

APLICACIÓN DE BIOTECNOLOGÍA AL DESARROLLO DE VACUNAS DE USO VETERINARIO

INTRODUCCIÓN

La vacunación como medio de prevención de enfermedades animales se ha utilizado durante siglos y se ha demostrado que es una potente herramienta para aliviar el sufrimiento de los animales, así como para contribuir a la tranquilidad económica de los ganaderos. Hasta hace 15 a 20 años, las vacunas habían cambiado poco respecto a las que Jenner y Pasteur crearon inicialmente. Desde ese momento se han producido importantes cambios en los tipos de vacunas de los que se dispone, debido a varios motivos, como la compatibilidad con los programas de erradicación y las políticas de comercio internacional, así como la relación coste-eficacia de la producción. Las primeras vacunas recombinantes se introdujeron a finales de los años 1980 para controlar la enfermedad de Aujeszky y la rabia en animales salvajes (Pastoret y cols., 1988), y son las precursoras de productos similares que existirán en el futuro.

Los enfoques utilizados para el desarrollo de vacunas han prosperado rápidamente como consecuencia de la ampliación de los conocimientos sobre los mecanismos mediante los cuales se induce la inmunidad protectora, y gracias a la inmensa disponibilidad de datos del genoma tanto de los agentes patógenos como de sus hospedadores. Además, la evolución de nuevas tecnologías que ha tenido lugar de forma paralela en el campo de la biología molecular y la inmunología también ha influido mucho en el desarrollo de nuevas estrategias vacunales y en la calidad de los productos que se han desarrollado. Ello ha permitido el diseño de vacunas dirigidas al control y la erradicación de agentes patógenos concretos dentro del marco de trabajo que establecen las exigencias regionales, nacionales e internacionales. La utilización de tecnologías recombinantes conlleva la necesidad de aplicar una evaluación de la relación riesgo-beneficio, en la cual se analizan los aspectos concretos que deben tenerse en cuenta, en concreto respecto a la seguridad (véase el Apéndice 1.1.8.1. Análisis del riesgo asociado a los productos biológicos de uso veterinario, del Capítulo 1.1.8. Principios de producción de vacunas de uso veterinario de este Manual Terrestre).

En este capítulo se describen todas las tecnologías que se utilizan para desarrollar vacunas basadas en la ingeniería genética destinadas a un fin concreto. Se ha establecido la presente clasificación con el objetivo de ayudar al lector a comprender las tecnologías utilizadas, pero debe tenerse en cuenta que las categorías no se excluyen mutuamente (es decir, la genética inversa puede utilizarse para producir vacunas quiméricas). En principio, las tecnologías pueden utilizarse para cambiar el agente patógeno diana en sí con el fin de alterar sus propiedades mediante delección, inserción u otras modificaciones genéticas, o bien para modificar los genes o las secuencias de codificación aislados de agentes patógenos para producir inmunógenos concretos asociados a una inmunidad protectora.

A. GENÉTICA INVERSA

El desarrollo de un sistema de genética inversa para varios virus de ARN y de ADN ha revolucionado el campo de la virología al permitir la introducción de mutaciones, inserciones y delecciones diseñadas en el genoma de virus vivos. Hasta ahora se ha utilizado en gran variedad de aplicaciones, como la atenuación de virus, la modificación de la especificidad de hospedador y la generación de virus con replicación deficiente. Estas

estrategias también deben aplicarse al desarrollo de nuevas estrategias vacunales y se utilizan mucho en la caracterización de la estructura y la función de genes víricos individuales y secuencias de codificación.

La tecnología de la genética inversa permite generar una copia clonada de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mediante transcripción inversa *in vitro*, manipulando ADN *in vitro* y generando a continuación el virus vivo modificado mediante transfección de células permisivas con el/los ADN/s clonado/s. Esta tecnología se aplicó por primera vez utilizando el bacteriófago Q-Beta, un virus de ARN de hebra positiva (Taniguchi, 1978). A continuación, se han rescatado muchos virus de ARN de hebra positiva con genomas grandes, como el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS), lo cual ha contribuido al estudio de la biología de estos virus y al desarrollo de nuevas vacunas antivíricas atenuadas (virus vivo). Así, por ejemplo, se utilizó la genética inversa para desarrollar un clon infeccioso del virus de la gastroenteritis transmisible (VGET), que indujo inmunidad lactógena en cerdas inmunizadas (Sola y cols., 2003). Esta novedosa técnica también se ha utilizado para desarrollar un virus modificado del síndrome respiratorio y disgenésico porcino, que se puede utilizar como vacuna DIVA (que permite diferenciar entre animales infectados y vacunados) para contribuir a diferenciar entre cerdos vacunados e infectados (de Lima y cols., 2008).

Debido a las características inherentes a los virus con ARN de hebra negativa, ha costado años de trabajo desarrollar esta técnica y utilizarla para generar virus mediante ingeniería genética que contuvieran genomas de ARN de hebra negativa. Inicialmente, la genética inversa se desarrolló para los virus del género influenza, que son virus de ARN de hebra negativa segmentada. Desde entonces, esta técnica se ha utilizado con éxito para generar gran variedad de virus de ARN con genomas de hebra negativa, segmentada o no. Por ejemplo, la utilización de esta técnica ha permitido el desarrollo de una vacuna contra el virus de la influenza aviar en la cual el virus creado mediante ingeniería genética contiene un gen de hemaglutinina (HA) de un virus H5N1 y un gen de neuraminidasa (NA) de un virus H2N3, utilizando como base un H1N1 (Meeusen y cols., 2007). La vacuna inactivada resultante basada en un virus H5N3 indujo una protección completa frente a virus H5N1 altamente patógeno en aves expuestas a este virus. También se ha utilizado una técnica de genética inversa en el desarrollo de vacunas contra la fiebre aftosa, la peste porcina clásica y la enfermedad de Newcastle (véanse los Capítulos de la OIE 3.1.8, 3.8.3 y 3.3.14, respectivamente). Más recientemente, se han desarrollado sistemas de genética inversa para virus de ARN bicatenarios segmentados, como el virus de la lengua azul (VLA), lo cual plantea la posibilidad de nuevas estrategias de desarrollo de vacunas contra estos virus (Boyce y cols., 2008).

La vacuna de ciclo único incapaz de producir infección (DISC) supone la delección de un cuadro de lectura abierto que codifica una proteína clave involucrada en la replicación vírica o la formación de cápside vírica (Widman y cols., 2008). El virus DISC se aísla en células que expresan la proteína clave, de tal forma que proporcionan la proteína que falta en *trans*. Este tipo de virus, una vez inyectado en los animales, puede terminar solo un ciclo de replicación sin producir virus progenie. Las vacunas de virus DISC son más estimulantes que las de virus muertos y no causan los problemas que causan las vacunas de virus vivos.

B. TECNOLOGÍA DE LOS VECTORES RECOMBINANTES

Los avances en la genética inversa, la genómica y la proteómica han facilitado la detección de mecanismos de virulencia, de interacciones entre hospedador y agente patógeno, y de antígenos protectores en muchos microorganismos patógenos, así como también el desarrollo de vehículos/vectores adecuados para la administración de estos antígenos al hospedador. La secuenciación de genomas bacterianos y víricos ha facilitado el rápido desarrollo de delecciones definidas en los genomas de gran variedad de agentes patógenos, lo cual no solo da lugar a la atenuación, sino que también crea espacio para la inserción de genes externos que codifican antígenos de microbios heterólogos. En general, los vectores bacterianos o víricos vivos tienen en común varias características, como la facilidad y economía de la producción, la no integración en el genoma del hospedador, la estabilidad y una capacidad razonable de insertar genes que codifican antígenos heterólogos. Además, como ocurre con cualquier vacuna atenuada (virus vivo), el vector debe ser avirulento y debe evaluarse cómo le afecta el sistema inmunitario.

1. Vectores bacterianos

En general, los vectores bacterianos se atenúan mediante delección de genes necesarios para los procesos metabólicos clave o de genes relacionados necesarios para la virulencia. Aunque no se utilizan de forma sistemática en los animales, se están logrando rápidos avances en el desarrollo y evaluación de distintas bacterias que podrían funcionar como vectores. Durante varios años, se han desarrollado BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) y *Salmonella* como vectores para administrar antígenos vacunales a animales, y la segunda se ha utilizado para generar cepas vacunales vivas para aves de corral. Actualmente se están desarrollando muchos otros vectores bacterianos con microorganismos comensales (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Staphylococcus*) o bien con microorganismos patógenos atenuados (*Shigella*, *Bacillus*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Cornebacteria* y *Bordetella*), en todos los cuales se está evaluando si tienen capacidad para inducir inmunidad protectora.

2. Vectores víricos

La mayoría de vectores víricos se desarrolla utilizando virus que causan enfermedad leve o que no causan enfermedad, o bien utilizando virus que son patógenos pero que se han atenuado mediante la delección de los genes de la virulencia. Como vehículos para la administración de vacunas se han desarrollado y evaluado vectores víricos de replicación competente, que pueden producir virus progenie, así como vectores víricos de replicación defectuosa, que no producen virus progenie. Muchas vacunas comerciales basadas en vectores víricos de ADN, incluidos poxvirus y herpesvirus, se han autorizado con éxito para ser utilizadas en veterinaria (revisado en Gerdtz y cols., 2006). Algunos de estos vectores víricos son el virus de la vaccinia, el virus de la viruela del canario, el virus de la viruela aviar y el herpesvirus del pavo. Se han desarrollado muchos vectores víricos, o bien están en proceso de desarrollarse, mejorarse y evaluarse. Entre ellos, virus de ARN como el virus de la encefalitis equina venezolana, el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus espumoso felino, así como virus de ADN como adenovirus, herpesvirus o poxvirus. Los virus de la viruela aviar y de la viruela del canario se han utilizado como vectores en gran variedad de aplicaciones (MacLachlan y cols., 2007; Swayne, 2009); también se han utilizado adenovirus humanos de replicación deficiente como vectores que han funcionado muy bien en el desarrollo de vacunas contra la fiebre aftosa (Rodríguez & Grubman, 2009). Las vacunas autorizadas contra el virus de la viruela del canario incluyen vacunas contra la influenza equina y contra la leucemia felina. Otras vacunas de vector autorizadas son herpesvirus del pavo vectorizados con un inserto de enfermedad de Gumboro.

C. VACUNAS CON GENES DELECIONADOS

Conocer el factor/es de virulencia específicos de un patógeno y la tecnología de ADN recombinante existente ha facilitado la creación de patógenos con delecciones en genes específicos, con el fin de utilizarlos como vacunas de virus vivo. El enfoque de crear y comprobar delecciones génicas definidas contribuye en último término a reducir la patogenicidad/virulencia del microorganismo sin afectar a su inmunogenicidad. Este tipo de microorganismos con genes delecionados pueden utilizarse como vacunas, puesto que conservan los rasgos inmunógenos del agente natural, pero no causan enfermedad. Sin embargo, para ser eficaces como vacunas viables, estos microorganismos deben ser genéticamente estables, deben crecer fácilmente y deben ser fáciles de administrar. Hasta ahora, este tipo de delecciones se han centrado en los genes que determinan la virulencia o que regulan vías metabólicas clave del microorganismo.

Este enfoque se ha utilizado con éxito para crear varias vacunas atenuadas, con cepas bacterianas patógenas vivas genéticamente estables, que pueden utilizarse de forma segura y que inducen una mejor protección que las vacunas inactivas. Se han autorizado vacunas de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* y serovar *enteritidis* con genes delecionados para su uso en aves de corral (Babu y col., 2004; Meesun y col., 2007) y, de forma similar, se ha autorizado una vacuna de *Streptococcus equi* con el gen *aroA* delecionado para su uso en caballos (Jakobs y cols., 2000; Meesun y cols., 2007).

Esta tecnología también se ha utilizado con éxito para crear vacunas atenuadas de cepas de virus patógenos vivos genéticamente estables, que pueden utilizarse como vacunas marcadoras para diferenciar entre animales vacunados e infectados. Se ha autorizado una vacuna marcadora de virus de la enfermedad de Aujeszky con dos genes delecionados (*gE* y *TK*) para su uso en cerdos (Ferrari y col., 2000; Meesun y col., 2007), así como una vacuna marcadora de herpesvirus bovino tipo 1 con el gen *gE* delecionado para su uso en ganado bovino (Meesun y col., 2007; Van Oirschot y col., 1996).

D. VIRUS QUIMÉRICOS

Los virus quiméricos se definen como virus recombinantes que pueden contener partes de dos genomas víricos estrechamente relacionados. Así, por ejemplo, un virus quimérico puede contener genes estructurales de un serotipo vírico y genes no estructurales de otro serotipo del mismo virus. Por otra parte, un virus quimérico puede contener parte del genoma de distintos miembros de la misma familia de virus. En principio, los virus quiméricos presentan las características biológicas de ambos virus parentales. Una de las principales ventajas de este enfoque es que una sola dosis de virus proporciona el repertorio completo de los antígenos que se parecen mucho al virus patógeno/s, los cuales pueden inducir una respuesta inmunitaria protectora contra múltiples virus patógenos del mismo o distintos serotipos que dicho virus patógeno.

La obtención de clones de ADN complementario (ADNc) infeccioso de longitud total a partir de distintos virus de ARN mediante tecnologías genéticas ha conllevado nuevas estrategias de desarrollo de vacunas. Se han desarrollado pestivirus quiméricos utilizando un clon de ADNc infeccioso que contiene la parte esencial del genoma del virus de la peste porcina clásica (VPPC) o bien del genoma del virus de la diarrea vírica bovina (VDVB). En un caso, se desarrolló un pestivirus quimérico sustituyendo la secuencia que codifica el gen E2 del VDVB en la copia de ADN infeccioso de la cepa CP7 del VDVB por la correspondiente secuencia de codificación del E2 de la cepa Alfort 187 del VDVB (Reimann y col., 2004). Por otra parte, se desarrolló otro virus quimérico

sustituyendo la secuencia de codificación del E2 del VDVB en la copia de ADN infeccioso de la cepa C utilizado en la vacuna contra el VDVB, por la correspondiente secuencia de codificación del gen E2 del VDVB (van Gennip y cols., 2000). Estos virus quiméricos parecían estar atenuados en cerdos, indujeron protección completa en los casos de exposición al VPPC y contribuyeron a discriminar entre cerdos vacunados e infectados (Reimann y cols., 2004; van Gennip y cols., 2000).

En otra aplicación, se han aislado circovirus porcinos quiméricos (CVPQ) utilizando clones de ADNc del circovirus porcino CVP1 en los que se utilizó la proteína de la cápside de un CVP2 patógeno para sustituir el gen correspondiente en la cepa CVP1 no patógena (CVP 1-2). De igual forma, el gen de la cápside del CVP2 se ha sustituido por el gen del CVP1 (CVP2-1). El virus CVP1-2 quimérico pareció estar atenuado en cerdos e indujo inmunidad protectora contra CVP2 natural en cerdos expuestos (Fenaux y cols., 2004).

Este tipo de tecnología también se ha utilizado para generar flavivirus quiméricos. Así, por ejemplo, se generó un virus quimérico sustituyendo las secuencias que codificaban proteínas estructurales del virus YF-17D de la fiebre amarilla por las del virus del Nilo occidental (VNO). Una sola dosis de esta vacuna de flavivirus quimérico indujo respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales en caballos, y en animales expuestos al VNO proporcionó protección frente a este virus sin causar enfermedad clínica de ningún tipo (Meeusen y cols., 2007). También se ha utilizado este tipo de tecnología para desarrollar vacunas para seres humanos contra el virus de la encefalitis japonesa, el VNO y el virus del dengue. Aunque las vacunas de flavivirus quimérico han presentado perfiles de seguridad satisfactorios y protecciones eficaces, en los virus quiméricos deben evaluarse con precaución los cambios de virulencia.

E. VACUNAS DE SUBUNIDADES

Desde principios de los años 1980 existen vacunas de subunidades formadas por proteínas semi-puras o purificadas, y los componentes de las subunidades que se producen mediante tecnología de ADN recombinante existen desde los años 1990 (Cohen, 1993; Rhodes y cols., 1994; Ulmer y cols., 1993; 1995). Estos últimos han suscitado cada vez más interés y actividad a partir de aquel momento. Las vacunas de subunidades no incluyen tecnología de vector vivo recombinante, el cual permite la administración de proteínas recombinantes *in vivo*. El campo de la genómica y disciplinas relacionadas ha revolucionado la forma en que se identifican los antígenos microbianos. Desde que se secuenció un genoma bacteriano por primera vez, en 1995, el número de genomas bacterianos, víricos y parasitarios secuenciados ha aumentado enormemente. De hecho, casi todos los agentes patógenos de animales están ya secuenciados, y los que no lo están pueden secuenciarse fácilmente en menos de un día. Pero lo más importante es que, de forma paralela, ha tenido lugar el desarrollo de los recursos y herramientas bioinformáticos necesarios para analizar estos genomas, y que hoy en día es relativamente fácil identificar antígenos de superficie, epítomos de células B y T específicos, etc. Ya no es necesario conseguir que el microorganismo crezca en un cultivo; así, por ejemplo, se han desarrollado vacunas de subunidad contra *Piscirickettsia salmonis*, un patógeno de los salmónidos, a pesar de las dificultades halladas en el cultivo de este microorganismo (Kuzyk y cols., 2001).

Se pueden producir antígenos de subunidad mediante tecnología tanto bioquímica convencional como de ADN recombinante. La segunda consiste en varios sistemas de expresión procariota y eucariota, incluidas levaduras, células de insectos y plantas (Chichester & Yusibov, 2007) mediante gran variedad de estrategias de expresión integradas o transitorias. Las técnicas bioquímicas siguen siendo útiles en ciertos casos en los que la expresión recombinante no es adecuada, como en los antígenos que requieren una compleja unión (como las fimbrias), o cuando es necesaria una modificación post-translacional. Por ejemplo, *Campylobacter jejuni* es una especie bacteriana que glicosila muchas proteínas de superficie y, como tales, estas se producen mejor en *C. jejuni* que en sistemas de expresión heterólogos, aunque se han modificado cepas de *Escherichia coli* para llevar a cabo la misma función (Wacker y cols., 2002). Un excelente ejemplo de una vacuna de subunidad formada por un auténtico antígeno que mantenía la estructura tridimensional fue la vacuna de *E. coli* K99 inicial contra la diarrea neonatal del ternero, que se probó hace tres décadas (Acres y cols., 1979). Este producto estaba basado en el antígeno de fimbria K99, que pudo extraerse fácilmente de las células mediante tratamiento por calor, de tal forma que mantenía la estructura tridimensional propia de las fimbrias. Otro ejemplo es una vacuna basada en la expresión de baculovirus contra el circovirus porcino tipo 2 (Fachinger y cols., 2008). En muchos casos, la proteína expresada en la vacuna de subunidad se une espontáneamente a partículas bien definidas que podrían parecer partículas víricas. Estas partículas pseudovíricas (VLP) son una subclase de vacunas de subunidad (Roy & Noad, 2008) y su aplicación al desarrollo de vacunas se revisa en el apartado F. Se han comercializado vacunas que contienen la proteína ORF 2 del CVP-2 expresada en el baculovirus.

Las vacunas de subunidad podrían tener algunas ventajas respecto a las atenuadas y a las inactivadas, como la capacidad de inducir una fuerte respuesta inmunitaria humoral y celular. Además, estas vacunas ofrecen un excelente perfil de seguridad, y pueden utilizarse junto con otras vacunas de subunidad. Sin embargo, la eficacia depende de que la inmunidad protectora esté inducida por la inoculación de una o bien un conjunto de proteínas recombinantes definidas. La experiencia ha demostrado que esto podría resultar afectado por el sistema de

expresión génica utilizado. Además, las vacunas de subunidad pueden ser caras de producir en el caso de ciertas glicoproteínas, y pueden requerir el uso de adyuvantes para potenciar las respuestas inmunitarias.

Una de las principales ventajas de las vacunas de subunidad es que, en general, son compatibles con las estrategias DIVA siempre que no se esté utilizando el antígeno como marcador. En el caso de los herpesvirus bovinos se ha utilizado con éxito la glicoproteína gD en formulaciones de vacunas de subunidad. Aunque se ha demostrado que la inmunización con gD es protectora a nivel del animal individual (Harland y cols., 1992; van Drunen Littel-van den Hurk y cols., 1994), no ha reducido la prevalencia del virus en el campo, lo cual disminuye su utilización. Se han probado con éxito vacunas de subunidad contra gran variedad de otros virus respiratorios y entéricos, como el VDVB, el VRSB, el VPIB3, rotavirus y coronavirus, aunque ninguna de ellas se ha comercializado. Podría decirse que las subunidades bacterianas han tenido más éxito que sus homólogos víricas. Ello se debe a la relación coste-eficacia del crecimiento tanto de microorganismos recombinantes como convencionales, y a que en muchos casos existe el requisito general de que la respuesta inmunitaria esté sesgada a linfocitos Th2. Comercialmente se dispone de vacunas recombinantes contra agentes patógenos respiratorios como *Mannheimia haemolytica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, que se basan en las leucotoxinas que producen estos microorganismos, así como en proteínas fijadoras de la transferrina. *Actinobacillus pleuropneumoniae* es un excelente ejemplo de una vacuna formada por subunidades escogidas por crear reactividad cruzada frente a distintos serotipos, de tal modo que proporciona una protección de amplio espectro contra la enfermedad. Asimismo, se ha comercializado una vacuna contra la rinitis atrófica que contiene un derivado no tóxico de la toxina dermonecrótica de *Pasteurella multocida*, producida por una cepa genéticamente modificada de *Escherichia coli*, junto con una bacteria convencional de *B. bronchiseptica*.

Las vacunas contra la PPC ponen claramente de manifiesto la necesidad de dirigir la tecnología recombinante a un fin concreto. Las vacunas convencionales atenuadas, con virus vivo, conllevan una rápida aparición de la inmunidad y son eficaces para prevenir la transmisión de la infección (Van Oirschot, 2003) pero tienen el inconveniente de que no permiten diferenciar entre cerdos infectados y cerdos meramente vacunados. Las vacunas de subunidad E₂ comerciales comportan una aparición más lenta de la inmunidad y reducen, aunque no previenen, la excreción del virus. Sin embargo, permiten aplicar una estrategia DIVA, de tal modo que facilitan una estrategia de vacunación protectora. Por tanto, es probable que su utilización resulte especialmente beneficiosa en cerdos reproductores de gran valor, en los que la vacuna puede utilizarse para reducir el impacto clínico de la enfermedad, y al mismo tiempo para detectar y eliminar los cerdos infectados.

F. PARTÍCULAS PSEUDOVÍRICAS

Las partículas pseudovíricas (VLP) son estructuras supramoleculares formadas por una o más proteínas recombinantes. Las partículas se forman mediante un auto-ensamblaje y típicamente miden entre 20 y 100 nm. En función de su origen, pueden tener una estructura icosaédrica o baciliforme (revisado en Jennings & Bachmann, 2008). Las VLP ofrecen la ventaja de poder formular el antígeno vacunal con una estructura particular, aumentando así la inmunogenicidad de la vacuna. Las VLP pueden utilizarse como vacuna en sí o como portadoras de antígenos fusionados genéticamente (quiméricos), incorporados o fijados covalentemente. Las VLP se han estudiado exhaustivamente durante los últimos 20 años, con vacunas humanas contra el virus de la hepatitis B (Zuckerman, 2006) y papilomavirus humanos (Stanley, 2008) comercialmente disponibles, así como con varias vacunas de uso veterinario en desarrollo, como la vacuna contra el virus de la lengua azul, rotavirus o parvovirus.

Las VLP ofrecen varias ventajas cuando se utilizan como vacuna, como un perfil de alta seguridad, la similitud con estructuras víricas y bacterianas, la posibilidad de una producción a gran escala y la de combinarlas con otros adyuvantes. Lo habitual es que la inmunización con VLP produzca respuestas de anticuerpos rápidas y fuertes. De forma similar a lo que ocurre en los virus y las bacterias, se producen múltiples copias de los antígenos vacunales con una estructura altamente repetitiva y ordenada, casi cristalina (Bachmann & Zinkernagel, 1996), que pueden fijarse de forma cruzada al receptor de las células B, dando así lugar a una activación de la célula B y a la posterior inducción de repuestas de IgM independientes de las células T (Thyagarajan y cols., 2003). Además, ello posibilita la interacción con el sistema del complemento, lo cual da lugar a un aumento de la fagocitosis. Por otra parte, la estructura particulada de las VLP también potencia la captación por parte de células dendríticas y la subsiguiente presentación cruzada del antígeno. Lenz y cols. (2001) observaron que la presentación cruzada de antígenos particulados era más eficaz que las presentaciones de antígenos solubles. Sin embargo, la inducción de respuestas de células T en general todavía no es tan eficaz como la que se consigue mediante vacunas con agente vivo. Para superar este problema, las VLP se han combinado con éxito con adyuvantes moleculares como CpG ODN y ARN monocatenario. Otras VLP se ha observado que estimulan directamente células dendríticas (CD). Así, por ejemplo, se ha comprobado que la combinación de proteína L1 con VLP de papilomavirus activa directamente células dendríticas.

Las VLP pueden utilizarse como vacuna en sí o bien como portadoras de antígenos recombinantes, incorporados directamente, fusionados genéticamente o bien fijados covalentemente. Así, por ejemplo, la proteína 6 del rotavirus bovino (VP6) forma VLP que son altamente inmunógenas y que por sí mismas ya confieren protección

contra la infección en caso de exposición (Redmond y cols., 1993). Sin embargo, utilizando la VP4 y la VP7 pueden fijarse covalentemente otros antígenos a las partículas VP6 y utilizarse para la inmunización (Redmond y cols., 1993). Otros ejemplos destacables son las VLP del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg-VLP) o del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, las VLP del virus del dengue, las VLP de norovirus y las VLP del virus de la influenza A. Algunos ejemplos de VLP utilizadas como portadoras son las VLP del antígeno central del virus de la hepatitis B, que están bien caracterizadas (HBcAg VLPs; [Blanchet & Sureau, 2006; Pumpens & Grens, 2001]) y que se utilizan como portadoras de la proteína M de la influenza A (M2-HBcAg [Jegerlehner y cols., 2002]), o los epítomos del antígeno de la malaria reconocidos por células B y T (Nardin y cols., 2004). Aunque casi siempre se administran por vía sistémica, ya se ha probado la administración enteral de algunas vacunas de VLP.

G. VACUNAS DE ADN

La inmunización con ADN representa una estrategia de vacunación relativamente nueva que se basa en un concepto sencillo. Las vacunas de ADN pueden definirse como plásmidos bacterianos que codifican antígeno, capaces de inducir respuestas inmunitarias específicas tras la inoculación en un hospedador adecuado. La inmunización tiene lugar mediante la captación de plásmido purificado en las células del hospedador, donde persiste a nivel extracromosómico en los núcleos. La posterior expresión de proteína da lugar a la presentación al sistema inmunitario de formas de la proteína procesadas normalmente o modificadas. En el hospedador, las formas nativas de las proteínas tienen acceso a las vías de presentación de antígeno mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tanto de clase I como de clase II, lo cual da lugar a una respuesta inmunitaria equilibrada. La utilización de ADN de plásmido puro ofrece muchas ventajas respecto a otros vehículos de administración de vacunas. Una de las principales ventajas es la capacidad de las vacunas de ADN de inducir respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares, lo cual es esencial en la protección frente a muchas enfermedades. También existen evidencias de que las vacunas de ADN pueden inducir una inmunidad a largo plazo, lo cual es otro requisito para que una vacuna se considere eficaz. Dado que el vector por sí mismo no induce respuestas inmunitarias, las vacunas de ADN pueden administrarse repetidamente sin la interferencia de anticuerpos. Desde un punto de vista técnico, las vacunas de ADN son fáciles de modificar, producir y purificar, de tal modo que pueden desarrollarse y evaluarse nuevas vacunas de ADN en modelos animales en cuestión de meses. Las vacunas de ADN son muy estables y, por tanto, tienen un largo periodo de validez y pueden transportarse sin una cadena de frío. En varios estudios llevados a cabo con distintas especies, incluido el ser humano, se ha establecido la seguridad de las vacunas de ADN (Bagarazzi y cols., 1998; Kim y cols., 2001).

En cuanto empezó a explorarse el concepto de inmunización con ADN, se observó que esta tecnología es muy eficaz en roedores, pero inicialmente no funcionó tan bien en especies más grandes. Sin embargo, los avances más recientes han dado lugar al desarrollo de vacunas de ADN en muchas especies de destino exogámicas (Carvalho y cols., 2009; Redding & Weiner, 2009). Actualmente existen cuatro vacunas de ADN autorizadas para uso veterinario, contra la hormona liberadora de la hormona del crecimiento para cerdos, en Australia, contra el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa del salmón, en Canadá, y contra el VNO para caballos y el melanoma para perros en EEUU (Kutzler & Weiner, 2008). Para lograr una mayor eficacia en especies grandes, se ha requerido una optimización a distintos niveles, como los siguientes: (i) modificaciones del vector; (ii) modificar la localización subcelular de la proteína mediante ingeniería genética; (iii) mejoras en las vías y métodos de administración del ADN; (iv) inclusión de adyuvantes, como un gen o un agente co-administrado, y (v) antígenos dirigidos a células presentadoras de antígeno (APC). Es probable que la eficacia de las vacunas de ADN en grandes animales, a menudo insatisfactoria, derivara de una transfección ineficaz, así como de una "insipidez inmunológica", de los plásmidos administrados. Se observó que la utilización de un dispositivo de administración de la vacuna sin aguja reducía la dosis eficaz de una vacuna de ADN polivalente experimental contra la influenza aviar, y que servía para administrar rápidamente inyecciones repetidas en aves de corral (Rao y cols., 2009).

H. ADMINISTRACIÓN DEL ANTÍGENO Y ADYUVANTES MOLECULARES

Los adyuvantes son sustancias que potencian respuestas inmunitarias cuando se administran junto con antígenos. Constituyen un componente clave de las vacunas inactivadas (recombinantes o de subunidad), que a menudo son poco inmunógenas. Los adyuvantes se clasifican en dos grandes categorías en función de su supuesto mecanismo de acción: i) sistemas de administración, y ii) adyuvantes inmunoestimulantes. Los sistemas de administración engloban muchos adyuvantes convencionales y muchos adyuvantes particulados, y se explican por separado más adelante.

A pesar de la importancia de los adyuvantes en las vacunas, sus mecanismos de acción siguen sin comprenderse del todo. Avances recientes en el estudio de la inmunidad innata han proporcionado importantes pistas sobre los mecanismos moleculares de los adyuvantes inmunoestimulantes. En este sentido, las células

inmunitarias expresan gran variedad de receptores, que en conjunto se denominan receptores de reconocimiento de patrón (PRR) y que probablemente detectan componentes microbianos conservados denominados patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP). Se han descrito varios PRR, como los receptores tipo Toll (TLR); algunos ejemplos son el TLR 9, que reconoce motivos de ácido nucleico de CpG bacteriano; un agonista natural de los TLR7/8, formado por ARN vírico monocatenario (oligoribonucleótidos, ORN), que activa fuertemente respuestas inmunitarias innatas en ratones y seres humanos, y especialmente potentes en grandes animales; un agonista del TLR4 como el lipopolisacárido (LPS), que se conoce por sus potentes propiedades inmunoestimulantes y adyuvantes, aunque desafortunadamente esta molécula es muy tóxica, y por último, receptores tipo NOD -dominio de oligomerización de nucleótido- (NLL), receptores tipo RIG –gen inducible por ácido retinoico- (RLL), y receptores de lectina tipo C (CLR), todos los cuales detectan componentes microbianos. La unión de estos receptores a sus agonistas desencadena una cascada de episodios moleculares y celulares que da lugar a la activación de una inmunidad innata, la cual determina la inmunidad adaptativa específica de antígeno. De estos receptores, los agonistas de los TLR son los más estudiados, y han dado resultados muy prometedores como adyuvantes. Asimismo, es interesante destacar que la vacuna atenuada viva 17D contra la fiebre amarilla (YF-17D), una de las vacunas de mayor éxito, activa los TLR2, 7, 8 y 9 (Querec y cols., 2006), lo cual sugiere que el éxito de al menos algunas de las vacunas atenuadas puede derivar de su capacidad de activar los TLR. Este hecho ha generado un gran interés por los agonistas de los TLR como adyuvantes.

El paradigma de la industria de las vacunas de uso veterinario de utilizar un solo adyuvante por vacuna viene determinado en parte por los costes derivados de incluir más de un adyuvante en cada vacuna; sin embargo, ello puede reducir seriamente la eficacia de candidatos a vacuna que podrían ser seguros, y podría explicar, al menos en parte, por qué con algunas vacunas o adyuvantes no se ha conseguido una eficacia óptima. Poco a poco se está observando que tal vez sea mejor utilizar varios adyuvantes por vacuna que solo uno. Así, por ejemplo, aunque los CpG ODN son buenos adyuvantes, como tales pueden incluso mejorar si se formulan o se administran conjuntamente con otros componentes, como partículas, sales minerales, saponinas, liposomas, péptidos catiónicos, polisacáridos y toxinas bacterianas o los polímeros sintéticos, polifosfacenos (Wack y cols., 2008).

El efecto adyuvante de las micropartículas se conoce desde hace algún tiempo y se ha revisado con anterioridad (Mutwiri y cols., 2005). Los sistemas de administración con partículas se considera que potencian la captura y retención de antígenos en ganglios linfáticos locales. Además, las micropartículas facilitan la presentación de antígeno por parte de las APC, por medio de las vías de procesamiento restringido y presentación tanto del MHC de clase I como del MHC de clase II. Una de las principales ventajas de las micropartículas para la administración dirigida de antígeno es que pueden constituir un medio de administración flexible que puede utilizarse para administrar tanto antígenos como moléculas inmunoestimulantes.

Otros posibles sistemas de administración de antígeno son los polifosfacenos, un tipo de polímeros sintéticos formados por el elemento principal y átomos de fósforo y de nitrógeno alternantes con grupos laterales orgánicos unidos a cada fósforo (Mutwiri y cols., 2007). En cuanto al ISCOM, un complejo inmunoestimulante que consiste en una pequeña nanopartícula de 40 nm formada por saponina (adyuvante), lípidos y antígeno, también se ha descrito como un sistema de administración de antígeno porque no solo tiene actividad adyuvante sino también la capacidad de dirigirse a las APC (Morein y cols., 2004). Durante muchos años se ha autorizado una vacuna comercial con ISCOM contra la influenza equina (Heldens y cols., 2009).

I. ADMINISTRACIÓN DE VACUNAS

La decisión relativa a cómo administrar una vacuna debe tomarse teniendo en cuenta gran variedad de aspectos, con el objetivo final de poder vacunar de forma masiva durante los brotes de enfermedad, y de vacunar animales salvajes. Las vacunas orales utilizadas contra la rabia en animales salvajes, como los zorros, inicialmente contenían virus vacunales atenuados de la rabia, como la cepa ERA, pero la posibilidad de que estas vacunas pudieran causar rabia en algún caso (Fehlner-Gardiner y cols., 2008) ha comportado que fueran en gran medida sustituidas (http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/eradication/rabies_pres_19.pdf). En Canadá, actualmente se está utilizando una vacuna con adenovirus vivo vectorizado, que presenta un muy buen perfil de seguridad (Knowles y cols., 2009), en campañas de vacunación antirrábica para el control de esta enfermedad en mofetas y mapaches (Rosatte y cols., 2009). La vacuna oral de glicoproteína contra la vaccinia y la rabia (V-RG) se utiliza mucho en otros lugares, y se está intentando optimizar su eficacia en otras especies, como el perro (Cliquet y cols., 2008). La infección por el virus de la rabia en perros vagabundos y en fauna salvaje constituye un grave problema para la salud pública a nivel mundial, y se sigue investigando para conseguir vacunas orales atenuadas más seguras, estables y eficaces (Faber y cols., 2009). Se han estudiado activamente otras posibilidades de vacunación masiva utilizando vacunas preparadas con plantas comestibles, pero a pesar de los avances tecnológicos en la expresión de antígenos vacunales en plantas, hasta ahora no se ha desarrollado ningún producto comercial que pueda ser administrado por vía oral (Rice y cols., 2005).

BIBLIOGRAFÍA

- ACRES S.D., ISAACSON R.E., BABIUK L.A. & KAPITANY R.A. (1979). Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. *Infect. Immun.*, **25**, 121–126.
- BABU U., DALLOUL R.A., OKAMURA M., LILLEHOJ H.S., XIE H., RAYBOURNE R.B., GAINES D. & HECKERT R. (2004). *Salmonella enteritidis* clearance and immune responses in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Vet. Immunol. & Immunopathol.*, **101**, 251–257.
- BACHMANN M.F. & ZINKERNAGEL R.M. (1996). The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. *Immunol. Today*, **17**, 553–558.
- BAGARAZZI M.L., BOYER J.D., UGEN K.E., JAVADIAN M.A., CHATTERGOON M., SHAH A., BENNETT M., CICCARELLI R., CARRANO R., CONEY L. & WEINER D.B. (1998). Safety and immunogenicity of HIV-1 DNA constructs in chimpanzees. *Vaccine*, **16**, 1836–1841.
- BLANCHET M. & SUREAU C. (2006). Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J. Virol.*, **80**, 11935–11945.
- BOYCE M., CELMA C.C. & ROY. P. (2008). Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J. Virol.*, **82**, 8339–8348.
- CARVALHO J.A., PRAZERES D.M. & MONTEIRO GA. (2009). Bringing DNA vaccines closer to commercial use. *IDrugs*, **12**, 642–647.
- CHICHESTER J.A. & YUSIBOV V. (2007). Plants as alternative systems for production of vaccines. *Hum. Vaccin.*, **3**, 146–148.
- CLIQUET F., BARRAT J., GUIOT A.L., CAËL N., BOUTRAND S., MAKI J. & SCHUMACHER C.L. (2008). Efficacy and bait acceptance of vaccinia vectored rabies glycoprotein vaccine in captive foxes (*Vulpes vulpes*), raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and dogs (*Canis familiaris*). *Vaccine*, **26**, 4627–4638.
- COHEN J. (1993). Naked DNA points way to vaccines. *Science*, **259**, 1745–1749.
- DE LIMA M., KWON B., ANSARI I.H., PATNAIK A.K., FLORES E.F. & OSORIO F.A. (2008). Development of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus differentiable (DIVA) strain through deletion of specific immunodominant epitopes. *Vaccine*, **26**, 3594–3600.
- FABER M., DIETZSCHOLD B. & LI J. (2009). Immunogenicity and safety of recombinant rabies viruses used for oral vaccination of stray dogs and wildlife. *Zoonoses Public Health*, **56**, 262–269.
- FACHINGER V., BISCHOFF R., JEDIA S.B., SAALMÜLLER A. & ELBERS K. (2008). The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine*, **26**, 1488–1499.
- FEHLNER-GARDINER C, NADIN-DAVIS S., ARMSTRONG J., MULDOON F., BACHMANN P. & WANDELER A. (2008). ERA vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989–2004. *J. Wildl. Dis.*, **44**, 71–85.
- FENAUX M., OPRIESSNIG T., HALBUR P.G., ELVINGER F. & MENG X.J. (2004). A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J. Virol.*, **78**, 6297–6303.
- FERRARI M., BRACK A., ROMANELLI M.G., METTENLEITER T.C., CORRADI A., DAL MAS N., LOSIO M.N., SILINI R., PINONI C. & PRATELLI A. (2000). A study of the ability of a TK negative and gE/gI negative pseudorabies virus (PRV) mutant inoculated by different routes to protect pigs against PRV infection. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health*, **47**, 753–762.
- GERDTS V., MUTWIRI G.K., TIKOO S.K. & BABIUK L.A. (2006). Mucosal delivery of vaccines in domestic animals. *Vet. Res.*, **37**, 487–510.
- HARLAND R.J., POTTER A.A., VAN DRUNEN-LITTEL-VAN DEN HURK S., VAN DONKERSGOED J., PARKER M.D., ZAMB T.J. & JANZEN E.D. (1992). The effect of subunit or modified live bovine herpesvirus-1 vaccines on the efficacy of a recombinant *Pasteurella haemolytica* vaccine for the prevention of respiratory disease in feedlot calves. *Can. Vet. J.*, **33**, 734–741.

- HELDENS J.G., POWELS H.G., DERKS C.G., VAN DE ZANDE S.M. & HOEIJMAKERS M.J. (2009). The first safe inactivated equine influenza vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix that closes the immunity gap. *Vaccine*, **27**, 5530–5537.
- JAKOBS A.A., GOOVAERTS D., NUIJTEN P.J., THEELAN R.P., HARTFORD O.M. & FOSTER T.J. (2000). Investigation towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi*. *Vet. Rec.*, **147**, 563–567
- JEGERLEHNER A., TISSOT A., LECHNER F., SEBBEL P., ERDMANN I., KÜNDIG T., BÄCHI T., STORNI T., JENNINGS G., PUMPENS P., RENNER W.A. & BACHMANN M.F. (2002). A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine*, **20**, 3104–3112.
- JENNINGS G.T. & BACHMANN M.F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem.*, **389**, 521–536.
- KIM J.J., YANG J.S., NOTTINGHAM L.K., TANG W., DANG K., MANSON K.H., WYAND M.S., WILSON D.M. & WEINER D.B. (2001). Induction of immune responses and safety profiles in rhesus macaques immunized with a DNA vaccine expressing human prostate specific antigen. *Oncogene*, **20**, 4497–4506.
- KNOWLES M.K., NADIN-DAVIS S.A., SHEEN M., ROSATTE R., MUELLER R. & BERESFORD A. (2009). Safety studies on an adenovirus recombinant vaccine for rabies (AdRG1.3-ONRAB) in target and non-target species. *Vaccine*, **27**, 6619–6626.
- KUTZLER M.A. & WEINER D.B. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 776–788.
- KUZYK M.A., BURIAN J., MACHANDER D., DOLHAINE D., CAMERON S., THORNTON J.C. & KAY W.W. (2001). An efficacious recombinant subunit vaccine against the salmonid rickettsial pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Vaccine*, **19**, 2337–2344.
- LENZ P., DAY P.M., PANG Y.Y., FRYE S.A., JENSEN P.N., LOWY D.R. & SCHILLER J.T. (2001). Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J. Immunol.*, **166**, 5346–5355.
- MACLACHLAN N.J., BALASURIYA U.B., DAVIS N.L., COLLIER M., JOHNSTON R.E., FERRARO G.L. & GUTHRIE A.J. (2007). Experiences with new generation vaccines against equine viral arteritis, West Nile disease and African horse sickness. *Vaccine*, **25**, 5577–5582.
- MEEUSEN E.N., WALKER J., PETERS A., PASTORET P.P. & JUNGENSEN G. (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**, 489–510.
- MOREIN B., HU K.F. & ABUSUGRA I. (2004). Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 1367–1382.
- MUTWIRI G., BENJAMIN P., SOITA H., TOWNSEND H., YOST R., ROBERTS B., ANDRIANOV A.K. & BABIUK L.A. (2007). Poly[di(sodium carboxylatoethylphenoxy)phosphazene] (PCEP) is a potent enhancer of mixed Th1/Th2 immune responses in mice immunized with influenza virus antigens. *Vaccine*, **25**, 1204–1213.
- MUTWIRI G., BOWERSOCK T.L. & BABIUK L.A. (2005). Microparticles for oral delivery of vaccines. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2**, 791–806.
- NARDIN E.H., OLIVEIRA G.A., CALVO-CALLE J.M., WETZEL K., MAIER C., BIRKETT A.J., SARPOTDAR P., CORADO M.L., THORNTON G.B. & SCHMIDT A. (2004). Phase I testing of a malaria vaccine composed of hepatitis B virus core particles expressing *Plasmodium falciparum* circumsporozoite epitopes. *Infect. Immun.*, **72**, 6519–6527.
- PASTORET P.P., BROCHIER B., LANGUET B., THOMAS I., PAQUOT A., BAUDUIN B., KIENY M.P., LECOCQ J.P., DE BRUYN J., COSTY F., ET AL. (1988). First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus. *Vet. Rec.*, **123**, 481–483.
- PUMPENS P. & GRENS E. (2001). HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*, **44**, 98–114.
- QUEREC T., BENNOUNA S., ALKAN S., LAOUAR Y., GORDEN K., FLAVELL R., AKIRA S., AHMED R. & PULENDRAN B. (2006). Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.*, **203**, 413–424.

- RAO S.S., STYLES D., KONG W., ANDREWS C., GORRES J.P. & NABEL G.J. (2009). A gene-based avian influenza vaccine in poultry. *Poult. Sci.*, **88**, 860–866.
- REDDING L. & WEINER D.B. (2009). DNA vaccines in veterinary use. *Exp. Rev. Vaccines*, **8**, 1251–1276.
- REDMOND M.J., IJAZ M.K., PARKER M.D., SABARA M.I., DENT D., GIBBONS E. & BABIUK L.A. (1993). Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. *Vaccine*, **11**, 273–281.
- REIMANN I., DEPNER K., TRAPP S. & BEER M. (2004). An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology*, **322**, 143–157.
- RHODES G.H., ABAI A.M., MARGALITH M., KUWAHARA-RUNDELL A., MORROW J., PARKER S.E. & DWARKI V.J. (1994). Characterization of humoral immunity after DNA injection. *Dev. Biol. Stand.*, **82**, 229–236.
- RICE J., AINLEY W.M. & SHEWEN P. (2005). Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health. *Animal Health Res. Rev.*, **6**, 199–209.
- RODRIGUEZ L.L. & GRUBMAN M.J. (2009). Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine*, **27**, Suppl 4: D90-4.
- ROSATTE R.C., DONOVAN D., DAVIES J.C., ALLAN M., BACHMANN P., STEVENSON B., SOBEY K., BROWN L., SILVER A., BENNETT K., BUCHANAN T., BRUCE L., GIBSON M., BERESFORD A., BEATH A., FEHLNER-GARDINER C. & LAWSON K. (2009). Aerial distribution of ONRAB baits as a tactic to control rabies in raccoons and striped skunks in Ontario, Canada. *J. Wildl. Dis.*, **45**, 363–374.
- ROY P. & NOAD R. (2008). Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Hum. Vaccin.*, **4**, 5–12.
- SOLA I., ALONSO S., ZÚÑIGA S., BALASCH M., PLANA-DURÁN J. & ENJUANES L. (2003). Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *J. Virol.*, **77**, 4357–4369.
- STANLEY M. (2008). HPV vaccines: are they the answer? *Br. Med. Bull.*, **88**, 59–74.
- SWAYNE D.E. (2009). Avian influenza vaccines and therapies for poultry. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **32**, 351–363.
- TANIGUCHI T. (1978). Site-directed mutagenesis on bacteriophage Qbeta RNA (author's transl). *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **23**, 159–169.
- THYAGARAJAN R., ARUNKUMAR N. & SONG W. (2003). Polyvalent antigens stabilize B cell antigen receptor surface signaling microdomains. *J. Immunol.*, **170**, 6099–6106.
- ULMER J.B., DONNELLY J.J., DECK R.R., DEWITT C.M. & LIU M.A. (1995). Immunization against viral proteins with naked DNA. *Ann. NY Acad. Sci.*, **772**, 117–125.
- ULMER J.B., DONNELLY J.J., PARKER S.E., RHODES G.H., FELGNER P.L., DWARKI V.J., GROMKOWSKI S.H., DECK R.R., DEWITT C.M., FRIEDMAN A., ET AL. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, **259**, 1691–1692.
- VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., VAN DONKERSGOED J., KOWALSKI J., VAN DEN HURK J.V., HARLAND R., BABIUK L.A. & ZAMB T.J. (1994). A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Vaccine*, **12**, 1295–1302.
- VAN GENNIP H.G., VAN RIJN P.A., WIDJOJOATMODJO M.N., DE SMIT A.J. & MOORMANN R.J. (2000). Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E(RNS) or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response. *Vaccine*, **19**, 447–459.
- VAN OIRSCHOT J.T. (2003). Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet. Microbiol.*, **96**, 367–384.
- VAN OIRSCHOT J., KAASHOEK T.M.J. & RIJSEWIJK F.A. (1996). Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet. Microbiol.*, **53**, 43–54.

WACK A., BAUDNER B.C., HILBERT A.K., MANINI I., NUTI S., TAVARINI S., SCHEFFCZIK H., UGOZZOLI M., SINGH M., KAZZAZ J., MONTOMOLI E., DEL GIUDICE G., RAPPUOLI R. & O'HAGAN D.T. (2008). Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine*, **26**, 552–561.

WACKER M., LINTON D., HITCHEN P.G., NITA-LAZAR M., HASLAM S.M., NORTH S.J., PANICO M., MORRIS H.R., DELL A., WREN B.W. & AEBI M. (2002). N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, **298**, 1790–1793.

WIDMAN D.G., FROLOV I. & MASON P.W. (2008). Third-generation flavivirus vaccines based on single-cycle, encapsidation-defective viruses. *Adv. Virus Res.*, **72**, 77–126.

ZUCKERMAN J.N. (2006). Vaccination against hepatitis A and B: developments, deployment and delusions. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **19**, 456–459.

*
* *

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2010.