

Futuro de las vacunas ADN frente a virus en Acuicultura

Nereida Jiménez¹, Julio Coll², Amparo Estepa³, Carolina Tafalla¹

¹ Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA)

Carretera de Algete a El Casar, Km. 8,1. Valdeolmos 28130 (Madrid) (España)

e-mail: tafalla@inia.es

² SGIT, INIA, Biotecnología

Carretera de La Coruña, Km. 7. 28040 Madrid (España)

³ Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC). Universidad Miguel Hernández. Elche (Alicante)

Resumen

Las enfermedades infectocontagiosas de origen vírico son uno de los problemas con mayor impacto en el desarrollo de la acuicultura, ya que generalmente provocan unas altas mortalidades y frente a ellas no existen tratamientos efectivos ni vacunas. La vacunación sería el método más eficaz para controlar el impacto de estas enfermedades, sin embargo, para muchos de los virus más devastadores, las vacunas tradicionales (vacunas atenuadas, muertas) o la vacunación con antígenos virales han resultado ineficaces. Dentro de este contexto, la vacunación genética (vacunas ADN), representa en estos momentos la opción más viable. Desde hace unos años, se viene experimentando con las vacunas ADN para muchos de estos patógenos, con resultados positivos. La mayor parte de las vacunas ADN desarrolladas en el ámbito de la piscicultura son frente a rhabdovirus, los virus de peces con mayor repercusión en la acuicultura continental, y entre los que se encuentran el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) y el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). Sin embargo, hasta que no se resuelvan algunos problemas asociados con estas vacunas ADN, como son los aspectos relacionados con la seguridad y/o rentabilidad económica, éstas no estarán disponibles para el sector. En este trabajo, se revisa el estado actual de la investigación en vacunas ADN para virus de peces, así como de los problemas que tendrán que ser resueltos para conseguir su comercialización.

Palabras clave: Vacunas ADN, acuicultura, virus, adyuvantes, promotores

Summary

The future of viral ADN vaccines in aquaculture

Viral diseases are one of main problems in aquaculture, due to the fact that they usually provoke high mortalities, and there are no effective treatments or vaccines for most of these pathogens. Vaccination would be the most effective manner to control the impact of these infections, however, for many of the most devastating viruses, traditional vaccines (attenuated or dead vaccines) or vaccination with viral antigens has proved ineffective. In this context, genetic vaccination (ADN vaccines) constitutes the most viable option. In the past years, research has focused on ADN vaccination for many of these viruses, with positive results. Most of the work has been performed in rhabdoviruses, the fish viruses with a greater impact on continental aquaculture, in which infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) are included. However, until the problems associated with these vaccines such as security and economic profit, are resolved, these vaccines would not be available to the farmers. In the current work, we revise the state of art in aquaculture viral ADN vaccines, as well as the problems that have to be resolved to achieve commercialization.

Key words: DNA vaccines, aquaculture, virus, adjuvants, promoters

Introducción

Uno de los problemas más importantes de la acuicultura (marina y continental), que está relacionado con las condiciones de cultivo en alta densidad de población, es el impacto de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias, parásitos y virus. Esto es debido a la severidad con la que cursan, y a que los agentes patógenos se transmiten rápidamente a través del agua. El impacto total de las enfermedades infecciosas en la Acuicultura se estima en varios miles de millones de dólares en todo el mundo (MAPA, 2001). Estas pérdidas incluyen, además de la mortalidad directa, la interrupción de los ciclos de producción, el incremento de los gastos de producción y las deformaciones en los individuos supervivientes que no son aptos para la comercialización.

Dentro de las enfermedades infecciosas que afectan a los peces acuicultivados, los virus, constituyen el mayor problema, debido a las altas mortalidades que producen, así como el hecho de que frente a ellos no existen tratamientos eficaces (como los antibióticos en el caso de las bacterias). Tampoco existen vacunas comercializadas para la mayoría de estos virus, y por el momento, solamente existen tres vacunas autorizadas frente a virus de peces: una vacuna frente a IPNV (virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa) para salmón en Noruega, una frente a iridovirus en Japón y otra frente al virus hemorrágico de la carpa en China (Gudding y cols, 1999). La prevención de las patologías causadas por virus está recomendada por la FAO y la OIE (FAO, 1977; OIE, 2005; ICES, 1988), y la UE (DOCE, 1990, 1991) para que la Acuicultura pueda ser alternativa a las pesquerías.

Dentro de los virus que afectan a peces, los rhabdovirus son el grupo de virus más numeroso. En este grupo se incluyen el virus de la septicemia hemorrágica (VHSV) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), las dos patologías víricas con mayor impacto y repercusión mundial en el cultivo de peces. Las pérdidas en Europa debidas al VHSV se han estimado alrededor de los 50 millones de euros por año (Coll, 1999). Cantidades similares y adicionales de pérdidas se deben a IHNV. En total, se estiman en 20-40% las pérdidas anuales en tonelaje en salmicultura por rhabdovirus a nivel mundial (Europa, Estados Unidos y Japón). Aunque en principio las infecciones por VHSV estaban limitadas a salmónidos, en la actualidad, se ha demostrado que este virus puede afectar también a lubina (*Dicentrarchus labrax*) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Schlotfeldt y cols, 1991). Además, se ha aislado VHSV en cultivos de anguila (*Anguilla anguilla*), lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), langostino (*Penaeus vannamei*) (Lu y cols, 1994) y en especies salvajes marinas como el bacalao (*Gadus morhua*) (Einer-Jensen y cols, 2004; Meyers y cols, 1992). Estos dos virus de declaración obligatoria en la Unión Europea, son exóticos en España, aunque endémicos en gran parte de Europa y América. Sin embargo, debido a la necesidad en España de la importación de huevos y alevines de otros países en los que estas graves infecciones son endémicas, nos encontramos en un permanente riesgo. En España se importan unos 500 millones de huevos de salmónidos al año (MAPA, 2001).

Entre los rhabdovirus, se encuentran también otros virus de menor impacto económico, más restringidos en cuanto a localización y especies a las que afectan, como son el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV), el hirame rhabdovirus (HIRRV) o el snakehead rhabdovirus (SHRV).

Otro de los virus más estudiados y con un impacto económico importante en acuicultura es el IPNV, un birnavirus capaz de afectar a un gran número de especies entre los cuales no sólo se encuentran salmónidos y peces marinos de alto valor

comercial como el rodaballo, sino también moluscos y crustáceos (Reno y cols, 1999; Rodríguez Saint-Jean y cols, 2003).

Junto con los rabdovirus y los birnavirus, desde hace unos años, los nodavirus se han convertido en uno de los problemas de mayor gravedad para el cultivo de especies marinas. Los nodavirus producen una enfermedad degenerativa que afecta sobre todo al cerebro y a la retina, afectando a más de 20 especies de aguas templadas. En lubina, especie de gran importancia para nuestro país, estos virus son capaces de provocar unas mortalidades masivas. La susceptibilidad de la dorada (*Sparus aurata*), otro cultivo de gran importancia en España, se ha demostrado de forma experimental, aunque por el momento no se han experimentado brotes naturales en esta especie (Aranguren y cols, 2002).

Otro virus, que afecta desde hace años a las especies cultivadas en España, y frente al que no se han ensayado por el momento estrategias de vacunación es el virus de la linfocistis de la dorada (González de Canales y cols, 1996).

Vacunas ADN frente a virus en la acuicultura

Se ha comprobado que frente a VHSV e IHNV, la vacunación con antígenos proteicos resulta poco eficaz (Lorenzen y Olesen, 1997; Winton, 1997). En nuestro país, en la actualidad, no se vacuna a peces frente a ninguna patología vírica. El mercado potencial en Europa de una vacuna para VHSV está estimado en 5 millones de euros al año (calculado para $7,2 \times 10^8$ dosis y 7 € por 1 000 dosis). Una repercusión similar tendría la posible vacuna contra IHNV (Rocha y Coll, 2000).

El desarrollo de las llamadas vacunas ADN surge a partir de la observación de que células de músculo esquelético inyectadas con vectores o plásmidos de expresión eucariota que codifican para proteínas, son capaces de expresarlos de manera eficiente y con una correcta conformación. En el caso de las vacunas, lo que se expresa es un gen que codifica para una/s determinada/s proteína/s de un patógeno (antígeno) (Leong y cols, 1997).

La inmunización genética con ADN recombinante ofrece muchas ventajas sobre los métodos convencionales de inmunización (vacunas de virus muerto, atenuado o recombinantes formadas por subunidades antigénicas de los virus). En teoría, estas vacunas son de las más seguras que existen ya que al utilizar únicamente el material genético de una proteína del virus, es imposible que se produzcan fenómenos de reversión. A pesar de no provocar efectos secundarios negativos, suelen conferir una protección eficaz. Además, son baratas de producir y tienen una gran estabilidad (Manoj y cols, 2004).

Mimetizan la infección viral mejor que otras vacunas, ya que la expresión de la proteína se da en el interior de las células inyectadas, lo que conlleva que esta proteína correctamente plegada y modificada post-traduccionalmente, se procese vía los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) de clase I y de clase II, lo que hace que se genere una respuesta inmune protectora que implica tanto la activación de células T cooperadoras como citotóxicas específicas. En este aspecto serían semejantes a las vacunas vivas atenuadas, pero sin sus problemas asociados de posible reversión.

Tabla 1. Resumen de los trabajos realizados en vacunas ADN frente a rhabdovirus de peces, en el que se especifica la especie utilizada, el antígeno y el promotor utilizado en el plásmido CMV(promotor de citomegalovirus) y BactCarpa (promotor del gen de la β -actina de carpa), la ruta de vacunación (i.m. intramuscular), el virus y la cantidad de virus utilizada en el desafío, y la protección conferida expresada como porcentaje de supervivientes o como expresión del antígeno (rtu en el caso de que se muestre la luminiscencia de genes marcadores).

Especie	Antígeno	Promotor	Ruta de vacunación	μ g plásmido /g pez	Virus para desafío	Protección conferida	Expresión del antígeno	Referencia
Trucha arcoiris	pG IHN	CMV	Inyección i.m.	10 μ g / g	IHN (10 ⁵ /mL)	85-87%	N.D.	Anderson y cols, 1996a
Trucha arcoiris	pG IHN	CMV	Inyección i.m.	1 μ g / g	IHN	N.D.	6000 rtu	Anderson y cols, 1996b
Trucha arcoiris Pez cebra	pG VHSV	BactCarpa	Inyección i.m.	1 μ g / g	VHSV (10 ⁶ /mL)	93%	N.D.	Heppell y cols, 1998
Trucha arcoiris	pG VHSV	CMV	Inyección i.m.	0,77-1 μ g / g	VHSV (10 ⁶ /mL)	94%	N.D.	Lorenzen y cols, 1998
Salmón	pG IHN	CMV	Inyección i.m.	25 μ g / pez	IHN (5,9x10 ³ /mL)	90-100%	N.D.	Traxler y cols, 1999
Trucha arcoiris	pG IHN	CMV	Inyección i.m.	0.1 μ g / g	IHN (10 ⁴ /mL)	90-100%	N.D.	Corbeil y cols, 1999
Trucha arcoiris	pG SVCV pG SHRV	CMV	Inyección i.m.	7,5 μ g / g	IHN (10 ³ /mL-10 ⁵ /mL)	95%	N.D.	Kim y cols, 2000
Trucha arcoiris	pG VHSV	CMV	Inmersión ultrasonidos	40 μ g / 6g / 4mL	VHSV 10 ⁶ /pez	50%	N.D.	Fernández-Alonso y cols, 2001
Trucha arcoiris	pG VHSV	CMV	Inyección i.m.	0,33 μ g / g	VHSV / IHN (4x10 ⁶ /mL)	96-99%	N.D.	Lorenzen y cols, 2002b
Trucha arcoiris	pG VHSV	CMV	Inyección i.m.	0.001-1 μ g / g	VHSV (10 ⁵ /mL)	43-98%	N.D.	McLaughlan y cols, 2003
Lenguado japonés	pG HIRRV	CMV	Inyección i.m.	0,5-5 μ g / g	HIRRV	71-91%	N.D.	Takano y cols, 2004

N.D.= no determinado.

Desde que se comenzó a introducir la posibilidad de la utilización de las vacunas ADN en acuicultura, la mayoría de los estudios realizados en vacunas ADN frente a virus en peces, se han realizado con rhabdovirus (Tabla 1), principalmente con los virus VHSV e IHNV (Anderson y cols, 1996a, b; Leong y cols, 1997; Boudinot y cols, 1998; Heppell y cols, 1998). Estas vacunas ADN frente a rhabdovirus se basan en los tradicionales plásmidos de *E. coli* diseñados para la expresión transitoria en células eucariotas y en todos los casos el gen del virus que se incluye es el de la glicoproteína viral pG, ya que las vacunas ADN que codifican para cualquiera de las otras proteínas de estos virus (N, NV, M, P) no protegen frente a una infección con virus virulento (Corbeil y cols, 1999).

También utilizando la glicoproteína viral, se han desarrollado vacunas ADN efectivas para otros rhabdovirus, tales como HIRRV (Takano y cols, 2004), SHRV o SVCV (Kim y cols, 2000).

En el caso del birnavirus IPNV, se ha estudiado la capacidad de 5 plásmidos distintos para vacunación ADN en los cuales se introducían partes o genes completos del segmento A de su genoma (Mikalsen y cols, 2004). De esta forma se determinó, que para conferir protección era necesario incluir la región codificante de la poliproteína completa. Un ensayo similar, se realizó en pez gato, en el que se identificaron las regiones del herpesvirus de pez gato (IHV-1) capaces de conferir resistencia en una vacuna ADN (Nusbaum y cols, 2002).

Existen casos en los que la vacunación ADN no ha sido capaz de conferir protección, como por ejemplo, frente a los nodavirus. Estudios recientes han demostrado que mientras la vacunación de rodaballo con la proteína recombinante de la cápside de un nodavirus de halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) protege significativamente frente al virus, una vacuna ADN en la que se incluye el gen que codifica para esa misma región no es capaz de conferir protección (Somerset y cols, 2005).

Respuesta inmune a la vacunación ADN en peces

Por el momento se desconocen los mecanismos mediante los cuales las vacunas ADN confieren la protección en peces, y mientras no se conozcan estos mecanismos, estas vacunas serán de difícil comercialización, ni podrán servir de base para el desarrollo de nuevas vacunas.

Gran parte de los estudios en los que se ha intentado profundizar en estos mecanismos de defensa responsables de la protección, han sido realizados en salmónidos con vacunas ADN frente a VHSV o IHNV. En estos casos, se ha visto, que estas vacunas, a muy corto plazo (1 semana), confieren una protección no sólo frente al patógeno frente al cual se vacunó, sino frente a otros virus heterólogos, incluso frente a virus de distinta familia como son los nodavirus (Somerset y cols, 2003), aunque no frente a bacterias (Lorenzen y cols, 2002b). El único caso en el que no se obtiene una protección cruzada entre virus, es cuando se vacuna a los peces con la pG del virus de la rabia, ya que a pesar de ser un rhabdovirus, esta construcción no es capaz de proteger frente a VHSV ni frente a IHNV (LaPatra y cols, 2001). Esta protección a tiempos cortos post-vacunación sólo puede estar mediada por el sistema inmune innato, ya que se sabe que los peces no desarrollan una respuesta de anticuerpos hasta al menos 2 semanas después de la inmunización (Chiller y cols, 1969). Por lo tanto, parece evidente que algún mecanismo de defensa innato media la

protección conferida a corto plazo, y que este mecanismo sólo es efectivo frente a virus, y no frente a bacterias. Por ello, se ha postulado la mediación del interferón (IFN) de tipo I en esta protección. Sin embargo, como hasta hace muy poco no se habían descrito genes de IFN en peces, los estudios realizados hasta el momento se han centrado en estudiar la posible expresión de la proteína Mx inducida por IFN de tipo I. Así, se ha demostrado que esta proteína se induce en peces inmunizados con vacunas ADN frente a VHSV o IHNV a los 7 días de inmunización (Boudinot y cols, 1998; Lorenzen y cols, 2002a). También se ha demostrado la expresión de otro gen inducido por IFN de tipo I en respuesta a una vacuna ADN frente a IHNV, como es el gen vig-8 (Purcell y cols, 2004). En este mismo trabajo, también se demuestra la inducción a tiempos cortos post-vacunación de la expresión de distintas citoquinas como la interleuquina 1 β (IL1 β) o el factor de crecimiento transformante β (TGF β). Utilizando la vacuna frente al rhabdovirus HIRRV en lenguado japonés, también se ha demostrado que estas vacunas inducen en los peces la expresión de MHC de clase I y II, así como de TCR (*T-cell receptor*) alpha, beta o delta (Takano y cols, 2004).

Posteriormente, a partir de un mes postvacunación, la protección conferida por estas vacunas, ya está restringida para el virus frente al cual se vacunó, revelando la intervención de mecanismos de defensa específicos tanto humorales como celulares (Traxler y cols, 1999; Kanellos y cols, 1999a). El momento en el que se pasa de una protección inespecífica frente a cualquier virus a una protección específica frente al virus frente al cual se vacunó depende en gran medida del tamaño de los peces y de la dosis de vacuna (McLauchlan y cols, 2003). Sin embargo, a pesar de que, como es de esperar, esta vacunación induce la producción de anticuerpos, la protección conferida a largo plazo no siempre se correlaciona con el título de anticuerpos neutralizantes. Estudios de inmunización pasiva donde los peces recibían suero de peces vacunados, demostraron que los anticuerpos sí tienen un papel importante en la protección, ya que estos sueros eran capaces de proteger a los peces tratados de un desafío con el virus homólogo (Boudinot y cols, 1998). Sin embargo, McLauchlan y cols (2003), determinaron que los anticuerpos neutralizantes inducidos por una vacunación se detectaban únicamente hasta los 6 meses postvacunación, y sin embargo, los peces estaban protegidos frente al virus hasta los 9 meses postvacunación. Es posible que anticuerpos no detectados con la técnica de seroneutralización, utilizada en estos estudios, estén mediando esta resistencia a largo plazo. También puede que esta protección esté mediada por una memoria inmunológica celular. Se ha demostrado que tras la vacunación ADN, los linfocitos proliferan de forma específica frente al antígeno frente al cual se vacunó (Kanellos y cols, 1999a), sin embargo, muchos aspectos de la inmunidad celular específica se desconocen aún en peces, por lo que no se ha evaluado su papel en la protección conferida.

Factores que podrían mejorar las vacunas ADN

Utilización de adyuvantes

Una de las posibilidades para aumentar la inmunogenicidad de una vacuna, y por lo tanto aumentar la protección que esta confiere, es la administración conjunta de ésta con un adyuvante. Los adyuvantes actúan fundamentalmente favoreciendo la presentación de los antígenos al sistema inmune, mediante el secuestro de los antígenos vacunales y la posterior liberación de manera lenta y prolongada, así como produciendo una ligera inflamación que activa la atracción de las células presentadoras. Si con ello se consigue aumentar la capacidad y duración de la

protección que confiere una vacuna, la dosis de vacuna a emplear podría disminuir lo que conllevaría una reducción de costes.

Además de la posible utilización de adyuvantes tradicionales, en el caso de vacunas ADN, existe la posibilidad de utilizar otro tipo de adyuvantes moleculares que se encuentren incluidos en el propio plásmido vacunal. Por ejemplo, Sato y cols (1996) demostraron que la respuesta frente a una vacunación ADN aumenta de forma significativa cuando se incluían ciertas secuencias de ADN denominadas CpGs. Estas secuencias cortas de ADN repetitivo no-metilado (por ejemplo AACGTT) se encuentran generalmente en los plásmidos de las bacterias. Estos fragmentos de ADN se engloban dentro el grupo de "señales de alarma" que existen en los distintos tipos de patógenos, y que el organismo es capaz de detectar mediante la activación de receptores de tipo Toll (Medzhitov, 2001). Una vez activados estos receptores, se induce la correspondiente respuesta inmune, principalmente la secreción de citoquinas del tipo Th1 (Krieg y cols, 1998). En peces, se ha comprobado que estas secuencias son capaces de activar la producción de interferón por parte de leucocitos de salmónidos (Jørgensen y cols, 2001a,b), la producción de IL1 de macrófagos (Jørgensen y cols, 2001b) y la proliferación linfocitaria (Carrington y cols, 2004) de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y la actividad de células inespecíficas citotóxicas en el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Oumouna y cols, 2002). También se ha comprobado que por sí solos los CpGs son capaces de conferir cierta protección como la demostrada en salmón atlántico (*Salmo salar*) frente a IPNV (Jørgensen y cols, 2003) o amebas (Bridle y cols, 2003), así como frente a *Edwardsiella tarda* en lenguado japonés (Lee y cols, 2003a).

Sin embargo, por el momento, su capacidad como adyuvantes en vacunas ADN para peces no ha sido estudiada en profundidad. Es posible que la presencia de algunas secuencias CpGs en los plásmidos vacunales utilizados en peces (existen secuencias CpGs en el gen de resistencia a la ampicilina presente en muchos de estos plásmidos) estén colaborando a la efectividad de estas vacunas, aunque no se han realizado estudios para probar esto, y sin embargo, se sabe que el plásmido vacunal sin la glicoproteína G de rhabdovirus no confiere protección (Lorenzen y cols, 2002b). El único trabajo en el que se estudia la capacidad de los CpGs como adyuvantes en peces, es el publicado por Kanellos y cols (1999b) en el que demostraron que una de las secuencias CpG estimuladoras en mamíferos (AACGTT) era capaz de aumentar la respuesta a una vacuna ADN en peces, mientras que otra de estas secuencias inmunoestimulantes para mamíferos no lo era para peces (GACGTT).

Otra de las posibilidades que se explora en el campo de la vacunación ADN en vertebrados superiores y que apenas se ha ensayado en peces, es la utilización de citoquinas como adyuvantes. La citoquina recombinante se podría administrar en paralelo a la vacunación o se podría incluir su gen bajo el control de un promotor eucariota en un plásmido, que podría ser independiente o el mismo plásmido vacunal. La utilización de determinadas citoquinas como adyuvantes permitiría aumentar la respuesta inmune en el momento de encuentro con el antígeno, y por lo tanto mejoraría la protección.

En vertebrados superiores el mayor número de estudios en este campo se ha realizado con citoquinas cuya función es la estimulación de la proliferación de linfocitos como la IL2 (Cui y cols, 2004; Henke y cols, 2004; Li y cols, 2004), IL12 (Cui y cols, 2004; Chattergoon y cols, 2004; Lee y cols, 2003b), IL15 (Oh y cols, 2001), o la IL21 (Cui y cols, 2004). En estos casos, lo que se pretende es aumentar la proliferación de los linfocitos ante el encuentro de la vacuna, lo cual conllevaría una mayor respuesta y un mayor número de linfocitos de memoria preparados para

proliferar ante un segundo encuentro. Otro de los grupos de citoquinas más utilizados como adyuvantes son las quimioquinas (citoquinas con actividad quimiotáctica) como RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), MCP-1, IL8, y MIP 1-beta (Pinto y cols, 2003). Entre los efectos beneficiosos de las quimioquinas como adyuvantes destaca el hecho de que atraen células presentadoras de antígeno al punto en el que se ha inoculado la vacuna, y por lo tanto aumenta la respuesta linfocitaria. También se ha ensayado la capacidad de otras citoquinas de actuar como adyuvantes como el IFN de tipo II (Xue y cols, 2004) o el Factor Activador de Granulocitos-Macrófagos (GM-CSF) (Kanellos y cols, 1999b).

Desde hace unos años, y favorecido en gran medida por la secuenciación del genoma completo de los peces Fugu (*Fugu rubripes*) y del pez cebra (*Danio rerio*), se vienen identificando un gran número de genes de citoquinas en distintas especies de peces teleosteos (Secombes y cols, 2001a, b; Laing y Secombes, 2004). Esto nos abre la posibilidad de ensayar la utilización de alguna de estas citoquinas homólogas como adyuvantes en estas vacunas ADN, algo que de momento sólo se ha ensayado utilizando el GM-CSF de ratón en un modelo de salmónidos con un incremento de la capacidad proliferativa y de la respuesta de anticuerpos entre un 10 a un 30% (Kanellos y cols, 1999b).

Búsqueda de promotores adecuados para regular la expresión del antígeno en peces

Un aspecto muy importante y a tener en cuenta en el diseño de las vacunas ADN para peces, por razones de seguridad y eficacia, es la elección de las secuencias reguladoras que van a controlar la expresión del antígeno vacunal. En la mayoría de las vacunas ADN ensayadas hasta el momento, es habitual que la expresión de los genes de interés esté regulada por el Promotor Inmediato Temprano de Citomegalovirus (CMVIEP) (Tabla 1). Con este sistema y por inyección intramuscular, los niveles de protección alcanzados con las vacunas ADN, por ejemplo frente a rabdovirus, son muy elevados y en el caso de INHV, el 85-98% de los animales vacunados sobreviven a una contraprueba con virus virulento.

CMVIEP es el promotor encargado de transcribir los genes inmediato-tempranos (IE, *Immediate Early*) del citomegalovirus utilizando tanto la ARN polimerasa como factores de transcripción de la célula huésped. Cuando se utiliza para la expresión de transgenes, se comporta como un promotor muy fuerte y es capaz de dirigir la transcripción de la mayoría de los genes ensayados en un amplio rango de células eucariotas (Ramesh y cols, 1995; Artuc y cols, 1995; Doll y cols, 1996; Heppell y cols, 1998), incluidas las de peces.

En general, los vectores de expresión de células eucariotas que contienen el CMVIEP, junto con la secuencia del promotor propiamente dicha, llevan secuencias denominadas *enhancer* que contienen sitios de unión para diferentes factores de transcripción y que están situadas "aguas arriba" de la secuencia del promotor. En los plásmidos comerciales basados en CMVIEP se ha comprobado que la longitud de estas secuencias *enhancer* varía de unos a otros (Rocha y cols, 2004a). En este sentido, Rocha y cols han demostrado que en la línea celular de origen piscícola EPC (*Epithelioma Papulosum Cyprini*) (Fijan y cols, 1983) la expresión del gen marcador β -galactosidasa era sensiblemente mayor cuando se utilizaban plásmidos que contenían secuencias *enhancer* de mayor longitud (Rocha y cols, 2004a). Además de las secuencias *enhancer*, para entender mejor el funcionamiento de este *enhancer* / promotor y poder optimizarlo para células epiteliales de peces, se está estudiado la totalidad de las secuencias presentes en el citomegalovirus humano AD169 y la

actividad de sus secuencias repetidas están siendo objeto de múltiples trabajos (García y cols, 1994; Keller y cols, 2003; Lashmit y cols, 2004; Lee y cols, 2004; Rubinsky y Ruvkun, 2003; Sawicki y cols, 1998).

Sin embargo, y a pesar de lo eficiente del sistema, como CMVIEP es un promotor que regula la transcripción de un virus de células eucariotas, incluidas las humanas, estas vacunas de peces no pueden ser autorizadas ni comercializadas por los evidentes motivos de seguridad (Alonso y cols, 2003). Por lo tanto, se hace necesaria la sustitución de los promotores de CMVIEP en las vacunas ADN para peces por otros preferentemente de origen piscícola. A pesar de ello y teniendo en cuenta los fabulosos resultados obtenidos, los estudios sobre el promotor de CMVIEP en relación con peces deben de continuar buscando como objetivo final el diseño de un promotor sintético optimizado para células de pez que pudiera en su día utilizarse en vacunas ADN en peces. En todo caso, la mejora de la eficiencia de este promotor se podría utilizar como trabajo modelo para posteriormente optimizar los promotores de peces.

Varios promotores de genes de salmónidos se han utilizado para controlar la expresión de genes en peces aunque sin resultados demasiado alentadores. Entre ellos, los promotores de la histona H3 de trucha arco iris, metalotionina A, también de trucha de arco iris y la protamina (Mayer y cols, 2003). Sin embargo, recientemente se ha demostrado la efectividad de los promotores inducibles de los genes Mx1 y de la proteína inducible por interferón 1A (IRF-1A) de trucha arco iris en una vacuna frente a IHNV (Alonso y cols, 2003). Además, los promotores de la β -actina de diferentes especies de peces se han mostrado especialmente eficientes en el control de transgenes en peces (Hwang y cols, 2003) y se proponen como una alternativa seria y viable al promotor de CMVIEP.

Utilización de transposones

Otro de los problemas que afectan a la posible aplicación de las vacunas ADN a la acuicultura es la limitada duración de la inmunidad específica inducida por ellas. Una posible solución sería que las vacunas ADN no sólo transfectaran los tejidos adecuados sino que los transformaran permanentemente. La producción del antígeno y por lo tanto la duración de la inmunidad serían así constantes. La presencia endógena de transposasas en peces (por ejemplo las denominadas secuencias SmaI en salmón) (Kido y cols, 1991), podría aprovecharse para que el ADN de las vacunas se incorporará permanentemente a los tejidos inmunizados (Coll, 2001).

Para insertar ADN en el genoma del pez mediante transposasas endógenas, se requiere flanquearlo por sitios *tir* (*terminal inverted repeats* de unas 200 pb) que fueran reconocibles por las transposasas endógenas. Todo ello localizado en plásmidos adecuados (pTn). Mediante la incorporación de promotores específicos de tejido e inducibles, la producción del antígeno podría controlarse espacial y temporalmente (Rocha y cols, 2003; Ryding y cols, 2001), para una mayor seguridad.

Por amplificación de las *tir* y mutagénesis dirigida se ha reconstruido un transposón (*tir*-SB-*tir*) del salmón activo en células humanas (Ivics y cols, 1997), el "Bella Durmiente" o *Sleeping Beauty*, SB. Ello ha dado lugar a que se disponga desde hace unos años de varios plásmidos pTn que son reconocidos en diversas especies de peces: células de carpa EPC (resultados no publicados), medaka (*Oryzias latipes*) (Grabher y cols, 2003), pez cebrá (Davidson y cols, 2003) y salmónidos (Izsvak y

cols, 2000). En condiciones controladas puede haber una sola inserción pero pueden ocurrir más de 1 000 por genoma (Ívics y cols, 1997; Izsvak y cols, 1997).

Aunque todavía existen algunos problemas con este sistema, es indudable que ofrece un método de introducción del ADN de gran eficiencia que podría ser aprovechado para aumentar la duración de la inmunización en la vacunación ADN en peces.

Rutas de administración de la vacuna en masa

La ruta idónea para la administración de una vacuna en peces sería por baño o inmersión, sin embargo, hasta ahora, la ruta de administración de las vacunas ADN que ha resultado mas efectiva en peces es la intramuscular, lo que conlleva que la administración de la vacuna sea una tarea demasiado laboriosa, costosa e inviable en la práctica, sobre todo con peces de pequeño tamaño y escaso valor comercial.

Entre las rutas de administración alternativas que se están estudiando están la vacunación en masa por vía oral o por baño inmersión, aunque hasta el momento no se han alcanzado con estos métodos niveles de protección tan altos como los obtenidos tras la inyección intramuscular. La utilización de ultrasonidos de baja frecuencia (Fernández-Alonso y cols, 2001) y el choque hiperosmótico (Huisling y cols, 2003) parecen mejorar el resultado de la vacunación por baño-inmersión. Sin embargo, mientras que con las vacunas ADN inyectadas intramuscularmente pez a pez se obtiene un 90-100% de protección, por inmersión y ultrasonidos se obtiene un 50% (Fernández-Alonso y cols, 2001). También se ha probado el bombardeo de partículas de oro cubiertas de ADN vacunal (Tucker y cols, 2000), comprobándose que por este método se consigue una expresión del antígeno durante 60 días.

Recientemente, se ha estudiado la expresión en distintos órganos de un plásmido con el gen de la luciferasa administrado el plásmido tanto directamente, como unido a liposomas o a quitosán, a través de distintas rutas (intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, inmersión o anal) (Romoren y cols, 2004). A pesar de que la expresión de la luciferasa mejora con la utilización de liposomas, estos no son capaces de conseguir que la administración por inmersión ni la anal, den lugar a unos niveles detectables de luciferasa.

Uso de proteínas mutantes para aumentar la seguridad

Una de las posibilidades para reducir el riesgo de estas vacunas y permitir su uso en acuicultura, podría ser el uso de proteínas antigénicas mutantes, que debido a su atenuación, aumentarían así la seguridad.

De acuerdo con secuencias de la glicoproteína pG de VHSV obtenidas por otros grupos, por mutagénesis dirigida, se han obtenido 16 mutantes de la pG de VHSV atenuados en fusión, con mutaciones puntuales localizadas en la región de fusión previamente identificada (Estepa y cols, 2001; Nuñez y cols, 1998). Estas proteínas mutantes tienen alterada su conformación y cuatro de ellas todavía conservan su capacidad de fusión aunque alterada en lo que se refiere al porcentaje de fusión y su pH óptimo (Rocha y cols, 2004b). Dos de estos mutantes afectados en fusión, que son mutantes dobles, serían posibles candidatos para uso en vacunas ADN.

Sin embargo debido a las alteraciones en conformación de todos los mutantes y a la cercanía de los sitios de fusión y neutralización, habría que verificar que la pérdida de conformación no ha repercutido en su inmunogenicidad.

El pez cebra como posible modelo para vacunas ADN

El pez cebra (es un modelo genético puente entre los modelos animales más estudiados, *Drosophila* (mosca) / *Caenorhabditis* (gusano) y ratón / hombre. Lo que se aprenda de su utilización se podrá aplicar a otros peces e incluso podría tener sus repercusiones en humanos.

Hasta ahora, la investigación básica se ha desarrollado sobre todo en genética enfocada a su desarrollo embrionario. El pez cebra, junto con el pez Fugu, es uno de los peces que se encuentran más cercanos a la completa secuenciación de su genoma (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio) y ya son comerciales algunas librerías de cDNA y genómicas, así como *microarrays* con miles de genes para su investigación (Genotek, Madrid).

Actualmente, se estudian diferentes órganos y sus mutantes para detectar similitudes entre el pez cebra y el hombre. De su estudio dependen quizá posibles soluciones a numerosas enfermedades genéticas y ya existe un banco de datos a este respecto (<http://www.nih.gov/science/models/zebrafish/reports/genomic-genetic.html>). Es por todo ello que la utilización del pez cebra como modelo de enfermedades de peces ofrecería numerosas ventajas, además de la facilidad de manejo frente a otras especies que aunque de interés comercial son muy caras de estudiar experimentalmente.

Se ha demostrado que el pez cebra es susceptible al birnavirus IPNV (Seeley y cols, 1977) y a los rhabdovirus SVCV (Sanders y cols, 2003), IHNV (LaPatra y cols, 2000) y SHRV (Phelan y cols, 2005). Basados en resultados obtenidos por nosotros en estudios preliminares, por primera vez se ha demostrado la susceptibilidad del pez cebra a VHSV a bajas temperaturas (12-14°C) (trabajo no publicado).

Por todo ello, se podría trasladar parte de la investigación de virus de peces a este modelo, y así aprovechar todos los reactivos y secuencias disponibles en esta especie (sondas, secuencia del genoma, chips ADN, etc.). Esto nos permitiría, de una forma más rápida profundizar en aspectos desconocidos de la vacunación ADN en peces, como por ejemplo, en la respuesta inmune inducida y los mecanismos mediante los cuales se confiere la protección.

Conclusiones

A pesar de que para la mayoría de sistemas las vacunas ADN confieren una protección efectiva hasta 9 meses postvacunación, éstas no podrán estar disponibles para su uso rutinario en acuicultura, mientras no se conozcan los mecanismos inmunológicos mediante los cuales se obtiene la protección y no se resuelvan los problemas relacionados con su seguridad, producción a gran escala y rentabilidad económica.

Para que las vacunas ADN por inyección contra rhabdovirus sean eficaces con los vectores actuales, se necesitan 1-10 µg de plásmido por trucha inyectada o 0,1 µg para inmunizar alevines de trucha (Tabla 1). Estas cantidades no son económicamente viables, por lo que habría que aumentar unas 100-1 000 veces su actividad específica.

El estudio de métodos de vacunación en masa, la mejora de promotores y/o el uso de adyuvantes podría hacer que se aumentaran sus posibilidades prácticas y su actividad específica. Además, el empleo de promotores de pez, así como el uso de antígenos atenuados poco susceptibles a revertir el genotipo salvaje (mutantes múltiples atenuados), podrían aportar mejoras en su seguridad.

Bibliografía

1. Alonso, M., M. Johnson, B. Simon y J.A. Leong (2003). A fish specific expression vector containing the interferon regulatory factor 1A (IRF1A) promoter for genetic immunization of fish. *Vaccine*, 21(15):1591-1600
2. Anderson, E.D., D.V. Mourich y J.C. Leong (1996b). Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 5:105-113
3. Anderson, E.D., D.V. Mourich, S.C. Fahrenkrug, S. LaPatra, J. Shepherd y J.A. Leong (1996a). Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 5(2):114-122
4. Aranguren, R., C. Tafalla, B. Novoa y A. Figueras (2002). Experimental transmission of encephalopathy and retinopathy induced by nodavirus to sea bream (*Sparus aurata* L.) using different infection models. *J. Fish Dis.*, 25(6):317-324
5. Artuc, M., W. Nurnberg, B.M. Czarnetzki y D. Schadendorf (1995). Characterization of gene regulatory elements for selective gene expression in human melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 213(2):699-705
6. Boudinot, P., M. Blanco, P. de Kinkelin y A. Benmansour (1998). Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology*, 249:297-306
7. Bridle, A.R., R. Butler y B.F. Nowak (2003). Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides increase resistance against amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 26(6):367-371
8. Carrington, A.C., B. Collet, J.W. Holland y C.J. Secombes (2004). CpG oligodeoxynucleotides stimulate immune cell proliferation but not specific antibody production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 101(3-4):211-222
9. Chattergoon, M.A., V. Saulino, J.P. Shames, J. Stein, L.J. Montaner y D.B. Weiner (2004). Co-immunization with plasmid IL-12 generates a strong T-cell memory response in mice. *Vaccine*, 22(13-14):1744-1750
10. Chiller, J.M., H.O. Hodkins y R.S. Weiser (1969). Antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). II. Studies on the kinetics of development of antibody producing cells and on complement and natural hemolysis. *J. Immunol.*, 102:1202-1207
11. Coll, J.M. (1999). Prevalencia de las rhabdovirus en la Acuicultura Europea. *Revista AquaTIC* 6. Disponible en URL: <http://aquatic.unizar.es/n2/art602/rabdoUE.htm>
12. Coll, J.M. (2001). El transposón SB de salmónidos como vector para transferencia de genes en vertebrados. *Investigaciones Agrarias*, 16:237-244
13. Corbeil, S., S.E. LaPatra, E.D. Anderson, J. Jones, B. Vincent, Y.L. Hsu y G. Kurath (1999). Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines. *Dis. Aquat. Organ.*, 39(1):29-36
14. Cui, F.D., H. Asada, M.L. Jin, T. Kishida, M. Shin-Ya, T. Nakaya, M. Kita, M. Ishii, M. Iwai, T. Okanoue, J. Imanishi y O. Mazda (2004). Cytokine genetic adjuvant facilitates prophylactic intravascular DNA vaccine against acute and latent herpes simplex virus infection in mice. *Gene Ther.* En prensa
15. Davidson, A.E., D. Balciunas, D. Mohn, J. Shaffer, S. Hermanson, S. Sivasubbu, M.P. Cliff, P.B. Hackett y C. Ekker (2003). Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the sleeping beauty transposon. *Devel. Biol.*, 263:191-202
16. DOCE, Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1990). *Decision del Consejo 90/84/CEE de 26 de febrero de 1990, por la que se aprueba un programa comunitario específico de investigación y desarrollo tecnológico en el ámbito de la competitividad de la agricultura y de la gestión de los recursos agrarios (1989-1993)*. L58 de 7 marzo 1990
17. DOCE, Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1991). *Directiva 91/67 del Consejo de 28 de enero de 1991, relativa a las condiciones de policía sanitaria aplicables a la puesta en el mercado de animales y de productos de la acuicultura*. L46, 19 febrero 1991
18. Doll, R.F., J.E. Crandall, C.A. Dyer, J.M. Aucoin y F.I. Smith (1996). Comparison of promoter strengths on gene delivery into mammalian brain cells using AAV vectors. *Gene Ther.* 3(5):437-447
19. Einer-Jensen, K., P. Ahrens, R. Forsberg y N. Lorenzen (2004). Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicemia virus. *J. Gen. Virol.*, 85:1167-1179
20. Estepa, A., A. Rocha, L. Pérez, J.A. Encinar, E. Nuñez, A. Fernández, J.M. González Ros, F. Gavilanes, y J.M. Coll (2001). A protein fragment from the salmonid VHS rhabdovirus induces cell-to-cell fusion and membrane

- phosphatidylserine translocation at low pH. *J. Biol. Chem.*, 276:46268-46275
21. FAO (1977). *Control of the spread of major communicable fish diseases*. FAO Fisheries Reports, No. 192
 22. Fernández-Alonso, M., A. Rocha, y J.M. Coll (2001). DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine*, 19:3067-3075
 23. Fijan, N., D. Sulimanovic, M. Bearzotti, D. Mizinic, L.O. Zwillenberg, S. Chilmonczyk, J.F. Vautherot y P. de Kinkelin (1983). Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Ann. Virol.* 134:207-220
 24. García, B.D., R. Martínez, O. Hernández, R. Leonart, y J. De la Fuente (1994). Differences in transient expression directed by heterologous promoter and enhancer sequences in fish cells and embryos. *J. Mar. Biotechnol.*, 1:203-205
 25. González de Canales, M.L., J.A. Muñoz-Cueto, J. Arellano, A. García-García y C. Sarasquete (1996). Histological and histochemical characteristics of the lymphocystis disease in gilthead seabream, *Sparus aurata* L. from the South Atlantic coast of Spain. *Eur. J. Histochem.*, 40:143-152
 26. Grabher, C., T. Henrich, T. Sasado, A. Arenz, J. Wittbrodt y M. Furutani-Seiki (2003). Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. *Gene*, 322:57-66
 27. Gudding, R., A. Lillehaug y O. Evensen (1999). Recent developments in fish vaccinology. *Vet Immunol Immunopathol.*, 72(1-2):203-212
 28. Henke, A., C.S. Chaing, R. Zell y A. Stelzner (2004). Co-expression of interleukin-2 to increase the efficacy of DNA vaccine-mediated protection in coxsackievirus B3-infected mice. *Antiviral Res.*, 64(2):131-6
 29. Heppell, J., N. Lorenzen, N.K. Armstrong, T. Wu, E. Lorenzen, K. Einer-Jensen, J. Schorr y H.L. Davis (1998). Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. *Fish & Shellfish Immunol.*, 8(4):271-286
 30. Huisling, M.O., T. Guichelaar, C. Hoek, B.M.L. Verburg-van Kemenade, G. Flik, H.F.J. Savelkoul, y J.H.W.M. Rombout (2003). Increased efficacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. *Vaccine*, 21:4178-4193
 31. Hwang, G.L., M. Azizur Rahman, S. Abdul Razak, F. Sohm, H. Farahmand, A. Smith, C. Brooks y N. Maclean (2003). Isolation and characterisation of tilapia beta-actin promoter and comparison of its activity with carp beta-actin promoter. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1625(1):11-18
 32. ICES (1988). *Codes of Practice and Manual of Procedures for Consideration of Introductions and Transfers of Marine and Freshwater Organisms*. ICES Cooperative Research Reports nº 159
 33. Ivics, Z., Z. Izsvak y P.B. Hackett (1997). Molecular reconstruction of sleeping beauty, a Tc1-like transposon system from fish and its transposition in human cells. *Cell*, 91:501-510
 34. Izsvak, Z., Z. Ivics y P.B. Hackett (1997). Repetitive elements and their genetic applications in zebrafish. *Biochem. Cell Biol.*, 75:507-523
 35. Izsvak, Z., Z. Ivics y R.H. Plasterk (2000). Sleeping beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J. Mol. Biol.*, 302:93-102
 36. Jørgensen, J.B., A. Johansen, B. Stenersen y A.-I. Sommer (2001a). CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Dev. Comp. Immunol.*, 25:313-321
 37. Jørgensen, J.B., J. Zou, A. Johansen, y C.J. Secombes (2001b). Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1beta and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism. *Fish Shellfish Immunol.*, 11:673-682
 38. Jørgensen, J.B., L.H. Johansen, K. Steiro y A. Johansen (2003). CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Virol.*, 77(21):11471-11479
 39. Kanellos, T., I.D. Sylvester, A.G. Ambali, C.R. Howard y P.H. Russell (1999a). The safety and longevity of DNA vaccines for fish. *Immunology*, 96(2):307-313
 40. Kanellos, T.S., I.D. Sylvester, V.L. Butler, A.G. Ambali, C.D. Partidos, A.S. Hamblin y P.H. Russell (1999b). Mammalian granulocyte-macrophage colony stimulating factor and some CpG motifs have an effect on the immunogenicity of DNA and subunit vaccines in fish. *Immunology*, 96:507-510
 41. Keller, M.J., D.G. Wheeler, E. Cooper y J.L. Meier (2003). Role of the human cytomegalovirus major immediate early promoter's 19-base-pair-repeat cyclic AMP response element in acutely infected cells. *J. Virol.*, 77:6666-6675
 42. Kido, Y., M. Aono, T. Yamaki, K. Matsumoto, S. Murata, M. Saneyosi y N. Okada (1991). Shaping and reshaping of salmonid genomes by amplification of tRNA derived retrotransposons during evolution. *Proceed. Nat. Acad. Sci. USA*, 88:2326-2330

43. Kim, C.H., M.C. Johnson, J.D. Drennan, B.E. Simon, E. Thomann, y J.-A.C. Leong (2000). DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish. *J. Virol.*, 74:7048-7054
44. Krieg. A.M., A.-K. Yi, J. Schorr y H.L. Davis (1998). The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol.*, 6:23-27
45. Laing, K.J. y C.J. Secombes (2004). Trout CC chemokines: comparison of their sequences and expression patterns. *Mol. Immunol.*, 41(8):793-808
46. LaPatra, S.E., L. Barone, G.R. Jones y L.I. Zon (2000). Effects on infectious hematopoietic necrosis virus and infectious necrosis virus infection on hematopoietic precursors of the zebrafish. *Blood Cell Mol. Dis.*, 26:445-452
47. LaPatra, S.E., S. Corbeil, G.R. Jones, W.D. Shewmaker, N. Lorenzen, E.D. Anderson, y G. Kurath (2001). Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination. *Vaccine*, 19:4011-4019
48. Lashmit, P.E., C.A. Lundquist, J.L. Meier y M.F. Stinski (2004). Cellular repressor inhibits human cytomegalovirus transcription from the UL127 promoter. *J. Virol.*, 78:5113-5123
49. Lee, C.H., H.D. Jeong, J.K. Chung, H.H. Lee y K.H. Kim (2003a). CpG motif in synthetic ODN primes respiratory burst of olive flounder *Paralichthys olivaceus* phagocytes and enhances protection against *Edwardsiella tarda*. *Dis. Aquat. Organ.*, 56(1):43-48
50. Lee, S., M. Gierynska, S.K. Eo, N. Kuklin y B.T. Rouse (2003b). Influence of DNA encoding cytokines on systemic and mucosal immunity following genetic vaccination against herpes simplex virus. *Microbes Infect.*, 5(7):571-578
51. Lee, Y., W.J. Sohn, D.S. Kim y H.J. Kwon (2004). NF- κ B- and c-Jun-dependent regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene enhancer/promoter in response to lipopolysaccharide and bacterial CpG-oligodeoxynucleotides in macrophage cell line RAW 264.7. *Eur. J. Biochem.*, 271:1094-1105
52. Leong, J.C., E. Anderson, L.M. Bootland, P.W. Chiou, M. Johnson, C. Kim, D. Mourich y G. Trobridge (1997). Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Dev. Biol. Stand.*, 90:267-277
53. Li J., X. Liang, Y. Huang, S. Meng, R. Xie, R. Deng y L. Yu (2004). Enhancement of the immunogenicity of DNA vaccine against infectious bursal disease virus by co-delivery with plasmid encoding chicken interleukin 2. *Virology*, 329(1):89-100
54. Lorenzen, N. y N.J. Olesen (1997). Immunization with viral antigens: viral haemorrhagic septicaemia. *Dev. Biol. Stand.*, 90:201-209
55. Lorenzen, N., E. Lorenzen, K. Einer-Jensen y S.E. LaPatra (2002a). DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunol.*, 12(5):439-453
56. Lorenzen, N., E. Lorenzen, K. Einer-Jensen y S.E. LaPatra (2002b). Immunity induced shortly after DNA vaccination of rainbow trout against rhabdoviruses protects against heterologous virus but not against bacterial pathogens. *Devel. Comp. Immunol.*, 26(2):173-179
57. Lorenzen, N., E. Lorenzen, K. Einer-jensen, J. Heppell, T. Wu y H. Davis (1998). Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 8:261-270
58. Lu, Y., P.C. Loh y E.C.B. Nadala (1994). Serological studies of the rhabdovirus of penaeid shrimp (RPS) and its relationship to three other fish rhabdoviruses. *J. Fish Dis.*, 17:303-309
59. Manoj, S., L.A. Babiuk y S. Van Drunen Littelvan den Hurk (2004). Approaches to enhance the efficacy of DNA vaccines. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 41(1): 1-39.
60. MAPA (2001). Libro Blanco de la Acuicultura en España, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 521 pp.
61. Mayer, G.D., A. Leach, P. Kling, P.E. Olsson y C. Hogstrand (2003). Activation of the rainbow trout metallothionein-A promoter by silver and zinc. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 134(1):181-188
62. McLauchlan, P.E., B. Collet, E. Ingerslev, C.J. Secombes, N. Lorenzen y A.E. Ellis (2003). DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection-early protection correlates with Mx expression. *Fish Shellfish Immunol.*, 15(1):39-50
63. Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 1:135-145
64. Meyers, T.R., J. Sullivan, E. Emmenegger, J. Follet, S. Short, W.N. Batts y J.R. Winton (1992). Identification of viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from pacific cod, *Gadus macrocephalus* in prince William Sound, Alaska, USA. *Dis. Aquat. Organ.*, 12:167-175
65. Mikalsen, A.B., J. Torgersen, P. Alestrom, A.L. Helleman, E.O. Koppang y E. Rimstad (2004). Protection of atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Dis. Aquat. Organ.*, 60(1):11-20

66. Nuñez, E., A.M. Fernandez, A. Estepa, J.M. Gonzalez-Ros, F. Gavilanes, y J.M. Coll (1998). Phospholipid interactions of a peptide from the fusion-related domain of the glycoprotein of VHSV, a fish rhabdovirus. *Virology*, 243:322-330
67. Nusbaum, K.E., B.F. Smith, P. DeInnocentes y R.C. Bird (2002). Protective immunity induced by DNA vaccination of channel catfish with early and late transcripts of the channel catfish herpesvirus (IHV-1). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 84(3-4):151-168
68. Oh, S., J.A. Berzofsky, D.S. Burke, T.A. Waldmann y L.P. Perera (2003). Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:3392-3397
69. OIE, Oficina Internacional de Epizootias (2005). Aquatic Animal Health Code (8th ed)
70. Oumouna, M., L. Jaso-Friedmann, y D. L. Evans (2002). Activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) with synthetic oligodeoxynucleotides and bacterial genomic DNA: binding, specificity and identification of unique immunostimulatory motifs. *Devel. Comp. Immunol.*, 26:257-269
71. Phelan, P.E., M.E. Pressley, P.E. Witten, M.T. Mellon, S. Blake y C.H. Kim (2005) Characterization of snakehead rhabdovirus infection in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Virol.*, 79(3):1842-1852
72. Pinto, A.R., A. Reyes-Sandoval, y H.C. Ertl (2003). Chemokines and TRANCE as genetic adjuvants for a DNA vaccine to rabies virus. *Cell Immunol.*, 224(2):106-113
73. Purcell, M.K., G. Kurath, K.A. Garver, R.P. Herwig y J.R. Winton (2004). Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 17(5):447-462
74. Ramesh, N., Y.K. Shin, S. Lau y W.R. Osborne (1995). High-level expression from a cytomegalovirus promoter in macrophage cells. *Hum. Gene Ther.*, 6(10):1323-1327
75. Reno, P.W. (1999). Infectious pancreatic necrosis virus and associated aquatic birnaviruses. En: *Fish Diseases and Disorders*. Vol. 3: Viral, bacterial and fungal infections. P.T. Woo y D.W. Bruno. CAB Publishing. Wallingford. 1-55
76. Rocha, A. y J.M. Coll (2000). Investigación actual en vacunas para la Acuicultura. *Revista AquaTIC* 11. Disponible en URL: <http://aquatic.unizar.es/n3/art1106/vacunas.htm>
77. Rocha, A., S. Ruiz, A. Estepa y J.M. Coll (2003). Fish as biofactories: inducible genetic systems and gene targeting. *Spanish J. Agr. Res.*, 1:3-11
78. Rocha, A., S. Ruiz, C. Tafalla y J.M. Coll (2004b). Conformation and fusion defective mutants in the hypothetical phospholipid-binding and fusion peptides of the protein G of viral haemorrhagic septicemia salmonid rhabdovirus. *J. Virol.*, 78:9115-9122
79. Rocha, A., S. Ruiz, y J.M. Coll (2004a). Improvement of transfection efficiency of epithelioma papulosum cyprini carp cells by modification of their cell cycle and using an optimal promoter. *Mar. Biotechnol.* En prensa
80. Rodríguez Saint-Jean, S., J.J. Borrego y S.I. Pérez-Prieto (2003). Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. *Adv. Virus Res.*, 62:113-165
81. Romoren K, B.J. Thu y O. Evensen (2004). Expression of luciferase in selected organs following delivery of naked and formulated DNA to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by different routes of administration. *Fish Shellfish Immunol.*, 16(2):251-264
82. Rubinsky, I. y G. Ruvkun (2003). Functional test of enhancer conservation between distantly related species. *Devel. Biol.*, 130:5133-5142
83. Ryding, A.D.S., M.G.F. Sharp y J.J. Mullins (2001). Conditional transgenic technologies. *J. Endocrinol.*, 171:1-14
84. Sanders, G.E., W.N. Batts y J.R. Winton (2003). Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus. *Comp. Med.*, 53:514-521
85. Sato Y, M. Roman, H. Tighe, D. Lee, M. Corr, M.D. Nguyen, G.J. Silverman, M. Lotz, D.A. Carson y E. Raz (1996). Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*, 273(5273):352-354
86. Sawicki, J.A., R.J. Morris, B. Monks, K. Sakai y J.I. Miyazaki (1998). A composite CMV-IE enhancer/ β -actin promoter is ubiquitously expressed in mouse cutaneous epithelium. *Exp. Cell Res.*, 244:367-369
87. Schlotfeldt, H.J., W. Ahne, P.E. Vestergard-Jorgensen y W. Glende, (1991) Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*). A natural outbreak. *Bull. EAAP*, 11:105-107
88. Secombes, C.J., S. Bird, S. Hong, K.J. Laing y J. Zou (2001b) Phylogeny of vertebrate cytokines. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 484:89-94
89. Secombes, C.J., T. Wang, S. Hong, S. Peddie, M. Crampe, K.J. Laing, C. Cunningham y J. Zou (2001a). Cytokines and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 25(8-9):713-723
90. Seeley, R.J., A. Perlmutter y V.A. Seeley (1977). Inheritance and longevity of infectious pancreatic necrosis virus in zebra

- fish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Appl. Env. Microbiol.*, 34:50-55
91. Sommerset, I., E. Lorenzen, N. Lorenzen, H. Bleie, y A.H. Nerland (2003). A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine*, 21(32):4661-4667
92. Sommerset, I., R. Skern, E. Biering, H. Bleie, I.U. Fiksdal, S. Grove, y A.H. Nerland (2005). Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 18(1):13-29
93. Takano, T., A. Iwahori, I. Hirono, y T. Aoki (2004). Development of a DNA vaccine against hiramé rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, 17(4):367-374
94. Traxler, G.S., E. Anderson, S.E. LaPatra, J. Richard, B. Shewmaker y G. Kurath, (1999). Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV. *Dis. Aquat. Organ.*, 38:183-190
95. Tucker, C., M. Endo, I. Hirono y T. Aoki. (2000). Assessment of DNA vaccine potential for juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, through the introduction of reporter genes by particle bombardment and histopathology. *Vaccine*, 19(7-8): 801-809
96. Winton, J.R. (1997). Immunization with viral antigens: infectious haematopoietic necrosis. *Dev. Biol. Stand.*, 90:211-220
97. Xue, Q., Y.G. Zhao, Y.J. Zhou, H.J. Qiu, Y.F. Wang, D. L., Wu, Z. J. Tain y G.Z. Tong (2004). Immune responses of swine following DNA immunization with plasmids encoding porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 5 and 7, and porcine IL-2 and IFN gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 102(3):291-298