

# Vacunas DNA en Acuicultura

---

**Fernández-Alonso, M., Estepa, A. y [Coll, J.M.](#)\***

Centro de Investigación en Sanidad Animal

INIA - CISA

Valdeolmos, 28130 Madrid

Tel.: 91 620 23 00 / Fax: 91 620 22 47

\* Enviar correspondencia

---

**Palabras clave:** DNA, vacunas, Acuicultura

**Keywords:** DNA, vaccines, Aquaculture

## Resumen

Las vacunas-DNA constituyen una nueva tecnología de vacunación cuya aplicación se comienza a experimentar en Acuicultura. Se trata de inducir inmunidad contra un patógeno utilizando la expresión in vivo de alguna de sus proteínas a través de la transferencia de gen(es) codificador(es) a las células del hospedador. Su aplicación todavía incipiente al campo de la Acuicultura ya ha obtenido los primeros resultados positivos por inyección en rhabdovirus de salmónidos y es de esperar que se extienda a todas las especies de peces cultivados y a todos sus principales patógenos. Para que muchas de estas aplicaciones sean posibles habrá que pasar de las técnicas de inyección a las técnicas de inmersión, que es el principal reto actual.

## Abstract

The DNA vaccines are a new technology which is beginning to be experienced in Aquaculture. It consists in inducing immunity against a pathogen by expressing in vivo some of its proteins throughout the transfer of its genes to the cells of the host. In its still preliminary application to the Aquaculture field has already obtained the first positive results by using injection in salmonid rhabdoviruses. It is hoped that this technology will be expanded to all fish species and all its main pathogens. For that to be possible, the main actual challenge, the techniques of immersion vaccination will have to be developed.

## Necesidad de mejora de los métodos de vacunación en Acuicultura

Las enfermedades infecciosas son la causa mayoritaria de las numerosas pérdidas económicas en Acuicultura. Por ejemplo en Acuicultura, las pérdidas debidas a las enfermedades infecciosas son mayores que la suma de las pérdidas debidas a todas las demás causas juntas. Se estima que en conjunto un 10% de todos los animales cultivados se pierden cada año debido a las enfermedades. Muchas enfermedades causan mortalidades superiores al 90% en una granja individual. En Francia sólo la VHS causa pérdidas anuales del 35% de truchas adultas en las áreas infectadas y en USA más del 50% de la cosecha anual de truchas se pierde por enfermedades infecciosas. El cultivo de langostino en Taiwan, pasó de 46.000 a 900 Tm, 2 años después de una infección viral.

Actualmente, las enfermedades causadas por virus no tienen tratamiento y por lo tanto, la aparición de una enfermedad viral en una granja requiere la destrucción de todo el stock y la esterilización de toda la granja antes de repoblar. La aparición de una infección viral en cultivo de redes en mar abierto puede igualmente ser devastadora.

La prevención de una enfermedad es más deseable que intervenir para frenarla una vez comenzada. De las varias estrategias de prevención existentes, la vacunación ofrece la más efectiva, eficiente en coste y con efectos de mayor duración. La quimioterapia debería evitarse o ser considerada sólo como emergencia o último recurso, debido a problemas de generación de resistencias, impacto medioambiental y residuos en el producto alimenticio. Incluso utilizada sólo en casos de emergencia, la quimioterapia es cara, dura poco y no se puede utilizar contra enfermedades víricas. Es decir que, la

forma más reproducible, económica y factible para prevenir dichas enfermedades es la vacunación.

## Estado actual de las vacunas para peces

La vacunación de peces a gran escala se ha llevado a cabo desde los años 70. La vacuna ideal debe ser fácil y barata de producir y de administrar, inducir una fuerte, duradera y protectora inmunidad con seguridad y en una sola toma y no tener un impacto medioambiental negativo.

De las varias estrategias de vacunación posibles de aplicación a peces, cada una tiene sus ventajas y desventajas:

1. los **patógenos vivos atenuados** normalmente producen buena inmunidad, pero no se aceptan en Acuicultura debido al riesgo de reversión de la virulencia, especialmente para otras especies salvajes de peces.
2. las vacunas hechas de **patógenos muertos**, aunque evitan el riesgo de reversión si están completamente inactivadas, son poco inmunogénicas y a veces no crecen bien en cultivo. Las bacterias muertas (bacterinas) se usan como vacunas para peces, pero excepto unos pocos ejemplos (*Yersinia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, etc...) la mayoría deben de ser inyectadas con adyuvantes oleosos que pueden causar alteraciones en las vísceras.
3. las vacunas por **subunidades**, generalmente recombinantes, son caras de producir en grado de purificación suficiente y en cantidad, pero sobre todo no inducen inmunidad celular de la que depende una mayor memoria inmunológica. Sin embargo, aunque estas vacunas reducen la mortalidad, no son capaces de evitar la infección y la generación de portadores asintomáticos.
4. cualquiera de los tipos de vacunas mencionadas, serían deseables métodos de administración orales o por inmersión. Sin embargo, excepto para algunas bacterias estos métodos no inducen una buena protección y la mejor protección se obtiene, en la mayoría de los casos, por inyección.

## Ventajas de las vacunas DNA

Las vacunas DNA constituyen una nueva tecnología que actualmente está siendo investigada buscando aplicación en una gran variedad de enfermedades y de hospedadores desde el hombre hasta los peces. Las vacunas DNA inducen inmunidad contra una proteína expresada in vivo después de la transferencia de su gen a las células del hospedador.

Las vacunas DNA (Estepa et al, 1994) ofrecen varias ventajas:

1. la expresión in vivo del antígeno patógeno de interés induce una fuerte inmunidad, tanto humoral como celular, siendo esta última de mayor memoria y eficacia.
2. la expresión antigénica en células de músculo es larga y puede inducir inmunidad de larga duración sin necesidad de reinmunizaciones.
3. los plásmidos DNA empleados llevan su propio adyuvante en forma de repeticiones CpG por lo que se pueden evitar adyuvantes tóxicos y minimizar sus daños aumentando así la calidad del producto.
4. las vacunas DNA son una tecnología aplicable a muchas enfermedades/patógenos posibles ("transdisease technology") por lo que cualquier avance en una vacuna contra una enfermedad específica, es rápidamente exportable a otras.
5. el uso de plásmidos de expresión transitoria (Estepa et al, 1994) evita los efectos adversos asociados a otros vectores.
6. las vacunas DNA son fáciles y poco caras de fabricar y se pueden usar para vacunar grandes cantidades de peces de todas las especies y tamaños.

## Etapas en el desarrollo de una vacuna DNA para peces

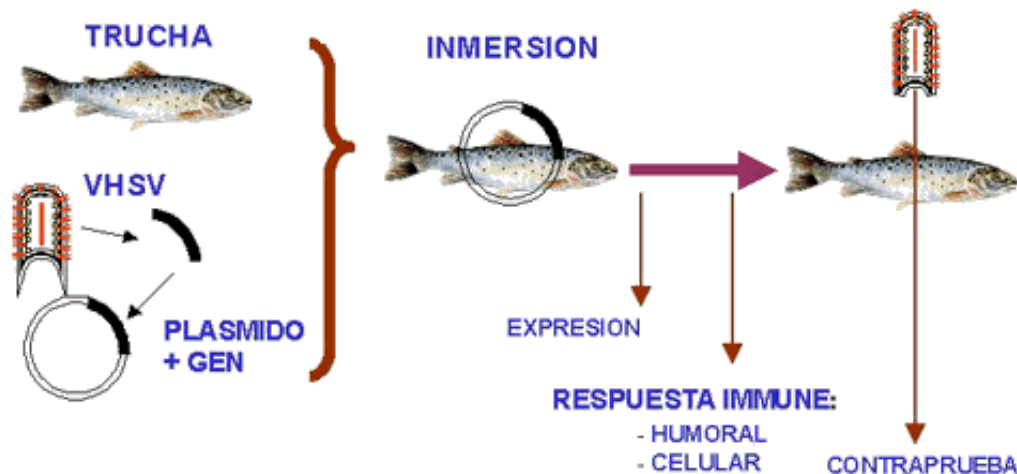
El proceso de desarrollo de una vacuna DNA para peces puede dividirse en varios pasos:

**1º) Identificación del antígeno del patógeno capaz de inducir protección.** Este paso depende del patógeno y puede ser uno de los mayores problemas a la hora de desarrollar una vacuna DNA, por ejemplo, en el caso de virus complejos de unos 200 genes, en bacterias y sobre todo en parásitos. Aunque este paso es necesario, la nueva tecnología también permite hacer pruebas al azar de todos los genes del patógeno e inmunizar con ello al hospedador (método ELI) (Ulmer y Liu, 1996).

**2º) Clonaje del gen identificado en plásmidos adecuados.** Ello incluye la optimización del plásmido, el uso de vectores con promotores de peces, el uso de adyuvantes DNA, etc. Es posible que en algunos antígenos patogénicos el DNA de los genes sea inestable al clonarlo en bacterias, para lo que habrá que probar varios tipos de plásmidos y de bacterias *E. coli* en aquellos casos que presenten este problema (por ejemplo, plásmidos de número de copias baja o con promotores inducibles o muy regulados). La expresión del antígeno de interés deberá demostrarse a escala pequeña por transfección de células de pez in vitro, FACS, inmunofluorescencia o inmunoprecipitación.

**3º) Evaluación in vivo con peces pequeños inmunoincompetentes.** Para optimizar la expresión in vivo y poder realizar gran cantidad de experimentos. El nivel de transfección in vivo puede ser evaluado por PCR (presencia del gen de interés), así como por expresión de la proteína de interés.

**4º) Evaluación in vivo con peces maduros inmunocompetentes** para evaluar sus respuestas inmunes humorales y celulares así como su resistencia a la contraprueba con el patógeno de interés.



**Figura 1. Pasos en el desarrollo de una vacuna DNA.** Son el pez (tamaño, desarrollo inmunológico, etc.), el patógeno (identificación de los genes inductores de protección, concentración, cepas, etc.), el plásmido (tipo de promotor, secuencias adyuvantes, etc.) y los métodos de administración (inyección, inmersión, liposomas, microencapsulación, etc.). La evaluación de la inmunización se lleva a cabo por estimación: de la expresión (PCR, inmunohistología, etc.), de la respuesta inmune (humoral y/o celular) y finalmente por resistencia a la contraprueba.

## Vacunas DNA por inyección en peces.

La inmunización basada en vacunas DNA, aunque reciente, ya ha sido demostrada para numerosas enfermedades víricas, bacterianas o parasitarias en mamíferos. En todos los casos se ha encontrado que inducen una fuerte y duradera respuesta humoral (anticuerpos) y celular (respuestas citotóxicas, CTL) y en muchos casos protección a la contraprueba.

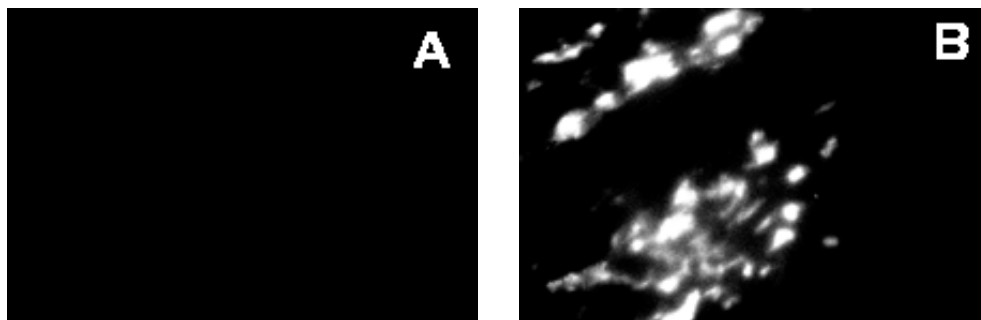
La transferencia directa de genes marcadores, también se ha demostrado en peces (Anderson et al., 1996; Gómez-Chiarri et al., 1996; Hansen et al., 1991; Heppell et al., 1998). Incluso se ha demostrado que los músculos de pez son capaces de expresar el DNA inyectado unas 100 veces más

eficientemente que el músculo de ratón.

Ya se ha demostrado que las vacunas DNA por inyección son eficaces contra la contraprueba con 2 rabdovirus de salmónidos, el IHNV (Anderson et al., 1996) y el VHSV (Heppell et al., 1998). En experimentos paralelos, se ha podido demostrar casi un 100% de protección con estas vacunas DNA comparadas con sólo un 60% de protección utilizando una vacuna de virus muerta.

En nuestro laboratorio y utilizando el modelo trucha/rabdovirus se están haciendo pruebas de evaluación de la respuesta inmune a vacunas DNA (proyecto UE FAIR CT98-84003). Las respuestas inmunes inducidas contra VHSV, se están evaluando por ELISA y por microneutralización. La inducción de anticuerpos totales contra la proteína G del VHSV se está estimando por medio de un ELISA indirecto (Sanz y Coll, 1992a; Sanz y Coll, 1992b) utilizando G4 recombinante producida en levadura (Estepa et al, 1994) y el anticuerpo monoclonal 1G7 anti-IgM de trucha (Sánchez et al, 1991) que reconoce específicamente la mayoría de las especies moleculares de inmunoglobulinas de salmónidos.

Los anticuerpos neutralizantes anti-VHSV se estiman por medio de un ensayo de microneutralización desarrollado recientemente (Lorenzo et al, 1996) que permite no sólo una estimación rápida (1 día), sino también con una pequeña cantidad de suero (10 mL) tal que se pueden ensayar hasta las truchas más pequeñas y una gran cantidad de ensayos por placa. La inmunoproliferación anamnésica (Estepa y Coll, 1991; Estepa et al, 1991; Estepa et al, 1994; Lorenzo et al., 1995a; Lorenzo et al., 1995b) al contrario que los anticuerpos neutralizantes que duran en sangre sólo unos 2-3 meses, responde por más de 1 año (Estepa et al., 1998; Estepa et al., 1996), lo que hace que estos ensayos sean más fiables para estimar la duración de la vacunación. Brevemente, los leucocitos de riñón anterior de truchas individuales se cultivan en condiciones y medios especiales en presencia de G4 recombinante para estimar el valor de estimulación sobre las respuestas inmunoproliferativas a distintos tiempos después de la vacunación. Todos estos ensayos puestos a punto y caracterizados durante años de trabajo se utilizan para estimar la respuesta inmunológica producida en las truchas inmunizadas con distintas formulaciones por inmersión en DNA codificante de la proteína G de VHSV.



**Figura 2. Expresión de una proteína fluorescente en la aleta de una trucha.** Truchas de 3-4 cm. se expusieron a formulaciones de liposomas a base de DOTAP y plásmidos conteniendo el gen de una proteína fluorescente (GFP). Cinco días más tarde se fotografiaron a la luz ultravioleta. **A**, aletas de trucha expuestas a un plásmido sin GFP. **B**, aletas de trucha expuestas a un plásmido con GFP (Fernández-Alonso y Coll, en preparación).

## Vacunas DNA por inmersión

El desarrollo de métodos de inmersión debido a sus mayores posibilidades prácticas es uno de los principales desafíos que tiene esta tecnología. No parece haber captura y transformación del DNA por los peces después de una inmersión en agua conteniendo plásmidos disueltos. Por ello hay que probar nuevos métodos que no poseen una historia previa de éxito.

Como métodos que necesitan ser optimizados actualmente trabajamos en:

1. inmersión en complejos de DNA + liposomas y
2. inmersión y/o toma oral de DNA microencapsulado.

Los liposomas catiónicos (capaces de formar complejos con el negativamente cargado DNA) tales como el DOTAP (Huang y Li, 1997) se están investigando concienzudamente como sistema de vehiculación de DNA para terapia génica. Como resultado de este área tan activa de investigación, la formulación de liposomas se está constantemente innovando.

La microencapsulación se ha usado para aumentar las respuestas de anticuerpos en la mucosa después de la administración oral en ratón (Jones et al., 1997) y se ha demostrado la inmunización oral de truchas con antígenos proteicos (Lavelle et al., 1997).

## 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.
- **Estepa, A., Alvarez, F., Ezquerro, A., y Coll, J. M.** (1998). Viral-antigen dependence and T-cell receptor expression in leucocytes from rhabdovirus immunized trout. An in vitro model to study fish anti-viral responses. *J. Gen. Virol.* *submitted*.
- **Estepa, A., Alvarez, F., Villena, A., y Coll, J. M.** (1996). Morphology of antigen-dependent haematopoietic cells from trout surviving rhabdoviral infections. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **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., y Coll, J. M.** (1991). Infection of mitogen stimulated colonies from trout kidney cell cultures with salmonid viruses. *J. Fish Dis.* **14**, 555-562.
- **Estepa, A., Lorenzo, G., y Coll, J. M.** (1994). Revision sobre inmunización con plásmidos de expresión transitoria. *Investigación 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. *J. Gen. Virol.* **75**, 1329-1338.
- **Gomez-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. *Dis. Aquatic Organ.* **27**, 5-12.
- **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 Lett.* **290**, 73-76.
- **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* *en prensa*.
- **Huang, L., y Li, S.** (1997). Liposomal gene delivery: a complex package. *Nature Biotechnology* **15**, 620-621.
- **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.
- **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.
- **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. *J. Virol. 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.
- **Sánchez, C., Coll, J. M., y Domínguez, J.** (1991). One step purification of rainbow trout immunoglobulin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **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. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **12**, 116-119.
- **Sanz, F. A., y Coll, J. M.** (1992b). Detection of hemorrhagic virus of salmonid fishes by use of an enzyme-linked immunosorbent assay containing high sodium chloride concentration and two concompetitive monoclonal antibodies against early viral nucleoproteins. *Am. J. Vet. Res.* **53**, 897-903.
- **Ulmer, J. B., y Liu, M. A.** (1996). ELI\*s coming: expression library immunization and vaccine antigen discovery. *Trends Microbiology* **4**, 169-171.



[Artículo publicado en la Revista AquaTIC nº 4, septiembre 1998](#)