

“Expresión, purificación y encapsulación de la proteína FstC para la formulación de una vacuna contra la infección por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* en acuicultura”

“Expresión, purificación e encapsulación da proteína FstC para a formulación dunha vacina contra a infección por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* en acuicultura”

“Expression, purification and encapsulation of the FstC protein for the formulation of a vaccine against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in aquaculture”



Autora: Laura Álvarez Peláez

Trabajo de Fin de Máster

Julio 2021

AUTORIZACIÓN DE LOS TUTORES

Dr. Carlos Jiménez González y Dra. Diana Martínez Matamoras, en calidad de tutores del presente trabajo, titulado:

‘Expresión, purificación y encapsulación de la proteína FstC para la formulación de una vacuna contra la infección por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* en acuicultura’

‘Expresión, purificación e encapsulación da proteína FstC para a formulación dunha vacina contra a infección por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* en acuicultura’

‘Expression, purification and encapsulation of the FstC protein for the formulation of a vaccine against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in aquaculture’

autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

A Coruña, 2 de julio de 2021. Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña.

JIMENEZ
GONZALEZ
CARLOS -
34940670J

Firmado digitalmente por
JIMENEZ GONZALEZ
CARLOS - 34940670J
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-34940
670J, givenName=CARLOS,
sn=JIMENEZ GONZALEZ,
cn=JIMENEZ GONZALEZ
CARLOS - 34940670J
Fecha: 2021.07.02 08:35:56
+02'00'

Fdo. Dr. Carlos Jiménez González

Diana Martínez M

Firmado digitalmente por
MARTINEZ MATAMOROS DIANA -
Y3482572H
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, serialNumber=IDCES-
Y3482572H, givenName=DIANA,
sn=MARTINEZ MATAMOROS,
cn=MARTINEZ MATAMOROS
DIANA - Y3482572H
Fecha: 2021.07.02 09:48:38
+02'00'

Fdo. Dra. Diana Martínez Matamoras

Trabajo realizado por Laura Álvarez Peláez en el Grupo de Química Molecular y de Materiales (QUIMOLMAT). Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas, CICA.



Laura

Fdo. Laura Álvarez Peláez

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis tutores, Dr. Carlos Jiménez González y Dra. Diana Martínez Matamoros, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo. En especial a ti Diana, por instruirme en el trabajo de laboratorio y estar siempre disponible para cualquier duda que pudiera surgir. Gracias por tu tiempo, tu paciencia, tus consejos y tu buen humor.

A mis padres y a mis hermanos, por apoyarme siempre en todas mis decisiones.

A Iria de GIBE, por ser la más fiel compañera de laboratorio y ofrecerme su ayuda.

A mis compañeros del MBA: Elena, Pedro, Adrián, Lucía, Roque, María, Alba, Junquera, Ana María y Marcos, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos dentro y fuera de la ciencia. Me siento muy afortunada por haberos conocido.

A Sara y Claudia, por aparecer en mi vida sin avisar y llenarla de buena energía, en un año tan peculiar como este.

Y, sobre todo, gracias a mi amiga Mónica, por la convivencia durante este año, por apoyarme siempre en los momentos difíciles, animarme y hacerme reír. Sin ti no habría sido posible.

Índice

Resumen

Índice de abreviaturas

1. Introducción.....	1
1.1. La industria de la acuicultura y su situación actual	1
1.2. La forunculosis	3
1.3. Los sistemas de sideróforos como factor de virulencia.....	5
1.4. La necesidad de nuevos tratamientos.....	7
1.5. Liposomas.....	8
2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos.....	10
3.1. Elección de la cepa de expresión	10
3.2. Cultivo de <i>E. coli</i> BL21C43(DE3) /pET20b (+)-C6His-FstC para la producción de FstC	11
3.3. Lisis y separación de membranas	11
3.4. Purificación de la proteína rFstC	12
a. Cromatografía de afinidad.....	12
b. Recarga de columnas de níquel.....	12
c. Cromatografía de exclusión por tamaño	12
d. Concentración de fracciones.....	12
3.5. Análisis de fracciones por SDS-PAGE y Western Blot.....	13
a. SDS-PAGE.....	13
b. Western Blot.....	13
3.6. Cuantificación por Nanodrop	14
3.7. Encapsulación de FstC en liposomas	14
3.8. Cuantificación de la proteína encapsulada.....	14
3.9. Medida de potencial Z y tamaño de los liposomas mediante ELS y DLS	15
3.10. Visualización de liposomas mediante TEM/SEM	16
4. Resultados y discusión	17
4.1. La expresión heteróloga de la proteína FstC se produce correctamente.....	17
4.2. Optimización de la producción de rFstC por temperatura.....	19
4.3. Western Blot.....	21
4.4. Optimización de la purificación de rFstC	23
4.5. Cromatografía de exclusión por tamaño	25

4.6.	Cantidad final de rFstC	26
4.7.	Encapsulación en liposomas	26
4.8.	Caracterización de los liposomas.....	28
4.8.1.	Comportamiento en disolución.....	28
4.8.2.	Tamaño y morfología.....	29
5.	Conclusiones	30
6.	Bibliografía	31

Resumen

Aeromonas salmonicida subsp *salmonicida* es una bacteria Gram negativa de interés para la industria de la acuicultura, por su papel como agente etiológico de la forunculosis. Esta enfermedad afecta a los peces y provoca una alta mortalidad, lo que se refleja en una disminución de la producción y grandes pérdidas económicas.

El mecanismo por el que la bacteria patógena causa esta enfermedad está relacionado con sus sistemas de captación de hierro, concretamente con la producción y liberación del sideróforo amonabactina al medio extracelular. Los sideróforos actúan como quelantes de Fe (III), un elemento esencial para el metabolismo, y son internalizados de nuevo a través de receptores de membrana externa, como FstC, y otros presentes en la membrana interna.

El objetivo de este trabajo es la producción y purificación de la proteína FstC para emplearla como componente activo en la formulación de una vacuna contra la forunculosis, mediante su encapsulación en liposomas. El desarrollo de esta vacuna permitiría luchar contra la enfermedad de forma preventiva, asegurando un mayor bienestar animal y aumentando el rendimiento del proceso de producción piscícola.

Palabras clave: Acuicultura; Bacterias patógenas; Sideróforos; Purificación de proteínas; Liposomas.

Resumo

Aeromonas salmonicida subsp *salmonicida* é unha bacteria Gram negativa de interés para a industria da acuicultura, polo seu papel como axente etiolóxico da forunculose. Esta enfermidade afecta aos peixes e provoca una elevada mortalidade, o que se reflicte nunha diminución da produción e grandes perdas económicas.

O mecanismo polo que a bacteria patóxena causa esta enfermidade está relacionado cos seus sistemas de captación de ferro, concretamente coa produción e liberación do sideróforo amonabactina ao medio extracelular. Os sideróforos actúan como quelantes de Fe (III), un elemento esencial para o metabolismo, e entran de novo na célula mediante receptores da membrana externa, como FstC, e outros da membrana interna.

O obxectivo deste traballo é a produción e purificación da proteína FstC para empregala como componente activo na formulación dunha vacina contra a forunculose, mediante a súa encapsulación en liposomas. O desenvolvemento desta vacina permitiría loitar contra a enfermidade de forma preventiva, garantizando un maior benestar animal e aumentando o rendemento do proceso da produción piscícola.

Palabras clave: Acuicultura; Bacterias patóxenas; Sideróforos; Purificación de proteínas; Liposomas.

Abstract

Aeromonas salmonicida subsp *salmonicida* is a Gram negative bacterium of interest to the aquaculture industry, due to its role as an etiological agent of furunculosis. This disease affects fish and causes high mortality, which is reflected in a decrease in production and large economic losses.

The mechanism by which the pathogenic bacteria cause this disease is related to their iron uptake systems, specifically with the production and release of the amonabactin siderophore to the extracellular environment. Siderophores act as chelators of Fe (III), an essential element for metabolism, and are internalized again through outer membrane receptors, such as FstC, and others inners membrane receptors.

The aim of this work is the production and purification of the FstC protein, in order to use it as an active component in the formulation of a furunculosis vaccine, by means of its encapsulation in liposomes. The development of this vaccine would make possible to fight against the disease in a preventive way, ensuring greater animal welfare and increasing the performance of the fish production process.

Keywords: Aquaculture; Pathogenic bacteria; Siderophores; Protein purification; Liposomes.

Índice de abreviaturas

ABC	ATP Binding Cassette (Dominio de unión a ATP)
APROMAR	Asociación Empresarial de Acuicultura en España
Ass	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
CV	Volúmenes de columna
DHA	Ácido docosahexanoico
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELS	<i>Electrophoretic Light Scattering</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas)
IPTG	β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo
kDa	Kilo Dalton
LB	<i>Luria Bertani High Salt</i>
LDAO	N-óxido de N,N-Dimetildodecilamina
LS	Lauril sarcosinato de sodio
OD ₆₀₀	<i>Optical Density at 600 nm</i>
PBP	<i>Periplasm Binding Protein</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampón fosfato salino)
PEG	Polietilenglicol
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>
rFstC	Proteína FstC recombinante
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (microscopía electrónica de barrido)
TBDR	<i>TonB Dependant Receptors</i> (Receptores dependientes de TonB)
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (microscopía electrónica de transmisión)

1. Introducción

1.1. La industria de la acuicultura y su situación actual

El consumo de pescado forma parte de una dieta saludable y equilibrada. Su composición lipídica se basa en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Omega-3 DHA y EPA), que ofrecen múltiples beneficios para el desarrollo infantil y la salud, como la prevención de enfermedades cardiovasculares. Por otro lado, contiene aminoácidos esenciales y su proteína tiene una biodisponibilidad de un 5-15% mayor que la derivada de fuentes vegetales. Además, es una fuente importante de vitaminas (A, B y D) y de micronutrientes minerales (calcio, fósforo, yodo, zinc, hierro y selenio)(APROMAR, 2020).

Con estas cualidades, no es de extrañar que la producción y comercialización de pescado sea cada vez más importante a nivel mundial. En sus inicios, los productos acuáticos se obtenían íntegramente de los sistemas naturales, pero la creciente demanda alimentaria derivada del crecimiento poblacional global y la imposibilidad de llevar a cabo una pesca extractiva sostenible a largo plazo propiciaron la aparición de la acuicultura.

La acuicultura consiste en la producción controlada de organismos animales y vegetales en el agua, y es un sector que ha crecido considerablemente en los últimos años, como se puede observar en la *Figura 1*. En realidad, no es una actividad complementaria a la pesca, sino su evolución natural, como reemplazó en su momento la ganadería a la caza en la mayoría de las poblaciones humanas (APROMAR, 2020).

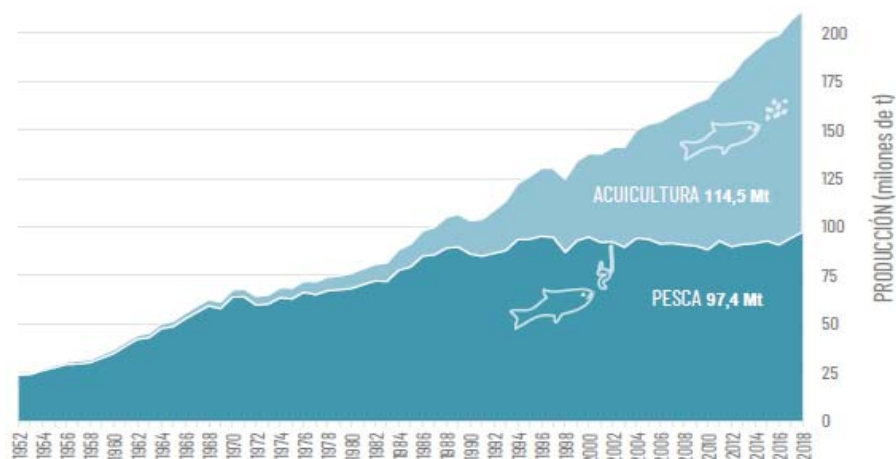


Figura 1. Evolución de la producción acuática mundial (acuicultura más pesca) en el periodo 1952-2018. Se observa un considerable incremento de producción en el sector de la acuicultura, mientras que la pesca permanece estable. Imagen tomada de APROMAR 2020.

Según el informe anual más reciente de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se estima que en 2018 la producción mundial de pescado y productos acuáticos alcanzó 179 millones de toneladas, siendo un 46% procedente de la acuicultura. Del total producido, 156 millones de toneladas fueron empleados para consumo humano (20,5 kg per cápita anual), siendo un 52% procedente de la acuicultura, y los restantes 22 millones de toneladas fueron destinados a otros usos, como la producción de alimento para peces o aceite de pescado (FAO, 2020a).

En ese mismo año, España generó 34.825 toneladas de productos acuáticos, lo que corresponde a un 25,5% de la producción total europea, convirtiéndose en el mayor productor de la UE en el sector de la acuicultura (APROMAR, 2020).

Cabe destacar que la actual pandemia por COVID-19 ha afectado notablemente a la industria de la acuicultura, por las dificultades de transporte y comercio que tuvieron lugar desde el pasado marzo de 2020. Esta situación ha destacado la importancia del sector primario y de la producción local, para evitar escenarios de incertidumbre alimentaria (FAO, 2020b). Por otro lado, y dadas las circunstancias de la crisis sanitaria, en sus inicios se demostró que los productos marinos no suponen una vía de transmisión de la enfermedad (Melba G. Bondad-Reantaso, Brett Mackinnon, Hao Bin et al., 2020), por lo que son alimentos seguros para el consumo.

Algunos de los productos derivados de la actividad acuícola son peces, algas, crustáceos, moluscos y otros invertebrados. En el caso de las especies pisciformes, la acuicultura de agua salada está dominada por el salmón Atlántico, cuyo principal productor es Noruega. Otras especies económicamente importantes son la dorada (*Sparus aurata*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), producidas en países mediterráneos como Grecia, Italia, Francia, España y Portugal (APROMAR, 2020; FAO, 2020a).

De entre los países europeos, España es el mayor productor de rodaballo de acuicultura, aportando un 76,9% del total. En 2019 la cosecha de rodaballo de acuicultura en España fue de 8.258 toneladas, un 10,8% más que la del año anterior, y Galicia fue la única comunidad autónoma productora (APROMAR, 2020).

Cabe destacar que, a nivel mundial, el 90% del rodaballo se produce en acuicultura y el resto procede de la pesca extractiva, al contrario de lo que sucede con otros peces como la dorada

o la lubina. Además, el rodaballo silvestre es cada vez más escaso y su producción mediante la acuicultura supone el 99% de la producción total en España (APROMAR, 2020).

Dada la relevancia del pescado en Galicia, tanto a nivel nutricional como económico, supone todo un reto mejorar los sistemas de acuicultura y solventar los problemas que aparecen durante el proceso de producción, con el objetivo de aumentar el rendimiento del proceso y la calidad de los productos.

1.2. La forunculosis

Las enfermedades infecciosas son uno de los factores limitantes para la expansión y el desarrollo de la acuicultura sostenible, ya que suponen una disminución directa de la producción debido a la mortalidad y/o lento crecimiento de las especies afectadas (FAO, 2020a).

Dentro de las enfermedades de etiología bacteriana, aunque existen gran diversidad de patógenos, sólo un grupo reducido supone un verdadero problema a nivel mundial. Una de estas enfermedades es la **forunculosis**.

De forma clásica, la forunculosis era considerada una enfermedad de agua dulce, pero hoy en día es un problema importante también en agua salada, y causa devastadoras pérdidas económicas en el sector de la acuicultura. Originalmente se pensaba que afectaba sólo a salmónidos, pero hoy se sabe que afecta a muchas otras especies de peces de interés comercial, como el rodaballo, el lenguado y el fletán, y que presenta una amplia distribución geográfica (Beaz-Hidalgo et al., 2013; Toranzo et al., 2005).

Aunque el agente patógeno causante de la enfermedad se aisló por primera vez en Galicia en criaderos de trucha arcoíris y de salmón del atlántico, en 1987 y 1989 respectivamente, el primer brote descrito de forunculosis en rodaballo de acuicultura fue en 1992. Desde entonces es una de las enfermedades con mayor prevalencia en los criaderos de producción de esta especie, y se ha convertido en un problema importante por la alta mortalidad que produce y por el rápido desarrollo de resistencia a los antibióticos (Johansen et al., 2011; Lago et al., 2012; Toranzo et al., 2005).

La forunculosis debe su nombre a los forúnculos o nódulos que se desarrollan en la piel y musculatura de los peces afectados (Coscelli et al., 2014; Dallaire-Dufresne et al., 2014). Es una enfermedad que puede afectar a cualquier etapa del ciclo vital, aunque son más sensibles

de padecerla los juveniles. Del mismo modo, se puede manifestar de forma **crónica** o **aguda**, siendo esta última la más frecuente.

Se caracteriza por cursar con una septicemia hemorrágica generalizada, acompañada de melanosis, pérdida de apetito y letargo. En la forma subaguda, habitualmente el pez afectado muere a los 2-3 días. Además, su aparición es repentina, con pocos signos externos, como petequias en la base de las aletas al inicio de la enfermedad o nódulos en su forma crónica (*Figura 2*). Esto se debe a que las bacterias patógenas se diseminan por la sangre, produciendo hemorragia y necrosis de los tejidos internos, fundamentalmente en las paredes abdominales, vísceras y corazón. En ocasiones también pueden causar lesiones ulcerativas profundas y agrandamiento del bazo (Austin B., Austin, 2016; Dallaire-Dufresne et al., 2014; Toranzo et al., 2005).

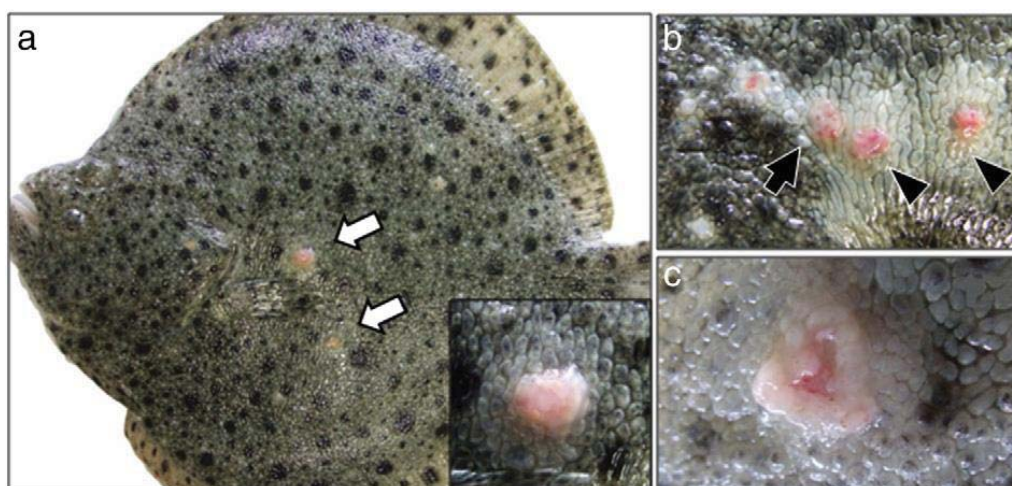


Figura 2. Lesiones macroscópicas provocadas por la infección por Ass en rodaballo. **A.** Pez que muestra una típica lesión cutánea nodular bien circunscrita (flechas) en el lado ocular. Recuadro: detalle de un nódulo no ulcerado, que se caracteriza por una hinchazón firme, de color rosa pálido y bien definido. **B.** Nódulos rodeados por un área variable de piel hipopigmentada. Un nódulo muestra una superficie pálida (flecha), mientras que los otros eran hiperémicos y levemente hemorrágicos (puntas de flecha). **C.** Nódulo ulcerado con muestra apariencia crateriforme. Imagen tomada de Coscelli et al. 2014.

forunculosis se manifiesta por la convergencia de múltiples factores añadidos a la presencia del patógeno. En otras palabras, responde a un modelo de multicausalidad, y los factores que participan de su aparición son fundamentalmente tres: los relacionados con el **hospedador** (especie de pez, edad, estado de salud inicial, etc), el **ambiente** (la temperatura, el bajo nivel de O₂, factores que provoquen la aparición de lesiones cutáneas, etc) y el **manejo** de los individuos (sobrepoblación, maniobras que generen estrés o traumatismos físicos, etc) (Coscelli Bautista, 2014; Valderrama Pereira, 2016).

El **agente causante** de esta enfermedad, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, es una bacteria Gram negativa psicrófila e inmóvil. Es un patógeno intracelular facultativo, y a pesar de no ser especie-específico, la familia *Salmonidae* es especialmente susceptible a su infección. (Coscelli Bautista, 2014; Austin B., Austin, 2016)

A. salmonicida subsp. *salmonicida* se libera al medio por las heridas cutáneas de los peces infectados. Esta bacteria tiene una superficie proteica hidrofóbica, llamada capa A, que le permite adherirse a superficies como partículas de alimento o potenciales vectores, facilitando su transmisión por el agua. Las vías susceptibles de entrada a un potencial hospedador son fundamentalmente la branquial, cutánea y digestiva. La branquial es la más efectiva porque la bacteria patógena ingresa directamente al torrente sanguíneo, y se disemina por el organismo, pero también es frecuente la vía cutánea, favorecida por las lesiones previamente presentes. La vía digestiva es la menos efectiva (Coscelli Bautista, 2014).

En resumen, un pez sano puede adquirir el patógeno por exposición a agua contaminada con el mismo o por contacto directo con los peces infectados. Este dato sugiere actuar con precaución a la hora de manejar las poblaciones, ya que se ha observado que la transmisión del patógeno es dependiente de la densidad de hospedadores. Es por ese motivo que la acuicultura es un entorno más susceptible para el desarrollo de enfermedades (Dallaire-Dufresne et al., 2014; Johansen et al., 2011).

Además, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* posee diferentes factores de virulencia que participan en el desarrollo de la enfermedad, pero el presente trabajo se centra en uno de ellos: los mecanismos de adquisición de hierro.

1.3. Los sistemas de sideróforos como factor de virulencia

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de las bacterias, por su papel como cofactor en procesos metabólicos claves. Sin embargo, tiende a formar compuestos insolubles en la naturaleza y a asociarse con proteínas de alta afinidad dentro de un hospedador. Por este motivo, a lo largo de la evolución las bacterias han desarrollado diferentes estrategias para su adquisición, dado que es una de las claves de su supervivencia, además de contribuir significativamente a la virulencia en el caso de las bacterias patógenas (Albelda-Berenguer et al., 2019; Najimi et al., 2008; Schaible et al., 2004). Una de las estrategias más habituales es la síntesis y liberación de **sideróforos**.

Los sideróforos son metabolitos secundarios de bajo peso molecular que presentan una alta afinidad por el Fe (III). La expresión de los genes de síntesis de estos metabolitos se activa bajo condiciones limitantes de hierro y, una vez liberados, son quelantes de Fe (III) en el medio extracelular, al que se unen formando un complejo llamado ferri-sideróforo. Estos complejos se internalizan mediante una maquinaria de transporte de proteínas de membrana dependiente de energía (Beaz-Hidalgo et al., 2013; Mislin et al., 2014; Najimi et al., 2008).

En las bacterias Gram negativas, las proteínas transportadoras de membrana externa dependientes de TonB (TBDR) reconocen el complejo sideróforo-Fe (III) y lo internalizan en el periplasma. Una vez allí, se une a proteínas periplasmáticas (PBP), que lo transportan hasta la membrana interna, donde es reconocido por otras proteínas receptoras: los transportadores de tipo ABC. El complejo entra en el citoplasma y el Fe (III) es liberado por reducción a Fe (II) o por degradación del sideróforo. (Górska et al., 2014; Mislin et al., 2014; Thode et al., 2018) (Figura 3)

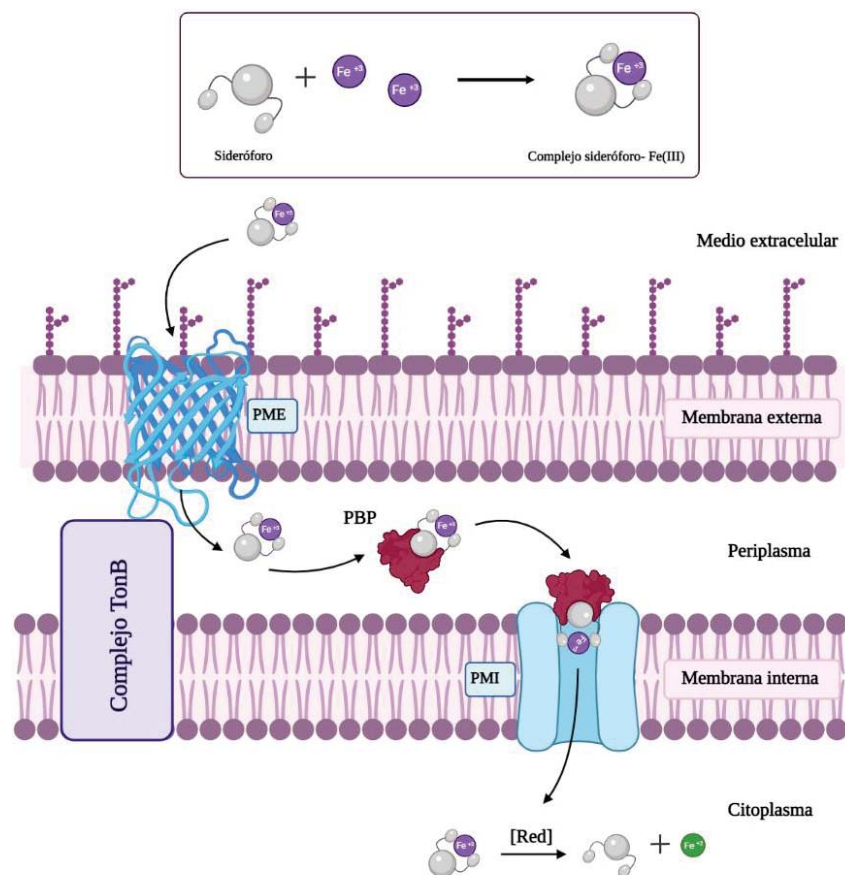


Figura 3. Mecanismo de transporte de hierro mediante sideróforos en bacterias Gram negativas. PME: proteína de membrana externa, PMI: proteína de membrana interna, PBP: proteína periplasmática de unión, [Red]: reducción.

Imagen propia, elaborada con BioRender.com (Martínez Matamoros, 2018)

Es habitual que las bacterias sinteticen diferentes tipos de sideróforos e incluso que tengan receptores para sideróforos que producen otras especies (xenosideróforos). Este fenómeno se denomina ‘piratería’ de sideróforos, y es una estrategia muy común empleada por las bacterias, porque la síntesis de estos metabolitos conlleva un elevado gasto de energía. Por ello, la utilización de xenosideróforos es una ventaja competitiva bajo presión selectiva (Cordero et al., 2012).

En el caso de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, el análisis del genoma reveló la presencia de dos *clusters* de genes involucrados en la síntesis de los sideróforos acinetobactina, producido también por el patógeno humano *Acinetobacter baumannii*, y amonabactina. Cada uno de estos *clusters* contiene respectivamente los genes *fstB* y *fstC*, que codifican para los receptores de membrana externa dependientes de TonB (TBDR), encargados de la internalización de los sideróforos. El receptor FstC en concreto está ampliamente distribuido en el género *Aeromonas*, apareciendo incluso en el patógeno humano *A. hydrophila* (Balado et al., 2017; Lemos et al., 2010; Rey-varela et al., 2019).

1.4. La necesidad de nuevos tratamientos

Antibióticos como la oxitetraciclina, el ácido oxolínico o el sulfafurazol son un tratamiento habitual en los sistemas de acuicultura, para controlar la aparición de brotes de enfermedad causadas por bacterias Gram negativas (Romero et al., 2012). Sin embargo, la presión selectiva que ejercen estos fármacos, sobre todo cuando se utilizan de forma profiláctica ya que permanecen durante mucho tiempo en el agua, proporciona las condiciones ideales para la emergencia y selección de cepas bacterianas resistentes, además de estimular la transferencia horizontal de genes (Santos et al., 2018).

Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida* presenta una gran variedad de plásmidos que contienen diferentes genes de resistencia a los antibióticos, y frecuentemente se han detectado cepas multirresistentes. Esta heterogeneidad plasmídica tiene grandes consecuencias en términos del tratamiento de la enfermedad, pero es también preocupante porque puede existir un flujo significativo de genes de resistencia a los antibióticos entre bacterias acuáticas (Vincent et al., 2014). Un ejemplo es el caso de la sulfonamida, que se empleó en 1950 para el control de este patógeno y la resistencia a este fármaco aumentó, con una prevalencia de más del 75% (Romero et al., 2012).

Debido a esta creciente resistencia a los antibióticos, se ha convertido una necesidad para la industria de la acuicultura investigar nuevas estrategias para controlar y prevenir la enfermedad. En Noruega, las epidemias están controladas desde 1993 gracias a la introducción de vacunas que contienen células inactivadas del patógeno, comúnmente denominadas bacterinas. Estas vacunas son un tratamiento eficaz durante largos períodos de tiempo en salmónidos, pero su eficacia es prácticamente nula en rodaballo, por lo que son necesarias otras estrategias (Martínez Matamoros, 2018; Toranzo et al., 2005).

Las proteínas receptoras de sideróforos, como FstB o FstC, son potenciales antígenos para generar una respuesta inmune en el hospedador, porque se encuentran en la membrana externa de la bacteria. En los ensayos de vacunación recientemente realizados por la Dra. Martínez con estas dos proteínas, se observó que rFstB era más inmunogénica que rFstC. Sin embargo, la reducción de la mortalidad fue mayor con rFstC. Al analizar la regulación génica se observó que rFstC tiene unos niveles de expresión mucho más altos que rFstB, lo que puede explicar una mayor protección contra la enfermedad. Por ello, en este trabajo se parte de rFstC como el mejor candidato para su posible uso en la formulación de una vacuna contra *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Martínez Matamoros, 2018).

En el caso de otras enfermedades infecciosas de acuicultura, como la pasteurelisis, también se realizaron ensayos de vacunación con la proteína rFrpA, receptora de sideróforos de su agente etiológico. En ellos se observó una supervivencia de los individuos muy similar a la conseguida por las bacterinas (Valderrama Pereira, 2016). Estos resultados demuestran que las proteínas receptoras de sideróforos son el camino adecuado en el desarrollo de vacunas efectivas para la prevención de estas enfermedades.

1.5. Liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas y microscópicas, formadas por una o varias bicapas lipídicas que rodean una fase acuosa de pequeño volumen. Su tamaño puede variar entre la escala nanométrica y micrométrica, aunque el grosor de la bicapa lipídica ronda los 4 nm, pero el tamaño ideal para su aplicación en liberación de fármacos se encuentra entre 50-150 nm (Has et al., 2020).

Actualmente son de gran utilidad en la industria farmacéutica, por su versatilidad y plasticidad. De hecho, en los últimos años se han empleado, con éxito, para vehicular antígenos y/o adyuvantes en diferentes formulaciones de vacunas.

La ventaja clave de los sistemas de liberación basados en liposomas es que su composición y preparación puede ser diseñada para conseguir las propiedades deseadas. Por ejemplo, es posible variar diferentes parámetros como la naturaleza de los lípidos, carga, tamaño, distribución de tamaño, encapsulación de los compuestos e incluso en la localización de los mismos dentro del liposoma. Dependiendo de las características químicas del compuesto de interés, éste puede alojarse en su interior (en el caso de moléculas hidrofílicas) o intercalarse en la bicapa lipídica (en el caso de moléculas lipofílicas) (Schwendener, 2014).

La formulación lipídica de los liposomas está compuesta por fosfolípidos. Dependiendo del grupo presente en la cabeza polar, los lípidos tendrán carga negativa (por ejemplo, con ácido fosfatídico o fosfatidilglicerol) o neutra (con fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina) en pH fisiológico. Además, las colas lipídicas insaturadas por la presencia de alquenos disminuyen las temperaturas de transición de sólido a líquido, promoviendo la formación de liposomas a temperatura ambiente. Por otro lado, para estabilizar la bicapa lipídica, debe incorporarse colesterol en la formulación y/o modificar la superficie del liposoma con polietilenglicol (PEG) (Fan et al., 2021).

Una ventaja que tienen los fosfolípidos en comparación con otros materiales inorgánicos y poliméricos es que son biocompatibles, por lo que pueden traspasar barreras biológicas, y que tienen la capacidad de auto ensamblarse, permitiendo una encapsulación eficaz. También permiten mejorar la estabilidad del antígeno y su presentación a las células inmunocompetentes, pudiendo realizar una liberación lenta y controlada (Schwendener, 2014).

2. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo es la formulación de una vacuna contra la infección por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* mediante la encapsulación de la proteína recombinante FstC en liposomas. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Expresión de la proteína recombinante FstC en la cepa de *E. coli* **BL21C43(DE3)** /**pET20b (+)-C6His-FstC**.
- Purificación de la proteína rFstC.
- Preparación de liposomas y encapsulación de la proteína rFstC.

3. Materiales y métodos

3.1. Elección de la cepa de expresión

Para la producción de la proteína FstC se empleó la cepa de expresión *Escherichia coli* BL21 C43 (DE3) transformada con un plásmido recombinante pET20b (+) FstC C-ter 6-His, que fue resultado de uno de los objetivos de la Tesis Doctoral de la Dra. Martínez (Martínez Matamoros, 2018). Esta cepa estaba conservada a -80 °C.

El plásmido pET20b (+) (Figura 4) es un vector de 3716 pares de bases, y el gen correspondiente de la proteína FstC está clonado bajo el control del promotor T7. Dicho promotor se puede inducir por IPTG (β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo) para obtener la proteína recombinante con una cola de 6 histidinas (6-His-tag) en el extremo C-terminal, lo que permite su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad. Por otro lado, el plásmido cuenta con una secuencia *pelB*, que se une al extremo N-terminal de la proteína recombinante para que sea transportada al periplasma una vez sintetizada. Esto evita la acumulación de proteínas tóxicas en el citoplasma y generalmente, incrementa la estabilidad de las proteínas de membrana producidas. Además, también se incluye un gen de resistencia a ampicilina (Martínez Matamoros, 2018; Rosano et al., 2014).

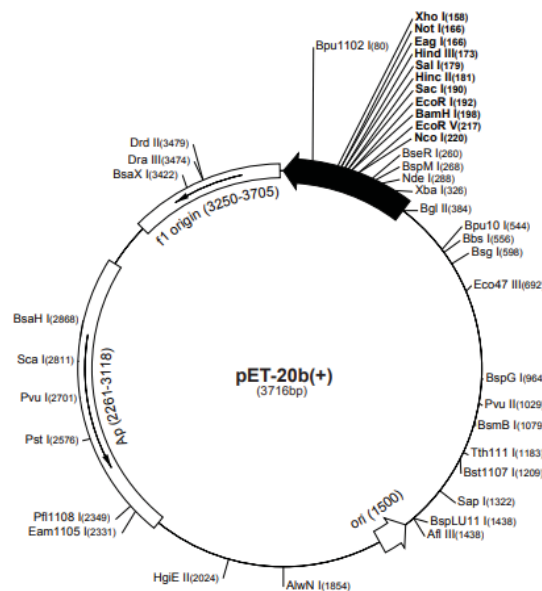


Figura 4. Mapa del plásmido pET20b (+) (imagen tomada de http://www.helmholtzmuenchen.de/fileadmin/PEPF/pET_vectors/pET-20b_map.pdf)

3.2. Cultivo de *E. coli* BL21C43(DE3) /pET20b (+)-C6His-FstC para la producción de FstC

En primer lugar, se realizó un precultivo en 100 mL de medio LB (*Luria bertina high salt*) suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y se dejó crecer toda la noche (aprox. 16 horas) con una agitación de 200 rpm a 37°C.

Posteriormente, 1 L de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) fue inoculado con 1 mL del precultivo, que se incubó a 37°C agitando a una velocidad de 200 rpm. Mediante espectrofotometría se midió la turbidez del cultivo (MySpec) hasta llegar a un rango de OD₆₀₀ entre 0.4 y 0.6 se indujo la expresión con IPTG (1mM). El cultivo permaneció en crecimiento 3 horas. Una vez finalizado el tiempo de expresión, los cultivos fueron centrifugados a 6760 g y 4°C durante 15 minutos (Hitachi CR22N). Los sedimentos obtenidos se resuspendieron con tampón de lisis (TNI-10: Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM) y se centrifugaron a 7197 g a 4°C durante 15 minutos (Centrifuge 5430R, Eppendorf). Finalmente, se retiró el sobrenadante y los sedimentos se conservaron a -20°C.

3.3. Lisis y separación de membranas

Los sedimentos se dejaron descongelar sobre hielo y se resuspendieron, con 5 mL de tampón de lisis (TNI-10 con inhibidor de proteasas) por cada gramo de sedimento. Tras disolver el sedimento agitando con vórtex, se añadieron 10 µL de ADNasa (2mg/mL) y 10 µL de lizozima (50 mg/mL) por cada 5 mL de tampón de lisis. Posteriormente, la muestra se dejó en un agitador de balanceo a 4°C durante 1 hora.

A continuación, se lisaron las células empleando partículas de zirconio/sílice (*glass beads*) en un disruptor celular, realizando 4 ciclos de 30 s de lisis y 4 minutos de descanso a 4°C. Los restos celulares se retiraron por centrifugación a 7197 g y 4°C, durante 15 minutos (Centrifuge 5430R, Eppendorf).

Posteriormente, a la fracción soluble se le añadió lauril sarcosinato de sodio (1%) y se sonicó en un baño de ultrasonidos. La suspensión se centrifugó a una velocidad 125000 g a 4°C durante 1 hora (Hitachi CS 150NX). Seguidamente, el sobrenadante fue retirado y el sedimento (las membranas externas) se suspendió con TNI-10 (con inhibidor de proteasas) Elugent al 5%, y se mantuvo durante toda la noche (12-16 horas) en un agitador de balanceo a 4°C con el fin de solubilizar al máximo la proteína rFstC contenida en las membranas externas.

Al día siguiente, se centrifugó a 125000 g y 4°C durante 1 hora (Hitachi CS 150NX) y se conservó el sobrenadante, que contiene la proteína solubilizada, para su purificación.

3.4. Purificación de la proteína rFstC

a. Cromatografía de afinidad

La proteína rFstC presente en el sobrenadante se purificó mediante FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography NGC Quest 10 Plus*, de Bio-Rad) y una columna de níquel de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences). Para ello, se emplearon como fases móviles el tampón A, compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 50 mM y Elugent al 0.25 % (TNI-50), y el tampón B, compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM y Elugent al 0.25 % (TNI-250). Ambas disoluciones se filtraron al vacío previamente a su uso con membranas de policarbonato de 0.45 µm (FilterLab).

b. Recarga de columnas de níquel

En las cromatografías de afinidad fue necesario recargar el níquel de las columnas después de varias purificaciones. Para ello se empleó un programa automatizado en el FPLC, utilizando como fases móviles 12 CV de tampón de limpieza (NaCl 0,5 M, NaH₂PO₄ 20 mM, EDTA 50 mM), 8 CV de tampón de carga (NPI-20: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol), 8 CV de solución de níquel (NiSO₄ 0,1 M) y 8 CV de etanol al 20% (EtOH) para su conservación.

c. Cromatografía de exclusión por tamaño

Se empleó una columna de sefarosa HiPrep Size Exclusion 26/60 S-200HR GE Healthcare Life Sciences. Como fases móviles se utilizaron un tampón A 'H₂O Milli-Q' y un tampón B 'LDAO' (Tris-HCl 25 mM pH 8.0, NaCl 350 mM y LDAO al 0.1%).

d. Concentración de fracciones

Se tomaron las fracciones en las que se observó presencia de la proteína rFstC tras la cromatografía de exclusión por tamaño y se concentraron con PBS (1X) empleando un filtro Amicon 30 kDa durante 15 min a 5000 g y 4°C. El concentrado se mantuvo a 4°C.

Las fracciones obtenidas de ambas cromatografías y de la concentración de las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y Western Blot.

3.5. Análisis de fracciones por SDS-PAGE y Western Blot

a. SDS-PAGE

Se preparó un gel de separación al 12% empleando 6 mL de acrilamida al 40% (NZYtech), 5 mL de tampón Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M), 200 μ L de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, 8.7 mL de agua Milli-Q, 10 μ L de TEMED y 100 μ L de persulfato de amonio (APS) al 10%. El gel concentrador al 4% se preparó empleando 1 mL de acrilamida al 40%, 2.52 mL de tampón Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M), 100 μ L de SDS al 10%, 6.32 mL de agua Milli-Q, 10 μ L de TEMED y 50 μ L de APS al 10%. Tras cargar las muestras con el tampón *Laemmli sample buffer 2X* (SDS 4%, glicerol 20%, Tris-Cl pH 6.8 (0.125 M), DTT 10% y azul de bromofenol 0.04%), la electroforesis se llevó a cabo en la fuente PowerPacTM (Bio-Rad), con tampón Tris-Glicina 1X (3 g Tris, 14.4 g glicina, 1 g SDS en 1L de H₂O), a 160 V durante 75 min. El marcador de peso molecular empleado fue NZY Colour Protein Marker II y la tinción del gel se realizó añadiendo revelador Blue Safe (NZYTech). Finalmente, se visualizó en el fotodocumentador (Chemidoc, Bio-Rad).

b. Western Blot

Se lavó la membrana de PVDF en metanol durante 30 s y en agua Milli-Q durante 2 minutos. A continuación, se realizó la electrotransferencia del gel a la membrana empleando tampón Tris-Glicina (200 mL de etanol, 3 g de Tris base, 14.4 g de glicina y 1 mL de SDS al 20%, en 1 L de agua Milli-Q), a 300 mA durante 1h. Posteriormente se bloqueó con 35 mL de Skim milk, en un agitador de balanceo a temperatura ambiente, durante 45 minutos.

Se lavó la membrana 3 veces (5 min/vez) usando tampón PBS 1X con detergente Tween 20 al 0.05%. Se añadieron 1.5 μ L de anticuerpo primario (*Monoclonal Anti-polyhistidine antibody produced in mouse*, Sigma) diluidos en 15 mL de Skim milk y se dejó incubar durante 1 h a temperatura ambiente. De nuevo, se lavó la membrana 3 veces con PBS-Tween 20 (5 min/vez) en un agitador de balanceo.

Posteriormente, se diluyó 1.5 μ L de anticuerpo secundario (1.5 μ L, *Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody*, GE Healthcare) en 15 mL de PBS-Tween 20 y se dejó en contacto con la membrana en un agitador de balanceo durante 45 minutos. Se lavó 2 veces con PBS-Tween 20 (10 min/vez). Finalmente se añadieron 6 mL de revelador (NZY Advanced ECL, NZYTech) para visualizar en el fotodocumentador (Chemidoc, Bio-Rad).

3.6. Cuantificación por Nanodrop

En el software de Nanodrop se seleccionó 'Protein' > 'Protein 280' > 'Small sample' y a continuación se eligió el tamaño de la proteína rFstC en la base de datos (74 kDa). Para el blanco se tomaron 2 μ L de tampón LDAO, directamente sobre el pedestal del Nanodrop. Una vez registrada la medida, se limpió el pedestal, se tomaron 2 μ L de la fracción purificada y se midió la concentración de rFstC.

3.7. Encapsulación de FstC en liposomas

Para la preparación de la monocapa lipídica, se agregó 1 mL de solución de fosfatidilcolina (95%)- colesterol (5%) en cloroformo a un balón de fondo redondo de 100 mL. El balón se colocó en un rotavapor (Buchi) y se inició la rotación a velocidad media, antes de hacer vacío e introducirlo parcialmente en un baño a 40°C. Una vez se evaporó el disolvente, se conectó el balón a una línea de vacío para eliminar completamente cualquier resto de cloroformo.

A continuación, se agregó 1 mL de solución de rFstC en PBS al balón que contenía la monocapa lipídica y se mantuvo el balón a 4°C durante toda la noche. Se despegó la capa de lípidos en un baño de ultrasonidos durante 2-4 min. Se cargó la suspensión de rFstC y lípidos en una jeringa y se realizaron 12 ciclos de extrusión empleando una membrana de policarbonato de 0.2 μ m (Avanti Polar Lipids, Inc.).

Posteriormente, para recuperar los liposomas obtenidos, se vertió la solución de la jeringa en un tubo eppendorf '*low bind protein*' y se centrifugó durante 30 min a 15000 g y 4°C.

El sobrenadante, que contiene la proteína no encapsulada, se mantuvo a 4°C en un tubo eppendorf '*low bind protein*' y se empleó para realizar la cuantificación de proteína encapsulada y la eficiencia de la encapsulación. Los liposomas se conservaron también a 4°C.

3.8. Cuantificación de la proteína encapsulada

La cuantificación se realizó mediante el método Folin-Ciocalteu y para ello se emplearon los siguientes reactivos y soluciones: Na₂CO₃ 20%, CuSO₄, tartrato monobásico de potasio, dodecilsulfatosódico (SDS), NaOH 8 M, deoxicolato de sodio (DOC), ácido tricloroacético (TCA) al 72% en agua y CTC (cobre-tartrato-carbonato). Para la preparación del reactivo A se añadieron volúmenes iguales de CTC, NaOH, SDS y agua Milli-Q y para la preparación del reactivo B se diluyó el reactivo de Folin-Ciocalteu en relación 1:5 con agua Milli-Q.

Se realizó un tratamiento del sobrenadante antes de cuantificar. En primer lugar, se tomaron 500 μL del sobrenadante y se completaron a 1 mL con PBS en un tubo eppendorf ‘low bind protein’, se añadieron 100 μL de DOC, se homogeneizó con el vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. En segundo lugar, se añadieron 100 μL de TCA, se homogeneizó con el vórtex y se centrifugó a 3000 g durante 15 min, a temperatura ambiente. Finalmente se descartó el sobrenadante y se conservó el sedimento, que contiene la proteína precipitada.

Posteriormente, se resuspendió el sedimento con 1 mL de PBS y se homogeneizó con vórtex. Se transfirió a un vial de vidrio, así como el resto de las soluciones patrón que se emplean para trazar la curva de calibración (tomando como proteína de referencia BSA), detalladas en el cuadro que se presenta a continuación:

Patrón	Volumen de BSA 1 mg/mL (μL)	Volumen de PBS (μL)
1	10	990
2	50	950
3	100	900
4	200	800
5	500	500

Se añadió 1 mL de reactivo A a los viales con blanco, patrones y sobrenadante y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Del mismo modo, se añadieron 500 μL de reactivo B y se incubó 30 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda fija de 750 nm, se realizó una curva de calibración en Excel y se calculó la concentración de proteína y la eficiencia de la encapsulación del siguiente modo:

$$[\text{rFstC}] = \frac{\text{Absorbancia a } 750 \text{ nm}}{\text{pendiente de recta}} * \text{Volumen del sobrenadante}$$

$$\% \text{Eficiencia de encapsulación (EE)} = \frac{1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} - [\text{rFstC}]}{1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} * 100$$

3.9. Medida de potencial Z y tamaño de los liposomas mediante ELS y DLS

Se homogenizó el sedimento de liposomas en 1 mL de PBS al vórtex para disminuir la cantidad de surfactante (LDAO) presente en la muestra, de 0.1% a 0.01%. Posteriormente se tomaron 20-50 μL de esa solución y se completaron hasta 2 mL con H_2O Milli-Q en una celda de plástico, en la que se realizaron las mediciones.

Para el DLS se introdujo directamente la cubeta de plástico con la muestra en el aparato, que mide el coeficiente de dispersión de la luz para determinar una estimación del tamaño de las partículas en la suspensión.

Para el ELS se introdujo la cubeta con un electrodo, que mide la diferencia de potencial entre el electrodo en sí y las partículas en suspensión por atracción-repulsión, para determinar el potencial Z de dichas partículas.

3.10. Visualización de liposomas mediante TEM/SEM

La muestra de rFstC encapsulada en los liposomas se trasladó al Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI), donde se obtuvieron imágenes en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) y de barrido (SEM). A partir de las imágenes panorámicas de los liposomas obtenidas por TEM, se realizó la medición de su tamaño mediante el programa informático ImageJ y se obtuvo un histograma de la distribución de los tamaños mediante el programa Origin8.

4. Resultados y discusión

4.1. La expresión heteróloga de la proteína FstC se produce correctamente

Antes de iniciar la producción a gran escala de la proteína rFstC, se comprobó que su expresión heteróloga en la cepa de *E. coli* seleccionada se producía correctamente. Para ello, se inició el proceso de expresión, lisado y separación de membranas y se analizaron las fracciones obtenidas de cada fase por SDS-PAGE (Figura 5), empleando sonicación para romper las células bacterianas en el caso de las bandas 1 y 2.

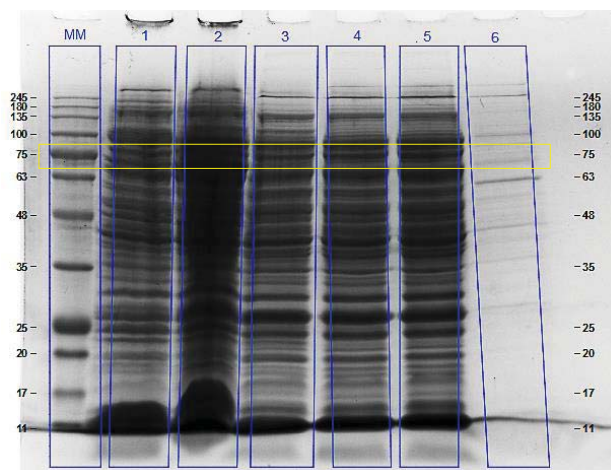


Figura 5. Gel de SDS-PAGE con marcador de peso molecular (MM) y las fracciones del cultivo de *E. coli* recombinante antes de la inducción con IPTG (1), después de la inducción (2), después del lisado (3), membranas internas solubles con laurilsarcosinato (4), membranas externas insolubles (5) y fracción soluble de membranas externas (6).

Teniendo en cuenta este resultado, podemos decir que la expresión se lleva a cabo correctamente, ya que se observa la banda a 74 kDa, que es el peso molecular aproximado de rFstC. Además, la cantidad de proteína aumenta tras la inducción con IPTG (diferencia de la banda 1 a la 2) y disminuye a medida que se realiza la separación de las membranas debido a que parte de la proteína exportada al periplasma forma cuerpos de inclusión que no se solubilizan con el detergente, pero también se clarifica la banda, como consecuencia de la purificación.

Inicialmente se prepararon 10 litros de cultivos para su producción a gran escala, siguiendo el procedimiento que se describe en el apartado de materiales y métodos inicialmente empleado por la Dra. Martínez en su Tesis Doctoral.

A la hora de purificar rFstC por cromatografía de afinidad, se analizaron dos muestras: la obtenida de la solubilización de las membranas externas con Elugent al 5%, donde la proteína está en forma nativa, y la obtenida de la solubilización de las membranas internas

con LS, que también contiene rFstC, pero en su forma no nativa. Este es un aspecto importante, ya que a partir de la fracción de las membranas internas podemos obtener la proteína rFstC que haya quedado en el periplasma, pero no se haya insertado en la membrana externa. Aunque no esté plegada en su forma nativa, es útil porque actúa como indicadora de que tiene lugar el transporte del citoplasma a la membrana y además podríamos emplearla también como componente en la formulación de una futura vacuna.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para las fracciones de membranas externas (*Figura 6*) e internas (*Figura 7*). En ambos casos se muestra el cromatograma obtenido del FPLC y el análisis de las fracciones por SDS-PAGE.

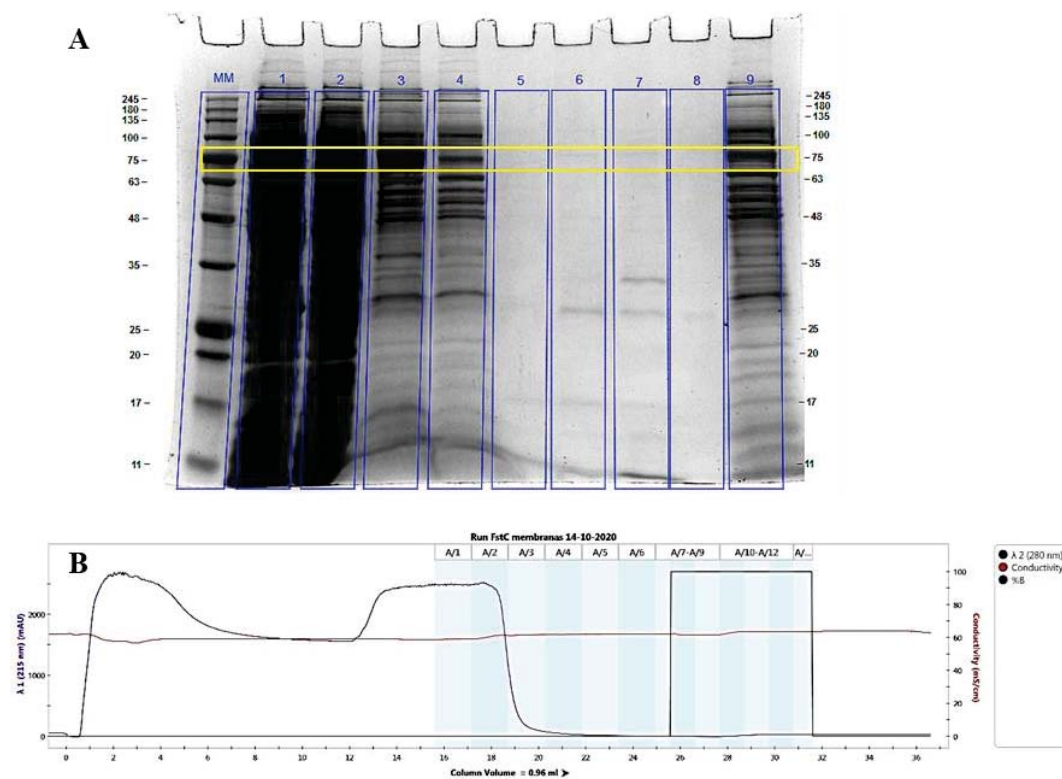


Figura 6. Separación de membranas y purificación de rFstC. **A.** Gel SDS-PAGE con marcador de peso molecular (MM), lisado (1), membranas internas solubles con LS (2), membranas externas insolubles (3), fracción soluble de membranas externas (4), fracciones de elución de FPLC (5-7), concentrado de rFstC (8) y fracción no retenida (9). **B.** Cromatograma obtenido por cromatografía de afinidad en FPLC. No se observa ningún pico de elución.

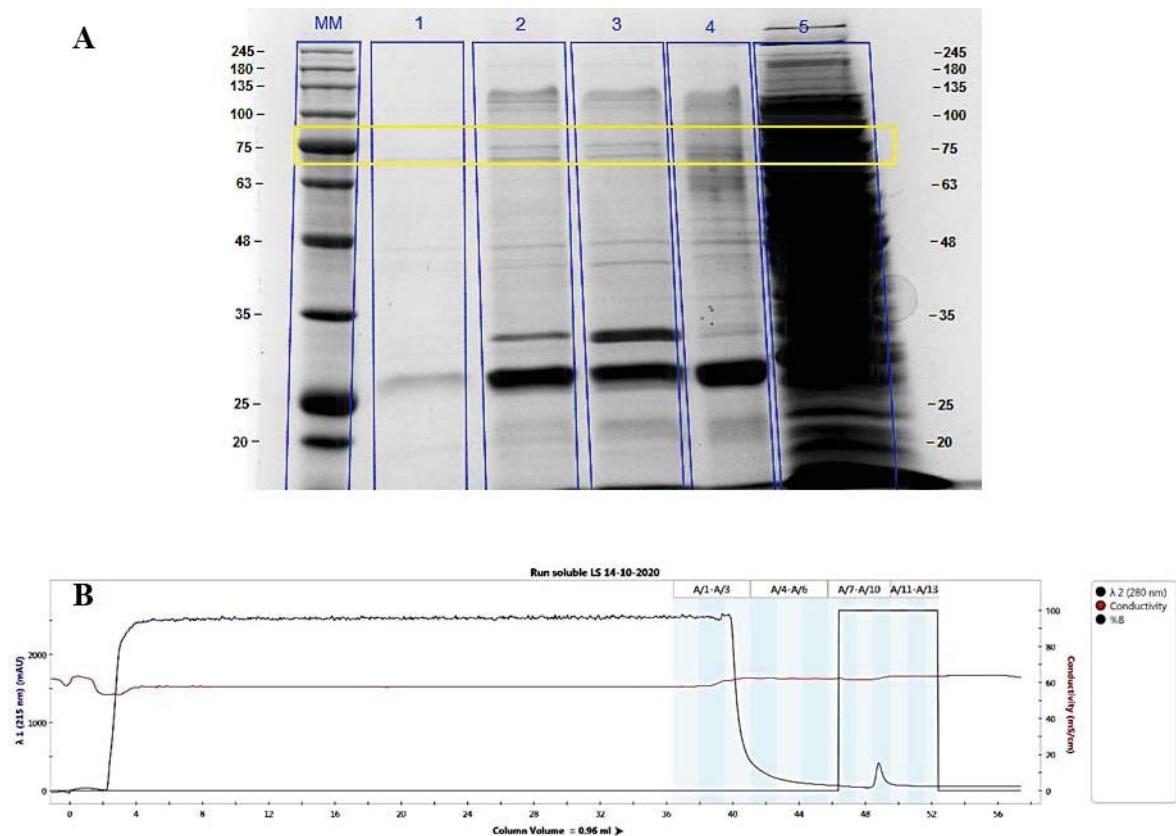


Figura 7. Purificación de rFstC a partir de las membranas internas. A. Gel SDS-PAGE con marcador de peso molecular (MM), fracciones de elución de FPLC (1-3), concentrado de rFstC en dichas fracciones (4) y fracción no retenida (5). B. Cromatograma obtenido por cromatografía de afinidad en FPLC. Se observa un pico de elución a un tiempo de retención de 50 min.

4.2. Optimización de la producción de rFstC por temperatura

Teniendo en cuenta que no se observó señal de rFstC en el cromatograma durante la purificación de la fracción soluble de las membranas externas, y bajo la hipótesis de que la proteína recombinante no se estaba dirigiendo a ellas de forma eficaz, se decidió realizar de nuevo 10 litros de cultivos, pero esta vez reduciendo la temperatura de 37°C a 30°C. La finalidad es aumentar la producción de rFstC en su forma nativa, ya que existen evidencias de que la disminución de la temperatura reduce la formación de cuerpos de inclusión (Valderrama Pereira, 2016).

En este caso de expresión heteróloga, la producción de la proteína tiene lugar como consecuencia de un inductor (IPTG). Además, la temperatura óptima de crecimiento para *E.coli* es de 37°C, por lo que el metabolismo está enfocado a la supervivencia y la fase exponencial tiene lugar de forma muy rápida, llegando mucho antes a la etapa de muerte celular. Al reducir la temperatura de cultivo a 30°C, y por tanto ralentizar la fase exponencial, las células presentes dedican más tiempo a la síntesis de proteína. Una temperatura menor

también disminuye el ritmo metabólico y los procesos de transporte a la membrana, por esta razón es importante que el tiempo de incubación post inducción sea mayor, con la finalidad de acumular mucha biomasa bacteriana y dar tiempo a que las proteínas sean dirigidas al periplasma en mayor concentración, buscando una menor formación de cuerpos de inclusión. A continuación, se muestran los resultados de la purificación de las fracciones solubles de membranas externas (*Figura 8*) e internas (*Figura 9*), obtenidas a partir de cultivos realizados a 30°C.

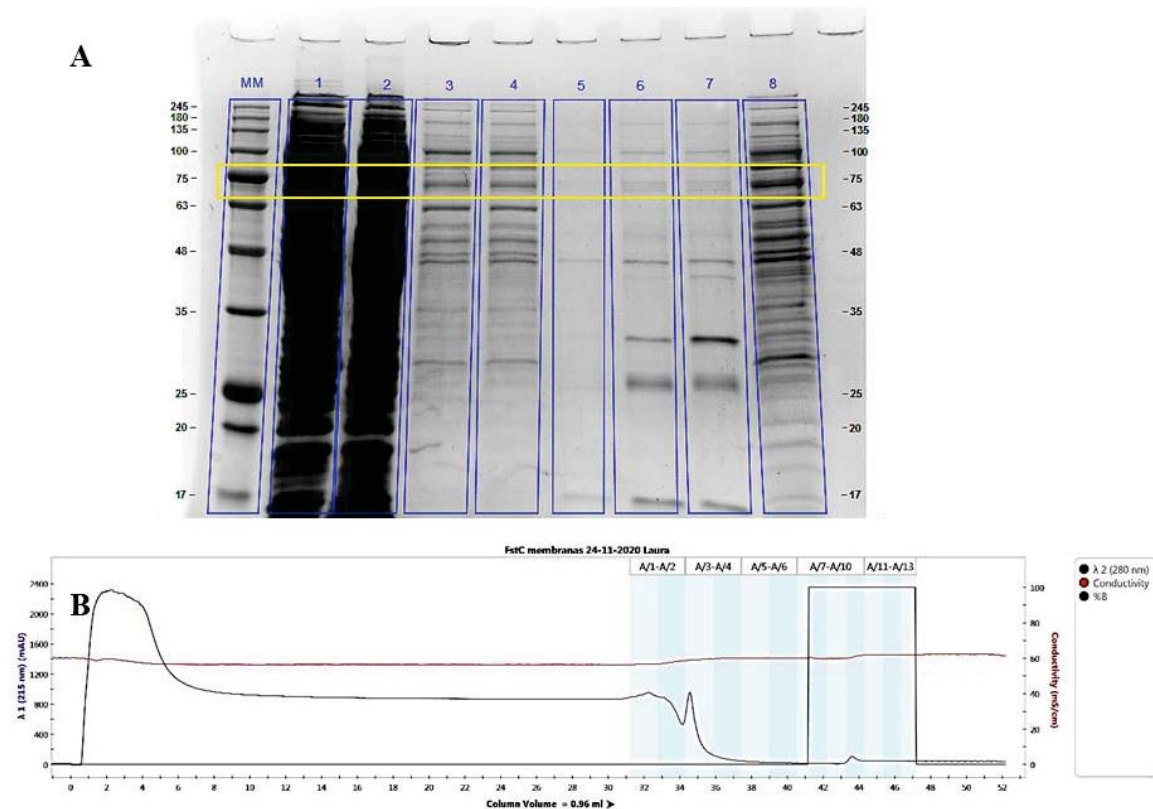


Figura 8. Separación de membranas y purificación de rFstC, de cultivos a 30°C. **A.** Gel SDS-PAGE con marcador de peso molecular (MM), lisado (1), membranas internas solubles con LS (2), membranas externas insolubles (3), fracción soluble de membranas externas (4), fracciones de elución de FPLC (5-7) y fracción no retenida (8). **B.** Cromatograma obtenido por cromatografía de afinidad en FPLC. Se observa un pico de elución, a un tiempo de retención de 44 minutos, que se corresponde con las bandas observadas en las fracciones 5-7 del gel.

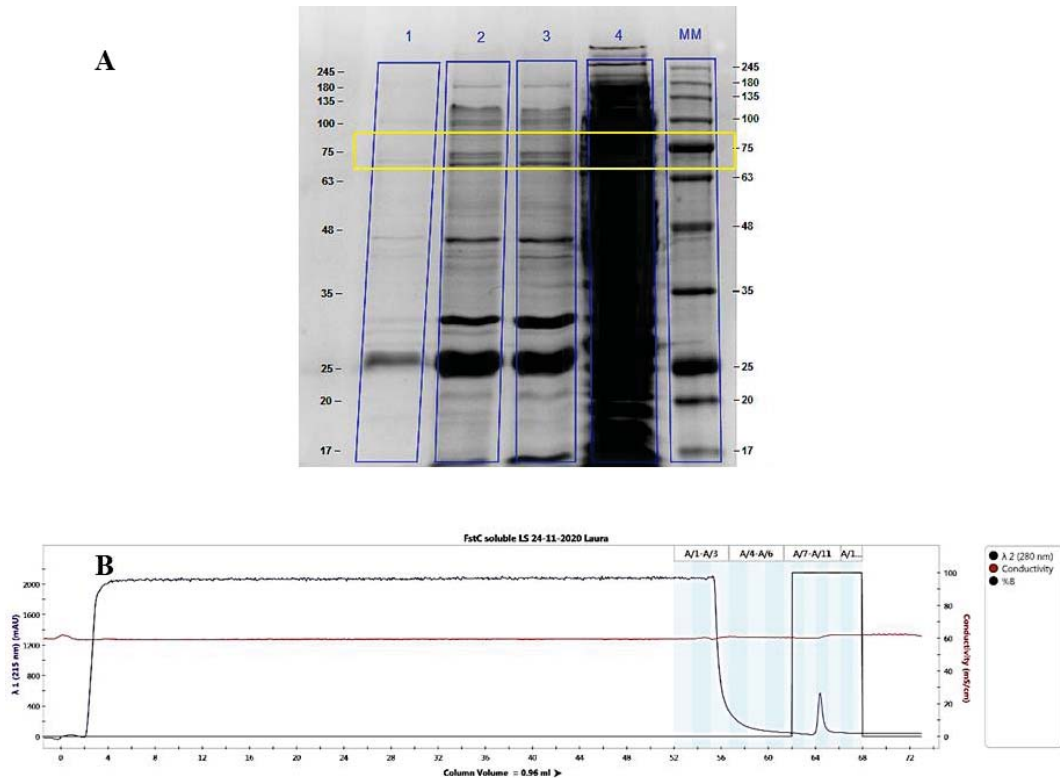


Figura 9. Purificación de rFstC a partir de las membranas internas, de cultivos a 30°C. **A.** Gel SDS-PAGE con marcador de peso molecular (MM), fracciones de elución de FPLC (1-3) y fracción no retenida (4). **B.** Cromatograma obtenido por cromatografía de afinidad en FPLC. Se observa un pico de elución, a un tiempo de retención de 65 minutos.

4.3. Western Blot

Al mismo tiempo que se realizó la purificación con las condiciones anteriormente mencionadas, se realizó el inmunoensayo Western Blot, en el que se emplea un anticuerpo primario que tiene afinidad por la cola de poli-histidinas de rFstC, y un anticuerpo secundario para poder visualizar dicha unión específica mediante quimioluminiscencia.

En la *Figura 6* se puede observar el análisis de las bandas de las diferentes etapas de purificación de los cultivos realizados a 30° C (*Figura 10*).

En ambas fracciones se observa una degradación de la proteína, ya que la señal aparece en pesos moleculares menores. Las causas de la degradación no se conocen de forma exacta, pero podría deberse a una ruptura de la cadena de frío en el proceso de conservación de las muestras, o al tiempo que transcurrió desde su obtención hasta la realización del análisis. En principio, no se contempla que se deba al calentamiento del tampón de electrotransferencia que se emplea para realizar la fase inicial del Western Blot, aunque no se descarta dicha posibilidad, dado que es una de las fuentes de error de la técnica (MacPhee, 2010).

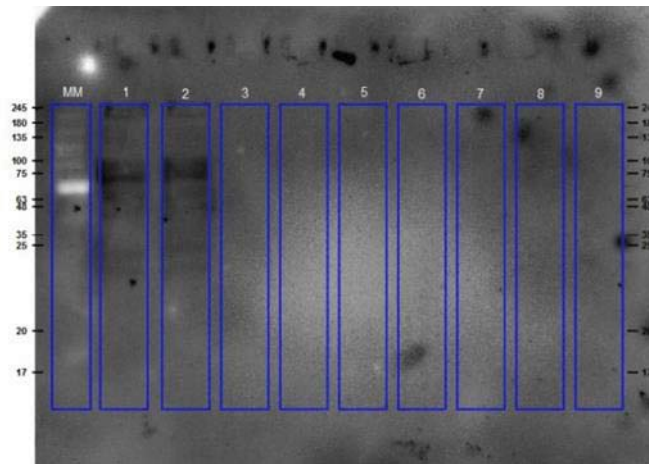


Figura 10. Membrana de PVDF de Western Blot tras el revelado. Se observa señal en las bandas 1 y 2, que representan fracciones de lisado (1) y lisado con LS (2). En el resto de las fracciones (3-9) no se observó presencia significativa de señal.

Además, la proteína se detecta sólo en las fracciones iniciales, que están menos purificadas. Esto podría deberse a que, en las fracciones purificadas, hay poca concentración de proteína, por lo que no es posible observar la señal de quimioluminiscencia. Por lo tanto, podemos afirmar que el rendimiento en la obtención de rFstC disminuye en cada paso de la purificación.

Por último, cabe destacar que el anticuerpo primario empleado en el Western Blot está diseñado para la detección de cola de poli-histidinas en el extremo N-terminal de la proteína recombinante, y en este caso, la proteína rFstC tiene la cola de poli-histidinas en el extremo C-terminal. Esta característica podría dificultar no sólo la detección por Western Blot, sino también la purificación, ya que la cola de poli-histidinas en esta posición está espacialmente menos expuesta (Wimley, 2003) (*Figura 11*). Este hecho puede dificultar la interacción con el níquel en la columna de afinidad, lo que podría explicar por qué se pierde bastante proteína en la fracción no retenida, tal y como se observa en los análisis SDS-PAGE (*Figuras 6-9*).

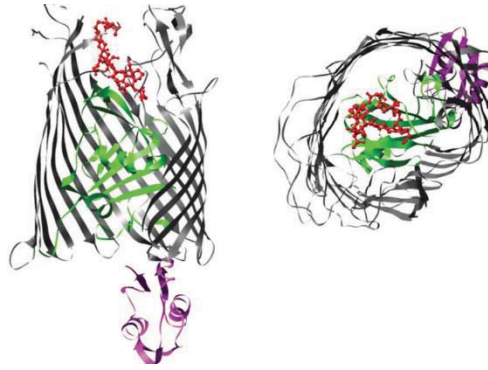


Figura 11. Estructura en barril beta de una proteína de membrana externa transportadora de sideróforos dependiente de TonB. Se compone de 22 láminas beta que se alojan en la membrana y contienen un dominio C-terminal en su interior (verde), mientras que el dominio N-terminal está más expuesto (violeta). El sideróforo se representa en rojo. Imagen tomada de Mislin et al., 2014.

4.4. Optimización de la purificación de rFstC

Bajo la hipótesis de que la temperatura no debía ser el verdadero obstáculo en la obtención de la proteína, sino la purificación en sí, se realizaron algunos cambios en la metodología, manteniendo la condición inicial de cultivo a 37°C, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de rFstC posible. Para esto se llevaron a cabo las siguientes variaciones:

- Se aumentó la cantidad de preinóculo de 1 mL a 10 mL por litro de medio de cultivo.
- Los sedimentos obtenidos se disolvieron en 20 mL de tampón TNI-10 con inhibidor de proteasas junto con 40 µL de DNAasa y lisozima para concentrar el lisado.
- Los siguientes pasos se mantuvieron igual hasta llegar a las ultracentrifugaciones, donde se redujo el tiempo de 1 hora a 45 minutos, y al día siguiente de 1 hora a 20 minutos. Esta modificación de tiempo se realizó para evitar que la proteína solubilizada pudiera precipitar junto a los cuerpos de inclusión y dejara de estar disponible en el sobrenadante que se emplearía para la purificación.
- Por otro lado, se reemplazó TNI-50 por TNI-20 para la solubilización de rFstC de las membranas externas, con el objetivo de bajar la concentración de imidazol presente en la muestra, que potencialmente pudiera unirse al níquel de la columna y desplazar a la proteína de interés.

A pesar de todas estas modificaciones, no se consiguieron cambios significativos en la obtención de rFstC a partir la fracción soluble de las membranas externas. En ese momento fue cuando se prestó atención a un factor que actuó como limitante durante todo el periodo del experimento: la columna de níquel.

En los primeros ensayos ya se observaba una pérdida de proteína en la fracción no retenida (*Figuras 6-9*), lo cual, hacía pensar que no quedaba debidamente unida a ella, y por lo tanto que no estaba funcionando correctamente. Para solucionar el problema, se realizaron purificaciones tanto con columnas nuevas como rehabilitadas, donde se realiza un proceso de regeneración de níquel. Sin embargo, no estaba claro cuántos usos era capaz de soportar una columna hasta que dejaba de funcionar correctamente. Después varios intentos, se observó que las columnas rehabilitadas funcionaban mejor que las nuevas, y que tenían una duración máxima de tres purificaciones.

Además del factor columna, el uso del tampón TNI-20 permitió que la proteína se uniera de forma más eficiente al níquel de la columna. Aunque no se obtuviera tan pura, se observó como la cantidad de rFstC disminuyó en la fracción no retenida (*Figura 12A*).

El conjunto de todas las modificaciones previamente explicadas fue lo que hizo posible la obtención de un pico de elución notable en el FPLC (*Figura 12B*) y la presencia de la proteína de forma clara en el gel de SDS-PAGE, en las fracciones 7-8. (*Figura 12A*).

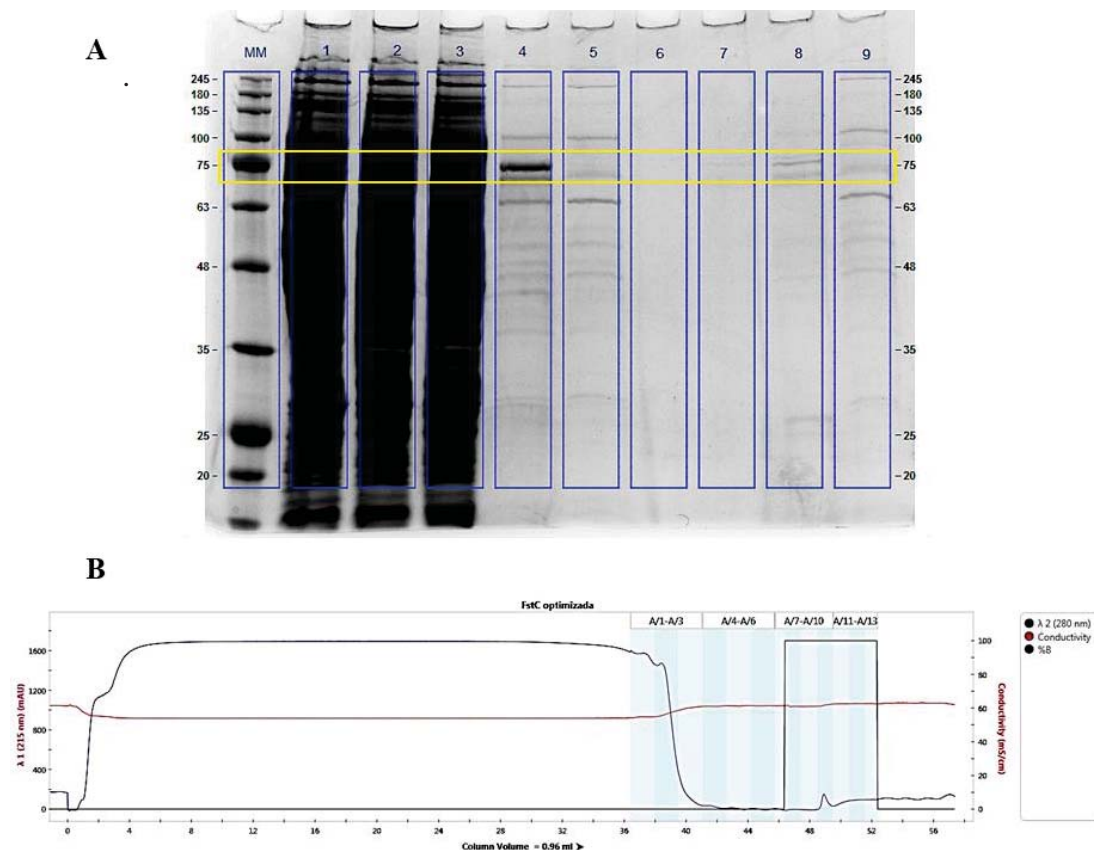


Figura 12. Separación de membranas y purificación de rFstC. **A.** Gel SDS-PAGE con marcador de peso molecular (MM) y fracciones de la purificación de rFstC a partir de las membranas externas: lisado (1), lisado con LS (2), membranas internas solubles con LS (3), membranas externas insolubles (4), fracción soluble de membranas externas (5), fracciones de elución de FPLC (6-8) y fracción no retenida (9). **B.** Cromatograma obtenido por cromatografía de afinidad en FPLC. Se observa un pico de elución, a un tiempo de retención de 50 minutos, que corresponde con las fracciones 6-8 del gel.

Como hemos podido observar, las proteínas de membrana son biomoléculas difíciles de purificar. Esto se debe fundamentalmente a que la mayoría de las proteínas de membrana están presentes a baja concentración y, además, se encuentran embebidas en la bicapa lipídica, por lo que necesitan la elección de un detergente adecuado para ser solubilizadas. De hecho, no se puede definir un único protocolo de purificación de proteínas, especialmente en el caso de las proteínas de membrana, ya que cada una de ellas posee unas características físicas determinadas, una preferencia de detergente y diferentes condiciones de purificación (Lin et al., 2009). Por este motivo, en el presente trabajo se decidió optimizar el proceso tanto en la producción (alterando la temperatura de cultivo y cantidad de preinóculo) como en la purificación (alterando otros parámetros como los tampones de trabajo, tiempos de centrifugación, etc).

Para futuros ensayos, sería interesante mejorar la parte de la producción, con el fin de disponer de una mayor cantidad de proteína desde el inicio. Una posibilidad muy prometedora sería emplear mutantes de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) que presenten deleciones en genes codificantes de proteínas de membrana externa propias. De este modo, se podría potenciar la expresión de proteínas de membrana externa recombinantes, como rFstC (Meuskens et al., 2017).

Otra forma de optimizar el proceso podría ser añadir más histidinas al plásmido pET20b (+)-C6His-FstC para tratar de mejorar la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad, dado que la cola de poli-histidinas se encuentra en el extremo C-terminal, menos expuesto.

4.5. Cromatografía de exclusión por tamaño

Una vez obtenida rFstC de forma clara en SDS-PAGE y en el cromatograma, se realizó una segunda cromatografía, esta vez de exclusión por tamaño, con el objetivo de obtenerla lo más pura posible.

En el cromatograma obtenido (*Figura 13B*) se observaron tres picos, las fracciones se reunieron, y se concentraron en un filtro Amicon de 30 kDa por centrifugación. Después fueron analizadas por SDS-PAGE para localizar la banda correspondiente a rFstC (*Figura*

13A). La proteína fue observada en el concentrado 1 y se conservó a 4°C para su posterior cuantificación y encapsulación.

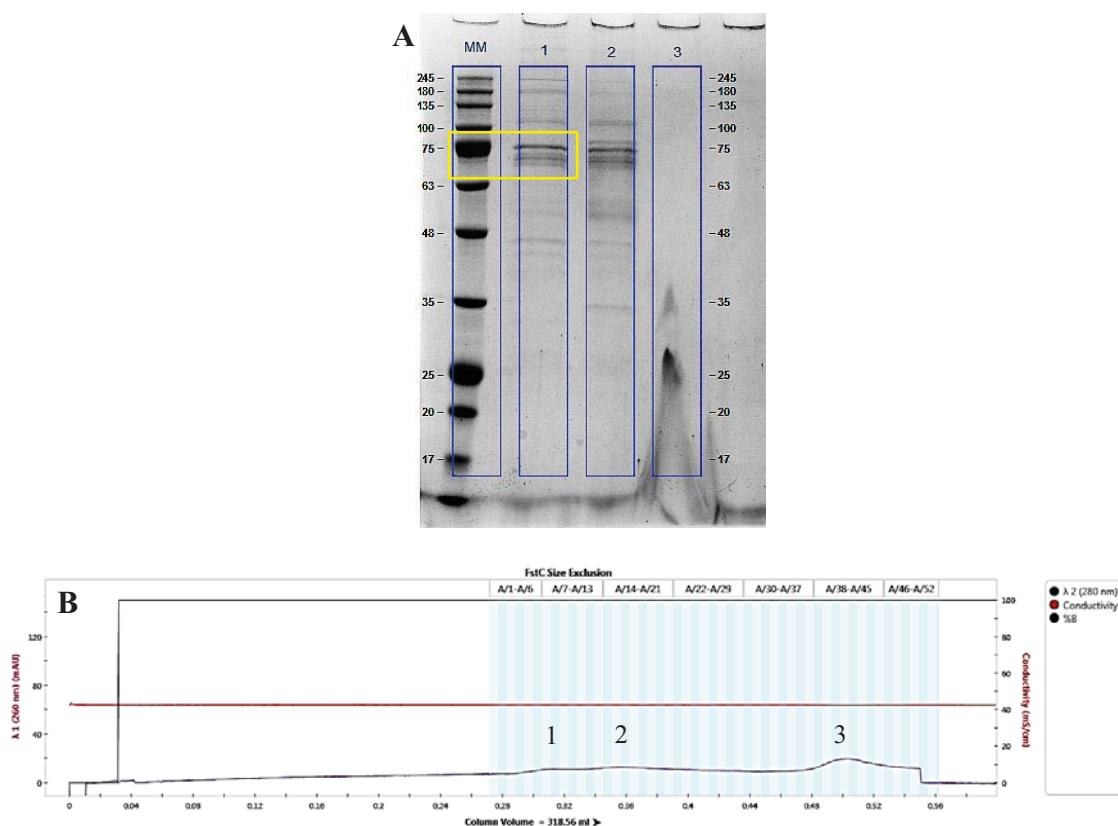


Figura 13. Resultados de la cromatografía de exclusión por tamaño. A. Gel SDS-PAGE con marcador de peso molecular (MM) y concentrados de los picos de absorbancia observados en el FPLC (1-3). B. Cromatograma obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño en FPLC. Se observan tres picos, correspondientes a las fracciones 1-3 indicadas en el gel de SDS-PAGE.

4.6. Cantidad final de rFstC

El concentrado seleccionado tenía un volumen de 60 μ L. Mediante su cuantificación por Nanodrop que se comprobó que se habían obtenido 0.4 mg/mL de rFstC, a partir de 2 L de cultivos. En comparación con los resultados de la Dra. Martínez, se obtiene menor cantidad, pero de mayor pureza, como consecuencia de la cromatografía de exclusión por tamaño.

4.7. Encapsulación en liposomas

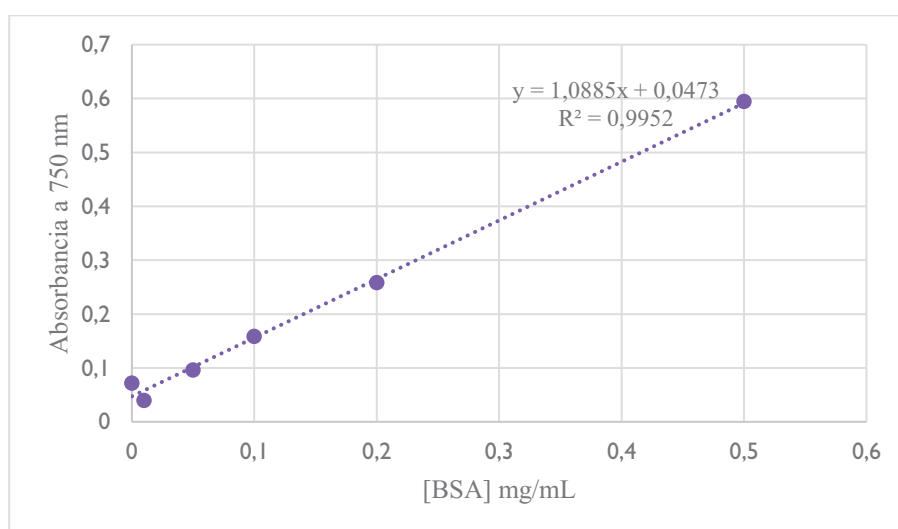
Al concentrado de rFstC se añadieron 940 μ L de PBS 1X, con el objetivo de bajar la concentración LDAO de 0.1% a 0.01%. La encapsulación de rFstC en liposomas se llevó a cabo según el procedimiento descrito en materiales y métodos, y para la formación de la

monocapa lipídica se empleó una solución de 95% de fosfatidilcolina y un 5% de colesterol en cloroformo, por ser la formulación más habitual en la preparación de liposomas.

Tras recuperar los liposomas por centrifugación, se cuantificó la proteína presente en el sobrenadante para calcular la eficiencia de la encapsulación, mediante el método de Folin. La absorbancia obtenida para la muestra de proteína rFstC sin encapsular fue de 0.082 y la eficiencia de encapsulación, como se muestra a continuación, fue del 90.8%.

$$[\text{rFstC}] = 0.082 / 1.0885 \times 0.5 \text{ mL} = 0.03766 \text{ mg/mL}$$

$$\%EE = (0.4 - 0.037) / 0.4 \times 100 = 90.8 \%$$



Gráfica 1. Curva de calibración de BSA por el método de Folin

Las proteínas de membrana como FstC presentan una gran afinidad por la bicapa lipídica e interaccionan mejor con el liposoma durante el proceso de extrusión, debido a su carácter hidrofóbico, por lo que es un resultado esperado, en contraposición a cómo se comportaría una proteína polar (por ejemplo, BSA), alojándose en el interior del liposoma durante la extrusión.

En comparación con los resultados de la Dra. Martínez, que obtuvo un porcentaje de encapsulación de rFstC mayor, esta diferencia de encapsulación podría deberse a la influencia del detergente LDAO empleado en la cromatografía de exclusión por tamaño, ya que es un detergente aniónico (mientras que Elugent es un detergente neutro). Esto podría provocar la disolución de los lípidos y, por lo tanto, una menor encapsulación. Por ello es

importante retirar la máxima cantidad de detergente posible antes de realizar la encapsulación.

4.8. Caracterización de los liposomas

4.8.1. Comportamiento en disolución

Tras diluir los liposomas en 1 mL de PBS, se observó su comportamiento en disolución mediante el uso del DLS/ELS. En ambos casos las mediciones se realizaron por triplicado.

El DLS mide el coeficiente de dispersión de la luz para realizar una estimación del radio hidrodinámico de las partículas en una suspensión. En el caso de los liposomas, el diámetro efectivo fue de 204.83 nm (*Figura 14A*). Esto nos indicaría su comportamiento en una solución, lo cual es más próximo a la realidad. Dado que para el proceso de extrusión y encapsulación se empleó una membrana de 0.2 μm (con el objetivo de formar liposomas de 200 nm), el valor obtenido fue un resultado esperado.

Un parámetro importante a tener en cuenta en el DLS es la polidispersión de la muestra. Debe ser menor de 0.5 para garantizar que la suspensión de partículas sea homogénea y estable. En este caso el valor fue de 0.065, lo que verifica su estabilidad (*Figura 14A*).

El ELS mide la diferencia de potencial entre el electrodo y las partículas en suspensión por atracción-repulsión, para determinar su potencial Z. A mayor valor absoluto del potencial Z, mayor es la estabilidad de la muestra, en otras palabras, el valor numérico nos indica que las partículas no tienden a formar agregados, sino que están dispersas en la solución. En este caso, los valores indican que la suspensión tiende a ser estable (*Figura 14B*). En cuanto a su carga, de las tres mediciones realizadas, una de ellas fue de signo positivo y las dos restantes, de signo negativo. Estos resultados nos indican cómo se comportan los liposomas en solución acuosa y salina (*Figura 14B*).

Para el uso fisiológico de los liposomas, sería interesante que tuvieran carga positiva, ya que podrían entrar fácilmente en el interior de las células por diferencia de potencial, pero los resultados indican que fundamentalmente tienen carga superficial negativa, por lo que son parecidos a los de una célula. En realidad, el objetivo de los liposomas es actuar como vehículo y adyuvante en la formulación de la vacuna, así que, aunque no tengan carga positiva para entrar en el interior de las células, el organismo podría detectarlos como un cuerpo extraño. Es necesario realizar un ensayo de vacunación en peces para comprobar esta

hipótesis y observar el comportamiento de los liposomas, además de evaluar la eficacia de la inmunización.

A					B				
Type	Start Date/Time	Sample ID	Eff. Diam. (nm)	Polydispersity	Type	Start Date/Time	Sample ID	Zeta Potential (mV)	
DLS	28/05/2021 12:03:31	Liposomas FstC 28-05-2	203,29	0,043	ELS	28/05/2021 13:28:21	Liposomas FstC 28-05-2	1,86	
DLS	28/05/2021 12:05:46	Liposomas FstC 28-05-2	208,21	0,026	ELS	28/05/2021 13:37:01	Liposomas FstC 28-05-2	-20,29	
DLS	28/05/2021 12:08:00	Liposomas FstC 28-05-2	203,00	0,126	ELS	28/05/2021 13:41:33	Liposomas FstC 28-05-2	-23,04	
			Mean:	204,83				Mean:	-13,82
			Std Err:	1,69				Std Err:	7,88
			Std Dev:	2,93				Std Dev:	13,65

Figura 14. Tablas resumen de los resultados obtenidos en DLS (A) y ELS (B).

4.8.2. Tamaño y morfología

El tamaño medido por TEM y SEM es el tamaño real de los liposomas. En las imágenes panorámicas (Figura 15) se observa que presentan una morfología esférica, con una distribución de tamaño homogénea. Por otro lado, en la imagen detalle de TEM (Figura 15A) podemos observar la doble capa lipídica del liposoma y su interior. La proteína rFstC no podemos visualizarla, pero probamos su encapsulación con la cuantificación del sobrenadante.

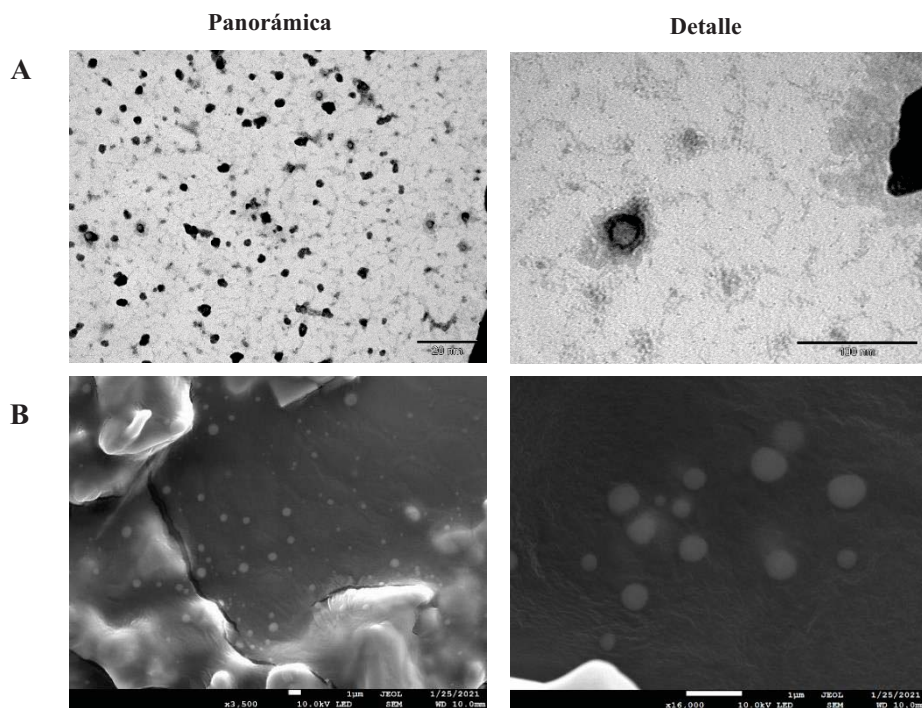
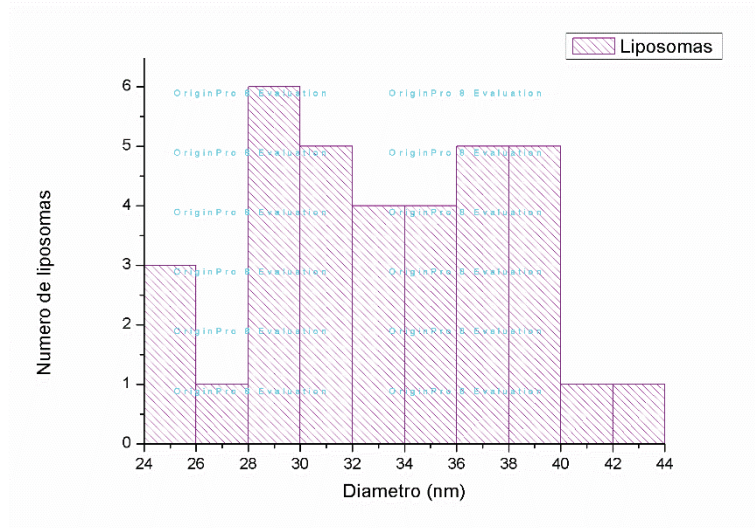


Figura 15. Imágenes de TEM (A) y SEM (B), a modo panorámico (izquierda) y en detalle (derecha).

Para la medición de los liposomas se analizó una imagen panorámica de TEM con el programa ImageJ. Se tomaron 35 medidas al azar y los datos obtenidos se procesaron con el programa Origin, obteniendo un histograma con la distribución de dichas medidas (*Gráfica 2*).



Gráfica 2. Histograma de distribución de los tamaños de los liposomas obtenido mediante ImageJ y Origin. La mayor parte de la muestra tiene un tamaño de unos 28-40 nm.

5. Conclusiones

- La expresión de la proteína rFstC se consiguió con éxito, tanto a 37 como a 30°C, lo cual se demostró por análisis Western Blot.
- La purificación de rFstC se alcanzó tras las modificaciones realizadas durante el proceso y pone de manifiesto la dificultad de purificar proteínas de membrana, además de la importancia del buen estado de las columnas de cromatografía. Sin embargo, es necesario seguir investigando en futuras optimizaciones que permitan una mayor obtención de proteína.
- Se obtuvo una buena eficiencia de encapsulación de rFstC, y los liposomas presentaron las características apropiadas de morfología, tamaño y comportamiento en solución.

Finalmente, será necesario realizar un ensayo de vacunación en peces con la proteína rFstC encapsulada en liposomas, para comprobar su comportamiento y realizar una valoración de la inmunogenicidad y protección que confiere contra la enfermedad.

6. Bibliografía

- Albelda-Berenguer, M., Monachon, M., & Joseph, E. (2019). Chapter Five. Siderophores: From natural roles to potential applications. In: Gadd, G.M. & Sariadlani, S. (Eds). *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 106. United Kingdom: Academic Press (Elsevier Inc.), pp 193-225. doi: 10.1016/bs.aambs.2018.12.001
- APROMAR (2020). La Acuicultura en España. Informe anual.
- Austin B., Austin, D. A. (2016). Bacterial fish pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish, Sixth Edition. Switzerland: Springer. doi: 10.1017/CBO9781139855952.178
- Balado, M., Segade, Y., Rey, D., Osorio, C. R., Rodríguez, J., Lemos, M. L., & Jiménez, C. (2017). Identification of the Ferric-Acinetobactin Outer Membrane Receptor in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and Structure-Activity Relationships of Synthetic Acinetobactin Analogues. *ACS Chem. Biol.*, 12, 479 - 493. doi: 10.1021/acscchembio.6b00805
- Beaz-Hidalgo, R., & Figueras, M. J. (2013). *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of Fish Diseases*, 36, 371–388. doi: 10.1111/jfd.12025
- Bondad-Reantaso, M.G., Mackinnon, B., Bin, H., Jie, H. , Tang-Nelson, K., Surachetpong, W., Alday-Sanz, V., Salman, M.O., Brun, E., Karunasagar, I., Hanson, L., Sumption, K., Barange, M., Lovatelli, A., Sunarto, A., Fejzic, N., Subasighe, R., Mathiesen, A.M. & Shariff, M. (2020). SARS-CoV-2 (The Cause of COVID-19 in Humans) is not known to infect aquatic food animals or contaminate their products. *Asian Fisheries Society*, 33, 74–78. doi: 10.33997/j.afs.2020.33.1.009
- Cordero, O. X., Ventouras, L.-A., DeLong, E. F., & Polz, M. F. (2012). Public good dynamics drive evolution of iron acquisition strategies in natural bacterioplankton populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 109, 20059–20064. doi: 10.1073/pnas.1213344109
- Coscelli, G. A. (2014). Estudio de la patogenia y de los mecanismos inmunológicos en la infección por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* en rodaballos (*Scophthalmus maximus*). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Coscelli, G. A., Bermúdez, R., Sancho Silva, A. R., Ruíz de Ocenda, M. V., & Quiroga, M. I. (2014). Granulomatous dermatitis in turbot (*Scophthalmus maximus*) associated with natural *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* infection. *Aquaculture* 428–429, 111–116. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.02.038
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., & Charette, S. J. (2014). Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet. Microbiol.*, 169, 1–7. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.06.025
- Fan, Y., Marioli, M., & Zhang, K. (2021). Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 192, 113642. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113642
- FAO. (2020a). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome: FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO. (2020b). Summary of the Impacts of the Covid-19 Pandemic on the Fisheries and aquaculture sector: *Addendum to the State of World Fisheries and Aquaculture 2020*, 1–4.
- Górska, A., Sloderbach, A., & Marszał, M. P. (2014). Siderophore-drug complexes: Potential medicinal applications of the “Trojan horse” strategy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35, 442–449. doi: 10.1016/j.tips.2014.06.007
- Has, C., & Sunthar, P. (2020). A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. *Journal of Liposome Research*, 30, 336–365. doi: 10.1080/08982104.2019.1668010
- Johansen, L. H., Jensen, I., Mikkelsen, H., Bjørn, P. A., Jansen, P. A., & Bergh, O. (2011). Disease interaction and pathogens exchange between wild and farmed fish populations with special reference to Norway. *Aquaculture*, 315, 167–186. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.02.014

- Lago, E. P., Nieto, T. P., & Farto, R. (2012). Virulence factors of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* strains associated with infections in turbot *Psetta maxima*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *99*, 145–151. doi: 10.3354/dao02467
- Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2010). Iron Uptake in *Vibrio* and *Aeromonas*. In Cornelis, P. & Andrews, S.C. (Eds). *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*. Belgium and United Kingdom: Caister Academic Press, pp. 117–141.
- Lin, S. H., & Guidotti, G. (2009). Chapter 35: Purification of Membrane Proteins. In Burguess, R.R. & Deutscher, M.P (Eds). *Methods in Enzymology*, Vol. 463: Guide to Protein Purification. United Kingdom: Elsevier Inc, pp. 619-629. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63035-4
- MacPhee, D. J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *61*, 171–177. doi: 10.1016/j.vascn.2009.12.001
- Martínez Matamoros, D. (2018). Estudio químico de bacterias de origen marino: aislamiento de productos naturales bioactivos, proteínas recombinantes receptoras de sideróforos de bacterias patógenas en peces de acuicultura y síntesis de conjugados de sideróforos con nanopartículas magnéticas. Tesis Doctoral. Universidad de A Coruña.
- Meuskens, I., Michalik, M., Chauhan, N., Linke, D., & Leo, J. C. (2017). A new strain collection for improved expression of outer membrane proteins. *Frontiers Cell. Infect. Microbiol.* *7*, 464. doi: 10.3389/fcimb.2017.00464
- Mislin, G. L. A., & Schalk, I. J. (2014). Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Metallomics*, *6*, 408–420. doi: 10.1039/c3mt00359k
- Najimi, M., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2008). Identification of siderophore biosynthesis genes essential for growth of *Aeromonas salmonicida* under iron limitation conditions. *App. and Environ. Microbiol.*, *74*, 8, 2341–2348. doi: 10.1128/AEM.02728-07
- Rey-Varela, D., Cisneros-Sureda, J., Balado, M., Rodríguez, J., Lemos, M. L. & Jiménez, C. (2019). The Outer Membrane Protein FstC of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Acts as Receptor for Amonabactin Siderophores and Displays a Wide Ligand Plasticity. Structure – Activity Relationships of Synthetic Amonabactin Analogues. *ACS Infect. Dis.*, *5*, 1936-1951. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00274
- Romero, J., Gloria, C., & Navarrete, P. (2012). Chapter 6: Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. In Carvalho, E. (Ed). *Health and Environment in Aquaculture*. InTech, pp. 159-198. doi: 10.5772/28157
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiol.* *5*, 172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172
- Santos, L., & Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *52*, 135–143. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010
- Schaible, U. E., & Kaufmann, S. H. E. (2004). Iron and microbial infection. *Nature Reviews Microbiology*, *2*, 946–953. doi: 10.1038/nrmicro1046
- Schwendener, R. A. (2014). Liposomes as vaccine delivery systems: A review of the recent advances. *Ther. Adv. Vaccines*, *2*, 159–182. doi: 10.1177/2051013614541440
- Thode, S. K., Rojek, E., Kozłowski, M., Ahmad, R., & Haugen, P. (2018). Distribution of siderophore gene systems on a *Vibrionaceae* phylogeny: Database searches, phylogenetic analyses and evolutionary perspectives. *PLoS ONE*, *13*, 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0191860
- Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, *246*, 37–61. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.01.002
- Valderrama Pereira, A. K. (2016). Estudio de los sideróforos y de las proteínas receptoras producidas por las bacterias patógenas de peces: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Aeromonas salmonicida*. Tesis Doctoral. Universidad de A Coruña.

- Vincent, A. T., Trudel, M. V., Paquet, V. E., Boyle, B., Tanaka, K. H., Dallaire-Dufresne, S., Daher, R. K., Frenette, M., Derome, N., & Charette, S. J. (2014). Detection of variants of the pRAS3, pAB5S9, and pSN254 plasmids in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: Multidrug resistance, interspecies exchanges, and plasmid reshaping. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 7367–7374. doi: 10.1128/AAC.03730-14
- Wimley, W. C. (2003). The versatile β -barrel membrane protein. *Current Opinion in Structural Biology*, 13, 404–411. doi: 10.1016/S0959-440X(03)00099-X