

Las vacunas de ADN: una promisorio medicina para el paciente veterinario (DNA vaccines: a promising medicine for the veterinary patient)

Juan Carlos Díaz David*, Maritza Barrera Valle

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.
C.P.: 32700 *jcdiaz@censa.edu.cu

Resumen

Las vacunas de ADN constituyen una promisorio herramienta en vacunología moderna. Al tratarse de una tecnología fácil de aplicar y de gran versatilidad, capaz de estimular una respuesta inmune humoral y celular, esenciales en la lucha contra infecciones virales, constituye una línea primordial de investigación y desarrollo. Esta revisión aborda las características de un vector de ADN y los mecanismos propuestos para la generación de la respuesta inmune mediante este tipo de vacunación. Igualmente, se discuten algunos regímenes de vacunación, ejemplos de respuestas inmunes protectoras obtenidas en especies de interés veterinario, y se hace referencia a las cuestiones de inocuidad inherentes a este tipo de vacuna.

Palabras clave: Vacunas de ADN, inmunidad humoral y celular, vacunología veterinaria

Abstract

DNA vaccines represent an invaluable tool in modern vaccinology. Besides being a simple versatile technology, capable of stimulating both cellular and humoral immune responses, it is also an essential weapon to fight against infections of viral etiology. This review emphasizes the characteristics of a DNA vaccine vector, as well as the proposed mechanisms responsible for the generation of a protective immune response. Furthermore, immunization regimes are discussed, examples of protective immune responses attained in target species of veterinary interest are given and reference is made to the safety concerns derived from this kind of vaccine.

Key words: DNA vaccines, humoral and cellular immunity, veterinary vaccinology

Introducción

Si bien durante el pasado siglo se demostró que la vacunación es capaz de proteger contra la infección por diversos patógenos, es sabido que para muchas enfermedades humanas y veterinarias, como el VIH, la tuberculosis, o la peste porcina africana (Pastoret, 2005), los métodos vacunales pueden resultar poco eficientes atendiendo a su capacidad para conferir inmunidad protectora o incluso no estar aún disponibles.

Las vacunas de ADN se basan en la inmunización con un plásmido que contiene la información genética de uno o varios genes que codifican para proteínas inmunogénicas de determinado patógeno. El plásmido actúa como un vector permitiendo la expresión en el interior de las células que son transfectadas como resultado de la inmunización. La respuesta inmune generada, humoral o celular, prepara al individuo vacunado para contrarrestar una infección con el patógeno, de manera que su utilización de forma profiláctica constituye una potencial herramienta a aplicar, sobre todo en aquellas enfermedades que requieren ambas ramas de la respuesta inmune, como las causadas por virus (Davis y Whalen, 1995).

Entre las ventajas que pueden atribuirse al empleo de las vacunas de ADN, pueden mencionarse: su capacidad para estimular una respuesta de tipo celular citotóxica mediada por linfocitos T CD8⁺, la cual no se logra con las actuales vacunas convencionales inactivadas o de subunidades recombinantes, además de que se obvia el empleo de vacunas vivas y las cuestiones de seguridad asociadas a este tipo de vacunación; su relativamente bajo costo de producción y el hecho que no requieren de cadena de frío para su distribución, dada su mayor estabilidad.

Esta revisión aborda aspectos de la obtención de las vacunas de ADN, las estrategias de inmunización, los mecanismos de presentación antigénica responsables de los niveles de protección alcanzados con este tipo de vacunas y la generación de respuesta inmune mucosal. Igualmente, se desarrollan los temas referentes a memoria inmunitaria, duración de la respuesta inmune y se mencionan las cuestiones de seguridad referentes al uso de este tipo de vacunas.

Características del vector de una vacuna de ADN

Como se ha mencionado anteriormente, las vacunas de ADN consisten en un plásmido bacteriano diseñado para expresar un gen (o genes) de interés que codifiquen, por ejemplo, para una proteína inmunogénica de un patógeno determinado, contra la cual se desea inducir una respuesta inmune protectora en el individuo vacunado. Las secuencias de interés se insertan en el vector plasmídico que vehiculizará la introducción de la información genética de interés al interior de las células del hospedero, de manera que se logre su expresión, procesamiento y presentación al sistema inmune, en lo que sería una imitación de lo que ocurre durante la infección con el patógeno completo.

Los componentes básicos de un vector que garantizan la óptima expresión en células eucarióticas, pero no la multiplicación del plásmido en el hospedero son: origen de replicación procariótico para la amplificación y propagación del plásmido en bacteria; gen de resistencia a antibióticos (generalmente kanamicina o ampicilina), como marcador de selección de las células bacterianas que portan el plásmido; promotor eucariótico fuerte que garantice altos niveles de transcripción del gen de interés en la célula eucariota (se han empleado exitosamente promotores virales como el promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano); sitio de múltiple clonaje inmediatamente después del promotor para insertar la secuencia de interés; secuencia de terminación de la transcripción y secuencia estabilizadora del ARN mensajero transcrito, dada por una cola de poliadenina derivada del virus simio 40 o del gen que codifica para la hormona de crecimiento bovina (Wolf y col., 1990).

Regímenes de inmunización

Una vez que se ha construido el vector plasmídico, debe considerarse el régimen de inmunización. La frecuencia, dosis, ruta así como el empleo de adyuvantes pueden influir en el resultado final de la respuesta inmune. Muchos estudios han demostrado una ventaja en la estrategia "prime-boost", en la cual se inmuniza primero con la vacuna de ADN y a continuación con la proteína recombinante o con un vector vivo recombinante. (Doria-Rose y Haigwood, 2003).

Modo de administración

Se han probado diversas rutas de inoculación del ADN plasmídico, entre ellas: intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intravenosa, oral, rectal, vaginal, intraorbital, intratraqueal, intranasal (Fynan y col., 1993).

La inmunización puede llevarse a cabo utilizando la inyección con aguja (parenteral) o por métodos biolísticos con pistola de genes. Este último método garantiza una mayor eficiencia, puesto que el ADN penetra al interior celular, a diferencia de la inyección donde queda en el medio intersticial y por tanto expuesto a la acción de nucleasas. Debido a ello se requieren dosis hasta 100 veces menores cuando se inmuniza con pistola de genes (van den Hurk y col., 2000). Además se ha empleado la microencapsulación del ADN, lo cual estimula la respuesta inmune tanto celular como humoral (Doria-Rose y Haigwood, 2003; Jilek y col., 2005).

Número, tamaño y frecuencia de las dosis

El número de dosis afecta la respuesta inmune en las vacunas de ADN. Se ha visto que si se trata de un gen muy inmunogénico, una sola dosis pudiera ser suficiente (Lodmell y col., 2001). En general, se requiere de más de una inmunización para conferir una respuesta lo suficientemente fuerte como para ser protectora. Además, el intervalo entre las dosis aplicadas resulta crítico, y se ha probado que un incremento en este intervalo de

inmunización se refleja en un aumento de la respuesta inmune conferida por la vacuna de ADN (Fuller y col., 1997).

En ratones 100 µg de la vacuna de ADN ó 1 µg con la pistola de genes es suficiente para inducir una respuesta inmune protectora para múltiples antígenos. Los animales de mayor tamaño requieren dosis mucho mayores por encima de 300 µg y hasta el orden de los mg (Doria-Rose y Haigwood, 2003). La dosis depende entre otros factores: del tamaño del individuo que se vacuna, de la inmunogenicidad del antígeno empleado y de la eficiencia de transfección durante la administración.

Adyuvantes

Pueden emplearse con éxito adyuvantes químicos como el hidróxido de aluminio (Ulmer y col., 1999) o adyuvantes genéticos que consisten en coinmunizar con un gen estimulador, como puede ser un gen que codifica para citoquinas que confieren una estimulación inmunitaria general o que estimulan respuesta de linfocitos cooperadores Th-1 ó Th-2; genes para la toxina del cólera o aquellos que estimulan la apoptosis o muerte celular programada (Sasaki y col., 2003).

La selección del adyuvante debe supeditarse al conocimiento del tipo de respuesta inmune que se desea obtener para garantizar la protección. Así en el modelo de Leishmania major, se requiere una respuesta de linfocitos cooperadores Th-1, por lo que incluir el gen que codifica para la IL-12 en las vacunas de ADN, mejoró la potencia y duración de la respuesta inmune (Gurunathan y col., 1998). Por el contrario, una vacuna de ADN contra el virus causante de la encefalitis japonesa, resultó protectora al administrarse sola, puesto que al coinmunizar con un plásmido que codifica para la IL-12, se redujo la respuesta humoral y con ello el nivel de anticuerpos neutralizantes, que son responsables de la protección en esta enfermedad (Chen y col., 2001).

Además existen adyuvantes que potencian la inmunidad mucosal como los motivos CpG no metilados del ADN bacteriano, la toxina lábil de E.coli mutante, las interleuquinas proinflamatorias IL-1 α , IL-12 e IL-18, las que inducen respuesta humoral, o las interleuquinas IL-5, IL-6 que mejoran los niveles de IgA secretora, la IL-15 que estimulan respuesta CTL. La quimiocina MCP-1 puede utilizarse igualmente como adyuvante potencial, puesto que estimula respuesta de IgA secretora a nivel mucosal (Stevceva y Ferrari, 2005).

Estrategias de inmunización

Se ha demostrado la ventaja de combinar dos o más tipos de vacuna. En este caso, la respuesta inmune obtenida puede ser cualitativa y cuantitativamente superior a la obtenida con cada vacuna por separado. En general, los regímenes comienzan con 1 o más dosis de la primera vacuna, seguido de 1 o más dosis de la segunda vacuna (Nagata y col., 2004). Se ha visto que inmunizar primero con la vacuna de ADN y a continuación aplicar una vacunación de recuerdo con vacuna de subunidades, induce una respuesta inmune más efectiva que la administración de cada vacuna por separado (Huygen, 2005). Asimismo, se

han estudiado las combinaciones de vacunación con vector vivo recombinante y vacuna de subunidades; vector vivo recombinante más DNA y viceversa. En este último caso es posible repetir dosis de recuerdo con vacuna de ADN, puesto que la respuesta inmune de memoria que se genera no neutraliza esta vacuna.

Para el modelo de herpesvirus en ratones, se vio que inmunizar primeramente por vía intramuscular con la vacuna de ADN, seguido de inmunización por la misma vía con un vector recombinante basado en vaccinia, confirió la mejor respuesta sistémica, mientras que la inmunización por vía mucosal produjo las mejores respuestas a nivel mucosal y sistémico al emplear el vector recombinante de vaccinia en la inmunización inicial y administrar la vacuna de ADN como dosis de recuerdo (Eo y col., 2001).

Generación de la respuesta inmune en la vacunación con ADN

Mecanismos de presentación antigénica

Existen al menos tres mecanismos de procesamiento y presentación del antígeno codificado por el plásmido de ADN, los cuales garantizan la inducción de una respuesta inmune: 1. estimulación directa mediada por células somáticas (miocitos, queratinocitos o cualquier célula MHC II negativa) 2. transfección directa de células profesionales presentadoras de antígeno (APC) y 3. Presentación cruzada (Cross-priming en inglés), en el cual el plásmido transfecta una célula somática y/o APC, y la proteína secretada es captada por otra APC donde es procesada para su presentación a linfocitos T CD8⁺ (Akbari y col., 1999; Gurunathan y col., 2000).

Aunque se reporta en la literatura la participación activa de las células musculares en la inducción de la respuesta inmune tras la vacunación con ADN (Tang y col., 1992), existe la dificultad conceptual de que los miocitos como células somáticas expresan la molécula MHC clase II, pero no otras moléculas de superficie celular como la CD80 o la CD86, las cuales son esenciales en la estimulación de los linfocitos T, por lo que se plantea que el papel fundamental de las células somáticas es en la presentación cruzada, cuando el antígeno secretado por ella pasa a las APC (Ulmer y col., 1996)

Las observaciones y datos experimentales muestran que las células dendríticas juegan un importante papel en la inducción de la respuesta inmune en la vacunación de ADN, y que sólo un reducido número de células dendríticas es transfectado directamente. Además, se plantea que la mayor parte de las células dendríticas no transfectadas pudiera contribuir a la presentación antigénica por otros mecanismos como la presentación cruzada (Elliott y Howarth, 2004).

Diferentes patrones de respuesta inmune inducidos por vacunas de ADN

Inmunidad humoral

La inmunización con ADN puede inducir una elevada respuesta inmune humoral frente a numerosas proteínas en diversas especies. Esta respuesta humoral puede ser protectora in vivo. En general se ha visto que la respuesta de anticuerpos alcanza un pico entre las 4 y las 12 semanas post-vacunación en ratones y que el nivel de anticuerpos se incrementa con el aumento de la dosis (Deck y col., 1997).

Por otra parte, se ha comprobado que la respuesta de anticuerpos obtenida mediante vacunación con ADN es menor que la que se obtiene al inmunizar con virus vivo a dosis subletales, y que el pico en los niveles de anticuerpos se alcanza más tardíamente, aunque en ratones, las respuestas respecto a título y duración de los niveles pueden ser equivalentes a las obtenidas en las infecciones virales (Robinson, 1999). No obstante, esto no debe interpretarse como una desventaja de las vacunas de ADN, puesto que a través de su administración es posible generar respuesta de memoria, de ahí que los títulos de anticuerpos se disparen frente al agente infeccioso completo (Abdelnoor, 2001).

Es importante señalar que en las vacunas de ADN se produce el antígeno por la célula hospedera, de ahí que se logre un adecuado procesamiento de la proteína antigénica sintetizada y por tanto la correcta conformación tridimensional, que garantizará una respuesta inmune de anticuerpos frente a epítopes neutralizantes dependientes de la conformación, al igual que ocurre en la infección natural de animales que han resistido la infección, y a diferencia de lo que sucede en vacunas inactivadas y de subunidades, donde estos epítopes pueden perderse (Deck y col., 1997; Boyle, y col., 1997).

Inmunidad celular

A) Linfocitos T CD4⁺ cooperadores

Debido al carácter proinflamatorio de los motivos CpG no metilados presentes en el ADN bacteriano, los cuales inducen la síntesis y excreción de IL-12, se obtiene en muchos casos una respuesta Th-1, cuando la inmunización se realiza intramuscularmente. Esto es así puesto que se activan células relacionadas con la inmunidad innata, que reconocen los motivos CpG como extraños (Hussain y Kline. 2003). Por el contrario, si se inmuniza con pistola de genes, se genera una respuesta de tipo Th-2, probablemente debido a que en este caso se emplea mucha menos cantidad de vector plasmídico, con lo que disminuye el carácter extraño del vector plasmídico, y al hecho que con esta forma de administración, el ADN es introducido directamente al interior de las células transfectadas, de manera que se obvia la interacción a nivel de superficie de los motivos CpG con las APC que mediarían la liberación de citoquinas tipo Th-1 proinflamatorias (van den Hurk y col., 2004).

Además, debido a que las vacunas de ADN hacen blanco en las células dendríticas, es posible que diferentes métodos de inmunización puedan transfectar subconjuntos diferentes de células dendríticas, que se sabe determinan de forma diferente la respuesta de linfocitos T cooperadores. De igual modo, existe evidencia de que la naturaleza del antígeno

codificado por el plásmido (secretado o intracelular) puede determinar el tipo de respuesta de linfocitos T cooperadores activados por la vacuna de ADN (Boyle y col., 1997; Haddad y col., 1997).

B) Linfocitos T CD8⁺ citotóxicos

Una de las principales ventajas de las vacunas de ADN es su capacidad para generar antígeno endógenamente, haciéndolos accesibles a los linfocitos T CD8⁺ a través de la vía MHC clase I (Donnelly y Ulmer, 1999). Las vacunas de ADN superan a las vacunas convencionales basadas en proteínas debido a que las respuestas citotóxicas por linfocitos CD8⁺ (CTL) son difíciles de inducir por estas últimas. Igualmente, presentan ventajas respecto a las vacunas vivas, que manifiestan potencial de reversión a la virulencia (Gurunathan y col., 2000).

Se ha visto que en dependencia del tipo de antígeno utilizado y del sistema viral empleado como modelo, la vacunación de ADN puede generar respuestas CTL similares a las obtenidas en la infección viral in vivo o en un reducido número de CTL que se expanden in vivo tras el desafío viral y confieren protección ante el mismo (Zarozinsky y col., 1995; Chen y col., 1998).

La inyección muscular de ADN plasmídico transfecta mayormente células musculares estriadas, mientras que la inmunización epidérmica con pistola de genes, puede transfectar queratinocitos y células de Langerhans, así como células mononucleares presentes en los vasos capilares epidérmicos. En múltiples experimentos se ha demostrado el papel de las APC derivadas de la médula ósea, en la generación de la respuesta CTL, y se ha visto, como ya se indicó, que la presentación cruzada contribuye a la generación de respuesta CTL (Combes y Mahony, 2001).

Inmunidad mucosal

La mayoría de los patógenos veterinarios se transmiten a través del epitelio de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genital. De acuerdo con ello, la inducción de inmunidad protectora a este nivel constituye un elemento decisivo en la protección contra los microorganismos invasores.

La vigilancia en las superficies mucosales está garantizada por las estructuras linfoides asociadas a nasofaringe, tonsilas, glándulas salivales y tracto respiratorio superior, conocido como tejidos linfoides nasales (NALT, en inglés); el broncoepitelio y tracto respiratorio inferior (BALT, en inglés); el tracto gastrointestinal (GALT, en inglés) y los tractos genitales masculino y femenino. Cada tejido linfoide asociado a mucosa (MALT, en inglés) está cubierto por un epitelio que contiene células especializadas que transportan el antígeno intacto desde la membrana apical expuesta hasta la superficie basolateral donde el antígeno, o el ADN plasmídico, interactúa con la APC y se inicia la estimulación de la respuesta mediada por linfocitos B y T (Neurath y col., 2002).

Se ha visto, además, que la IgA secretora confiere una respuesta inmune mucosal protectora capaz de neutralizar los microorganismos presentes en la superficie mucosal (Ogra y col., 1994) y que la protección contra la reinfección se correlaciona con los niveles de inmunoglobulina secretada a nivel de las superficies mucosales y no con el nivel de anticuerpos séricos (Mestecky, 1987) lo que confirma la importancia de la inmunidad mucosal.

Existen numerosos trabajos que reportan el éxito referido a propiedades protectoras en el uso de vacunas de ADN aplicadas a una amplia gama de superficies mucosales (Hobson y col., 2003). De acuerdo con ello, muchos grupos investigan y desarrollan temáticas relacionadas con las estrategias de inmunización con ADN plasmídico dirigido a superficies mucosales. Continuamente se describen procedimientos para la formulación de estas vacunas, de manera que se garantice una adecuada eficiencia de transfección y consecuente presentación antigénica al sistema inmune, que serán en definitiva las responsables de inducir el nivel deseado de inmunidad mucosal protectora.

Memoria inmunitaria y duración de la respuesta inmune

Una característica deseable de cualquier vacuna es su capacidad de inducir memoria inmunitaria de larga duración. Los resultados muestran que si bien las vacunas de ADN pueden inducir de forma efectiva respuestas humorales duraderas, esta respuesta depende del tipo de antígeno empleado en la vacuna, puesto que en un modelo de vacunación de ratones con ADN que codifica para antígeno hemaglutinante de influenza, los animales presentaron niveles de anticuerpos similares o superiores que los animales convalecientes. Estos títulos de anticuerpos podían detectarse hasta 1 año después de la vacunación. (Deek y col., 1997). Esto contrasta con otro modelo en que se vacunó con una vacuna de ADN que contenía información para la nucleoproteína del virus LCMV. En este caso, la vacuna aplicada con pistola de genes o intramuscularmente, no estimuló una respuesta de anticuerpos detectable antes del desafío, o bien los títulos de anticuerpos cayeron a los 4 meses post-vacunación (Martín y col., 1995).

Con respecto a la inmunidad celular, se ha mostrado que células CD4⁺ son activadas en los nódulos linfoides, de donde migran hacia el bazo. Aquí pueden persistir hasta 40 semanas en ausencia de cantidades detectables de antígeno. Además se ha visto que la vacunación con ADN puede inducir respuestas duraderas tipo Th-1, y conferir así una protección más efectiva que la vacunación con proteína y adyuvante (IL-12), debido posiblemente a los bajos niveles de antígeno que persisten y/o al efecto de adyuvante conferido por los motivos CpG del ADN plasmídico (Gurunathan y col., 1998).

Existe evidencia de que las repuestas proliferativas duraderas inducidas por las vacunas de ADN, pueden mantenerse sin que se detecte antígeno (Akbari y col., 1999). No obstante, el estudio original de Wolf y col., 1992, mostró que la inoculación intramuscular con ADN plasmídico que codifica para diferentes genes reporteros, permitió la expresión de los genes por más de 1 año.

De acuerdo con esto, existen varias posibilidades para explicar las respuestas inmune duraderas estimuladas por este tipo de vacunas: a) el antígeno está presente continuamente a bajos niveles, suficientes para la presentación antigénica, pero por debajo del límite de detección. O bien, el ADN no se detecta pero el antígeno sintetizado pudiera persistir in vivo, proporcionando así un reservorio para mantener la respuesta inmune b) el plásmido y el antígeno sintetizado desaparecen y las respuestas observadas son antígeno-independientes c) las células memoria generadas por la vacunación de ADN son diferentes desde el punto de vista cualitativo de las inducidas por otras formas de vacuna, como la administración de proteína más adyuvante (Gurunathan y col., 2000).

Respuestas inmunes protectoras en especies de interés veterinario

Durante los últimos años se han producido considerables avances en la determinación de la secuencia codificante para antígenos inmunodominantes de gran variedad de patógenos con interés en veterinaria, responsables de la inmunidad protectora in vivo. Muchas de estas secuencias se han clonado en vectores de ADN plasmídico para su utilización como vacunas de ADN. A continuación se presentan ejemplos de la utilización de este tipo de vacunas en especies con importancia veterinaria.

Ganado vacuno

Se han obtenido vacunas de ADN basadas en el gen de la glicoproteína D del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina 1 (IBR-1), ya sea con región transmembrana o sin ésta. Los resultados muestran que estas vacunas confieren cierta protección con respecto a los grupos controles no vacunados, atendiendo a estado clínico, temperatura corporal, excreción viral y disminución de peso, aunque en general el título de anticuerpos que se obtiene no es elevado, ni se incrementa con un aumento del número de dosis. Además se ha visto que este tipo de vacuna aplicada en terneros recién nacidos, con nivel detectables de anticuerpos calostrales, consigue conferir protección ante el desafío viral, lo cual avala la potencia en este grupo específico de animales (van den Hurk y col. 1999).

Toussaint y col., 2005 demostraron que una vacuna de ADN que codifica para la glicoproteína D del IBR-1, induce títulos de anticuerpos neutralizantes mayores que vacunas que codifican para el gen de la glicoproteína C de este mismo virus. Además estos autores obtuvieron como resultado que una vacuna de ADN que contiene la forma secretada de la gD induce una respuesta inmune mayor que la vacuna que codifica para la proteína completa. Sin embargo, la inmunogenicidad de la forma secretada de la gD, no se observó para la gC.

El gen que codifica para la proteína G del virus sincitial respiratorio bovino ha servido de base también para el desarrollo de una vacuna contra este virus. Se probó que la vacunación intradérmica sin aguja confiere mayor protección que cuando se aplica por vía intramuscular o intradérmica con aguja, atendiendo a los niveles de excreción viral de los animales vacunados y que se desafiaron. Igualmente, se obtuvo que la vacunación con un vector viral vivo recombinante, basado en la misma proteína G, es más eficaz de acuerdo a

su potencialidad para conferir protección tras el desafío viral (Schrijver y col., 1997).

La información genética para la proteína E2 del virus de la diarrea viral bovina (BVDV) ha sido clonada en un vector de ADN, y se ha demostrado su capacidad para conferir una respuesta inmune protectora. La administración del plásmido recombinante por vía intramuscular en solución salina o en liposoma, indujo respuesta de anticuerpos neutralizantes y respuestas linfoproliferativas específicas a este antígeno. El desafío con el BVDV-1 provocó una marcada respuesta humoral de memoria, al igual que respuesta mucosal a nivel de las secreciones nasales, y los animales vacunados estuvieron parcialmente protegidos contra la enfermedad (Harpin y col., 1999).

Ganado porcino

El gen de la glicoproteína D del virus de la pseudorrabia ha sido clonado para su utilización como vacuna de ADN. Se mostró que los mejores títulos de anticuerpos inducidos por la vacunación, se lograron al inmunizar cerditos de 1 día de edad provenientes de madres no vacunadas, carentes de anticuerpos anti-virus de la pseudorrabia. Estos animales recibieron una dosis de recuerdo a los 42 días post-primera dosis, y fueron desafiados 73 días después de esta segunda dosis. No obstante, los animales vacunados no estuvieron protegidos ante el desafío viral letal. (Monteil y col., 1996).

Por otra parte se ha visto que la glicoproteína C administrada como vacuna de ADN, sí es capaz de conferir protección en cerditos de más de 1 día de edad, a diferencia del gen de la glicoproteína D, aunque ambos plásmidos indujeron anticuerpos neutralizantes del virus de la pseudorrabia. Además, se detectaron respuestas celulares específicas y se comprobó que 1 µg de ADN vacunal fue capaz de conferir protección frente al desafío letal con la cepa patógena NIA-3 del virus de la pseudorrabia (Gerdtts y col., 1997).

Ganges y col. (2005) reportaron la obtención de una vacuna de ADN basada en el gen de la glicoproteína E2 del virus de la peste porcina clásica. En este estudio se demostró que la inmunización de cerdos domésticos con esta vacuna confirió protección total frente al desafío letal. La administración de 3 dosis a intervalos de 14 días entre sí, con 400 µg de ADN por vía intramuscular, indujo una respuesta de linfocitos T cooperadores restringidos al MHC clase II, y no se detectaron anticuerpos en el suero de los animales vacunados. Tras el desafío los animales desarrollaron una marcada respuesta de linfocitos T cooperadores, y una rápida elevación de los niveles de anticuerpos neutralizantes en 2 de los 3 animales vacunados, lo que se correlacionó con la protección ante los síntomas clínicos y la infección viral (Ganges y col., 2005).

Aves

En las aves se han desarrollado vacunas de ADN contra la influenza aviar y la enfermedad de Newcastle. El gen de la hemaglutinina viral se ha empleado en el caso de la influenza aviar (Robinson y col., 1993). La administración de 2 dosis de 100 µg cada una separadas 1 mes entre sí, confirió protección ante el desafío 1-2 semanas después de la segunda dosis.

Esto demostró la prueba de concepto de que los pollos pueden inmunizarse contra la infección viral, a través de una vacuna de ADN (Kodihalli y col., 1997).

El gen que codifica para la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle se ha clonado en vectores de ADN plasmídico, y se ha empleado como vacuna de ADN (Sakaguchi y col., 1996). Se aplicó una dosis de 100 µg del plásmido recombinante administrado por vía intramuscular, de forma lineal o circular, en combinación con lipofectina o lipofectamina. Se logró protección solamente con el plásmido lineal y el empleo de lipofectina para aumentar la eficiencia de la transfección, puesto que 4 de 5 animales inmunizados en estas condiciones estuvieron protegidos, mientras 2 de 5 animales inmunizados con el plásmido lineal solamente, estuvieron protegidos ante el desafío viral.

Debe señalarse que generalmente el ADN plasmídico circular es más eficiente que la molécula lineal en conseguir la expresión del gen de interés in vivo (Krishnan, 2000); no obstante, en este ejemplo los animales vacunados con el plásmido circular no presentaron respuesta de anticuerpos, y sólo los vacunados con el ADN lineal estuvieron protegidos ante el desafío letal. Esto avala el hecho de que la inducción de inmunidad mucosal en el modelo de infección por el virus de la enfermedad de Newcastle, resulta decisiva.

Conclusiones

Las vacunas de ADN constituyen una relativamente nueva y promisorio tecnología que permitirá abordar la obtención de vacunas como herramientas para el tratamiento y la prevención de enfermedades de los humanos y veterinarias. No obstante, existen ciertas preocupaciones con respecto a su inocuidad incluyendo: a) la posibilidad de que el ADN plasmídico se integre al genoma, incrementando así el riesgo de que se silencien genes supresores de tumores, o se activen genes oncogénicos; b) inducción de respuesta contra las células transfectadas con lo que se incrementaría el desarrollo de enfermedades autoinmunes; c) inducción de tolerancia en lugar de inmunidad y d) estimulación de la síntesis y excreción de citoquinas que alteran la capacidad del individuo vacunado de responder a otras vacunas y resistir la infección (Klinman y col., 1997; Cichutek, 2000).

Aunque estas cuestiones se han examinado en varios trabajos, los resultados se han obtenido en ratones, y no siempre es posible extrapolarlos a otras especies, por lo que se requiere de estudios profundos en cada especie donde se pretenda aplicar este tipo de vacuna. En especies de ciclo corto, no obstante, la ocurrencia de estos eventos indeseables no es tan trascendental como en el humano o en animales de compañía, caballos, ganado lechero y otros.

Si bien las bondades de una vacuna ideal como son: precio competitivo, inocuidad, estabilidad física y genética, posibilidad de conseguir inmunización contra múltiples componentes protectores de diversos patógenos simultáneamente, capacidad de conferir protección de larga duración con una sola dosis por vía oral, capacidad de inducir inmunidad mucosal en 2 semanas o menos, estimulación de respuesta inmune humoral y celular balanceadas a nivel sistémico, eficacia mayor del 90 %, así como efectividad en recién

nacidos que aún estén protegidos por anticuerpos maternos en el momento de la vacunación, son difíciles de alcanzar (van den Hurk y col., 2000), la tecnología de vacunación con ADN tiene la potencialidad para abarcar de forma exitosa estas cuestiones. Debido a ello, se justifica con creces la inversión de recursos materiales, humanos y esfuerzos dirigidos a la investigación y el desarrollo de esta poderosa alternativa vacunal.

Bibliografía

1. Abdelnoor, A.M. 2001. Plasmid DNA Vaccines. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*. 1:79-92.
2. Akbari, O.; Panjwani, K.; García, S.; Tascon, R.; Lowrie, D. and Stockinger, B. 1999. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med.* 189: 169-178.
3. Akbari, O.; Panjwani, K.; García, S.; Tascon, R. Lowrie, D. and Stockinger, B. 1999. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med.* 189: 169-17.
4. Boyle, J.S.; Koniaras, C. and Low, A.M. 1997. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Immunology*. 9: 1897-1906.
5. Boyle, J.S.; Silva, A.; Brady, J.L. and Lew, J.M. 1997. DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T-cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 14626-14631.
6. Chen, Y.; Webster, R.G. and Woodland, D.L. 1998. Induction of CD8⁺ T cell responses to dominant and subdominant epitopes and protective immunity to Sendai virus infection by DNA vaccination. *J. Immunol.* 160: 2425-2432.
7. Cichutek, K. 2000. DNA vaccines: development, standardization and regulation. *Intervirology*. 43: 331-338
8. Combes, B.K. and Mahony, J.B. 2001. *Immunology Letters*. 78: 103-111.
9. Davis, H.L.; Whalen, R.G. 1995. DNA-based immunization. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser.* 5:368-387).
10. Deck, R.R.; DeWitt, C.M.; Donnelly, J.J.; Liu, M.A.; and Ulmer, J.B. 1997. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine*. 15:71-78.
11. Deek, R.R.; Edwin, C.M.; Donnelly, J.J.; Liu, M.A. and Ulmer, J.B. 1997. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine*. 15:71-78.
12. Donnelly, J.J. and Ulmer, J.B. 1999. DNA vaccines for viral diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32: 215-222.
13. Doria-Rose, N.A. and Haigwood, N.L. 2003. DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimes. *Methods*. 31: 207-216.
14. Elliott, M. and Howarth, M. 2004. The processing of antigen delivered as DNA vaccines. *Immunological Reviews*. 166:27-36.
15. Eo, S.K.; Gierynska, M; Kamar, A.A. and Rouse, B.T. 2001. Prime/boost immunization with DNA vaccine: mucosal route of administration changes the rules. *J. Immunol.* 166:5473.

16. Fuller, D.H.; Corb, M.M.; Barnett, S; Steimer, K. and haynes, J.R. 1997. Enhancement of immunodeficiency virus-specific immune responses in DNA-immunized rhesus macaques. *Vaccine*. 15: 924-926.
17. Fynan, E.F.; Webster, R.G.; Fuller, D.H.; Haynes, J.R.; Santoro, J.C. and Robinson, H.L. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 90: 11478:11482).
18. Ganges, Ll.; Barrera, M.; Núñez, J.I.; Blanco, I.; Frías, M.T.; Rodríguez, F. and Sobrino, F. 2005. A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine*. 23: 3741-3752.
19. Gerdt, V.; Jons, A.; Makoschey, B., Visser, N. and Mettenleiter, T.C. 1997. Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J. General Virol*. 78: 2139-2146).
20. Gurnathan, S.; Klinman, D.M. and Seder, R.A. 2000. DNA Vaccines: Immunology, Application and Optimization. *Annual Reviews Immunology*. 927-974.
21. Gurnathan, S.; Klinman, D.M. and Seder, R.A. 2000. DNA Vaccines: Immunology, Application and Optimization. *Annual Reviews Immunology*. 927-974.
22. Gurnathan, S.; Klinman, D.M. and Seder, R.A. 2000. DNA Vaccines: Immunology, Application and Optimization. *Annual Reviews Immunology*. 927-974.
23. Gurnathan, S.; Prussin, C.; Sacks, D.L. and Seder, R.A. 1998. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nat. Med*. 4: 1409-1415.
24. Gurnathan, S.; Prussin, C; Sacks, D.L. and Sedez R.A. 1998. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nat. Med*. 4: 1409-1415.
25. Haddad, H.; Liljeqvist, S.; Stahl, S.; Anderson, I; Perlmann, P.; Berzins, K. and Ahlborg, N. 1997. Comparative study of DNA-based immunization vectors: effect of secretion signals on the antibody responses in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 18: 193-202.
26. Harpin, S; Makabi-Pauzu, D.J.; Hurley, D.J.; Mhikay, M; Talbot, B. and Elazhary, Y. 1999. Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhea virus major glycoprotein E2. In: *IBC Genetic Vaccines Meeting, Washington, D.C.*
27. Hobson, P.; Barnfield, C; Barnes, A. and Klavinskis L. 2003. Mucosal immunization with DNA vaccines. *Methods*. 31: 217-224.
28. Hussain, I.; Kline, J.N. 2003. Oligodeoxynucleotides: a novel therapeutic approach for atopic disorders. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003. 2(3):199-205.
29. Huygen, K. 2005. Plasmid DNA vaccination. *Microbes and Infection*. 7: 932-938.
30. Jilek, S.; Merkle, H.P. and Walter, E. 2005. DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 53(3): 377-390).
31. Klinman, D.M.; Takeno, M.; Ichino, M.; Gu, M.; Yamshechikov, G.; Mor, G. y Conover, J. 1997. DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Semin. Immunopathol*. 19: 245-256.

32. Kodihalli, S; Haynes, J.R.; Robinson, H.L. and Webster, R.G. 1997. Cross-protection among letal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the haemagglutinin. *J. Virol.* 71: 3391-3396.
33. Krishnan, B.R. 2000. Current status of DNA vaccines in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews.*42: 3-11.
34. Lodmell, D.L.; Parnell, M.J.; Bailey, J.R.; Ewalt, L.C. and Nalón, C.A. 2001. One-time gene gun or intramuscular rabies DNA vaccination of non-human primates: comparison of neutralizing antibody responses and protection against rabies virus 1 year after vaccination. *Vaccine.* 20. 838-844.
35. Martín, L.P.; Lau, L.L.; Asano, M.S. and Ahmed, R. 1995. DNA vaccination against persistent viral infection. *J. Virol.* 69: 2574-2582.
36. Mestecky, J. 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.* 7: 265-276.
37. Monteil, M.; Le Potier, M.F.; Guillotin, J.; Cariolet, R.; Houdayer, M. and Eliot, M. 1996. Genetic immunization of one-day-old piglets against pseudorabies induces neutralizing antibodies but not protection and is ineffective in piglets from immune dams. *Vet. Res.* 27: 443-452.
38. Nagata, T.; Aoshi, T; Uchijima, M.; Suzuki, M. and Koide, Y. 2004. Cytotoxic T lymphocyte, and Helper T lymphocyte-oriented DNA vaccination. *DNA and Cell Biology.* 23(2): 93-106.
39. Neurath, M.F.; Finotto, S. y Glimcher, L. 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature Medicine.* 8(6):567573.
40. Ogra, P.L.; Mestecky, J. Lamm, M.E.; Strober, W. McGhee, J.R. and Bienenstock, J. 1994. *Handbook of mucosal immunology.* Academic Press, San Diego, California.
41. Pastoret, P.P. 2005. The place of marker vaccines in control and eradication of animal diseases—aspects of comparative interest. *Dev Biol (Basel).* 121:181-188.
42. Robinson, H.L. 1999. DNA vaccines: basic mechanisms and immune responses. *J. Mol. Med.* 4(5): 549-555.
43. Robinson, H.L.; Huni, L.A. and Webster, R.G. 1993. Protection against a lethal influenza challenge by immunization with a heamagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine.* 11: 957-960
44. Sakaguchi, M.; Nakamura, H.; Sonoda, K.; hamada, P. and Hirai, K. 1996. Protection of chickens from Newcastle disease by vaccination with a linear plasmid DNA expressing the F protein of Newcastle disease virus. *Vaccine.* 14: 747-752.
45. Sasaki, S.; Takeshita, F.; Xin, K.O.; Ishii, N. and Okuda, K. 2003. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods.* 31: 243-254).
46. Schrijver, R.S.; Langedijk, J.P.; Keil, G.M.; Middel, W.G.; Manis-Veldkuis, M. and van Oirschot, J.T. 1997. Immunization of cattle with BHV-1 vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV. *Vaccine.* 15: 1908-1916.
47. Stevceva, L. y Ferrari, M.G. 2005. Mucosal Adjuvants. *Current Pharmaceutical Design.* 11:807-811
48. Tang, D.C.; De Vit, M. and Johnston, S.A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 356: 152-154. 1465-1468.
49. Toussaint, J.F.; Coen, L; Letellier, C; Dispas, M; Gillet, L; Vanderplasschen, A. and Pierre Kerkhofs. 2005. Genetic immunisation of cattle against Bovine herpesvirus 1:

- glycoprotein gD confers higher protection than glycoprotein gC or tegument protein VP8. Vet. Res. 36: 529-544.
50. Ulmer, J.B.; Deck, R.R.; Dewitt, C.M.; Donnhly, J.I. and Liu, M.A. 1996. Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. Immunology. 89: 59-67.
 51. Ulmer, J.B.; DeWitt, C.M.; Chastain, M.; Friedman, A.; Donnelly, J.J.; McClements, W.L.; Caulfield, M.J.; Bohannon, K.E.; Volkin, D.B and Evans, R.K. 1999. Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants Vaccine. 18: 18-28.
 52. Van Drunen Littel-van den Hurk, S.; Braun, R.P.; Lewis, P.J.; Karvonen, B.C.; Babiuk, L.A. and Griebel P.J. 1999. Immunization of neonates with DNA encoding a bovine herpesvirus glycoprotein is effective in the presence of maternal antibodies. Viral Immunol. 12(1):67-77.
 53. van Drunen Littel-van den Hurk, S.; Gerds, V.; Loehr, B.I.; Pontarollo, R.; Rankin, R.; Uwiera, R. and Babiuk, L.A. 2000. Recent advances in the use of DNA vaccines for the treatment of diseases of farmed animals. Advanced Drug Delivery Reviews. 43: 13-28.
 54. van Drunen Littel-van den Hurk, S; Babiuk, S.L. and Babiuk, L.A. 2004. Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. Immunol Rev.199:113-25.
 55. Wolf, J.A; Ludtke, J.J.; Acsadi, G.; Williams, P. and Jani, A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expresión in mouse muscle. Hum. Mol. Genet. 1: 363-369.
 56. Wolf, J.A; Malone, R.W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science. 247: 1465-1468.
 57. Zarozinsky, C.C.; Fyann, E.F.; Selin, L.K.; Robinson, H.L. and Welsh, R.M. 1995. Protective CTL-dependent immunity and enhanced immunopathology in mice immunized by particle bombardment with DNA encoding an internal virion protein. J. Immunol. 154: 4010-4017.

Trabajo recibido el 10/11/2005, nº de referencia 020612 REDVET. Enviado por su autor principal. Publicado en [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)®, ISSN 1695-7504 el 01/02/06. [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org/comunidad-virtual)® - Veterinaria Organización S.L.® Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org [http://www.veterinaria.org/](http://www.veterinaria.org) y [REDVET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)® <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y cumpla los requisitos indicados en [Copyright](http://www.veterinaria.org/copyright) 1996-2006