



Carlos Angulo, Gracia Gómez, Julio Hernández,
Mario Arce, Rodrigo Celis y Felipe Ascencio
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC.
angulo@cibnor.mx



Resumen

Las enfermedades infecciosas tienen impactos serios en la producción animal y la salud humana en el mundo. Una de las estrategias más económicas para combatir las continúa siendo la vacunación. Actualmente, la investigación sobre vacunas de ADN ha mostrado ventajas potenciales para prevenir enfermedades de manera eficaz. Nuestro grupo de trabajo está enfocado al desarrollo y evaluación de vacunas de ADN para prevenir enfermedades prevalentes en México, que afectan a la ganadería (paratuberculosis), la acuicultura (septicemia causada por *Aeromonas*) y los seres humanos (gastritis asociada a *Helicobacter pylori*).

Palabras clave: Enfermedades bacterianas; vacunas de ADN; ganadería, piscicultura y salud pública.

Abstract

Salinity Infectious diseases have serious impacts on animal production and human health worldwide. Vaccination is an economic strategy to combat them. Current research on DNA vaccines has shown potential benefits in preventing diseases effectively. Our team is focused on development and evaluation of DNA vaccines to prevent diseases prevalent in Mexico, affecting livestock (paratuberculosis), aquaculture (hemorrhagic septicemia caused by *Aeromonas*) and humans beings (gastritis associated with *Helicobacter pylori*).

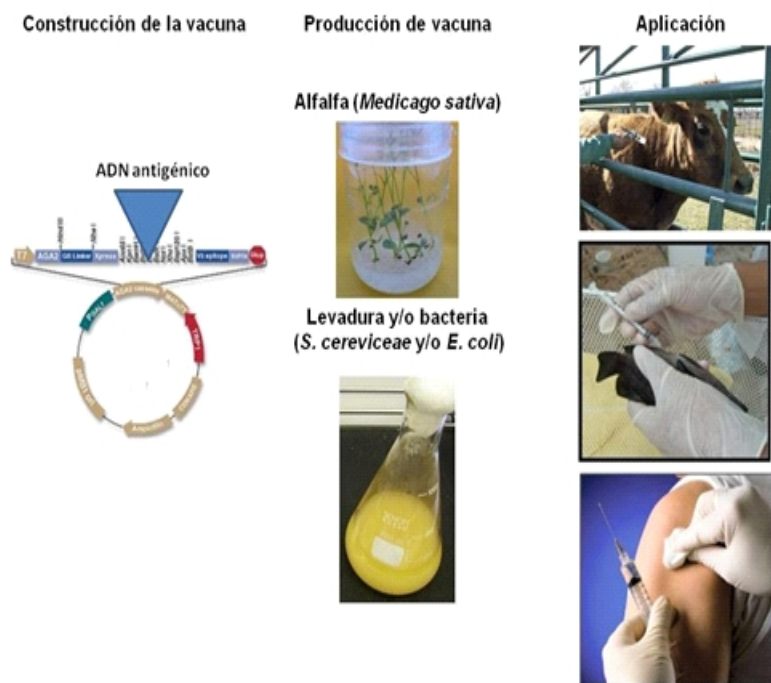
Key words: Bacterial diseases, DNA vaccines, livestock, fisheries and public health.

Area temática: Área 6: Biotecnología y Ciencias Agropecuarias.

Problemática

Las enfermedades (virales, bacterianas y parasitarias) de los animales y los seres humanos han tenido efectos devastadores en todas las culturas a lo largo de la historia del mundo. Aunque existen diversas maneras de prevenir y curar enfermedades, las vacunas continúan siendo la manera más económica de prevenirlas. Inicialmente, las vacunas se desarrollaron utilizando patógenos muertos y patógenos vivos atenuados que continúan siendo empleadas. Posteriormente, se desarrollaron vacunas a partir de subunidades de proteínas o polisacáridos de patógenos (muchos de ellos implicados en la adhesión al hospedero), que probaron buena efectividad. No obstante de estos enormes esfuerzos para el desarrollo de vacunas, es evidente la necesidad de generar vacunas más efectivas, seguras y de bajo costo. Actualmente, uno de los enfoques innovadores y prometedores es el desarrollo de vacunas de ADN, mediante ingeniería genética. La vacunación con ADN plasmídico utiliza genes que codifican para proteínas específicas de un patógeno que son capaces de inducir respuestas de defensa inmune en el hospedero. Además, se ha demostrado su efectividad para conferir protección contra enfermedades. Es un método de aplicación rápida, sencilla y se puede prescindir de uno de los principales problemas del transporte y conservación de vacunas, como es la cadena de frío.

Fig. 1. Representación esquemática de la construcción, producción y aplicación de vacunas de ADN para ganado, peces y humanos.



Usuarios

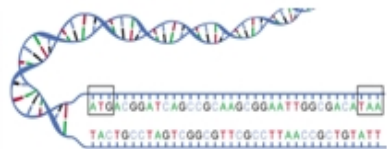
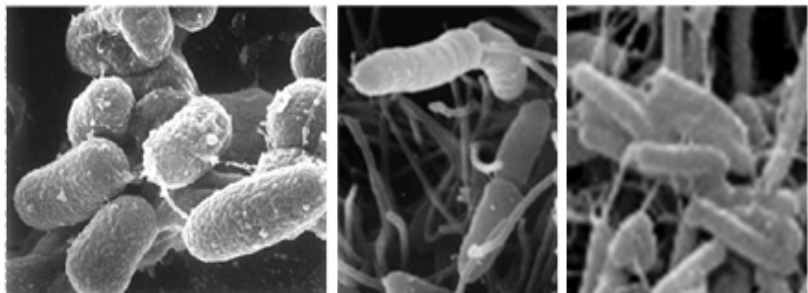
Los usuarios potenciales son: la industria farmacéutica, lechera y piscícola, el gobierno federal y los gobiernos estatales y las instituciones de salud pública y privada.

Proyecto

La meta de la investigación es el desarrollo de vacunas de ADN para prevenir enfermedades que afectan a la ganadería (paratuberculosis), acuicultura (septicemia hemorrágica causada por *Aeromonas*) y a humanos (gastritis asociada a *Helicobacter pylori*).

Vacunas de ADN para peces. Las bacterias del género *Aeromonas* son patógenos importantes que causan septicemia hemorrágica en peces. El objetivo de este trabajo fue la construcción de vacunas con genes de proteínas de membrana externa (OMP's) implicadas en la adhesión de *Aeromonas veronni*. Para ello, se identificaron OMP de *A. veronni* con propiedades de adhesión a componentes de mucosa (mucina y lactoferrina) y proteínas de la matriz extracelular (colágena y fibronectina) de células epiteliales. Se seleccionaron dos proteínas de 38 kDa y 49 kDa (llamadas OMP38 y OPM48, respectivamente). Estas proteínas poseen características de porinas; la OMP38 es similar a las porinas PhoE, OmpC y OmpF de bacterias entéricas, y la OMP48 es similar a la familia de porinas LamB. Los genes que codifican para las proteínas identificadas se clonaron en un plásmido de expresión (pcDNA3.1) para generar las construcciones de las vacunas génicas. La evaluación de las vacunas se realizó usando a la cabrilla arenosa (*Paralabrax maculatofasciatus*) como pez modelo. Los peces fueron vacunados una vez intramuscularmente con pOMP38P y pOMP48P, o mezcla de ambos, y posteriormente retados con *A. veronni*. Los resultados indicaron que ambas vacunas de ADN indujeron respuestas de humorales (anticuerpos) específicos que incrementaron la supervivencia (40-50%) de los peces infectados experimentalmente. Además, los organismos vacunados tuvieron 40% menos daños patológicos en diferentes órganos que los peces control. Este trabajo demostró que la administración intramuscular de una dosis de las vacunas de ADN (pOMP38P y pOMP48P) indujeron fuertes respuestas inmunes y confirieron protección parcial a los peces retados con la bacteria patógena *A. veronni*. Niveles de protección similares se han encontrado en salmón (*Salmo salar*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) vacunados con OMPs y se ha propuesto que los anticuerpos producidos previenen la adhesión bacteriana al epitelio de peces (Vázquez-Juárez et al., Fish Shellfish Immunol. 2005 19:153-63; Roberto Carlos Vázquez Juárez, Tesis Doctoral CIBNOR, 2003). El siguiente paso será evaluar nuevas estrategias de ingeniería genética y protocolos de inmunización con vacunas de ADN. Esta investigación se desarrolló en colaboración con la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Fig. 2. Patógenos e identificación de genes que codifican para antígenos vacunales. *M. avium* sub. *paratuberculosis* (izq.), *Aeromonas* spp. (centro), *H. pylori* (der).

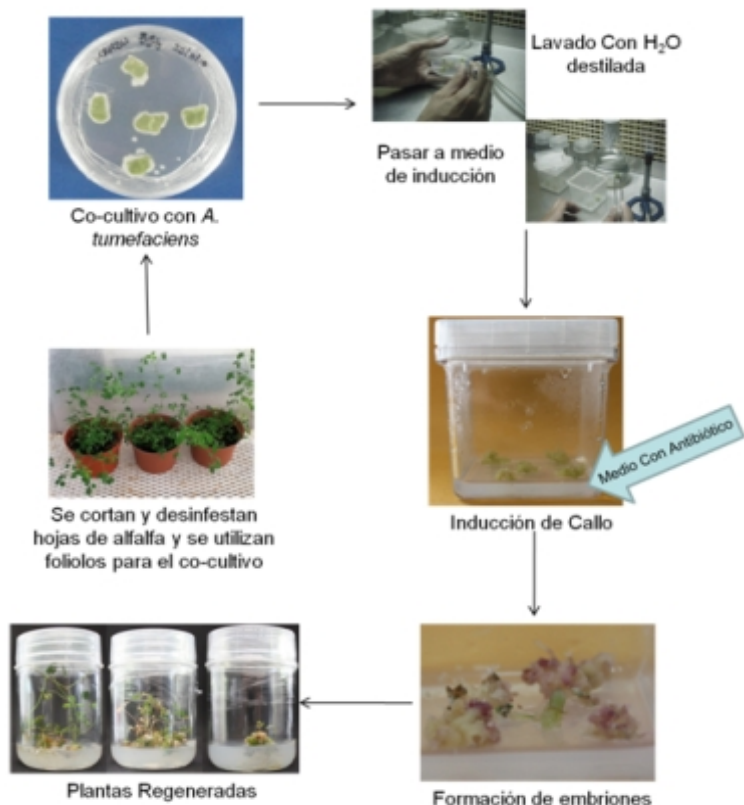


Vacunas de ADN para ganado. *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* (MAP) es el agente etiológico de la Paratuberculosis (enfermedad de John), una enfermedad gastroentérica severa de ruminantes domésticos y salvajes que causa pérdidas económicas en la industria lechera. El objetivo de este trabajo es construir vacunas génicas (ADN) y comestibles (proteínas recombinantes) para evaluar la capacidad de inmunoprotección contra la Paratuberculosis. Se seleccionaron dos antígenos: map85B (una proteína que pertenece a la familia de las micoliltransferasas) y map0586c (una transglicosilasa putativa). Actualmente se tienen los genes de antígenos clonados en el plásmido pV1J.ns.tPA (construcciones pV1J.ns.tPA::map85B y pV1J.ns.tPA::map0586C) (vacunas de ADN). Para la transformación de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens*, se montó la técnica de transformación y regeneración de plantas de alfalfa RegenSY27 *in vitro* evaluando los vectores binarios pBI121, pBIN35sNOS y pCAMBIA2301. La mayor eficiencia de regeneración y transformación se encontró usando el vector pCAMBIA2301 (30.2%). Sin embargo, no se ha logrado clonar los genes de los antígenos en cada plásmido binario evaluado, por lo que se cambió la estrategia y ahora se están clonando los genes en el vector pMDC32 (Gateway® Clonase) para transformar alfalfa y producir las recombinantes. Posteriormente, se realizará un protocolo de inmunización con las vacunas de ADN (1ra inmunización) y un refuerzo (2da inmunización) con las vacunas orales a base de alfalfa transgénica. Se realizará el reto infeccioso con MAP usando el modelo de ratón y se comparará la carga bacteriana en órganos blanco entre grupos control e inmunizados. Los resultados ayudarán a elucidar el rol de las vacunas en la modulación de la respuesta inmune en animales infectados y su correlación con el establecimiento de la infección. La meta final es aportar en el desarrollo de vacunas de ADN y comestibles en alfalfa para ayudar en el control de la Paratuberculosis. Esta investigación se está desarrollando en colaboración con el Laboratorio de Inmunología de Mycobacterias del Instituto Científico de Salud Pública de Bélgica.

Vacunas de ADN para humanos. El agente infeccioso de la gastritis en humanos es la bacteria *Helicobacter pylori*. Recientemente, se identificaron y caracterizaron dos proteínas antigénicas de membrana externa de *H. pylori* que inhiben su adhesión a células epiteliales *in vitro* hasta en un hasta 50% (ver: Lopez-Bolaños et al., 2009. Can. J. Microbiol. 55, 450-456; Claudia López Bolaños, Tesis Doctoral CIBNOR, 2009). Los resultados anteriores nos indican que las proteínas evaluadas podrían jugar un rol importante role en la adhesión de *H. pylori*. Aunque vacunas de ADN contra *H. pylori* han sido evaluadas usando la subunidad de la ureasa B con resultados interesantes, los resultados con antígenos de la membrana externa son candidatos para su evaluación como vacunas. El siguiente paso será construir las vacunas de ADN con los antígenos identificados, y evaluar la respuesta y protección inmune ante un reto infeccioso en modelo de ratón.

Es importante señalar que muchos grupos de investigación están desarrollando vacunas de ADN para humanos contra patógenos tales como: virus de la inmunodeficiencia humana, hepatitis C, *Mycobacterium tuberculosis*, *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium falciparum*, entre otros. Sin embargo, los resultados en humanos no han sido tan alentadores como en animales. Se requiere de una mayor investigación en muchos aspectos alrededor de las vacunas de ADN antes de que se conviertan en una realidad terapéutica y funcional.

Fig. 3. Esquemización del proceso de estandarización de la transformación y regeneración de plantas de alfalfa RegenSY27 *in vitro* para la producción de vacunas orales en el CIBNOR.



Impacto socioeconómico

Tanto *A. veronii* como *M. paratuberculosis* son patógenos asociados a enfermedades gastrointestinales en humanos y representan un riesgo para la salud pública. Su control a través de la vacunación efectiva, incluyendo vacunas de ADN, pueden asegurar la inocuidad de los alimentos de origen animal (leche y pescado) y reducir riesgo de infecciones humanas. De acuerdo con reportes recientes, la incidencia de *Aeromonas* spp. puede variar de 0 a 88% de los sistemas acuícolas, dependiendo de la especie, el lugar geográfico, el sistema de producción, la especie de pez y el sitio anatómico muestreado, entre otros. En los peces infectados con *Aeromonas* spp. se pueden presentar mortalidades asociadas cercanas al 10% en peces de cultivo. En el caso de la paratuberculosis, en general, se estiman prevalencias de alrededor del 10% de los bovinos lecheros en América. En México, se tienen reportes de prevalencias de paratuberculosis de 9%, 19.72% y 36% en bovinos, caprinos y ovinos, respectivamente, de acuerdo con el Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal; mientras que las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad se han estimado en alrededor del 15% en la producción de leche de bovino. Por otra parte, *H. pylori* es un patógeno gástrico de humanos cuyos impactos económicos en la población humana son considerablemente altos y en la actualidad solo existen tratamientos paliativos para la gastritis.

Contacto: <http://pcti.mx>, hnolasco2008@hotmail.com