

DESARROLLOS EN VACUNOLOGIA VETERINARIA

Elías F. Rodríguez Ferri
RACVE, 7 de marzo de 2016

INTRODUCCIÓN

Existe unanimidad al reconocer que las vacunas son un poderoso instrumento en la lucha contra las enfermedades infecciosas que, indirectamente, sus beneficios repercuten en otros muchos ámbitos como el desarrollo de la Ganadería, el incremento de la salud y productividad de los animales y el hombre, el bienestar, incluso en la lucha contra el cambio climático y otros.

El afamado Centro para el Control de las Enfermedades Infecciosas (CDC) sito en Atlanta, en los Estados Unidos ha afirmado que la vacunación, la práctica de uso de las vacunas ha sido el logro número 1 en materia de Salud Pública en el pasado siglo XX y la propia Organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado por su parte, que “a excepción del agua limpia, ningún otro factor, ni tan siquiera la disponibilidad y uso de los antibióticos, ha ejercido un efecto tan importante sobre la reducción de la mortalidad en la reciente historia de la humanidad”. Ha sido, continúa señalando, “la intervención sanitaria más potente en relación con el costo, y decisiva para alcanzar los objetivos del milenio”-

El mundo industrial que pivota sobre las vacunas en materia de Sanidad Animal ha sido valorado para 2013 en un montante de 5.800 millones de dólares americanos, que representan aproximadamente el 26,6% del mercado del sector, con una tendencia creciente en los últimos años y unas perspectivas muy halagüeñas (con una tasa de crecimiento del 8,1%, para 2018 se estima una facturación de 8.600 millones de dólares, aunque tales valores están muy lejos de las cifras que representa el sector de las vacunas en el hombre, estimado en más de 17.000 millones de dólares en 2013) . En el caso de Europa, por ejemplo, la industria de las vacunas, que da empleo a más de 50.000 personas e invierte más de 500 millones de euros en Investigación y Desarrollo (I+D), produce al año 1.500 millones de euros, con la particularidad de que a nivel de la Unión Europea (UE) en el periodo que va desde 1996 a 2014, casi el 50% de los registros se realizaron por el procedimiento centralizado. En España, el dato más reciente, según la patronal del sector (Veterindustria) supone una facturación de 175 millones de euros que representa el 30% del total.

En el mundo de los animales en toda su extensión, las vacunas representan un poderoso instrumento cuyos objetivos se diversifican enormemente. Se puede afirmar que a las vacunas se debe en buena parte el desarrollo de la ganadería moderna y el control de las enfermedades infecciosas, personalizado en la actualidad por la erradicación oficial de la peste bovina en 2011 y la situación de control de algunas

enfermedades muy importantes como la fiebre aftosa y algunas otras. Las vacunas mejoran la salud y productividad de los animales, contribuyen a su bienestar y, como ya indicamos, a la lucha contra el cambio climático. Todas las organizaciones de defensa de los animales promueven su uso al tratarse de un recurso limpio, que reduce el uso de fármacos u hormonas y no genera residuos, con un impacto social favorable, que previene del uso de medidas radicales, impopulares, como el *stamping out* (sacrificio preventivo) y que en el caso de enfermedades transmisibles al hombre (zoonosis), representa igualmente un recurso de lucha de importancia decisiva. Las vacunas carecen de limitaciones en cuanto a su destino en los animales, llegando tanto a los animales de producción (de alimentos de origen animal), animales de compañía, animales salvajes, etc.

Aunque no es el propósito de esta intervención, en el mundo de la Salud Pública su intervención es tan decisiva que se podría resumir que anualmente salva la vida de 3 millones de niños, en todo el mundo y su valor se pone de manifiesto, precisamente, allí donde por diferentes razones (política, sociales, económicas,...), las vacunas desgraciadamente no llegan.

Una de las grandes ironías del mundo de las vacunas, de la Vacunología, como se expresa en la actualidad, es que la gran mayoría de las vacunas se han desarrollado de forma empírica, con escaso o nulo conocimiento de los mecanismos que conducen al desarrollo de inmunidad protectora.

INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA, LAS BASES DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LAS VACUNAS

La inmunidad innata, definida como el conjunto de recursos físicos, químicos y celulares del hospedador que se oponen a la infección por agentes patógenos en el primer nivel, desde su entrada, se caracteriza por su inespecificidad, su condición conservada, capaz de reconocer rápidamente a los agentes patógenos y reaccionar frente a ellos. La inmunidad innata, sin embargo, carece de capacidad para conferir protección de larga duración, ni dispone de memoria inmunológica, aunque esta afirmación esta, en la actualidad sometida a revisión, tal como se ha descrito recientemente a la luz de la descripción de un tipo de reprogramación epigenética en células dendríticas que deriva de subpoblaciones de células NK-NKT, de linfocitos T gamma-delta ($LT_{\gamma\delta}$) y células linfoides innatas (ILCs) tanto en vertebrados como en invertebrados y plantas.

La inmunidad innata está íntimamente relacionada con la inmunidad adaptativa (adquirida o específica) a la que precede e induce, una aportación reciente que ha revolucionado la forma de entender la respuesta inmunitaria frente a la infección y, consecuentemente también, frente a las vacunas.

El proceso comienza y depende de la activación de un tipo de receptores celulares, presentes en las células de la defensa innata, conocidos como “receptores de reconocimiento de patrones” (PRRs, por sus siglas en inglés), que reconocen determinadas moléculas presentes en los patógenos y exclusivas de ellos, conocidas como “patrones moleculares asociados a los patógenos” (PAMPs, por sus siglas en inglés), con capacidad igualmente para reconocer otro tipo de moléculas derivadas a los efectos del daño o injurias originadas por los microorganismos patógenos en el hospedador infectado.

Receptores que inician la respuesta. Deben diferenciarse según su disposición en las células de la defensa innata, de este modo, a nivel superficial dispuestos en la membrana o internamente, en la membrana de endosomas o vesículas, se descubren los TLR (receptores *Toll-like*)¹, que son un tipo de receptores de membrana tipo I, muy conservados, presentes en humanos, mamíferos, aves y peces. Son receptores para moléculas PAMPs y DAMPs. Existen también receptores de lectina tipo C (CLR) que reconocen moléculas de manano o β -glucano. Por su parte, en el citoplasma de las células existen otro tipo de receptores, como los RLR (receptores para moléculas de ARN de origen vírico), receptores NLR (receptores tipo NOD-1 y NOD-2, *Nod Like Receptors*) y receptores PYHIN (que son receptores de ADN vírico o bacteriano, que forman el inflammasoma, un complejo que inicia la activación de la procaspasa I para la secreción de citoquinas inflamatorias activas).

La identificación de PRRs y la caracterización de sus ligandos microbianos e inflammasoma, son parte importante de los desarrollos en materia de vacunas y adyuvantes.

La investigación sobre los TLR se ha centrado hasta la fecha de modo principal en el caso del hombre, donde se han descrito diez tipos diferentes (TLR-1 a TLR-10) dispuestos en la membrana celular (caso de los TLR-1, 2, 4, 5, 6 y 7) y otros en la membrana de endosomas (TLR-3, 7, 8 y 9) ¿Qué pasa con el TLR-10?

Cuando los TLR reconocen los PAMPs (por ejemplo, glicosil fosfatidil inositol en el caso de parásitos, zimosano en levaduras, lipopolisacárido, ácido lipoteicoico, diacil o triacil lipopéptido o flagelina, en el caso de bacterias, ácidos nucleicos –ARN ó ADN- o secuencias, en el caso de virus).

Los TLR están formados por 3 dominios; un dominio extracelular, denominado LRR, caracterizado por la presencia de repeticiones de leucina (*Leucine-Repeat*),

¹ **Toll* =raro, extravagante (1980: su ausencia = sin eje dorso ventral en *Drosophila*); en 1996: J. Hoffman y Lemaitre relacionaron su ausencia con infección letal por *Aspergillus fumigatus* y en 2011, el primero, recibió por el descubrimiento, el Premio Nobel de Medicina

un dominio transmembrana, corto, y un dominio intracitoplasmático o intracelular, que se conoce como TIR (*Toll/IL-1Receptor*).

Cuando se produce la activación del receptor TLR, esto es, cuando los TLR reconocen las señales de PAMP/DAMPs, se reclutan proteínas adaptadoras a TIR, fundamentalmente de dos tipos (MYD88 y TRIF) que se disponen en la cola del dominio intracelular del TLR. En el caso particular de los TLR 1, 2, 4 y 6, se precisa de un segundo adaptador que se intercala entre el primero y el TLR. En el caso de MYD88 el adaptador es TIRAP, mientras que en el caso de TRIF, el adaptador es TRAM.

Todos los adaptadores reclutan proteínas quinasas que inician diferentes vías de señalización intracelular, por ejemplo MAP quinasas, que son activadoras de las vías ERK, p38 o JNK, el factor nuclear κ B (NF κ B) o el factor regulador del interferón (IRF).

El resultado final es la producción de citoquinas, quimioquinas e interferón de tipo I (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α , IFN- α , IFN- β , RANTES, mol coestimuladoras: CD80/86 y CD40) que es el ambiente químico preciso que permite la iniciación de la respuesta inmune adaptativa o específica.

En Vacunología, el conocimiento del mecanismo de protección o de la inducción de respuestas protectoras con/sin adyuvantes, representan áreas de investigación del máximo interés. En la práctica, el proceso se inicia mediante la inoculación del preparado vacunal y (en su caso incluyendo adyuvantes), los cuales son detectados por los TLR que desencadenan una reacción que se inicia con el reclutamiento de células dendríticas y otras células sanguíneas circulantes, principalmente monocitos y neutrófilos que fagocitan y procesan los patógenos presentando péptidos antigénicos en el surco correspondiente de las moléculas del CPH (complejo principal o mayor de histocompatibilidad) a la vez que migran por el sistema linfático hasta los órganos linfoides secundarios (principalmente ganglios y bazo), donde tiene lugar el encuentro con los linfocitos T a los que presentan el Ag, a través del receptor de la célula T y B, en unión de moléculas coestimuladoras, dando lugar a su activación.

En el caso de los patógenos extracelulares, igual que de los contenidos en endosomas o fagosomas, los antígenos / adyuvantes son procesados y presentados a los LT-Th (colaboradores, CD4+) (o directamente a los L-B) vírgenes en el surco de CPH de clase II, al tiempo que se completa esta primera señal con la coestimulación entre las moléculas CD28-CD80/86. La unión del CD28 del linfocito Th con su ligando (CD80/86) en las células presentadoras de antígeno (CPA) regula la respuesta, el patrón de citoquinas y la expresión de receptores para ellas, produciéndose a continuación una sinapsis efectora con liberación de interleuquina-2 (IL-2) y su receptor (IL-2R ó CD25), que permite la secreción de IL-2, constituyendo lo cual la segunda señal de activación necesaria.

La activación supone, en primer lugar, la proliferación (expansión clonal) de los linfocitos T CD4+, la adquisición de funciones efectoras (según el caso, L-T CD4+ y CD8+ efectores), así como la diferenciación en células de memoria (L-Tm). A partir de este momento, los L-T efectores y de memoria activados, solo necesitan para su actuación (para la respuesta inmune) la primera señal mediada por el TCR, esto es la presentación del antígeno. Si en el proceso de activación solamente se produce la primera señal, los L-T se vuelven anérgicos (se denomina activación abortada), pudiéndose generar fenómenos de autotolerancia. Al final, los LT que no encuentran el antígeno, abandonan el ganglio.

En primera instancia, la presentación directa del antígeno a los linfocitos B (LB) seguido de su activación en términos similares a los descritos para los L-Th, produce la expansión clonal y diferenciación de dos poblaciones, una de ellas los L-B de memoria (L-Bm) y otra de células plasmáticas, estas últimas con capacidad de producción de anticuerpos específicos solubles, aunque de baja afinidad y en niveles discretos. Algunos linfocitos B pasan después a los centros germinales de los folículos linfoides en los ganglios, implicando a las células dendríticas foliculares y reciben la colaboración de los L-T foliculares colaboradores (L-Tfh), induciendo en este caso la proliferación, expansión clonal y diferenciación en células plasmáticas de afinidad elevada por los epitopes contenidos en la formulación vacunal, productoras de anticuerpos de afinidad moderada y nuevos L-Bm, todo lo cual caracteriza la denominada respuesta primaria.

Cuando tiene lugar un segundo encuentro con el antígeno vacunal (dosis de recuerdo o *booster*), los acontecimientos que tienen lugar se producen más rápidamente y se diferencian en relación con la calidad y eficacia de los efectores secretados. En primer lugar, la segunda dosis del antígeno se dirige a promover la activación de los L-Bm generados en la respuesta primaria, pero debe competir con una barrera representada por los L-Bm generados en la primera fase de la respuesta primaria, además de los anticuerpos residuales de actividad baja y moderada resultado de aquella. Como quiera que sea el resultado es que se reclutan y activan rápidamente L-Bm de alta afinidad, incluso en presencia de aquellas barreras, también en cantidades mayores y más eficaces.

Los L-T CD4+ son colaboradores, entre otros, de los L-B en la generación de la respuesta de anticuerpos. Cuando son activados por la presentación del antígeno a cargo de las células presentadoras, se diferencian en distintos tipos de subpoblaciones en función del entorno de citoquinas polarizantes, por ejemplo, en presencia de IL4 se diferencian a L-Th2 que produce, además de IL4 otras citoquinas como IL5, 6, 9, 10 y 13, mientras que si el entorno polarizante es de IL12 e interferón gamma (IFN- γ) la diferenciación es hacia Th1, de importante papel en la inmunidad de base celular.

En el caso de vacunas atenuadas frente a patógenos intracelulares o merced a la acción de determinado tipo de adyuvantes, se produce la presentación del antígeno

a cargo de las células nucleadas (incluyendo presentadoras de antígeno) a los linfocitos T CD8+ en el surco de la molécula del CPH de clase I, promoviéndose su activación, diferenciación a L-Tc (citotóxicas) y expansión clonal en lo que colaboran las citoquinas procedentes de las Th1 a su vez presentadas en las CPH de clase II. Los L-Tc acumulan vesículas secretoras que contienen perforinas (un tipo de molécula semejante a la proteína C9 del complemento), granzimas y una proteína denominada FasL, que cuando se une con su receptor, activan en las células vías de apoptosis (caspasas) y las destruyen.

En la formulación de las vacunas, los adyuvantes de inmunidad forman una parte muy importante del diseño definitivo, debiéndose elegir aquellos que dirijan correctamente los *subsets* de células dendríticas u otras células presentadoras, además de los receptores TLR, todo lo cual inducirá una respuesta adecuada y de calidad, que se traducirá en la neutralización o destrucción del agente patógeno.

La mayoría de las vacunas actuales confieren protección mediante la inducción de una respuesta inmune humoral, en base al desarrollo de anticuerpos neutralizantes, aunque en el caso de las vacunas vivas atenuadas o modificadas, igual que en algunas en las que se plantea la colaboración de determinado tipo de adyuvantes (por ejemplo, los ISCOMS y los agonistas del TLR-9 como los CpG), también se induce un tipo de inmunidad de base celular muy resolutive, cuyo desarrollo es particularmente atractivo toda vez que se ha comprobado que allí donde se producen fallos en las vacunas (fallos en la eficacia) o donde no se ha logrado disponer hasta la fecha de vacunas eficaces, como sucede en el caso de la tuberculosis, la malaria, la peste porcina africana o síndrome de inmunodeficiencia humana, parece que este tipo de respuesta es clave.

Una Vacuna Ideal en Vacunología Veterinaria, ha de reunir una serie de caracteres que podrían resumirse en: 1) debe ser inmunogénica, esto es, que genere una respuesta inmunitaria; 2) no se debe afectar por la presencia de anticuerpos maternos, una circunstancia que por lo general retrasa el momento de la vacunación en animales jóvenes hasta su curva desciende hasta anularse, produciendo momentos de particular riesgo, por la vulnerabilidad de los hospedadores; 3) no debe generar portadores; 4) debe ser segura; 5) estable en condiciones de campo; 6) de administración fácil, incluyen la posibilidad de ser administrada directamente en mucosas; 7) capaz de generar una respuesta inmunitaria mixta (humoral y celular); 8) que sea efectiva con una única dosis; 9) de costo reducido; 10) que permita la diferenciación entre animales vacunados e infectados y 11) que permita la terapia conjunta con la vacunación.

Vacunas clásicas. Incluyen las denominadas vacunas inactivadas y las vacunas atenuadas. Ambas, principalmente las primeras, siguen representando un porcentaje muy elevado (el 70% o más) de la oferta comercial. Las **vacunas inactivadas** consisten en suspensiones de cultivos puros del agente contra el que se pretende vacunar,

inactivados completamente mediante procedimientos físicos o químicos (o combinaciones de ambos) lo menos agresivos posible para que no alteren su composición antigénica. Habitualmente se utiliza calor, formol, beta propiolactona, agentes oxidantes, etc., Son poco inmunógenas (la inactivación destruye epitopes), pero son seguras. Algunos ejemplos recientes incluyen vacunas inactivadas (bacterinas) frente a la enfermedad periodontal en perros por *Porphyromonas*, o frente a la boca roja de la trucha, por *Yersinia ruckeri*. Las denominadas autovacunas, vacunas autógenas o vacunas de establo, son vacunas inactivadas elaboradas frente a un agente particular, causa reiterada de enfermedad en una determinada explotación, presumiblemente distinto (variante o subtipo) de la misma o distinta especie que causa un proceso similar en otras explotaciones en las que el producto puede resultar ineficaz. Este tipo de vacunas inducen una respuesta ordinariamente humoral y habitualmente van complementadas con la presencia de adyuvantes y ocasionalmente conservantes, para neutralizar la posible contaminación del producto durante su vida comercial. Aunque no precisan de su conservación en frío, éste alarga su vida comercial.

Las **vacunas atenuadas** son productos que incorporan un microorganismo vivo, bacterias o virus, por lo general, atenuado de forma natural o inducida. Generan una buena inmunidad, tanto humoral como celular (CD4+ y CD8+), y duradera, aunque adolecen de la posibilidad o riesgo de reversión a la forma salvaje original. Habitualmente producen trastornos fisiológicos suaves, que desaparecen en poco tiempo y su uso debe llevarse a cabo después de la desparasitación o de un examen de salud del animal objeto de la vacunación. Existen todavía muchos ejemplos de vacunas atenuadas en veterinaria aunque la tendencia es sacrificar su mejor capacidad inductora de protección en beneficio de la seguridad, por lo que poco a poco se van sustituyendo por otros productos. La mayor parte de estos productos son empíricos, obtenidos mediante pases por animales de experimentación o diferentes del hospedador habitual, microorganismos heterólogos que inducen inmunidad por reacción cruzada, atenuación mediante pases en medios de cultivo o por cultivo a temperaturas o condiciones inhabituales, en ocasiones disgenéticas, etc., en los que la adaptación necesaria por lo general produce una pérdida de virulencia, hoy sabemos que como consecuencia de mutaciones espontáneas que no aseguran la reversión contraria, como hemos indicado, con el riesgo consiguiente.

Algunos ejemplos de vacunas que siguen siendo utilizados en la práctica veterinaria incluyen las vacunas frente a la brucelosis de los rumiantes (cepas SB-19 y RB-51 en el caso del ganado bovino y Rev-1 en el caso de los pequeños rumiantes).

Vacunas modernas. Vacunas de primera generación. Vacunas de subunidades y vacunas conjugadas

Las vacunas de subunidades se pueden considerar la primera innovación importante en el campo de la Vacunología. En 1979 se incorporó la primera vacuna frente a la diarrea de los terneros y corderos a base de fimbrias K99 de *Escherichia coli* enteropatógeno, a la que siguieron las formulaciones con K88, 987P y K99 en diarreas de lechones producidas por *E. coli* enterotoxigénico. Estos antígenos proteicos, purificados, resultan buenos antígenos pero inmunogenos deficientes, por lo que generalmente precisan de la incorporación de adyuvantes e incluso de proteínas carrier (portadoras) que además de conferir tamaño y complejidad, cuando el antígeno que constituye la subunidad es de naturaleza no proteica, por ejemplo polisacárido, produce un tipo de respuesta timo-independiente que el portador cambia a timo-dependiente, lo que a su vez traduce ventajas de interés. Se utilizan vacunas de subunidades en muchos casos en Veterinaria, como sucede con patógenos como *Salmonella gallinarum*, *Burkholderia pseudomallei* y otros agentes.

Los toxoides, que poseen una gran importancia en veterinaria, fundamentalmente en el caso de la prevención frente a las enterotoxemias producidas por especies del género *Clostridium* son, realmente vacunas de subunidades, ya que la base de su actuación es una toxina detoxificada por la acción combinada del formol y del calor, siguiendo el procedimiento original descubierto por Gastón Ramón a comienzo de los años veinte, en el caso de la toxina diftérica y después de la toxina tetánica, que sirvió para la elaboración de las correspondientes vacunas, que tantos beneficios produjeron a la humanidad. En la actualidad se elaboran vacunas simples, conjugadas o mixtas, incluso combinadas con células enteras inactivadas, por ejemplo en el caso de la toxina de *Pasteurella multocida* (para la prevención de la rinitis atrófica porcina), toxinas RTX de *Actinobacillus pleuropneumoniae* o *Mannheimia haemolytica*, entre otras.

Vacunas elaboradas mediante ingeniería genética. Como consecuencia de los avances en la tecnología de ADN recombinante o Ingeniería Genética, a partir de la segunda mitad del siglo pasado se aportaron a la producción de vacunas métodos muy interesantes que pretendieron desde el principio la obtención de antígenos cada vez mejores, más purificados, sencillos, a la vez que inmunógenos de calidad y siempre seguros con el fin de ganar en eficacia y efectividad desde el punto de vista de la generación de una respuesta inmune protectora frente a los agentes patógenos productores de enfermedades.

Habida cuenta de la excelente inmunogenicidad de los microorganismos atenuados, el foco se puso desde el principio en tratar de obtener mutantes atenuados estables en los que se pudiese conocer desde el punto de vista científico la base de la pérdida de virulencia. Se han seleccionado por lo general métodos dirigidos a la

supresión o silenciamiento de genes relacionados con la virulencia o con rutas metabólicas, como sucede con los mutantes *knockout* o dobles *knockout* en unos u otros, por ejemplo *Streptococcus equi* acapsulado y hialuronato sintasa negativos, como sucede con la cepa *Pinnacle* derivada de este agente, utilizada en una vacuna para la prevención de la papera equina. De igual modo se pueden incluir aquí cepas de *Salmonella* deficientes en pared celular, mutantes *galE*, *cya*, *purA* o *aroA* en todos los casos negativos o deficientes en tales genes metabólicos en *A. pleuropneumoniae*, *Str. equi* y otros. Tales vacunas se han revelado excelentes, por ejemplo en el caso de vacunas para mucosas.

Se incluyen también aquí mutantes *knockdown* mediante silenciamiento con RNA pequeños, por ejemplo en vacunas para peces y en el caso de algunos virus, por ejemplo *Herpesvirus* como los de la enfermedad de Aujeszky o el de la rinotraqueitis bovina infecciosa, mutantes timidin quinasa negativos (TK⁻) incapaces de replicarse aunque capaces de invadir, por lo que generan una buena respuesta inmune.

De este tipo de vacunas, seleccionando además genes no esenciales, no relacionados con la atenuación, pero cuya ausencia o inactivación permite establecer una respuesta diferenciada con la cepa salvaje, surgen las denominadas vacunas DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) como sucede con los genes *gE*, que permiten la diferenciación diagnóstica (ordinariamente mediante una reacción ELISA) entre vacunados e infectados. Este tipo de productos posee una gran importancia actual en Veterinaria y es presumible que su interés vaya en aumento, pudiéndose citar ya una buena relación de productos tanto en el caso de enfermedades producidas por bacterias como en enfermedades víricas.

Denominación	Especie	Características
<i>Suvaxyn 783 + O/W Aujeszky</i>	Cerdo	Virus de Aujeszky atenuado por deleción de gen Tk + Al(OH) ₃
<i>Suvaxyn PCV</i>	Cerdo	PCV-1 atenuado por deleción
<i>Equilis StrepE</i>	Caballo	Mutante atenuado de <i>Str. equi</i>
<i>Hiprabovis IBR</i>	Bovino	Atenuada por 2x deleción IBR
<i>Poulvac E. coli</i>	Pollo	<i>E.coli</i> O78 atenuada deleción <i>aroA</i>

Tabla 1. Algunas vacunas autorizadas y comercializadas atenuadas mediante procedimientos de ingeniería genética

El siguiente paso en la producción de vacunas mediante la aplicación de la tecnología del ADN recombinante tuvo que ver con la producción de vacunas de subunidades recombinantes. En este caso, seleccionado y aislado el gen de interés cuya expresión genera una proteína con la que se pretende formular la vacuna, se

inserta en un plásmido y éste se clona en un vector que expresa la proteína buscada en cultivo, utilizándose después esta purificada bien sola como vacuna o conjugada con un portador, por lo general adicionada de un adyuvante. La disponibilidad de vectores es crítica y tiene que ver con que se busque que el producto final sea o no glicosilado. En el primer caso el vector suele tratarse de bacterias atenuadas de forma natural o artificial, mientras que la glicosilación exige de vectores de expresión eucariotas, por lo general levaduras o células, bien de insecto o de mamífero. En el caso de proteínas víricas pueden utilizarse también vectores virales. Tres ejemplos bien conocidos podrían estar representados por la r-S (proteína S recombinante del virus de la hepatitis B) obtenida en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, primera vacuna obtenida mediante esta tecnología para la prevención de este tipo de vacuna en el hombre, la producción de la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa en *Escherichia coli*, o la hemaglutinina (HA) del virus influenza mediante la utilización de *Baculovirus*, en este caso expresada en cultivos celulares.

Denominación	Especie	Características
<i>Ecoporc Shiga</i>	Cerdo	r-Stx2e (toxina Shiga)
<i>Porcilis AR-T DF</i>	Cerdo	r-PMT + <i>B. bronchiseptica</i> inact
<i>Rhiniseng</i>	Cerdo	r-PMT + <i>B. bronchiseptica</i>
<i>Leucogen</i>	Gatos	r-p45 de la envoltura del FeLV
<i>Vaxxitek HVT+IBD</i>	Pollo	r- Gumboro y Marek

Tabla 2. Diferentes ejemplos de proteínas recombinantes en formulaciones de vacunas autorizadas y comercializadas con destino a algunas especies animales

Una ingeniosa aplicación de los productos recombinantes son las partículas semejantes a virus (*Virus Like Particles*, VLP) resultantes de la sobreexpresión de algunos genes, generalmente de origen vírico, que se autoensamblan de forma espontánea. Estas estructuras supramoleculares adoptan por las mismas reglas geométricas que rigen la morfogénesis de las partículas víricas, una forma aproximadamente esférica. En la práctica, son a modo de esferas huecas, carentes de ácido nucléico y formadas por cubiertas autoensambladas de la proteína de interés, generalmente de envoltura o cubierta (cápside vírica). Inducen una buena respuesta tanto humoral como celular y resultan excelentes por ejemplo frente a virus de los que derivan las unidades ensambladas sirviendo además como plataformas (plataformas VLP) para incluir algún tipo de antígeno de interés (de origen vírico o no vírico) en la que el VLP, además, se comporta como un adyuvante.

Resulta idóneas para virus no cultivables o de difícil cultivo (por ejemplo en el caso de calicivirus, virus de hepatitis, papilomavirus, etc.) o de elevado riesgo. En la práctica son la base de las vacunas actuales frente al virus del papiloma humano y existen numerosas propuestas de vacunas experimentales en relación con diferente tipo de enfermedades y sus correspondientes agentes en Veterinaria, una de las cuales, frente al circovirus porcino tipo 2, que produce el síndrome de desmedro en lechones, está autorizada y comercializada.

Virus	Proteína recombinante (la base del VLP)
PCV2 (Circovirus Porcino) AUTORIZADA	Proteína de cubierta (ORF2)
CAV (Circovirus Anemia del Pollo)	VP1, VP2
BTV (lengua azul) Orbivirus	VP2,VP3,VP5,VP7, VPS
Hemorrág. conejo (RHDV) Calicivirus	Proteína de la cápsida VP60
Calicivirus felino (FCV)	VP1
Parvovirus (porcino, canino, visón)	VP2
Parvovirus del pato y del ganso	VPs
Enf de Gumboro (Birnavirus)	VP2, VP3, VP4, VPX, PP
Newcastle (Paramyxovirus)	NP, M, F, HN
Influenza aviar (Orthomyxovirus)	HA, NA, M1, M2
Nodavirus (Vir necrosis ner peces)	Proteína de la cubierta
Fiebre del valle del Rift (Bunyavirus)	N, G _N , G _C
Rotavirus bovinos	VPs
Papillomavirus del conejo	L1,L2
Encefalomiocarditis porcina (EMCV)	P1, 2 A, 3C
Virus de la rinitis equina A (ERAV)	P1, 2 A, 3C
Virus de la fiebre aftosa (FMDV)	P1,2 A, 3C

Tabla 3. Ejemplo de vacunas con destino a enfermedades de los animales, autorizadas o experimentales, en diferentes etapas de desarrollo, que utilizan plataformas VLP (*Virus Like Particles*)

El siguiente avance se produjo cuando se decidió utilizar como vacuna no la partícula (subunidad) obtenida de forma directa o mediante ingeniería genética (subunidades recombinantes), sino el vector modificado, de forma tal que su multiplicación o replicación en el hospedador diana produjese (*in vivo*) el producto de interés a la vez que simplificando el procedimiento, beneficiándose de las ventajas que supone el entorno del animal vivo. Es lo que se denomina **vacunas vectorizadas** o

vacunas de vectores. Debemos recordar, a este respecto, que un vector aquí es un virus o una bacteria modificados, capaces de multiplicarse en el hospedador diana, replicantes (en el caso de virus), que expresa un gen de interés en condiciones naturales (in vivo).

A este respecto, podríamos considerar dos grupos de plataformas, según se trate de virus o de bacterias. Entre las plataformas a base virus, las más comunes utilizan *Poxvirus*, como el virus vaccinia (viruela vacuna), el virus de la viruela aviar o el virus de la viruela del canario, con la ventaja (todos ellos) de que su gran tamaño, el gran tamaño de su ácido nucléico (ADN), permite la sustitución de fragmentos propios por otros de interés, sin consecuencias negativas en lo que a su capacidad de replicación se refiere. Además se utilizan también plataformas de Adenovirus, de *Herpesvirus* o de *Baculovirus*, principalmente. Son ejemplos la vacuna frente a la rabia a base de virus vaccinia modificado con genes de la proteína G del virus de la rabia, o el virus, igualmente vaccinia, modificado con genes de hemaglutinina (HA) y de la proteína de fusión (F) del virus de la peste bovina (aunque en la actualidad está erradicada a nivel mundial y la vacunación está prohibida), o un Poxvirus de la viruela aviar, modificado con los genes A y F del virus de la enfermedad de Newcastle, para proteger frente a esta enfermedad, o productos similares en relación con el virus de la diarrea vírica bovina, del virus respiratorio sincitial bovino, parainfluenza 3, rota y coronavirus, etc.

Las plataformas a base de bacterias modificadas mediante la incorporación de un gen de interés, incluyen tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, atenuadas de forma natural o inducida, como sucede en el caso de *E. coli*, *Salmonella*, etc., con una tendencia reciente a utilizar microorganismos comensales que forman parte de la microbiota intestinal, adaptados a su hospedador correspondiente, que suma a lo anterior su condición ventajosa de implantarse a nivel de mucosas generando un efecto adicional, muy interesante de exclusión competitiva.

La Tabla 4, por ejemplo, presenta un resumen de vacunas vectorizadas recombinantes autorizadas en Sanidad Animal, de uso generalizado en muchos países, de los cinco continentes

Denominación	Fabricante	Especie	Características
ProteqFlu	Merial.	Caballo	Recombinante Vectorizada en canarypox con 2 cepas de <u>influenza</u> equina (A/equi-2/Ohio/03 y A/equi-2/Newmarket/2/93)
ProteqFlu-Te	Merial.	Caballo	Recombinante Vectorizado en canarypoxvirus de proteínas de 2 cepas de virus influenza equina (A/equi-2/Ohio/03 y A/equi-2/Newmarket/2/93) + toxina colérica modificada
Recombitek Equine WNV	Merial	Caballo	Recombinante vectorizado en canarypoxvirus de la proteína pre-M-Env del <u>virus WN</u> ,
Purevax FeLV	Merial.	Gatos	Recombinante Vectorizado del virus FeLV (leucemia felina) genes <i>env</i> y <i>gag</i>
Purevax Rabies	Merial	Gatos	Recombinante Vectorizada de proteína G (<u>rabia</u>) en canarypox
Purevax Ferret Distemper	Merial	Hurones	Recombinante Vectorizado en canarypoxvirus de las proteínas HA y F del virus del <u>moquillo canino</u>
Rcombitek rDistemper	Merial	Perros	Recombinante vectorizado en canarypoxvirus de las proteínas HA y F del virus del moquillo canino
Vaxxitek HVT+IBD	Merial.	Pollo	Recombinante en herpesvirus del pavo, frente a <u>Gumboro y Marek</u>
NewH5	Avimex	Aves	Recombinante de La Sota (ENDV) con la H5 y HA de los virus de la <u>influenza</u>
Vectormune FP-N	Biomune	Aves	Recombinante vectorizado del virus de la viruela aviar con las proteínas HN y F del <u>ENDV</u> y el de la viruela aviar
Nobivac Myxo-RHD	Intervet	Conejos	Recombinante Vectorizada de virus de la <u>Enf. Hemorrágica Vírica</u> (proteína del RHD) en Virus de Mixoma atenuado

Tabla 4. Vacunas recombinantes vectorizadas y autorizadas en Sanidad Animal

Las **Quimeras**, aplicadas preferentemente al caso de los virus pueden definirse como virus recombinantes con una combinación de genes o genomas que corresponden a otros orígenes, lo que confiere propiedades biológicas que corresponden a los genes o genomas de los virus de partida.

En la Tabla 5 se resumen algunos ejemplos aplicables a este tipo de solución vacunal, muy efectiva y aplicada en el caso de algunos virus emergentes en Sanidad Animal.

Quimera	Composición
virus del BDVV	Sustitución del gen de la E2 por el de la PPC
Virus de la PPC	Sustitución del gen de la E2 por el del BDVV
PCV1	Sustitución del gen de la cápsida por el del PCV2
Virus 17D (cepa vacunal) de la fiebre amarilla	Inserción de genes de proteínas de pre-M (premembrana) y de la envoltura (E) del virus de WNV. Autorizada en el caballo (Intervet: Prevenile)
Gripe aviar H1N1	Sustitución de la HA por la de un H5N1 y la NA por la de un H2N3
Herpes del pavo (HVT)	Introducción de genes de Gumboro (IBDV) y Marek (autorizada Merial: Vaxxitek)

Tabla 5. Quimeras de virus en Sanidad Animal

Un tipo a base de *Alphavirus*, están dando buenos resultados en vacunas experimentales. Se denominan **replicones** y funcionan sobre este tipo de virus, como plataforma, en los que se sustituye el gen de la proteína estructural por genes heterólogos de interés. En este caso el gen mantiene su capacidad autorreplicativa (razón que justifica el carácter de replicón) pero es incapaz de empaquetarse (ensamblarse) al faltar la proteína estructural que constituye el capsómero, la base de la cápside. Son por tanto vectores de ciclo único, dado que no se produce progenie y por tanto incapaces de transmitirse, pero capaces de generar en un tiempo breve hasta doscientas mil copias de ARN por célula. Aunque hasta la fecha ninguna de estas vacunas han pasado de ser experimentales, lo cierto es que muchas de ellas han sido evaluadas con muy buenos resultados en términos de respuesta inmunitaria y otras ventajas, en modelos animales. Se incluyen ejemplos de vacunas con destino a la Sanidad Animal, pero también respecto de Medicina Humana. En las tablas que siguen se resumen algunos ejemplos en relación con las tres principales plataformas a base del virus de la encefalitis equina, de la selva de Semliki y del virus Sindbis.

Virus	Hospedador	Diana de la expresión	Respuesta
BVDV	Bovino	Proteína E2	protección
Influenza A	Aves	HA	protección
Influenza A	Porcino	HA	protección
Dengue	Macacos	PrME, E85	protección
Marburgvirus	Macacos	GP, NP	protección
Ebolavirus	Ratón	NP	protección
id	id	VP24, 30, 35,	protección
Virus Hendra	id	GP	Ac neutralizan
Virus de la fiebre de Lassa	id	N	Respuesta inmune
Virus Nipah	id	GP	Ac neutralizantes
Virus de la fiebre del Valle del Rift	id	Gn	protección
Coronavir SARS	id	GP	protección
Virus Vaccinia	id	A33R, B5R	protección

Tabla 6. Vacunas experimentales de replicones frente a enfermedades víricas sobre la plataforma del virus de la encefalitis equina

Virus	Hospedador	Diana de la expresión	Respuesta
CSFV (PPC)	Porcinos	E2	Protección
IBDV (Gumboro)	Aves	VP2	Ac
ISAV (anemia del salmón)	Salmón Atlántico	HE	Protección
Louping ill	Ovinos	prME, NS1	protección
inmunodeficiencia de los simios-humanos (SHIV)	Simios y humanos	Env	Proliferación linfocitos T
BVDV	bovinos	NS3 (p80)	Linfocitos Tc,
virus influenza A	Ratón	NP	Ac y L Tc
Virus de la encefalitis del valle Murray (MVE)	Ratón	prME, E	Ac neutralizantes

Tabla 7. Replicones sobre la plataforma del virus de la selva Semliki

Microorganismo	Hospedador	Diana de la expresión	Plataforma	Respuesta
<i>Bacillus anthracis</i>	Ratón	PA	SINDBIS	protección
<i>Brucella abortus</i>	raton	IF3	SFV	protección
<i>Clostridium botulinum</i>	ratón	BoNTA-Hc	SFV	Ac, respuesta linfoproliferativa
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ratón	Ag85A	SINDBIS	protección

Tabla 8. Replicones experimentales sobre la plataforma del virus Sindbis

En el último tercio del siglo pasado se puso de manifiesto la posibilidad de inducir respuesta inmune protectora mediante la administración directa de plásmidos que llevasen insertado el gen de interés. Son las **vacunas de ADN**

Se pueden utilizar bien plásmidos (lo más común) o incluso fagos en los que se inserta el gen de interés con promotores eucariotas. Para la administración se utilizan, por ejemplo, pistolas de genes insertado el preparado directamente en el tejido muscular (aunque también se pueden administrar directamente en mucosas) en el que son accesibles al ácido nucléico bien miocitos o células dendríticas, que captan el plásmido no debiendo insertarse este en el genoma celular, aunque el riesgo de que tal ocurra existe, lo que induciría un fenómeno de tolerancia o bien un proceso de mutagénesis al azar. Como quiera que sea, el gen (que no se replica) después se expresa en las células y se traduce a proteínas antigénicas que se liberan al exterior siendo captadas por otras dendríticas y presentadas a los linfocitos T en el CPH (complejo principal de histocompatibilidad) de clase II. Algunas otras dendríticas a las que también llegó el plásmido, como señalamos, también pueden expresar (*cross priming* o cebamiento cruzado) péptidos antigénicos en el CPI de clase I. En cualquier caso, las dendríticas con el antígeno procesado, se dirigen a los órganos linfoides secundarios, donde le presentan al linfocito T y le activan. De esta manera, son capaces de inducir buenas respuestas de tipo humoral (linfocitos T CD4+, Th1 y Th2) y celular, además de CD8+, Tc. Como la proteína se produce en el interior de las células, se procesa y modifica de la misma manera que las proteínas víricas (induce respuesta CD8+), por lo que en conjunto el procedimiento general desde el punto de vista de la inmunogenicidad mejores resultados que purificar las proteínas y resulta muy adecuado para patógenos intracelulares (ej. *Mycobacterium tuberculosis*).

Las ventajas de este tipo de vacunas van, todavía, más allá; por ejemplo, como no se utiliza vector para el ácido nucléico, no se produce respuesta frente a él, lo que permite en la práctica realizar inoculaciones repetidas. Además este tipo de productos se califican en general como fáciles de manipular, producir y modificar. Son, además,

productos estables y de bajo coste y resuelven el problema de microorganismos de difícil cultivo o peligroso. Se pueden preparar mezclas de plásmidos para producir así una vacuna de amplio espectro y siempre se obtendrán mejores resultados añadiendo adyuvantes y optimizando el plásmido para incrementar la expresión mediante la incorporación de promotores más potentes o incorporando elementos reguladores o potenciadores de la transcripción.

Hasta la fecha solo se ha autorizado un producto de este tipo frente una neoplasia canina, en Australia, pero existen muchas vacunas experimentales en diverso grado de desarrollo, incluyendo frente a la fiebre aftosa (por ejemplo con genes de VP1 y-C), frente al virus de la enfermedad de Aujeszky, la peste porcina clásica (proteína E2), la rabia, el moquillo canino o la brucelosis, entre otras. También existen importantes avances de esta naturaleza en relación con la necrosis hematopoyética de los peces, la encefalitis de West Nile o las mycobacterias (tuberculosis).

Gene/s	Bacterias	Hospedador
L7/L12; SOD	<i>Brucella abortus</i>	Bovino
OMP-31	<i>B. melitensis</i>	Ovino y caprino
MPB83; Ag85B	<i>Myc. bovis</i>	Bovino
HSP-65	<i>M. paratuberculosis</i>	Ovino y caprino
FnBP; ClfA	<i>Staphy. aureus</i>	Bovino (mastitis)
PA83	<i>Bacillus anthracis</i>	Ovino (carbunco)
flaB2	<i>Leptospira Canicola</i>	Perro (Leptospirosis)
VapA	<i>Rhodococcus equi</i>	Caballo (neumonía)
K88	<i>E. coli</i>	Aves (colibacilosis)
MOMP	<i>Chlamydia psitacci</i>	Aves (clamidiosis)
MSP1B	<i>Anaplasma marginale</i>	Bovinos (anaplasmosis)
15kDa	<i>C. parvum</i>	Criptosporidiosis cabra
Sj28GST;Sj23	<i>S. japonicum</i>	Esquistomosis cabra
p50	<i>B. gibsoni</i>	Perro (babesiosis)
3-1E; EtMIC2	<i>E. tenella, E. acervulina</i>	Aves (coccidiosis)

Tabla 9. Vacunas de ADN para enfermedades de interés veterinario. Bacterias

Agente virico	Hospedador	Gen/es
Retrovirus	Bovino (leucosis)	gp51; gp30
Herpes virus bovino	Bovino (IBR)	gC; gD
Herpes virus porcino	Porcino (E. Aujeszky)	gB, gC, gD
Herpes virus equino	Équidos (Herpes)	gB,gC, gD
Pestivirus	Bovino (diarrea virica)	E2
Pestivirus	Cerdo (PPC)	E2
Picornavirus	Bovino (Aftosa)	VP1
Parvovirus	Perro (parvovirosis)	VP1, VP2
Rhabdovirus	Perro (rabia)	gP
Morbillivirus	Perro (moquillo)	HA; F
Influenza A	Influenza (aves, ..)	HA
Paramyxovirus	Aves (Newcastle)	HN; F
Coronavirus	Aves (Bronquitis Infecc)	N, S1
Avibirnavirus	Aves (E. Gumboro)	VP2

Tabla 10. Vacunas de ADN para enfermedades de interés veterinario. Virus

Tipo de vacuna	Laboratorio producto	Año de autorización y país
Frente a West Nile encefalitis	Centro del Cáncer	2005, USA
Necrosis hematopoyetica infecciosa	Novartis	2005, Canadá
Life Tide-SWS	VGX Animal Health	2007, Australia
Vacuna frente al melanoma canino	Merial	2007, USA

Tabla 10. Otros productos de ADN frente a procesos infecciosos y no infecciosos

Vacunología Inversa. La estrategia de vacunología inversa es muy reciente. Como indica su denominación va al contrario de la corriente convencional en la fabricación de vacunas que, como se ha podido ver, en lugar de partir del producto final (microorganismo entero atenuado o inactivado, subunidad obtenida por procedimientos físicos o químicos, subunidad recombinante, vacunas vectorizadas, etc.), lo que hace es definir la base genética del microorganismo en cuestión y basándose en informaciones previas acerca del genoma del mismo agente o de otros próximos, llevar a cabo una prueba de ensayo y error hasta decidir cuál de los genes-proteínas resulta más adecuado entre los seleccionados, para elaborar una vacuna con capacidad de inducir una respuesta inmunitaria protectora eficaz.

Serruto y colaboradores, en 2009, llevaron a cabo un estudio que ya se considera clásico que culminó con la obtención de un producto eficaz frente a *Neisseria meningitidis*, uno de los patógenos habituales en los cuadros de meningitis humana. El trabajo partió de la secuenciación del genoma de *N. meningitidis* serotipo B seleccionando de él, de partida, un total de 600 genes candidatos sobre la base de información no excluyente obtenida a partir de otros agentes, por similitud en relación con propiedades útiles desde el punto de vista de inducción de respuesta protectora. Uno tras otro, los genes fueron insertados en plásmidos y clonados en *E. coli*, de los que aproximadamente la mitad (350 genes) se expresaron bien. De todos estos, 91 fueron seleccionados nuevamente por expresar proteínas superficiales, que desde el punto de vista práctico se presumía tendrían buenas oportunidades de entrar en contacto con células presentadoras de antígeno y otras relacionadas con el desarrollo de la respuesta inmune. Todas las proteínas fueron probadas in vivo en un modelo animal (ratón) con el fin de comprobar su capacidad para inducir respuesta

protectora y de ella, solo 28 eran capaces de inducir la producción de anticuerpos con actividad bactericida (activación de la vía clásica del complemento). La lista se redujo al final con la selección de tres de estas proteínas, producidas como proteínas de fusión, que en unión de vesículas de membrana externa producidas a partir del agente patógeno, fueron registradas como una fórmula vacunal para la prevención frente a la meningitis producida por *N. meningitidis* tipo B.

Esta estrategia no hizo más que empezar con los estudios de Serruto y col., pues enseguida fueron seguidos de otros, actualmente en proceso de estudio frente a patógenos como *Streptococcus agalactiae*, *E. coli* uropatógeno (UP), *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolítica*, etc. Incluso, recientemente, de ensayos llevados a cabo sobre diferentes especies de protozoos como *Theileria parva*, *Neospora caninum*, *Leishmania spp*, *Cryptosporidium parvum*, etc., y helmintos como *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, incluso *Echinococcus granulosum*. Como se ve la lista de patógenos diana se está ampliando cada vez más, pero además, esta estrategia ha generado otras muy interesantes, como la denominada **Vacunología Estructural**, que pretende el desarrollo y aplicación de la vacunología Inversa para resolver problemas que hasta ahora se resisten, como el desarrollo de vacunas frente a patógenos altamente variables, o en aquellos casos en los que los resultados obtenidos en forma de respuesta inmunitaria con los preparados al uso, no son resolutivos bien por la escasa calidad de los anticuerpos generados o por otro tipo de razones. Los ejemplos vienen enseguida a la memoria en el caso de la tuberculosis, malaria o el virus respiratorio sincitial en el caso del hombre, o el caso de la fiebre aftosa, tipos antigénicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* o *Haemophilus parasuis* o del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRRS), entre otros.

La estrategia, tal como se plantea, consiste en añadir a la información basada en el genoma, como ocurre con la vacunología inversa, la procedente de la Biología Estructural, por ejemplo mediante estudios de cristalografía de rayos X, que permite caracterizar y modular el diseño de un antígeno en particular. En la práctica, los dominios variables de los determinantes antigénicos que inducen inmunidad protectora se ensamblan en un antígeno híbrido para inducir protección frente a todas las variantes de un patógeno en particular, convirtiéndose de este modo en una herramienta crítica para el diseño de nuevos antígenos vacunales. Hasta la fecha son escasos los estudios que han generado opciones de interés, pero ya se describen, en el campo de la Sanidad Animal, frente al virus de la fiebre aftosa y frente a la enfermedad de Glässer, producida por *H. parasuis*.

Otros caminos que están comenzando a ser explorados en la actualidad, se dirigen al uso de **Vesículas de Membrana Externa (OMV)** como nuevos antígenos vacunales. Ya se hizo mención en párrafos anteriores que el producto registrado por Serruto y col., en la protección frente a la meningitis humana producida por *N.*

meningitidis, además de las 3 proteínas seleccionadas como consecuencia de la metodología inversa, se incorporó también vesículas de membrana externa. Este tipo de formaciones se han descrito fundamentalmente en diferentes especies de microorganismos Gram negativos, como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *A. pleuropneumoniae*, *Brucella*, *Pasteurella multocida* y, recientemente en *H. parasuis*, además como ya se ha indicado, en el caso de *N. meningitidis* y se pueden considerar productos de secreción que contienen complejos proteicos (proteínas de la membrana externa) y otros factores de virulencia bacterianos entre los que se incluyen fragmentos de lipopolisacárido (LPS), de ácidos nucleicos, enzimas, toxinas, etc., liberadas de forma natural durante el crecimiento bacteriano mediante un procedimiento de extrusión que no produce cambios en la membrana y que les permite ingresar sin alteración evidente en cualquier tipo de tejido corporal del hospedador diana. Las OMV se han utilizado directamente como preparados vacunales, con buen éxito, e incluso como vectores en vacunas experimentales en ratón, por ejemplo frente a *Brucella melitensis*, generando una buena respuesta celular (Th1 y Th2), abriendo una nueva vía al desarrollo de preparados vacunales en casos en los que algún obstáculo como se ha visto dificulta la obtención de vacunas eficaces.

Vacunas comestibles.

La tecnología de modificación genética que ha permitido la obtención de los denominados “alimentos transgénicos” u “organismos manipulados genéticamente” o “plantas transgénicas” tiene aplicación en una de las direcciones que pueden resolver muchos problemas a medio plazo. Las plantas transgénicas poseen un enorme potencial en uno de los sistemas más efectivos y seguros para la producción de proteínas a gran escala para usos industriales, incluyendo la producción de vacunas. Las formulaciones que incluyen antígenos derivados de plantas, estables frente al calor, por ejemplo, pueden contribuir a resolver problemas de cobertura sanitaria tanto en niños como en animales, sobre todo en países en desarrollo². La tecnología se basa en el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, un tipo de microorganismo responsables de la formación de tumores o callos en las plantas de lo que se responsabiliza la presencia de un plásmido denominado Ti (inductor de tumores).

El plásmido en cuestión, al que se inserta un gen de interés (para la expresión del antígeno deseado) se inserta con un marcador de resistencia antibiótica y se clona en un vector, como *E. coli* y se dispone en un medio de cultivo al que se añaden en solución el antibiótico frente al que se ha introducido la resistencia en el vector bacteriano. Al tiempo, se añaden al cultivo células vegetales (fragmentos de tejidos de una planta seleccionada capaces de desarrollarse de forma vegetativa) con capacidad para transformarse genéticamente mediante la incorporación del plásmido Ti desde el

² Hefferon, K.L., 2010. Pharm. Res. 27(10):2040-42

vector bacteriano. El futuro de las células vegetales transformadas está condicionado a la presencia del marcador antibiótico que induce resistencia frente al antibiótico existente en el medio. De este modo, solo las células transformadas serán capaces de crecer en presencia del antibiótico y generaran plantas capaces de producir el antígeno buscado.

La lista de antígenos vacunales producidos mediante este procedimiento es ya numerosa e incluye, por ejemplo, la subunidad B de la toxina de E.coli enterotoxigénico en patata, la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa en alfalfa, la proteína VP2 del parvovirus canino en arabis, la proteína S del virus de la gastroenteritis transmisible porcina en patata y maíz, antígenos de superficie del virus de la hepatitis B en lechuga, hemaglutinina A del virus de la peste bovina en tabaco o proteínas del virus del sarampión, en zanahoria, por poner solo unos pocos ejemplos

Otras vacunas de interés en Ciencias Veterinarias.

Los preparados vacunales, en la actualidad, ya no se limitan a la prevención frente a las enfermedades infecciosas, su justificación original, sino que el terreno de la prevención, y en ocasiones tratamiento, navega ahora por territorios nuevos, sin abandonar los clásicos.

Es el caso, por ejemplo, del grupo de vacunas formuladas a base de hormonas con propósitos concretos, sobre todo en algunas especies de producción, como sucede con el ganado bovino o el porcino. En este sentido por ejemplo, para el control de la reproducción, existen desarrollos a base de un péptido de la hormona liberadora de gonadotropina (LHRH), que conjugado con ovoalbúmina, se utiliza para el control del celo en las vacas, o conjugada con una mezcla péptido-proteína y mezclada con adyuvante, ofrece buenos resultados para el control del olor sexual en los verracos, o para el control del celo y el comportamiento en las yeguas, o para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata en los perros. Un péptido de LHRH, conjugado con hemocianina de lapa, se utiliza también como contraceptivo para la fauna salvaje (por ejemplo, en el caso del ciervo, bisonte e incluso caballos salvajes), o un péptido de GnRH, también conjugado con hemocianina, utilizado como contraceptivo en gatos o, finalmente, androstendiona conjugada con albúmina sérica de origen humano, con el fin de incrementar la ovulación y los partos gemelares en el caso de las ovejas.

En este mismo apartado debe hacerse referencia a otros usos de las vacunas que se dirigen fundamentalmente a la prevención **de procesos alérgicos o tumorales** en animales de compañía o de alto valor. Las vacunas frente a procesos alérgicos se utilizan fundamentalmente en el caso de perros, gatos y caballos y sus condiciones son similares a las de las vacunas humanas, con una eficacia de entre el 20-100% en el caso de los perros. En el caso de los procesos tumorales, el prototipo es el melanoma canino maligno, al que se debe añadir el uso de la vacunación con BCG (bacilo de

Calmette y Guérin de *Mycobacterium bovis*) en el tratamiento de tumores del tracto urinario en el hombre y algunas especies animales, igual que frente a la sarcoidosis equina o el carcinoma de células escamosas de los bovinos.

Adyuvantes

No podría finalizar una referencia a las vacunas, cualquiera que sea la especie de su destino, sin hacer una referencia siquiera breve a este grupo de sustancias que desde comienzos del siglo XX, merced a los trabajos de Ramón y Glenny, se comprobó que aumentaban la inmunogenicidad de los antígenos vacunales. Responden así a la necesidad puesta de manifiesto repetidamente en el caso de las vacunas inactivadas o de los antígenos de subunidades purificados o parcialmente purificados.

Su uso, sin embargo, ha sido ciertamente empírico hasta fechas recientes. Ahora sabemos que la mayoría, sino todos, exaltan las respuestas de linfocitos T y B estimulando los componentes de la inmunidad innata, más que actuar directamente sobre este tipo de células. No obstante, algunas estrategias que tienen que ver con la liberación lenta del antígeno (efecto depot) y otras, también deben ser consideradas.

Más allá de las sales minerales, como el hidróxido de aluminio y las emulsiones oleosas, probablemente los productos mejor conocidos y que se han venido utilizando casi desde los comienzos de esta importante parte de la Vacunología, los descubrimientos relacionados con la inmunidad innata a los que nos hemos referido en la primera parte de este trabajo, han condicionado nuevos desarrollos que incorporan como adyuvantes agonistas (ligandos) de los receptores TLR, iniciando así un camino de la inmunidad innata que al final dispara la inmunidad adaptativa al provocar la producción de un entorno de citoquinas y quimioquinas que favorece la activación de los linfocitos T.

En este sentido, por ejemplo, el ARNbc, asociado a la infección por virus, o el ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C), un análogo sintético del primero, se utiliza como agonista del TLR3 en el caso de vacunas frente a influenza, o agonistas del TLR4 como el LPS, principalmente en forma de MPL (monofosforil-lípido A), forma detoxificada (más de mil veces) del LPS de *Salmonella* Minnesota, se ha comprobado que estimulan la producción de moléculas coestimuladoras y de citoquinas, mejorando la respuesta inmune a base de L-T CD4+ y CD8+, utilizándose en la vacunación frente a la hepatitis B, combinadas con sales de hidróxido de aluminio.

La flagelina, componente proteico de los flagelos en Gram negativos, como sucede con las salmonelas móviles, es un agonista del TLR5 y se incorpora en vacunas para aves, o las imidazoquinolinas, que son compuestos sintéticos que mimetizan el ligando natural de los TLR7 y TLR8, están implicadas en la respuesta inmune frente a virus. Con el mismo fin se utilizan también análogos de nucleósidos.

Por último, los oligonucleótidos no metilados de citosina y guanina (ODN-CpG) son agonistas del TLR9 e inducen citoquinas como IL-1, 16, IFN- α,γ , o TNF- α y producen muy buena respuesta frente L-Th1 y L-Tc, como se ha podido demostrar en estudios llevados a cabo en ratón, ganado bovino, ovino, cerdos, caballos, perros, gatos y peces, con resultados óptimos en el caso del síndrome respiratorio y reproductivo porcino o en la infección por *Toxoplasma gondii* en el ratón o frente a *Francisella tularensis*, frente a *L. monocytogenes* o el virus de la fiebre aftosa, entre otros.

En general, la mayoría de los agonistas de los TLR reclutan células dendríticas, presentadoras de antígenos, e inducen una respuesta inmune adaptativa fuerte y duradera. En el caso de patógenos intracelulares, como sucede con los virus además, acortan el tiempo de respuesta.

Consideraciones finales

En el contexto en el que se mueve la actualidad, con el auge de la doctrina nueva de “Una Salud” y las corrientes que dirigen los tópicos de investigación en la UE (horizonte 2020), como motivos principales de reflexión, procede realizar, para finalizar, algunas consideraciones en relación con la actualidad y futuro próximo de las vacunas en Ciencias Veterinarias.

En primer lugar, las vacunas son herramientas que contribuyen al abastecimiento seguro de alimentos, en una sociedad que camina hacia una población que se prevé llegar a los 9 mil millones de habitantes para el año 2050. Su acción preventiva sobre las enfermedades infecciosas neutraliza el factor negativo de mayor importancia sobre la producción animal y los alimentos que de ella se derivan con destino al hombre, pero además, sin olvidar como hemos señalado que la las $\frac{3}{4}$ partes de las zoonosis, son emergentes y que el 60% de las enfermedades infecciosas humanas son zoonosis. Las vacunas son clave en el control de estas enfermedades y contribuyen, por ello directa e indirectamente a la mejora de la Salud Pública.

El uso de vacunas reduce la dependencia de antimicrobianos en la terapia contra enfermedades infecciosas y con ello alivia el gran problema de las resistencias y su difusión.

Entre los objetivos inmediatos para lograr vacunas más seguras y eficientes debe incluirse estudios que promuevan la identificación de moléculas reconocibles por los receptores dispuestos en las células de la defensa innata, su caracterización e investigaciones que aclaren su papel inductor de la inmunidad innata, estudios sobre el inflammasoma, incluyendo sus funciones y todos aquellos elementos que permitan nuevos desarrollos preventivos y terapéuticos de base inmune en Ciencias Veterinarias.

Es importante llevar a cabo estudios de la interacción entre el patógeno y los hospedadores a fin de comprender las fases e interacciones que se suceden entre uno y otros y las que forman parte de la respuesta inmune.

Cada vez debe preocupar y, consecuentemente, estudiar cuanto se refiere al conocimiento de las razones que justifican ocasionales fallos vacunales y posibles reacciones adversas, incluyendo fenómenos alérgicos y anafilácticos en el que pueden implicarse desde razones de mala praxis a ingredientes de las formulaciones vacunales relacionados con adyuvantes y/o conservantes. En este sentido, como en el anterior, debe prestarse particular atención a las modernas tecnologías, particularmente las “ómicas” en el contexto de la moderna Biología de Sistemas.

Finalmente, resulta una necesidad indiscutible poner al servicio de la comunidad una cooperación estrecha entre la investigación humana y animal en el contexto de la doctrina “One Health”, con una respuesta integrada sobre los riesgos

Bibliografía

Pastoret, P.P., Lombard, M., Schudel, A.a., Plana-Durán, J., and A. Wennberg. 2007. Animal vaccination. Introduction. Rev. sci.tech. Off. Int. Epiz. 26(1)17-28

García Barreno, P., La revolución de los microbios: Infecciones emergentes y reemergentes.

Blancou, J. Histoire de la surveillance et du contrôle des maladies animales transmissibles. OIE. Paris, 2000

Plotkin, S. 2014. History of vaccination. PNAS, 111:34, 12283-12287 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1400472111 Acceso 22.03.2016

Lombard, M., Pastoret, P.P. and A.M. Moulin. 2007. A brief history of vaccines and vaccination. Rev. sci.tech. Off.int. Epiz. 26 (1), 29-48

Lobo Barrero, A. 2001. Aspectos sociales de la tuberculosis. XIII Congreso Neumosur Enfermería. Cadiz

Salmon, D.E., and T. Smith. 1886. On a new method of producing immunity from contagious diseases. Am. Vet. Rev. 10:63-69

Spiess, H. Vacunaciones. Editorial Paz Montalvo. Madrid, 1960

Ovejero del Agua, S. La obra inmunológica del Profesor Gastón Ramón (1886-1963). Discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina del Distrito Universitario de Oviedo. Oviedo, 1975

Ramón, G. Le principe des Anatoxines et ses applications. Masson & Cie., Éditeur. Paris, 1950

Netea, M.G., *et al.*, 2015. Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. Nature Immunol., 16:675-679. Doi:10.1038/nl.3178

Siegrist, C.A. WHO, 2010

- Gotschlich, E.C., Liu, T.Y and M.S. Artesntein. 1969. Human immunity to the meningococcus. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and group C meningococcal polysaccharides. *J. Exp. Med.*, 129 (6), 1349-1365
- Anderson, P., Peter, G., Johnston, R.B, Wetterlow, L.H., Smith, D.H. 1972. Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Clin. Invest.* 51:1, 39-44
- Hilleman, M.r., McAleer, W.J., Buynak, E.B., McLean, A.A. 1983. The preparation and safety of hepatitis B vaccine. *J. Infect.* 7 (Suppl. 1) 12-19
- Netea, M.G. *et al.*,. **2015**. Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. *Nature Immunology*, 16: 675-679. doi:10.1038/ni.3178
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J. Ammerer, G., Hall, B.D. 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 298 (5872):347-350
- Germanier, R., and E. Fuer. 1975. Isolation and characterization of *Ga/E* mutant Ty 21 a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* 13 (5)553-558
- Guy, B. *et al.* 2010. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine*, 28(3):632-649
- Kimbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., and J.T. Schiller. 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles there are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89(24):12180-12184
- Fikrig, E., Barthold, S.W., Kantor, F.S., Flavell, R.A. 1990. Protection of mice against the Lyme diseases agent by immunizing with recombinant OspA. *Science*, 250 (4980)): 553-556
- Steere, A.C., *et al.* Lyme Diseases Vaccine Study Group. 1998. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burdorgferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. *N. Engl. J. Med.*, 339 (4): 209-215
- Rappuoli, R. 2000. Reverse vaccinology. *Curr. Opin. Microbiol.*, 3(5):445-450
- Roush, S.W., Murphy, T.V., and the Vaccine-Preventable Disease Table Working Group. 2007. Historical comparisons of morbidity and mortality for vaccine-preventable diseases in the United States. *JAMA*, 298:18, 2155-2163
- Rappuoli, R., Pizza, M., Del Giudice, G. and E. de Gregorio. Vaccines, new opportunities for a new society. *PNAS*, 111:34, 12288-12293.