TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE NAVARRA

FACULTAD DE FARMACIA

EXPRESIÓN EN VECTORES EUCARIONTES DE GENES PARA VACUNACIÓN DNA POR INMERSIÓN EN EL MODELO TRUCHA / RABDOVIRUS.

Mirian Fernández Alonso

Pamplona 2000

Director:
Julio Coll Morales
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Complutense Madrid)
Ph.D. in Biology (Massachusetts Institute Technology)
Departamento de Mejora Genética y Biotecnología
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)

Este trabajo se ha realizado en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA) bajo la dirección del Dr. Julio Coll Morales, gracias a una beca predoctoral del Programa de Formación de Investigadores del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco, el Proyecto Nacional AGF97-297 y el Proyecto Europeo CT984003.

JULIO COLL MORALES, DR. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID) Y PH.D.BIOLOGY (MASSACHUSETTS INSTITUTE TECHNOLOGY) DEL DEPARTAMENTO DE MEJORA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA) DEL MINISTERIO DE INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y TECNOLOGÍA

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado "EXPRESIÓN EN VECTORES EUCARIONTES DE GENES PARA VACUNACIÓN DNA POR INMERSIÓN EN EL MODELO TRUCHA/RABDOVIRUS", del que es autora la Licenciada Dª Mirian Fernández Alonso, ha sido realizado bajo mi dirección y que cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Y para que conste a efectos oportunos, firmo el presente informe, en Madrid 25 de Septiembre de 2000.

Fdo. Julio Coll Morales

EL DR. IGNACIO LÓPEZ GOÑI, PROFESOR ADJUNTO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE NAVARRA

CERTIFICA:

Que como Profesor Ponente, designado por la Facultad de Farmacia, para la revisión del trabajo titulado "EXPRESIÓN EN VECTORES EUCARIONTES DE GENES PARA VACUNACIÓN DNA POR INMERSIÓN EN EL MODELO TRUCHA/RABDOVIRUS", del que es autora la Licenciada Dª Mirian Fernández Alonso, considera que puede ser defendido para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste a efectos oportunos, firmo el presente informe, en Pamplona a 25 de Septiembre de 2000.

Fdo. Ignacio López Goñi

A toda mi familia

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a quien me ha dado el tiempo y la ocasión de llevar a cabo este proyecto. A Julio Coll, de quien he aprendido, no sólo de trabajo en el laboratorio, no sólo técnicas y ciencia, sino también de la ciencia de la vida. A la Dra. Mª Pilar Fernández-Otero, por su estímulo desde mis tempranos años de carrera. Al Dr. Díaz por haberme puesto en contacto con quien ha dirigido mi tesis y por la confianza que puso desde el principio y, con él, a todo el Departamento de Microbiología de la Clínica Universitaria (jefes, residentes, enfermeras, auxiliares, técnicos...) por lo que he aprendido en mis años de especialidad, que me han orientado hacia hacia la virología, haciéndome descubrir campos por los que investigar. A Rafael Blasco y su grupo, por sus plásmidos y sus brillantes ideas y sugerencias, que nunca nos han defraudado y han sido decisivas para la orientación de esta investigación.

Gracias a Ana Rocha, por su ayuda, su presencia, sus ideas, y los ratos de “speaking”; sin todo esto, no sé si habría terminado. A mis compañeros becarios, en general y a muchos de vosotros en particular, aunque este apartado se haría desmesuradamente grande si especifico; también al personal de la limpieza y mantenimiento del CISA y, por supuesto, de Forestales. A Paco: un tiempo corto, pero con muy buenos recuerdos. A Amparo Estepa, por la compañía en las primeras salidas a Francia, a la Biología Molecular y por otras cosas más tangenciales.

A mis padres y Raquel, por tantas cosas...; a Roberto, sin el que me habría sido difícil, no sólo el desplazarme. A mis amigos y allegados, por su paciencia, confianza, apoyo y aguante en tantos momentos un poco más duros. Una siempre queda en deuda y nunca agradece lo suficiente: ¡Gracias a todos!

A la gente del INRA, por su ayuda en biología molecular, clonaje y en la práctica del francés, con sus oídos siempre dispuestos a escucharme.

Al Gobierno Vasco y la Subdirección de Educación, Universidades e Investigación, que mediante la convocatoria de becas predoctorales ha financiado estos años de formación de la tesis y otros anteriores de mis estudios de Farmacia.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....11
LISTA DE ABREVIATURAS.....13

1. INTRODUCCIÓN.....15

1.1. LAS PATOLOGÍAS INFECCIOSAS EN PISCICULTURA.....16

1.2. PRINCIPALES RABDOVIRUS DE PECES.....19

1.3. LOS RABDOVIRUS DE PECES.....22

1.3.1. Taxonomía e infección viral.....22

1.3.2. Morfología y estructura molecular.....23

1.3.3. Biología molecular.....23

1.4. LA GLICOPROTEÍNA G DE LOS RABDOVIRUS.....24

1.5. RESPUESTA INMUNE FRENTE A RABDOVIRUS.....28

1.5.1. Interferón 28

1.5.2. Anticuerpos (Acs) 29

1.5.3. Respuesta celular 32

1.6. VACUNAS FRENTE A RABDOVIRUS.....33

1.6.1. Dificultad de la vacunación contra VSHV.....33

1.6.2. Vacunas con VSHV inactivado o atenuado.....34

1.6.3. Vacunas recombinantes contra VSHV.....34

1.7. VARIABLES EN LA VACUNACIÓN DNA EN LA TRUCHA.....36

1.7.1. Ventajas de las vacunas DNA.....36

1.7.2. Desarrollo del sistema immunitario de la trucha.....38

1.7.3. Determinación empírica del momento óptimo para vacunación.....39

1.7.4. Diseño de plásmidos para vacuanción DNA.....40

1.7.5. Posibles métodos para desarrollar vacunas DNA por immersión.....41

1.7.6. Posibles modelos *in vitro*.....43

1.7.7. Investigación de las rutas de entrada.....44

1.7.8. Investigación de los antígenos protectores.....44

1.7.9. Diseño de las contrapruebas.....44

2. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA.....47

3. MATERIAL Y MÉTODOS.....51

3.1. VIRUS, CULTIVOS CELULARES Y PLÁSMIDOS.....52

3.1.1. Línea celular.....52

3.1.2. Virus de la Septicemia Hemorrágica Vírica (VSHV).....52

3.1.3. Plásmidos utilizados.....53

3.2 CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN DEL PLÁSMIDO G3-pcDNAI/Amp.....56

3.2.1. Subclonaje del gen de la G de VSHV de pcDNAI a pcDNAI/Amp.....56

3.2.2. Caracterización de la expresión del G3-pcDNAI/Amp por transfección.....58

3.2.3. Caracterización por PCR y secuenciación 59

3.3. OBTENCIÓN DE BACTERIAS RECOMBINANTES POR FERMENTACIÓN.....60

3.4. ESCALADO DE LA PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS.....60

3.5. FORMULACIONES EMPLEADAS PARA TRANSFECCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS.....61

3.5.1. Transfección con reactivos comerciales.....61

3.5.2. Formulaciones con DOTAP.....63

3.5.3. Formulaciones con polímeros catiónicos.....63

3.6. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN *IN VITRO* EN CÉLULAS EPC.....64

3.7. MANIPULACIÒN DE TRUCHAS (*Oncorhynchus mykiss*).....64

3.7.1. Obtención de sueros de truchas.....64

3.7.2. Ensayos con truchas de 2cm inmunoincompetentes y GFP-pQBI$_{25}$ +

formulaciones.....65

3.7.3. Ensayos de vacunación/contraprueba *in vivo* con truchas inmunocompetentes y G3-pcDNAI/Amp.....66

3.8. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES: GFP y βgal.....68

3.8.1. Detección de la expresión de GFP.....68

3.8.2. Detección de la expresión de β-Galactosidasa (βgal).....70

3.9. INMUNOENSAYOS.....70

3.9.1. Enzimoinmunoensayo (ELISA).....70

3.9.2. Transferencia de geles SDS-PAGE a nitrocelulosa e inmunodetección.....71

3.9.3. Microensayo de neutralización de VSHV.....72

3.10. RESPUESTA INMUNE CELULAR.....73

3.10.1. Obtención y cultivo de leucocitos de riñón de trucha.....73

3.10.2. Ensayos de proliferación.....73

4. RESULTADOS.....75

4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS.....76

4.1.1. Subclonaje del gen G de VSHV en el plásmido pcDNAI/Amp.....76

4.1.2. Producción de *E. coli*.(G3-pcDNAI/Amp) en cantidad 81

4.2 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EPC *IN VITRO* 83

4.3. ENSAYOS *IN VIVO* CON EL PLÁSMIDO GFP-pQBI$_{25}$.....91

4.3.1. Establecimiento de un método de cuantificación de la fluorescencia.....91

4.3.2. Experimentos de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$ con ultrasonidos.....98

4.3.3. Experimentos de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP.....100

4.3.4. Experimentos de inmersión en *E. coli* (GFP-pQBI$_{25}$).....105

4.3.5. Experimentos de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$+otros reactivos.....106

4.4. ENSAYOS DE VACUNACIÓN/CONTRAPRUEBA 112

4.4.1. Estudio de la respuesta inmune después de inyección de virus o de proteína G recombinante.....112

4.4.2. Estudios de vacunación DNA por inyección de G-pcDNA3 con distintos promotores.....119

4.4.3. Estudios de métodos de vacunación DNA por inmersión en G3-pcDNAI/Amp..120

5. DISCUSIÓN.....127

5.1. EXPERIMENTOS *IN VITRO*: TRANSFECCIÓN DE EPC.....128

5.2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*: MODELO GFP/TRUCHAS DE 2 cm.....130

5.3. EXPERIMENTOS *IN VIVO*: VACUNACIÓN/CONTRAPRUEBA.....138

5.3.1. Evaluación de los antígenos utilizados en los ensayos de anticuerpos.....138

5.3.2. Respuesta inmune después de la vacunación DNA por inmersión.....139

5.3.3. Protección de truchas vacunadas con G3-pcDNAI/Amp a la contraprueba con VSHV.....140

5.4. PREDICCIÓN DE LOS RESULTADOS DE VACUNACIÓN/CONTRAPRUEBA..144

5.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ULTRASONIDOS.....147

5.4. POSIBLE APLICACIÓN DE LA VACUNACIÓN POR INMERSIÓN UTILIZANDO ULTRASONIDOS EN ACUICULTURA.....149

6. CONCLUSIONES.....152

7. BIBLIOGRAFÍA.....154

8. TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS.....168

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1.....18

Figura 2.....25

Figura 3.....31

Figura 4.....46

Figura 5.....50

Figura 6.....54 y 55

Figura 7.....77

Figura 8.....78

Figura 9.....82

Figura 10.....85

Figura 11.....86

Figura 12.....87

Figura 13.....88

Figura 14.....89

Figura 15.....90

Figura 16.....94

Figura 17.....95

Figura 18.....96

Figura 19.....97

Figura 20.....101

Figura 21.....102

Figura 22.....103

Figura 23.....104

Figura 24.....108

Figura 25.....109

Figura 26.....110

Figura 27.....111

Figura 28.....116

Figura 29.....122

Figura 30.....123

Figura 31.....124

Figura 32.....125

Figura 33.....136

Figura 34.....137

Figura 35.....143

Tabla 1.....17

Tabla 2.....20

Tabla 3.....62

Tabla 4.....81

Tabla 5.....117

Tabla 6.....118

Tabla 7.....126

Tabla 8.....146

LISTA DE ABREVIATURAS

∈	Épsilon, factor de conversión en cantidad de proteína
βgal	β-Galactosidasa
Å	Amstrong
aa	Áminoácido
Ac	Anticuerpo
AchR	Receptor de la Acetilcolina
AcMo	Anticuerpo monoclonal
AcPo	Anticuerpo policlonal
BF2	*Bluegill fibroblast* (línea celular)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico copia
cél	Célula
CHSE	*Chinook salmon embrio* (línea celular)
CMV	*Cytomegalovirus*
CpG	Secuencias de DNA con varias repeticiones de Citosina Guanina
cpm	Cuentas por minuto
$DICT_{50}$	Dosis infectiva en cultivo de tejidos que infecta la mitad de los cultivos
DL_{50}	Dosis letal para el 50% de los peces
DMAA-VP	Dimetilacrilamida-co-Vinilpirrolidona
DNA	Ácido desixirribonucleico
DOTAP	1,2,dioleoyl-3-4-trimethyl ammonio propano
ECU	Unidad monetaria europea
EDTA	Etilen diamino tetra-Acético
ELISA	Ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas
EPC	*Epithelioma papulosum cyprini* (línea celular)
EVEX	Virus X de la anguila
FHM	*Fathead minnow* (línea celular)
frg#11	Fragmento #11 de la proteína G de VSHV
g	Fuerza centrífuga
G	Proteína G de VSHV
G4	Proteína recombinante, parte de la G, producida en levaduras
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Factor de crecimiento de colonias de la serie granulocito macrofágica
h	Hora
I.E.	Índice de estimulación
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
Ig	Inmunoglobulina

IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
m.o.i.	Multiplicidad de infección viral
MAR	Mutantes de escape a anticuerpos monoclonales
min	Minuto
NHI	Necrosis hematopoyética infecciosa
nt	Nucleótido
O.D.	Densidad óptica
O.I.E.	Organización Internacional de Epizootias
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFR	Rabdovirus de la tenca
poc	Pocillo
PRS	Porcentaje relativo de supervivencia
PRSV	Rabdovirus del langostino
PVP	Polivinil pirrolidona
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RTG-2	*Rainbow trout gonad* (línea celular)
RV	Virus de la rabia
s	Segundo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SFB	Suero fetal bovino
SHV	Seticemia Hemorrágica Vírica
Spp.	Especies
TAE	Tampón Tis Acético EDTA
TGF	Factor transformador del crecimiento
U	Unidade de actividad enzimática
UFP	Unidades formadoras de placa
v.o.	Vía oral
VNHI	Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa
VNPI	Virus de la necrosis pancreática infecciosa
VSHV	Virus de la septicemia hemorrágica viral
VSV	Virus de la estomatitis vesicular del cerdo
VVPC	Virus de la viremia primaveral de la carpa

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS PATOLOGÍAS INFECCIOSAS EN PISCICULTURA.

Todos los cultivos intensivos de peces, como por ejemplo, la producción de trucha en Europa y EE.UU., de salmón del Pacífico en EE.UU., de salmón del Atlántico en Noruega, de la carpa en Europa central, de anguilas en Japón, etc., tienen como principal problema, las patologías infecciosas. Entre estas patologías cabe destacar las de origen vírico, especialmente las rabdovirosis. Para estas enfermedades víricas actualmente no existen vacunas (DeKinkelin *et al*., 1995; Leong *et al*., 1995), ni métodos terapeúticos eficaces y no es posible la detección de portadores asintomáticos (Leong y Munn, 1991; Leong *et al*., 1995; Leong y Fryer, 1993). En 1991 en Estados Unidos, el 52% (30,8 millones de dólares) de la producción se perdió como resultado de enfermedades, la mayoría de origen vírico (Leong *et al*., 1995) y en Europa se calculan pérdidas de 50 millones ECUs anuales por septicemia hemorrágica vírica (SHV) (Olesen y Korsholm, 1997) y otras patologías similares como la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI). En Japón las pérdidas económicas producidas por rabdovirosis alcanzan el mismo orden de magnitud.

En la UE existen unas 1.700 piscifactorías dedicadas al cultivo de salmónidos con una producción total superior a las 200.000 Tm/año. Sólo en Francia la SHV causa un 30-50% de pérdidas anúales en tonelaje en las áreas infectadas. La amenaza de todos los rabdovirus sobre la producción europea es tal que se puso en marcha un programa de erradicación (Doc. 90/495/EF) (Hattenberg-Baudoy *et al*., 1995), que se está llevando a cabo y que a finales de 1998, y casi sin cambios en 1999, mostraba una situación que se esquematiza en la Tabla 1 y en la Figura 1A (Olesen, Ariel y Slierendrecht, 1998). El mercado potencial de una vacuna para la SHV en Europa está estimado en unos 5 millones de ECUs/año (se supone que serían necesarias ~ $7x10^8$ dosis, con un coste unitario de 7 ECUs). Una repercusión similar tendría la posible vacuna frente a la NHI.

Tabla 1.

Porcentaje de aislamiento de virus en granjas, por países (Olesen, Ariel y Slierendrecht, 1998).

País	% de granjas ensayadas[a]	VSHV	VNHI	VVPC	EVX	VNPI
Austria	10,5	27,7	5,5	25	-	5,5
Bélgica	50,7	2,9	20,5	-	-	-
Dinamarca[b]	100,0	4,0	-	-	-	6,5
Finlandia	29,7	-	-	-	-	-
Francia	40,1	1,4	1,4	-	-	23,1
Alemania	6,0	9,5	2,3	7,9	-	42,1
Irlanda[b]	100,0	1,2	-	-	-	-
Italia	26,7	6,3	13,7	-	0,5	11,2
Portugal	72,4	-	-	-	-	-
España	86,9	-	-	-	-	11,8
Suecia	39,2	-	-	-	-	-
Holanda[c]	1,3	-	-	+	+	+
Inglaterra	55,1	-	-	-	-	22,4
Rep. Checa	84,0	-	-	3,1	-	1,5
Islandia	51,2	-	-	-	-	-
Noruega	50,2	-	-	-	-	38,5
Eslovenia	66,6	3,7	13,7	-	-	-
Suiza[c]	0,6	+	+	-	-	-
Media	48,8					

-, no se detectaron muestras positivas.
+, los porcentajes fueron excepcionalmente altos.
a, % de granjas ensayadas, número de granjas muestreadas durante 1997 / número total de granjas.
b, el número de granjas muestreadas fue mayor que el número total de granjas registradas en el país.
c, el número de granjas muestreadas fue excesivamente bajo (no significativo).
VSHV, Virus de la Septicemia Hemorrágica Vírica.
VNHI, Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa.
VVPC, Virus de la Viremia Primaveral de la Carpa.
EVX, Virus X de la Anguila.
VNPI, Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (igualmente extendido por todo el mundo).

Figura 1. Grado de infección por rabdovirus de los Estados Europeos participantes en el informe de situación de las enfermedades víricas en Europa de 1998 (Coll, 1999b; Olesen, Ariel y Slierendrecht, 1998) (A) y estructura y genoma de VSHV (B). A, Se han clasificado los países según el porcentaje de granjas positivas para rabdovirus calculado en la Tabla 1 (VSHV + VNHI + SVCV + EVX) en cuatro colores: blanco (0%), amarillo (<5%), naranja (15-25%) y rojo (~50%). **B,** Izquierda, esquema de la morfología de VSHV. Derecha, perfil de proteínas de VSHV en gel de poliacrilamida, con sus pesos moleculares en kDa. Nx, variante génica de N (Basurco *et al.*, 1991). Abajo, disposición de los genes en el RNA viral y tamaño aproximado. Nv, proteína no estructural.

La producción actual anual de la Acuicultura en España está repartida fundamentalmente entre la piscicultura de la trucha (20.000 Tm/año) y el cultivo del mejillón (200.000 Tm/año) (Coll, 1988). El resto, actualmente de menor importancia aunque en aumento, se reparte entre la Acuicultura marina: cultivo de peces (lubina, dorada, rodaballo y salmón), otros moluscos (ostra) y crustáceos (langostino) y la repoblación de ríos y lagos con especies como la tenca, la carpa o el cangrejo de río. El potencial futuro de la producción de la Acuicultura en España se estima en unas 865.000 Tm/año (Coll, 1988). En España la producción anual de salmónidos supone ~ 100 millones de truchas y una importación anual de 200-400 millones de huevos que entran en España procedentes de otros países sin apenas controles sanitarios.

De todos los virus de peces actualmente conocidos, los rabdovirus (Leong *et al*., 1995) junto con los birnavirus (McAllister *et al*., 1991) constituyen el grupo más numeroso. Aunque ya se han descrito más de 20 tipos de rabdovirus de peces, la mayoría no han sido caracterizados todavía (Frerichs, 1989) (Tabla 2). Los rabdovirus tienen mayor incidencia económica que los birnavirus porque causan elevada mortalidad en adultos. Sus aislamientos reflejan la evolución geográfica del cultivo intensivo de peces durante las últimas décadas.

1.2. PRINCIPALES RABDOVIRUS DE PECES.

Virus de la Septicemia Hemorrágica Vírica (VSHV). El virus de la SHV o virus de Egtved, es endémico en Europa y afecta a varias especies cultivables tales como la trucha, el salmón coho, el salmón chinook, el bacalao, el rodaballo, la anguila y el arenque (Schlotfeldt *et al*., 1991). Se han demostrado infecciones experimentales en lubina y rodaballo (Brañas, Coll y Estepa, 1994), y se ha aislado en cultivos de rodaballo (Schlotfeldt *et al*., 1991), anguila, lenguado y langostino (Liu, Hilleman y Kurth, 1995). Recientemente se ha aislado también en Norteamerica a partir de salmón, bacalao y arenque (Brunson, True y Yancey, 1989; Hopper, 1989; Snow *et al*., 1999; Winton *et al*., 1991). Existen serotipos de referencia de VSHV

Tabla 2.

Rabdovirus de peces.

Virus	Origen	Tamaño[a] (nm)	Temp[b] (ºC)	Línea celular[c]
VSHV				
Virus de la Septicemia Hemorrágica Vírica	Trucha Arco iris *Oncorhynchus mykiss*	198x68	6-18	R,F,E,C
VNHI				
Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa	Salmón Sockeye *Oncorhynchus nerka*	156x82	13-18	R,F,E,C
VVPC				
Virus de la Viremia Primaveral de la Carpa	Carpa común *Cyprinus carpio*	140x77	4-32	R,F,E,C
PFRV				
Rabdovirus de la Tenca	Tenca *Exos lucius*	125x80	21-28	R,F,E
EVA				
Virus A de la Aguila	Anguila americana *Anguilla rostrata*	134x79	10-29	R,F,E,B
EVEX				
Virus X de la Anguila Europea	Anguila europea *Anguilla anguilla*	134x79	10-29	R,F,E,B
CUSR				
Rabdovirus del Síndrome Ulcus del Bacalao	Bacalao Atlántico *Gadus morhua*	155x65	14-16	(R,F,B)
RGPR				
Rabdovirus de la Perca Río Grande	Perca Río Grande *Cichlasoma cyanogutatum*	-	23-33	R,F,B
EVB				
Virus B_{12} de la anguila	Anguila europea *Anguilla anguilla*	185x75	10-20	E (R)
RS				
Rabdovirus del Salmón	Trucha Arco iris *Oncorhynchus mykiss*	135x65	18-20	R,F,E
PR				
Rabdovirus de la Perca	Perca *Perca fluviatilis*	200x100	13-15	R (E)
HRV				
Rabdovirus de la Platija (*R. olivaceus*)	Platija Japonesa *Paralichthys olivaceus*	190x80	5-20	R,F,E,B (C)
UDRV				
Rabdovirus de la Enfermedad Ulcerativa	*Striped snakehad* *Ophicephalus striatus*	120x80	25-30	B (C,E)

[a], Los tamaños se dan como medias de varios autores según datos recopilados por Frerichs (Frerichs, 1989).
[b], Rango de temperaturas de replicación e infección viral.
[c], Líneas celulares susceptibles (sin paréntesis) y refractarias (con paréntesis). R=RTG-2, E=EPC, F=FHM, C=CHSE, B=BF2.

definidos por seroneutralización con anticuerpos policlonales (AcPo), F1, F2, 23.75 y quizás el F4 (DeKinkelin *et al*., 1977; Hattenberg-Baudoy *et al*., 1995; Olesen, Lorenzen y Jorgensen, 1993; Vestergaard-Jorgensen, 1972). En España se han aislado y estudiado cinco brotes de VSHV F1 (Basurco y Coll, 1989; Basurco y Coll, 1992). Se ha secuenciado su genoma completo (Heike, Egbert y Mettenleiter, 1999).

Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (VNHI). Se han estudiado las características de crecimiento, sus proteínas, su tipaje con T1 (Oshima *et al*., 1993), se ha comparado las secuencias y reacción con AcMo (LaPatra, Lauda y Jones, 1994) de muchos de los aislados, pero sólo se ha observado un único serotipo. Se ha secuenciado su genoma completo (Morzunov, Winton y Nichol, 1995; Oshima *et al*., 1995; Schutze *et al*., 1995). El VSHV originario de Europa (DeKinkelin, 1972) es similar al VNHI originario de Norteamérica, pero no tienen reacciones cruzadas de seroneutralización. Hace pocos años se detectó por primera vez NHI en Francia (Baudin, 1987) y en Italia (Bovo *et al*., 1987). En 1991 se detectó en los Pirineos franceses (Dr. J. Adroit, O.I.E.) y en 1993 en España en coinfecciones con VNPI (Rodríguez *et al*., 1995; Vilas, Rodríguez y Pérez, 1994).

Virus de la Viremia Primaveral de la Carpa (VVPC). En este grupo se incluyen aislados de carpa y otros aislados de peces de agua dulce templada de Europa. Aunque se han encontrado reacciones serológicas cruzadas entre VVPC y el rabdovirus de la tenca (PFR), sus secuencias genómicas parecen confirmar que se trata de virus diferentes (Bjorklund, Higman y Kurath, 1996; Johnson *et al*., 1999). El VVPC se detectó simultáneamente por primera vez en varios pantanos del centro de España en 1990 (Marcotegui *et al*., 1992).

Rabdovirus de la Tenca (PFRV). La posible relación entre VVPC y PFRV hacen deseable la realización de más estudios, principalmente a nivel de secuenciación, con objeto de poder establecer una posible relación entre ambos virus y la diversidad existente para los aislados de cada virus (Bjorklund, Higman y Kurath, 1996).

Rabdovirus de la Platija (HRV). Puede diferenciarse de otros rabdovirus de peces mediante seroneutralización. Los distintos aislados de HRV de diferentes especies de peces cultivadas en Japón son bioquímica y serológicamente indistinguibles. Por otra parte, HRV comparte antígenos con varias proteínas de VNHI (glicoproteína, nucleoproteína, proteína de matriz) y con la glicoproteína de VSHV.

Rabdovirus de la Anguila**.** Entre los aislados de rabdovirus de anguila existe un tipo *Vesiculovirus* (EVEX, EVA, C30, B44 y D13) y un tipo *Lyssavirus* (L59, B12 y C26) (Castric *et al*., 1992). Aunque son bioquímicamente (perfil de proteínas) y serológicamente diferentes, aún no existen suficientes estudios serológico-bioquímicos que puedan definir correctamente la relación entre estos dos tipos de rabdovirus de anguilas.

Rabdovirus de la Enfermedad Ulcerativa (UDRV). Este virus tiene un patrón electroforético de proteínas típico de *Lyssavirus* y se distingue de VNHI, VSHV, HRV, VVPC o PFRV mediante seroneutralización.

Rabdovirus del Langostino (PRSV)**.** Aunque los langostinos son crustáceos, son un grupo de animales acuáticos que también son huéspedes de los rabdovirus. Se han hecho estudios serológicos y estructurales que diferencian al PRSV de los rabdovirus de peces (Lu y Loh, 1994; Lu, Loh y Nadala, 1994).

1.3. LOS RABDOVIRUS DE PECES.

1.3.1. Taxonomía e infección viral. El VSHV y el VNHI pertenecen al género *Lyssavirus*, dentro de la familia *Rabdoviridae*, compuesta por virus con RNA monocatenario no segmentado y de polaridad negativa. La familia comprende cinco géneros, en base al rango del hospedador, presencia de genes suplementarios y lugar de replicación del virus dentro de la célula. Están más ampliamente distribuídos en la naturaleza que otras familias (infectan tanto vertebrados como invertebrados y plantas). Los rabdovirus de peces, al igual que el virus de la rabia (RV) y el de la estomatitis vesicular (VSV), permanecen confinados a vertebrados (Fields *et al*., 1996).

En rabdovirus, la infección se inicia por unión de éste a receptores específicos en la membrana externa del huésped y continúa con una fusión de membranas dependiente de una bajada de pH después de que el virus ha sido introducido en el citoplasma de la célula por endocitosis (Coll, 1999a). Se replican en el citoplasma de las células que infectan y los viriones maduran y brotan por gemación en la superficie celular. La infección termina con lisis celular (Wagner y Rose, 1996).

1.3.2. Morfología viral y estructura molecular. La partícula viral, de ~170x80 nm, se compone de una nucleocápsida interior, que encierra una única molécula de RNA monocatenario de polaridad negativa y una envoltura exterior en forma de bala, compuesta por una membrana lipoproteica y unas espículas de proteína que se proyectan hacia el exterior de ésta (Figura 1B). Componen el virus las proteínas L, G, N, M1 y M2. La proteína L (190 kDa), asociada al RNA vírico, tiene actividad transcriptasa y replicasa. La G (65 kDa) es una glicoproteína que forma las espículas triméricas, responsables de la producción de anticuerpos (Ac) neutralizantes. La nucleoproteína N (40 kDa) de la nucleocápsida es la proteína mayoritaria. En VSHV se ha descrito además una proteína Nx relacionada antigénicamente con la proteína N, cuya función se desconoce (Basurco *et al*., 1991). La fosfoproteína M1 o P (19 kDa) está asociada a la polimerasa L. La proteína M2 o M (25 kDa) puede estar situada bien alrededor de la membrana lipídica o en el interior de la nucleocápsida (Barge *et al*., 1993). En VSHV y VNHI existe una proteína no estructural NV (12 kDa) no descrita en otros rabdovirus (Basurco y Benmansour, 1995; Basurco, Yun y Hedrick, 1993; Kurath, Higman y Bjorklund, 1995).

1.3.2. Biología molecular. El genoma está constituído por una molécula de RNA monocatenario de polaridad negativa. El de VSHV tiene ~11.000 bases (Hill *et al*., 1975) y un peso molecular de 5-6,4x10^6 kDa (Enzmann, Maier y Bigott, 1981). El orden de los genes en el RNA es 3' N-M_1-M_2-G-NV-L 5'. Se ha secuenciado el genoma completo del VNHI (Jorgensen *et al*., 1995; Morzunov, Winton y Nichol, 1995; Nichol, Rowe y Winton, 1995; Oshima *et al*., 1995; Schutze *et al*., 1995), del VSHV (Heike, Egbert y Mettenleiter, 1999) y partes importantes

del VVPC y del HRV (Bjorklund, Higman y Kurath, 1996). Además ya se han publicado varios estudios comparativos de secuencias (Kurath, Higman y Bjorklund, 1995; Morzunov, Winton y Nichol, 1995; Nichol, Rowe y Winton, 1995) y se trabaja en la obtención de virus infectivos tanto de VNHI, como de VSHV a partir de cDNA mediante tecnologías de genética reversa tal y como se ha conseguido ya con el virus de la rabia (RV) y con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Mebatsion *et al*., 1996; Schnell, Mebatsion y Conzelmann, 1994; Whelan *et al*., 1995).

1.4. LA GLICOPROTEÍNA G DE LOS RABDOVIRUS.

Los rabdovirus poseen una única glicoproteína (G) que se asocia formando unos 450 homotrímeros por virión (espículas de 83 Å), distribuídos por la envuelta lipídica que lo rodea (Gaudin *et al*., 1993). La G es responsable de la unión del virus a los receptores celulares (Bjorklund, Higman y Kurath, 1996), contiene las propiedades de fusión del virus detectables a pH < 6 (Estepa y Coll, 1996a; Gaudin *et al*., 1993; Konieczko, Whitaker-Dowling y Widnell, 1994; Lecocq-Xhonneux *et al*., 1994; Lorenzen y Olesen, 1995) e induce la formación de Acs neutralizantes de virus en el huésped (Lorenzen, Olesen y Vestergaard-Jorgensen, 1990). Los monómeros de G poseen una secuencia de unos 500 aa en la que se pueden distinguir las siguientes regiones: un péptido señal hidrofóbico, un dominio extracelular, un dominio hidrofóbico transmembranal no glicosilado resistente a proteasas (5 kDa) y un dominio citoplasmático en el extremo carboxi terminal (Coll, 1995b) (Figura 2).

El RNAm de la G, se traduce como un precursor no glicosilado de 63 kDa.. Tanto durante la traducción como una vez finalizada ésta, la G sufre glicosilación, plegamiento y acilación. La inhibición de la glicosilación da lugar a agregados mal ensamblados, complejos entrelazados por puentes disulfuro y a fenotipos sensibles a temperatura (Doms *et al*., 1987). En VSHV se han mapeado los puentes disulfuro y secuenciado los grupos de glicosilación (Einer-Jensen *et al*., 1998).

Figura 2. Localización de dominios en la glicoproteína G de VSHV. ----------, Perfil de hidrofobicidad predicha con el programa ANTIGEN (PCGene package). ●, Cisteínas. □, Carbohidratos. ▮▮▮▮▮▮, Regiones de héptadas hidrofóbicas repetidas (Coll, 1995c). ▭ , Regiones de unión a fosfatidilserina (PS) (Estepa y Coll, 1996a). ▭ , Regiones que unen péptidos biotinilados correspondientes a las héptadas repetidas. ⌊‾‾‾‾⌋ , Puentes disulfuro (Einer-Jensen *et al*., 1998). ■, Péptido señal hidrofóbico y dominio hidrofóbico transmembranal. ▭ , Dominio extracelular y dominio citoplasmático (extremo carboxi terminal). Se ha descrito la región de mayor variabilidad entre los aminoácidos 260 a 300 de la secuencia de G de VSHV (Benmansour *et al*., 1997).

Existen importantes diferencias antigénicas entre monoméros aislados y monómeros ensamblados (trímero), por lo que este fenómeno se debe tener en cuenta a la hora de desarrollar una posible vacuna (Doms *et al*., 1993). Además en rabdovirus de peces la conformación de la G es dependiente de la temperatura (Cain *et al*., 1999).

La acilación de la G con ácidos grasos, localizada en el dominio citoplasmático se ha demostrado en RV (Gaudin *et al*., 1991) y en VSV (Magee *et al*., 1984). La G del VSHV tiene un peso molecular de 65 kDa que se reduce a 55 kDa por deglicosilación (Bernard *et al*., 1990). Su cDNA tiene aproximadamente, unos 1,5 Kb que codifican para 507 aa (Thiry *et al*., 1991a; Thiry *et al*., 1991b).

Otro tipo de ensayos a nivel celular comienzan a identificar los receptores celulares para rabdovirus. Así, la región que comprende los aminoácidos 170 a 225 de la G del RV es homóloga a las regiones de proteínas venenosas de serpientes que unen el receptor de la acetilcolina (AchR) (Tordo *et al*., 1993). Además, la G del RV se une al AchR y funciona como su antagonista (Hanham, Zhao y Tignor, 1993). Confirmando que el AchR puede ser uno de los receptores del RV, se ha demostrado que anticuerpos policlonales (AcPo) frente a anticuerpos monoclonales (AcMo) neutralizantes del RV se unen al AchR (Hanham, Zhao y Tignor, 1993). Otra aproximación reciente es la generación de AcMo anti-receptor celular, que neutralizan la actividad viral. Se han generado tres AcMo frente a la línea celular de pez RTG-2, seleccionados por su capacidad de proteger las células de la infección por VSHV. La inmunoprecipitación de las proteínas de membranas celulares con estos AcMo muestran que la molécula diana consiste en un complejo heterodimérico (dos proteínas de 200 y 47 kDa). Este complejo es el más abundante en músculo de trucha y el componente de 200 kDa resulta idéntico a la fibronectina de trucha. Se ha demostrado también que el VSHV purificado puede unirse a fibronectina de trucha purificada. Los AcMo anti-receptor son capaces de bloquear la infección de un amplio panel de rabdovirus de peces no relacionados antigénicamente (PFRV, EVEX, VVPC) y todos los serotipos de VSHV y VNHI, sugiriendo que todos interaccionan con la misma molécula (Bearzotti *et al*., 1999). La

fibronectina es una proteína dimérica de 400 kDa unida por puentes disulfuro, que se encuentra en forma fibrilar insoluble y en forma soluble en el plasma. Es un componente funcional en procesos de adhesión célula-célula, coagulación sanguínea y cicatrización de heridas (Sadaghiani, Crawford y Vielkind, 1994). Se ha demostrado también que un complejo proteínico que contiene fibronectina interactúa con RV (Broughan y Wunner, 1995). Debido a que otros autores han identificado el AchR como la diana inicial de este virus (Bracci *et al*., 1997; Gastka, Horvath y Lentz, 1996; Lentz *et al*., 1986; Lentz *et al*., 1982) es interesante además resaltar que la fibronectina se encuentra entre las moléculas que interaccionan con el AchR (Dimytrenko y Bloch, 1993). Estos experimentos sugieren la posibilidad de que existan receptores múltiples de los rabdovirus. La caracterización completa del receptor/es celular/es de rabdovirus así como el mapeo en la G de los dominios implicados en el reconocimiento de sus receptores son aún cuestiones abiertas (Coll, 1999a).

Se han localizado en la secuencia de la G de todos los rabdovirus (RV, VSV, rabdovirus de peces y plantas) al menos dos regiones de varias héptadas (**a**bc**d**efg) con aminoácidos hidrofóbicos en posiciones a-d. Estas regiones están relacionadas topográficamente con los llamados péptidos de fusión identificados por mutagénesis en RV y en VSV (Durrer *et al*., 1995; Shokralla, Chernish y Ghosh, 1999). La G del VSHV es singular a este respecto ya que en ella existen tres regiones de héptadas hidrofóbicas (Figura 2) (Coll, 1995c). Debido a que en otros virus los péptidos sintéticos correspondientes a héptadas hidrofóbicas son potentes inhibidores de su infecciones (Kazmierski *et al*., 1996; Lambert *et al*., 1996; Rabenstein y Shin, 1995; Yao y Compans, 1996), es posible que suceda lo mismo en los rabdovirus. Ello abriría posibles aplicaciones terapeúticas, especialmente en el caso de los rabdovirus de peces.

Utilizando ensayos de ligamiento en fase sólida, se ha podido identificar un dominio de interacción con fosfolípidos localizado en las héptadas hidrofóbicas de VSHV (Coll, 1996; Estepa y Coll, 1996a; Estepa y Coll, 1996b) (Figura 2). Existe además una dependencia de pH similar en la interacción con fosfolípidos y en la fusión viral con la célula (Gaudin, DeKinkelin y

Benmansour, 1999; Lecocq-Xhonneux *et al*., 1994) y anticuerpos anti-dominio inhiben la fusión (Estepa y Coll, 1997b). El significado biológico de estas interacciones *in vitro* está actualmente en estudio (Núñez *et al*., 1998).

1.5. RESPUESTA INMUNE FRENTE A RABDOVIRUS.

A nivel de organismo, se desconoce actualmente el tejido de entrada de los rabdovirus en los peces. Estudios inmunohistoquímicos recientes proponen el esófago como la zona de entrada de los rabdovirus (Helmick *et al*., 1995), pero éstos son incipientes y falta todavía la confirmación de sus conclusiones. Los tipos de respuesta inmune frente a infecciones víricas que se han estudiado en peces han sido la producción de interferón, la liberación de Acs en sangre y la respuesta celular de memoria (Lorenzen, Olesen y Koch, 1999).

1.5.1. Interferón. La producción de interferón en trucha arco iris puede proteger a los peces de la infección con VNHI, VSHV y VNPI, (Congleton y Sun, 1996; DeKinkelin y Dorson, 1973; Dorson, De Kinkelin y Torchy, 1992; Renault, Torchy y De Kinkelin, 1991 ; Rogel-Gaillard, Chilmonczyk y De Kinkelin, 1993; Snegaroff, 1993; Tamai *et al*., 1993; Tengelsen, Trobidge y Leong, 1991). El interferón de suero de trucha tiene un peso molecular de 26 kDa (Dorson, Barde y De Kinkelin, 1975) y su síntesis viene determinada principalmente por la temperatura del agua (11-15ºC) y la virulencia del virus (Dorson y DeKinkelin, 1974). Se sintetiza paralelamente a la viremia y alcanza títulos máximos entre el cuarto y quinto día post-infección (DeKinkelin *et al*., 1977). La producción de interferón induce a su vez la síntesis de proteínas intracelulares (varias protein quinasas y las proteínas Mx), que inhiben la replicación de los virus. Los genes Mx se han encontrado en una gran variedad de organismos (humanos, ratones, cerdos, pájaros) incluídos los peces. Actualmente, se han caracterizado tres genes Mx en trucha arco iris mediante amplificación por PCR y posterior clonaje y secuenciación a partir del RNA extraído de la línea celular RTG-2 por exposición al VNHI o al RNA de doble banda (Trobridge, Chiou y Leong, 1997; Trobridge y Leong, 1995).

1.5.2. Anticuerpos (Acs). Otra respuesta a la infección vírica es la aparición de Acs en suero. Los Acs de salmónidos que neutralizan el VSHV y el VNHI muestran especificidad absoluta por la G (Engelking y Leong, 1989; Gilmore *et al*., 1988; Olesen, Lorenzen y Vestergaard-Jorgensen, 1991; Xu *et al*., 1991). En el caso de las infecciones por VSHV se sabe que: i) solamente el 54% de los supervivientes tienen niveles detectables de Acs neutralizantes (Olesen, Lorenzen y Vestergaard-Jorgensen, 1991), ii) la mayoría de los supervivientes a una primera infección sobreviven una segunda infección (Basurco y Coll, 1992), iii) después de una segunda infección no se obtienen respuestas más altas de Acs (Olesen, Lorenzen y Vestergaard-Jorgensen, 1991) y iv) la inmunización de truchas con proteínas víricas recombinantes producidas en *E. coli* ha fallado (Estepa, Thiry y Coll, 1994; Lorenzen *et al*., 1993) a pesar de la inducción de Acs neutralizantes (Lorenzen *et al*., 1993).

Se han obtenido pocos AcMo neutralizantes anti-VSHV. Una de las causas podría ser la pérdida de conformación de la proteína nativa y por tanto, la pérdida de aquellos epítopos dependientes de conformación implicados en la neutralización (Coll, 1995a; Lorenzen, Olesen y Vestergaard-Jorgensen, 1990; Sanz y Coll, 1992b). El número de epítopos neutralizantes y su localización en la G del VSHV aún no se conoce, pero parecen existir tanto epítopos lineales como no lineales, ambos libres de carbohidratos (Jorgensen *et al*., 1995; Lorenzen, Olesen y Vestergaard-Jorgensen, 1990). Los AcMo neutralizantes no reaccionan con la G en presencia de mercaptoetanol, por lo que existen puentes disulfuro intracatenarios que deberían definir el/los epítopo/s neutralizante/s (Lorenzen, Olesen y Vestergaard-Jorgensen, 1990; Olesen, Lorenzen y Jorgensen, 1993). Se han mapeado recientemente las posiciones correspondientes al AcMo neutralizante C10, mediante la secuenciación de mutantes resistentes a la neutralización con AcMo (mutantes MAR). La secuenciación de dichos mutantes localizó sustituciones de aa simultáneas, en las posiciones aminoacídicas 140 y 433. También se encontraron los mismos cambios en variantes de VSHV atenuadas a altas temperaturas (Bearzotti *et al*., 1995). No se ha

publicado ningún otro estudio de localización de mutantes MAR de VSHV, aunque el AcMo neutralizante 3F1A12 se ha mapeado en la posición 253 (Lorenzen, comunicación personal).

Algunas evidencias muestran correlación entre el reconocimiento por AcMo neutralizantes *in vitro* con la capacidad de protección *in vivo* de fragmentos de la G clonados en VNHI (Xu *et al*., 1991) y en VSHV (Estepa, Thiry y Coll, 1994; Lorenzen *et al*., 1993). Sin embargo, queda mucho por hacer debido a los pocos estudios existentes sobre la antigenicidad de la G de los rabdovirus de peces (Bearzotti *et al*., 1995; Estepa, Thiry y Coll, 1993).

Existe resistencia a la reinfección por parte de los peces supervivientes al VSHV. Sin embargo, es difícil detectar Acs neutralizantes en todos los peces que han superado la enfermedad, aunque su suero inyectado a truchas sanas confiere una protección parcial frente al virus (DeKinkelin *et al*., 1977). De manera similar, los sueros procedentes de truchas resistentes a la infección con un serotipo de VSHV son capaces de conferir resistencia frente a infecciones con los otros serotipos (DeKinkelin y Bearzotti, 1981) y truchas resistentes a una infección con un serotipo, resisten parcialmente la reinfección con otro serotipo (Basurco y Coll, 1992).

La duración de la inmunidad mediada por Acs neutralizantes se mantiene al menos durante 4-6 meses (Noonan, Enzmann y Trust, 1995; Olesen y Vestergard-Jorgensen, 1986) (Figura 3A), pero hasta el momento, no se ha detectado respuesta inmune anamnésica caracterizada por un incremento del título de Acs, frente a una reinfección con VSHV (Cossarini-Dunier, 1985; Olesen, Lorenzen y Vestergaard-Jorgensen, 1991).

La presencia de inmunoglobulinas (Igs) se detecta en salmónidos desde los primeros estadíos del desarrollo embrionario, lo que se interpreta como que, previamente a la síntesis, existe transferencia pasiva de Acs desde la madre a los huevos (Castillo *et al*., 1991; Sánchez, 1992). Se ha descrito recientemente que peces hembras inmunizadas presentan Acs específicos en ovarios y huevos (Castillo *et al*., 1993), sugiriendo que la inmunidad puede ser transferida de

Figura 3. Duración de los anticuerpos neutralizantes anti-VSHV en trucha después de una infección por VSHV (A) y evolución del peso de riñón y timo en función del peso corporal de la trucha (B). A, Se infectaron truchas de 15-18 cm con VSHV. La mortalidad fue nula en el caso de 6 truchas comunes y del 60% en el caso de trucha arco iris. La sangre se extrajo de los 6 y 7 animales supervivientes durante 1 año y se determinaron los niveles de anticuerpos neutralizantes. En la Figura se expresa el porcentaje de sueros positivos a cada tiempo ensayado después de la infección. □□□, trucha común; ——, trucha arco iris (Enzmann y Konrad, 1993). **B,** Los datos son de Ellis (Ellis, 1988b). Otros autores han publicado datos similares (Tatner y Manning, 1983). ●----●, timo. ○-----○ riñón.

madre a hijos (Oshima *et al*., 1995). Si la inmunidad persiste en la progenie, mediante la inmunización de las madres podría quedar protegida su descendencia (Oshima *et al*., 1995), pero estos resultados son todavía muy preliminares.

Los niveles de anticuerpos neutralizantes de virus producidos en truchas después de la inyección con plásmidos que contienen la G son muy bajos, elevándose después de la exposición al virus (Traxler *et al*., 1999)

La respuesta de anticuerpos inducida contra los rabdovirus en peces, puede evaluarse por ELISA y por microneutralización. La indución de anticuerpos totales no conformacionales contra la G del VSHV por medio de ELISA indirecto (Sanz y Coll, 1992a; Sanz y Coll, 1992c) se ha ensayado utilizando G4 recombinante producida en levaduras (Estepa, Thiry y Coll, 1994) y el anticuerpo monoclonal 1G7 anti-IgM de trucha (Sánchez, Coll y Domínguez, 1991). Los anticuerpos neutralizantes anti-VSHV pueden ensayarse por medio de ensayos de microneutralización (Lorenzo, Estepa y Coll, 1996) que permiten no sólo una estimación rápida (1 día), sino también una pequeña cantidad de suero (10 μL) con lo que se pueden ensayar hasta los sueros de las truchas más pequeñas.

1.5.3. Respuesta celular. Por último, la respuesta anamnésica celular (Nakanishi *et al*., 1999) se ha estudiado *in vitro* mediante ensayos de linfoproliferación usando VSHV purificado (Chilmonczyk, 1978), proteínas purificadas obtenidas de VSHV y proteínas recombinantes expresadas en diferentes vectores (Estepa, Thiry y Coll, 1994). La G del VSHV purificada y desnaturalizada estimuló la linfoproliferación tanto en cultivos de leucocitos de riñón de truchas inmunizadas con VSHV como en truchas supervivientes a la infección pero no en truchas no inmunizadas o no infectadas (Estepa, 1992; Estepa y Coll, 1991b; Estepa y Coll, 1992a; Estepa y Coll, 1992b; Estepa, Thiry y Coll, 1994). Además de la G, las nucleoproteínas N/Nx (Basurco *et al*., 1991) mostraron también un efecto estimulador de la linfoproliferación en el mismo tipo de cultivos (Estepa y Coll, 1992b). Confirmando estos resultados, fragmentos recombinantes de la G expresados en *E. coli*, *Yersinia ruckeri* (patógeno de trucha) y *Saccharomyces cerevisiae*

estimularon respuestas linfoproliferativas *in vitro* en cultivos de leucocitos de truchas supervivientes a la infección pero no en aquellos procedentes de truchas no infectadas (Estepa, Thiry y Coll, 1994). Confirmando los resultados de los estudios mencionados, se han podido obtener *in vitro* células hematopoyéticas de riñón de trucha dependientes en su proliferación de la proteína recombinante G4 expresada en levaduras. Estas células procedentes de truchas supervivientes a la infección con VSHV expresan el receptor de células T de linfocitos de peces (Estepa *et al*., 1996; Estepa y Coll, 1997a; Estepa *et al*., 1999a).

La memoria inmunológica celular (Estepa, Thiry y Coll, 1994; Lorenzo *et al*., 1995a; Lorenzo *et al*., 1995b), a diferencia de los anticuerpos neutralizantes que duran en la sangre sólo unos 3-4 meses, dura más de 1 año (Estepa *et al*., 1999a; Estepa *et al*., 1996; Estepa y Coll, 1997a), lo cual hace que estos ensayos sean mejores para estimar la duración de la vacunación si pudiera establecerse una correlación con los resultados de la contraprueba.

1.6. VACUNAS FRENTE A RABDOVIRUS.

1.6.1. Dificultad de la vacunación contra VSHV. Las vacunaciones contra los patógenos de los peces han tenido éxitos muy limitados, con la excepción de tres enfermedades bacterianas, la boca roja (Y*ersinia spp.*) (Johnson, Flynn y Amene, 1982), la vibriosis (*Vibrio spp.*) y la infección por *Aeromonas spp.* (Ellis, 1988a; Gudding, Lillehaugh y Evensen, 1999). Esta dificultad es todavía mayor en el caso de los virus. Por ejemplo, sólo se dispone de vacunas experimentales inactivadas o atenuadas no comerciales para algunos virus (VVPC, herpes virus, VSHV, VNPI, etc.). En la actualidad sólo existen algunas perspectivas de vacunas comerciales basadas en subunidades para VVPC, herpesvirus del pez gato (Awad, Nusbaum y Brady, 1989) y el birnavirus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) (Christie, 1996). La vacuna frente a VSHV debe ser no infecciosa, debido a problemas ambientales y regulaciones internacionales; por lo tanto, obtenida por métodos de manipulación genética (Lorenzen *et al*., 1993) o mediante

péptidos sintéticos (Emmenegger *et al*., 1995; Leong y Fryer, 1993; Noonan, Enzmann y Trust, 1995).

1.6.2. Vacunas con VSHV inactivado o atenuado. Las primeras vacunas experimentales frente a VSHV de las que se dispuso en estudios de laboratorio fueron vacunas inactivadas con propiolactona, con propiolactona /formol (DeKinkelin y LeBerre, 1977), o con rayos ultravioleta (Bernard y De Kinkelin, 1985). Se obtuvo protección frente a la infección al aplicar estas vacunas por inyección intraperitoneal (con adyuvante), pero fallaron cuando la administración fue por inmersión. Las vacunas vivas atenuadas, no presentan problemas de antigenicidad y son adecuadas para la administración oral pero existe el peligro de reversión a formas virulentas (Leong y Munn, 1991). Actualmente no se permite el uso de vacunas vivas atenuadas en Acuicultura (Leong *et al*., 1995). Experimentalmente, sin embargo, para el VSHV se obtuvieron buenos porcentajes de supervivencia después de una contraprueba con virus virulento, usando como vacuna virus atenuado, bien por pases de cultivo en la línea celular RTG-2 (Vestergaard-Jorgensen, 1976) o por pases en cultivos a altas temperaturas F25 (Bernard y De Kinkelin, 1985; DeKinkelin y Bearzotti, 1981). La virulencia de estas vacunas fue baja (4-6% mortalidad) y la estabilidad de los virus atenuados se demostró durante 20 pases *in vivo* (Vestergaard-Jorgensen, 1981).

1.6.3. Vacunas recombinantes contra VSHV. Una vacuna no replicativa contra el virus VSHV, consistente en subunidades recombinantes podría obtenerse por medio de:

i) La preparación de proteínas viricas antigénicas producidas a partir de genes víricos clonados y expresados en diversos vectores de expresión. Sin embargo, los extractos conteniendo G producida en bacterias recombinantes tales como *E. coli* (Lorenzen *et al*., 1993), *Aeromonas salmonicida* (Noonan, Enzmann y Trust, 1995) o *Yersinia ruckeri* (Estepa, Thiry y Coll, 1994), sólo fueron capaces de conferir una protección parcial a la contraprueba con VSHV. Por otra parte, algunas regiones de la G de VSHV expresadas en células de insectos (Lecocq-Xhonneux *et al*., 1994) utilizando baculovirus (Koener y Leong, 1990) y en levaduras (Estepa, Thiry y Coll,

1994), tampoco fueron capaces de inducir una protección total. En contraste con VSHV, para VNHI sí se ha desarrollado un prototipo de vacuna recombinante (Engelking y Leong, 1989; Gilmore *et al*., 1988; Hsu, Engelking y Leong, 1986; Xu *et al*., 1991) mediante el clonaje y expresión en *E. coli* (Koener y Leong, 1990; Koener *et al*., 1987) del gen que codifica la proteína G de este virus (Gilmore *et al*., 1988). Sin embargo dicha vacuna no se ha comercializado.

ii) El uso de vectores vivos, víricos o bacterianos, como medio para presentar antígenos víricos (Mebatsion *et al*., 1996; Zhang y Hanson, 1996) como por ejemplo, los intentos de utilizar la bacteria *Aeromonas salmonicida* para expresar epítopos de VSHV y de VNHI (Noonan, Enzmann y Trust, 1995).

iii) La síntesis química para producir péptidos correspondientes a epítopos relevantes en la protección frente a VSHV (Cornellis *et al*., 1996; Lorenzo *et al*., 1995b).

iv) La expresión de proteínas víricas antigénicas en plantas transgénicas, con buenos resultados de expresión de proteínas de rabdovirus de mamíferos, tales como el de la rabia (RV) (McGarvey *et al*., 1995).

v) La utilización de variantes víricas vivas y suficientemente atenuadas por ingeniería genética. En el caso de VSHV (virus RNA de polaridad negativa), ello implica disponer de una copia infectiva manipulable, es decir en DNA (Conzelmann, 1998). Todavía no se ha conseguido un cDNA infectivo de VSHV que se pudiera utilizar para su manipulación. Estos cDNA infectivos, sí se han conseguido en el caso de rabdovirus como RV (Schnell, Mebatsion y Conzelmann, 1994) y VSV (Whelan *et al*., 1995), por lo que es de esperar que pronto se disponga de estas herramientas tanto para VSHV como para VHNI.

vi) Las vacunas DNA, en las que un plásmido que expresa el gen del patógeno se inyecta en el pez, bajo un promotor de expresión en eucariontes (Anderson, Mourich y Leong, 1996; Estepa, Lorenzo y Coll, 1994), técnica objeto del presente trabajo.

1.7. VARIABLES EN LA VACUNACIÓN DNA EN LA TRUCHA.

1.7.1. Ventajas de las vacunas DNA. La inyección directa de genes y su expresión transitoria en los tejidos del hospedador (vacunas DNA) se ha obtenido con varios genes, en varios tejidos y en especies tan diversas, como ratones y peces (Cox, Zamb y Babiuk, 1993; Hansen *et al*., 1991; Liu, Hilleman y Kurth, 1995). Se ha demostrado el potencial de la vacunación DNA como posible vacuna contra la rabia (Xiang *et al*., 1994), el VNHI (Anderson *et al*., 1996; y Anderson, Mourich y Leong, 1996) y el VSHV (Heppell *et al*., 1998; Lorenzen *et al*., 1998). Aunque los resultados obtenidos hasta el momento son preliminares, su potencial como método futuro de vacunación en Acuicultura es objeto de investigación en varios laboratorios y proyectos. El éxito de esta técnica puede depender del uso de formulaciones especiales, del estudio de los parámetros que afectan a la especificidad de expresión en distintos tejidos, del uso de promotores o construcciones especiales (Gómez-Chiarri y Chiaverini, 1999; Kanellos *et al*., 1999c; Lewis y Babiuk, 1999) y de la cointroducción en los plásmidos de genes modificadores de respuesta inmunológica (interleukinas, mitógenos, etc.) (Lewis y Babiuk, 1999; Raz *et al*., 1993). La vacunación DNA en peces tendría las siguientes ventajas:

Potencia la inmunidad celular. Los virus y muchos patógenos bacterianos (*Renibacterium spp.* y *Aeromonas spp.*, por ejemplo) son patógenos intracelulares y es difícil producir anticuerpos contra ellos para su neutralización durante una infección natural, por lo que requieren inmunidad celular para una máxima protección. Las vacunas DNA serían la mejor solución para estos casos (Gudding, Lillehaugh y Evensen, 1999; Lewis y Babiuk, 1999). Se ha estudiado la respuesta inmune celular en vacunación DNA por inyección (VanMuiswinkel y Wiegertjes, 1997) así como la contribución a ella de las células en el lugar de la inyección (Klinman *et al*., 1998), pero estos estudios son muy escasos todavía.

Posibilita la inmunización con librerias. La identificación de los antígenos protectores de un patógeno complejo, como lo es una bacteria, es muy laborioso. Particularmente, ello es más difícil cuando la protección requiere una respuesta celular, ya que la mayoría de las vacunas

muertas no inducen respuestas celulares fácilmente detectables. Las vacunas DNA permiten el uso de librerías del genoma completo para inmunización y por tanto son un método poderoso para identificar el antígeno protector.

Permite la síntesis *in vivo* del antígeno. Este mecanismo hace posible inmunizar con DNA frente a todos aquellos patógenos cuya virulencia y respuestas antigénicas sea debida a una proteína. Así se consigue una conformación, plegamiento y glicosilación adecuadas y muy difíciles de reproducir utilizando otros vectores. Se permite además la selección de los péptidos víricos relevantes a la protección para cada antígeno y por cada indivíduo (Betancourt *et al*., 1993). Ello lleva consigo la generación de respuestas celulares específicas debido a la presentación vía clase I del antígeno, procesado convenientemente sin el riesgo de generar una verdadera infección. Es semejante en este aspecto a las vacunas vivas atenuadas pero sin sus problemas asociados de seguridad.

Permite la expresión continuada del antígeno. La expresión del antígeno se prolonga durante varios días-semanas, como mínimo. Ello significa una fuerte y duradera respuesta inmunológica celular y humoral, sin que haya que utilizar una inmunización de recuerdo. En los peces hay que tener en cuenta que esto sólo ocurre a la temperatura adecuada y sólo cuando el sistema inmune está maduro.

Se puede utilizar la actividad adjuvante de las secuencias CpG en el DNA. La presencia en el DNA de dinucleótidos CpG repetidos, presentes en bacterias pero no presentes en células eucariotas, donde se encuentran metilados (Krieg *et al*., 1995), tiene efectos inmunoestimuladores. Estos efectos podrían incrementarse adicionando más motivos CpG en el DNA vector (Kanellos *et al*., 1999b; Sato *et al*., 1996).

Ventajas económico-prácticas. No se manejan virus vivos y, por lo tanto, las vacunas DNA son de bajo coste y facilidad de fabricación, estables a la temperatura y capaces de ser utilizadas en cualquier especie y edad, tanto de pez, como de patógeno. Además, es posible

fabricar vacunas DNA multivalentes contra varios patógenos, en el mismo o en diferentes plásmidos (Boudinot *et al*., 1998; Grifantini *et al*., 1998; Whintton *et al*., 1993).

1.7.2. Desarrollo del sistema inmunitario de la trucha. En la trucha, después de la eclosión, el sistema linfoide se está desarrollando (Grace y Manning, 1980; Scapigliati, Romano y Abelli, 1999; Tatner y Manning, 1983). Debido a que los rabdovirus pueden afectar a las truchas desde estos primeros estadíos, es importante el poder determinar el momento más temprano a partir del cual la trucha puede ser inmunizada con éxito. Si es expuesta a los antígenos demasiado pronto en su desarrollo, en vez de generar protección con producción de anticuerpos y respuesta celular, se genera una tolerancia que bloquea la producción de anticuerpos (Davidson, Ellis y Secombes, 1994; Manning, Grace y Secombes, 1982; Tatner y Horne, 1984). Además, es de interés comercial el vacunar tan pronto como sea posible, no sólo para inducir protección, sino también porque es más fácil y más barato, ya que se necesita menor cantidad de vacuna (Ellis, 1988b).

Puesto que en los peces la velocidad del desarrollo de la inmunidad, tanto humoral (Tatner, 1986) cómo celular (Tatner y Manning, 1983), así como el crecimiento del cuerpo dependen de la temperatura, es más reproducible hablar de peso/tamaño o de edad/temperatura, que sólo de edad.

En la trucha los primeros precursores linfoides (células Ig+) se detectan en el saco vitelino 14 días antes de nacer (Castillo *et al*., 1993; Tatner y Manning, 1985). El timo es el primer órgano que se coloniza por linfocitos a los 3 días después de nacer, a 14 ºC. Los linfocitos B (células Ig+) aparecen a los 5-6 días en el riñón y en el bazo. Los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT) aparecen a los 13 días (Tatner y Manning, 1983; Zapata, 1996). El desarrollo de los órganos linfoides de la trucha estudiados según el peso relativo al resto del cuerpo o al número de células linfoides (Tatner y Manning, 1983), sufre cambios importantes entre los 0,5 a 1 g de peso (entre 3 y 5 cm de longitud, aproximadamente). El desarrollo del timo, del que depende el reconocimiento de antígenos timo-dependientes, alcanza su máximo cuando el peso de

la trucha es entre 0,5 y 1 g , lo que equivale a 2-3 meses de edad a 14 ºC (Tatner, 1985). Más adelante en el desarrollo el timo involuciona (Figura 3B), probablemente debido a la emigración de sus timocitos a otros órganos, como el riñón. Teóricamente, por lo tanto, a partir de 1 g de peso la trucha comenzaría a poder distinguir y reaccionar frente a antígenos externos, siendo a partir de este momento una trucha inmunocompetente.

1.7.3. Determinación empírica del momento óptimo para vacunación. Sólo se han estudiado suficientes datos empíricos para determinar el momento más oportuno y temprano para la vacunación de truchas frente a Y*ersinia spp.* y V*ibrio spp.* (supuestamente antígenos T-independientes, en peces). Existen tres aspectos de importancia: la edad más temprana a la cual las truchas desarrollan la máxima protección (PRS, porcentaje relativo de supervivencia), la duración de la protección y el efecto de la temperatura.

A 10 ºC las especies de salmónidos a un tamaño de 0,5g/pez no desarrollan inmunidad protectora contra Y*ersinia spp. /*V*ibrio spp.* Es decir, son todavía inmunoincompetentes. A mayores tamaños se obtienen niveles de protección crecientes, hasta un tamaño de 2,5 g/pez, donde se alcanzan los niveles máximos de protección (Johnson, Flynn y Amene, 1982). Utilizando 6 especies de salmónidos se logró definir una curva de PRS respecto al peso corporal. Los mejores PRS se obtuvieron entre 1-2,5 g/pez (Figura 4A). Cuando los salmónidos se cultivan a varias temperaturas para variar su ritmo de crecimiento, la protección se correlaciona con el tamaño o peso del cuerpo, y no con su edad. Por lo tanto, es el tamaño/peso del pez lo que es importante de cara a la vacunación (Johnson, Flynn y Amend, 1982; Tatner y Manning, 1983). La duración de la protección aumenta con el tamaño de la trucha; por ejemplo, es de 120 días para un tamaño de 1 g/trucha, 180 días para un tamaño de 2 g/trucha y alrededor de 1 año para tamaños ≥4 g/trucha (Figura 4B). La temperatura tiene un efecto directo en la producción de respuesta inmune en los peces; sin embargo, no existen suficientes estudios sobre la influencia de este parámetro en la vacunación/protección (Horne *et al*., 1982).

Las truchas inmunizadas por inmersión frente a *Aeromonas spp*. producen Ac cuando su tamaño es ≥0,13 g/trucha (1 mes a 4-6 ºC) pero no desarrollan memoria inmunológica hasta que alcanzan un tamaño ≥0,26 g/trucha (2 meses a 4-6 ºC). Tampoco se observa respuesta de Ac hasta tamaños ≥0,26g/trucha cuando se emplean proteínas para la inmunización (antígeno T-dependiente); al contrario, a tamaños menores se produce tolerancia (Manning, Grace y Secombes, 1982).

1.7.4. Diseño de plásmidos para vacunación DNA. La expresión de genes marcadores por inyección o por transferencia mecánica de DNA se ha demostrado en peces (Anderson, Mourich y Leong, 1996; Gómez-Chiarri *et al*., 1996; Hansen *et al*., 1991; Heppell *et al*., 1998). Se ha demostrado además que la inyección con vacunas DNA protege contra dos rabdovirus de peces, el VNHI (Anderson *et al*., 1996; Traxler *et al*., 1999) y el VSHV (Heppell *et al*., 1998). Comparando con experimentos paralelos en los que sólo se obtuvo un 60% de protección, utilizando una vacuna de virus muerta, con estas vacunas de DNA se ha podido demostrar casi un 100% de protección, incluso con cantidades de plásmido inferiores a 1µg/trucha (Corbeil *et al*., 2000).

Después de la inyección intramuscular de plásmidos en ratón, la mayor expresión del antígeno se da en las células musculares (Hansen *et al*., 1991). El transplante de mioblastos transfectados en ratón ha demostrado que esta expresión es suficiente para inducir respuesta inmunológica (Ulmer *et al*., 1996), a través de las células presentadoras de antígeno. De acuerdo con estos datos, es probable que sea necesario optimizar los vectores DNA para su uso en peces, incorporando promotores específicos de músculo. Por ejemplo, el promotor de la cadena pesada de miosina de carpa y otros promotores relacionados, como el FG2 (Muller y Brem, 1996), que permiten la expresión de genes marcadores en músculo de pez (Gauvry *et al*., 1996). Es muy posible que el uso de promotores no específicos tales como el de *Cytomegalovirus* (CMV), que es el mejor de los promotores ensayados que actúan en células de pez (Betancourt *et al*., 1993),

tengan que ser substituidos por promotores específicos de pez (por ejemplo, los de músculo), debido a restricciones legislativas (Kanellos *et al*., 1999a).

Otro método que se está utilizando para aumentar la respuesta inmunológica de los plásmidos en animales, es la inclusión de genes inmunoestimuladores de la respuesta inmune. La coexpresión del antígeno patógeno y de estos genes inmunoestimuladores lleva a un incremento de las respuestas inmunes producidas. En ratón ya se han comprobado efectos inmunoestimulantes con IL-2 y IL-4 y efectos supresores con TGF (Raz *et al*., 1993). En el modelo ratón/rabdovirus se ha demostrado inmunoestimulación con GM-CSF y supresión con interferón γ (Xiang y Ertl, 1995). Sin embargo, el efecto de GM-CSF en peces no coincide con el efecto en mamíferos (Kanellos *et al*., 1999b). Otros estudios reflejan efectos similares en otros modelos (Davis *et al*., 1997; Leong *et al*., 1994; Schijns *et al*., 1994; Xiang *et al*., 1997). Un buen uso de estas posibilidades requiere un mayor conocimiento de los efectos e interrelaciones de los inmunoestimuladores, probablemente distintos para cada modelo animal. Respecto a su posible uso en peces, sólo la IL-1 se ha podido clonar hasta ahora y su uso está muy restringido (Dr. Secombes, comunicación personal), por lo que actualmente no se puede explorar esta posibilidad.

1.7.5. Posibles métodos para desarrollar vacunas DNA por inmersión. Si bien la vacunación DNA en peces funciona con éxito cuando su aplicación se hace por inyección, no es un método práctico especialmente para peces de pequeño tamaño. Sólo la inmersión en DNA facilitaría la aplicación de vacunas DNA para esos casos (Nakanishi y Ototake, 1997), pero no se ha descrito todavía. Como métodos que necesitan ser puestos a punto en su aplicación a la Acuicultura, dos métodos empleados en terapia génica podrían ser de interes: (i) la inmersión en formulaciones DNA-liposomas y (ii) la inmersión o administración oral de DNA microencapsulado. La utilización de medios físicos que faciliten la entrada del DNA en la célula sería un tercer método de interés (iii).

Los liposomas catiónicos como el DOTAP (Huang y Li, 1997), capaces de formar complejos con el DNA cargado negativamente, se investigan actualmente como sistema de vehiculización de DNA para terapia génica (Templeton *et al*., 1997), así como el modo de aumentar la potencia de transfección (Lam y Cullis, 2000). La aplicación de estos métodos al campo de la Acuicultura se ha intentado muy rara vez (Szelei *et al*., 1994). Existen liposomas optimizados para administración oral en mamíferos (Klavinkis *et al*., 1997) y para vacunación por inyección (Davis *et al*., 1997; Gregoriadis, Saffie y BriandeSouza, 1997), que podrían utilizarse en las pruebas de vacuanción por inmersión en DNA, para peces.

La microencapsulación se ha usado para aumentar las respuestas de anticuerpos en la mucosa después de la administación oral en ratón (Jones *et al*., 1997) (Walter *et al*., 1999) y se ha utilizado para inmunización oral de truchas con antígenos proteicos (Lavelle, Jenkins y Harris, 1997). En la actualidad se investiga en nuevos polímeros como vehículo para el DNA (MacLaughlin *et al*., 1998; Queiroz, Gallardo y SanRoman, 2000). El DNA *encocleado* (formando estructuras con lípidos cilíndricos) también se está utilizando como vehículo (Archibald y Mann, 1994). Hay que tener en cuenta en estos casos los posibles efectos nocivos que puede tener el uso de estos métodos, para desarrollo del pez (Midtlying y Lillehaug, 1998).

Un caso especial de microencapsulación es la utilización de la misma bacteria que se usa para clonaje del plásmido (se denomina bactofección). Ya se ha intentado con éxito en mamíferos utilizando *Shigella spp.* (Sizemore, Branstrom y Sadoff, 1995) y se podría intentar con otras bacterias intracelulares, patógenos habituales en Acuicultura (*Renibacterium spp.*, *Aeromonas spp.*, etc.). A este respecto, la transformación de *Yersinia spp.* (Cutrin *et al*., 1994) y la identificación y clonaje de un fragmento de DNA asociado con las propiedades de internalización de *Renibacterium* en células de pez (Maulen *et al*., 1996), así cómo el uso de mutantes de *Aeromonas spp.* (Noonan, Enzmann y Trust, 1995), son avances que se podrían aprovechar para nuevos desarrollos en vacunas DNA. Una gran ventaja de la utilización de los vectores bacterianos para vehiculizar vacunas DNA, frente a otros métodos, puede ser el hecho de que no

se requiere purificación de los plásmidos, por lo que las vacunas DNA se podrían producir simplemente al coste de fermentación, liofilización y empaquetado.

Los métodos físicos para facilitar la entrada del DNA en peces están aún sin desarrollar, aunque la electroporación se utiliza en el caso de células bacterianas (Conchas y Carmiel, 1990) y cultivos celulares, así como en la tecnología de transferencia de genes en gametos, para obtener peces transgénicos (Inonue *et al*., 1990; Powers *et al*., 1992). El uso de los ultrasonidos está también siendo estudiado en terapéutica y en mejora de la penetración de fármacos a través de la piel (Diederich y Hynynen, 1999; Mitragorri, Blankschtein y Langer, 1995). Los efectos de su aplicación en peces (Martin, Pratt y Watmough, 1983) y el conocimiento de los mecanismos que induce su aplicación a nivel de membranas celulares (Frenkel y Kimmel, 2000), sólo recientemente están recibiendo alguna atención.

1.7.6. Posibles modelos *in vitro*. Cualesquiera que sean los métodos empleados para hacer llegar el plásmido codificante del antígeno del patógeno al tejido del pez *in vivo*, experimentos paralelos *in vitro* con algunos modelos tisulares podrían añadir algunas ideas para mejorar el proceso. Puesto que *in vitro* siempre se pueden ensayar muchas más variables, deberíamos de ser capaces de seleccionar aquellas que luego podrán ser utilizadas *in vivo*. Debido a que no se conoce la posible diana celular del DNA en la vacunación por inmersión, se podría pensar en: i) Usar una línea celular epitelial, componente mayoritario de las branquias y de la piel (por ejemplo, la línea celular EPC). Además, se ha demostrado que las células epiteliales de las branquias son capaces de capturar *Yersinia spp.* del medio acuático (Zapata *et al*., 1987). ii) Puesto que los macrófagos son células abundantes en las branquias, fagocitan antígenos bacterianos (Zapata *et al*., 1987) y se pueden obtener facilmente *in vitro* (Estepa *et al*., 1991; Estepa y Coll, 1991a), están entre las células que con mayores probabilidades podrían captar el DNA. Ya que las branquias son la superficie más grande del pez en contacto con el agua y tienen poca cantidad de mucus, tienen una mayor probabilidad de captar DNA que otros tejidos.

1.7.7. Investigación de las rutas de entrada. Aún después de muchos años de experimentación, se desconocen las rutas de entrada de los antígenos proteicos en los peces después de una inmersión en agua conteniendo dichos antígenos. Por otra parte, las posibles rutas de entrada del DNA son totalmente desconocidas. El estudio de la distribución tisular del DNA en la trucha después de su inmersión en soluciones de DNA puede ayudar a definir la ruta de entrada, aportando nuevas ideas para su optimización. La localización de DNA marcado radioactivamente podría seguirse fácilmente, a lo largo del tiempo; además, podría detectarse el DNA específico mediante amplificación por PCR en distintos tejidos, así como la presencia del antígeno expresado, por inmunohistología.

1.7.8. Investigación de los antígenos protectores. Aunque las vacunas DNA codificadoras tanto del gen de la G como del gen de la N de VSHV fueron efectivas protegiendo truchas frente a la contraprueba vírica, la construcción con G fue más eficaz, llegando casi al 100% de protección. En el caso de los rabdovirus está claro que el mejor antígeno protector a utilizar es la proteína G y quizás también la N (Anderson *et al*., 1996; Heppell *et al*., 1998).

1.7.9. Diseño de las contrapruebas. Las contrapruebas se deberían hacer con varias concentraciones de virus, para escoger como más representativa aquella dosis de virus que cause la muerte en un 50% de la población de peces (DL_{50}) (Engelking, Harry y Leong, 1991). Para muchos aislados de VNHI, utilizando truchas de 0.4-1g, dichas dosis de virus están entre 10^2-10^4 dosis infectivas de cultivo tejido ($DICT_{50}$/ml). Las mortalidades, expresadas en porcentajes relativos de supervivencia (PRS = 1 - mortalidad de los vacunados / mortalidad de los no vacunados x100) varían también con la virulencia del aislado viral utilizado en la contraprueba (Figura 4C). Ello también ilustra el hecho de que a bajas dosis de virus las vacunas pueden proteger y, sin embargo, a altas dosis de virus la protección inducida por la vacunación puede no ser suficiente. Vacunas como las mencionadas pueden no obstante ser suficientes en campo, ya que muy rara vez pueden observarse epizootias en las que haya concentraciones de virus en el agua de las granjas mayores de 10^5 $DICT_{50}$/ml. Aunque estas consideraciones deben tenerse en

cuenta al experimentar en el laboratorio, por razones prácticas es muy difícil evaluar la protección inducida por una vacuna a varias dosis de virus, debiendo restringirse a los resultados obtenidos con una única dosis de virus y ~ 30 peces por grupo de experimentación.

Figura 4. Variación del PRS (porcentaje relativo de supervivencia) en función del peso corporal de la trucha (A), evolución del PRS con el tiempo en truchas de diferentes edades (B) y variación de la mortalidad con el título de virus utilizado en la contraprueba con VNHI (C). A, Los datos son de Johnson (Johnson, Flynn y Amene, 1982). Seis especies de salmónidos de varios tamaños se vacunaron por inmersión en una bacterina de *Vibrio spp*. diluída 1/10. Los peces se contraprobaron con *Vibrio anguillarum* virulento, 30 días después de la vacunación. PRS = número de peces vacunados supervivientes/número de peces no vacunados supervivientes x 100. Sólo se han representado los PRS máximos y mínimos a cada tamaño ensayado, prescindiendo de la especie (trucha o salmón). **B,** Los datos son de Johnson (Johnson, Flynn y Amend, 1982) en condiciones iguales a los experimentos descritos en A. ------, 0,6g/trucha; □-----□, 1,1g/trucha; ○----○, 1,4g/trucha; ●----●, 2,8g/trucha. **C,** Se realizaron contrapruebas en truchas control no vacunadas con distintas concentraciones de virus. Para VNHI y truchas de 0.4-1g los niveles de virus a utilizar están entre 10^2-10^4 $DICT_{50}$/ml. -------, VNHI atenuado ; ——, VNHI virulento (Leong *et al*., 1995).

2. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA

Los modelos elegidos para estudiar la vacunación DNA de peces por inmersión en soluciones de plásmidos han sido el Virus de la Septicemia Hemorrágica Vírica (VSHV) y la trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*, Walbaum). En cuanto al VSHV, su biología molecular es bien conocida y la enfermedad que produce es, además, una de las causantes de la mayor mortalidad en la producción piscícola mundial. Hasta el momento, no existen en piscicultura ni vacunas ni agentes terapeúticos eficaces frente a las infecciones causadas por rabdovirus. En el caso de la trucha, su sistema inmunológico es uno de los más estudiados entre los peces. El estudio de estos modelos permite conclusiones extrapolables a todas las especies cultivadas y a otros patógenos.

El gen de VSHV seleccionado para la vacunación DNA es el de la proteína G que forma las espículas que se proyectan hacia el exterior de la envuelta lipídica, ya que ésta es la proteína mayormente implicada en protección, contra la que van dirigidos los anticuerpos neutralizantes, así como la mayor inductora de inmunoestimulación de linfocitos T. Para poner a punto las distintas formulaciones necesarias para aumentar la transferencia del DNA al cuerpo de la trucha, mediante inmersión, se ha seleccionado un plásmido comercial de expresión en eucariontes, el pcDNAI/Amp que utiliza el promotor de *Cytomegalovirus* (CMV) y un marcador de selección que confiere resistencia a Ampicilina (Amp), que contiene secuencias inmunoestimuladoras CpG (Lewis y Babiuk, 1999). Con el gen G y el pcDNAI/Amp se ha generado y caracterizado una construcción que se ha denominado G3-pcDNAI/Amp.

El trabajo se ha dirigido hacia tres objetivos principales:

1. La realización de estudios de transfección *in vitro* en células de pez (EPC), utilizando plásmidos con los genes marcadores de la proteína verde fluorescente (GFP) y de la ßGalactosidasa (βgal). La finalidad de este primer objetivo es estudiar a nivel celular distintas variables implicadas en la entrada del DNA en células de pez, como temperatura, concentración de DNA, relación DNA-agente de transfección, presencia de otros plásmidos, tamaño del plásmido, etc. Ello facilitaría el conocimiento de las condiciones en las que podría realizarse la

posible vacunación DNA. Asímismo, permitiría la selección de una amplia batería de agentes de transfección, tanto comerciales como preparados en el laboratorio. Este modelo también permitiría la caracterización de la construcción G3-pcDNAI/Amp, generada para los experimentos de vacunación/contraprueba.

2. La realización de estudios de transfección *in vivo* con truchas de 2 cm inmunoincompetentes, utilizando los mismos genes marcadores (GFP y βgal). La finalidad de éstos es poder comparar distintas formulaciones y métodos de vehiculización del DNA susceptibles de ser aplicados por inmersión en experimentos con truchas mayores, mediante la detección de la expresión de la proteína marcadora codificada por el plásmido, en las truchas pequeñas. Son estudios más cortos y sencillos de ejecución que los de vacunación/contraprueba y se trata de comprobar si son extrapolables al ensayo con truchas más grandes. Permitiría seleccionar métodos para probar en experimentos de vacunación/contraprueba con truchas inmunocompetentes.

3. La realización de estudios de vacunación/contraprueba con truchas de 5-7 cm inmunocompetentes,utilizando G3-pcDNAI/Amp. La finalidad es probar la eficacia *in vivo* de aquellas formulaciones y métodos de vehiculización de DNA con buenos resultados en los experimentos con truchas pequeñas. En estos estudios se analiza tanto la respuesta inmune humoral y celular, después de la vacunación, como la resistencia a la contraprueba con VSHV (esquematizado en la Figura 5). Como controles positivos de vacunación DNA por inmersión se ensayaron por inyección dos construcciones más con la G de VSHV, comparando la eficacia en la inducción de protección de dos promotores distintos (CMV, de *Cytomegalovirus* y FG2, de expresión en músculo de pez)

Figura 5. Características generales de los estudios de vacunación DNA por inmersión. Los participantes en la vacunación son: el pez (tamaño, desarrollo inmunológico, etc.), el patógeno (identificación de los genes inductores de protección) y el plásmido (tipo de promotor, secuencias adjuvantes CpG, etc.). Los métodos de formulación para la administración son: inyección, inmersión, liposomas, microencapsulación, etc. La evaluación o estudio de los resultados de la inmunización se hace por estimación de la expresión (expresión de genes marcadores, PCR, inmunohistología, etc.), de la respuesta inmune (humoral y/o celular) y, finalmente, por resistencia a la contraprueba con el patógeno.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. VIRUS, CULTIVOS CELULARES Y PLÁSMIDOS.

3.1.1. Línea celular. La línea celular empleada en todos los ensayos con VSHV fue *Epithelioma Papullosum Cyprini* (EPC) (Fijan *et al*., 1971). Las células EPC se crecieron en medio RPMI-1640 modificado por Dutch con 20 mM Hepes (290 mOsm/Kg), (Flow Ayrshire, Escocia), con 10% de suero fetal bovino (SFB, Seralab, Inbiotech, León, España) y suplementado con 2 mM de glutamina (Flow), 1 mM de piruvato sódico (Flow), 50 µg/ml de gentamicina (Flow) y 1,2 µg/ml de anfotericina (Flow) (Estepa, 1992). Se utilizaron frascos estériles de plástico de 25, 75 y 150 cm^2 de superficie (Costar, Cambridge, MA, USA) y placas de 24, 48 y 96 pocillos (Costar). Las células se crecieron a una temperatura de 28ºC en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO_2. Una vez conseguidas las monocapas celulares de EPC, se guardaron en incubadores de 12ºC hasta su uso (Basurco, 1990; Estepa, 1992). Para subcultivarlas, las células se despegaron de los frascos con una solución de tripsina-EDTA y se diluyeron con medio fresco al volumen necesario (dilución 1/3 a 1/5) para sembrar nuevos frascos. La mezcla tripsina-EDTA se preparó mezclando 0,25% de 4U/mg de tripsina (Serva, Heidelberg, Alemania), 1g/ml de glucosa (Merck, Alemania), 0,026% de EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y 0,001% de rojo fenol (Sigma) en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM HNa_2HPO_4 y 1,5 mM H_2KPO_4, pH 7,4).

3.1.2. Virus de la Septicemia Hemorrágica Vírica (VSHV). La cepa del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV) empleada es el aislado francés VSHV-07.71 (Bernard, LeBerre y DeKinkelin, 1983; DeKinkelin y LeBerre, 1979; LeBerre, De Kinkelin y Metzger, 1977) que se obtuvo de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).

La producción y titulación de virus se realizó según la descrita por DeKinkelin (DeKinkelin y LeBerre, 1979). Retirando previamente el medio utilizado para crecer las células, se infectaron monocapas de EPC con VSHV en medio con 2% de SFB, a baja multiplicidad de infección (m.o.i.=10^{-2}-10^{-4}). Las células se mantuvieron en adsorción con el virus durante 1 h a

14ºC con agitación suave cada 15 min y se rellenaron los frascos con medio con 2% de SFB, hasta la lisis completa del tapiz celular (10-14 días). Los inóculos para neutralización se obtuvieron separando los restos celulares del sobrenadante por congelación y descongelación y posterior centrifugación a 3.000 rpm, recuperación del sobrenadante y congelación a –70ºC. Para la realización de las contrapruebas se utilizaron inóculos recién preparados y sin separación de restos celulares.

En cuanto a la purificación del virus, la metodología seguida es básicamente la descrita por DeKinkelin (DeKinkelin, 1972) y modificada por Basurco (Basurco, 1990). Después de descartar por centrifugación los restos celulares de cultivos de EPC infectados, se precipitó el virus con Polietilenglicol 6000 (PEG-6.000) al 7% en ClNa al 2,3% a 4ºC y en agitación durante 2 h. Después de centrifugar a 10.000 g durante 45 min se resuspendió el sedimento en 1-2 ml de TNE (0,15 M Tris, 0,15 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,6). Para aumentar la pureza, se ultracentrifugó el virus a través de un gradiente de sacarosa 15-45% en TNE a 80.000 g durante 270 min en una ultracentrífuga Beckman 25-75 con rotor SW27. La estimación de la cantidad de proteína se realizó por medida de A_{280nm} ($\in$ = 1,4) o por tinción con azul de Coomassie y comparación con patrones conocidos, considerado el límite de detección 1 µg por banda de proteína detectada. Para su uso como inmunógeno fue necesario inactivar el VSHV por tratamiento con calor (100ºC durante 5 min).

3.1.3. Plásmidos utilizados. Para los experimentos *in vitro* se utilizaron el pCMVβ (7,2Kb) (Clontech Labs, Palo Alto, CA, USA) y el pcDNA3.1/HisB/lacZ (pcDNAlacZ) (8,6Kb) (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). Ambos contienen el gen βgal (βgal) de *E. coli* bajo el promotor temprano de *Cytomegalovirus* (CMV). El pGINT7β (15 Kb), que contiene el gen lacZ bajo el promotor de la polimerasa del fago T7, fue amablemente cedido por el Dr. Berger (Nussbaum, Broder y Berger, 1994) (Figura 6). Para los experimentos de inmersión a pequeña escala utilizando truchas de 2 cm, se obtuvo el plámido GFP-$pQBI_{25}$ (6,2Kb) que contiene el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), clonado bajo el promotor CMV (Quantum Biotech Inc,

Figura 6. Pásmidos utilizados en los experimentos con genes marcadores (A) y en los experimentos de vacunación/contraprueba (B). A, pCMVβ de 7,2Kb (Clontech), pcDNA3.1/HisB/lacZ (pcDNAlacZ) de 8,6Kb (Invitrogen), pGINT7β de 15 Kb (Nussbaum, Broder y Berger, 1994), GFP-pQBI$_{25}$ de 6,2Kb (Quantum Biotech Inc). **B,** G-pcDNAI de 5,5 Kb (Dr. Michel Brémont, INRA, Francia), G3-pcDNAI/Amp de 6,3Kb (obtenido por subclonaje del G-pcDNAI, G-pcDNA3-CMV de 7,0Kb (Dra. Heather Davis), G-pcDNA3-FG2 de 7,0Kb (Dra. Heather Davis). Ori, origen de replicación del plásmido; CMV, promotor de *Cytomagalovirus*; T7, promotor de la polimerasa del fago T7; FG2, promotor de músculo de pez; β-Gal, β-Galactosidasa; GFP, proteína verde fluorescente; G de VSHV, glicoproteína de VSHV.

Montrevil-sous-bois, France). Para la generación de la construcción G3-pcDNAI/Amp, utilizada en los experimentos de vacunación/contraprueba por inmersión, se partió de la construcción G-pcDNAI (Dr. Michel Brémont, INRA, Francia), que contiene el gen de la G de VSHV (aislado francés 07.71) clonado en el vector pcDNAI (4,0Kb) (Invitrogen) y se subclonó en el vector comercial pcDNAI/Amp (4,8Kb) (Invitrogen). Para los experimentos de vacunación/contraprueba por inyección y comparación de promotores se utilizaron las construcciones G-pcDNA3-CMV (7,0Kb), con la G bajo el promotor CMV y G-pcDNA3-FG2 (7,0Kb), con la G bajo el promotor de músculo de pez FG2, ambas cedidas por Dra. Heather Davis (Loeb Health Research Institute, Otawa, Canadá), generadas y producidas en su laboratorio (Figura 6).

Se usaron los plásmidos para transformar bacterias *E. coli*. Después se prepararon grandes cantidades de plásmido a partir de sedimento de cultivos de bacterias utilizando el sistema de purificación de DNA Wizard plus Megaprep (Promega, Madison, WI, USA) y se ajustaron las soluciones de plásmido a 0,5-1 mg/ml de DNA total (A_{260}nm). Las preparaciones de plásmidos contenían 80-100% de DNA plasmídico, según se mostró por electroforesis en gel de agarosa, siendo el resto otros DNA bacterianos.

3.2. CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN DEL PLÁSMIDO G3-PCDNAI/AMP.

3.2.1. Subclonaje del gen de la G de VSHV de pcDNAI a pcDNAI/Amp.

Se obtuvo el gen G mediante una digestión preparativa a partir de 2 µg de la construcción G-pcDNAI con las endonucleasas de restricción *Eco*RI (10 U/µl) y *Xho*I (40 U/µl) (GibcoBRL, Postfach, Germany), durante 2 h a 37ºC en baño. Se trataron en las mismas condiciones 2 µg de pcDNAI/Amp. El producto de la digestión se separó en un gel de agarosa al 1% (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989), recuperando y purificando las bandas obtenidas, utilizando el kit comercial Prep-A-Gen, (DNA purification kit de Biorad, Hércules, CA, USA). Se recuperaron 50 ng/µl de DNA por cada banda. Se realizó la ligación del plásmido y el inserto con extremos

cohesivos (razón plásmido:inserto 2:3, 1:3 y 1:6), a temperatura ambiente durante 2 h utilizando la T4 DNA ligasa (GibcoBRL) sobre un volumen final de 10 µl por mezcla de ligación. Se incluyeron controles sin inserto. Después se transformaron bacterias competentes *E. coli* Top 10F' mediante el método del cloruro cálcico y choque térmico (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989) y *E. coli* DH5α comerciales (Frozen Competent Cells, Clontech). Se transformaron también por electroporación *E. coli* DH5α comerciales (Electrocompetent Cells, Clontech). Para la transformación mediante choque térmico se sometieron 100 µl de bacterias competentes más 9 µl de mezcla de ligación durante 30 min a 4ºC y durante 45 s en un baño a 42ºC. En el caso de la electroporación, 40 µl de bacterias competentes mezcladas con 1 µl de mezcla de ligación y preenfriadas en hielo, se electroporaron en cubetas de 0,1 cm (Biorad). Las condiciones de electroporación fueron 1,8 Kv, 200 Ω, 25 µF , que resultó en un ζ ~0,4 ms. En ambos casos después de la transformación se añadió 1 ml de medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de ClNa por litro, pH 7,5) y se incubaron las bacterias a 37ºC durante 1 h en un incubador con agitación. Después de centifugar a 3.000 rpm durante 2 min y resuspender las bacterias en 50 µl de medio LB se sembraron 40 µl en placas de LB-Ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37ºC durante toda la noche.

La extracción del DNA plasmídico se realizó a partir de varias colonias transformadas (ligación con la relación plásmido:inserto 1:6) y de una colonia del control de ligación. Para ello, se incubaron cultivos de 2 ml de medio LB-Ampicilina (100 µg/ml) con las colonias en tubos de 13 ml (Starstedt, Inc., Newton, USA) a 37ºC con agitación durante la noche. Se recuperó el precipitado bacteriano por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 s y se sometió a lisis con solución STET (50 mM Tris-ClH pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 8% sacarosa, 0.1% TritonX100) y lisozima (1 mg/ml) durante 2 min a temperatura ambiente y durante 45 s en un bloque térmico a 100ºC. Se centrifugó después a 12.000 rpm durante 8 min y se recuperó el sobrenadante, que se trató con RNasa (50 µg/ml) durante 30 min a 37ºC. Se trató el DNA durante 5 min a temperatura

ambiente con una solución al 5% de CTAB (Sigma) (0.2% final), previamente solubilizado y se centrifugó a 12.000 rpm 10 min. El precipitado recuperado se disoció del CTAB con etanol 100% y ClNa 5 M a –70ºC durante 20 min y se lavó con etanol 70% frío. Se resuspendió el precipitado en H_2O destilada estéril (Sigma).

Para detectar la presencia del inserto se digirió el DNA extraído de los distintos clones. La digestión se realizó durante 1 h 30 min a 37ºC con las mismas enzimas utilizadas para el clonaje (*Eco*RI y *Xho*I). Se separaron los productos de la digestión en un gel de agarosa al 1% y se seleccionó uno de los clones que contenía el inserto (gen G), que se denominó G3-pcDNAI/Amp.

3.2.2. Caracterización de la expresión del G3-pcDNAI/Amp por transfección. Se hicieron proliferar células EPC en placas de 24 pocillos (Costar). Cuando la confluencia de las células era ~70% ($0.5x10^6$ células/poc) se incubaron durante 1-2 h a 26ºC con 0.5 μg de G3-pcDNAI/Amp mezclado con 10 μl de lipofectamina (GibcoBRL). Transcurrido este tiempo se añadieron 3 ml de medio de crecimiento de EPC (ver 3.1.1.) a las células transfectadas y se dejaron crecer durante 3 días más (Bearzotti *et al*., 1992).

Para el análisis por FACS se lavaron las células transfectadas y se despegaron de la superficie de la placa con 3 ml de solución I (0,13 M NaCl, 2,7 ,KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,7 mM KH_2PO_4, 0,1% seroalbúmina bovina, 0,01% N_3Na y 5 mM EDTA, pH 7,4). Después se centrifugaron las células a 1.000 rpm durante 10 min y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-VSHV neutralizante 3F1A12 (Lorenzen et al., no publicado) diluído 1/50 en la solución I suplementada con 2% de suero de conejo, 2% de suero de cabra, 2% de extracto de *E. coli* y 2% de suero de trucha. Después de lavar las células con PBS y centrifugar 10 min a 1.000 rpm se incubaron durante 30 min con el anticuerpo fluorescente FITC Fab'2 Goat Anti-mouse (Caltag, San Francisco, USA) diluído 1/50 en la solución I. Posteriormente la suspensión de células se lavó y centrifugó de nuevo. El mismo día de la recogida y tinción se analizaron 5.000 células por citometría de flujo en el aparato FACScan (Beckton-Dickinson, San

José, California), utilizando el programa LYSYSII versión 1.0. Se midió la fluorescencia utilizando el filtro FL1 (514-545 nm, verde).

3.2.3. Caracterización por PCR y secuenciación. Para la caracterización de la construcción G3-pcDNAI/Amp y utilizando la secuencia publicada del gen de 1,58 Kb de la proteína G que contenía la construcción de partida G-pcDNA/I (Thiry *et al*., 1991b), se diseñaron cuatro oligonucleótidos con el objeto de amplificar dos fragmentos solapados del gen de G (nucleótidos, nt 13 a 339 y nt 184 a 1.536 de la secuencia de G). La secuencia de los oligonucleótidos en sentido 5'→3' fue la siguiente: #59 (ida): ATG GAA TGG AAC ACT TTT TTC TTG G TG ; #60 (vuelta): GGT GAGC TCG ATA AGT CAC TCT GTG CAG; #61 (ida): CGA CCA GCT CAA CTC AGG TGT CCT CAT; #62 (vuelta): TCA GAC CGT CTG ACT TCT GGA GAA CTG. Se calculó el T_M de forma manual y mediante el programa PCGene. El tamaño esperado de los fragmentos amplificados era de 327 (oligos #59 y #60, nt 13 a 339 de la secuencia de G) y de 1.353 (oligos #61 y #62, nt 184 a 1.536 de la secuencia de G) pares de bases. Se realizaron amplificaciones PCR con cada una de las dos parejas de oligonucleótidos (#59-#60 y #61-#62) y las dos construcciones con el gen G, la de partida G-pcDNAI y la subclonada G3-pcDNAI/Amp, incluyéndose controles negativos sin DNA y con el plásmido comercial utilizado en el subclonaje (pcDNAI/Amp). Se utilizó la AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin-Elmer, Bucks, Inglaterra). Se mezclaron para la reacción 5 U de Ampli Taq, 200 ng de cada uno de los oligonucleótidos de las parejas correspondientes, 10 ng de DNA plasmídico como matriz, el tampón correspondiente, en presencia de 2 mM de $MgCl_2$ y de 0,2 mM de una mezcla de dNTPs (Promega), en un volumen final de 100 µl. Primero se realizaron 30 ciclos de amplificación de 1 min a 95ºC, 1 min a 55ºC y 2 min a 72ºC, seguido de un último ciclo de extensión de 10 min a 72ºC. Después se hicieron migrar en un gel del 1% de agarosa 10 µl de cada reacción de PCR durante 2 h a 80 V para comprobar la amplificación.

3.3. OBTENCIÓN DE BACTERIAS RECOMBINANTES POR FERMENTACIÓN.

Para la producción de *E. coli* (G3-pcDNAI/Amp) recombinante en gran cantidad se realizó un ensayo previo de crecimiento en los medios de cultivo de bacterias LB y JLB (12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura, 4 ml de glicerol, 2,3 g de KH_2PO_4 y 12,54 g de K_2HPO_4 por litro, pH 7,5) en presencia de 50 μg/ml de Ampicilina (INBIOTEC, León, España). Para cada medio, se inoculó una colonia de *E. coli* Top10F' transformada con la construcción G3-pcDNAI/Amp en 6 ml de medio y se incubó durante la noche. Se inocularon 1,5 ml de estos cultivos, por duplicado, en 500 ml de medio fresco y se incubaron durante 12 h a 37ºC y otras 12 h a 32ºC, para retrasar la llegada de la fase estacionaria. Pasado este tiempo se midió en un espectrofotómetro la A_{600nm}. Para la producción en masa se inocularon 400 ml de cultivos saturados de bacterias recombinantes en 16 l de medio JLB con 50 μg/ml de Ampicilina pH 7,18 .Se incubaron a 37ºC en un fermentador Biostat C (B. Braun-Biotech International, Madrid, España) de 17 l de capacidad con agitación variable (~275 rpm) en función del O_2 disuelto. Transcurridas 4 h de incubación se añadió de nuevo Ampicilina. Se paró la incubación a las 8 h, con una pO_2=100%, lo cual indica que no hay consumo de O_2 y que el cultivo ha entrado en la fase estacionaria. Se centrifugaron las bacterias y la pasta se almacenó a –70ºC. Para hacer el cálculo del rendimiento en peso seco de bacterias, se centrifugaron 5 ml de cultivo, se lavaron y se secaron a 60ºC hasta peso constante. El rendimiento en peso seco fue de 5,5 g/l de cultivo.

3.4. ESCALADO DE LA PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS.

La preparación de plásmidos en gran cantidad se hizo a partir de la pasta de cultivos de *E. coli* (G3-pcDNAI/Amp) utilizando el sistema comercial de purificación de DNA Wizard Plus Megaprep (Promega), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y un protocolo de purificación modificado basado en lisis alcalina. El protocolo se simplificó y optimizó en cuanto a rendimiento y grado de pureza. El protocolo optimizado es el siguiente: se resuspendieron 5 g de pasta de bacterias en tubos de 250 ml (rotor GSA) con 60 ml de una solución de resuspensión I

(50 mM Tris-Cl, 40 mM EDTA, 100 μg/ml de RNAsa A, pH 7,5) y se lisaron durante <20 min mezclando por inversión hasta que se obtuvo un medio transparente con una solución de lisis II (0,2N NaOH, 0,1% SDS). Después los restos bacterianos se precipitaron con una solución de neutralización III (1,3M Acetato de Potasio, pH 4,8) y se retiró el precipitado por centrifugación a 14.000 g durante 15 min y filtración con papel de filtro. Para recuperar el plásmido del sobrenadante se precipitó con 80 ml de Isopropanol durante 5 min, agitando por inversión y se centrifugó a 14.000 g 15 min. Después de secado y disuelto en H_2O bidestilada estéril (Sigma) se volvió a precipitar el DNA en tubos de 40 ml (rotor SS34) con 0,25 mM de Acetato de Sodio pH 5,2 y Etanol 100% frío y se lavó con Etanol 70%. Después de secar el precipitado durante 20 min a vacío o durante toda la noche a temperatura ambiente se disolvió el DNA en H_2O (Sigma). Finalmente se estimó la cantidad de DNA total por medida de la absorbancia en un espectrofotómetro (A_{260nm}) y el porcentaje de G3-pcDNAI/Amp por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como procedimiento para lisar las bacterias, parte de la pasta de bacterias (40 ml de bacterias mezcladas con 30 ml de PBS) se pasaron por Prensa de French SLM-AMINCO (SLM Instruments, INC) a una presión de 20.000 PSI en célula C, perdiéndose un 20% durante el proceso. Se realizó la extracción de plásmido a partir de este lisado para comparar con la extracción a partir del sedimento sin pasar por prensa de French.

3.5. FORMULACIONES EMPLEADAS PARA TRANSFECCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS.

Las formulaciones empleadas se esquematizan en la Tabla 3. Se emplearon tanto reactivos de transfección comerciales como preparaciones hechas en el laboratorio.

3.5.1. Transfección con reactivos comerciales. Para los experimentos de transfección en monocapas de EPC se obtuvieron los siguientes reactivos de transfección: fugene 6 (Roche, Barcelona, España), lipofectamina y lipofectina (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) y Perfect lipid tfx (Invitrogen, Leek, The Netherlands).

Tabla 3.

Tabla de formulaciones empleadas para transfectar plásmidos.

FORMULACIONES	ENSAYOS	PLÁSMIDOS	Referencias
Fugene	EPC[a] *In vivo* 2 cm[b]	A, B, C, D A	Roche
Lipofectamina	EPC	B, C, D	Bearzotti *et al*., 1992
Lipofectina	EPC	B, C, E	GibcoBRL
Lípidos tfx	EPC	B, C	Invitrogen
PolímeroVMMA	*In vivo* 2 cm	A	Queiroz *et al*., 2000
Ultrasonidos	EPC *In vivo* 2 cm *In vivo* 5-7 cm[c]	A, B A E	Frenkel y Kimmel, 2000
DOTAP	EPC *In vivo* 2 cm *In vivo* 5-7 cm	A, B A E	Gregoriadis *et al*., 1997 Crook *et al*., 1998
Bactofección	*In vivo 2 cm* *In vivo 5-7 cm*	A E	Sizemore *et al*., 1995

[a], Transfección *in vitro* en células EPC.
[b], Experimentos *in vivo* con truchas de 2 cm inmunoincompetentes.
[c], Experimentos *in vivo* con truchas de 5-7 cm inmunocompetentes.
A, GFP-pQBI$_{25}$
B, pCMVβ (βgal)
C, pcDNAlacZ (βgal)
D, pGINT7β (βgal)
E, G3-pcDNAI/Amp (proteína G de VSHV)

3.5.2. Formulaciones con DOTAP. Se hicieron formulaciones DNA-liposomas con DOTAP (1,2,dioleoil-3-4-trimetil amonio propano) (Avanti Polar Lipids Inc, Ababaster, AL, USA). Los liposomas se preparon concentrados mezclando cantidades equimoleculares de DOTAP:Colesterol (120 mM DOTAP y 120 mM Colesterol) disueltas en cloroformo en un matraz de corazón y secando con una corriente de Argon. Se emulsionaron en glucosa al 5% durante 30 min a 50ºC, gaseando antes y después con Argon para evitar la oxidación del DOTAP. Después se sonicaron a dicha temperatura durante 5 min y se guardaron a –20ºC hasta su utilización. Las mezclas DNA-DOTAP se prepararon los días previos al ensayo. Para ello se mezclaron y liofilizaron liposomas sonicados con 10-100 μg de DNA en glucosa al 5%. Antes de su utilización se reconstituyeron en un volumen de H_2O destilada (concentraciones finales de 20 mM DOTAP, 20 mM Colesterol) (Gregoriadis, Saffie y BriandeSouza, 1997). La concentración final en el baño de aplicación a las truchas fue de 1 mM DOTAP 1 mM Colesterol y variable para el DNA plásmidico, según los experimentos.

3.5.3. Formulaciones con polímeros catiónicos. Para la preparación de los sistemas DNA-polímero catiónico se utilizó el copolímero poli-dimetilacrilamida-vinilpirrolidona (VMAA-VP) en fracción molar 0,73 VMAA: 0,27 VP (Queiroz, Gallardo y SanRoman, 2000). Para la síntesis del copolímero se destilaron a vacío monómeros dimetiacrilamida y vinilpirrolidona, se mezclaron y se polimerizó en solución utilizando etanol como solvente. Después de desgasificar con gas N_2 durante 30 min, se indujo la reacción térmicamente a 50ºC utilizando azobis-isobutironitrilo (AIBN $1,5x10^{-2}$ M) como radical libre iniciador. Los copolímeros resultantes se precipitaron con dietiléter, se redisolvieron en etanol, se reprecipitaron, para eliminar monómeros residuales y se secaron al vacío. Para formar el sistema DNA-polímero, se solubilizaron 600 mg del polímero en PBS, se añadieron 600 μg de GFP-$pQBI_{25}$ y se liofilizaron.

3.6. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN *IN VITRO* EN CÉLULAS EPC.

Se hicieron crecer células EPC en placas de 24 pocillos a 20ºC con 500 µl de medio RPMI-1640 modificado por Dutch con 20 mM de Hepes y suplementado con 10% de suero fetal bovino (crecimiento óptimo a 28-30ºC). Cuando la confluencia de las células era del 70-80% ($5x10^5$ células/pocillo) se incubaron durante 2-4 h con cantidades diferentes de plásmidos mezclados con los reactivos de transfección apropiados, durante 15 min en 25 µl de RPMI-1640 con o sin suero fetal bovino (según el reactivo de transfección) y se añadieron a los pocillos que contenían 500 µl de medio, con o sin suero, respectivamente. Después de la transfección se incubaron las células durante 2 o más días a 20ºC (Bearzotti *et al*., 1992) antes de los ensayos detección.

Para la transfección por electroporación se despegaron células EPC de los frascos de cultivo con tampón fosfato libre de Magnesio y Calcio (PBS) conteniendo 0,9 g/l de EDTA. Después de lavarlas con el mismo tampón se añadieron 10 µg de DNA plasmídico a $2x10^6$ células en 400 µl de PBS y se electroporaron en cubetas de 0,2 cm a 0.3 Kv, 960 µF (ζ~0,2ms). Después, las células electroporadas se colocaron en placas de 24 pocillos y se incubaron hasta la ejecución de los ensayos de detección.

Para los ensayos de transfección con pGINT7β (promotor T7), previamente a la transfección se infectaron las monocapas de células con la cepa de *Vaccinia* VTF7-3, que expresa la polimerasa del fago T7 (Fuerst *et al*., 1986) y se incubaron durante1-2 h.

3.7. MANIPULACIÓN DE TRUCHAS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*, WALBAUM).

3.7.1. Obtención de sueros de truchas. Los sueros de truchas control arco iris sanas (truchas adquiridas en la piscifactoría Vistahermosa, León) se obtuvieron mediante sangrado por la vena caudal hasta su muerte y posterior mezclado de 200 truchas de 200 g. Otro suero de truchas control se obtuvo en 1987 procedente de una mezcla de sueros de 30 truchas de la

Piscifactoría de la Escuela de Ingenieros de Montes de Madrid (una piscifactoría en circuito cerrado, con reproducción de trucha durante más de 30 años). Los sueros de truchas inmunizadas y/o vacunadas se obtuvieron por dos métodos, según el tamaño de la trucha y la posibilidad de recuperar cantidad suficiente de suero. Las truchas menores de 5 cm se sangraron por la vena caudal, diluyendo la sangre a una dilución ¼ en una solución anticoagulante con 6,4 g/l de citrato sódico y 1,5 g/l de EDTA en suero salino isotónico (IBYS), separando después por centrifugación el sobrenadante diluído. En el caso de truchas mayores el sangrado se realizó directamente por inyección en la vena caudal. Se utilizó un único método de sangrado para un mismo experimento, según el tamaño de las truchas.

3.7.2. Ensayos con truchas de 2 cm inmunoincompetentes y GFP-pQBI$_{25}$ + formulaciones. Para estos ensayos se utilizó el plásmido GFP-pQBI$_{25}$ que codifica la proteína fluorescente GFP. Para los ensayos con GFP-pQBI$_{25}$ utilizando las formulaciones: DOTAP, polímeros catiónicos, fugene y bactofección, se mantuvieron grupos de 5 truchas de 2 cm con un peso corporal de 0,3-0,5 g (Las Zayas, León, España) en un contenedor con 20 ml de agua de acuario durante 15-30 min con GFP-pQBI$_{25}$ + formulaciones. Como control positivo (Heppell *et al*., 1998), se inyectaron intramuscularmente con 1 μg de GFP-pQBI$_{25}$ /trucha utilizando una jeringa de 10 μl (Hamilton, Reno, NV, USA). Se incluyeron controles con la formulación y un plásmido codificando una proteína no fluorescente (G$_3$-pcDNAI/Amp), con pQBI$_{25}$ o con la formulacion sin plásmido. Después se traspasaron las truchas a 500 ml y se mantuvieron a 4-10ºC durante 1-2 semanas mientras se analizaba la expresión de la GFP.

Para los ensayos basados en ultrasonidos de baja frecuencia se mantuvieron grupos de 5 truchas de 0,3-0,5 g de peso (2 cm) en un vaso de vidrio con 20 ml de agua de acuario dentro de un baño sonicador de 250 ml de capacidad y de 40 W de potencia de ultrasonidos a una frecuencia de 40 KHz (Selecta, Barcelona, España) lleno con 100 ml de agua. Primero se aplicaron los ultrasonidos en dos pulsos de 2 s cada uno con 1 min de descanso entre pulsos, después se añadió el GFP-pQBI$_{25}$ y se aplicaron 2 pulsos de 1 s cada uno con 1 min de descanso

entre pulsos. Se mantuvieron después las truchas con el GFP-pQBI$_{25}$ durante 30 min, se traspasaron a 500 ml y se mantuvieron a 4-10ºC con aireación durante 1-2 semanas mientras se analizaba la expresión de la GFP.

3.7.3. Ensayos de vacunación/contraprueba *in vivo* con truchas inmunocompetentes y G3-pcDNAI/Amp. Para estos ensayos se utilizó el plásmido G3-pcDNAI/Amp que codifica la proteína G del VSHV. Se utilizaron truchas de peso y tamaño comprendidos entre 1-5 g (5-7 cm) (Basurco y Coll, 1991a; Basurco y Coll, 1991b), que fueron adquiridas en la piscifactoría Fuentehermosa (Puebla Lillo, León, España) y El Molino (Manzanares del Real, Madrid, España). Hasta el momento de la vacunación/contraprueba, las truchas se mantuvieron en acuarios de 30 l en circuito cerrado. Las instalaciones donde se realizaron las pruebas se ubican en el Laboratorio de Alta Seguridad del I.N.I.A. en Valdeolmos (Madrid).

Para el estudio previo de la respuesta inmunológica a la inyección con proteínas de VSHV y con VSHV, se mantuvieron truchas de 0,5 a 1 Kg en acuarios de 100 l a 12-18ºC. Por cada antígeno, se inyectaron dos truchas intraperitonealmente 4 veces a lo largo de 3 meses. Las inyecciones se llevaron a cabo con 400 µl de dos proteínas recombinantes de VSHV (G4, aa 9-443 de la proteína G de VSHV y N3, proteína N de VSHV) expresadas en la levadura *Saccharomyces cerevisae* DC04 (Estepa, Thiry y Coll, 1994) y VSHV concentrado con PEG e inactivado por calor (37ºC, 30 min) (Basurco y Coll, 1991a) (ver 3.1.2.). En la primera inyección se diluyeron a partes iguales (1:1) 30 mg de VSHV o de G4+N3 recombinantes con el adyuvante completo de Freunds y para el resto de inyecciones se diluyeron 1:1 con el adyuvante incompleto de Freunds. También se utilizó el adjuvante saponina. Para ello, la misma preparación de VSHV (30 mg/ml) se sonicó en presencia de 30 mg/ml de saponina (Superfos, Quil A), 620 mg/ml de colesterol y 6 mg/ml de fosfatidilcolina (Morein, Sundquist, Hoglund, Dalsgarrd y Osterhaus 1984; Larsson, Lougren y Morein 1993).

Los experimentos de vacunación/contraprueba se realizaron mediante baño-inmersión siguiendo protocolos descritos con anterioridad (Basurco, 1990; Basurco y Coll, 1992;

DeKinkelin y Bearzotti, 1981; Estepa, 1992; Estepa, Thiry y Coll, 1994; Neukirch, 1984). En cada experimento se incluyó un acuario con 10 μg de G3-pcDNAI/Amp inyectado por trucha y un acuario control con truchas no vacunadas. Brevemente, las truchas se mantuvieron en un volumen de 500 m1 de agua del acuario con fuerte aireación mediante difusores a 8-10 ºC durante 30-120 min desde la adición de las vacunas, según los diferentes experimentos. Inmediatamente despúes, se devolvieron las truchas a los acuarios y se esperaron unos 30 días para dar la contraprueba con VSHV. En todos los casos se añadió la mezcla y baño a los acuarios, excepto con la bactofección, en la que las bacterias no se añadieron al acuario, para evitar infecciones en el acuario debido a la elevada carga bacteriana.

Para la vacunación utilizando ultrasonidos de baja frecuencia se mantuvieron 20-30 truchas de 5-7 cm en un baño sonicador con 100 ml de agua de acuario (volumen total ~250 ml) con las formulaciones de plásmido. Se aplicaron 2 pulsos de 10 s , se añadió el G3-pcDNAI/Amp y se aplicaron 2 pulsos de 2 s. Entre un pulso y otro se esperó 1 min. Se mantuvieron después en contenedores con un volumen total de 500 ml de agua del acuario durante 30 min con aireación y se traspasaron después a acuarios de 30 l a 10ºC en circuito cerrado, hasta el momento de la contraprueba.

Los experimentos de vacunación por inyección para el estudio de promotores se realizaron en las mismas condiciones que el resto, inyectando directamente los plásmidos por vía intramuscular. Se utilizaron los plásmidos G-pcDNA3.1-CMV y G-pcDNA3.1-FG2 para comparar la eficacia de los promotores CMV y FG2 y el pcDNA3.1 como control negativo.

Las contrapruebas por inmersión se realizaron con una dosis de 10^5 unidades formadoras de placa o UFP/ml (Basurco y Coll, 1992) de la cepa VSHV 07.71 (Bernard, LeBerre y DeKinkelin, 1983; DeKinkelin y LeBerre, 1979; LeBerre, De Kinkelin y Metzger, 1977). Las contrapruebas por inyección intramuscular (im) y por via oral (vo) se realizaron con una dosis de 10^6 UFP/ml de virus 50-200 μl por trucha. Se utilizó aireación con difusores cuando las contrapruebas se hicieron en 0,5-1 l en recipientes externos a los acuarios. Después de la

contraprueba se recopilaron los datos de mortalidad durante 30-40 días y se calculó el porcentaje relativo de supervivencia (PRS) según la fórmula 1 – mortalidad de truchas tratadas con plásmido / mortalidad en el control de truchas no vacunadas x 100.

3.8. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES: GFP Y ßGAL.

3.8.1. Detección de la expresión de GFP. Se lavaron las truchas con suero salino 0,9 g/l. Para el montaje se cubrieron parcialmente con un portaobjetos sobre una placa de Petri. Se examinaron las aletas caudales y se fotografiaron a 10x4 aumentos en un microscopio Nikon invertido provisto de una lámpara de luz ultravioleta utilizando un filtro azul DM510 B-2ª y una cámara SBIG ST-7 (Santa Bárbara Instrument group, Sta Barbara, CA, USA). Todas las fotografías se tomaron con 5 s de exposición . Se incluyó un filtro para evitar la fluorescencia inespecífica de infrarrojos (eyeguard for CFWN 10X MB J99000 ND4). Para tomar y procesar las microfotografías al microscopio se utilizó el programa CCDOPS versión 1.09 (Santa Bárbara Instrument group, Sta Barbara, CA, USA). Para comparar las fotografías se modificaron las fotografías hasta el mismo fondo y rango. Para el análisis comparativo de intensidad de luz en células individuales se utilizó el programa CCDOPS versión 4.03 (Santa Bárbara Instrument group). Se analizaron un total de 3 truchas por grupo y 3 fotografías por cada trucha, anotándo los valores de intensidad de luz de las 20-30 células con mayor fluorescencia (luz recogida en un área cuadrada 13x13, ~9 μm^2) por fotografía. Se calcularon y representaron las intensidades relativas de luz por célula, halladas restando al valor de cada célula el valor media de fondo correspondiente a su fotografía. Se relalizaron los siguientes cálculos para cuantificar la fluorescencia:

(i) Fluorescencia media de todos los *pixels* por fotografía: según la fluorescencia media calculada por el programa (pico del histograma de la fotografía). Se utilizó sólo en los experimentos preliminares para decidir el método a usar en la cuantificación.

(ii) Fluorescencia de cada célula relativa al fondo de cada fotografía (FR1). Se calculó restando a la fluorescencia de cada célula (fluorescencia del área 13x13), la fluorescencia media de fondo de su fotografía (FR1= fluorescencia por célula – media de la fluorescencia de fondo). Para calcular la fluorescencia media de fondo de cada fotografía se utilizaron 10 áreas de 13x13 de la fotografía sin fluorescencia o 5 melanomacrófagos (estas células nunca mostraron fluorescencia).

(iv) Fluorescencia relativa al fondo de la fotografía y al grupo control del experimento por célula (FR3). Para calcular este dato se procedió de la siguiente manera: Primero, en cada fotografía se calculó la FR1 y se dividió por la media de la fluorescencia de fondo:

$$FR2 = \frac{FR1}{\text{media de la fluorescencia de fondo}}$$

En segundo lugar, para el grupo control se calculó la media de las fluorescencias relativas de cada célula (MFRC):

$$MFRC = \frac{\sum \text{fluorescencia relativa de células control}}{\text{número de células control}}$$

En tercer lugar, para cada célula de los grupos expuestos al GFP-pQBI$_{25}$, se calculó la fluorescencia relativa al fondo y al control, según la formula: FR3 = FR2/MFRC

(v) Porcentaje de células con fluorescencia relativa (FR3) mayor que la media más dos desviaciones estándar (>X+2σ). Se contaron las células con FR3 >X+2σ (aquellas cuya fluorescencia podía considerarse positiva con un 90% de probabilidad asumiendo una distribución normal de todos los valores) y se expresaron los resultados como el porcentaje del número total de células con fluorescencia., según la fórmula: % células = número de células con FR3>X+2σ / número total de células fluorescentes x 100.

3.8.2. Detección de la expresión de ß-Galactosidasa (βgal). Para el ensayo de βgal se utilizó el kit comercial *bgal Reporter Chemiluminescent Kit Gene Assay* (Roche). Experimentos preliminares mostraron que para estimar de la mejor forma posible la actividad βgal en células EPC transfectadas se deberían mantener éstas un mínimo de 2 días a 20ºC después de la transfección. Después de quitar el medio de cultivo celular y lavar las células dos veces con PBS, se añadieron 250 µl de solución de lisis a las EPC transfectadas y se agitaron los pocillos en un agitador SBS durante 10 min. Después se transfirieron 50 µl de células lisadas a cada pocillo correspondiente de una placa Isoplate (EG&G, Madrid, España) de 96 pocillos. Se añadieron 100 µl de solución sustrato recién preparado y se incubaron durante 1 h, pasado el cual se añadieron por pocillo 50 µl de solución intensificadora recién preparada y se contaron inmediatamente durante 6 s en un contador de centelleo 1450 Microbeta (Wallac, Oy, Turku, Finland). En las condiciones usadas en este trabajo, 1 pg de βgal rendía $4x10^4$ cpm (factor utilizado para convertir la actividad en cantidad de βgal).

3.9. INMUNOENSAYOS.

3.9.1. Enzimoinmunoensayo (ELISA). Se cubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos (Dynatech, Plochingen, Germany) con 1 µg/pocillo de proteínas recombinantes o de VSHV (100 µl/pocillo en agua Sigma) y se tapizaron a sequedad manteniéndolas a 37ºC durante toda la noche. Previamente a su uso las placas se bloquearon con 100 µl/pocillo de tampón de dilución (130 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM Na_2HOP_4, 1,4 mM KH_2OP_4, 0,24 mM mertiolato, 5 g/l seroalbúmina bovina, 0,3% suero de conejo, 0,5 g/l Tween-20, 50 mg/l rojo fenol, pH 6,8) diluído a 1/20 en agua destilada (Sanz y Coll, 1992c). A continuación, se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min con 100 µl/pocillo de los sueros de trucha diluídos en tampón de dilución. Se lavaron las placas una vez por inmersión en agua desionizada y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con un AcMo anti-IgM de trucha obtenido en ratón (1G7) diluído 1/200 en tampón de dilución (100 µl/pocillo) (Sánchez, Coll y Domínguez,

1991; Sánchez, 1992). Después de lavar por inmersión en agua desionizada, las placas se incubaron durante 30 min con 100 µl/pocillo de Acs anti-Igs de ratón obtenidos en conejo y conjugados con peroxidasa (Sigma) diluídos 1/500 en tampón de dilución. Se lavaron las placas tres veces y se revelaron añadiendo 50 µl/pocillo de orto-fenilendiamina 1 mg/ml (OPD, Dakopatts, Denmark) disueltas en tampón sustrato (150 mM citrato sódico, 3 mM H_2O_2, 0,24 mM mertiolato, pH 4,8) (Coll, 1989) dejando el desarrollo de color durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se frenó la reacción con 50 µl/pocillo 2 M H_2SO_4 y se leyó la absorbancia de las placas en un Titertek Multiskan RC a 492 y a 620 nm. La A_{620nm} se utilizó para corregir diferencias individuales de absorbancia entre pocillos. Los resultados se expresaron como A_{492}-A_{620nm} (Martínez y Coll, 1988).

3.9.2. Transferencia de geles SDS-PAGE a nitrocelulosa e inmunodetección.

Se separaron muestras de VSHV purificado, en geles de poliacrilamida (12% de poliacrilamida para el gel separador y 6% para el gel apelmazador), polimerizados con 0,5% TEMED y 1% persulfato amónico. Las muestras diluídas en tampón de muestra (0,12 M TrisClH pH 6,8, 10% glicerol, 250 mM β-mercaptoetanol/DTT, 2% SDS, 0,02% azul de Bromofenol), se calentaron previamente a 100ºC durante 2 min y se realizó la electroforesis durante 2-3 h a 25 mA en tampón de electroforesis (25 mM Tris base pH 8,6, 192 mM Glicina, 0,1% SDS).

Las proteínas ya separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad) en cubeta húmeda durante 3 h a 250 mA en tampón de transferencia (25 mM Tris base pH 8,6, 192 mM glicina y 20% Metanol). Los filtros con las proteínas transferidas se cortaron en tiras y se procedió a la inmunodetección. Para ello, las tiras se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS, 2% de leche desnatada Molico, 0,05% de Tween-20, 4% de extracto *E. coli*, 0,3% de suero de conejo) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron 1 h los Acs diluídos 1/200 en tampón de bloqueo. Se lavaron por inmersión en H_2O tres veces 5 min y se incubaron con Acs de conejo anti-Igs de ratón conjugados con peroxidasa durante 30 min. Tras los últimos

lavados, se procedió al revelado utilizando el kit comercial ECL de bioluminiscencia (Amersham, Arlington Heights, IL).

3.9.3. Microensayo de neutralización de VSHV. Para realizar este ensayo, se incubaron durante toda la noche a 4ºC 10^3 $DICT_{50}$/ml de VSHV 07.71 con diluciones seriadas de los sueros de trucha en placas Costar de 96 pocillos (200 µl/pocillo) (Lorenzo, Estepa y Coll, 1996). Al día siguiente, se añadieron 100 µl de las diferentes mezclas de dilución de sueros/virus a cultivos de células EPC en placas de 96 pocillos y se mantuvieron en adsorción durante 2 h a 14ºC con agitación suave cada 15 min. Después de retirar la mezcla, las células se lavaron suavemente para evitar que se levantara el tapiz, con medio RPMI-1640 modificado por Dutch con 2% de suero fetal bovino, se añadió 100 µl/pocillo de medio de cultivo celular fresco y se incubaron las placas durante toda la noche a 14ºC. Las monocapas de EPC infectadas se fijaron con metanol frío (100 µl/pocillo) durante 10 min. A continuación, se realizó el inmunoensayo. Para ello, las células fijadas se incubaron con el AcMo 2C9 (Sanz y Coll, 1992a; Sanz y Coll, 1992c) que reconoce la nucleoproteína N del VSHV (proteína mayoritaria del virus) diluído (1/200) en tampón de dilucion de ELISA durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar con H_2O desionizada, se incubaron con 100 µL de Acs de conejo anti-Igs de ratón conjugados con peroxidasa (Sigma) durante 30 min. Después de tres lavados, las placas se revelaron añadiendo 100 µl/pocillo de diaminobenzidina (DAB, Sigma) conservada a -70 ºC recién disuelta en 10 ml PBS pH 6,5; 8 mg DAB y 10 µl H_2O_2 (Panreac). Se dejó proceder la reacción hasta que se detectaron focos de color marrón (desde pocos minutos a 1 h) al microscopio invertido. Una vez lavada y secada la placa, los focos marrones (positivos a DAB) se contaron con un microscopio invertido provisto de un ocular 10x con cuadrícula. Los resultados se expresaron según la fórmula: número de focos positivos en presencia de Ac/número de focos en ausencia de Ac x100. El título de neutralización se definió como la inversa de la última dilución en la que se observan el número focos que se obtienen en los controles sin virus (1-2 por pocillo).

3.10. RESPUESTA INMUNE CELULAR.

3.10.1. Obtención y cultivo de leucocitos de riñón de trucha. Los leucocitos de riñón de trucha se obtuvieron según métodos descritos con anterioridad (Estepa, 1992; Estepa, Thiry y Coll, 1994). Brevemente, los cultivos de leucocitos se prepararon a partir de riñón anterior (Estepa y Coll, 1992b) de truchas individuales para evitar posibles reacciones inmunológicas cruzadas entre los leucocitos de distintos individuos (Stet y Egberts, 1991). La concentración celular y el medio de cultivo celular empleado se seleccionaron para una linfoproliferación óptima después de varios ensayos. El número de leucocitos se determinó con un hemocitómetro y se ajustó a una concentración de células redondeadas y viables de $2{,}4x10^4$ células/ml. El medio de cultivo celular utilizado fue el RPMI-1640 modificado por Dutch con 20 mM Hepes (290 mOsm/Kg), (Flow) con 10% de suero fetal bovino descomplementado (SFB, Seralab) y suplementado con 2 mM de glutamina (Flow), 1 mM de piruvato sódico (Flow), 50 µg/ml de gentamicina (Flow), 2 µg/ml de anfotericina (Flow), 50 µM ß-mercaptoetanol y 3% de una mezcla de sueros de trucha preensayada descomplementada (Estepa y Coll, 1992b; Estepa, Frías y Coll, 1993). Después de preparar las suspensiones de leucocitos, se pipetearon 100 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos (Costar) ya pipeteada con los inmunógenos adecuados (10 µl/pocillo). Las placas se sellaron en bolsas de plástico de 20x12 cm, se gasearon con 5% de CO_2 en aire y se incubaron a 20ºC durante 10 días (Estepa y Coll, 1992b).

3.10.2. Ensayos de proliferación. Después de ocho días de cultivo, las placas se pulsaron con 1 µCi de metil-timidina tritiada (60 µCi/mmol, Amersham, Madrid, España) en 25 µl de medio de cultivo por pocillo (Estepa, 1992). Dos días después, las células se recolectaron con agua destilada sobre filtros de fibra de vidrio (Printed Filtermat A, 1450-421, Wallac-Pharmacia) con un Tomtec Cell Harvester de 96 pocillos (Tomtec, Orange, Connecticut, USA). Los filtros se secaron, se introdujeron en bolsas con líquido de centelleo, (Optiphase Hisafe II) y se contaron en un contador de centelleo líquido 1450 Microbeta (Wallac, Oy, Turku, Finlandia & Pharmacia Ibérica S.A.) (Estepa, Thiry, yColl, 1994). Se utilizó como control positivo, la estimulación

obtenida con 2 µg/pocillo de fitohemaglutinina (PHA) (Flow). La incorporación de fondo se obtuvo en cultivos control que no contenían inmunógenos. El índice de estimulación (IE) se calculó por la fórmula, cuentas por minuto (cpm) incorporadas en presencia del inmunógeno/fondo, después de restar el fondo a cada dato.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS.

4.1.1. Subclonaje del gen G de VSHV en el plásmido pcDNAI/Amp. El plásmido G-pcDNAI (Dr. Michel Brémont, INRA, Francia) que contiene el gen de la glicoproteína G de VSHV se transfirió al plásmido pcDNAI/Amp.

De la digestión del G-pcDNAI se obtuvo una banda de 1,5 Kb (Figura 7A) correspondiente al gen G de VSHV. Después de purificar tanto la banda de la G como la del plásmido abierto pcDNAI/Amp (Figura 7B), se transformaron bacterias *E. coli* (Top10F' y DH5α) con mezclas de su ligamiento y se seleccionaron varios clones para extraer el DNA, digerir y comprobar cuales poseían el inserto G. Aunque la digestión con *Eco*RI y *Xho*I fue parcial (Figura 7C) se observaron bandas de 1,5Kb, correspondientes al tamaño esperado para el inserto en 6 de los clones (todos ellos con bacterias Top10F') y ausentes de los clones transformados con pcDNAI/Amp. Se eligió el clon 3, por poseer una banda más intensa y se denominó G3-pcDNAI/Amp (Figura 7C, banda7).

Con objeto de caracterizar el inserto recombinante se diseñó una reacción de PCR mediante dos parejas de oligonucleótidos que amplificaban dos fragmentos solapados del gen de la proteína G. Se hizo PCR de la construcción obtenida de las bacterias transformadas (G3-pcDNAI/Amp), de la construcción de partida (G-pcDNAI), del pcDNAI/Amp y se incluyó un control sin plásmido. Después de los ciclos de amplificación, los productos en un gel de agarosa demostraron que se obtenían los fragmentos esperados (Figura 8). Confirmando estos datos, la secuencia de nucleótidos de la G en la construcción generada, G3-pcDNAI/Amp, en ambas direcciones coincidía (datos no mostrados) con la secuencia publicada de la G de VSHV (Thiry *et al*., 1991b). Por lo tanto, la construcción G3-pcDNAI/Amp contiene el gen G del VSHV. Se cultivó la cepa en LB-Ampicilina y se guardó en 20% de glicerol a –70ºC y ha sido la cepa a partir de la cual se ha producido el plásmido en cantidad para los experimentos de vacunación DNA por inmersión.

Figura 7. Digestión preparativa (A), purificación del gen G y del vector pcDNAI/Amp para el subclonaje (B) y selección de clones positivos después del subclonaje del gen G en el vector pcDNAI/Amp y transformación de *E. coli* Top10F' y DH5α (C). **A**, Se realizó una digestión con las enzimas *Eco*RI y *Xho*I a partir de la construcción G-pcDNAI y del vector comercial pcDNAI/Amp. Se separaron las muestras sobre gel de agarosa. **1**, Marcador III (Böeringher-Manheim); **2**, pcDNAI/Amp digerido *EcoR*I/*Xho*I; **3**, G-pcDNAI digerido *EcoR*I/*Xho*I); **4**, Marcador VI (Böeringher-Manheim). **B,** Los productos de la digestión se purificaron mediante el kit comercial Prep-A-gen (Biorad). **1**, banda de 1,5 kb (G); **2**, banda de 4 Kb (pcDNAI); **3**, banda de 4,8 Kb (pcDNAI/Amp); **4**, Marcador III. **C,** Se extrajo el DNA plasmídico de 2 ml de cultivo de colonias de bacterias transformadas con la mezcla de ligación (pcDNAI/Amp + inserto G). Se realizó digestión con *Eco*RI y *Xho*I y se separaron las muestras en gel de agarosa. 2 a 11, transformación en *E. coli* Top10F'. 12 a 14, transformación en *E. coli* DH5α. **1**, Marcador III; **2**, pcDNAI/Amp comercial, sin digerir; **3**, Top10F'; **4**, Top10F'+ pcDNAI/Amp; **5** a **11**, Top10F' +GpcDNAI/Amp ; **12**, DH5α; **13** y **14**, DH5α+GpcDNAI/Amp; **15**, Marcador III; **16**, Marcador VI. Se indican a ambos lados de las fotografías los tamaños de las bandas, en Kb (marcadores, en la derecha y bandas significativas, en la izquierda).

Figura 8. Amplificación por PCR de fragmentos del inserto G3 del recombinante G3-pcDNAI/Amp. Se realizó una PCR con dos parejas de oligonucleótidos (#59-#60 y #61-#62) que amplificaban dos fragmentos del gen de la G clonado en el vector pcDNAI/Amp. Se aplicaron 30 ciclos de 1 min a 95ºC, 1 min a 55ºC y 2 min a 72ºC, sobre una volumen total de 100 µl de reacción. Se hicieron migrar 10 µl en un gel de agarosa al 1%. 1 a 4, PCR con los oligonucleótidos #59-#60. **1**, control de reacción sin DNA; **2**, G-pcDNAI; **3**, G3-pcDNAI/Amp; **4**, pcDNAI/Amp. 5 a 8, PCR con los oligonucleótidos #61-#62. **5**, control de reacción sin DNA; **6**, G-pcDNAI; **7**, G3-pcDNAI/Amp; **8**, pcDNAI/Amp. **9**, Marcador VI (Böeringher-Manheim). **10**, Marcador III (Böeringher-Manheim). nt, nucleótidos.

4.1.2. Producción de *E.coli*(G3-pcDNAI/Amp) en cantidad. Con objeto de producir grandes cantidades de *E.coli*(G3-pcDNAI/Amp) se llevó a cabo una fermentación en 17 l. Después de los estudios de optimización del medio en pequeña escala se eligió el medio JLB porque favoreció el crecimento bacteriano y se llegaba antes a la saturación del cultivo, de manera que se podía reducir el tiempo de incubación para un mismo rendimiento, con un menor gasto. Así, la A_{600nm} de las bacterias recombinantes incubadas durante 16 h en medio JLB fue 3-4 veces mayor que la de las mismas bacterias incubadas durante ese tiempo en medio LB.

El cultivo de grandes cantidades de bacterias en un fermentador de velocidad de agitación controlada en función de la presión parcial de oxígeno parece un sistema apropiado de producción de G3-pcDNAI/Amp a gran escala, en poco tiempo y con poco gasto (17 l de medio de cultivo y 8 a 10 horas). En sólo 8 h de incubación desde la adición del incólulo bacteriano al fermentador se alcanzó la saturación del cultivo, con una recuperación de 10-20 g de pasta húmeda bacteriana por litro.

En los primeros experimentos de purificación del plásmido a partir de pasta de bacterias, con el sistema comercial Wizard (Promega Corp, Madison, WI, USA), basado en el protocolo de lisis alcalina, se obtuvieron cantidades de G3-pcDNAI/Amp de 32% de pureza con un rendimiento de 7 µg por g de pasta de *E.coli*(G3-pcDNAI/Amp) (Tabla 4). Cuando se realizó la extracción de G3-pcDNAI/Amp a partir de pasta de bacterias pasadas previamente por una prensa de French se obtuvo un rendimiento menor (datos no mostrados).

Para optimizar tanto la pureza como el rendimiento se realizó un estudio comparativo de estos parámetros en función de las diferentes cantidades de partida de la pasta de *E.coli*(G3-pcDNAI/Amp) (Figura 9, Tabla 4). Se hicieron extracciones a partir de 1,25, 2,5 y 5 g de pasta de bacterias por cada 30 ml de volumen inicial de soluciones I, II y III (ver materiales y métodos). Para 5 g de pasta de bacterias el rendimiento obtenido fue entre 7-56 µg de G3-pcDNAI/Amp por gramo de pasta y una pureza entre 7-32 %. Para 2,5 g el rendimiento de G3-pcDNAI/Amp fue de 112 a 115 µg/g de pasta y una pureza de 11,8 a 17,5%. Cuando se disminuyó a 1,25 g aunque

aumentaron en una pequeña proporción tanto el rendimiento a 129 µg/g como la pureza al 22%, las cantidades absolutas de plásmido por cada preparación eran demasiado pequeñas (de 1,93 mg frente a 3,45 mg). Para aumentar la pureza del G3-pcDNAI/Amp extraído se estudió la conveniencia o no de su repurificación en una segunda extracción por medio de lisis alcalina. Se demostró un aumento en la pureza del 11,8 al 32% y de un 17,5% al 40% en 2 experimentos diferentes sin una pérdida significativa de rendimiento en las cantidades obtenidas de G3-pcDNAI/Amp (112 a 110 µg/g y 115 a 110 µg/g, respectivamente) (Figura 9), por lo que se adoptó 2,5 g de pasta de bacterias por 30 ml de soluciones iniciales como cantidad óptima para iniciar el procedimiento de extracción y el procedimiento de repurificación para los protocolos de trabajo de obtención en gran cantidad de G3-pcDNAI/Amp. Asímismo, se adoptó este procedimiento de purificación para obtener cualquiera de los otros plásmidos utilizados en este trabajo.

Según datos bibliográficos, del rendimiento en la producción de plásmido en función de su tamaño y del número de copias por bacteria, se esperaba un rendimiento de aproximadamente 1 µg/ml de cultivo, y según otros datos hasta 2-5 µg/ml (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989) frente a los 0,6-0,7 µg/ml que se obtuvieron.

Este procedimiento de extracción de plásmidos se adoptó también para obtener el resto de los plásmidos con los que se trabajó, después de su transferencia a *E. coli* y a partir de sedimento de cultivos de las bacterias *E.coli* resultantes. En alguno de los casos se llegaron a obtener valores de pureza del 90-100%, en el plásmido purificado mediante los procedimientos descritos.

Tabla 4.

Cantidad, rendimiento y pureza en la producción de G3-pcDNAI/Amp a gran escala.

	Bacteria,	Cantidad DNA obtenido, mg[b]		Rendimiento, µg/g bacterias		Pureza, %[d]
Ext	g/30 ml[a]	G3-pcDNAI/Amp[c]	DNA total[c]	G3-pcDNAI/Amp	DNA total	
A	5	0,035	0,110	7	22	32
B	5	0,560	5	56	500	14,7
C	5	1,12	16	56	800	7
D	2.5	1,12	9,5	112	950	11,8
D'	**2.5**	**1,10**	**3,4**	**110**	**340**	**32**
E	2.5	3,45	19,7	115	657	17,5
E'	**2.5**	**3,31**	**8,25**	**110**	**275**	**40**
F	1.25	1,93	8,68	129	580	22

A, protocolo completo con paso final de resina Wizard (Promega). **B, C, D, E, F**, sin paso final de resina. **D'** y **E'**, repurificación. Se ha partido de la misma pasta de bacterias recombinantes cultivadas en un fermentador de 17 l. Ext, número de extración. [a], Los datos del volumen inicial se refieren a las soluciones I, II y III del protocolo de lisis alcalina (Promega). [b], Cantidad de DNA obtenido después de un protocolo de extracción.[c], El G3-pcDNAI/Amp se estimó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y el DNA total (bacteriano contaminante) se estimó por absorbancia a 260 nm (A_{260nm}). [d], La pureza se calculó según la siguiente fórmula, G3-pcDNAI/Amp / DNA total x 100. En negritas, los procedimientos seleccionados.

Figura 9. Resultados del estudio del rendimiento en la producción de plásmido G3-pcDNAI/Amp a partir de pasta de bacterias. Se extrajo el G3-pcDNAI/Amp de pasta de bacterias *E. coli* recombinantes con la construcción G3-pcDNAI/Amp por un método de lisis alcalina. **Lis**, extracción a partir de pasta de bacterias. **Rep**, repurificación. En abcisas se indica la cantidad de bacterias utilizadas por 30 ml de las soluciones usadas en la extracción. ☐ , Rendimiento expresado en µg de G3-pcDNAI/Amp por g de pasta de bacterias. ⊠ , Pureza : G3-pcDNAI/Amp /DNA total x 100.

4.2. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EPC *IN VITRO*.

Se realizaron experimentos de transfección utilizando células EPC de carpa, como modelo para estudiar las variables que afectan a la entrada de plásmidos en células de pez, la dependencia de la concentración de plásmido, tiempo de exposición, distintos agentes de transfección, etc. El uso de pCMVß conteniendo el gen de la β-Galactosidasa (βgal) y de un sustrato quimioluminiscente para la detección facilitó la cuantificación y estudio de los resultados.

Solamente se alcanzaron actividades βgal que correspondían a cantidades iguales o superiores a 10 ng de βgal/pocillo (10^8-10^9 cpm/5x10^5 células) con fugene y lipofectamina (Figura 10). Dichas cantidades de βgal por pocillo fueron similares a las obtenidas por transfección de células de mamífero (Nussbaum, Broder y Berger, 1994). Con tfx1, tfx6 o lipofectina, se obtuvieron actividades correspondientes a ~1 ng de βgal/pocillo. Las menores actividades de βgal correspondieron a las obtenidas con tfx3, electroporación y DOTAP (0,01 ng de βgal/pocillo). El fondo de βgal obtenido en presencia de reactivos de transfección pero en ausencia de pCMVβ fue de 0,01-0,1 pg de βgal/pocillo que correspondían al límite de detección de βgal descrito por el fabricante. Las cantidades de βgal detectadas en presencia de pCMVβ pero en ausencia de reactivo de transfección fueron similares a los valores fondo (Figura 10).

Se prefirió el fugene a la lipofectamina, dado que la expresión de βgal no se vio afectada por la presencia del 2-10% de suero en el medio de cultivo (resultados no mostrados). Además, el uso del fugene fue más simple que otros reactivos de transfección ensayados. Por ello, los experimentos que siguieron se realizaron con fugene como reactivo de transfección.

Seguidamente se refieren los resultados más importantes obtenidos con el método seleccionado. La βgal mostró una actividad óptima cuando se transfectaron las células EPC con una relación de concentración pCMVβ/fugene de 0,4/1 (μg de pCMVβ/μl de fugene), disminuyendo cuando se usaron relaciones mayores (Figura 11A, n=9). La mayor expresión de βgal a lo largo de los diferentes experimentos varió entre 0,1 y 10 ng/pocillo, probablemente

debido a la dificultad de reproducir la edad de las monocapas de EPC. La actividad βgal fue óptima a 2-3 μg de pCMVβ por pocillo (500 μl de medio con ~$5x10^5$ células por pocillo). Concentraciones superiores e inferiores de pCMVβ mostraron una disminución de la cantidad de βgal detectada, hasta niveles próximos al fondo (Figura 11B).

La cantidad de βgal fue óptima cuando la temperatura post-transfección se mantuvo entre 20 y 30ºC, mientras que decayó 1.000-10.000 veces cuando se mantuvo a 37ºC durante las primeras 4 horas (Figura 12), debido probablemente a la baja viabilidad de las células EPC bajo estas condiciones de temperatura. La cantidad de βgal fue aproximadamente 20 veces menor cuando se usó un plásmido de mayor tamaño que el pCMVß (7,2 Kb), tal como el pcDNAlacZ (8,6 Kb) (resultados no mostrados y Figura 13). Cuando se introdujeron cortes en el pCMVβ debido a sucesivos ciclos de congelación y descongelación (como se mostró por electroforesis en gel de agarosa), la cantidad de βgal detectada en las EPC transfectadas disminuyó de 1 a 0,001 ng/poc (10^7 cpm a 10^4 cpm/$5x10^5$ células). La cantidad de βgal detectada bajó 100 a 1.000 veces cuando la transfección con pCMVβ (promotor CMV) se realizó simultáneamente con pGINT7β (promotor T7) o con GFP-$pQBI_{25}$ (promotor CMV) (Figura 13).

La Figura 14 muestra el aspecto de las células transfectadas con GFP-$pQBI_{25}$ y el rango de concentraciones célulares en el que la cantidad de células transfectadas fue proporcional al número de células plaqueadas y transfectadas.

Para estimar la expresión de G mediante transfección de G3-pcDNAI/Amp en células EPC, se detectó la proteína expresada mediante tinción con el anticuerpo monoclonal (AcMo) neutralizante antiG de VSHV 3F1A12 (Dr. Niels Lorenzen) y FACS. Se observa un desplazamiento en la intensidad de fluorescencia de las células con respecto al pico de intensidad de las células transfectadas en ausencia de G3-pcDNAI/Amp, lo que indica un reconocimiento de la proteína expresada en ellas, por el AcMo, es decir, expresión de G en las células en presencia de transfectante y de la construcción G3-pcDNAI/Amp.

Figura 10. Cantidad de βgal detectada en células EPC después de su transfección con pCMVβ y varios reactivos de transfección. Se transfectaron $5x10^5$ cél/poc de placa de 24 pocillos con 5 μg de pCMVβ por ml después de mezclarlo con un reactivo de transfección en 25 μl de medio. Se añadieron las mezclas pCMVβ /transfectante a 500 μl de células EPC en medio de cultivo, a 20ºC durante 2 horas. Después de 48 horas a 20ºC se estudió la actividad βgal. Para lipofectamina, perfect kit (pfx) 1, 3 y 6 y DOTAP, las 2 horas de transfección y las primeras 24 horas de incubación se realizaron ambas en ausencia de suero. Se usó cada reactivo de transfección a 2 o más concentraciones diferentes y se representó la concentración correspondiente a la mayor actividad obtenida. Se representan medias y desviaciones estándar de los duplicados. **A,** pCMVβ. **B,** pCMVβ + 6 μl/ml de fugene. **C,** pCMVβ + 10 μl/ml de lipofectamina. **D,** pCMVβ + 20 μl/ml de lipofectina. **E**, pCMVβ + 6 μl/ml de tfx1. **F**, pCMVβ + 6 μl/ml de tfx3. **G**, pCMVβ + 6 μl/ml de tfx6. **H**, pCMVβ + electroporación. **I**, pCMVβ + 30 μl/ml de DOTAP. Barras vacías, reactivos de transfección sin pCMVβ.

Figura 11. Efecto de la relación plásmido/fugene (A) y de la concentración de pCMVβ (B) en la cantidad de βgal detectada en células EPC transfectadas. Se hicieron crecer células EPC en 500 µl de medio/poc en placas de 24 pocillos hasta $5x10^5$ células/poc. Se mezcló el pCMVβ con fugene en 25 µl de RPMI-1640 y después de 15 min se añadieron las mezclas a las células. Después de 48 horas a 20ºC se ensayó la actividad βgal. Símbolos diferentes corresponden a diferentes experimentos. **A,** Resultados obtenidos usando 3 µg de pCMVβ /pocillo y diferentes concentraciones de fugene. **B,** Resultados obtenidos con 3 µl de fugene por pocillo y diferentes concentraciones de pCMVβ. ----------, curva de ajuste por minimización del cuadrado de las medias por el programa FigP (Biosoft, Cambridge, UK). Se ha trazado en B para facilitar la visibilidad de los resultados.

Figura 12. Efecto de la temperatura durante las primeras horas de transfección de células EPC en la cantidad de βgal detectada. Se transfectaron células EPC con una mezcla de 5 μg/ml de pCMVβ y 6 μl/ml de fugene en 25 μl y se añadieron a 500 μl de medio por pocillo y se incubaron durante 4 h (●) o 6 h (❍) a diferentes temperaturas. Después de 48 h a 20ºC se ensayó la actividad βgal. Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos diferentes, ambos por duplicado. ----------, curva de ajuste por minimización del cuadrado de las medias por el programa FigP (Biosoft).

Figura 13. Efecto de los ciclos de congelación/descongelación de pCMVβ, de la competición de pCMVβ con la adición simultánea de otros plásmidos y del tamaño de los plásmidos, en la cantidad de βgal detectada en células EPC transfectadas. Se utilizó pCMVβ a una concentración final de 5 μg/ml mezclado con 6 μl/ml de fugene y se añadió a los pocillos de placas de 24 pocillos. La cantidad de pcDNAlacZ se ajustó de forma que inducía el mismo nivel de actividad βgal que el pCMVβ por electroporación. , pCMVβ después de 6 ciclos de congelación/descongelación. ■, pCMVβ. □, pCMVβ + GFP-pQBI$_{25}$, , pCMVβ + pGINT7β. , 7 μg/ml de pcDNAlacZ. ----------, valores medios de fondo (←).

Figura 14. Variación de la fluorescencia de GFP con el número de células plaqueadas y transfectadas con GFP-pQBI$_{25}$. Se prepararon placas de 24 pocillos de células EPC con 500 µl de medio. Al día siguiente se añadieron 2,5 µg de GFP-pQBI$_{25}$ por pocillo, mezclados previamente con 3 µl de fugene en 25 µl de RPMI-1640, por pocillo. Después de 48 horas a 20ºC se contó el número de células fluorescentes por pocillo. **A,** Número de células fluorescentes por pocillo a distintas concentraciónes célulares. Unas $6x10^5$ células se corresponden con el 100% de confluencia por pocillo. Se representan las medias y desviaciones estándar. **B,** Aspecto de las células fluorescentes observadas al microscopio de fluorescencia con objetivo x20, 48 horas después de la transfección con el plásmido GFP-pQBI$_{25}$.

Figura 15. Estimación de la expresión de G por citometría de flujo de células EPC transfectadas sin plásmido (———) y transfectadas con G_3-pcDNAI/Amp (———). Se transfectaron células EPC con mezcla de 0,5 µg de G3-pcDNAI/Amp y 10 µl de lipofectina durante 1 o 2 h. Tres días después, se despegaron la células, se tiñeron con el anticuerpo monoclonal neutralizante anti-G de VSHV 3F1A12 (Lorenzen et al, no publicado) y un conjugado fluorescente Fab'2 GAM (Caltag, San Francisco, USA) y se examinaron por FACSscan (Becton-Dickinson, San José, California) a 514-545 nm.

4.3. ENSAYOS *IN VIVO* CON EL PLÁSMIDO GFP-PQBI$_{25}$.

Como modelo experimental a pequeña escala de vacunación DNA por inmersión se ha utilizado el gen GFP codificado en el plásmido GFP-pQBI$_{25}$ y la detección de la fluorescencia de la GFP expresada en truchas de 2 cm inmunoincompetentes. Estos experimentos a pequeña escala suponen una simplificación de los experimentos de vacunación/contraprueba mucho más complejos tanto de realización como de interpretación. El objetivo de esta serie de experimentos fue la validación de su posible valor predictivo sobre los experimentos de vacunación/contraprueba.

4.3.1. Establecimiento de un método de cuantificación de la fluorescencia. La exposición de truchas de 2 cm a GFP-pQBI$_{25}$ en presencia de algunas formulaciones (ver discusión más adelante) inducía la aparición de fluorescencia en sus aletas. En los experimentos preliminares se observaron las características de dicha fluorescencia, se identificaron las estructuras fluorescentes que se observaban al microscopio y se eligieron los criterios para definir las zonas concretas a fotografiar en los ensayos, de forma que se pudiera describir cuantitativamente el fenómeno observado.

Las aletas caudales de las truchas mostraron abundantes manchas fluorescentes más intensas que el fondo, de ~ 10 μm de diámetro cuando se utilizó GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP. Las aletas caudales de truchas inyectadas intramuscularmente con GFP-pQBI$_{25}$ fueron también fluorescentes, mientras que la fluorescencia de las aletas de truchas no inyectadas o no expuestas al plásmido no eran diferentes del fondo.

La fluorescencia detectada se observó primeramente a los 2 días después de la exposición y duró hasta al menos 10 días después de la exposición al GFP-pQBI$_{25}$. Estos resultados se observaron no sólo en aletas caudales, sino en todas las aletas examinadas (ventral, dorsal, etc.). Se seleccionó la aleta caudal para el resto de los estudios ya que se pueden manejar más

fácilmente. Se observaron las aletas caudales a 10x4 aumentos bajo el microscopio invertido y de cada trucha examinada se fotografiaron 3 campos con fluorescencia más intensa.

La apariencia de las aletas caudales al microscopio óptico después de una inmersión en un baño con GFP-pQBI$_{25}$+formulación muestra los cartílagos y abundantes células melanóforas distribuídas por las aletas (Figura 16, A). Cuando se observó el mismo campo con luz azul, los espacios entre los cartílagos aparecen llenos de manchas fluorescentes de ~10 μm. Las manchas fluorescentes se sitúan bajo la capa más superficial de células, en la misma capa en la que se sitúan los melanóforos. Sólo unas pocas células aparecen fluorescentes a la altura o en el interior del cartílago. (Figura 16, B).

Con el fin de hacer una estimación más cuantitativa de la fluorescencia observada, se tomaron más de 10 fotografías de un total de 5 truchas/experimento y se comparó su fluorescencia en las mismas condiciones de fondo y rango. Ninguna de las fotografías fue positiva para fluorescencia en las truchas no expuestas a plásmido o expuestas al G3-pcDNAI/Amp mientras que el 10% y el 56% de las fotografías fueron positivas para fluorescencia en truchas expuestas a 1 y 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$, respectivamente. Sin embargo este método de cuantificación no era capaz de expresar adecuadamente las diferencias observadas en otros casos (datos no mostrados).

Para poder comparar experimentos con varias truchas y experimentos entre sí, fue necesario diseñar un método objetivo para cuantificar la fluorescencia. En primer lugar, se hizo un estudio de la totalidad de *pixels* y de su distribución por fluorescencia (Figura 17) de las fotografías que se muestran en la Figura 16. La Figura 17 muestra que la fluorescencia media en la totalidad de la fotografía es mayor en aquella obtenida de la trucha expuesta a 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ que en el resto de los experimentos. Este método tampoco era capaz de expresar adecuadamente las diferencias observadas en otros casos (datos no mostrados). Se comparó entonces la fluorescencia media por fotografía (Figura 18 A y E), pero se observa poca diferencia entre los grupos. Para describir mejor los resultados obtenidos se pensó por un lado en tener en

cuenta que la fluorescencia de fondo de cada fotografía era un poco diferente entre fotografías y por otro en definir más objetivamente los puntos de fluorescencia que aparecían. Se obtuvieron entonces datos de fluorescencia relativa al fondo de cada fotografía en áreas cuadradas de 13x13 *pixels*, correspondientes a un área de ~9 μm de lado, es decir, aproximadamente de una célula (fluorescencia relativa por célula). Se contaron ~200 células por tres fotografías por trucha y 3 truchas por acuario. En el nuevo método de análisis se muestran las intensidades relativas por célula en valores absolutos (Figura 18 B y F) o expresadas como un índice de fluorescencia relativa dividiendo fluorescencias relativas por célula de cada una de las células de los grupos en presencia de GFP-pQBI$_{25}$ entre la media de las fluorescencias relativas por célula de los grupos control (Figura 18 C y G). Este ha sido el método elegido para mostrar la mayoría de los experimentos realizados ya que describía cuantitativamente el fenómeno de fluorescencia observado en todos los casos. Por último, para cada grupo y a partir de este último parámetro, se pueden contar el número de células fluorescentes con un índice superior al límite de significación del grupo control asumiendo una distribución normal de sus valores (media + 2 desviaciones estándar, $X+2\sigma$); es decir, las células con fluorescencias relativas mayores que los grupos control con un 90% de probabilidad. Para poder comparar fluorescencias entre cada grupo y entre experimentos, el número de células con fluorescencia relativa por célula significativa se puede expresar como porcentaje del número total de células fluorescentes de cada grupo. Este último método permite observar mejor las diferencias entre los grupos, ya que se comparan sólo los valores que pueden considerarse significativamente positivos (Figura 18 D y H).

En la Figura 19 se muestra la apariencia real de las fotografías de un experimento analizado en igualdad de condiciones de fondo y rango (3 truchas por punto experimental, 3 fotografías por trucha y ~30 puntos fluorescentes por fotografía). Se observa que los puntos de luz coinciden con el tamaño de las células y se aprecia de modo visual la diferencia entre los grupos sin apenas fluorescencia: sin plásmido+DOTAP (A) y G3-pcDNAI/Amp+DOTAP (B), y los grupos con fluorescencia: 1 y 10 μg/ml GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP (C y D).

Figura 16. Aletas caudales tal como se observan al microscopio de fluorescencia, con luz visible (A) y con luz azul (B). Se sometieron truchas de 2 cm a ultrasonidos en presencia de 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ y se examinaron 7 días después, observándose en las aletas caudales la emisión de luz verde al ser estimuladas con luz azul. La barra corresponde a una distancia de 10 μm.

Figura 17. Distribución de los niveles de fluorescencia en la totalidad de los *pixels* de la Figura 16B (después de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP). Se tomaron y analizaron las fotografías con el programa CCDOPS vs 1.09 y se superpusieron los histogramas correspondientes a cada fotografía. ....., **A,** DOTAP; -------, **B,** 10 µg/ml de G$_3$-pcDNAI/Amp+DOTAP ; _____, **C,** 1 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP; ▭ , **D,** 10 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP.

Figura 18. Parámetros para el análisis de la fluorescencia. Experimentos de inmersión al plásmido GFP-pQBI$_{25}$ con ultrasonidos (A, B, C, D) y con DOTAP (E, F, G, H). Después de inmersión de grupos de truchas de 2 cm en distintas formulaciones se tomaron 3 fotografías/trucha de cada grupo y se analizaron los 30 valores de mayor intensidad de luz en un cuadrado 13x13 *pixels* (área de ~9μm de lado, área de una célula) por fotografía mediante el programa CCDOPS. **A y E**, Medias de fluorescencia por fotografía. **B y F**, Medias de fluorescencia relativa por célula. **C y G**, Fluorescencia relativa al control por célula = fluorescencia relativa por célula en presencia de agente transfectante / media de las flurescencias relativas de las células de los grupos control. **D y H**, Porcentaje de células con fluorescencia relativa superior a las medias de fluorescencia relativa del control 1,52 y 1,60, respectivamente (X+2σ del control, 90%probabilidad). **Ctrl**, control sin GFP-pQBI$_{25}$; **G3**, control con 10 μg/ml de G3-pcDNAI/Amp ; **GFP 1 μg** , 1 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$; **GFP 10 μg**, 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$. **A, B, C, D** , Inmersión en GFP-pQBI$_{25}$ + ultrasonidos. Se analizaron 38 fotografías, n= 972. **E, F, G, H,** Inmersión en GFP-pQBI$_{25}$DNA+DOTAP. Se analizaron 42 fotografías n= 1224.

Figura 19. Ejemplo de fotografías con fluorescencia producida por GFP en aleta caudal de truchas tratadas con GFP-pQBI$_{25}$ +DOTAP. Se eligieron 3 truchas por grupo de experimentación y se tomaron 3 fotografías por trucha (#1 a #12) de 3 puntos diferentes de la aleta caudal, seleccionando los campos con más intensidad de fluorescencia. Todas las fotografías se tomaron en las mismas condiciones de fondo y rango (CCDOPS). **A,** DOTAP. **B,** 10 µg/ml de G3-pcDNAI/Amp+DOTAP. **C,** 1 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP. **D,** 10 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ +DOTAP. ▬ , 100 µm. #, número asignado a cada trucha.

4.3.2. Experimentos de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$ con ultrasonidos. Se realizaron experimentos de inmersión *in vivo* utilizando ultrasonidos de baja frecuencia como método para facilitar la entrada de GFP-pQBI$_{25}$ en las células.

Los experimentos preliminares se realizaron utilizando un sonicador de aguja, pero para todos los demás se utilizó un baño de ultrasonidos de 40W de 250 ml de capacidad, porque su uso resultaba más estandarizable. Se aplicaron unos tiempos 2 veces inferiores a aquellos a los cuales las truchas comenzaban a mostrar signos deletéreos. Todos los experimentos se realizaron a 10ºC.

Se realizaron una serie de experimentos (n=5) en los que se probaron distintas concentraciones de plásmido GFP-pQBI$_{25}$ entre 0,7 y 10 µg/ml. La Figura 20 muestra un experimento representativo en el que se estudia la variación de la fluorescencia después de aplicar ultrasonidos a varias concentraciónes de GFP-pQBI$_{25}$. La **media** (**x**) y desviación estándar (σ) y el porcentaje de células con fluorescencia relativa >x+2σ (entre paréntesis) fueron de **1,06** ± 0,33 (12,5%) y de **1,75** ± 0,54 (0,54%) para 1 y 10 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$+ultrasonidos, respectivamente. Mientras que se obtuvieron **1,03** ± 0,30 (9,4%) y **0,96** ± 0,20 (0,5%) para las truchas tratadas con ultrasonidos y G3-pcDNAI/Amp+ultrasonidos, respectivamente. Los valores obtenidos para otras concentraciones de plásmido en todos los experimentos fueron de: **0,99** ± 0,42 (8,6 %), **1,06** ± 0,33 (12,5%), **0,82** ± 0,23 (0,7%) y **1,3** ± 0,3 (28,3%), para 0,7, 1 , 2,7 y 10 µg/ml, respectivamente. Por lo tanto, la concentración de GFP-pQBI$_{25}$ óptima para la expresión de GFP fue de 10 µg/ml.

Después se realizó un experimento de seguimiento a los 2, 7, 15 y 21 días después de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$ + ultrasonidos. En este caso, aunque los grupos fueron de 15 truchas, el experimento se hizo en grupos de 5 truchas en las mismas condiciones para cada grupo, para igualar las variables que pudieran introducirse por el volumen de agua, concentración de truchas, distancia al vidrio, etc. Después del tratamiento con ultrasonidos se agruparon las

truchas de cada grupo. En este experimento se utilizaron 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$, concentración que había producido una fluorescencia máxima en los experimentos arriba mencionados. La fluorescencia relativa de las truchas control sin GFP-pQBI$_{25}$ ni ultrasonidos varía entre: **0,98** ± 0,24, **0,89** ± 0,19, **0,90** ± 0,19 y **0,87** ± 0,1, a los 2, 7, 15 y 21 días, respectivamente (Figura 21 A). La fluorescencia relativa de las truchas con GFP-pQBI$_{25}$ varía entre: **1,0** ± 0,27, **1,13** ± 0,2, **1,12** ± 0,38, **0,94** ± 0,16, a los 2, 7, 15 y 21 días, respectivamente (Figura 21 B). La fluorescencia relativa de las truchas control con ultrasonidos varía entre: **1,0** ± 0,24, **1,1** ± 0,29, **1,0** ± 0,19 y **1,12** ± 0,36, a los 2, 7, 15 y 21 días, respectivamente (Figura 21 C). Finalmente, la fluorescencia relativa de las truchas con GFP-pQBI$_{25}$ + ultrasonidos varía entre: **1,37** ± 0,33, **1,16** ± 0,16, **1,47** ± 0,58 y **1,78** ± 0,54 a los 2, 7, 15 y 21 días (Figura 21 D). En los controles A, B y C el porcentaje de células con fluorescencias relativas > X ± 2σ se mantiene de 0,5-10% (media de 4,5%), mientras que asciende a 33-39,2 % en las truchas expuestas a. GFP-pQBI$_{25}$ + ultrasonidos (D). Podríamos resumir estos resultados diciendo que la fluorescencia relativa de las células de aletas caudales de pez inmersos en GFP-pQBI$_{25}$+ultrasonidos aumenta hasta los 2 días y se mantiene posteriormente.

4.3.3. **Experimentos de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP.** La Figura 22 muestra un experimento representativo en el que se estudia la variación de la fluorescencia después de aplicar GFP-pQBI$_{25}$ a varias concentraciones, acomplejado con DOTAP. La **media (x)** y desviación estándar (σ) y el porcentaje de células con fluorescencia relativa >x+2σ (entre paréntesis) fueron de **1,57** ± 0,35 (42,7 %) y de **1,84** ± 0,61 (62,4 %) para 1 y 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$+ultrasonidos, respectivamente, mientras que se obtuvieron **1,1** ± 0,26 (1,8 %) y **0,98** ± 0,34 (3,1 %) para las truchas tratadas con ultrasonidos y G3-pcDNAI/Amp+ultrasonidos, respectivamente.

Se estudió el efecto de los ultrasonidos en la inmersión en GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP, realizando un experimento en condiciones similares a las anteriores (ver apartado anterior). El

análisis de fluorescencias mostraba que no existían diferencias significativas entre los grupos control, sin GFP-pQBI$_{25}$ pero con ultrasonidos: **1,01** ± 0,25 (8,9 %) y con G3-pcDNAI/Amp+ultrasonidos : **0,98** ± 0,17 (1,1 %) y los grupos con GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP+ultrasonidos: **1,14** ± 0,25 (15%) para 1 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ y **1,0** ± 0,21 (2%) para 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ (datos no mostrados).

Después se realizó un experimento de seguimiento a los 2, 4 y 7 días después de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$ + DOTAP. En este experimento se utilizaron 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$, concentración que había producido una fluorescencia máxima en los experimentos de optimización de la concentración arriba mencionados. La fluorescencia relativa de las truchas control G3-pcDNAI/Amp+DOTAP varía entre: **1** ± 0,18 (2,5%), **1** ± 0,36 (2,5%) y **1** ± 0,19 (2,5 %), a los 2, 4 y 7 días, respectivamente (Figura 23 A). La fluorescencia relativa de las truchas con GFP-pQBI$_{25}$ varía entre: **1,18** ± 0,26 (15 %), **1,14** ± 0,46 (2,5 %) y **0,99** ± 0,18 (2,5 %), a los 2, 4 y 7 días, respectivamente (Figura 23 B). La fluorescencia relativa de las truchas con 1 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ + DOTAP varía entre: **1,59** ± 0,44 (63 %), **1,25** ± 0,40 (11%) y **0,97** ± 0,36 (8%), a los 2, 4 y 7 días, respectivamente (Figura 23 C). Finalmente, la fluorescencia relativa de las truchas con 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ + DOTAP varía entre: **1,41** ± 0,41 (40 %), **1,53** ± 0,64 (27 %) y **1,12** ± 0,26 (10 %), a los 2, 4 y 7 días (Figura 23 D). Podríamos resumir estos resultados diciendo que la fluorescencia relativa de las células de aletas caudales de truchas inmersas en GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP aumenta hasta los 2 días y disminuye posteriormente, mientras que con concentraciones mayores la fluorescencia se mantiene hasta los cuatro días.

Figura 20. Fluorescencia en células de la aleta caudal de truchas después de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$ +ultrasonidos: variación de la fluorescencia con varias concentraciones de GFP-pQBI$_{25}$. Expresión de GFP después de inmersión de truchas de 2 cm en baño con GFP-pQBI$_{25}$ y aplicación de pulsos de ultrasonidos (dos previos y dos posteriores a la adición de plásmido). (X + 2σ = media + 2 desviaciones estándar, % de células con fluorescencia relativa >X+2σ del control). ❍, sin GFP-pQBI$_{25}$ + ultrasonidos; ❑, 10 µg/ml de G$_3$-pcDNAI/Amp + ultrasonidos ; ◆, 1 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ + ultrasonidos ; ●, 10 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ + ultrasonidos .

Figura 21. Fluorescencia en células de la aleta caudal de truchas después de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$ + ultrasonidos:variación de la flluorescencia con el tiempo. Grupos de 15 de truchas de 2 cm se sometieron a pulsos de ultrasonidos y se mantuvieron en una solución con 10 µg/ml del plásmido GFP-pQBI$_{25}$ en agua de acuario durante 30 min con aireación. Se fotografiaron al microscopio de fluorescencia a los 2, 7, 15 y 21 días después de la exposición al plásmido, 3 truchas por grupo y por día, 3 fotografías por trucha. **A**, control sin plásmido ni ultrasonidos. **B,** 10 µg/ml de GFP-pQBI$_{25.}$ **C,** ultrasonidos. **D,** 10 µg/ml GFP-pQBI$_{25}$ + ultrasonidos.

Figura 22. Fluorescencia en células de la aleta caudal de truchas después de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$ + DOTAP: variación de la fluorescencia con la concentración de GFP-pQBI$_{25}$. Ctrl, DOTAP. **G3**,.10 µg/ml de G3-pcDNAI/Amp+DOTAP. **GFP 1 µg/ml**, 1 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ +DOTAP. **GFP 10 µg/ml**, 10 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ +DOTAP .

Figura 23. Fluorescencia en células de la aleta caudal de truchas después de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$ + DOTAP:Variación de la fluorescencia con el tiempo. **A,** 10 μg/ml de G3-pcDNAI/Amp+DOTAP. **B,** 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$. **C,** 1 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP. **D,** 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ +DOTAP.

4.3.4. Experimentos de inmersión en *E. coli* (GFP-pQBI$_{25}$). Para el estudio de inmersión en bacterias transformadas con el plásmido (bactofección) se analizaron varios experimentos en los que se mantuvieron inmersas durante 30 min con aireación, grupos de truchas de 2 cm en distintas concentraciones de bacterias *E. coli* (GFP-pQBI$_{25}$) y se estudió la fluorescencia relativa en células de aleta caudal (Figura 24). Las concentraciones analizadas fueron 1, 10 y 50 mg/ml de pasta de bacterias obtenidas por centrifugación a partir de un cultivo de las bacterias transformadas. Estas cantidades de bacterias incluían, según los resultados obtenidos en la extracción de plásmidos a partir de ellas por lisis alcalina, 1,7, 17 y 85 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$. Se observó una mortalidad elevada (65% y 60%) cuando la concentración de bacterias era de 10 y 50 mg/ml, respectivamente frente al 0-10% del resto de los grupos. Asímismo, se observó una influencia del estado de las truchas en la fluorescencia relativa de sus células; en truchas de aspecto enfermo los valores obtenidos en los experimentos disminuyeron.

La Figura 24 muestra un experimento representativo en el que se estudia la variación de la fluorescencia después de inmersión en *E.coli*(GFP-pQBI$_{25}$) a varias concentraciones. La **media (x)** y desviación estándar (σ) y el porcentaje de células con fluorescencia relativa >x+2σ (entre paréntesis) fueron de **1,27** ± 0,45 (24,5 %), de **1,42** ± 0,45 (25,7 %) y de **1,05** ± 0,35 (12,2 %) para 1, 10 y 50 mg/ml de *E.coli*(GFP-pQBI$_{25}$), respectivamente. En un experimento independiente se obtuvieron fluorescencias de **1,27** ± 0,34 (23,4 %) para 10 mg/ml de *E.coli*(GFP-pQBI$_{25}$), mientras que se obtuvieron **1** ± 0,32 (1,75 %) y **1** ± 0,25 (4,31 %) para las truchas tratadas con *E.coli*() y *E.coli*(G3-pcDNAI/Amp), respectivamente.

Se estudió después la combinación de métodos de inmersión aplicando ultrasonidos a truchas inmersas en bacterias, pero no pudo demostrarse una mejora de los resultados de expresión de GFP. Se obtuvieron **1,27** ± 0,45 (24,4 %) y **1,42** ± 0,45 (25,7 %) sin ultrasonidos en presencia de 1 y 10 mg/ml de *E.coli*(GFP-pQBI$_{25}$), respectivamente y al aplicar ultrasonidos

1,43 ± 0,51 (30 %) y **1,33**±0,37 (28,6%), en presencia de 1 y 10 mg/ml de *E.coli*(GFP-pQBI$_{25}$), respectivamente.

Después se realizó un experimento de seguimiento a los 2 y 7 días después de inmersión en *E.coli*(GFP-pQBI$_{25}$). La fluorescencia relativa de las truchas control *E.coli*()(A) y *E.coli*(G3-pcDNAI/Amp) varía entre**: 1** ± 0,32 (3,52%) y **1** ± 0,44 (3,6%) a los 2 y 7 días, respectivamente (Figura 25 A y C). La fluorescencia relativa de las truchas con 1 mg/ml de *E.coli*(GFP-pQBI$_{25}$) varía entre: **1,27** ± 0,45 (23,7 %) y **1,92** ± 0,9 (40,5 %) a los 2 y 7 días, respectivamente (Figura 25 B). La fluorescencia relativa de las truchas con 10 mg/ml de *E.coli*(GFP-pQBI$_{25}$) varía entre: **1,42** ± 0,45 (26,4 %) y **1,86** ± 0,79 (40,2%) a los 2 y 7 días, respectivamente (Figura 25 D). Podríamos resumir estos resultados diciendo que la fluorescencia relativa de las células de aletas caudales de truchas inmersas en *E.coli*(GFP-pQBI$_{25}$) aumenta desde los 2 días pero la mortalidad de las truchas expuestas hace difícil seguir durnate más tiempo la evolución de las fluorescencias.

4.3.5. Experimentos de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$+otros reactivos. Se estudió la fluorescencia relativa en las células de trucha después de inmersión en un sistema de GFP-pQBI$_{25}$ +copolímero. Se utilizó el copolímero VMAA-VP (poli-dimetilacrilamida-co-vinilpirrolidona) (Dr. Gallardo, CSIC, Madrid). Se realizaron dos experimentos por duplicado en condiciones similares y se calculó la media de los resultados. No se encontró diferencia entre truchas inmersas en GFP-pQBI$_{25}$ (13,5% de células significativamente por encima del grupo control) y truchas inmersas en GFP-pQBI$_{25}$D+copolímero (11,8% de células positivas). En los dos casos la fluorescencia fue mayor que los controles (2,9 y 3,3% de células positivas) (Figura 26). Experimentos realizados en cultivo celular (EPC y linfocitos), utilizando plásmidos con βgal como gen marcador y polímeros de la misma naturaleza catiónica, como el Chitosan o la polivinilpirrolidona (PVP), fueron ineficaces en la expresión del gen βgal (datos no mostrados). Estos polímeros, en especial el Chitosan a las concentraciones utilizadas, mostraron toxicidad en

las células observable al microscopio óptico (no mostrado), lo que podría explicar la baja expresión del gen.

También se eligió el fugene como reactivo de transfección para realizar experimentos de inmersión *in vivo* con truchas de 2 cm y GFP-pQBI$_{25,}$ debido a los buenos resultados que se obtuvieron con este agente en los experimentos *in vitro* en cultivo celular en EPC, referidos con anterioridad. Se utilizó para la preparación el mismo protocolo que en los experimentos con EPC, mezclando previamente y por separado el fugene en RPMI y añadiéndolo **después** sobre el GFP-pQBI$_{25}$ y manteniéndo esta mezcla 30 minutos a temperatura ambiente antes de añadirla al baño de inmersión. Se empleó el fugene a una concentración final de 6 µl/ml y el GFP-pQBI$_{25}$ a 1 y 10 µg/ml. La duración de la inmersión en la mezcla de transfección fue de 1 h con aireación. Se utilizaron en este caso recipientes de poliestireno, por indicación del fabricante del producto. Después de 1 día, la fluorescencia relativa en el grupo con GFP-pQBI$_{25}$ fue de **1,51** ± 0,24 (Figura 27 B) frente a **1,37** ± 0,18 con 1 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$+fugene (Figura 27C) y a **1,45**±0,45 con 10 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$+fugene (Figura 27D). Después de 4 días, en ninguno de los grupos se observó una media de fluorescencia relativa significativamente superior al **1**±0,35 del G3-pcDNAI/Amp+fugene (**1,27**±0,34 con GFP-pQBI$_{25}$, **1,21**±0,34 con 1 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$+fugene y **1,15**±0,3 con 10 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$+fugene). Los porcentajes de células fluorescentes significativas oscilaron entre 6,1 y 8,9%, en todos los casos.

Figura 24. Fluorescencia en células de la aleta caudal de truchas después de inmersión en *E. coli* (GFP-pQBI$_{25}$):Variación de la fluorescencia con la concentración. Se representan todos los puntos estudiados (n) en dos experimentos distintos. **A,** Grupos *E. coli* () y *E. coli* (G3-pcDNAI/Amp); **B,** 1 g/l (1,7 µg/ml de plásmido), 10 g/l (17 µg/ml de plásmido) y 50 g/l (85 µg/ml de plásmido) de *E.coli*(GFP-pQBI$_{25}$).

Figura 25. Fluorescencia en células de la aleta caudal de truchas después de inmersión en *E. coli* (GFP-pQBI$_{25}$):Variación de la fluorescencia con el tiempo. Fluorescencia después de inmersión durante 30 min de grupos de 10 truchas en una suspensión de bacterias *E. coli*(GFP-pQBI$_{25}$). **A,** *E. coli.* **C,** *E. coli*(G3-pcDNAI/Amp). **B,** 1 g/l de *E. coli*(GFP-pQBI$_{25}$) con 1,7 μg/ml de plásmido. **D,** 10 g/l de *E.coli*(GFP-pQBI$_{25}$) con 17 μg/ml de plásmido.

Figura 26. Fluorescencia en células de la aleta caudal de truchas después de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$ +polímero Se mantuvieron grupos de 5 truchas de 2 cm durante 30 min en un baño al que se añadió un liofilizado del copolímero catiónico DMAA-VP (Dr. Gallardo, CSIC, Madrid, España) y el plásmido GFP-pQBI$_{25}$. Se representan los datos de dos experimentos realizados en condiciones similares con diferentes lotes de truchas. **Ctrl**, control sin plásmido ni copolímero. **Pol**, 0,15 mg/ml de DMAA-VP, **DNA**, 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$. **DNA-pol**, 10 μg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ +0,15 mg/ml de DMAA-VP.

Figura 27. Fluorescencia en células de la aleta caudal de truchas después de inmersión en GFP-pQBI$_{25}$ + fugene. Fluorescencia después de inmersión de truchas en una mezcla plásmidos y fugene. **A,** 10 µg/ml de G3-pcDNAI/Amp + 6 µL de fugene. **B,** 10 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$. **C,** 1 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$+ 6 µL de fugene. **D,** 10 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$ +6 µL de fugene.

4.4. ENSAYOS DE VACUNACIÓN/CONTRAPRUEBA.

Estos ensayos se realizaron utilizando los métodos que dieron mejores resultados en los ensayos a pequeña escala con truchas de 2 cm, es decir con ultrasonidos, DOTAP y bactofección. Se realizaron con truchas inmunocompetentes (5-7 cm) y vacunación con el plásmido G3-pcDNAI/Amp, que contiene el gen G de la glicoproteína del VSHV. La transferencia y expresión del gen G a las truchas inmunocompetentes permitiría la realización de contrapruebas de exposición al VSHV. Sólo las truchas que hubieran captado y expresado el gen vírico, se habrían inmunizado con él y por lo tanto serían capaces de resistir la contraprueba con VSHV. Estos experimentos también han servido para, de manera retrospectiva, evaluar el valor predictivo, tanto de los ensayos a pequeña escala, como de los datos de la respuesta inmune de las truchas vacunadas.

4.4.1. Estudio de la respuesta inmune después de inyección de VSHV o de proteína G recombinante.

Previamente a los ensayos de vacunación/contraprueba *in vivo* se realizó un estudio de la respuesta inmune humoral (anticuerpos) de truchas inmunocompetentes para poder interpretar los resultados de ELISA y neutralización en las truchas que se vacunaran con plásmidos con el gen de la proteína G (vacunación DNA). Debido a que no existe todavía un método para evaluar el estado de inmunización de las truchas, para la valoración de la respuesta de anticuerpos realizamos primero una evaluación de la utilización de dos fragmentos recombinantes de la proteína G de VSHV (la proteína G4 y el fragmento #11 o frg#11). Se evaluaron tanto su capacidad antigénica para detectar anticuerpos por ELISA en sueros de trucha inmunizadas con G4 o con VSHV, como su capacidad inmunogénica, para inducir la producción de anticuerpos (anticuerpos anti-VSHV detectables por ELISA o anticuerpos neutralizantes del VSHV). El estudio ayudó a la comprensión de la respuesta inmune frente al VSHV en trucha, así como a la interpretación de los resultados de respuesta inmune después de vacunación DNA por inmersión

con el gen G de VSHV. Hay que tener en cuenta la diferencia entre los dos antígenos, tanto en tamaño (G4, 435 aa y frg#11, 58 aa), como en la forma de producción (G4 en levaduras, que tienen mecanismos para formar puentes disulfuro; frg#11 en bacterias *E. coli*, que son incapaces de formarlos), al proceso de purificación (por centrifugación de cuerpos de inclusión en el caso de G4, con 30-50% de contaminacion con otras proteínas y por columnas de afinidad para el frg#11, obteniéndose un grado de pureza muy alta), y en los epítopos que incluyen (G4 es casi la totalidad de la proteína G y el frg#11 es la décima parte de la proteína G pero es una zona con alta densidad de epítopos reconocidos por sueros de truchas que han sufrido infección por VSHV) (datos no mostrados).

Para valoración de ambos antígenos, se realizaron inmunizaciones de truchas con G4 y N3 para estudiar cómo se inducía la respuesta de anticuerpos, para evaluar la G4 como antígeno para estudio de la respuesta de anticuerpos de trucha y para estudiar la necesidad o no de una conformación intacta para inducir anticuerpos de unión y/o neutralizantes de virus.

Los anticuerpos de unión anti-G, estimados por ELISA, mostraron títulos 2-3 veces más altos en truchas inmunizadas con G4+N3 que en truchas inmunizadas con VSHV en formulaciones oleosas o en saponina. No se detectaron Acs neutralizantes en truchas inmunizadas con G4+N3, mientras que sí se obtuvieron Acs neutralizantes en truchas inmunizadas con VSHV en formulaciones oleosas o en saponina (Figura 28 A y B).

Tanto el suero obtenido en truchas inmunizadas con G4+N3, como el obtenido con VSHV en formulaciones oleosas, mostraron la presencia de Acs de unión para las proteínas G y N de VSHV. El suero obtenido de truchas inmunizadas con VSHV en saponina sólo mostró la presencia de Acs para G, como se estimó por inmunoblot (datos no mostrados). Ello es debido a que la G es la única proteína de VSHV que puede formar un complejo con la saponina, porque tiene un dominio transmembranal, por ello resulta ser la única proteína vírica que puede ser inmunogénica cuando esta formulación es utilizada (Larsson *et al* 1993).

El estudio de la respuesta inmune humoral después de la vacunación DNA por inmersión y por inyección permitió evaluar ambos fragmentos recombinantes como antígenos para el estudio de la respuesta inmune en vacunación DNA. Se estableció una correlación utilizando sueros de truchas vacunadas con G3-pcDNAI/Amp entre los datos de ELISA, con G4 y con frg#11. Los datos demuestran que el frg#11 es más sensible para detectar Acs de unión (Figura 28C). Para la evaluación de la respuesta de Acs de trucha por ELISA en los experimentos de vacunación DNA siguientes se han utilizado, no obstante, tanto placas tapizadas con G4 como placas tapizadas con frg#11.

Se estudiaron en primer lugar (Tabla 5) los niveles de Acs producidos en los experimentos de comparación de promotores (*Cytomegalovirus*, CMV y músculo de pez, FG2), usando el plásmido pcDNA3 (Dra.Heather). Con G4 la absorbancia relativa de los sueros de truchas vacunadas con G-pcDNA3 usando el promotor FG2 (3,4 ± 0,5) fue mayor que la de las vacunadas con el G-pcDNA3 usando el promotor CMV (1,8 ± 0,7) y mayor que el control inyectando pcDNA3 (1,2±0,1). Al utilizar frg#11, sin embargo, no se encontró diferencia entre las absorbancias relativas de los sueros de truchas vacunadas con ambos promotores (2,2 en ambos casos).

La Tabla 5 también muestra los resultados obtenidos en ELISA con los sueros de truchas vacunadas por inmersión por diferentes métodos. Solamente se obtuvieron absorbancias relativas mayores que el control cuando se utilizó G3-pcDNAI/Amp+ultrasonidos (4,1±1,9).

Podemos resumir diciendo que en cuanto a respuesta inmune humoral (Acs de unión a antígeno reconocidos por ELISA) no se han observado diferencias significativas entre los promotores CMV y FG2 inyectados ya que ambos inducían un nivel similar de Acs y que también hay una respuesta significativa de Acs vacunando por inmersión en G3-pcDNAI/Amp con la aplicación de pulsos de ultrasonidos de baja frecuencia.

En la Tabla 6, se muestran los datos obtenidos en ensayos de linfoproliferación utilizando G4 como antígeno. En estos ensayos interesa presentar una gran cantidad de epitopos T, ya que

cada trucha individual reconoce epitopos distintos en la G de VSHV (Lorenzo *et al*, 1995). Es por ello que sólo se ha utilizado el antígeno G4 para estos experimentos. Se utilizaron para representar los resultados de la Tabla 6 sólo los índices de proliferación en presencia de 50 μg/pocillo de G4, la mayor de las cuatro concentraciones utilizada. En las truchas inyectadas con distintos plásmidos ninguna de las construcciones G-pcDNA3-CMV o G-pcDNA3-FG2 utilizadas (2,3±1,9 y 2,3±1,4) produjo índices de proliferación superiores al control (2,2±1,7). Entre los grupos vacunados por inmersión en G3-pcDNAI/Amp sí se encontraron diferencias entre su control vacunado sin plásmido (0,7±0,2) y el resto de los grupos. La mayor respuesta de proliferación se dio en el grupo de truchas vacunadas con G3-pcDNAI/Amp+DOTAP (2,4±1,4) mientras que para la utilización de ultrasonidos sin plásmido, inmersión en G3-pcDNAI/Amp y bactofección los valores se aproximaban más al valor control (1,0±0,1, 1,4±0,2 y 1,2±0,1, respectivamente). Sin embargo, no se pueden considerar significativos estos valores positivos obtenidos con el G3-pcDNAI/Amp+DOTAP debido a que son valores del mismo orden que los valores control de los experimentos de vacunación por inyección.

Los resultados, por lo tanto, no demuestran diferencias significativas entre los linfocitos provenientes de truchas inmunizadas con G-pcDNA3.1- FG2, con G-pcDNA3.1-CMV, con G3-pcDNAI/Amp, con pcDNA3.1 o con pcDNAI/Amp.

Figura 28. Anticuerpos de trucha anti-G, anticuerpos neutralizantes contra VSHV y correlación ELISA entre G4 y frg#11. A, Los Acs de trucha de unión a G se estimaron por ELISA usando placas con 1 µg/pocillo de G4. **B,** Los Acs de trucha neutralizantes de VSHV se estimaron mediante un test de neutralización en microplaca de 96 pocillos. Se representan las medias y las desviaciones estándar de los sueros de 2 truchas. ■—■, suero de trucha inmunizada con las proteínas recombinantes G4+N3. ❑—❑, suero de trucha inmunizada con VSHV en adyuvante completo de Freund. ❍—❍, suero de trucha inmunizada con VSHV en saponina. **.....**, suero de trucha no inmunizada o de trucha inyectada sólo con los adyuvantes. **C,** Correlación entre niveles de Acs anti-VSHV utilizando 1 µg de G4 o de frg#11 para tapizar los pocillos del ELISA.

Tabla 5.

Estimación de anticuerpos anti-G y anti-frg#11 en sueros de truchas inmunizadas con plásmidos G-pcDNA3 y G3-pcDNAI y distintos promotores.

		Absorbancia relativa al control	
Inserto-Plásmido-Promotor	Método	Placas G4	Placas frg#11
G-pcDNA3-FG2	**Inyección**	**3,4±0,5 (24) 3**	**2,2±0,4 (15)2**
G-pcDNA3-CMV	**Inyección**	1,8±0,7 (21) 2	**2,2±0,4 (24)2**
pcDNA3	Inyección	1,2±0,1 (18) 2	0,8±0,2 (12)2
G3-pcDNAI -CMV	**Ultrasonidos**	1,3±0,5 (12) 3	**4,1±1,9 (9)2**
G3-pcDNAI-CMV	DOTAP	0,9±0,1 (12) 2	1,7±0,7 (9)2
G3-pcDNAI-CMV	bactofección	0,8±0,2 (9) 2	--- ---
G3-pcDNAI-CMV	inmersión	1,4±0,6 (9) 2	1,6±0,3 (9)2

Se utilizaron placas recubiertas con 1 μg/pocillo de G4 o de frg#11. Los resultados se obtuvieron a $A_{492\text{-}620nm}$ y varias diluciones del suero (1/12, 1/36, 1/108), escogiendo la dilución 1/36 para la elaboración de la Tabla. Los resultados se expresan en absorbancia relativa al control = absorbancia de cada suero/absorbancia media del suero x 100. Para la inyección, el suero control se obtuvo de truchas inyectadas con PBS en cada experimento (3 a 6 truchas por experimento). Para inmersión, el suero control se obtuvo de truchas sin exponer a plásmido en cada experimento (3 a 6 truchas por experimento). Se dan las medias ± las desviaciones estándar de (n) truchas agrupadas en varios experimentos (número después del paréntesis). ---, no determinado. En negritas se subrayan los resultados significativamente diferentes del fondo.

Tabla 6.

Índice de proliferación (I.P.) de linfocitos de truchas inmunizadas con plásmidos G-pcDNA3 y G3-pcDNAI y distintos promotores.

Inserto-Plásmido-Promotor	Método	I.P.
G-pcDNA3-FG2	Inyección	2,3±1,4 (6)
G-pcDNA3-CMV	Inyección	2,3±1,9 (9)
pcDNA3	Inyección	1,1±0,1 (3)
PBS	Inyección	2,2±1,7 (6)
G3-pcDNAI-CMV	Ultrasonidos	1,0±0,1 (3)
G3- pcDNAI-CMV	Bactofección	1,2±0,1 (2)
G3-pcDNAI-CMV	DOTAP	2,4±1,4 (3)
G3-pcDNAI-CMV	Inmersión	1,4±0,2 (3)
PBS	Inmersión	0,7±0,2 (3)

Se utilizaron placas con concentraciones crecientes de G4 hasta 50 μg/pocillo. Los resultados se expresan en índice de proliferación (I.P.) = cpm de cada trucha en presencia de 50 μg/pocillo de G4 / media de cpm de cada trucha en ausencia de G4 (n=4) x 100. Se dan las medias ± las desviaciones estándar de (n) truchas. PBS, solución salina.

4.4.2. Estudios de vacunación DNA por inyección de G-pcDNA3 con distintos promotores. Se emplearon métodos de inyección para estudiar la influencia de los promotores, puesto que el funcionamiento del método de inyección como método de vacunación DNA está suficientemente demostrado en la literatura. El objetivo de estos experimentos se restringía a evaluar la sustitucion del promotor de *Cytomegalovirus* por el de uno de pez (FG2), debido que este es uno de los requisitos para la posible comercialización de una vacuna DNA para peces, tanto si es inyectada como si es por inmersión.

Se realizaron 4 experimentos de vacunación por inyección y contraprueba con el plásmido G-pcDNA3 con 2 promotores, de expresión en células de mamíferos (CMV) y de expresión en músculo de pez (FG2).

En el primero de los experimentos se realizó la contraprueba por inmersión. La mortalidad en el grupo inyectado con G-pcDNA3-FG2 fue del 23%. Puesto que la mortalidad de los grupos control no vacunados fue entre el 85-90% (Figura 29A), el promotor de pez es capaz de substituir con éxito al promotor de *Cytomegalovirus* en este experimento.

En el segundo de los experimentos, se realizó la contraprueba por inyección vía i.p. trucha a trucha (Figura 29B). En este caso la mortalidad de los grupos control no vacunados fue del 68%, y no se hallaron diferencias significativas entre las mortalidades de truchas inyectadas con G-pcDNA3-FG2 (40,9%), G-pcDNA3-CMV (38%) o pcDNA3 (34,8%).

En el tercer experimento se utilizaron 2 acuarios por grupo y se realizó la contraprueba por inmersión (Figura 30A). En este caso la mortalidad de los grupos control no vacunados fue del 52 y del 70% y de los grupos vacunados con el pcDNA3 varió entre el 10 y el 48% entre acuarios. Es éste un ejemplo ilustrativo de las variaciones entre acuarios que tienen esta clase de experimentos. Las mortalidades de truchas inyectadas con G-pcDNA3-FG2 (10-48%) y con G-pcDNA3-CMV (15%) fueron pues menores en su conjunto que las obtenidas en los controles, confirmando que el promotor de pez es otra vez capaz de substituir con éxito al promotor de *Cytomegalovirus*.

En los experimentos descritos en las Figuras 29B y 30A (los 2 últimos descritos) se observaron mortalidades más lentas de lo que es habitual en esta infección (50% de mortalidad en 15-17 días frente a 7-9 días). Para comprobar si este retraso era debido a la baja dosis de virus suministrada (10^5 UFP/ml), se multiplicó por 100 la dosis administrada y se realizó un nuevo experimento con 10 μg de plásmidos (diez veces más dosis que en anteriores experimentos) y contraprueba con una dosis i.m. y otra administrada por vía oral. Esta abundante dosis vírica en la contraprueba provocó un 50% de mortalidad a los 3-5 días en los controles no vacunados (Figura 30B). La mortalidad de ambos controles (inyectados con PBS y pcDNA3.1) alcanzó el 100% y el 95%, respectivamente. En los grupos vacunados con G-pcDNA3-FG2 (83%) y G-pcDNA3-CMV (72%) la mortalidad de las truchas fue un poco menor pero muy alta. El hecho de que la mortalidad sea tan alta puede deberse a un exceso de inóculo. Sí se observó, sin embargo, un retraso de 5 días en la mortalidad entre control no vacunado y truchas vacunadas con pcDNA3 y G-pcDNA3-CMV, mientras que el retraso de la mortalidad fue de hasta 8-9 días en el caso de las truchas vacunadas con pcDNA3-FG2. Este último dato confirma el efecto positivo de la sustitución del promotor CMV de *Cytomegalovirus* por el FG2 de pez.

4.4.3. Estudios de métodos de vacunación DNA por inmersión en G3-pcDNAI/Amp.

Se realizaron experimentos de vacunación por inmersión para probar distintos métodos de administración descritos en la bibliografía y las formulaciones que dieron mejores resultados en los experimentos en pequeña escala, con truchas de 2 cm. En experimentos previos se probaron el shock hiperosmótico, la resina Wizard, el alumbre y el fosfato cálcico. Se descartaron por su toxicidad (la resina Wizard) o por la ausencia de resultados positivos en protección y respuesta inmune (datos no mostrados).

En sucesivos experimentos se probaron solamente ultrasonidos, DOTAP y bactofección, métodos con los que se obtuvieron los mejores resultados en los experimentos con GFP-$pQBI_{25}$. En la Figura 31 se muestra la evolución de las mortalidades después de la contraprueba en uno de los experimentos de vacunación por inmersión. Las menores mortalidades correspondieron al

grupo de truchas vacunadas con G3-pcDNAI/Amp+ultrasonidos (~50%) y los mayores a las truchas vacunadas con *E.coli*(G3-pcDNAI/Amp) (93,3%), G3-pcDNAI/Amp+DOTAP (95%) y a la combinación de formulaciones (100% G3-pcDNAI/Amp+DOTAP+ultrasonidos y 85,7% G3-pcDNAI/Amp+bactofección+ultrasonidos) (datos no mostrados).

En un segundo experimento (Figura 32) de nuevo las truchas vacunadas por inmersión en G3-pcDNAI/Amp+ultrasonidos presentaron la menor de las mortalidades relativas (47,6%) frente a las vacunadas por G3-pcDNAI/Amp+bactofección (57,1%) y G3-pcDNAI/Amp+DOTAP (87,5%). La mortalidad de truchas inyectadas con G3-pcDNAI/Amp fue del 15,5%.

El porcentaje relativo de supervivencia (PRS) calculado a partir de tres experimentos de vacunación por inmersión con relación a las mortalidades de las truchas no vacunadas se muestra en la Tabla 7. La máxima supervivencia relativa del 71,5% se obtuvo por inyección de G3-pcDNAI/Amp. De los métodos ensayados por inmersión, la aplicación de G3-pcDNAI/Amp +ultrasonidos a las truchas fue el método que proporcionó una mayor supervivencia a la contraprueba (50,1%). La inmersión en G3-pcDNAI/Amp+DOTAP (12,3%) y la inmersión *E.coli*(G3-pcDNAI/Amp)(20,7%) así como el G3-pcDNAI/Amp (8,8%) obtuvieron PRS muy cercanos a la mortalidad total. Asímismo, se observó mayor reproducibilidad entre diferentes experimentos (dato muy difícil de obtener en los experimentos de vacunación/contraprueba con peces) en el caso de G3-pcDNAI/Amp+ultrasonidos (σ=3,2%), que en G3-pcDNAI/Amp+DOTAP y *E.coli*(G3-pcDNAI/Amp) (σ=10,9 y 14,0%, respectivamente).

Figura 29. Porcentaje de mortalidad después de la contraprueba con VSHV de truchas inyectadas con G-pcDNA3 y distintos promotores. Se inyectaron con 1 µg/trucha de G-pcDNA3. Un mes después se contraprobaron con un inóculo de 10^5 UFP/ml en un volumen de 2 l de agua por acuario durante 2 horas, restableciendo después el nivel de agua fría y los filtros. Después se contó el número de truchas muertas por acuario. ●—●, G-pcDNA3- pFG2. ❍—❍, G-pcDNA3-CMV. -------, pcDNA3. ....., PBS.

Figura 30. Porcentaje de mortalidad después de la contraprueba con VSHV de truchas inyectadas con G-pcDNA3 y distintos promotores. Se inyectaron 30 truchas de 5-7 cm de longitud por acuario (8) con 25 µl plásmido a una concentración de 10 µg/trucha. Un mes después se contraprobaron con VSHV. Después se contó el número de truchas muertas por acuario. **A**, La contraprueba se hizo por inmersión VSHV en un inóculo de 10^5 UFP/ml en 500 ml de agua de acuario durante 2 horas con aireación, devolviéndolas después a los acuarios. Se han representado las mortalidades independientes por cada cuario de los 2 utilizados por experimento. **B,** La contraprueba se hizo por inyección i.m. y v.o. de 10^7 UFP por trucha. ●—●, G-pcDNA3- pFG2. ❍—❍, G-pcDNA3-CMV . -------, pcDNA3. ....., PBS.

Figura 31. Porcentaje de mortalidad después de la contraprueba con VSHV de truchas inmersa en G3-pcDNAI/Amp+formulaciones. Se mantuvieron 20 truchas de 5-7 cm de longitud por acuario durante 30 min en 100 ml de agua con G3-pcDNAI/Amp +formulaciones. Posteriormente se realizó la contraprueba mediante inyección de 10^6 UFP/ml, i.m. (50 µl/trucha) y administración oral (50 µl/trucha) de VSHV. Después se contó el número de truchas muertas por acuario. ●—●, 10 µg/ml de G3-pcDNAI/Amp+ultrasonidos. ❍—❍, 10 µg/ml de G3-pcDNAI/Amp+DOTAP. ❑—❑, 40 µg/ml de *E.coli*(G3-pcDNAI/Amp).

Figura 32. Mortalidades después de la contraprueba de truchas inmersas en plásmidos. Se mantuvieron 25 truchas de 5-7 cm de longitud por acuario durante 30 minutos en 100 ml de agua con G3-pcDNAI/Amp+formulaciones. Después de 47 días se infectaron por inmersión durante 2 horas en aireación, con 30 ml de 10^6 UFP/ml de VSHV en 500 ml de agua de acuario, devolviéndolas después a los acuarios. Después se contó el número de truchas muertas por acuario. ●—●, 10 µg/ml de G3-pcDNAI/Amp+ultrasonidos. ❍—❍, 10 µg/ml de G3-pcDNAI/Amp+DOTAP. ❑—❑, 40 µg/ml de *E. coli*.(G3-pcDNAI/Amp) ------, inyección de 10 µg G3-pcDNAI/Amp por trucha.

Tabla 7.

Porcentaje relativo de supervivencia (PRS) de las truchas 1 mes después de vacunación por inmersión en G3-pcDNAI/Amp.

Método de inmersión	PRS
G3-pcDNAI/Amp+inyección	**71,5 ± 0,0 (n=1)**
G3-pcDNAI/Amp+Ultrasonidos	**50,1 ± 3,2 (n=3)**
G3-pcDNAI/Amp+DOTAP	12,3 ± 10,9 (n=3)
G3-pcDNAI/Amp+ Bactofección	20,7 ± 14,0 (n=2)
G3-pcDNAI/Amp	8,8 ± 0,0 (n=2)

Se utilizaron ~20 truchas de 5-7g por trucha por punto experimental. En cada uno de los tres experimentos se incluyó un acuario control con truchas no vacunadas. La mortalidad en los acuarios sin vacunar fue del 100, 87,5 y 63,6%, respectivamente, para los tres experimentos. La combinación de G3-pcDNAI/Amp+ultrasonidos+DOTAP o de G3-pcDNAI/Amp+ultrasonidos+ bactofección produjo un porcentaje relativo de supervivencia similar al obtenido con G3-pcDNAI/Amp. Se calcularon las medias y desviaciones estándar para el número de experimentos indicado entre paréntesis. En negritas se destacan los resultados significativos.

5. DISCUSIÓN.

5.1. EXPERIMENTOS *IN VITRO*: TRANSFECCIÓN DE EPC.

Tanto los reactivos de transfección comerciales como las condiciones usadas para transfectar células se han desarrollado para células de mamífero utilizando temperaturas de 37ºC. Es por ello que dichos reactivos y condiciones podrían no ser aplicables a células de pez, que requieren temperatura menores. Para buscar las mejores condiciones para transfectar células de pez se utilizaron células EPC (derivadas de carpa), debido a que: es una línea celular bien conocida, es el mejor modelo pronosticador de la actividad de construcciones plasmídicas en peces transgénicos (Moav *et al*., 1992) y se transfectan mejor que las líneas celulares RTG-2 o RTH (derivadas de trucha) (Bearzotti *et al*., 1992; Moav *et al*., 1992). Para detectar la actividad después de la transfección se eligió el gen de la ßgal y un ensayo comercial de actividad basado en un sustrato quimioluminiscente altamente sensible *(bgal Chemiluminescent substrate*).

Los resultados obtenidos seleccionaron como el transfectante más eficaz el fugene, tanto por inducir las mayores actividades de βgal después de la transfección como por ser más fácil de manipular. Después de mezclar el fugene y el plásmido (en este caso el pCMVß), la mezcla se añade simplemente a las monocapas de EPC en presencia de medio de cultivo celular que contiene suero. Otros reactivos, sin embargo, exigen la eliminación del suero de los medios de cultivo y por lo tanto un paso más de manipulación.

El estudio mostró la importancia de la relación de concentraciones entre el pCMVß y el reactivo transfectante. Los mejores resultados se obtuvieron con una relación pCMVß/fugene de 0.4 a 1 (µg/µl). Por otro lado, la concentración del pCMVß es muy crítica. El exceso en la concentración de pCMVß disminuye la actividad de βgal obtenida después de la transfección debido a mecanismos de naturaleza desconocida. Para obtener los mejores resultados la concentración final de pCMVß en contacto con las células debía mantenerse entre 4-6 µg/ml. Fuera de estos estrechos límites de concentración pCMVß/fugene el nivel de transfección desciende a los valores del fondo.

Se demostró también la importancia de la temperatura. Al aumentar ésta, desciende en gran medida la actividad ßgal. Para utilizar el sistema dual basado en el virus vacuna y la T7 polimerasa y su promotor (Lawson *et al*., 1995), así como en el caso del uso de promotores de *Cytomegalovirus* (CMV), los protocolos ordinarios exigen el uso de incubaciones a 37ºC. Sin embargo, la cantidad de βgal detectada después de transfección de células EPC a 37ºC fue muy baja. La transfección de EPC ocurre con mayor eficiencia a 30ºC, la temperatura óptima de la EPC o a temperaturas menores (Fijan *et al*., 1983).

Los resultados muestran que hay una fuerte competición por la expresión cuando se transfectan simultáneamente 2 plásmidos. Este fenómeno puede ser debido a la existencia de un promotor común (por ejemplo, con pCMVß y GFP-pQBI$_{25}$), al exceso en la concentración de DNA (por ejemplo, con pCMVß y pGINT7β) o a los dos. Quizás el uso de transfecciones múltiples paso a paso o el uso de plásmidos con diferentes promotores podrían resultar en un aumento de los niveles de expresión de cada plámido transfectado.

En el caso de los polímeros catiónicos se observó una elevada toxicidad en las células, tanto en EPC como en linfocitos de trucha (datos no mostrados). Este hecho podría ser la razón de la baja expresión de βgal obtenida y se podría explicar por una elevada polidispersividad del sistema, que puede ocasionar asociación irreversible del polímero a la membrana celular.

Para una óptima transfección, también hay que tener en cuenta el estado de los plámidos. Para una mayor eficacia de la transfección fue necesario que las estructuras de los plásmidos estuvieran en estado circular y superenrollado. Es decir, se debe cuidar el no introducir en la preparación de los plásmidos y/o en los procesos de manipulación cortes en la molécula de DNA. Por ejemplo, una vez obtenidos, los plásmidos han de alicuotarse y mantenerse congelados a –20ºC y usarse solamente una vez, evitando así los ciclos de congelación y descongelación.

Un método simple y reproducible para transfectar células de pez como el estudiado en este trabajo, así como un ensayo altamente sensible gracias al substrato empleado, ha servido para estudiar distintas variables implicadas en la entrada del DNA a las células de pez, ha confirmado el

modelo basado en las células EPC como un buen ensayo de las construcciones empleadas para la expresión de proteínas codificadas por plásmidos en células de pez y nos ha orientado acerca de las condiciones y problemas en las que se realizarían los experimentos de vacunación DNA por inmersión en peces.

Además, estos resultados también son útiles para otros muchos estudios básicos y aplicados, tales como los de expresión de genes heterólogos en peces transgénicos (Walker *et al*., 1995), los ensayos cuantitativos para estudiar la fusión inducida por virus de peces (Coll, 1999a; Nussbaum, Broder, yBerger, 1994) o la obtención de virus RNA infeccioso a partir de copias de cDNA en peces (Estepa *et al*., 1999b; Lawson *et al*., 1995).

5.2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*: MODELO GFP/TRUCHAS DE 2 CM.

Con estos estudios se han podido comparar cuantitativamente distintos métodos de transferencia de DNA (codificando el gen de la proteína fluorescente GFP) a truchas de 2 cm, por inmersión. Además se ha estudiado la influencia de la concentración de DNA y del tiempo, después de la inmersión, en la fluorescencia inducida en las células de la aleta caudal de las truchas. La fluorescencia distribuída en manchas del tamaño de las células, de ~10 μm de diámetro y la ausencia de fluorescencia en el cartílago y en los melanóforos, sugieren que la fluorescencia se localiza en las células de la piel de las aletas de la trucha y que la fluorescencia se debe a la expresión transitoria del gen GFP inducida en ellas.

Se eligieron los distintos métodos a estudiar como representativos de distintos modos de transferencia del DNA: la aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia como ayuda mecánica a la entrada del DNA, más suave que la electroporación y de aplicación más sencilla; el DOTAP por sus características lipídicas y por la abundante investigación que se lleva a cabo para su aplicación en terapia génica; los polímeros catiónicos que podrían favorecer la formación de complejos con el DNA para su vehiculización por microencapsulación; la bactofección, que es la utilización de

bacterias como vehículo vivo para la entrada del DNA a las células y el reactivo lípidico comercial fugene, por los excelentes resultados obtenidos con él en los experimentos *in vitro.*

Para hacer todas las comparaciones mencionadas arriba, era necesario cuantificar la expresión de GFP. Sin embargo, la comparación visual de la totalidad de las fotografías tomadas por experimento en iguales condiciones de fondo y rango (Figura 19) no permitía una discriminación fácil y objetiva, ni era posible cuantificar la expresión. Tampoco la comparación de histogramas representativos de cada fotografía, con la totalidad de los puntos de luz (Figura 17) (Fernández-Alonso *et al*., 1999) servía para cuantificar la fluorescencia obtenida. Ambos métodos resultaron insuficientes, por la baja expresión de GFP y las variaciones de fluorescencia del fondo entre fotografías. El método puesto a punto de cuantificación de la fluorescencia de GFP en aletas, en áreas de luz del tamaño celular, después de inmersión en plásmidos con GFP, permitió calcular otros parámetros discriminatorios como la fluorescencia relativa por célula (valor relativo al fondo de la fotografía y al grupo control) y el porcentaje de células con fluorescencia relativa significativamente mayor que las células del grupo control. Estos últimos métodos de análisis resultaron eficaces para el estudio comparativo de las variables en un mismo experimento y entre distintos experimentos, aunque requieren un intensivo y laborioso trabajo para recopilar, transformar y analizar los datos.

Para poder comparar los resultados obtenidos en esta discusión todos los datos expuestos en fluorescencias relativas en resultados se han expresado como porcentajes de células fluorescentes cuya fluorescencia relativa estaba significativamente (90%) por encima de la fluorescencia relativa del control. De todos los métodos de transferencia por inmersión estudiados con GFP (GFP-pQBI$_{25}$), se obtuvieron elevados porcentajes de células fluorescentes (35-60% de células con fluorescencia significativa) tanto aplicando ultrasonidos de baja frecuencia como utilizando DOTAP (liposoma) o bacterias transformadas con el plásmido (bactofección). Ni con fugene ni con los polímeros catiónicos se obtuvieron diferencias significativas (3-12% de células con fluorescencia relativa significativa) con respecto a los grupos que recibieron

simplemente GFP-pQBI$_{25}$ y los grupos control sin plásmido o con un plásmido que no contenía el gen de la proteína fluorescente (G3-pcDNAI/Amp). Por este motivo no se utilizaron fugene ni polímeros para los experimentos de vacunación/contraprueba con truchas de mayor tamaño.

Los ultrasonidos, DOTAP y la bactofección, coincidieron en una concentración crítica de GFP-pQBI$_{25}$ de 10 μg/ml, necesaria para obtener un máximo porcentaje de células significativamente fluorescentes (Figura 33). Por encima y por debajo de esta concentración el porcentaje de células significativamente fluorescentes se reduce mucho.

Mientras que sólo el uso de ultrasonidos induce una mayor duración de la expresión (después de 21 días se siguen detectando células fluorescentes en las aletas de las truchas sometidas a dicho tratamiento), utilizando DOTAP la expresión decae al cabo de una semana y utilizando bactofección se llega a buenos niveles de expresión o posiblemente mayores, pero las truchas comienzan a morirse en los acuarios (Figura 34). Es posible que la permanencia de las bacterias en la trucha, cualquiera que sea su modo de entrada, pudiera facilitar una expresión más prolongada y mayor, pero no se ha podido demostrar.

Aunque no es posible una comparación directa, los niveles de expresión después de la transfección *in vivo* parecen más bajos que los niveles de expresión obtenidos *in vitro* por μg de DNA utilizado. En comparación con los experimentos *in vitro*, hay que tener en cuenta que la transfección *in vivo* se realiza en un menor tiempo (30 min, debido a la falta de resistencia de las truchas en el volumen de agua tan pequeño en el que se realizan para ahorrar DNA), y a menor temperatura (10-14ºC, temperatura de los acuarios). Estas condiciones pueden disminuír la entrada del DNA y contribuír a que la expresión del gen sea baja.

Por otra parte, se ha observado una variación apreciable entre los niveles de expresión de experimento a experimento (Figuras 33 y 34, por ejemplo). Las causas responsables de la variación observada pueden ser debidas a:

(i) Aunque se seleccionaron las zonas de la aleta caudal donde la fluorescencia visible era mayor, la superficie total fotografiada y observada es mínima con respecto al total de células en la

piel de la trucha. Además, podrían haberse tomado fotografías que no se corresponden con zonas de expresión máxima. Se podría aumentar la sensibilidad del método de detección de fluorescencia aumentando el número de fotografías por trucha, así como de las zonas seleccionadas, sin embargo esto significaría demasiada cantidad de trabajo. El distinto tiempo transcurrido durante el montaje de cada una de las truchas en la placa para la toma de fotografías también podría introducir variaciones. Aunque para minimizar estas influencias y dentro de lo posible se unificaron las variables tales como el medio de montaje, la forma y número de fotografías, la solución de lavado de las truchas antes de tomar las fotografías, etc. Las truchas se observan *in vivo* por lo que en algunos casos un leve movimiento de éstas hace que se difumine la fotografía de la fluorescencia durante el tiempo de exposición, de manera que el tiempo en conseguir una fotografía nítida podía variar entre trucha y trucha. El tiempo de exposición no afectó, sin embargo, a la saturación de luz en las fotografías ya que mientras que los datos obtenidos en las células estuvieron en valores absolutos de intensidad de luz entre 200-800, el límite de saturación de la cámara digital y del programa utilizado para registrar los datos está en valores de luz de unos 65.000.

(ii) Una cierta variación entre truchas viene dada por las propias truchas y tiene como consecuencia una variación entre experimentos. Dentro de un mismo lote de truchas, en el que el tamaño de éstas es bastante similar, hay pequeñas variaciones entre individuos. Un aumento de tamaño se correspondía en la mayoría de los casos con un aumento en la fluorescencia del fondo y un aumento de fluorescencia inespecífica. Asímismo, en truchas mayores las células se alargan y adquieren apariencia fusiforme por lo que resulta más difícil ajustar el área célular predefinida de 13x13 *pixels* a las células observadas y disminuye artificialmente el valor de fluorescencia media de ese área. A lo largo de los experimentos realizados se ha observado también cómo afecta el estado de las truchas (enfermas o no), introduciendo cierta variación; por ejemplo, en truchas en las que al observar al microscopio se han visto algún tipo de parásitos, los resultados de fluorescencia relativa disminuyeron (datos no mostrados).

(iii) Otras fuentes de variación fueron la luz infraroja, el estado de los plásmidos y la fluorescencia inespecifica. En los primeros experimentos, la cantidad de filtración de luz infrarroja en el microscopio impedía distinguir algunas células en las fotografías. Ello obligó a incorporar en el momento de la observación y toma de fotografías, un filtro para infrarrojos. La incorporación de este filtro diminuyó la inespecificidad, pero también la intensidad de los datos de los puntos de luz de toda la fotografía. Según los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* , la utilización de plásmido congelado y descongelado varias veces en alguno de los experimentos puede haber introducido una fuente adicional de variación. Procuramos eliminar esta fuente de variación no reutilizando alícuotas de plásmido. Por último, también se ha podido observar fluorescencia inespecífica en las truchas control no inmersas en formulación o plásmido alguno (grupos de células fluorescentes en puntos localizados en el cuerpo de las truchas). Este dato se corrobora con que casi siempre hay un pequeño porcentaje de células en las aletas de los grupos control con valores de fluorescencia relativa mayores que los límites de significación. Por eso en todos los casos, también en los grupos control, las células estudiadas fueron las 20-30 con mayor intensidad de luz en la fotografía.

A la vista de lo explicado, un ensayo del extracto de la trucha completa utilizando βgal o luciferasa para su cuantificación en vez de GFP, podría ser un modelo de expresión más práctico. Ya se ha descrito la inducción de expresión de luciferasa en trucha (Heppell *et al*., 1998) y de βgal en peces distintos de la trucha, y en distintas temperaturas y condiciones de ensayo (Kanellos *et al*., 1999b). En todos esos casos se ha podido cuantificar la expresión de proteína después de la inyección intramuscular del plásmido correspondiente. En nuestros experimentos preliminares utilizando plásmidos que expresan βgal (pCMVβ) y el substrato quimioluminiscente utilizado con los experimentos *in vitro* en cultivos celulares EPC, no se llegó a detectar ßgal en el extracto de trucha (datos no mostrados). Este resultado es probablemente debido a la necesidad de una mayor sensibilidad para detectar las escasas células transfectadas, pero también podría ser debido a la inhibición de la actividad ßgal por los extractos de tejidos, como se comprobó en diluciones

de extractos de truchas a las que se había añadido βgal en cantidades conocidas (datos no mostrados). Otra causa puede ser la degradación de la ßgal por proteasas liberadas al obtener los extractos celulares durante la manipulación de éstos, a pesar de que se añadieron inhibidores de proteasas (quizás en cantidad insuficiente). Sin embargo, al ser ensayos estandarizados para su funcionamiento (*made it to work*) y lectura en el momento, las medidas deberían ser más sencillas de realizar que con GFP. Esto hace que los modelos basados en ßgal o luciferasa puedan ser en el futuro una buena alternativa al utilizado en el presente estudio basado en GFP.

Figura 33. Estudio de todos los resultados obtenidos en los experimentos de variación de la fluorescencia de GFP con la concentración de GFP-pQBI$_{25}$ Se utilizaron preparaciones con GFP-pQBI$_{25}$ a distintas concentraciones y se examinaron las aletas caudales de las truchas a los 2 días de la inmersión. ●—●, GFP-pQBI$_{25}$ +ultrasonidos. ❍—❍, GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP. ❑—❑, GFP-pQBI$_{25}$+bactofección, Δ—Δ, GFP-pQBI$_{25}$. Se trazó la curva de suavizado en algunos casos (❍, ❑), para facilitar la claridad, según el método del minimizado de los cuadrados de las medias del programa FigP (Biosoft). ❑, Pasado el tiempo indicado, las truchas comenzaron a morirse.

Figura 34. Estudio de todos los resultados obtenidos en los experimentos de variación de la fluorescencia de GFP con el tiempo después de inmersión en varias formulaciones de GFP-pQBI$_{25}$. Se utilizaron 10 µg/ml de GFP-pQBI$_{25}$. El porcentaje de células que superaban en fluorescencia al 90% de la fluorescencia de las células en el grupo control fue de 3.2±0.8 de 1650 células (n=11). ●—●, GFP-pQBI$_{25}$+ultrasonidos. ❍—❍, GFP-pQBI$_{25}$+DOTAP. ❑—❑, GFP-pQBI$_{25}$+ bactofección. Δ—Δ, GFP-pQBI$_{25}$. Se trazó la curva de suavizado en algunos casos (●, ❍, ❑), para facilitar la claridad, según el método del minimizado de los cuadrados de las medias del programa FigP (Biosoft). ❍, Imposible aumentar la cantidad de plásmido por la toxicidad del DOTAP, inviable para las truchas.

5.3. EXPERIMENTOS *IN VIVO*: VACUNACIÓN/CONTRAPRUEBA.

5.3.1. Evaluación de los antígenos utilizados en los ensayos de anticuerpos.

Utilizando sueros de truchas inmunizadas con G4 (G desnaturalizada, uniones disulfúricas desorganizadas) y con el VSHV completo (G nativa, uniones disulfúricas intactas), se observó que los Acs de trucha que reaccionaron fuertemente por ELISA con G4 no tienen actividad neutralizante frente a VSHV (Figura 28 A y B). Este resultado probablemente signifique que los Acs detectados por ELISA son incapaces de unirse a la proteína nativa G y que los epítopos neutralizantes están destruídos en la proteína G4. Numerosos estudios previos de la antigenicidad de G han mostrado que los epítopos neutralizantes de VSHV son dependientes de conformación (propiedades antigénicas). Por otro lado, los presentes resultados también destacan la incapacidad de obtener Acs neutralizantes dependientes de conformación por inmunización de truchas con G4 desnaturalizada (propiedades inmunogénicas).

En contraste, cuando se preserva la conformación de la G durante la preparación del inmunógeno (tanto usando formulaciones oleosas como saponinas), se pueden obtener Acs neutralizantes incluso aunque el suero de trucha contenga Acs detectables por ELISA (Figura 28B). Estos resultados confirman que tanto las propiedades neutralizantes antigénicas como inmunogénicas de la proteína G requieren una conformación disulfúrica intacta. Debido a que resulta más fácil que la conformación se mantenga en el caso de un fragmento menor, como es el caso del frg#11 y a que es mayor el número de epítopos que puede haber por pocillo de ELISA eligiendo un fragmento antigénico más pequeño, que con casi la totalidad de la proteína, se ensayó el frg#11 como antígeno en el ELISA para detectar Acs anti-VSHV. Efectivamente, utilizando frg#11 se obtuvo una mayor sensibilidad en la detección de los Acs por ELISA, lo que hace que este método sea preferido para la estimación de los bajos niveles de Acs detectados en los experimentos de vacunación DNA por inmersión (Figura 28C).

5.3.2. Respuesta inmune después de la vacunación DNA por inmersión. No se obtuvieron niveles detectables de Acs neutralizantes mediante la inmunización de truchas con ninguna de las formulaciones empleadas (datos no mostrados). El papel de la inmunidad en los mecanismos de protección después de vacunación por inmersión ha sido muy controvertido y se han implicado tanto la inmunidad humoral como la inmunidad mediada por células y la inmunidad local (Nakanishi *et al*., 1999). Sin embargo, en la mayoría de los ensayos de vacunación por inmersión con bacterinas o proteínas, los Acs no son detectables e incluso, cuando se encuentran, no se correlacionan bien con la protección obtenida (Nakanishi y Ototake, 1997).

En otros estudios se ha comprobado que en salmónidos inyectados con plásmidos que codificaban para la G de VNHI se producían bajos niveles de Acs neutralizantes antes de la contraprueba (Boudinot *et al*., 1998; Lewis y Babiuk, 1999). Algunos estudios muestran además cómo para la protección no se requieren títulos elevados de Acs neutralizantes, ya que la transferencia pasiva de sueros de truchas inmunizadas con títulos bajos de Acs neutralizantes (títulos de 1/20) conferían protección a la contraprueba a truchas no inmunizadas (LaPatra *et al*., 1994; Traxler *et al*., 1999).

Puede ser que existan otros factores en el suero responsables de la protección (Bachman *et al*., 1997) o que nos encontremos en presencia de una actividad neutralizante bajo límites detectables debido a otros mecanismos (Catalanotto *et al*., 2000).

Todos los sueros de truchas vacunadas se estudiaron por ELISA con los antígenos recombinantes G4 y frg#11 (Tabla 5). Los resultados demuestran la mayor sensibilidad del ELISA con frg#11, con el que sólo se pudieron demostrar títulos significativos en la vacunación DNA por inyección y por inmersión con ultrasonidos (Tabla 5). Dichos títulos y la presencia de sueros con títulos no significativos, concuerdan con los resultados de otros estudios en los que sólo del 27-44% de los sueros de truchas vacunadas tienen títulos de Acs antes de la contraprueba (Boudinot *et al*., 1998; Heppell *et al*., 1998; Lorenzen *et al*., 1998; y Anderson *et al*., 1996).

Una baja seroconversión pero significativa inmunoprotección puede indicar una inmunidad celular específica de antígeno o la existencia de factores antivirales no específicos responsables de conferir protección en estados tempranos de infección. El hecho de que no se detectó respuesta inmune celular mediante proliferación de linfocitos extraídos del riñón de las truchas vacunadas antes de la contraprueba (Tabla 6) puede deberse efectivamente a que no existe un nivel de respuesta celular detectable, pero también podría deberse a que la estimulación se hizo con la proteína recombinante G4 en vez de con la proteína G conformacionalmente intacta o con el virus completo.

5.3.4. Protección de truchas vacunadas con G3-pcDNAI/Amp a la contraprueba con VSHV .

Los resultados descritos en este trabajo demuestran que mediante vacunación DNA por inmersión y la aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia, se inmunizaron y protegieron truchas de 5-7 cm (mínimo tamaño con el que se pueden vacunar) (Figura 30 y 35). Utilizando vacunación DNA con ultrasonidos se ha podido establecer alrededor de un 50% de protección con muy poca variación entre los experimentos (Figura 35). Esto indica que los ultrasonidos, a pesar de las dificultades en reproducir los resultados de este tipo de experimentos (ver discusión más adelante), es suficientemente reproducible y que podría muy probablemente mejorarse.

Es el único método de vacunación DNA por inmersión de los que se experimentaron que indujo protección. Sin embargo, los resultados descritos muestran que los resultados obtenidos por inmersión utilizando ultrasonidos no alcanzaron los valores de los mejores porcentajes de supervivencia obtenidos en vacunación por inyección, tanto en el presente trabajo (hasta un 70%), como en trabajos descritos con anterioridad para VSHV (Boudinot *et al*., 1998; Heppell *et al*., 1998; Lorenzen *et al*., 1998) o para VNHI (Anderson *et al*., 1996).

Hay muchos factores que hacen de los experimentos de vacunación/contraprueba un objetivo difícil de llevar a cabo con eficacia o al menos con resultados interpretables. Aun así son el punto final de validación de una técnica de inmunización con el objetivo de vacunación, además

de servir de referencia para estimar el valor predictivo de otros métodos de estudio a pequeña escala.

La primera dificultad se encuentra en la necesidad de mantener los acuarios en circuito cerrado en condiciones apropiadas, sin que se rompa el equilibrio y sin que aparezcan infecciones. Desde que se acondicionan los acuarios y filtros, llegan las truchas y se aclimatan, se realiza el experimento y se desinfectan y vuelven a acondicionar los acuarios para el experimento siguiente, transcurren 3-4 meses por experimento. Hay que tener en cuenta también la dificultad en encontrar truchas de tamaño similar y en cualquier momento del año. Este problema lo comparten los experimentos con alevines de 2 cm y es debido a que las truchas sólo tienen sus épocas de puesta de huevos de Septiembre a Enero en nuestras latitudes. Para usar truchas durante otros periodos del año hay que recurrir a truchas importadas cuya calidad sanitaria es siempre impredecible. Además, es necesario para estos experimentos asegurar que se trabaja con trucha arco iris, porque existen especies o variedades de truchas genéticamente resistentes al VSHV. A estos problemas se añade la necesidad de que las truchas obtenidas estén libres de VSHV y de que no sean supervivientes de una infección con VSHV. Según el estudio internacional mostrado en la introducción, España es un país libre de este virus, pero hemos podido detectar Acs anti-VSHV por ELISA en algunos sueros de trucha recién incorporadas a los acuarios para los experimentos (datos no mostrados). Ello dificulta en gran manera la interpretación de los datos de contraprueba. Otro problema inevitable es la diferencia entre acuarios. El hecho de que éstos sean unidades independientes en equilibrio resulta eficaz para evitar la contaminación entre acuarios, pero da lugar a variaciones. Además, también existe una variabilidad natural entre las respuestas de diferentes individuos a la inmunización contra VSHV, demostrada y documentada en anteriores publicaciones (Lorenzo *et al*, 1995b).

A todas estas dificultades se añaden las que vienen como consecuencia de la preparación del VSHV y realización de las contrapruebas. A diferencia de las truchas, la variabilidad en VSHV es muy baja y su origen y cepa conocidos. Sin embargo, en la preparación del VSHV cabe

la posibilidad de que éste se atenúe por sucesivos pases en cultivo celular, disminuyendo la infectividad y retrasando o anulando la mortalidad. Este mismo efecto puede ocurrir cuando se prepara un inóculo infectando las monocapas celulares con una multiplicidad elevada de VSHV, con lo que se generan partículas interferentes, que son VSHV defectivos que disminuyen el título final con el que se hace la contraprueba. Además, cuando las contrapruebas se hacen en los mismos acuarios donde se vacunan las truchas es necesario retirar gran parte del agua y reponerla después, con lo que se sufre el riesgo de que un aumento de temperatura >20ºC inactive el VSHV. El VSHV también se inactiva al bajar el pH del agua (<6), lo que resulta a veces difícil de controlar por ser un equilibrio dinámico (depende de las truchas, sus metabolitos, alimentos, bacterias, etc.).

En el otro extremo de las dificultades, puede ocurrir que haya un exceso de mortalidad en las truchas cuando el inóculo de VSHV aplicado es demasiado grande. Esto es frecuente cuando el virus se administra por inyección intramuscular, intraperitoneal o vía oral. Las contrapruebas por inmersión se asemejan más a una infección natural (que suele ser por cohabitación con individuos infectados que liberan VSHV al medio), que las que se hacen por inyección, ya que nunca en una infección natural la dosis infectiva es tan alta. En estos casos hay que tener en cuenta al interpretar los resultados el retraso en la mortalidad, más que el porcentaje de supervivencia.

Figura 35. Media de los datos de las Figuras 31 y 32: Mortalidad de las truchas vacunadas por inmersión en G3-pcDNAI/Amp después de la contraprueba con VSHV. Se utilizaron unas 20 truchas por acuario, vacunadas por inmersión en G3-pcDNAI/Amp con diferentes formulaciones y se enfrentaron a VSHV 30 días después. Las mortalidades en las truchas control no vacunadas fue de 100 y 87,5%, respectivamente. Se calcularon las medias y desviaciones estándar de los experimentos mostrados en las Figuras 31 y 32. ●—●, G3-pcDNAI/Amp +ultrasonidos. ❍—❍, G3-pcDNAI/Amp +DOTAP. ❑—❑, G3-pcDNAI/Amp+bactofección. Δ—Δ, G3-pcDNAI/Amp. -------, G3-pcDNAI/Amp inyectado.

5.4. PREDICCIÓN DE LOS RESULTADOS DE VACUNACIÓN / CONTRAPRUEBA.

Con el presente trabajo se ha intentado predecir los resultados de la vacunación DNA por inmersión (vacunación/contraprueba) con estudios a pequeña escala, tanto *in vitro* (células EPC) como *in vivo* (truchas de 2 cm), utilizando genes marcadores (ß-gal y GFP) (resultados resumidos en la Tabla 8).

La mayor duración de la expresión de GFP en aletas de truchas de 2 cm después de su inmersión en GFP-pQBI$_{25}$+ultrasonidos se correlaciona con el mayor título de Acs anti-VSHV medido por ELISA utilizando frg#11 (niveles significativos de Acs detectables) (Tabla 5) y con un 50,1% de protección durante la contraprueba con VSHV, en truchas inmunocompetentes (Tabla 7).

Teniendo en cuenta que la supervivencia a la contraprueba es un ensayo de compleja realización pero decisiva para la utilización de una vacuna (además de la seguridad), se hace conveniente el encontrar modelos a pequeña escala que permitan un fácil y rápido estudio de variables antes de efectuar las costosas pruebas de vacunación/contraprueba. En la actualidad son pocos los estudios que no sólo analizan la expresión o la respuesta inmune en la vacunación con DNA frente a virus, sino que también buscan una correlación de la protección frente a la infección con algún método más sencillo que pudiera utilizarse para predecir la eficacia de una vacuna.

A pesar de las expectativas creadas en cuanto a la transfección de células EPC como modelo *in vitro* para predecir el éxito de métodos de vacunación por inmersión en DNA (Fernández-Alonso *et al*., 1999; Fernández-Alonso *et al*., 1998), se ha demostrado que los estudios de transfección *in vitro* no son extrapolables. Sí son útiles para el estudio de algunos parámetros relacionados con el acceso del DNA al interior de las células. Los resultados negativos *in vivo* de expresión de GFP en truchas de 2 cm utilizando el mejor método *in vitro*

(reactivo fugene) corroboran esta falta de correlación (Tabla 8). Por ese motivo, no se ha utilizado el fugene en ensayos *in vivo* en vacunación/contraprueba. En el caso de los ultrasonidos se ha observado un comportamiento contrario, ya que a pesar de los excelentes resultados de protección *in vivo*, no hubo datos positivos *in vitro* (datos no mostrados). La falta de correlación *in vitro-in vivo* puede deberse a la distancia existente entre una monocapa celular y un organismo completo, con células, órganos, barreras, así como al medio de experimentación, bien delimitado en las células y muy variable en el caso del trabajo *in vivo*.

El uso del modelo GFP en truchas de 2 cm, así como la estimación del nivel de Acs anti-frg#11 en truchas inmunocompetentes de 7 cm, sí han logrado predecir los resultados que luego se han encontrado en estudios de vacunación/contraprueba. Los resultados obtenidos utilizando dicho modelo muestran que los niveles de expresión de la GFP son bajos, pero a la vista de los niveles de Acs y de los resultados de la contraprueba después de vacunación con G3-pcDNAI/Amp, son niveles suficientes para que funcione la presentación antigénica a las células del sistema inmune y para que esta presentación genere Acs y protección. Sin embargo, en el modelo GFP y truchas de 2 cm es más decisiva la duración del nivel de expresión de GFP para predecir tanto el nivel de Acs como el porcentaje de protección a la contraprueba. A mayor duración de la expresión de GFP mayores niveles de Acs y mayor protección inducida por la formulación utilizada. Esos Acs y protección, mayores y más reproducibles, sólo se obtuvieron usando ultrasonidos, mientras que cuando se utilizó DOTAP o bactofección los niveles de Acs y la protección no fueron significativamente diferentes con respecto a las truchas no vacunadas.

Por lo tanto, en cuanto a futuros estudios, deberían orientarse hacia el modelo en pequeña escala con truchas de 2 cm y utilizando genes marcadores. Se ha demostrado su alto valor predictivo, mayor que el de los ensayos *in vitro*, y son más prácticos que los experimentos con truchas más grandes. Sin embargo, dado que los ensayos con GFP requieren un excesivo tiempo y esfuerzo para su análisis cuantitativo, sería recomendable la sustitución de éstos por ensayos con βgal o luciferasa.

Tabla 8.

Resumen de los resultados obtenidos.

Método de vehiculización del DNA	*in vitro* EPC[a]	*in vivo* [b] 2 cm	*in vivo* [c] 5-7 cm	OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES
Fugene	+	–	ND	Comercialmente inviable
Lipofectamina	+	ND	ND	Comercialmente inviable
Lipofectina	+/–	ND	ND	Comercialmente inviable
Lípidos tfx	–	ND	ND	Comercialmente inviable
PolímeroVMMA-VP	–	–	ND	Inviable. Problemas de toxicidad
Sonicación	–[d]	+	+	**Resultados prometedores Continuar la investigación**
DOTAP	+/–	+	–	Estudiar más variables
Bactofección	ND	+	–	Posible viabilidad en otros vectores. Investigar más

[a], Transfección de células EPC.
[b], Experimentos con alevines inmunoincompetentes y GFP.
[c], Experimentos de vacunación/contraprueba con alevines inmunocompetentes y G de VSHV.
[d], Experimentos preliminares, a repetir para su confirmación.
-, Resultados negativos
+, Resultados positivos
ND, No se determinó.

5.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ULTRASONIDOS.

Se desconocen los mecanismos por los cuales los ultrasonidos pueden inducir la transfección en las células de la piel de las aletas de la trucha.

A nivel macroscópico se puede observar una liberación al medio acuoso del mucus que cubre las branquias y la superficie corporal de la trucha durante la aplicación de los ultrasonidos. La eliminación o disminución de la barrera física que constituye el mucus que rodea toda la superficie de la trucha podría facilitar el acceso del DNA a las células de la piel. Sin embargo, se desconoce si el DNA accedió a las células epiteliales de la trucha a través de las branquias y desde el sistema circulatorio o directamente desde el agua.

A nivel celular, la interacción de los ultrasonidos de baja frecuencia y duración con los tejidos vivos es compleja y poco estudiada en el caso de los peces. Se sabe que el ultrasonido penetra bien en los tejidos vivos, produciendo efectos térmicos, cavitacionales, relacionados con la presión osmótica, la tensión superficial y la adhesión de las células. La intensidad y duración de los ultrasonidos aplicados a la trucha en este trabajo no puede producir ni hipertermia (Diederich y Hynynen, 1999), ni daño por cavitación (Frenkel, Kimmel y Iger, 1999) en el epitelio externo de la piel, ya que su intensidad y duración están por debajo de los niveles que los provocan. Por otra parte, los ultrasonidos terapéuticos (~2 Wcm^{-2} a 3.000 KHz durante 30 a 90 s) producen un ensanchamiento del espacio intercelular así como la rotura de los microfilamentos de los desmosomas que conectan células adyacentes en el epitelio de la piel de carpa (Frenkel y Kimmel, 2000). En los experimentos que se mencionan en el presente trabajo se utilizaron 0,4-0,6 Wcm^{-2} a 40 KHz durante 6 s totales para truchas de 2 cm o 24 s totales para truchas de 5-7 cm. El tiempo de aplicación de los ultrasonidos a dichas intensidades se escogió como aproximadamente la mitad del tiempo al que los pulsos de ultrasonidos producían efectos deletéreos observables a simple vista en las truchas (hemorragias, desprendimiento de la mucosa, o muerte). A las intensidades y tiempos utilizados en este trabajo las truchas tratadas continuaron viviendo sin

alteraciones macroscópicas durante los 2-3 meses que duraron los experimentos más largos. A nivel celular se ha comprobado también que la aplicación de ultrasonidos a dichas intensidades y tiempos a una suspensión de células (EPC) no disminuía la capacidad de adhesión ni la viabilidad de éstas (datos no mostrados).

Las condiciones de aplicación de los ultrasonidos variaban con respecto a los experimentos detallados en otros trabajos, en cuanto a la superficie del baño, la existencia de barreras de vidrio (en el caso de las truchas de 2 cm), la distancia de la superficie de transducción a las truchas (variaba entre 0-8 cm) y el ángulo de aplicación de los ultrasonidos. Estas dos últimas variaciones se deben a que las truchas no se encontraban inmovilizadas como se han hecho los experimentos en otros trabajos (Frenkel y Kimmel, 2000; Martin, Pratt y Watmough, 1983), sino libres en el baño de ultrasonidos.

Dado que la perforación del espacio intercelular descrita en membranas celulares requiere intensidades mayores de ultrasonidos (2,2 Wcm^{-2} a 3.000 KHz duante 30 a 90 s) (Frenkel y Kimmel, 2000), no es probable que dicho efecto tenga algo que ver con la adquisición del DNA plasmídico por las células de la piel de la trucha en nuestros experimentos, pero se necesita más evidencia experimental para clarificar esta posibilidad. Esta perforación podría ser temporal y/o variar con la potencia aplicada, la duración de los pulsos, el tiempo entre pulsos, el momento de adición del DNA, así como pequeñas variaciones en la temperatura. Otros mecanismos pueden estar operando; de hecho, se ha descrito en tejido epitelial de mamíferos que los ultrasonidos afectan a las configuraciones lipídicas de las membranas celulares, desorganizando las bicapas (Mitragorri, Blankschtein y Langer, 1995), así como a la permeabilidad celular.

Existen muchas variables en un protocolo de tratamiento por ultrasonidos y sólo unas pocas se han estudiado en este trabajo. Todas estas variables se han mantenido constantes en nuestros experimentos, pero su estudio podría llevar a una optimización de la cantidad de DNA que accede al interior de las células, a una mayor expresión de la proteína G para ser presentada al sistema inmune y con ello una inducción de una respuesta inmune más eficaz en la contraprueba.

5.6. POSIBLE APLICACIÓN DE LA VACUNACIÓN POR INMERSIÓN UTILIZANDO ULTRASONIDOS EN ACUICULTURA.

La vacunación por inmersión tiene actualmente una gran proyección y aplicación en Acuicultura, ya que son métodos efectivos y prácticos para la vacunación en masa de peces. La mayoría de las vacunas bacterianas o bacterinas comerciales se administran de ordinario por este método. Es por lo tanto de gran interés práctico el continuar los estudios de vacunación DNA en esta línea, a la vista de los prometedores resultados de protección utilizando ultrasonidos.

El hecho de que los resultados en protección con liposomas o con bactofección no hayan sido satisfactorios, debido en parte a su variabilidad, no descarta el interés en continuar investigando en ellos. La bactofección con bacterias trasportando plásmidos con promotores eucarióticos de otros virus (Lewis y Babiuk, 1999) o de pez (Gómez-Chiarri y Chiaverini, 1999) sería útil para vacunar frente a gran variedad de enfermedades (el uso de bacterias recombinantes como vehículos de vacunas DNA es una de las tecnologías de la investigación actual en este tipo de vacunas en mamíferos). De todas las formulaciones que inducían expresión de GFP en truchas de 2 cm, probablemente sea la más barata y práctica. Sin embargo, es necesario elegir un vehículo bacteriano adecuado, ya que *E. coli* no indujo protección detectable en truchas inmunocompetentes. Quizás usando bacterias atenuadas que sean patógenos intracelulares de peces, como algunos géneros, especies y cepas de *Renibacterium, Yersinia,* o *Aeromonas*, u otros como *Salmonella* o *Listeria*, se puedan conseguir mejores resultados. De hecho, de alguno de estos géneros ya existen cepas atenuadas por modificación genética que pueden ser buenos vehículos vivos para DNA. Las dificultades son sin embargo abundantes; por ejemplo, los primeros intentos de transformar *Yersinia ruckeri* con G3-pcDNAI/Amp no tuvieron éxito (datos no mostrados).

Otra observación que se desprende del conjunto de los experimentos realizados tanto con genes marcadores como con la G de VSHV es que la mezcla de métodos de vacunación (por ejemplo, bactofección + ultrasonidos o DOTAP + ultrasonidos) disminuye tanto la expresión del

gen en cuestión como la eficacia del método y la respuesta de Acs y supervivencia a la contraprueba.

Sería interesante, aunque no se ha hecho en este trabajo, estudiar si después de la entrada del DNA en la célula hay inserción o no en el genoma celular, lo que posibilitaría una expresión más permanente del antígeno. En principio se han utilizado vectores de expresión transitoria, por lo que si hay detección de la expresión durante un tiempo largo, puede no deberse a una integración en el genoma celular. Esto es importante en el caso de plásmidos con promotores que no son de pez (la mayoría de los ensayos descritos se han hecho con el promotor de *Cytomegalovirus* y no es seguro utilizar dicho promotor), sobre todo a la hora de la posible comercialización de una vacuna. Habría que asegurar que no existe riesgo de integración y además utilizar promotores de pez, según los puntos a considerar en vacunas DNA de cara a la prevención de enfermedades infecciosas (FDA, Food y Drug Administration).

Aunque el uso de ultrasonidos de baja frecuencia podría ser de fácil escalado para uso práctico en granjas piscícolas, la cantidad de plásmido requerido parece ser excesiva para ello. Las concentraciones óptimas de DNA para cualquiera de los métodos de formulación que tuvieron éxito en expresión de GFP (ultrasonidos, DOTAP, bactofección) fue de ~10 μg/ml (Figura 33). Sería necesaria más investigación en orden a minimizar dicha cantidad, bien por modificación de las pautas de vacunación, por manipulación del plásmido introduciendo en la secuencia adyuvantes nuevos para hacerlo más eficaz, tales como genes de citokinas (Davis *et al*., 1997; Kim *et al*., 1998; Xiang *et al*., 1997) o motivos CpG (Kanellos *et al*., 1999c; Krieg *et al*., 1995) o usando promotores de pez que hagan más eficaz la transcripción (Garcia *et al*., 1994). Por otra parte, la permanencia sin alteración del DNA en el baño en el que se mantienen inmersas las truchas después del tratamiento con ultrasonidos (datos no mostrados), podría dirigir los ensayos futuros hacia la reutilización de las mismas soluciones de plásmidos para vacunar varios grupos de truchas en el mismo baño, dentro de un límite de tiempo y de uso, que habría que estudiar. Queda mucho trabajo todavía para hacer práctica una vacuna de este tipo ya que

también se deberían estudiar la duración óptima del tiempo de inmersión, el tamaño óptimo de los peces, los efectos del estrés, del pH y de la concentración de sales y de la temperatura del agua (Nakanishi y Ototake, 1997), así como las variables introducidas en la aplicación de los pulsos de ultrasonidos. No obstante los resultados de este trabajo han abierto un nuevo cauce para mejorar los métodos de vacunación de las especies piscícolas.

6. CONCLUSIONES.

1. La metodología desarrollada en este trabajo ha permitido seleccionar como potencialmente viables los siguientes métodos de vacunación DNA por inmersión en truchas: los ultrasonidos de baja frecuencia, los liposomas DOTAP y la bactofección.

2. Se ha aportado evidencia experimental para una posible sustitución del promotor de *Cytomegalovirus* (CMV) por el de uno de pez (FG2). Éste es uno de los requisitos para la posible comercialización de una vacuna DNA para peces, tanto si es inyectada como si es por inmersión.

3. Se ha obtenido una correlación entre los resultados utilizando el modelo *in vivo* del gen fluorescente GFP y truchas de 2 cm y los resultados con la vacunación DNA/contraprueba utilizando el gen G de VSHV y truchas de 7 cm. Los resultados del modelo con truchas inmunoincompetentes, por lo tanto, tienen valor predictivo sobre los resultados con los métodos de vacunación DNA en truchas inmunocompetentes de mayor tamaño. Ello permitirá simplificar los futuros ensayos para mejorar los métodos más prometedores antes de utilizar los costosos experimentos de vacunación/contraprueba.

4. También se ha demostrado el valor predictivo de los niveles de Acs específicos de trucha sobre su posterior comportamiento en ensayos de vacunación/contraprueba. Para ello se ha tenido que demostrar la validez del uso del antígeno recombinante frg#11 procedente de VSHV para pruebas ELISA como método de gran sensibilidad para estimación de los Acs específicos de trucha.

5. La mayor duración de la expresión del gen marcador GFP, los mayores niveles de inducción de Acs anti-frg#11 de VSHV y la mayor protección de truchas immunizadas con el gen G de VSHV, se han conseguido mediante la aplicación de vacunación DNA utilizando ultrasonidos de baja frecuencia. La continuación de estos estudios a pequeña y a gran escala podría llegar al diseño de un método económico y efectivo para vacunación de peces por inmersión.

7. BIBLIOGRAFÍA.

Anderson, E. D., Mourich, D. V., Fahrenkrug, S. C., LaPatra, S. C., Shepherd, J. y Leong, J. C. (1996). Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology Biotechnology* **5,** 114-122.

Anderson, E. D., Mourich, D. V. y Leong, J. C. (1996). Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Molecular Marine Biology Biotechnology* **5,** 105-113.

Archibald, D. D. y Mann, S. (1994). Self assembled microstructures from 1,2, ethanediol suspensions of pure and binary mixtures of neutral and acidic biological galactosylceramides. *Chemical Physics Lipids* **69,** 51-64.

Awad, M. A., Nusbaum, K. E. y Brady, Y. J. (1989). Preliminary studies of a newly developed subunit vaccine for channel catfish virus disease. *Aquatic Health* **1,** 233-237.

Bachman, M., Kalinke, U., Athage, A., Freer, G., Burkhart, C., Roost, H. P., Aguet, M., Hangartner, H. y Sinkernagel, R. M. (1997). The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* **276,** 2024-2027.

Barge, A., Gaudin, Y., Coulon, P. y Ruigrok, R. W. H. (1993). Vesicular stomatitis virus M2 protein may be inside the ribonucleocapsid coil. *Journal Virology* **67,** 7246-7253.

Basurco, B. (1990). Estudio, identificación y caracterización del virus de la septicemia hemorrágica vírica en España. *Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid***,** 178.

Basurco, B. y Benmansour, A. (1995). Distant strains of the fish rhabdovirus VSHV mantain a sixth functional cistron which codes for a nonstructural protein of unknown function. *Virology* **212,** 741-745.

Basurco, B. y Coll, J. M. (1989). Spanish isolates and reference strains of viral haemorrhagic septicaemia virus shown similar protein size patterns. *Bulletin European Association Fish Pathology* **9,** 92-95.

Basurco, B. y Coll, J. M. (1991). Pruebas de immunización-protección con los primeros aislados del virus de la septicemia hemorrágica viral de los peces en España. *Medicina Veterinaria* **8,** 341-348.

Basurco, B. y Coll, J. M. (1992). In vitro studies and in vivo immunisation with the first viral haemorrhagic septicaemia viruses isolated in Spain compared to international reference serotypes. *Research Veterinary Science* **53,** 93-97.

Basurco, B., Sanz, F., Marcotegui, M. A. y Coll, J. M. (1991). The free nucleocapsids of the viral haemorrhagic septicaemia virus contain two antigenically related nucleoproteins. *Archives Virology* **119,** 153-163.

Basurco, B., Yun, S. y Hedrick, R. P. (1993). Comparison of selected strains of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) using neutralizing trout antisera. *Diseases Aquatic Organisms* **15,** 229-233.

Baudin, F. L. (1987). IHN in France. *Bulletin European Association Fish Pathology* **7,** 104.

Bearzotti, M., Delmas, B., Lamoureux, A., Loustau, A. M., Chilmonczyk, S. y Brémont, M. (1999). Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *Journal Virology* **73,** 7703-7709.

Bearzotti, M., Monnier, A. F., Vende, P., Grosclaude, J., DeKinkelin, P. y Benmansour, A. (1995). The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. *Veterinary Research* **26,** 413-422.

Bearzotti, M., Perrot, E., Michard-Vanhee, C., Jolivet, G., Attal, J., Theron, M. C., Puissant, C., Dreano, M., Kopchick, J. J., Powell, R., Gannon, F., Houdebine, L. M. y Chourrout, D. (1992). Gene expression following transfection of fish cells. *Journal Biotechnology* **26,** 315-325.

Benmansour, A., Basurco, B., Monnier, A. F., Vende, P., Winton, J. R. y deKinkelin, P. (1997). Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Journal General Virology* **78,** 2837-2846.

Bernard, J. y De Kinkelin, P. (1985). Effect of UV irradiation of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus on virus-specific intracelular synthesis. *Annals Institute Pasteur/Virology* **136,** 213-222.

Bernard, J., LeBerre, M. B. y DeKinkelin, P. (1983). Viral haemorrhagic septicemia of rainbow trout: relation between the G polypeptide and antibody production of fish after infection with the F25 attenuated variant. *Infection Immunity* **39,** 7-14.

Bernard, J., Lecocq-Xhonneux, F., Rossius, M., Thiry, M. E. y De Kinkelin, P. (1990). Cloning and sequencing the messenger RNA of the N gene of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal General Virology* **71,** 1669-1674.

Betancourt, O. H., Attal, J., Théron, M. C., Puissant, C. y Houdebine, L. M. (1993). Efficiency of introns from various origins in fish cells. *Molecular Marine Biology Biotechnology* **2,** 181-188.

Bjorklund, H. V., Higman, K. H. y Kurath, G. (1996). The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses. *Virus Research* **42,** 65-80.

Boudinot, P., Blanco, M., DeKinkelin, 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.

Bovo, G., Giorgetti, G., Jorgensen, P. E. V. y Olesen, N. J. (1987). Infectious haematopoietic necrosis: first detection in Italy. *Bulletin European Association Fish Pathology* **7,** 62-63.

Bracci, L., Ballas, S. K., Spreafico, A. y Neri, P. (1997). Molecular mimicry between the rabies virus glycoprotein and human immunodeficiency virus-1 GP120: Cross-reacting antibodies induced by rabies vaccination. *Blood* **90,** 3623-3628.

Brañas, M. V., Coll, J. M. y Estepa, A. (1994). A sandwhich ELISA to detect VHSV and IPNV in turbot. *Aquaculture International* **2,** 206-217.

Broughan, J. H. y Wunner, W. H. (1995). Characterization of protein involvement in rabies virus binding to BHK-21 cells. *Archives Virology* **140,** 75-93.

Brunson, R., True, K. y Yancey, J. (1989). VHS virus isolated at Makah National Fish Hatchery. *American Fish Society Fish Health Newsletter* **17,** 3.

Cain, K. D., Byrne, K. M., Brassfield, A. L., Lapatra, S. E. y Ristow, S. S. (1999). Temperature dependent characteristics of a recombinant infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein produced in insect cells. *Diseases Aquatic Organisms* **36,** 1-10.

Castillo, A., López-Fierro, P., Zapata, A. y Razquin, B. (1991). Post-hatching development of the thymic epithelial cells in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: an ultrastructural study. *American Journal Anatomy* **190,** 299-307.

Castillo, A., Sánchez, C., Domínguez, J., Kaatari, S. L. y Villena, A. J. (1993). Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Developmental Comparative Immunology* **17,** 419-424.

Castric, J., Jeffroy, J., Bearzotti, M. y DeKinkelin, P. (1992). Isolation of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) from wild elvers *Anguilla anguilla*. *Bulletin European Association Fish Pathology* **12,** 21-23.

Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. y Cogoni, C. (2000). Gene silencing in worms and fungi. *Nature* **404,** 245.

Chilmonczyk, S. (1978). In vitro stimulation by mitogens of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Annals Immunology* **129,** 3-12.

Christie, K. E. (1996). Immunization with viral and parasite antigens: Infectious pancreatic necrosis. *International Symposium on Fish Vaccinology.Oslo, June 5-7.IABS* **Book Abstracts,** 29.

Coll, J. (1995a). Mapeo de epítopos neutralizantes contra el rabdovirus de la septicemia hemorrágica vírica (SHV) de salmónidos utilizando mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales. Aplicaciones en la prevención y diagnóstico de la enfermedad. *Investigacion Agraria* **10,** 41-52.

Coll, J. M. (1988). La Acuicultura en España. *Tecnología XXI* **7,** 2-5.

Coll, J. M. (1989). Low-background substrate buffer for peroxidase-o-phenylenediamine enzymeimmunoassays. *Revista Española Fisiología* **45,** 41-46.

Coll, J. M. (1995b). The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Archives Virology* **140,** 827-851.

Coll, J. M. (1995c). Heptad-repeat sequences in the glycoprotein of rhabdoviruses. *Virus Genes* **10,** 107-114.

Coll, J. M. (1996). Low-pH increases the binding of haemorrhagic septicemia rhabdovirus to membrane phospholipids. *Journal Fish Diseases* **18,** 519-527.

Coll, J. M. (1999a). Early steps in rhabdoviral infection. *Recent Research Developments Virology* **1,** 75-83.

Coll, J. M. (1999b). Prevalencia de las rabdovirosis en la Acuicultura Europea. *AquaTic* **6,** http://aquatic.unizar.es/n2/art602/rabdoUE.htm.

Conchas, R. F. y Carmiel, E. (1990). A highly efficient electroporation system for transformation of yersinia. *Journal Geneneral Virology* **87,** 133-137.

Congleton, J. y Sun, B. (1996). Interferon-like activity produced by anterior kidney leucocytes of rainbow trout stimulated in vitro by infectious hematopoietic necrosis virus or poly I:C. *Diseases Aquatic Organisms* **25,** 185-195.

Conzelmann, K. K. (1998). Non segmented negative-strand RNA viruses: Genetics and Manipulation of Viral Genomes. *Annual Reviews Genetics* **32,** 123-162.

Corbeil, S., LaPatra, S. E., Anderson, E. D. y Kurath, G. (2000). Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vaccine* **18,** 2817-2824.

Cornellis, P., Sierra, J. C., Lim, A., Malur, A., Tungpradabkul, S., Tazka, H., Leitao, A., Martins, C. V., Perna, C., Brys, L., DeBaetselier, P. y Hamers, R. (1996). Development of new cloning vectors for the production of immunogenic outer membrane fusion proteins in Escherichia coli. *Biotechnology* **14,** 203-208.

Cossarini-Dunier, M. (1985). Indirect enzyme immunosorbent assay (ELISA) to tritiate rainbow trout serum antibodies against two pathogens: Yersinia ruckeri and Egtved virus. *Aquaculture* **49,** 197-208.

Cox, G. J. M., Zamb, T. J. y Babiuk, L. A. (1993). Bovine herpesvirus 1: Immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *Journal Virology* **67,** 5664-5667.

Crook, K., Stevenson, B. J., Dubouchet, M. y Porteus, D. J. (1998). Inclusion of cholesterol in DOTAP transfection complexes increases the delivery of DNA to cells in vitro in the presence of serum. *Gene Therapy* **5,** 137-143.

Cutrin, J. M., Conchas, R. F., Barja, J. L. y Toranzo, A. E. (1994). Electroporation of Yersinia ruckeri by plasmid DNA. *Microbiologia seminarios* **10,** 69-82.

Davidson, G. A., Ellis, A. E. y Secombes, C. J. (1994). A preliminary investigation into the phenomenon of oral tolerance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 19729. *Fish Shellfish Immunology* **4,** 141-151.

Davis, H. L., Millan, C. L., Mancini, M., McCluskie, M. J., Hadchovel, M., Comanita, L., Tiollais, P., Whallen, R. G. y Micnel, M. L. (1997). DNA-based immunization against hepatitis B surface antigen (HBsAg) in normal and HBsAg transgenic mice. *Vaccine* **15,** 849-852.

DeKinkelin, P. (1972). Le virus D'Egtved.II-Purification. *Annals Recherche Vétérinary* **3,** 199-208.

DeKinkelin, P. y Bearzotti, M. (1981). Immunization of rainbow trout against viral hemorrhagic septicaemia (VHS) with a thermoresistant variant of the virus. *Developments Biological Standards* **49,** 431-439.

DeKinkelin, P., Bearzotti, M., Castric, J., Nougayrede, P., Lecocq-Xhonneux, F. y Thiry, M. (1995). Eighteen years of vaccination against viral haemorrhagic septicemia in France. *Veterinary Research* **26,** 379-387.

DeKinkelin, P. y Dorson, M. (1973). Interferon production in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus. *Journal General Virology* **19,** 125-127.

DeKinkelin, P., Geraed, J. P., Dorson, M. y Le Berre, M. (1977). Viral Haemorrhagic Septicemia: Demostration of a protective immune response following natural infection. *Fish Health News* **6,** 43-45.

DeKinkelin, P. y LeBerre, M. (1977). Demonstration de la protection de la truite arc-en-ciel contre la SHV para l'administration d'un virus inactivé. *Bulletin Office International Epizooties* **87,** 401-402.

DeKinkelin, P. y LeBerre, M. (1979). Mass virus production in fish cell system. *Developments Biological Standards* **42,** 99-104.

Diederich, C. J. y Hynynen, K. (1999). Ultrasound technology for hyperthermia. *Ultrasound Medical Biology* **25,** 871-887.

Dimytrenko, G. M. y Bloch, R. J. (1993). Evidence for transmembrane anchoring of extracellular matrix at acetylcholine receptor clusters. *Experimental Cell Research* **206,** 323-334.

Doms, R. W., Keller, D. S., Helenius, A. y Balch, W. E. (1987). Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly y transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *Journal Cell Virology* **105,** 1957-1969.

Doms, R. W., Lamb, R. A., Rose, J. K. y Helenius, A. (1993). Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193,** 545-562.

Dorson, M., Barde, A. y De Kinkelin, P. (1975). Egtved virus induced Rainbow trout serum interferon: some physicochemical properties. *Annals Microbiologie (Institute Pasteur)* **126,** 485-489.

Dorson, M., De Kinkelin, P. y Torchy, C. (1992). Interferon synthesis in rainbow trout fry following infection with infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunology* **2,** 311-313.

Dorson, M. y DeKinkelin, P. (1974). Mortalitet production d'interferon circulan chez la truite arc-en-ciel apres infection experimentale avec le virus d'Egtved:Influence de la temperature. *Annals Recherches Veterinary* **5,** 365-372.

Durrer, P., Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H., Graf, R. y Brunner, J. (1995). Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis viruses. *Journal Biological Chemistry* **270,** 17575-17581.

Einer-Jensen, K., Krogh, T. N., Roepstorff, P. y Lorenzen, N. (1998). Characterization of intramolecular disulphide bonds and secondary modifications of the glycoprotein from viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Journal Virology* **72,** 10189-10196.

Ellis, A. E. (1988a). Fish Vaccination. *Academic Press London***,** 300.

Ellis, A. E. (1988b). Ontogeny of the immune system in teleost fish. *Fish vaccination ed.A.E.Ellis, Academic Press***,** 20-31.

Emmenegger, E., Huang, C., Landolt, M., LaPatra, S. y Winton, J. R. (1995). Immune response to synthetic peptides representing antigenic sites on the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus. *Veterinary Research* **26,** 374-378.

Engelking, H. y Leong, J. C. (1989). The glycoprotein of Infectious Hematopoitic Necrosis Virus eluciting antibody and protective responses. *Virus Research* **13,** 213-230.

Engelking, H. M., Harry, J. B. y Leong, J. C. (1991). Comparison of representative strains of infectious hematopoietic necrosis virus by serological neutralization and cross-protection assays. *Applied Environmental Microbiology* **57,** 1372-1378.

Enzmann, H. y Konrad, M. (1993). Longevity of antibodies in brown trout and rainbow trout following experimental infection with VHS virus. *Bulleting European Association Fish Pathology* **13,** 193-194.

Enzmann, P. J., Maier, B. y Bigott, K. (1981). Biochemical data on the RNA of VHS-V and RVC indicating a possible serological relationship. *Bulletin European Association Fish Pathology* **1,** 37-39.

Estepa, A. (1992). Estudios de immunización con proteínas electroeluídas y clonadas del virus de la septicemia hemorrágica vírica de la trucha. *Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid***,** 243.

Estepa, A., Álvarez, F., Ezquerra, A. y Coll, J. M. (1999a). Viral-antigen dependence and T-cell receptor expression in leucocytes from rhabdovirus immunized trout. An in vitro model to study fish anti-viral responses. *Veterinary Inmunology Inmunopathology* **68,** 73-89.

Estepa, A., Álvarez, F., Villena, A. y Coll, J. M. (1996). Morphology of antigen-dependent haematopoietic cells from trout surviving rhabdoviral infections. *Bulletin European Association Fish Pathologists* **16,** 203-207.

Estepa, A., Basurco, B., Sanz, F. y Coll, J. M. (1991). Stimulation of adherent cells by the addition of purified proteins of viral haemorrhagic septicaemia virus to trout kidney cell cultures. *Viral.Immunol.* **4,** 43-52.

Estepa, A., Brémont, M., Fernández-Alonso, M. y Coll, J. M. (1999b). Aplicacion de rabdovirus DNA infectivo para el desarrollo de un nuevo vector para tratar ictiopatologías infecciosas. *Investigaciones Agrarias* **14,** 85-93.

Estepa, A. y Coll, J. M. (1991a). Infection of mitogen stimulated colonies from trout kidney cell cultures with salmonid viruses. *Journal Fish Diseases* **14,** 555-562.

Estepa, A. y Coll, J. M. (1991b). Infection of trout kidney cells with infectious pancreatic necrosis and viral haemorrhagic septicaemia viruses. *Bulletin European Association Fish Pathologists* **11,** 101-104.

Estepa, A. y Coll, J. M. (1992a). In vitro immunostimulants for optimal responses of kidney cells from healthy trout and from trout surviving viral haemorrhagic septicaemia virus disease. *Journal Fish Shellfish Immunology* **2,** 53-68.

Estepa, A. y Coll, J. M. (1992b). Mitogen-Induced proliferation of trout kidney leucocytes by one-step culture in fibrin clots. *Veterinary Immunology Immunopathology* **32,** 165-177.

Estepa, A. y Coll, J. M. (1996a). Pepscan mapping and fusion related properties of the major phosphatidylserine-binding domain of the glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus, a salmonid rhabdovirus. *Virology* **216,** 60-70.

Estepa, A. y Coll, J. M. (1996b). Phosphatidylserine binding to solid-phase peptides: a new method to study phospholipid/viral protein interactions. *Journal Virological Methods* **61,** 37-45.

Estepa, A. y Coll, J. M. (1997a). An in vitro method to obtain T-lymphocyte like cells from the trout. *Journal Immunological Methods* **202,** 77-83.

Estepa, A. y Coll, J. M. (1997b). Temperature and pH requirements for viral haemorrhagic septicemia virus induced cell fusion. *Diseases Aquatic Organisms* **28,** 185-189.

Estepa, A., Frías, D. y Coll, J. M. (1993). In vitro susceptibility of rainbow trout fin cell lines to viral haemorrhagic septicaemiza virus. *Diseases Aquatic Organisms* **15,** 35-39.

Estepa, A., Lorenzo, G. y Coll, J. M. (1994). Revisión sobre inmunización con plásmidos de expresión transitoria. *Investigacion Agraria* **9,** 261-268.

Estepa, A., Thiry, M. y Coll, J. M. (1994). Recombinant protein fragments from haemorrhagic septicaemia rhabdovirus stimulate trout leucocyte anamnestic in vitro responses. *Journal General Virology* **75,** 1329-1338.

Fernández-Alonso, M., Álvarez, F., Estepa, A., Blasco, R. y Coll, J. M. (1999). A model to study fish DNA inmersion-vaccination by using the green fluorescent protein. *Journal Fish Diseases* **22,** 237-241.

Fernández-Alonso, M., Álvarez, F., Estepa, A. y Coll, J. M. (1998). Vacunas DNA en Acuicultura. *AquaTIC* **4,** http://aquatic.unizar.es/N1/art401/DNA_vac.htm.

Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. y eds. (1996). Fields Virology. *Philadelphia: Lippincott.*

Fijan, N., Petrinec, Z., Sulimanovic, D. y Zwillenberg, L. O. (1971). Isolation of the viral causative agent from the acute form of infection dropsy of carp. *Veterinarsky Archives* **41,** 125-138.

Fijan, N., Sulimanovic, D., Bearzotti, M., Muzinic, D., Zwillenberg, L. O. Z., Chilmonczyk, S., Vautherot, J. F. y Kinkelin, P. (1983). Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Annals Virology (Institute Pasteur)* **134,** 207-220.

Frenkel, V. y Kimmel, E. (2000). Ultrasound-induced intercellular space widening in fish epidermis. *Ultrasound Medical Biology* **26,** 473-480.

Frenkel, V., Kimmel, E. y Iger, Y. (1999). Ultrasound-induced cavitation damage to external apithelia of fish skin. *Ultrasound Medical Biology* **25,** 1295-1303.

Frerichs, G. N. (1989). Rhabdoviruses of fishes. *Viruses of lower vertebrates. Ahne,W.& Kurstak,E.eds. Springer, Berlin* **1,** 27-32.

Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. y Moss, B. (1986). Eukaryotis transient expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings National Academy Sciences USA* **83,** 8122-8126.

Garcia, B. D., Martínez, R., Hernandez, O., LLeonart, R. y DelaFuente, J. (1994). Differences in transient expression directed by heterologous promoter and enhancer sequences in fish cells and embryos. *Journal Marine Biotechnology* **1,** 203-205.

Gastka, M., Horvath, J. y Lentz, T. L. (1996). Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit demonstrated by virus overlay protein binding assay. *Journal General Virology* **77,** 2437-2440.

Gaudin, Y. (1997). Folding of rabies virus glycoprotein: epitope acquisition and interaction with endoplasmic reticulum chaperones. *Journal Virology* **71,** 3742-3750.

Gaudin, Y., DeKinkelin, P. y Benmansour, A. (1999). Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish and the pH threshold for membrane fusion. *Journal General Virology* **80,** 1221-1229.

Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H., Knossow, M. y Flamand, A. (1993). Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *Journal Virology* **67,** 1365-1372.

Gaudin, Y., Tuffereau, C., Benmansour, A. y Flamand, A. (1991). Fatty acylation of rabies virus proteins. *Virology* **184,** 441-444.

Gauvry, L., Ennion, S., Hansen, E., Butterworth, P. y Goldspink, G. (1996). Cloning and characterization of a carp myosin heavy chain gene promoter region. *European Journal Biochemistry*.

Gilmore, R. D. J., Engelking, H. M., Manning, D. S. y Leong, J. C. (1988). Expression in Escherichia coli of an epitope of the glycoprotein of infectious haematopoietic necrosis virus protects against challenge. *Biotechnology* **6,** 295-300.

Gómez-Chiarri, M. y Chiaverini, L. A. (1999). Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture. *Genetic analysis: Biomolecular Engineering* **15,** 121-124.

Gómez-Chiarri, M., Livingston, S. K., Muro-Cacho, C., Sanders, S. y Levine, R. P. (1996). Introduction of foreign genes into the tissue of live fish by direct injection and particle bombardment. *Diseases Aquatic Organisms* **27,** 5-12.

Grace, M. F. y Manning, M. J. (1980). Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, S*almo gairdneri*. *Developmental Comparative Immunology* **4,** 255-264.

Gregoriadis, G., Saffie, R. y BriandeSouza, J. (1997). Liposome-mediated DNA vaccination. *FEBS Letters* **402,** 107-110.

Grifantini, R., Finco, O., Bartolini, E., Draghi, M., Giudice, D. G., Kocken, C., Thomas, A., Abrignani, S. y Grandi, G. (1998). Multi-plasmid DNA vaccination avoids antigenic competition and enhances immunogenicity of a poorly immunogenic plasmid. *European Journal Immunology* **28,** 1225-1232.

Gudding, R., Lillehaugh, A. y Evensen, O. (1999). Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Inmunology Immunopathology* **72,** 203-212.

Hanham, C. A., Zhao, F. y Tignor, G. H. (1993). Evidence from the anti-idiotypic network that the acetylcholine receptor is a rabies virus receptor. *Journal Virology* **67,** 530-542.

Hansen, E., Fernandes, K., Goldspink, G., Buterworth, P., Umeda, P. K. y Chang, K.C. (1991). Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *Febs Letters* **290,** 73-76.

Hattenberg-Baudoy, A. M., Danton, M., Merle, G. y DeKinkelin, P. (1995). Serum neutralization test for epidemiological studies of salmonid rhabdoviroses in France. *Veterinary Research* **26,** 512-520.

Heike, S., Egbert, M. y Mettenleiter. (1999). Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus genes* **19,** 59-65.

Helmick, C. M., Bailey, J. F., LaPatra, S. y Ristow, S. (1995). The esophagus/cardiac stomach region: site of attachment and internalization of infectious hematopoietic necrosis virus in challenged juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and coho salmon *O. kisutch*. *Diseases Aquatic Organisms* **23,** 189-199.

Heppell, J., Lorenzen, N., Armstrong, N. K., Wu, T., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Ahrens, P., Schorr, J. y Davis, H. L. (1998). Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicemia virus genes as model. *Fish Shellfish Immunology* **8,** 271-287.

Hill, B. J., Underwood, B. O., Smale, C. J. y Brown, F. (1975). Physico-chemical and serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. *Journal General Virology* **27,** 369-378.

Hopper, K. (1989). The isolation of VHSV from salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. *American Fish Society Fish Health Newsletter* **17,** 1.

Horne, M. T., Tatner, M., McDerment, S., Agius, C. y Ward, P. (1982). Vaccination of rainbow trout, S*almo gairdneri*, Richardson, at low temperatures and the long persistence of protection. *Journal Fish Diseases* **5,** 343-345.

Hsu, Y. L., Engelking, H. M. y Leong, J. C. (1986). Ocurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish. *Applied Environmental Microbiology* **52,** 1353-1361.

Huang, L. y Li, S. (1997). Liposome gene delivery: A complex package. *Nature Biotechnology* **15,** 620-621.

Inonue, K., Yamashita, S., Hata, J., Kabeno, S., Asada, S., Nagahisa, E. y Fugita, T. (1990). Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Differentiation Development* **29,** 123-128.

Johnson, K. A., Flynn, J. K. y Amend, D. F. (1982). Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins. *Journal of Fish Diseases* **5,** 207-212.

Johnson, K. A., Flynn, J. K. y Amene, D. F. (1982). Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio angillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins. *Journal Fish Diseases* **5,** 197-205.

Johnson, M. C., Maxwell, J. M., Loh, P. C. y Leong, J. C. (1999). Molecular characterization of the glycoproteins from two warm water rhabdoviruses: snakehead rhabdovirus (SHRV) and rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS)/spring viremia of carp virus (SVCV). *Virus Research* **64,** 95-106.

Jones, D. H., Corris, S., McDonald, S., Clegg, J. C. S. y Farrar, G. H. (1997). Poly (DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration. *Vaccine* **15,** 814-817.

Jorgensen, P. E. V., Einer-Jensen, K., Higman, K. H. y Winton, J. R. (1995). Sequence comparison of the central region of the glycoprotein gene of neutralizable, non-neutralizable and serially passed isolates of viral haemorrhagic septicemia virus. *Diseases Aquatic Organisms* **23,** 77-82.

Kanellos, T., Sylvester, I. D., Ambali, A. G., Howard, C. R. y Rusell, P. H. (1999a). The safety and longevity of DNA vaccines for fish. *Immunology* **96,** 307-313.

Kanellos, T., Sylvester, I. D., Howard, C. R. y Rusell, P. H. (1999b). DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish. *Vaccine* **17,** 965-972.

Kanellos, T. S., Sylvester, I. D., Butler, V. L., Ambali, A. G., Partidos, C. D., Hamblin, A. S. y Russell, P. H. (1999c). Mammalian granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and some CpG motifs have an effect on the immunogenicity of DNA and subunit vaccines in fish. *Immunology* **96,** 507-510.

Kazmierski, W. M., Hazen, R. J., Aulabaugh, A. y StClair, H. (1996). Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 derived from gp41 transmembrane protein: structure-activity studies. *Journal Medical Chemistry* **39,** 2681-2689.

Kim, J. J., Trivedi, N. N., Nothingham, L. K., Morrison, L., Tsai, A., Hu, Y., Mahalinggam, S., Dang, K., Ahn, L., Doyle, N. K., Wilson, D. M., Chatetergoon, M. A., Chalian, A. A., Boyer, J. D., Agadjanyan, M. G. y Weiner, D. B. (1998). Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens. *European Journal Immunology* **28,** 1089-1103.

Klavinkis, L. S., Gao, L., Barnfield, C., Lehner, T. y Parker, S. (1997). Mucosal immunization with DNA-liposome complexes. *Vaccine* **15,** 818-820.

Klinman, D. M., Sechler, J. M. G., Conover, J., Gu, M. y Rosenberg, A. S. (1998). Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *Journal Immunology* **160,** 2388-2392.

Koener, J. F. y Leong, J. C. (1990). Expresion of the glycoprotein gene from a fish rhabdovirus by using baculovirus vectors. *Journal Virology* **64,** 428-430.

Koener, J. F., Passavant, C. W., Kurath, G. y Leong, J. (1987). Nucleotide sequence of a cDNA clone carrying the glycoprotein gene of Infectious Haematopoietic Necrosis virus,a fish rhabdovirus. *Journal Virology* **61,** 1342-1349.

Konieczko, E. M., Whitaker-Dowling, P. A. y Widnell, C. C. (1994). Membrane fusion as a determinant of the infectibility of cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* **199,** 200-211.

Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. y Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374,** 546-549.

Kurath, G., Higman, K. H. y Bjorklund, H. V. (1995). The NV genes of fish rhabdoviruses: development of RNase protection assays for rapid assesment of genetic variation. *Veterinary Research* **26,** 477-485.

Lam, A. M. I. y Cullis, P. R. (2000). Calcium enhances the transfection potency of plasmid DNA-cationic liposome complexes. *Biochimical Biophysical Acta* **1463,** 279-290.

Lambert, D. M., Barney, S., Lambert, A. L., Guthrie, K., Medinas, R., Davis, D. E., Bucy, T., Erickson, J., Merutka, G. y Petteway, S. R. (1996). Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proceedings National Academy Sciences USA* **93,** 2186-2191.

LaPatra, S. E., Lauda, K. A. y Jones, G. R. (1994). Antigenic variants of infectious hematopoietic necrosis virus and implications for vaccine development. *Diseases Aquatic Organisms* **20,** 119-126.

LaPatra, S. E., Lauda, K. A., Jones, G. R., Walker, S. C. y Shewmaker, W. D. (1994). Development of passive immunoterapy for control of infectious hematopoietic necrosis. *Diseases Aquatic Organisms* **20,** 1-6.

Lavelle, E. C., Jenkins, P. G. y Harris, J. E. (1997). oral immunization of rainbow trout with antigen microencapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles. *Vaccine* **15,** 1070-1078.

Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A. y Rose, J. K. (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proceedings National Academy Sciences USA* **92,** 4477-4481.

LeBerre, M., De Kinkelin, P. y Metzger, A. (1977). Identification sérologique des rhabdovirus des salmonidés. *Bulletin Office International Epizooties* **87,** 391-393.

Lecocq-Xhonneux, F., Thiry, M., Dheur, I., Rossius, M., Vanderheijden, N., Martial, J. y DeKinkelin, P. (1994). A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. *Journal General Virology* **75,** 1579-1587.

Lentz, T. L., Benson, J. J., Klimowicz, D., Wilson, P. T. y Hawrot, E. (1986). Binding of rabies virus to purified Torpedo acetylcholine receptor. *Molecular Brain Research* **1,** 211-219.

Lentz, T. L., Burrage, T. G., Smith, A. L., Crick, J. y Tignor, G. H. (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies receptor? *Science* **215,** 182-184.

Leong, J. A. y Munn, C. B. (1991). Potencial uses of recombinant DNA in development of fish vaccines. *Bulletin Europpean Association Fish Pathology* **11,** 30-40.

Leong, J. C., Bootland, L., Anderson, E., Chiou, P. W., Drolet, B., Kim, C., Lorz, H., Mourich, D., Ormonde, P., Pérez, L. y Trobridge, G. (1995). Viral vaccines for aquaculture. *Journal Marine Biotechnology* **3,** 16-23.

Leong, J. C. y Fryer, J. L. (1993). Viral vaccines for aquaculture. *Annual Review Fish Diseases* **-,** 225-240.

Leong, K., Ramsay, A. J., Boyle, D. B. y Ramshaw, I. A. (1994). Selective induction of immune responses by cytokines coexpressed in recombinant fowlpox virus. *Journal Virology* **68,** 8125-8130.

Lewis, P. J. y Babiuk, L. A. (1999). DNA vaccines: a review. *Advances in Virus Research. ed.Maramorosch,K.,Murphy,F.A. y Shatkin,A.J.* **54,** 129-188.

Liu, M. A., Hilleman, M. R. y Kurth, R. (1995). DNA vaccines. A new era in vaccinology. *Annals New York Academy Sciences* **772,** 1-294.

Lorenzen, N., Lorenzen, E., Eoner-jensen, K., Heppell, J., Wu, T. y Davis, H. (1998). Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunology* **8,** 261-270.

Lorenzen, N. y Olesen, N. J. (1995). Multiplication of VHS virus in insect cells. *Veterinary Research* **26,** 428-432.

Lorenzen, N., Olesen, N. J. y Koch, C. (1999). Inmunity to VHS virus in rainbow trout. *Aquaculture* **172,** 41-61.

Lorenzen, N., Olesen, N. J. y Vestergaard-Jorgensen, P. E. (1990). Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *Journal General Virology* **71,** 561-567.

Lorenzen, N., Olesen, N. J., Vestergaard-Jorgensen, P. E., Etzerodt, M., Holtet, T. L. y Thorgersen, M. C. (1993). Molecular cloning and expression in Escherichia coli of the glycoprotein gene of VHS virus and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *Journal General Virology* **74,** 623-630.

Lorenzo, G., Estepa, A., Chilmonczyk, S. y Coll, J. M. (1995a). Mapping of the G and N regions of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) inducing lymphoproliferation by pepscan. *Veterinary Research* **26,** 521-525.

Lorenzo, G., Estepa, A. y Coll, J. M. (1996). Fast neutralization/immunoperoxidase assay for viral haemorrhagic septicemia with anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *Journal Virological Methods* **58,** 1-6.

Lorenzo, G. A., Estepa, A., Chilmonczyk, S. y Coll, J. M. (1995b). Different peptides from haemorrhagic septicemia rhabdoviral proteins stimulate leucocyte proliferation with individual fish variation. *Virology* **212,** 348-355.

Lu, Y. y Loh, P. C. (1994). Viral structural proteins and genome analysis of the rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS). *Diseases Aquatic Organisms* **19,** 187-192.

Lu, Y., Loh, P. C. y Nadala, E. C. B. (1994). Serological studies of the rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS) and its relationship to three other fish rhabdoviruses. *Journal Fish Diseases* **17,** 303-309.

MacLaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M. y Rolland.A.P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal Controlled Release* **56,** 259-272.

Magee, A. I., Koyama, A. H., Malfer, C., Wen, D. y Schlesniger, M. J. (1984). Release of fatty acids from virus glycoproteins by hydroxylamine. *Biochimical Biophysical Acta* **798,** 156-166.

Manning, M. J., Grace, M. F. y Secombes, C. J. (1982). Ontogenic aspects of tolerance and immunity in carp and rainbow trout: studies on the role of the thymus. *Developmental Comparative Immunology* **2,** 75-82.

Marcotegui, M. A., Estepa, A., Frías, D. y Coll, J. M. (1992). First report of a rhabdovirus affecting carps in Spain. *Bulletin European Association Fish Pathology* **12,** 50-52.

Martin, C. J., Pratt, B. M. y Watmough, D. J. (1983). Observations of ultrasound-induced effects in the fish *Xiphophorus maculatus*. *Ultrasound Medical Biology* **9,** 177-183.

Martínez, J. A. y Coll, J. M. (1988). Selection and performance of monoclonal anti-C-reactive protein in ELISA quantitative assay. *Clinical Chemistry Acta* **176,** 123-132.

Maulen, N. P., Morales, P. J., Aruti, D., Figueroa, J. E., Concha, M. I., Krauskopf, M. y Leon, G. (1996). Identification of a *Renibacterium salmoninarum* DNA fragment associated with bacterial internalization into CHSE-cultured cells. *FEMS Microbiology letters* **135,** 37-43.

McAllister, P. E., Schill, W. B., Owens, W. J. y Hodge, D. L. (1991). Infectious pancreatic necrosis virus: a comparison of methods used to detect and identify virus in fluids and tissues os fish. In proceedings of II International Symposium on Viruses of Lower Vertebratges. *Oregon State University.Corvallis,Oregon.USA.* **-,** 191-201.

McGarvey, P. B., Hammond, J., Dienelt, M. M., Hooper, D. C., Fu, Z. F., Dietzschold, B., Koprowski, H. y Michaels, F. H. (1995). Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology* **13,** 1484-1487.

Mebatsion, T., Schnell, M. J., Cox, J. H., Finke, S. y Conzelmann, K. K. (1996). Highly stable expression of a foreign gene from rabies virus vectors. *Proceedings National Academy Sciences USA* **93,** 7310-7314.

Midtlying, P. J. y Lillehaug, A. (1998). Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Diseases Aquatic Organisms* **32,** 91-97.

Mitragorri, S., Blankschtein, D. y Langer, R. (1995). Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. *Science* **269,** 850-853.

Moav, B., Liu, Z., Groll, Y. y Hackett, P. B. (1992). Selection of promoters for gene transfer into fish. *Molecular Marine Technology Biotechnology* **1,** 338-345.

Morzunov, S. P., Winton, J. R. y Nichol, S. T. (1995). The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Research* **38,** 175-192.

Muller, M. y Brem, G. (1996). Intracellular, genetic or congenital immunization-transgenic approaches to increase disease resistance of farm animals. *Journal Biotechnology* **44,** 233-242.

Nakanishi, T., Aoyagi, K., Xia, C., Dijkstra, J. M. y Ototake, M. (1999). Specific cell-mediated immunity in fish. *Veterinary Immunology Immunopathology* **72,** 101-109.

Nakanishi, T. y Ototake, M. (1997). Antigen uptake and inmune responses after immersion vaccination. *Developmental Biological Standard* **90,** 59-68.

Neukirch, M. (1984). An experimental study of the entry and multiplication of viral haemorrhagic septicaemia virus in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Rich.) after water-borne infection. *Journal Fish Diseases* **7,** 231-234.

Nichol, S. T., Rowe, J. E. y Winton, J. R. (1995). Molecular epizootiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Virus Research* **38,** 159-173.

Noonan, B., Enzmann, P. J. y Trust, T. J. (1995). Recombinant infectious necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus glycoprotein epitopes expressed in *Aeromonas salmonicida* induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Applied Environmental Microbiology* **61,** 3586-3591.

Núñez, E., Fernández, A. M., Estepa, A., González-Ros, J. M., Gavilanes, F. y Coll, J. M. (1998). Phospholipid interactions of a peptide from the heptad-repeats of the glycoprotein of VHSV, a fish rhabdovirus. *In Press*.

Nussbaum, O., Broder, C. C. y Berger, E. A. (1994). Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion-dependent reporter gene activation. *Journal Virology* **68,** 5411-5422.

Olesen, N., J,, Lorenzen, N. y Vestergaard-Jorgensen, P. E. (1991). Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF) and plaque neutralization tests (50% PNT. *Diseases Aquatic Organisms* **10,** 31-38.

Olesen, N. J., Ariel, E. y Slierendrecht, W. (1998). Report of the second annual meeting of EU National Reference Laboratories for Fish Diseases. *Bruxelles,Belgium* **Sept 15-16,** 21.

Olesen, N. J. y Korsholm, H. (1997). Control measures for viral diseases in Aquaculture: eradication of VHS and IHN. *Bulletin European Association Fish Pathologists* **17,** 229-233.

Olesen, N. J., Lorenzen, N. y Jorgensen, P. E. V. (1993). Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Diseases Aquatic Organisms* **16,** 163-170.

Olesen, N. J. y Vestergard-Jorgensen, P. E. (1986). Detection of neutalizing antibody to Egtved virus in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by plaque neutralization test with complement addition. *Journal Applied Icthyology* **2,** 33-41.

Oshima, K. H., Arakawa, C. K., Higman, K. H., Landolt, M. L., Nichol, S. T. y Winton, J. R. (1995). The genetic diversity and epizootiology of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Research* **35,** 123-141.

Oshima, K. H., Higman, K. H., Arakawa, C. K., DeKinkelin, P., Jorgensen, P. E. V., Meyers, T. R. y Winton, J. R. (1993). Genetic comparison of viral hemorrhagic septicemia virus isolates from North America and Europe. *Diseases Aquatic Organisms* **17,** 73-80.

Powers, D. A., Hereford, L., Cole, T., Creech, K., Chen, T. T., Lin, C. M., Kight, K. y Dunham, R. A. (1992). Electroporation: A method for transferring genes into gametes of zebra fish (Brachydanio rerio) channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Molecular Marine Technology Biotechnology* **1,** 301-308.

Queiroz, A. A. A., Gallardo, A. y SanRoman, J. (2000). Vinylpyrrolidone-N'N-dimethylacrylamide water soluble copolymers: synthesis, physical-chemical properties and proteic interactions. *submitted*.

Rabenstein, M. y Shin, Y. K. (1995). A peptide from the heptad repeat of human immunodeficiency virus gp41 shows both membrane binding and coiled-coil formation. *Biochemistry* **34,** 13390-13397.

Raz, E., Watanabe, A., Baird, S. M., Eisenberg, R. A., Parr, T. B., Lotz, M., Kipps, T. J. y Carson, D. A. (1993). Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *Proceedings National Academy Sciences USA* **90,** 4523-4527.

Renault, T., Torchy, C. y De Kinkelin, P. (1991). Spectrophotometric method for titration of trout interferon and its application to rainbow trout fry experimentally infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. *Diseases Aquatic Organisms* **10,** 23-29.

Rodríguez, S., Vilas, M. P., Alonso, M. y Pérez, S. I. (1995). Study of a viral-dual infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by seroneutralization, Western blot and polymerase chain reaction assays. *Microbiologia Sem* **11,** 461-470.

Rogel-Gaillard, C., Chilmonczyk, S. y De Kinkelin, P. (1993). In vitro induction of interferon-like activity from rainbow trout leucocytes stimulated by Egtved virus. *Journal Fish Shellfish Immunology* **3,** 382-394.

Sadaghiani, B., Crawford, B. J. y Vielkind, J. R. (1994). Generation of poly- and monoclonal antibodies against trout fibronectin (FN) and their use in FN immunodetection in teleost fishes. *Biochemical Cell Biology* **72,** 343-348.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.

Sánchez, C. (1992). Análisis estructural y antigénico de las immunoglobulinas de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*,W.). *Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid***,** 213-214.

Sánchez, C., Coll, J. M. y Domínguez, J. (1991). One step purification of raimbow trout immunoglobulin. *Veterinary Immunology Immunopathology* **27,** 383-392.

Sanz, F. y Coll, J. M. (1992a). Detection of viral haemorrhagic septicemia virus by direct immunoperoxidase with selected anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *Bulletin European Association Fish Pathologists* **12,** 116-119.

Sanz, F. y Coll, J. M. (1992b). Neutralizing-Enhancing Monoclonal Antibody Recognizes the Denatured Glycoprotein of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus. *Archives of Virology* **127**(1-4)**,** 223-232.

Sanz, F. A. y Coll, J. M. (1992c). Detection of hemorrhagic virus of samonid fishes by use of an enzyme-linked immunosorbent assay containing high sodium chloride concentration and two concompetitive monoclonal antibodies against early viral nucleoproteins. *American Journal Veterinary Research* **53,** 897-903.

Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A. y Raz, E. (1996). Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **273,** 352-354.

Scapigliati, G., Romano, N. y Abelli, L. (1999). Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes. *Aquaculture* **172,** 3-28.

Schijns, V. E. C. J., Claassen, I. J. T. M., Vermeulen, A. A., Horzinek, M. C. y Osterhaus, A. D. M. E. (1994). Modulation of antiviral immune responses by exogenous cytokines: effects of tumour necrosis factor-, interleukin-2 and interferon-y on the immunogenicity of an inactivated rabies vaccine. *Journal General Virology* **75,** 55-63.

Schlotfeldt, H. J., Ahne, W., Vestergard-Jorgensen, P. E. y Glende, W. (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (Scophthalmus maximus)-A natural outbreak. *Bulletin European Association Fish Pathology* **11,** 105-107.

Schnell, M. J., Mebatsion, T. y Conzelmann, K. K. (1994). Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO Journal* **13,** 4195-4203.

Schutze, H., Enzmann, P. J., Kuchling, R., Mundt, E., Niemann, N. y Mettenleiter, T. C. (1995). Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal General Virology* **76,** 2519-2527.

Shokralla, S., Chernish, R. y Ghosh, H. P. (1999). Effects of double-site mutations of vesicular stomatitis virus glycoprotein G on membrane fusion activity. *Virology* **256,** 119-129.

Sizemore, D. R., Branstrom, A. A. y Sadoff, J. C. (1995). Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated Immunization. *Science* **270,** 299-302.

Snegaroff, J. (1993). Induction of interferon synthesis in rainbow trout leucocytes by various homeotherm viruses. *Journal Fish Shellfish Immunology* **3,** 191-198.

Snow, M., Cunningham, C. O., Melvin, W. T. y Kurath, G. (1999). Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment. *Virus Research* **63,** 35-44.

Stet, R. J. M. y Egberts, E. (1991). The histocompatibility system in teleostean fihes: From multiple histocompatibility loci to a major histocompatibility complex. *Journal Fish Shellfih Immunology* **1,** 1-16.

Szelei, J., Varadi, L., Muller, F., Erdelyi, F., Orban, L., Horvath, L. y Duda, E. (1994). Liposome-mediated gene transfer in fish embryos. *Transgenic Research* **3,** 116-119.

Tamai, T., Shirahata, S., Sato, N., Kimura, S., Nonaka, M. y Murakami, H. (1993). Purification and characterization of interferon-like antiviral protein derived from flatfish (*Paralichthys olivaceus*) lymphocytes immortalized by oncogenes. *Cytotechnology* **11,** 121-127.

Tatner, M. F. (1985). The migration of labelled thymocytes to the peripheral lymphoid organs in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. *Developmental Comparative Immunology* **9,** 85-91.

Tatner, M. F. (1986). The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Veterinary Immunology Immunopathology* **12,** 93-105.

Tatner, M. F. y Horne, M. T. (1984). The effects of early exposure to *Vibrio anguillarum* in post-hatching rainbow trout fry, *Salmo gairdneri*, Richardson. *Aquaculture* **41,** 193-202.

Tatner, M. F. y Manning, M. J. (1983). Growth of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, from one to 15 months of age. *Journal Zoology London* **199,** 503-520.

Tatner, M. F. y Manning, M. J. (1985). The ontogenetic development of the reticuloendothelial system in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. *Journal Fish Diseases* **8,** 35-41.

Templeton, N. S., Lasic, D. D., Frederick, P. M., Strey, H. H., Roberts, D. D. y Pavlakis, G. (1997). Improved DNA:liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nature Biotechnology* **15,** 647-652.

Tengelsen, L. A., Trobidge, G. D. y Leong, J. C. (1991). Characterization of an inducible B-interferon-like antiviral activity in salmonids. *Proceeding Second International Symposium Viruses Lower Vertebrates, Corvallis***,** 219-226.

Thiry, M., Lecoq-Xhonneux, F., Dheur, I., Renard, A. y Kinkelin, D. (1991a). Molecular cloning of the m-RNA coding for the G protein of the viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of salmonids. *Journal Veterinary Microbioogy* **23,** 221-226.

Thiry, M., Lecoq-Xhonneux, F., Dheur, I., Renard, A. y Kinkelin, D. (1991b). Sequence of a cDNA carrying the glycoprotein gene and part of the matrix protein M2 gene of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *Biochimica Biophysica Acta* **1090,** 345-347.

Tordo, N., Bourhy, H., Sather, S. y Ollo, R. (1993). Structure and expression in baculovirus of the Mokola virus glycoprotein: an efficient recombinant vaccine. *Virology* **194,** 59-69.

Traxler, G. S., Anderson, E., LaPatra, S. E., Richard, J., Shewmaker, B. y Kurath, G. (1999). Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV. *Diseases Aquatic Organisms* **38,** 183-190.

Trobridge, G. D., Chiou, P. P. y Leong, J. C. (1997). Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells. *Journal Virology* **71,** 5304-5311.

Trobridge, G. D. y Leong, J. C. (1995). Characterization of a rainbow trout Mx Gene. *Journal Interferon Cytokine Research* **15,** 691-702.

Ulmer, J. B., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Donnelly, J. J. y Liu, M. A. (1996). Generation of MHC class-I restricted T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* **89,** 59-67.

VanMuiswinkel, W. B. y Wiegertjes, G. F. (1997). Immune responses after injection vaccination of fish. *Fish vaccinology. Developments Biological Standarization* **90,** 55-57.

Vestergaard-Jorgensen, P. E. (1972). Egtved virus: antigenic variation in 76 virus isolates examined in neutralization test and by means of the fluorescent antibody technique. *Symposiums Zoological Society* **30,** 333-339.

Vestergaard-Jorgensen, P. E. (1976). Partial resistence of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to viral haemorrhagic septicemia (VHS) following exposure to non-virulent Egtved-virus. *Nordic Veterinary Medicine* **28,** 570-571.

Vestergaard-Jorgensen, P. E. (1981). Experimental VHS-Vaccine in field trials. *Bulletin European Association Fish Pathology* **1,** 13-14.

Vilas, M. P., Rodríguez, S. y Pérez, S. (1994). A case of coinfection of IPN and IHN virus in farmed rainbow trout in Spain. *Bulletin European Association Fish Pathology* **14,** 47-50.

Wagner, R. R. y Rose, J. K. (1996). Rhabdoviridae: the viruses and their replication**,** 1121-35.

Walker, S. P., Symonds, J. E., Sin, I. L. y Sin, F. Y. T. (1995). Gene transfger by electroporated chinook salmon sperm. *Journal Marine Biotechnology* **3,** 232-234.

Walter, E., Moelling, K., Pavlovic, J. y Merkle, H. P. (1999). Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics. *Journal Controlled Release* **61,** 361-374.

Whelan, P. J., Ball, L. A., Barr, J. N. y Wertz, G. T. W. (1995). Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proceedings National Academy Sciences USA* **92,** 8388-8392.

Whintton, J. L., Sheng, N., Oldstone, M. B. A. y McKee, T. A. (1993). A "String-of-Beads" vacine, comprising linked minigenes, confers protection from lethal-dose virus challenge. *Journal Virology* **67,** 348-352.

Winton, J., Batts, W., Deering, R., Brunson, R., Hopper, K., Nishizawa, T. y Stehr, C. (1991). Characteristics of the first North American isolations of viral hemorrhagic septicemia virus. *Proceedings second international symposium on viruses of lower vertebrates. Oregon State Univ.Press. Corvallis* **1,** 43-50.

Xiang, Z. y Ertl, C. J. (1995). Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Cell* **2,** 129-135.

Xiang, Z. Q., He, Z., Wang, Y. y Ertl, C. J. (1997). The effect of interferon-gamma on genetic immunization. *Vaccine* **15,** 896-898.

Xiang, Z. Q., Spitalnik, S., Tran, M., Wunner, W. H., Cheng, J. y Ertl, H. C. J. (1994). Vaccination with aplasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* **199,** 132-140.

Xu, L., Mourich, D. V., Engelking, H. M., Ristow, S., Arnzen, J. y Leong, J. C. (1991). Epitope mapping and characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein, using fusion proteins synthesized in Escherichia coli. *Journal Virology* **65,** 1611-1615.

Yao, Q. y Compans, R. W. (1996). Peptides corresponding to the heptad repeat sequence of human parainfluenza virus fusion protein are potent inhibitors of virus infection. *Virology* **223,** 103-112.

Zapata, A. G. (1996). Cells and tissues of the immune system of fish. *The fish immune system: organism, pathogen and environment. ed Akira Chivá. Alberto Varas***,** 278.

Zapata, A. G., Torroba, M., Álvarez, F., Anderson, D. P., Dixon, O. W. y Wisniewski, M. (1987). Electron microscopic examination of antigen uptake by salmonid gill cells after bath immunization with a bacterin. *Journal fish Biology* **31,** 209-217.

Zhang, H. G. y Hanson, L. A. (1996). Recombinant channel catfish virus (Ictalurid herpesvirus 1) can express foreign genes and induce antibody production against the gene product. *Journal Fish Diseases* **19,** 121-128.

8. TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS.

1.- **Fernández-Alonso, M**., Lorenzo,G.,Pérez,L.,Bullido,R., Estepa,A., Lorenzen,N. and Coll,J.M. (1998). Mapping of lineal antibody epitopes of the glycoprotein of VHSV, a salmonid rhabdovirus. *Dis Aquatic Organisms* **34**,167-176.

2.- Fábregas, J, García, D., **Fernández-Alonso, M**., Rocha, A.I., Gómez-Puertas, P., Escribano, Otero, O., J.M.,. y Coll, J.M. (1999) *In vitro* inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Antiviral Research* **4**, 67-73.

3.- **Fernández-Alonso, M.** y Coll, J.M. (1999). Induced fusion of VHSH persistently infected cells. *Journal Fish Diseases* **22**, 401-406.

4.- **Fernández-Alonso, M**., Estepa, A. y Coll, J.M. (1999). Variables en vacunación DNA en el modelo trucha/rabdovirus. *Investigación Agraria* **14**, 104-115.

5.- Estepa, A., **Fernández-Alonso, M.** y Coll, J.M. (1999). Structure, bindig and neutralization of VHSV with syntetic peptides. *Virus Research* **63**, 27-34.

6.- **Fernández-Alonso, M**., Álvarez, F., Estepa,A. y Coll, J.M. (1998). Vacunas DNA en *Acuicultura. AquaTIC. (Revista electrónica de Acuicultura*) http://aquatic.unizar.es/N1/art401/DNA_vac.htm

7.- **Fernández-Alonso, M**., Álvarez, F., Estepa,A. y Coll, J.M. (1999). G disulphide bond native conformation is required to elicit trout neutralizing antibodies against VHSV. *Journal Fish Disease* **22**, 219-222.

8.- **Fernández-Alonso, M**., Álvarez, F., Estepa,A. y Coll, J.M. (1999). Aplicación de rabdovirus DNA infectivo para el desarrollo de un nuevo vector para tratar ictiopatologías infecciosas. *Investigación Agraria* **14**, 86-93.

9.- **Fernández-Alonso, M**., Álvarez, F., Estepa,A., Blasco, R. y Coll, J.M. (1999). A model to study fish DNA vaccination by using the green fluorescent protein. *Journal Fish Disease* **22**, 237-241.

10.- Biacchesi, S., Yan-Xuing, Y., Béarzotti, M., Tafalla, C., **Fernández-Alonso, M.** and Brémont, M (2000). Rescue of synthetic salmonid rhabdovirus minigenomes. *Journal Geneneral Virology* **81**, 1941-1945.

11.- Estepa, A., Pérez, L , Evánon, J.A, Núñez, E., Fernández, A., **Fernández-alonso, M**., Rocha, A.I., González-Ros, J.M.,Gavilanes,F. y Coll, J.M. The conformation at the fusion pH of glycoprotein fragment 11 of a fish rhadovirus, depends on phospholipid binding (sometido).

12.- Rocha,A.I., **Fernández-Alonso, M.** and Coll, JM. Low pH inhibits viral haemorrhagic septicaemia with cell to cell spreading of *in vitro* infection (sometido).

13.- **Fernández Alonso, M.**, - Rocha, A. y Coll, J.M. DNA-vaccination of trout against VHSV by sonication (sometido).