaccgatgagcagaaaagcggctctggggc 696
      E L G Y D Y A R G N L T D E Q K A A L G
697 agcaaagattacgagaaaaacggccacatgctgaccgcccagctgaccaatccatgctg 756
      S K D Y E K N G H M L T A E L T Q S M L
757 ggtggcttcaacaagaccgtggttcagttttcggcgcggttatgccgctcaggctggt 816
      G G F N K T V V Q Y F A D G Y A A V
817 gactacggtagcggttctggcagcggcctgagccaatctgccgccaagggcgatggctgg 876
      D Y G S G S G S G L S Q S A A K G D G W
877 cgcttcatcaactggggcgtgctgcccgttggcgataaggctcgagttcggtcatcagctg 936
      R F I N W G V L P V G D K V E F G H Q L
937 gtttacgggtactgccagtgatatcgacaatgacagcgcctgacaaaagacaccttctccgtt 996
      V Y G T A S D I D N D S A D K D T F S V
997 gtcgcttcgcccgatgtacaagtggaatgacacccatgaagaccatcgccgagcttggctat 1056
      V V R P M Y K W N D T M K T I A E L G Y
1057 caccatgacagctacaagccgaacaatggcaccgaaaccagcaccatcggtagaataac 1116
      H H D S Y K P N N G T E T S T I G K K Y
1117 accctggctcaggcctggctccgctggctccagcttctgggcccggcggaaatccgcgta 1176
      T L A Q A W S A G S S F W A R P E I R V
1177 tatgcttctactcctggattctgacggccagttccgcccggatgccaatggcgtgaagcag 1236
      Y A S Y L D S D G Q F R P D A N G V K Q
1237 gacgactcctggaacttcggtgttcaagcgggaagcttgggtggtaa
      D D S W N F G V Q A E A W W *

```

Figura 15. Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del gen *omp48* de *A. veronii*. Las secuencias N-terminal y de los péptidos internos se presentan en negritas itálicas. Los posibles sitios de unión a ribosoma (RBS), el péptido líder y el motivo de unión a azúcares están subrayados. El codón de término de traducción se indica con un asterisco.

Como se esperaba para una OMP, se identificó una secuencia señal (péptido líder) correspondiente a los primeros 25 aminoácidos de la proteína primaria, con sus características clásicas: residuos de aminoácidos N-terminales básicos, una región central

altamente hidrofóbica (Kyte y Doolittle, 1982) y el sitio de corte de la peptidasa líder, Ala-X-Ala (Ala-Phe-Ala) en las posiciones 23-25 (von Heijne, 1983) (Figura 15).

Se localizaron dos secuencias como potenciales sitios de unión a ribosoma (secuencia Shine-Dalgarno), 9 pares de bases río arriba con respecto al primero y segundo codón ATG (Met1 y Met3). También se localizó un potencial motivo (motif) de unión de azúcares, [Y Y Q R H D], en las posiciones 133-138 (Figura 15) similar al encontrado en las amilasas bacterianas (Vihinen y Mantsala, 1989).

La proteína Omp48 madura (sin péptido líder) consiste de 401 aminoácidos y posee algunas características clásicas de porinas bacterianas, como el punto isoelectrico (pI) ácido (4.62) y alto contenido de glicinas (12%). En contraste, carece de cisteínas, a diferencia de otras porinas LamB de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* y *Yersinia enterocolitica* (Lang y Ferenci, 1995), las cuales contienen dos cisteínas que forman un puente disulfuro en el asa 1 (Schirmer y Cowan, 1993; Schirmer *et al.*, 1995).

La proteína Omp48 esta constituida por 9 asas externas y 18 láminas β antiparalelas transmembranales (Figura 16), según lo indica su patrón de hidrofobicidad (Kyte y Doolittle, 1982) y el alineamiento comparativo de Omp48 con la porina LamB de *E. coli*, cuya estructura tridimensional ya ha sido determinada (Schirmer y Cowan, 1993; Schirmer *et al.*, 1995).

```

      T1    $\beta$ 1           L1            $\beta$ 2           T2            $\beta$ 3           L2
lamBav  VDFHGYMRSGVGTSDNG----SLQTYSKAKVGR LGNEAET YGEVQLGQEA YNKDGKSFYVDSMFAMVSGQQGRDWESTSGSDADFALRQF 85
lamBec  VDFHGYARSGIGWTGSGGGEQQCFQTTGAQSKYRLGNECET YAELKLGQEVWKBGDKSFYFDTNVAYSVAQQN-DWEAT-----DPAFREA 84
      *****  ***:*  :..*      .:**  .      *****.*.*:*:*****:.....*****:*:  .*  .**  ***:*  *  *:*:

       $\beta$ 4           T3            $\beta$ 5           L3            $\beta$ 6           T4            $\beta$ 7           L4            $\beta$ 8
lamBav  NVQAKGV LGFAP EATLWAGK RYYQRHDIHISDFYYWVSGAGAGV ENIQAGP GKLSFAWLRNDPWDDYDQFVGG--VGVDKRVDTDVLDL 173

```

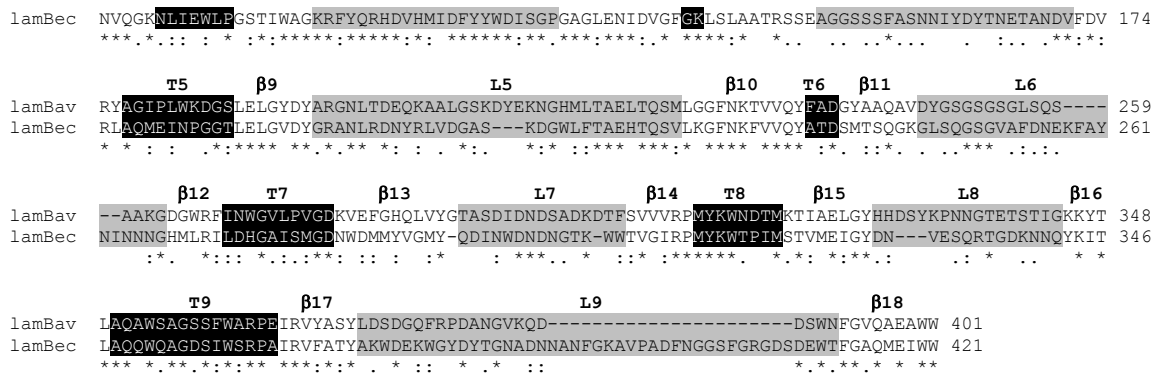


Figura 16. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de Omp48 con LamB de *E. coli*. Se indican las láminas β antiparalelas transmembranales (β 1- β 18), las asas externas (L1-L9) y las vueltas periplásmicas (T1-T9).

La búsqueda en las bases de datos genómicas (SwissProt, GenBank y EMBL) realizadas a por medio de BLAST reveló moderada similitud de Omp48 con maltoporinas bacterianas de la familia LamB (Tabla 12).

Tabla 12. Similitud de Omp48 con maltoporinas de la familia LamB

Organismo	% Identidad	% Similitud	No. de acceso
<i>Aeromonas veronii</i>	---	---	AF538866
<i>Aeromonas salmonicida</i>	57	67	Q44287
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	55	67	BAC62987.1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	55	67	BAC62987.1
<i>Yersinia pestis</i>	44	60	AAM86785.1
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	44	55	ZP_00135540.1
<i>Vibrio cholerae</i>	41	54	AAF96924.1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	40	53	Q56850
<i>Photorhabdus luminescens</i>	40	53	CAE12751.1
<i>Salmonella enterica</i>	40	52	AAO71601.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39	52	P31242
<i>Shigella flexneri</i>	38	51	AAN45590.1
<i>Escherichia coli</i>	38	51	P02943
<i>Salmonella typhimurium</i>	40	51	P26466

6. Construcción de vacunas de ADN (Anexo IV)

6.1. Amplificación y subclonación de omp38 y omp48 en pcDNA3.1

Utilizando la ADN polimerasa de alta fidelidad, *Pwo* ADN polimerasa, los genes *omp38* y *omp48* fueron amplificados por PCR.

En los oligonucleótidos 5' (directos) se incluyó un sitio de restricción *Bam*HI para facilitar posteriores sub-clonaciones, y la secuencia Kozak (sitio de unión a ribosoma eucariota) justo antes del codón de inicio para asegurar traducción de los RNAs mensajeros de los genes en las células eucariotas.

Los oligonucleótidos 3' (reversos) comprendían la secuencia nucleotídica de la región carboxilo terminal y el codón de término de traducción (Tabla 13).

Tabla 13. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes *omp38* y *omp48*.

Primer	Sentido	Secuencia*
38F1	Directo	GGATCCACCATG AAAAAGACAATTCTGGCTATTGC
38F2	Directo	GGATCCACCATG GCTGTCGTTTACGACAAAGACGG
38R	Reverso	TTAGAAGTTGTATTGCAGGGCAAC
48F1	Directo	GGATCCACCATG AAAATGAAAGCAAAGTGGCTCCC
48F2	Directo	GGATCCACCATG GTTGATTTCCACGGCTACATGCG
48R	Reverso	TTACCACCAAGCTTCCGCTTG

*El sitio de restricción *Bam*HI y el codón de inicio se indican en negritas y la secuencia Kozak está subrayada

Con las correspondientes parejas de oligonucleótidos se amplificaron las regiones génicas que codifican para las formas madura (sin péptido líder) y primaria (con péptido líder) de ambas proteínas (Figura 17).

Los genes fueron clonados en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1. Este vector posee el promotor inmediato temprano del citomegalovirus (CMV), la señal de poli-

adenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección y el origen de replicación ColE1 para su propagación en *E. coli* (Figura 18). De esta manera, se generaron los vectores de expresión pOMP38P, pOMP38M, pOMP48P y pOMP48M, los cuales codifican para las proteínas Omp38 y Omp48, conformando así las vacunas de ADN propiamente dichas (Figura 18). Finalmente los plásmidos se aislaron y se purificaron a través de columnas de intercambio catiónico. El patrón electroforetico de estos plásmidos se presenta en la Figura 17.

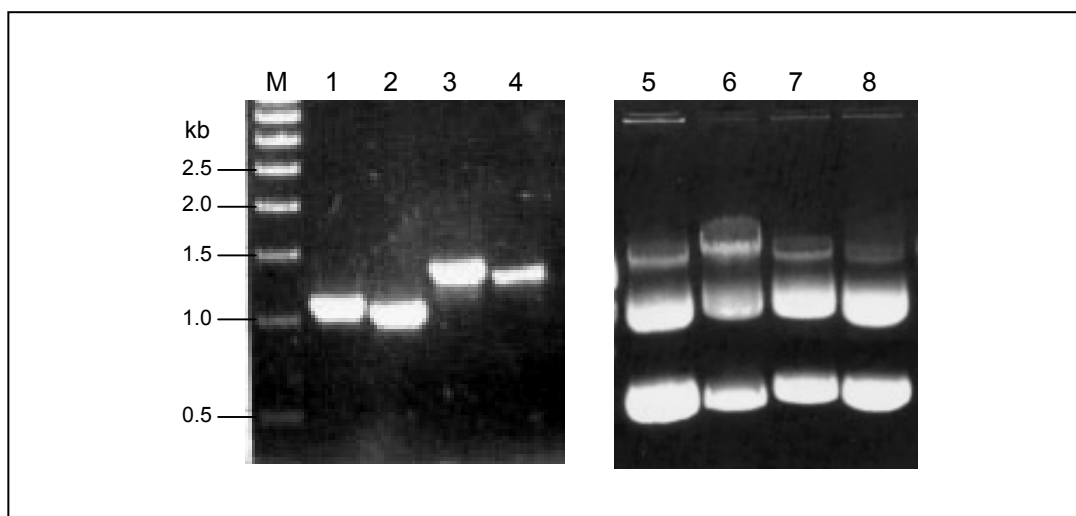


Figura 17. Amplificación de los genes *omp38* y *omp48* por PCR y vectores de expresión construidos. M, Marcador de talla molecular expresado en Kb; carril 1, *omp38* con péptido líder (1,100 pb); carril 2, *omp38* sin péptido líder (990 pb); carril 3, *omp48* con péptido líder (1,300 pb); carril 4, *omp48* sin péptido líder (1,150 pb); carril 5, pOMP38P; carril 5, pOMP38M; carril 6, pOMP48P; carril 7, pOMP48M.

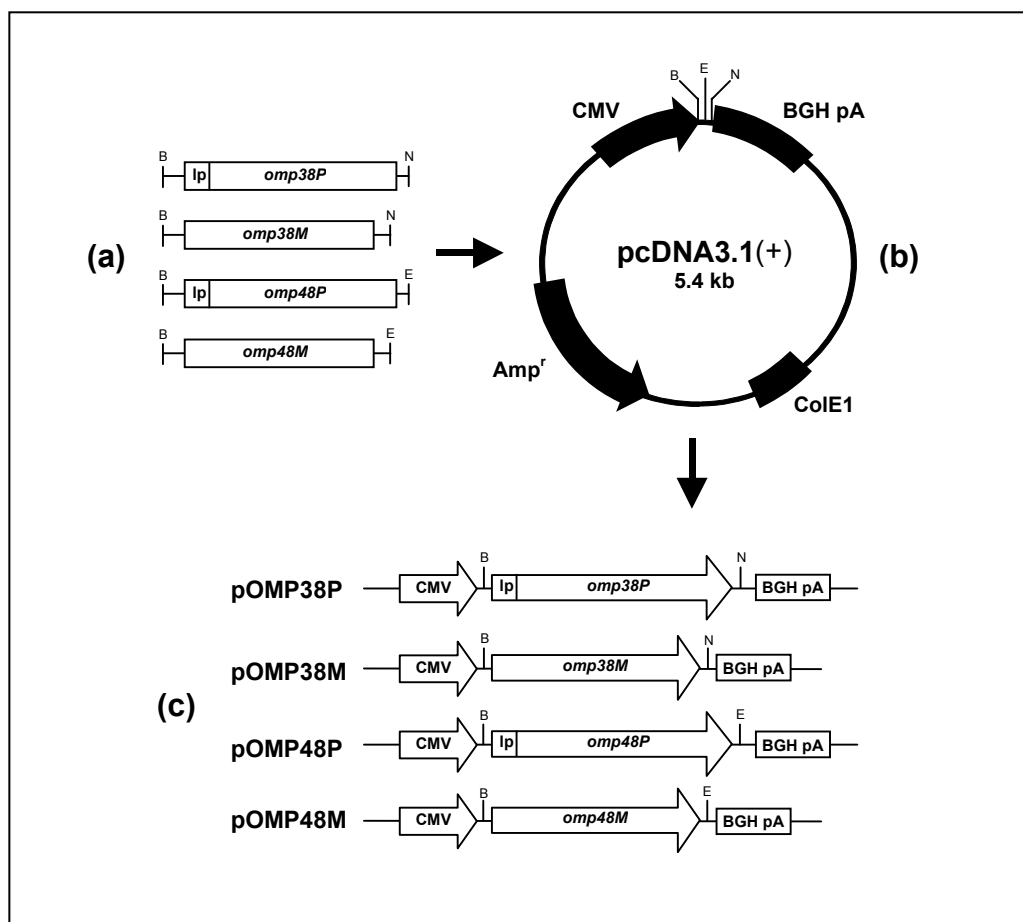


Figura 18. Diagrama esquemático de la construcción de las vacunas de ADN. Los genes amplificados por PCR (a), fueron clonados en el vector pcDNA3.1 (b), para generar los vectores de expresión (vacunas de ADN) (c). Abreviaturas: CMV, promotor inmediato temprano del citomegalovirus; BGH pA, señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina; Amp^r , gen de resistencia a ampicilina; ColE1, origen de replicación para *E. coli*; lp, péptido líder; B, *Bam*HI; N, *Not*I; E, *Eco*RI.

6.2. Expresión *in vitro* de *Omp38* y *Omp48* en células eucariotas

Se analizó la expresión *in vitro* de los genes *omp38* y *omp48* a partir de los vectores construidos. Células HeLa fueron transfectadas por separado con pOMP38P, pOMP38M, pOMP48P, pOMP48M y pcDNA3.1 y co-transfectadas con el vector reportero pCMV.SPORT- β gal como control de la transfección y para normalizar los datos de expresión. Por medio de análisis Western blot no fue posible detectar las formas primaria o madura de *Omp38* y *Omp48*. La detección de las proteínas se logró únicamente cuando los

extractos celulares se concentraron en las membranas utilizando un sistema “slot blot” (50 µg/pozo). Aunque la expresión de ambas proteínas fue significativa en comparación con el control, ésta fue muy baja ya que las señales fueron muy tenues. Se detectó un mayor nivel de expresión de Omp48 primaria con respecto a su forma madura, sin embargo, se observó lo contrario para la Omp38, siendo mayor la expresión de su forma madura (Figura 19).

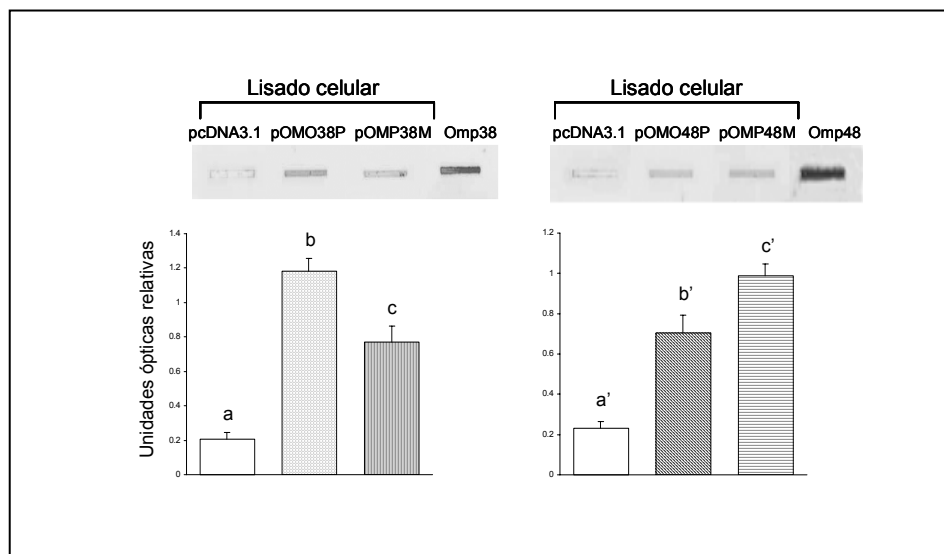


Figura 19. Análisis de la expresión de Omp38 y Omp48 en células HeLa. Los resultados se expresan como unidades ópticas relativas, que es la relación de la densidad de las bandas dividida por la actividad β-galactosidasa de cada tratamiento. Las proteínas Omp38 y Omp48 purificadas se usaron como controles positivos y las proteínas totales de células transfectadas con pcDNA3.1 se usaron como controles negativos. Las letras sobre las barras indican las diferencias significativas ($P < 0.05$)

7. Vacunación genética de *Paralabrax maculatofasciatus* (Anexo IV)

La eficiencia de las vacunas de ADN fue evaluada en cabrilla arenosa, *Paralabrax maculatofasciatus*, inmunizadas intramuscularmente. En dos bioensayos por separado, se analizó su potencial para despertar una respuesta inmune humoral y por otra parte, se evaluó su capacidad para generar protección contra infecciones experimentales por *A. veronii*.

7.1. Respuesta inmune humoral

La respuesta inmune humoral de *P. maculatofasciatus* generada por la inyección intramuscular de los plásmidos pOMP38P y pOMP48P, fue determinada por medio de ELISA a las cuatro y seis semanas después de la vacunación. En ambos tiempos, los peces vacunados produjeron muy bajos niveles de anticuerpos anti-Omp38 y anti-Omp48. Aunque baja, la respuesta humoral fue significativa, comparada a la de los peces control vacunados con buffer PBS o con el vector pcDNA3.1 solo (Figura 20).

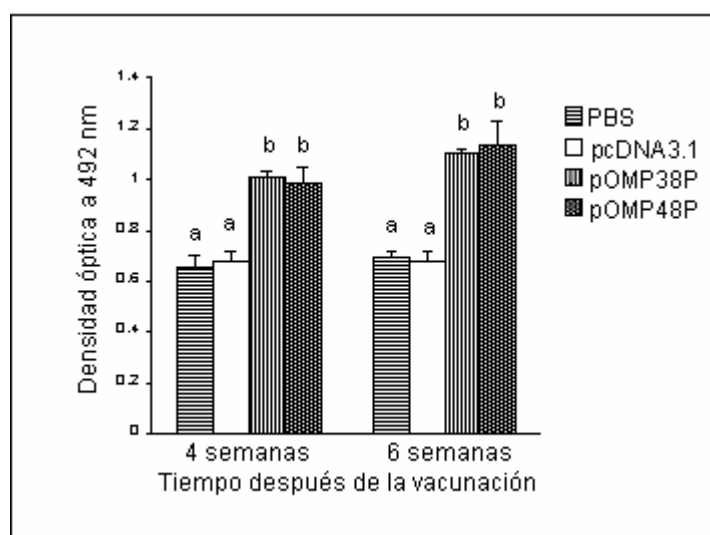


Figura 20. Detección de anticuerpos anti-Omp38 y anti-Omp48 en suero de peces vacunados con los plásmidos pOMP38P y pOMP48P. La cantidad de anticuerpos específicos presentes en el suero se determinó por medio de ELISA, cuatro y seis semanas después de la vacunación. Las letras sobre las barras indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2. Inmunoprotección contra *A. veronii*

Cuatro semanas después de la inmunización de los peces con las vacunas de ADN, éstos fueron infectados intraperitonealmente con *A. veronii*. Como lo muestra la Tabla 14, la mortalidad de los peces vacunados con pOMP38P y pOMP48P fue menor que la de los peces control vacunados con buffer PBS o con el vector pcDNA3.1. Las vacunas pOMP38P y pOMP48P generaron un porcentaje relativo de supervivencia (PRS) similar,

de 53.8% y 60.2%, respectivamente. Por otra parte, la aplicación de una mezcla de ambas vacunas no generó mayor protección que la de cada una individualmente (PRS=61.6%), lo cual descarta un posible efecto adyuvante.

Tabla 14. Mortalidad acumulada y porcentaje relativo de supervivencia de peces inmunizados con las vacunas de ADN y retos con *A. veronii*.

Peces vacunados con:	Mortalidad acumulada (peces muertos/peces vacunados totales)	PRS*
Buffer PBS	41.4% (12/29)	---
pcDNA3.1	43.3% (13/30)	---
pOMP38P	20% (6/30)	53.8%
pOMP48P	17.2% (5/29)	60.2%
pOMP38P + pOMP48P	16.6% (5/30)	61.6%

*Porcentaje relativo de supervivencia, con relación a los peces control vacunados con el vector pcDNA3.1 solo.

De acuerdo al análisis histopatológico, los principales daños que sufrieron los organismos infectados fueron en bazo, hígado y riñón. En estos tejidos se presentó necrosis, elevación del número de melanomacrófagos e infiltración hemorrágica, principalmente (Figura 21). Además, se observó que un número menor de peces vacunados con pOMP38P y pOMP48P (o la mezcla de ambas vacunas) presentó los daños histológicos, en comparación con aquellos vacunados con buffer PBS o el vector pcDNA3.1 (Tabla 15).

Tabla 15. Porcentaje de peces con alteraciones histológicas en diversos tejidos.

Peces vacunados con:	% de peces con alteraciones en:		
	Bazo	Hígado	Riñón
Buffer PBS	79	79	82
pcDNA3.1	83	80	86
pOMP38P	40	43	40
pOMP48P	40	37	31
pOMP38P + pOMP48P	39	39	36

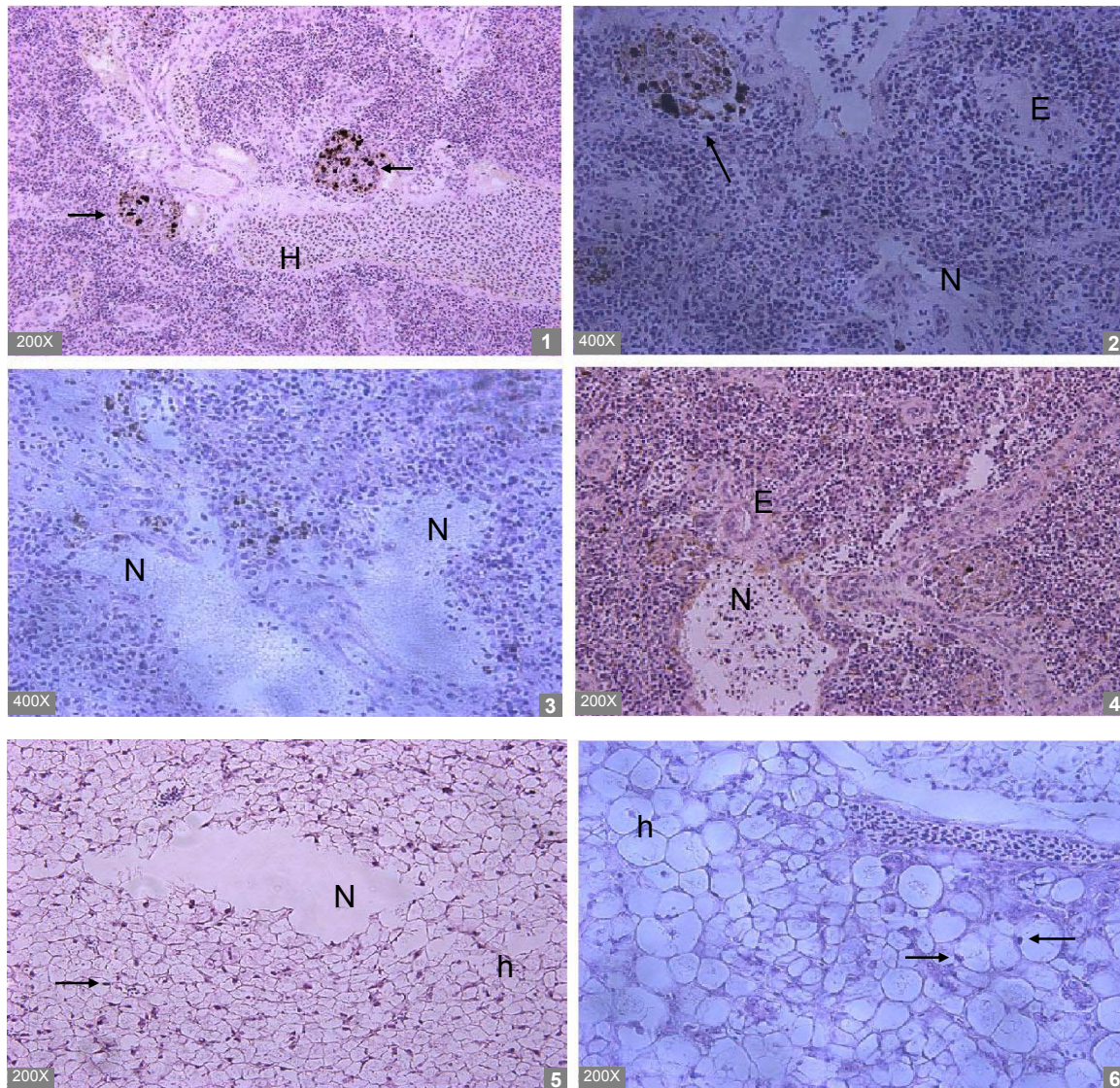


Figura 21. Principales daños histológicos observados en peces infectados. Secciones de bazo (1-4): Necrosis de la pulpa esplénica (N), infiltración hemorrágica (H), centros de melanomacrófagos (→), pérdida de la integridad de la pared de los elipsoides (E), reducción del tejido hematopoyético. Hígado (5-8): Necrosis (N), hepatocitos vacíos (h), núcleos picnóticos y cariorréticos (→). Riñón (9-12): Necrosis de tejido intersticial (N), necrosis de túbulos renales (r), inflamación de células epiteliales de túbulos renales (→), reducción del tejido hematopoyético. (continúa e la siguiente página).

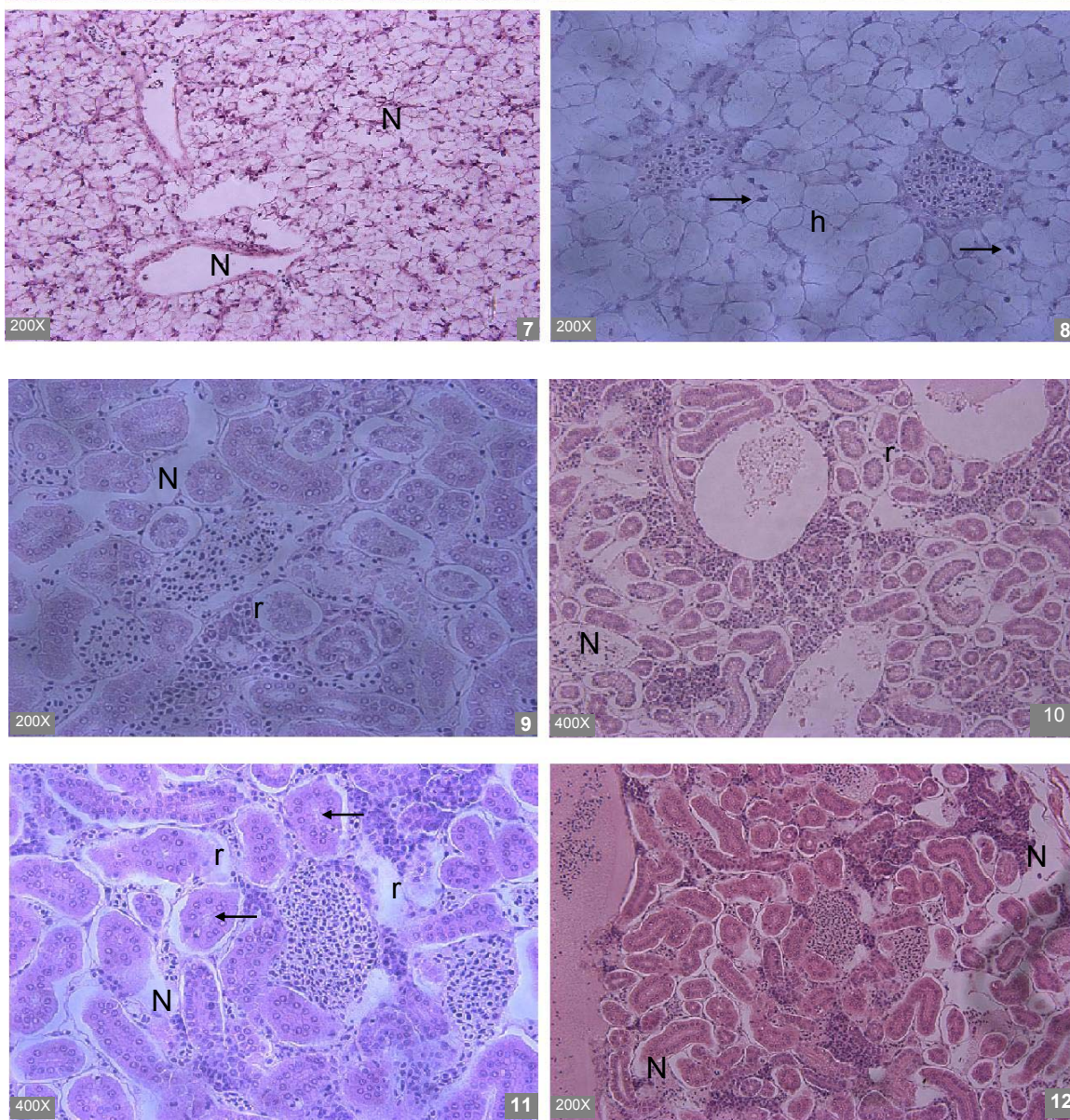


Figura 21. Continuación.

V. DISCUSIÓN

1. Omp38 y Omp48: potenciales adhesinas de *A. veronii* (Anexos II y III)

La adhesión bacteriana es el primer paso del proceso patogénico que permite la colonización del hospedero por parte del microorganismo. Para iniciar una infección, los patógenos bacterianos deben tener primeramente la capacidad de adherirse a un tejido apropiado del hospedero o a sus componentes asociados para eventualmente colonizarlo (Ofek y Doyle, 1994). Algunas glicoproteínas que juegan un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de las bacterias patógenas en el hospedero son las proteínas de la matriz extracelular y algunos componentes de las mucosas como la mucina y la lactoferrina (Ofek y Doyle, 1994; Westerlund y Korhonen, 1993). La matriz extracelular es una mezcla de glicoproteínas secretadas, compuesta principalmente de colágenas, laminina y proteoglicanos que se localizan en la superficie celular epitelial y endotelial y rodean a las células del tejido conectivo (Aumailley y Gayraud, 1998). Se ha observado que existe una relación directa entre la capacidad de algunas bacterias de adherirse a estas glicoproteínas y la patogenicidad de las mismas (Dubreuil *et al.*, 2002; Westerlund y Korhonen, 1993).

La habilidad de unir mucina y lactoferrina, así como algunos componentes de la matriz extracelular (fibronectina, laminina y colágena) es una propiedad común de las *Aeromonas* mesófilas. Esta característica se ha abordado en términos de adhesión y capacidad de captación de hierro en el caso de la lactoferrina (Ascencio *et al.*, 1990; 1991; 1992; 1998; Kishore *et al.*, 1991).

Se realizó un estudio preliminar con la finalidad de identificar específicamente a aquellas proteínas de *A. veronii* implicadas en la interacción con glicoproteínas. Por medio de Western blot se identificaron dos proteínas de 38 y 48 kDa en el sobrenadante de cultivo de *A. veronii* con afinidad por mucina y lactoferrina (Figura 2). Interesantemente, la secuencia N-terminal de estas proteínas indicó que correspondían a proteínas de membrana externa (OMPs). Este resultado es consistente con el hecho de que muchas bacterias Gram-negativas liberan fragmentos de su membrana externa en forma de vesículas y cuya composición proteica es muy similar al de las preparaciones de OMPs. Las vesículas en la

membrana externa se forman y se liberan durante el crecimiento exponencial, cuando la membrana externa de la bacteria se sintetiza más rápido que la capa de peptidoglicana, resultando en la formación de ampollas en la superficie bacteriana (Beveridge, 1999). La presencia de OMPs extracelularmente en forma de vesículas de membrana externa ya ha sido reportada previamente en *A. hydrophila* y *A. salmonicida* (MacIntyre *et al.*, 1980).

Las proteínas de 38 y 48 kDa que mostraron afinidad por mucina y lactoferrina fueron localizadas posteriormente en la fracción de la membrana externa, siendo ambas las más abundantes (Figura 3). El análisis por medio de BLAST de sus secuencias N-terminal y de péptidos internos (Tabla 15) confirmó su naturaleza como OMP, al mostrar considerable similitud con proteínas bacterianas tipo porinas como LamB, OmpC, OmpF y PhoE. A partir de que ambas proteínas fueron identificadas como OMPs, éstas fueron denominadas como Omp38 y Omp48. Similares resultados en cuanto a composición (perfil proteico), abundancia y similitud de secuencias N-terminal de las OMPs de *A. veronii* han sido observados previamente en *A. hydrophila* (Jeanteur *et al.*, 1992).

Se observó que tanto Omp38 como Omp48 interaccionan significativamente, aunque en diferentes intensidades, con fibronectina, varios tipos de colágenas y con mucina y lactoferrina (Figura 4). En otros trabajos se ha demostrado que bacterias patógenas como *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida* y *Campylobacter jejuni*, interaccionan con glicoproteínas de la matriz extracelular o mucinas por medio de sus OMPs, con lo cual se incrementa su potencial de adhesión (Sperandio *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 1996; Scharfman *et al.*, 1996; Konkel *et al.*, 1997; Dabo *et al.*, 2003). Como patógeno oportunista, *A. veronii* puede tomar ventaja de su capacidad de unir proteínas de la matriz extracelular a través de Omp38 y Omp48, puesto que estas moléculas del hospedero quedan expuestas después de una infección primaria o en tejidos que han sufrido un daño químico o mecánico.

La mucina es el componente principal de secreciones mucosales, como lo es la mucosa intestinal. Se ha demostrado la capacidad de varias especies de *Aeromonas* para unir y usar mucina de diversos hospederos como única fuente de carbono y nitrógeno para su crecimiento (Ascencio *et al.*, 1998). La afinidad de Omp48 y Omp38 por mucina podría ayudar a la bacteria a permanecer en la mucosa intestinal, utilizarla como nutriente para

replicarse y eventualmente alcanzar los enterocitos, o células epiteliales, y adherirse al tejido. La lactoferrina es una glicoproteína enlazante de hierro, secretada por el epitelio glandular y se encuentra presente en las secreciones mucosales. Esta proteína limita la disponibilidad de hierro en los fluidos extracelulares, el cual es esencial para el crecimiento microbiano. La proteína homóloga de la lactoferrina en los peces es la transferrina. Los efectos bactericidas y bacteriostáticos de la lactoferrina contra algunas bacterias Gram-negativas han sido demostrados (Ellison *et al.*, 1988). Contrario a esto, se ha observado que la lactoferrina puede ayudar al crecimiento de *A. salmonicida* (Hirst y Ellis, 1996) y *A. hydrophila* (Stintzi y Raymond, 2000). *A. salmonicida* posee un mecanismo de adquisición de hierro que requiere el contacto directo de la bacteria con lactoferrina, sin embargo la(s) molécula(s) implicada(s) aún no ha(n) sido identificada(s) (Chart y Trust, 1983). Cabría la posibilidad de que Omp38 y Omp48 participaran en este tipo de adquisición de hierro a partir de la lactoferrina, o transferrina en el caso de peces, sin embargo se requieren estudios adicionales para demostrar esta hipótesis.

La inhibición de la unión de Omp48 a mucina, lactoferrina y colágena por diversos azúcares, sugiere que la interacción es con los carbohidratos de estas glicoproteínas (Tabla 5). A este respecto, es posible que la secuencia aminoacídica localizada en Omp48 (Figura 15), la cual es similar al sitio de unión de azúcares (maltodextrinas) de las amilasas (Vihinen y Mantsala 1989), esté involucrada en la interacción tipo lectina con las glicoproteínas (Vazquez-Juarez *et al.*, 2003). La heterogeneidad de los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas hace difícil definir que carbohidratos en particular podrían servir como receptores de las OMPs. Sin embargo, los principales precursores de dichos oligosacáridos (galactosa, fucosa, manosa, ácido N-acetil neuramínico, dextrán sulfato) parecen estar comunmente involucrados. Anteriormente ya se habían aislado OMPs de *A. hydrophila* por medio de cromatografía de afinidad en base a su reactividad con carbohidratos, y de acuerdo a sus propiedades de hemoaglutinación se sugirieron como posibles adhesinas de esta bacteria (Quinn *et al.*, 1993).

La capacidad de Omp38 y Omp48 de adherirse a componentes de la matriz extracelular y otras glicoproteínas sugirió la posibilidad de que estas proteínas de superficie funcionaran como factores de adhesión de *A. veronii*. Para evaluar si la adhesión de *A.*

veronii a células epiteliales es mediada por Omp38 y Omp48, en el presente trabajo se utilizaron células HeLa cultivadas *in vitro*, las cuales han servido tradicionalmente como modelo para estudiar patrones de adhesión de otras enterobacterias (Albert *et al.*, 2000). A algunos elementos bacterianos que clásicamente se han conocido como factores de adhesión, tales como el antígeno O de los LPS, los flagelos polares o laterales y los pilis, también se les ha atribuido esta función en algunas especies de *Aeromonas* (Merino *et al.*, 1996; Rabaan *et al.*, 2001; Gavin *et al.*, 2002; Kirov *et al.*, 1999). Sin embargo, no se descarta la posible existencia de otros factores alternativos, y los resultados obtenidos así lo demuestran. Los anticuerpos policlonales anti-Omp38 y anti-Omp48 inhibieron significativamente la adhesión de *A. veronii* a células HeLa (Figura 5). En el caso de Omp38 la inhibición no fue significativa en la dilución 1:100 del anticuerpo, lo cual podría ser explicado en términos de un bajo título del mismo. La ausencia de inhibición de la adhesión con el suero de conejo no inmunizado demuestra que la inhibición observada con los antisueros anti-Omp38 y anti-Omp48 fue debida a los anticuerpos específicos ahí presentes. También se observó que las proteínas Omp38 y Omp48 inhiben competitivamente la adhesión de *A. veronii* (Figura 5). Además, los anticuerpos policlonales inhibieron de manera cruzada la adhesión de otras especies relacionadas de *Aeromonas* y *Vibrios* (Tablas 6 y 7). Existen otros estudios que demuestran la participación de OMPs de *A. hydrophila* y *A. caviae* en la adhesión de estas bacterias a células epiteliales (Fang *et al.*, 1998; Rocha-de-Souza *et al.*, 2001). Sin embargo estas OMPs no han sido plenamente caracterizadas, por lo que no se puede determinar si dichas proteínas son las correspondientes homólogas de Omp38 y Omp48, aunque de acuerdo a los resultados de inhibición cruzada existe la posibilidad de que así sea. La existencia de cepas adherentes de *Aeromonas* spp. que carecen del antígeno O de los LPS o de fimbrias (pilis), podría ser explicada por la participación de las OMPs como potenciales adhesinas (Sakazaki y Shimada, 1984; Nishikawa *et al.* 1991, 1994; Kirov *et al.*, 1995). El potencial de las OMPs como factores de adhesión se ha demostrado plenamente en otros importantes patógenos como *V. cholerae* (OmpU), *E. coli* enterohemorrágica (Intimina y OmpA), *Yersinia pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* (YadA) (Paerregaard *et al.*, 1991; McKee *et al.*, 1995; Sperandio *et al.*, 1995; Torres y Kaper, 2003), pero al igual que en el caso de las

OMPs de *A. veronii*, resta todavía determinar si la adhesión esta mediada por interacciones tipo lectina con superficies celulares ricas en carbohidratos, por la interacción con receptores específicos en los enterocitos o por ambas. Colectivamente, estos resultados muestran que Omp38 y Omp48 pueden funcionar como factores de adhesión alternativos de *A. veronii* y que otras especies relacionadas, tanto de *Aeromonas* como de *Vibrio*, poseen componentes en su superficie con epítopes conservados. Este hecho es de particular relevancia tomando en cuenta que la diversidad antigénica de estos patógenos dificulta en gran medida el desarrollo de vacunas (Newman, 1993).

2. Clonación y caracterización molecular de *omp38* y *omp48* (Anexos I y III)

Los oligonucleótidos degenerados que se diseñaron a partir de los péptidos secuenciados de Omp38 y de las regiones conservadas de Omp48 (Tablas 8 y 9), funcionaron adecuadamente para la amplificación específica, por medio de PCR, de fragmentos de los respectivos genes *omp38* y *omp48* (Figuras 7 y 8). Numerosos fracasos para localizar y clonar los genes completos a partir de la librería genómica y sub-genómica (parcial) de *A. veronii*, sugirió la posibilidad de que los genes fueran tóxicos para la cepa de *E. coli* hospedera. La dificultad para clonar genes que codifican para porinas, como resultado de un posible efecto tóxico de los genes, se ha descrito previamente para algunas bacterias Gram-negativas como *Neisseria gonorrhoeae*, *V. cholerae* y *Pasteurella multocida*, entre otras (Carbonetti y Sparling, 1987; Sperandio *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1997). La toxicidad de los genes que codifican para OMPs tipo porinas no ha sido explicada aún, pero se piensa que cuando las porinas son altamente expresadas, éstas son dirigidas y embebidas en la membrana externa por medio de su péptido líder, desplazando a las porinas nativas de *E. coli*, ocasionando inestabilidad osmótica y alteración de la integridad estructural de la membrana externa, lo cual es letal para la bacteria (Carbonetti y Sparling, 1987; Luo *et al.*, 1997). La síntesis de Omp38 y Omp48 a niveles tóxicos, podría deberse a la expresión de los genes a partir de su propio promotor de manera no regulada, aunado al efecto de dosis génica provocado por el alto número de copias del vector plasmídico, pBS-SK, usado para construir la librería genómica.

Para solventar este problema, se decidió clonar los genes *omp38* y *omp48* por medio de PCR inversa. Esta técnica sirve para determinar las secuencias flanqueantes (río arriba y río abajo) de una región de secuencia conocida (Figura 9) (Ochman *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2000). Los oligonucleótidos diseñados para la PCR inversa (Tabla 10) fueron específicos y generaron productos de amplificación de las tallas esperadas de acuerdo a los fragmentos de restricción de ADN genómico empleados como templado (Figura 10). Con estos amplicones se logró determinar la secuencia nucleotídica de los genes completos (Figuras 11 y 15).

La secuencia de aminoácidos de Omp38, deducida a partir de la secuencia nucleotídica de *omp38*, sugiere que ésta es una OMP tipo porina no específica, tal como PhoE, OmpC y OmpF (Jeanteur *et al.*, 1991; Nikaido, 1992). Al igual que estas proteínas y de acuerdo al alineamiento múltiple de secuencias y a su patrón de hidrofobicidad, Omp38 presenta un modelo teórico de estructura secundaria constituido por 8 asas externas y 16 láminas β antiparalelas transmembranales. A pesar de la baja similitud, Omp38 presenta los residuos conservados que se consideran importantes para la estructura y la función de estas porinas (Cowan *et al.*, 1992; de Cock *et al.*, 1997). Sin embargo, carece del pentapéptido conservado que se localiza en el asa 3 de la familia de porinas (Jeanteur *et al.*, 1991), el cual juega un papel relevante en la estabilidad térmica de la conformación trimérica de las porinas (Fourel *et al.*, 1993).

El análisis de la secuencia de aminoácidos indica que Omp48 tiene todas las características de una OMP tipo porina. Además, el análisis de homología de secuencia sugiere que Omp48 es una proteína de la familia de porinas LamB o maltoporinas (Jeanteur *et al.*, 1991; Nikaido, 1992). Estas proteínas están presentes en muchas bacterias incluyendo *Salmonella thyphimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. salmonicida*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Actinobacillus* y *Yersinia*, y sirven de poro de entrada de la maltosa al interior de las bacterias a través de la membrana externa (Lang y Ferenci, 1995). La expresión de estas proteínas es inducida en presencia de maltosa, sin embargo, cuando *A. veronii* fue cultivada en medio LB enriquecido con maltosa, no se observó un incremento en la producción de Omp48 (Figura 3). Este resultado es similar al obtenido en el trabajo de Jeanteur *et al.* (1992), donde la Porina I de *A. hydrophila* (homóloga de LamB) fue

constitutivamente expresada en caldo LB, independientemente de la presencia o ausencia de maltosa, y su inducción sólo fue observada en medio mínimo complementado con maltosa. Es probable que el caldo LB, al ser un medio completo enriquecido, contenga moléculas similares (azúcares), capaces de inducir la expresión de Omp48. Al igual que LamB, Omp48 presenta una conformación secundaria constituida por 9 asas expuestas y 18 láminas β antiparalelas transmembranales. A diferencia de las maltoporinas de *E. coli*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* y *Y. enterocolitica*, las cuales poseen dos cisteínas, la maltoporina de *A. salmonicida* y Omp48 carecen estos residuos (Dodsworth *et al.*, 1993; Lang y Ferenci, 1995). Es probable que la estructura de Omp48 difiera de la de LamB de *E. coli*, al menos en el asa 1, donde dichos residuos forman un puente disulfuro (Schirmer y Cowan, 1993; Schirmer *et al.*, 1995). Se requieren estudios adicionales para determinar si Omp38 y Omp48 poseen características funcionales similares a las de PhoE, OmpC, OmpF y LamB, en cuanto a diámetro y selectividad del poro se refiere.

Las bacterias Gram-negativas interactúan con superficies y moléculas presentes en el ambiente externo, a través de las regiones hidrofílicas expuestas o asas de sus OMPs. Por lo tanto, además de su papel fisiológico, las porinas bacterianas participan en otras facetas, asociadas a la adaptación, supervivencia y prevalencia de las bacterias en un determinado ambiente (Achouak *et al.*, 2001). Las asas de Omp38 y Omp48, al estar expuestas en la superficie de *A. veronii* podrían estar contribuyendo a las propiedades adhesivas de estas proteínas, y por ende de la bacteria, al interactuar con receptores específicos de las células epiteliales o de manera inespecífica por medio de interacciones electrostáticas. La elevada similitud de Omp38 con la Porina II de *A. hydrophila* (Tabla 11), explica la inhibición de la adhesión observada en *A. hydrophila* tratada con el antisuero anti-Omp38. Es probable que tanto las especies de *Aeromonas* como las de *Vibrios* que se evaluaron, posean epítopes conservados (lineales o estructurales) en las regiones correspondientes a las asas expuestas de sus OMPs (potencialmente homólogas a Omp38 y Omp48), los cuales puedan reaccionar de manera cruzada con los anticuerpos policlonales.

3. Diseño, construcción y evaluación de vacunas de ADN para peces (Anexo IV)

Se ha demostrado previamente que las OMPs son altamente antigénicas y que la vacunación de peces con estas proteínas es un método efectivo para prevenir infecciones por *A. salmonicida* y *A. hydrophila* (Hirst y Ellis, 1994; Lutwyche *et al.*, 1995; Bricknell *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2000; Rahman y Hawaii, 2000). En este estudio se construyeron vacunas de ADN a base de los genes *omp38* y *omp48* de *A. veronii* en el vector de expresión pcDNA3.1 (Figura 17). A pesar de que los vectores construidos (pOMP38P, pOMP48P, pOMP38M y pOMP48M) poseen todas las secuencias requeridas para la expresión de genes, la expresión de las proteínas Omp38 y Omp48 en células HeLa fue muy baja (Figura 19). Además, no se observó un efecto consistente en el nivel de expresión de ambas proteínas causado por la presencia de su secuencia señal nativa. No existió una diferencia considerable en el nivel de expresión de las formas primaria (con péptido líder) y madura (sin péptido líder) de ambas proteínas.

Teóricamente, cualquier gen que codifique para una proteína antigénica de un patógeno puede ser usado para la elaboración de vacunas de ADN, siempre y cuando el uso de codones del gen en cuestión permita su expresión en las células del hospedero. Numerosos estudios han demostrado que existe una correlación directa entre el uso de codones de genes que codifican para antígenos de virus, bacterias y parásitos y su nivel de expresión en hospederos heterólogos (Andre *et al.*, 1998; Uchijima *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 1999; Stratford *et al.*, 2000; zur Megede *et al.*, 2000; Nahum *et al.*, 2001; Cid-Arregui *et al.*, 2003). El problema con el uso de codones surge comúnmente con genes de algunas bacterias o parásitos inferiores, a diferencia de los genes virales, los cuales naturalmente son expresados en la célula hospedera usando su maquinaria celular. La baja expresión de Omp3 y Omp48 puede ser explicada en términos de uso de codones o estabilidad de su ARN mensajero, puesto que otros genes antigénicos, pero de origen viral, se han expresado apropiadamente en células de peces, utilizando el mismo promotor (CMV) presente en los vectores pcDNA3.1 y pCMV4 (Anderson *et al.*, 1996; Lorenzen *et al.*, 1998; Corbeil *et al.*, 1999).

La vacunación intramuscular de la cabrilla arenera con las vacunas de ADN generó bajos niveles de anticuerpos anti-Omp38 y anti-Omp48 (Figura 20). La baja respuesta de

anticuerpos en vacunación genética esta asociada con los bajos niveles de expresión del antígeno en las células del hospedero, ya que se ha demostrado que la optimización del uso de codones de los genes antigénicos se traduce en mejores niveles de expresión y respuesta humoral (Andre *et al.*, 1998; Uchijima *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 1999; Stratford *et al.*, 2000; zur Megede *et al.*, 2000; Nahum *et al.*, 2001; Cid-Arregui *et al.*, 2003). Por otra parte, para inducir una respuesta inmune humoral, las células B deben primero localizar al antígeno circulante para ser activadas. Por lo tanto, la secreción de la proteína antigénica puede influenciar la magnitud de la producción de anticuerpos. En el caso de antígenos no secretados, los linfocitos B (LcB) pueden ser activados cuando el antígeno es liberado de las células transfectadas, después de que éstas son lisadas por acción de los linfocitos T (LcT) citotóxicos específicos contra el antígeno, daño celular o muerte de los miocitos. También, la proteína antigénica liberada puede ser tomada y procesada por las células presentadoras de antígeno, resultando en la activación de los LcT cooperadores y posteriormente, en la actividad biosintética de los LcB (Donnelly *et al.*, 2000; Tüting *et al.*, 2000). Una buena respuesta de anticuerpos se ha obtenido con vectores de expresión que codifican para OMPs bacterianas que carecen de secuencia señal de secreción (Zhang *et al.*, 1999; Penttila *et al.*, 2001), sin embargo, se ha descrito que la magnitud de la respuesta se incrementa cuando los antígenos son expresados como proteínas extracelulares (Smooker *et al.*, 1999; Svanholm *et al.*, 1999). El vector pcDNA3.1 utilizado en este estudio para la construcción de las vacunas de ADN no posee una secuencia señal de secreción para expresar a los antígenos como proteínas extracelulares. Para estudios posteriores sobre el desarrollo de vacunas de ADN a base de antígenos bacterianos se recomienda la incorporación de dicha secuencia.

No obstante que las vacunas de ADN indujeron la producción de bajos niveles de anticuerpos anti-Omp38 y anti-Omp48, la vacunación generó una protección parcial contra infecciones experimentales por *A. veronii*. Es decir, existió menor mortalidad en cabrillas inmunizadas con pOMP38P y pOMP48P, respecto a los peces control vacunados con buffer PBS o con el vector pcDNA3.1, además de un porcentaje menor de peces con alteraciones histopatológicas (Tablas 13 y 14). Similares niveles de protección han sido observados en salmón (*Salmo salar*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) inmunizados con OMPs

(Hirst y Ellis, 1994; Lutwyche *et al.*, 1995; Bricknell *et al.*, 1999). Se ha propuesto que los anticuerpos específicos generados por vacunación participan en la prevención de la adhesión e invasión bacteriana del epitelio de agallas, piel y aletas de peces durante las primeras etapas de la infección (Yin *et al.*, 1996). Sin embargo, los resultados encontrados en estudios previos de vacunación contra *Aeromonas* spp., no ha permitido definir en forma definitiva si existe una correlación entre el nivel de anticuerpos específicos en suero y el grado de protección contra infecciones por *Aeromonas* spp. En algunos casos se ha observado una relación proporcional entre la magnitud de la respuesta humoral y la protección, mientras que en otros, la protección ha sido independiente del título de anticuerpos en suero (McCarthy *et al.*, 1983; Olivier *et al.*, 1985; Baba *et al.*, 1988; Palm *et al.*, 1998; Bricknell *et al.*, 1999; Chandran *et al.*, 2002). La escasa respuesta humoral generada en suero por la vacunación con pOMP38P y pOMP48P, sugiere que la inmunidad mediada por células podría estar involucrada en la protección parcial de la cabrilla registrada en este trabajo. Muy pocos estudios han abordado el papel de la inmunidad mediada por células como producto de la vacunación de peces, pero se ha sugerido que la activación de macrófagos juega un papel importante en la defensa contra patógenos bacterianos como *A. salmonicida* y *R. salmoninarum* (Ellis, 1997). El proceso fagocítico es un mecanismo importante para la destrucción de bacterias patógenas extracelulares. La activación de macrófagos, capaces de producir mayores niveles de especies reactivas de oxígeno, y por ende mayor actividad bactericida, puede ocurrir por diversas vías, pero principalmente a través del factor activador de macrófagos (aparentemente interferon gama) producido por los LcT estimulados por antígenos (Ellis, 1999). Las proteínas Omp38 y Omp48 (expresadas a partir de pOMP38P y pOMP48P), al ser liberadas de los miocitos de la cabrilla, podrían ser presentadas a través del MHCII al ser tomadas por las células presentadoras de antígeno, resultando en la activación de los LcT cooperadores y en la activación de macrófagos.

VI. CONCLUSIONES

- En términos cuantitativos, las proteínas Omp38 y Omp48, son las principales proteínas de la membrana externa de *A. veronii*.
- Las proteínas Omp38 y Omp48 tienen la propiedad de interactuar o enlazar de manera significativa a algunas proteínas de la matriz extracelular como la colágena y la fibronectina, y a componentes de secreciones mucosas como la mucina y la lactoferrina. Omp48 interactúa con la porción glicosídica de la mucina, lactoferrina y colágena, puesto que diversos azúcares inhiben la unión a estas glicoproteínas.
- Las proteínas Omp38 y Omp48 están implicadas en la adhesión de *A. veronii* a células epiteliales, ya que anticuerpos policlonales dirigidos contra estas proteínas inhiben significativamente la adhesión de la bacteria.
- La inhibición de la adhesión de otras bacterias patógenas de peces y humanos como *A. hydrophila*, *A. caviae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, por medio de anticuerpos anti-Omp38 y anti-Omp48, indica que en la superficie de estas bacterias existen proteínas con epítopes conservados.
- El gen *omp38* consiste de un marco de lectura abierta de 1,047 pares de bases que codifica para una proteína de 349 aminoácidos con un péptido líder de 25 residuos.
- De acuerdo a su estructura primaria, Omp38 posee características bioquímicas típicas de porinas específicas y presenta similitud a las porinas PhoE, OmpF y OmpC de numerosas bacteria entéricas. Su estructura secundaria teórica consta de 8 asas externas y 16 láminas β antiparalelas transmembranales.
- El gen *omp48* consiste de un marco de lectura abierta de 1,278 pares de bases que codifica para una proteína primaria de 426 aminoácidos con un péptido líder de 25 residuos.
- De acuerdo a su estructura primaria, Omp48 posee características bioquímicas típicas de porinas y presenta similitud a la familia de porinas LamB, presentes en numerosas bacterias, incluyendo a *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *A.*

salmonicida, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Actinobacillus* spp. y *Yersinia* spp. Teóricamente, su estructura secundaria consiste de 9 asas externas y 18 láminas β antiparalelas transmembranales.

- La clonación de genes que codifican para OMPs tipo porinas, como *omp38* y *omp48*, a través de la construcción de librerías genómicas en plásmidos de alto número de copias, no es recomendable ya que aparentemente existe una toxicidad de dichos genes que conduce a un efecto letal en la cepa de *E. coli* hospedera. De manera alternativa, la PCR inversa es una técnica adecuada para el aislamiento y caracterización molecular de genes cuya clonación es compleja.
- Se construyeron vacunas de ADN que consisten de vectores plasmídicos para la expresión de las proteínas Omp38 y Omp48.
- La expresión de las proteínas Omp38 y Omp48 en células eucariotas *in vitro* fue muy baja, a pesar de la inclusión de las secuencias necesarias para la expresión de genes (promotor CMV, secuencia Kozak como sitio de unión a ribosoma, señal de poliadenilación) en los vectores construidos. Una posible causa, es la diferencia en el uso de codones entre organismos evolutivamente distantes.
- Los peces vacunados con pOMP38P y pOMP48P, registraron bajos niveles de anticuerpos específicos en suero. La baja magnitud de la respuesta humoral puede ser debida a una débil expresión de Omp38 y Omp48 en las células (miocitos) de los peces vacunados.
- Los peces inmunizados con las vacunas de ADN fueron protegidos parcialmente contra infecciones experimentales por *A. veronii*, registrando menor mortalidad y menor porcentaje de peces con alteraciones histológicas que los peces control no inmunizados. Los bajos niveles de anticuerpos, sugieren que la respuesta inmune celular esta implicada en la protección parcial observada.
- La vacunación genética de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) con los vectores pOMP38P y pOMP48P, que codifican para las principales OMPs de *A. veronii*, Omp38 y Omp48, induce la producción de niveles bajos de anticuerpos en suero, pero es parcialmente eficiente para brindar protección contra infecciones por *A. veronii*.

VII. REFERENCIAS

- Abbott, S.L., Serve, H. y Janda, J.M. (1994). Case of *Aeromonas veronii* (DNA group 10) bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 3091-3093.
- Achouak, W., Heulin, T. y Pages, J.M. (2001). Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiology Letters* 199: 1-7.
- Albert, M.J., Grant, T. y Robins-Browne, R. (2000). Studying bacterial adhesion to cultured cells. In An, Y.H. y Friedman, R.J. (eds.) *Handbook of Bacterial Adhesion. Principles, Methods and Applications*. Totowa, New Jersey: Human Press. pp. 541-552.
- Alexander, J.B. y Ingram, G.A. (1992). Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases* 1: 249-279.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Anderson, R., Gao, X.M., Papakonstantinou, A., Roberts, M. y Dougan, G. (1996). Immune response in mice following immunization with DNA encoding fragment C of tetanus toxin. *Infection and Immunity*. 64: 3168-3173.
- Anderson, E.D., Mourich D.V., Fahrenkrug, S.C., LaPatra, S., Shepherd, J. y Leong, J.A.C. (1996). Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5: 114-122.
- Andre, S., Seed, B., Eberle, J., Schraut, W., Bultmann, A. y Haas, J. (1998). Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *Journal of Virology* 72: 1497-1503.
- Arason, G. J. (1996). Lectins as defense molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology*, 6: 277-89.
- Arvizu, M. J., de Lachica, F., Lluch-Cota, D.B. y Morales, A. (1990). El cultivo de peces marinos en la Baja California Sur. IV Congreso AMAC. Hermosillo, Sonora.
- Ascencio, F., Aleljung, P. y Wadstrom, T. (1990). Particle agglutination assays to identify fibronectin and collagen cell surface receptors and lectins in *Aeromonas* and *Vibrio* species. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1926-1931.
- Ascencio, F., Ljungh, A. y Wadstrom, T. (1991). Comparative study of extracellular matrix protein binding to *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish and human infection. *Microbios* 65: 135-146.
- Ascencio, F., Ljungh, A. y Wadstrom, T. (1992) Characterization of lactoferrin binding by *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 42-47.
- Ascencio, F., Martinez-Arias, W., Romero, M.J. y Wadstrom, T. (1998). Analysis of the interaction of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* with mucins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 20: 219-229.

- Aumailley, M. y Gayraud, B. (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. *Journal of Molecular Medicine* 76: 253-265.
- Austin, B. y Adams, C. (1996). Fish Pathogens. In: Austin, B., Altwegg, M., Gosling, P.J. and Joseph, S. (eds.) *The Genus Aeromonas*. John Wiley & Sons, New York. pp. 197-243.
- Austin, B. y Austin, D.A. (1999). *Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish*. New York: Springer Verlag.
- Avilés-Quevedo, A., MacGregor-Pardo, U., Rodríguez-Ramos, R., Hilaes-Cosío, O., Huerta-Bello, M.A. e Izawa, M. (1995). Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1968). INP/CRIP/JICA. México. 82 p.p.
- Baba, T., Imamura, J., Izawa, K. y Ikeda, K. (1988). Cell-mediated protection in carp, *Cyprinus carpio* L., against *Aeromonas hydrophila* crude lipopolysaccharide. *Journal of Fish Diseases* 11: 171-178.
- Barrera-Guevara, J.C., Román-Rodríguez, M.J. y Lincon-González, H.A. (1994). Desarrollo de la biotecnología para el cultivo de la Totoaba. SEPESCA/Gobierno del Estado de Sonora/Cideson. México. 89 p.p.
- Benetti, D., Alarcon, J. F., Stevens, O., Rotman, F., Banner-Stevens, G., Zimmerman, S., Feely, M. W., Matzie, W., Orhum, M. R., O'Hanlon, B. y Eldridge, L. (2001). Marine Fish Culture. *The Advocate* 4: 71-74.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* 181: 4725-4733.
- Boudinot, P., Blanco, M., de Kinkelin, P. y Benmansour, A. (1998). Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* 249: 297-306.
- Braun, R., Arnesen, J.A., Rinne, A. y Hjelmeland, K. (1990). Immunohistological localization of trypsin in mucus-secreting cell layers on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 13: 233-238.
- Bricknell, I.R., King, J.A., Browden, T.J. y Ellis, A.E. (1999). Duration of protective antibodies, and the correlation with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following vaccination with an *Aeromonas salmonicida* vaccine containing iron-regulated outer membrane proteins and secretory polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 139-151.
- Cadena-Roa, C. y Roldan, G. (1995). Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de la cabrilla. SEPESCA/Universidad Autónoma de Baja California Sur, p.p. 93
- Carbonetti, N.H. y Sparling, P.F. (1987). Molecular cloning and characterization of the structural gene for protein I, the major outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 9084-9088.

- Carnoy, C., Scharfman, A., Van Brussel, E., Lamblin, G., Ramphal, R. y Roussel, P. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane adhesins for human respiratory mucus glycoproteins. *Infection and Immunity* 62: 1896-1900.
- Chambers, M.A., Vordermeier, H., Whelan, A., Commander, N., Tascon, R., Lowrie, D. y Hewinson, R.G. (2000). Vaccination of mice and cattle with plasmid DNA encoding the *Mycobacterium bovis* antigen MPB83. *Clinical Infectious Diseases* 30: S283-S287.
- Chandran, M.R., Aruna, B.V., Logambal, S.M. y Michael, R.D. (2002). Immunisation of Indian major carps against *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection. *Fish & Shellfish Immunology* 13: 1-9.
- Chart, H. y Trust, T.J. (1983). Acquisition of iron by *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Bacteriology*. 156: 758-764.
- Cid-Arregui, A., Juarez, V. y zur Hausen, H. (2003). A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. *Journal of Virology* 77: 4928-4937.
- Cole, A.M., Weis, P. y Diamond, G. (1997). Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry* 272: 12008-12013.
- Colwell, R.R., MacDonell, M.T. y De Ley, J. (1986). Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36: 473-477.
- Corbeil, S., LaPatra, S.E., Anderson, E.D., Jones, J., Vincent, B., Hsu, Y.L. y Kurath, G. (1999). Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines. *Diseases of Aquatic Organisms* 39: 29-36.
- Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R.A., Jansonius, J.N. y Rosenbusch, J.P. (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358: 727-733.
- Dabo, S.M., Confer, A.W. y Quijano-Blas, R.A. (2003). Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microbial Pathogenesis* 35: 147-157.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. y Bogwald, J. (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases* 20: 241-273.
- Davidson, G.A., Ellis, A.E. y Secombes, C.J. (1993). Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developments in Comparative Immunology* 17: 373-376.
- Davidson, G.A., Lin, S.H., Secombes, C.J. y Ellis, A.E. (1997). Detection of specific and 'constitutive' antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood

- leucocytes of dab (*Limanda limanda*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58: 363-374.
- de Cock, H., Struyve, M., Kleerebezem, M., van der Krift, T. y Tommassen, J. (1997). Role of the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Molecular Biology* 269: 473-478.
- Dodsworth, S., Rowland, G., Bennett, A. y Coleman, G. (1993). Antigenicity of the *Aeromonas salmonicida* maltose-inducible outer membrane porin (maltoporin) and a hybrid protein derived from it. *Biochemical Society Transactions* 21: 338S.
- Donnelly, J.J., Liu, M.A. y Ulmer, J.B. (2000). Antigen presentation and DNA vaccines. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162: S190-S193.
- Donnelly, J.J., Ulmer, J.B. y Liu, M.A. (1997). DNA vaccines. *Life Science* 60: 163-172.
- Douglas, S.E., Gallant, J.W., Gong, Z. y Hew, C. (2001). Cloning and developmental expression of a family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). *Developments in Comparative Immunology* 25: 137-147.
- Dubreuil, J.D., Giudice, G.D. y Rappuoli, R. (2002). *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 617-29.
- Dutzler, R., Rummel, G., Alberti, S., Hernandez-Alles, S., Phale, P., Rosenbusch, J., Benedi, V. y Schirmer, T. (1999). Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure with Folding & Design* 7: 425-434.
- Ellis, A.E. (1987). Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by alpha 2-macroglobulin in the serum of rainbow trout. *Microbial Pathogenesis* 3: 167-177.
- Ellis, A.E. (1997). Furunculosis: protective antigens and mechanisms. In Bernoth, E. M., Ellis, A.E., Midtlyng, P.J., Olivier, G. and Smith, P. (eds.) *Furunculosis: multidisciplinary fish disease research*. Academic Press, London. pp. 366-381.
- Ellis, A.E. (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 9: 291-308.
- Ellis, A.E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developments in Comparative Immunology* 25: 827-839.
- Ellison, R.T. III, Giehl, T.J. y LaForce, F.M. (1988). Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infection and Immunity* 56: 2774-2781.
- Fang, H.M., Ling, K.C., Tan, Y.L. y Sin, Y.M. (1998). *In vitro* inhibition of epithelial cell invasion by *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio* species by fish *Aeromonas hydrophila* major adhesin. *Journal of Fish Diseases* 21: 273-280.
- Fang, H.M., Ling, K.C., Ge, R. y Sin, M. (2000). Enhancement of protective immunity in blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas), against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* by *A. hydrophila* major adhesin. *Journal of Fish Diseases* 23: 137-145.

- FAO. (1997). Review of the state of world aquaculture. *FAO Fisheries Circular* 1-163.
- FAO. (1999). Aquaculture production statistics 1988-1997. Fishery Information, Data and Statistics Unit, FAO Fisheries Department.
- Feidi, I.H. (2000). International seafood production and trade-towards 2010. *INFOFISH International* 1: 22-27.
- Fernandes, J.M., Saint, N., Kemp, G.D. y Smith, V.J. (2003). Oncorhyncin III: a potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochemical Journal* 373: 621-628.
- Fock, W.L., Chen, C.L., Lam, T.J. y Sin, Y.M. (2001). Roles of an endogenous serum lectin in the immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus) against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 11: 101-113.
- Fourel, D., Mizushima, S., Bernadac, A. y Pages, J.M. (1993). Specific regions of *Escherichia coli* OmpF protein involved in antigenic and colicin receptor sites and in stable trimerization. *Journal of Bacteriology* 175: 2754-2757.
- Freedman, S.J. (1991). The role of alpha 2-macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 98: 549-553.
- Gavin, R., Rabaan, A.A., Merino, S., Tomas, J.M., Gryllos, I. y Shaw, J. G. (2002). Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Molecular Microbiology* 43: 383-397.
- Gilleland, H.E.Jr., Gilleland, L.B. y Matthews-Greer, J.M. (1988). Outer membrane protein F preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model. *Infection and Immunity* 56: 1017-1022.
- Gomez-Chiarri, M., Brown, L.L. y Levine, R.P. (1996). Protection against *Renibacterium salmoninarum* infection by DNA-based immunization. San Francisco State University, American Fisheries Society. pp. 155-157.
- Gregoriadis, G. (1998). Genetic vaccines: strategies for optimization. *Pharmaceutical Research* 15: 661-670.
- Hansen, J.D. y Strassburger, P. (2000). Description of an ectothermic TCR coreceptor, CD8 alpha, in rainbow trout. *Journal of Immunology* 164: 3132-3139.
- Heppell, J., Lorenzen, N., Armstrong, N.K., Wu, T., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Schorr, J. y Davis, H.L. (1998). Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. *Fish & Shellfish Immunology* 8: 271-286.
- Heppell, J. y Davis, H.L. (2000). Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43: 29-43.
- Hickman-Brenner, F.W., MacDonald, K.L., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Brenner, D.J. y Farmer, J.J. (1987). *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 900-906.

- Hirst, I.D. y Ellis, A.E. (1994). Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology* 4: 29-45.
- Hirst, I.D. y Ellis, A.E. (1996). Utilization of transferrin and salmon serum as sources of iron by typical and atypical strains of *Aeromonas salmonicida*. *Microbiology* 142: 1543-1550.
- Hjelmeland, K., Christie, M. y Raa, J. (1983). Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *Journal of Fish Biology* 23: 13-22.
- Hsueh, P.R., Teng, L.J., Lee, L.N., Yang, P.C., Chen, Y.C., Ho, S.W. y Luh, K.T. (1998). Indwelling device-related and recurrent infections due to *Aeromonas* species. *Clinical Infectious Diseases* 26: 651-658.
- Huang, G., Zhang, L. y Birch, R.G. (2000). Rapid amplification and cloning of Tn5 flanking fragments by inverse PCR. *Letters in Applied Microbiology* 31: 149-153.
- Inglis, V., Roberts, R. J. and Bromage, N. R. (1993). *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Science Ltd, London.
- Janda, J.M. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 397-410.
- Janda, J.M. y Abbott, S.L. (1996). Human Pathogens. In Austin, B. Altwegg, M. Gosling, P. J. and Joseph, S. (eds.) *The Genus Aeromonas*. John Wiley & Sons, New York. pp. 151-173.
- Janda, J.M. and Abbott, S.L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases* 27: 332-344.
- Jeanteur, D., Lakey, J.H. y Pattus, F. (1991). The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Molecular Microbiology* 5: 2153-2164.
- Jeanteur, D., Gletsu, N., Pattus, F. y Buckley, J.T. (1992). Purification of *Aeromonas hydrophila* major outer-membrane proteins: N-terminal sequence analysis and channel-forming properties. *Molecular Microbiology* 6: 3355-3363.
- Jia, X., Patrzykat, A., Devlin, R.H., Ackerman, P.A., Iwama, G.K. y Hancock, R.E. (2000). Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infections. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1928-1932.
- Joosten, P.H.M., Tiemersma, E., Threels, A., Caumartin-Dhieux, C. y Rombout, J.H.W.M. (1997). Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish & Shellfish Immunology* 7: 471-485.
- Joseph, S.W., Carnahan, A.M., Brayton, P.R., Fanning, G.R., Almazan, R., Drabick, C., Trudo, E.W. y Colwell, R.R. (1991). *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 565-569.

- Kaattari, S.L. y Piganelli, J.D. (1996). The specific immune system: humoral defense. In Iwama, G. and Nakanishi, T. (eds.) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press Inc, New York. pp. 207-254.
- Kanellos, T., Sylvester, I.D., Ambali, A.G., Howard, C.R. y Russell, P. H. (1999). The safety and longevity of DNA vaccines for fish. *Immunology* 96: 307-313.
- Kanellos, T., Sylvester, I.D., Howard, C.R. y Russell, P.H. (1999). DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish. *Vaccine* 17: 965-972.
- Kirov, S.M., Jacobs, I., Hayward, L.J. y Hapin, R.H. (1995). Electron microscopic examination of factors influencing the expression of filamentous surface structures on clinical and environmental isolates of *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. *Microbiology and Immunology* 39: 329-338.
- Kirov, S.M. y Sanderson, K. (1996). Characterization of a type IV bundle-forming pilus (SFP) from a gastroenteritis-associated strain of *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. *Microbial Pathogenesis* 21: 23-34.
- Kirov, S.M., O'Donovan, L.A. y Sanderson, K. (1999). Functional characterization of type IV pili expressed on diarrhea-associated isolates of *Aeromonas* species. *Infection and Immunity* 67: 5447-5454.
- Kishore, A.R., Erdei, J., Naidu, S.S., Falsen, E., Forsgren, A. y Naidu, A.S. (1991). Specific binding of lactoferrin to *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters* 67: 115-119.
- Konkel, M.E., Garvis, S.G., Tipton, S.L., Anderson, D.E., Jr. y Cieplak, W. Jr. (1997). Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*. 24: 953-963.
- Kowalczyk, D.W. y Ertl, H.C. (1999). Immune responses to DNA vaccines. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 751-770.
- Kyte, J. y Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157: 105-132.
- Lang, H. y Ferenci, T. (1995). Sequence alignment and structural modelling of the LamB glycoporin family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208: 927-934.
- Lee, S.Y., Yin, Z., Ge, R. y Sin, Y.M. (1997). Isolation and characterization of fish *Aeromonas hydrophila* adhesins important for *in vitro* epithelial cell invasion. *Journal of Fish Diseases* 20: 169-175.
- Leclercq, S., Harms, J.S., Rosinha, G.M., Azevedo, V. y Oliveira, S.C. (2002). Induction of a th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. *Journal of Medical Microbiology* 51: 20-26.
- Leong, J.C. (1993). Molecular and biotechnological approaches to fish vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 4: 286-293.
- Leong, J.C., Anderson, E., Bootland, L.M., Chiou, P.W., Johnson, M., Mourich, D. y Trobridge, G. (1997). Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant

- DNA technologies. *Developments in Biological Standardisation* 90: 267-277.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Heppell, J., Wu, T. y Davis, H. (1998). Protective immunity of VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* 8: 261-270.
- Lorenzen, N. (1999). Recombinant vaccines: experimental and applied aspects. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 361-365.
- Lumsden, J.S., Ostland, V.E., MacPhee, D.D. y Ferguson, H.W. (1995). Production of gill-associated and serum antibody by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following immersion immunisation with acetone-killed *Flavobacterium branchiophilum* and the relationship to protection from experimental challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 151-165.
- Luo, Y., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Hancock, R.E., Bains, M., Cheng, I.H. y Wang, C. (1997). Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (*ompH*) of *Pasteurella multocida* X-73. *Journal of Bacteriology* 179: 7856-7864.
- Lutwyche, P., Exner, M.M., Hancock, R.E. y Trust, T.J. (1995). A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout. *Infection and Immunity* 63: 3137-3142.
- MacIntyre, S., Trust, T.J. y Buckley, J.T. (1980). Identification and characterization of outer membrane fragments released by *Aeromonas* sp. *Canadian Journal of Biochemistry* 58: 1018-1025.
- Manning, M.J. y Nakanishi, T. (1996). The specific immune system: cellular defenses. In Iwama, G. y Nakanishi, T. (eds.) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press Inc, New York. pp. 160-206.
- Matsui, K. y Arai, T. (1990). Protective immunities induced by porins from mutant strains of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology and Immunology* 34:917-927.
- McCarthy, D.H., Amend, D.F., Johnson, K.A. y Bloom, J.V. (1983). *Aeromonas salmonicida*: determination of antigen associated with protective immunity and evaluation of an experimental bacterin. *Journal of Fish Diseases* 6: 155-174.
- McKee, M.L., Melton-Celsa, A.R., Moxley, R.A., Francis, D.H. y O'Brien, A.D. (1995). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. *Infection and Immunity* 63: 3739-3744.
- Mencacci, A., Cenci, E., Mazzolla, R., Farinelli, S., D'Alo, F., Vitali, M. y Bistoni, F. (2003). *Aeromonas veronii* biovar *veronii* septicaemia and acute suppurative cholangitis in a patient with hepatitis B. *Journal of Medical Microbiology* 52: 727-730.
- Merino, S., Rubires, X., Aguilar, A. y Tomas, J.M. (1996). The O:34-antigen lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters* 139: 97-101.

- Miller, N.W. y Clem, L.W. (1984). Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus-independent antigens. *Journal of Immunology* 133: 2356-2359.
- Mor, G. (1998). Plasmid DNA: a new era in vaccinology. *Biochemical Pharmacology* 55: 1151-1153.
- Nagata, T., Uchijima, M., Yoshida, A., Kawashima, M. y Koide, Y. (1999). Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells: analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261: 445-451.
- Narum, D.L., Kumar, S., Rogers, W.O., Fuhrmann, S.R., Liang, H., Oakley, M., Taye, A., Sim, B.K. y Hoffman, S.L. (2001). Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium falciparum* merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice. *Infection and Immunity* 69: 7250-7253.
- Neves, M.S., Nunes, M.P., Milhomem, A.M. y Ricciardi, I.D. (1990). Production of enterotoxin and cytotoxin by *Aeromonas veronii*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23: 437-440.
- Newman, S. G. (1993). Bacterial vaccine for fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3: 145-185.
- Nikaido, H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Molecular Microbiology* 6: 435-442.
- Nishikawa, Y., Hase, A., Ogawasara, J., Scotland, S.M., Smith, H.R. y Kimura, T. (1994). Adhesion to and invasion of human colon carcinoma Caco-2 cells by *Aeromonas* strains. *Journal of Medical Microbiology* 40: 55-61.
- Nishikawa, Y., Kimura, T. y Kishi, T. (1991). Mannose-resistant adhesion of motile *Aeromonas* to INT407 cells and the differences among isolates from humans, food and water. *Epidemiology and Infection* 107: 171-179.
- Nogueras, M.M., Merino, S., Aguilar, A., Benedi, V.J. y Tomas, J.M. (2000). Cloning, sequencing, and role in serum susceptibility of porin II from mesophilic *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity* 68: 1849-1854.
- Nurminen, M., Butcher, S., Idanpaan-Heikkila, I., Wahlstrom, E., Muttillainen, S., Runeberg-Nyman, K., Sarvas, M. y Makela, P.H. (1992). The class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* produced in *Bacillus subtilis* can give rise to protective immunity. *Molecular Microbiology* 6: 2499-2506.
- Ofek, I. y Doyle, R.J. (1994). Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall, New York. pp.578.
- Olivier, G., Evelyn, T.P. y Lallier, R. (1985). Immunogenicity of vaccines from a virulent and avirulent strain of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases* 8: 43-55.
- Pal, S., Barnhart, K.M., Wei, Q., Abai, A.M., Peterson, E.M. y de la Maza, L.M. (1999). Vaccination of mice with DNA plasmids coding for the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein elicits an immune response but fails to protect against a genital challenge. *Vaccine* 17: 459-465.

- Paniagua-Michel, J. y Lizarraga-Partida, M.L. (1995). Marine biotechnology in Latin America: the case of Mexico. *Journal of Marine Biotechnology* 3: 64-66.
- Paerregaard, A., Espersen, F. y Skurnik, M. (1991) Role of the *Yersinia* outer membrane protein YadA in adhesion to rabbit intestinal tissue and rabbit intestinal brush border membrane vesicles. *APMIS* 99: 226-232.
- Palm, R.C.Jr., Landolt, M.L. y Busch, R.A. (1998). Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 33: 157-166.
- Park, C.B., Lee, J.H., Park, I.Y., Kim, M.S. y Kim, S.C. (1997). A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *FEBS Letters* 411: 173-178.
- Park, I.Y., Park, C.B., Kim, M.S. y Kim, S.C. (1998). Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Letters* 437: 258-262.
- Penttila, T., Vuola, J.M., Puurula, V., Anttila, M., Sarvas, M., Rautonen, N., Makela, P.H. y Puolakkainen, M. (2001). Immunity to *Chlamydia pneumoniae* induced by vaccination with DNA vectors expressing a cytoplasmic protein (Hsp60) or outer membrane proteins (MOMP and Omp2). *Vaccine* 19: 1256-1265.
- Price, B.M., Galloway, D.R., Baker, N.R., Gilleland, L.B., Staczek, J. y Gilleland, H.E., Jr. (2001). Protection against *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection in mice by genetic immunization against outer membrane protein F (OprF) of *P. aeruginosa*. *Infection and Immunity* 69: 3510-3515.
- Quinn, D.M., Wong, C.Y., Atkinson, H.M. y Flower, R.L. (1993). Isolation of carbohydrate-reactive outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity* 61: 371-377.
- Rabaan, A.A., Gryllos, I., Tomas, J.M. y Shaw, J.G. (2001). Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infection and Immunity* 69: 4257-4267.
- Rahman, M.H. y Kawai, K. (2000). Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 379-382.
- Reddy, M.S., Bernstein, J.M., Murphy, T.F., y Faden, H.S. (1996). Binding between outer membrane proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* and human nasopharyngeal mucin. *Infection and Immunity* 64: 1477-1479.
- Roberts, R.J. (1993). Motile Aeromonad Septicaemia. In Inglis, V., Roberts, R. J. and Bromage, N. R. (eds.) *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Science Ltd, London. pp. 143-155.
- Rocha-De-Souza, C.M., Colombo, A.V., Hirata, R., Mattos-Guaraldi, A.L., Monteiro-Leal, L.H., Previato, J.O., Freitas, A.C. y Andrade, A.F. (2001). Identification of a 43-kDa outer-membrane protein as an adhesin in *Aeromonas caviae*. *Journal of Medical Microbiology* 50: 313-319.

- Rodríguez-Ortega, I.P., Mellado-Guerreo, F., Méndez, F.A., Domínguez-Guadeay, H. y Ortega-Vidal, A. (1994). Desarrollo científico y tecnológico para el cultivo de pargo (*Lutjanus* sp.) en jaulas flotantes. SEPESC/IAES. México. 85 p.p.
- Sakazaki, R. y Shimada, T. (1984). O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. *Japanese Journal of Medical Sciences and Biology* 37: 247-255.
- Scapigliati, G., Romano, N., Picchietti, S., Mazzini, M., Mastrolia, L., Scalia, D. y Abelli, L. (1996). Monoclonal antibodies against sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) immunoglobulins: immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays. *Fish & shellfish Immunology* 6: 383-401.
- Scapigliati, G., Romano, N., Buonocore, F., Picchietti, S., Baldassini, M. R., Prugnoli, D., Galice, A., Meloni, S., Secombes, C. J., Mazzini, M. y Abelli, L. (2002). The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Developments in Comparative Immunology* 26: 151-160.
- Scharfman, A., Kroczyński, H., Carnoy, C., Van Brussel, E., Lamblin, G., Ramphal, R. y Roussel, P. (1996). Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory mucins and expression of mucin-binding proteins are increased by limiting iron during growth. *Infection and Immunity* 64: 5417-5420.
- Schirmer, T. y Cowan, S.W. (1993). Prediction of membrane-spanning beta-strands and its application to maltoporin. *Protein Science* 2: 1361-1363.
- Schirmer, T., Keller, T.A., Wang, Y.F. y Rosenbusch, J.P. (1995). Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* 267: 512-514.
- Secombes, C.J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defense. In Iwama, G. y Nakanishi, T. (eds.) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press Inc, New York. pp.63-103
- Shiau, J.W., Tang, T.K., Shih, Y.L., Tai, C., Sung, Y.Y., Huang, J.L. y Yang, H.L. (2000). Mice immunized with DNA encoding a modified *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A develop protective immunity against exotoxin intoxication. *Vaccine* 19: 1106-1112.
- Simmaco, M., Mangoni, M.L., Boman, A., Barra, D. y Boman, H.G. (1998). Experimental infections of *Rana esculenta* with *Aeromonas hydrophila*: a molecular mechanism for the control of the normal flora. *Scandinavian Journal of Immunology* 48: 357-363.
- Smooker, P.M., Steeper, K.R., Drew, D.R., Strugnell, R.A. y Spithill, T.W. (1999). Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression. *Parasite Immunology* 21: 357-364.
- Sperandio, V., Bailey, C., Giron, J.A., DiRita, V.J., Silveira, W.D., Vettore, A.L. y Kaper, J.B. (1996). Cloning and characterization of the gene encoding the OmpU outer membrane protein of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity* 64: 5406-5409.

- Sperandio, V., Giron, J.A., Silveira, W.D. y Kaper, J.B. (1995). The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity* 63: 4433-4438.
- Steinfeld, S., Rossi, C., Bourgeois, N., Mansoor, I., Thys, J.P. and Appelboom, T. (1998). Septic arthritis due to *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. *Clinical Infectious Diseases* 27: 402-403.
- Stelma, G.N., Johnson, C.H. y Spaulding, P.L. (1988). Experimental evidence for enteropathogenicity in *Aeromonas veronii*. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 877-880.
- Stintzi, A. y Raymond, K.N. (2000). Amonabactin-mediated iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Aeromonas hydrophila*: direct measurement of individual microscopic rate constants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 5: 57-66.
- Stratford, R., Douce, G., Zhang-Barber, L., Fairweather, N., Eskola, J. y Dougan, G. (2000). Influence of codon usage on the immunogenicity of a DNA vaccine against tetanus. *Vaccine* 19: 810-815.
- Svanholm, C., Bandholtz, L., Lobell, A. y Wigzell, H. (1999). Enhancement of antibody responses by DNA immunization using expression vectors mediating efficient antigen secretion. *Journal of Immunological Methods* 228: 121-130.
- Sveinbjornsson, B. y Seljelid, R. (1994). Aminated beta-1,3-D-polyglucose activates salmon pronephros *in vitro*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41: 113-123.
- Tabaraie, B., Sharma, B.K., Sharma, P.R., Sehgal, R. y Ganguly, N.K. (1994). Evaluation of *Salmonella* porins as a broad spectrum vaccine candidate. *Microbiology and Immunology* 38: 553-559.
- Tang, D.C., DeVit, M. y Johnston S.A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154.
- Torres, A.G. y Kaper, J.B. (2003). Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infection and Immunity* 71: 4985-4995.
- Trust, T.J., B. Noonan, S. Chu, P. Lutwyche y E. Umelo. (1996). A molecular approach to understanding the pathogenesis of *Aeromonas salmonicida*: relevance to vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology* 6: 269-276.
- Tüting, T., Austyn, J., Storkus, W.J. y Falo, L.D. (2000). The immunology of DNA vaccines. In Lowrie, D.B. y Whalen, R.G. (eds.) *DNA vaccines: Methods and protocols*. Human Press, Totowa, New Jersey. pp. 37-64.
- Uchijima, M., Yoshida, A., Nagata, T. y Koide, Y. (1998). Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *Journal of Immunology* 161: 5594-5599.

- Ulmer, J.B., Donnelly, J.J. y Liu, M.A. (1996). Toward the development of DNA vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 653-658.
- Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M. y Friedman, A. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-1749.
- Van der Heiden, A.M. (1985). Taxonomía, biología y evaluación de la ictiofauna demersal del Golfo de California. En: Yañes-Arancibia, A. (ed.) *Recursos pesqueros potenciales de México. La pesca acompañante del camarón*. UNAM/PUAL/ICML, SEPESCA/INP. México. 145-149 p.p.
- Vazquez-Juarez, R.C., Barrera-Saldana, H.A., Hernandez-Saavedra, N.Y., Gomez-Chiarri, M. y Ascencio, F. (2003). Molecular cloning, sequencing and characterization of *omp48*, the gene encoding for an antigenic outer membrane protein from *Aeromonas veronii*. *Journal of Applied Microbiology* 94: 908-918.
- Vihinen, M. y Mantsala, P. (1989). Microbial amyolytic enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 24: 329-418.
- Vinitnantharat, S., Gravningen, K. y Greger, E. (1999). Fish vaccines. *Advances in Veterinary Medicine* 41: 539-550.
- Vinitnantharat, S. (2001). Immunological methods of disease control. In Bondad-Reantaso, M. G., Humphrey, J. H., Kanchanakhan, S. y Chinabut, S. (eds.) *Development of a regional research programme on grouper virus transmission and vaccine development*. APEC/AAHRI, Bangkok, Thailandia. pp. 103-109.
- von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *European Journal of Biochemistry* 133: 17-21.
- Westerlund, B. y Korhonen, T.K. (1993). Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Molecular Microbiology* 9: 687-694.
- Wijkstrom, U.N. (2003). Short and long-term prospects for consumption of fish. *Veterinary Research Communications* 1: 461-468.
- Wilson, M.R. y Warr, G.W. (1992). Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 201-221.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. y Felgner, P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-1468.
- Yano, T. (1996). The nonspecific immune system: humoral defense. In Iwama, G. y Nakanishi, T. (eds.) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press Inc, New York. pp. 105-157.
- Yonezawa, H., Ishihara, K. y Okuda, K. (2001). Arg-gingipain a DNA vaccine induces protective immunity against infection by *Porphyromonas gingivalis* in a murine model. *Infection and Immunity* 69: 2858-2864.
- Yin, Z., Lam, T.J. y Sin, Y.M. (1996). The role of specific antiserum of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 6: 57-69.

- Zhang, D.J., Yang, X., Shen, C. y Brunham, R.C. (1999). Characterization of immune responses following intramuscular DNA immunization with the MOMP gene of *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis strain. *Immunology* 96: 314-321.
- zur Megede, J., Chen, M.C., Doe, B., Schaefer, M., Greer, C.E., Selby, M., Otten, G.R. y Barnett, S.W. (2000). Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 *gag* gene. *Journal of Virology* 74: 2628-2635.