



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN UN  
ESQUEMA DE VACUNACIÓN ORAL CONTRA CIRCOVIRUS  
PORCINO TIPO 2 (PCV -2) USANDO UN MODELO  
EXPERIMENTAL MURINO

**CAROLA DEL PILAR BERNALES URRUTIA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA:

DR. SERGIO BUCAREY VIVANCO

SANTIAGO – CHILE

2013



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



## EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN UN ESQUEMA DE VACUNACIÓN ORAL CONTRA CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV -2) USANDO UN MODELO EXPERIMENTAL MURINO

**CAROLA DEL PILAR BERNALES URRUTIA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. SERGIO BUCAREY	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DR. ANDRÓNICO NEIRA	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DR. CLAUDIO ZUÑIGA	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2013

MEMORIA DE TITULO

**“EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN UN ESQUEMA DE VACUNACIÓN ORAL CONTRA CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2 (PCV-2) USANDO UN MODELO EXPERIMENTAL MURINO”.**

**“EVALUATION OF THE ANTIBODIES INDUCTION AFTER ORAL VACCINATION AGAINST PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV-2) BY USING AN EXPERIMENTAL MURINE MODEL”.**

**Carola Bernales Urrutia\***

\*Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Esta tesis contó con financiamiento del Proyecto Fondecyt de Iniciación en Investigación Número 1111013 y el Proyecto de Iniciación en Investigación de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile, Cod. VID I 07/15-2.

## RESUMEN

Las enfermedades asociadas a circovirus porcino tipo 2 (PCV2) son consideradas el problema económico más grande de la industria porcina mundial. Además de mejorar la gestión y las prácticas de manejo (mejor higiene, menor hacinamiento y mejor ventilación), la disponibilidad de vacunas anti-PCV2 representa la opción inmunológica más eficaz para paliar el impacto de estas enfermedades. La proteína de la cápside de PCV2 (*Cap*) es un importante antígeno para el desarrollo de vacunas. Actualmente, la mayoría de las vacunas comerciales anti-PCV2 se producen como formulaciones inyectables de este antígeno. Aunque eficaces, estas vacunas tienen ciertas desventajas, incluyendo estrés animal e inmunosupresión concomitante, además de la implicancia de procedimientos laboriosos asociados y consumidores de tiempo. En este estudio, una cepa recombinante de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue utilizada como vector y vehículo para entregar el antígeno de la cápside viral proveniente de un aislado nacional de PCV2. Este procedimiento se realizó con el fin de obtener datos dirigidos a estudiar el desarrollo de una vacuna oral contra el virus. De esta forma, el potencial inmunogénico de este sistema fue probado en ratones BALB/c, después de la administración de la levadura recombinante vía oral, bajo dos formulaciones distintas, como cepa viva y como extracto sonicado. Para esto, el gen *cap* químicamente sintetizado con la preferencia codogénica optimizada de la levadura (*opt-cap*) fue replicado en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* a través del vector, pYES2. La expresión de la proteína *Cap* en la levadura fue confirmada a través de Western Blot con suero anti PCV2. Posteriormente, resultados de experimentación *in vivo* confirmaron que la administración oral en ratones de extractos sonicados de la levadura recombinante, estimulan la inducción de anticuerpos séricos y fecales específicos contra el antígeno *Cap* más eficientemente que la cepa viva. Estos resultados demostraron que es factible utilizar la levadura *S. cerevisiae* como un sistema seguro y simple de producir antígenos virales de PCV2, y de esta manera, su entrega vía oral podría ser una estratégica alternativa para inducir eficientemente anticuerpos anti-PCV2. Los resultados obtenidos en esta memoria en un modelo murino, están dirigidos a realizar investigación adicional en cerdos, el hospedero natural de PCV2.

**Palabras claves:** PCV2, *Saccharomyces cerevisiae*, proteína de la cápside, administración oral, vacunas comestibles, levadura.

## ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated diseases are considered to be the biggest problem for the worldwide swine industry. The PCV2 capsid protein (*Cap*) is an important antigen for development of vaccines. At present, most anti-PCV2 vaccines are produced as injectable formulations. Although effective, these vaccines have certain drawbacks, including stress with concomitant immunosuppression, and involve laborious and time-consuming procedures. In this study, *Saccharomyces cerevisiae* was used as a vehicle to deliver PCV2 antigen in a preliminary attempt to develop an oral vaccine, and its immunogenic potential in BALB/c mice was tested after oral gavage-mediated delivery using two different vaccine formulations, as a raw extract and live cells. The *cap* gene with a yeast-optimized codon usage sequence (*opt-cap*) was chemically synthesized and cloned into *Escherichia coli*/*Saccharomyces cerevisiae* shuttle vector, pYES2. Intracellular expression of the *Cap* protein was confirmed by Western blot analysis. Feeding raw yeast extract containing *Cap* protein to mice elicited both serum and fecal-specific antibodies against the antigen more efficiently than live yeast cells. These results show that it is feasible to use *S. cerevisiae* as a safe and simple system to produce PCV2 antigens, and that oral yeast-mediated antigen delivery is an alternative strategy to efficiently induce anti-PCV2 antibodies in a mouse model, which is worthy of further investigation in swine.

**Key word:** PCV2, *Saccharomyces cerevisiae*, capsid protein, oral delivery, edible vaccine, yeast.

## INTRODUCCIÓN

Los Circovirus porcinos tipo 1 y tipo 2 (PCV1 y PCV2) son virus no envueltos, esféricos de simetría icosaédrica y estructuralmente muy pequeños (cerca de 17nm) (40). El genoma de PCVs está compuesto por DNA circular de hebra simple de aproximadamente 1700 nucleótidos, (39), en el cual se han caracterizado dos marcos de lectura abiertos (ORFs, del inglés *Open Reading Frames*), ORF1 y ORF2 (20). ORF1 el cual codifica para la enzima replicasa (Rep) es esencial para la replicación del DNA viral (28), ORF2 el cual codifica para la proteína de la cápside viral (*Cap*), juega un papel fundamental, regulatorio y estructural, en el proceso de ensamblaje de la partícula viral (29,30).

Junto con una serie de virus aviares con características moleculares similares, los circovirus porcinos se clasifican en el género *Circovirus* dentro de familia *Circoviridae* (5). Aunque PCV1 persiste permanentemente en la población de cerdos, la presencia de PCV1 no se ha asociado con signos clínicos o lesiones reconocidas. En contraste, PCV2 se ha implicado como el agente causal principal del Síndrome de Desmedro Multisistémico Postdestete o Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) (1,9), una enfermedad que se caracteriza por causar debilitamiento y efectos inmunosupresivos severos específicamente en el hospedero porcino. La evidencia científica más reciente, sugiere que los trastornos del sistema inmune inducidos por PCV2 se producen principalmente por el silenciamiento específico generado sobre un tipo específico de células inmunes reguladoras, llamadas células dendríticas mieloides. Consecuentemente, el animal afectado es incapaz de responder frente a señales de peligro asociadas a patógenos. Por lo tanto, la infección por PCV2 genera la pérdida de la conexión entre el sistema inmune innato y adquirido, haciendo al hospedero susceptible a las infecciones microbianas secundarias o concomitantes (44).

Por otra parte, PCV2 también se asocia a muchas otras enfermedades tales como Complejo Respiratorio Porcino, la Neumonía Proliferativa Necrotizante, problemas reproductivos en cerdas gestantes, Síndrome de Dermatitis y Nefropatía Porcina, Tremor Congénito, Traqueítis Necrotizante y Epidermitis Exudativa (21,47). Éstas enfermedades se conocen como PCVAD o enfermedades asociadas a circovirus porcino, nombre que la Asociación Americana de Veterinarios de Porcinos (AASV) recomendó para agrupar a todas las enfermedades atribuidas al circovirus porcino tipo2, incluido el PMWS (36).

Las enfermedades asociadas a PCV2 se consideran actualmente el problema económico más grande de la industria mundial de cerdos (36). En octubre de 2006 se confirmó en Chile el primer caso de PMWS en un plantel de la VIII Región. Posteriormente surgió un

segundo caso en un plantel de la Región Metropolitana. Notoriamente, se observó un incremento paulatino de la mortalidad de cerdos, desde un valor normal de 0,44% en el año 2003, a un 4,1% en el año 2006 (en crianza). En engorda se registró una mortalidad de 1,73% el 2004 y de 4,3% el 2006 ([www.sag.cl](http://www.sag.cl)). En Chile las enfermedades asociadas a circovirus porcino han sido reconocidas por el SAG desde el año 2007([www.sag.cl](http://www.sag.cl)).

Además de mejorar la gestión y las prácticas de manejo (mejor higiene, menor hacinamiento y mejor ventilación), la disponibilidad de vacunas anti-PCV2 representa una opción inmunológica eficaz para paliar el impacto de estas enfermedades (2). En la actualidad, dos vacunas contra PCV2 han sido introducidas en nuestro país desde el mercado internacional. Estas vacunas son no replicativas (subunitarias) y ambas contienen la proteína de la cápside PCV2 como el principal antígeno inmunogénico. En todos los casos, los informes de los ensayos de campo sugieren que las vacunas disponibles comercialmente contribuyen significativamente a disminuir las tasas de mortalidad y mejorar el crecimiento de cerdos afectados por PMWS en las granjas (13,23), reduciendo así el impacto económico que las PCVAD tienen en la producción porcina mundial.

La proteína de la cápside (*Cap*) ha sido identificada como la principal proteína inmunogénica del virus, la cual es la principal portadora de epítomos específicos (29). Recientemente, se han investigado múltiples estrategias de sistemas de expresión *in vitro* con el fin de producir vacunas subunitarias de la proteína *Cap* de PCV2 como inmunógeno principal. Éstos han incluido sistemas que utilizan vectores bacterianos (*Escherichia coli*) y vectores virales atenuados (baculovirus, virus de la pseudorrabia) (14, 27). Si bien cada sistema tiene ventajas y características únicas, cada uno tiene también limitaciones que impiden un mayor desarrollo de la expresión de la proteína recombinante como vacuna subunitaria efectiva. En el caso de la expresión bacteriana, ésta es simple y ofrece rendimientos de producción altos, sin embargo la eficacia de la respuesta inmune es dependiente del correcto plegamiento y modificaciones post traduccionales de los antígenos, los cuales, cuando son expresados en bacterias, presentan algunas variables que se encuentran determinadas por la naturaleza del antígeno. En contraste, el sistema de expresión de baculovirus / células de insecto, es muy eficaz para la expresión heteróloga de múltiples proteínas virales estructurales, favoreciendo el auto-ensamblaje de partículas virales vacías o VLPs (del inglés, *Virus Like Particles*) (45,49). En la actualidad, en el mercado mundial se encuentran dos vacunas anti PCV2 formuladas en base a VLPs producidas en el sistema baculovirus / células de insecto, las cuales han mostrado

resultados exitosos, sin embargo, estas vacunas demandan un considerable tiempo de administración y son relativamente costosas.

*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), es un microorganismo no invasivo y no patógeno, es generalmente considerado como una especie segura GRAS (del inglés, *Generally Regarded As Safe*) y por esta razón, es una atractiva herramienta para entregar antígenos y moléculas terapéuticas (8,19). *S. cerevisiae*, utilizado como vehículo y sistema de expresión de antígenos vacunales, es capaz de inducir respuesta inmune local y sistémica a través de su administración en sitios asociados a mucosas, incluyendo las vías oral, respiratoria y genital (3,37). En mamíferos, en particular, se ha demostrado que *S. cerevisiae* tiene mayor seguridad y eficacia, y su administración en mucosas ha mostrado inducir tanto respuesta inmune innata como adaptativa, debido a la presencia de ligandos TLR (del inglés, *Toll Like Receptors*) en su pared celular (32). Además, los sistemas de expresión basados en levaduras proporcionan un mecanismo alternativo y económico para la expresión de proteínas virales estructurales. Por otra parte, como eucarionte, la levadura tiene muchas ventajas, ya que, las proteínas exógenas producidas por estos microorganismos pueden ser procesadas con un correcto plegamiento y modificaciones post traduccionales químicas propias. Actualmente, existen varios informes que confirman que la levadura puede sustentar el auto-ensamblaje de proteínas virales estructurales y formar VLPs (15,42). Esta capacidad mejora el reconocimiento, por parte del sistema inmune del hospedero, de los antígenos expresados por microorganismos, de esta forma pueden ser reconocidos como antígenos nativos mejorando la calidad de la respuesta inmune inducida (3,15, 42,48). Por otra parte, los cultivos de levaduras son fáciles de mantener, lo que los hace más rápidos y menos costosos de utilizar que otros sistemas de expresión eucariotas, tales como cultivos de células de insecto o de mamíferos.

Hasta la fecha, todas las vacunas contra el PCV2 en el mercado han sido producidas como fórmulas inyectables. Aunque las vacunas inyectables son eficientes, hay problemas asociados con el uso de este tipo de productos, incluidos el tiempo y los procedimientos laboriosos, la inducción de la respuesta inflamatoria en el sitio de inyección, y el estrés derivado del manejo animal (22,46). Por otra parte, las vacunas orales suministradas en el alimento representan una mejora tecnológica en el suministro de antígeno, superando los problemas relacionados con el manejo de la inyección y facilitando el reforzamiento del antígeno cuando la inmunidad de los animales está por debajo del umbral protectorio (12, 25, 32).



En varios sistemas de administración por vía oral se han intentado utilizar tanto bacterias mutantes atenuadas (4), micropartículas basadas en biopolímeros (26), liposomas (43), plantas recombinantes (24), y levaduras (15). En esta memoria, una cepa recombinante de levadura que expresa una versión sintética del gen de la proteína de la cápside de PCV2 y su posible aplicación como vacuna oral contra PCV2 se presentan y discuten. En concreto, el concepto "vacuna comestible" se investigó estudiando la seguridad de microorganismos y materiales microbiológicos mínimamente purificados en la entrega de vacunas mediante sonda oral.

Estudios anteriores realizados en el laboratorio Biovetec de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, demostraron que las levaduras sustentan la formación de VLPs de PCV2, con características conformacionales y antigénicas similares a las partículas producidas por células de insectos y que la proteína *Cap* expresada bajo este sistema es reconocida por un anticuerpo comercial específico contra PCV2 y el suero de cerdos afectados con PMWS (7). De forma paralela, se ha demostrado que las VLPs derivadas de levadura recombinantes son inmunogénicas en ratones, y que la administración oral de extractos crudos de levadura induce importantes respuestas de anticuerpos anti PCV2 en suero y heces (7).

Así, se ha considerado que es factible utilizar *S. cerevisiae* como un sistema simple y seguro para producir partículas similares al virus PCV2, las cuales al ser administradas por vía oral, como extracto crudo, inducen anticuerpos específicos anti PCV2 en un modelo murino. Estos resultados apoyaron un estudio adicional, abordado en esta tesis, para dilucidar que componentes del sistema de expresión de antígenos de PCV2 en levaduras, son claves para una eficiente inducción de anticuerpos anti PCV2 en el modelo murino, con miras de optimizar el sistema y recolectar datos destinados a escalar y proyectar este sistema hacia pruebas clínicas en cerdos, el hospedero natural de PCV2.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar experimentalmente en un modelo murino, la generación de anticuerpos en suero y heces frente a una inmunización oral, con una cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) que expresa una versión optimizada del gen ORF2 de PCV2, bajo dos formulaciones distintas, a modo de extracto crudo y a modo de cepa viva.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Inmunizar oralmente ratones BALB/c con extractos sonicados crudos de *Saccharomyces cerevisiae* /pYES2:: opt – cap y evaluar la presencia de IgG e IgA anti – PCV2 desde suero y heces de animales muestreados en distintos períodos de tiempo post – inmunización.
2. Inmunizar oralmente ratones BALB/c con la cepa viva *Saccharomyces cerevisiae* /pYES2:: opt – cap y evaluar la presencia de IgG e IgA anti – PCV2, desde suero y heces de los animales muestreados en distintos períodos de tiempo post – inmunización.

## **MATERIALES Y MÉTODOS (ver Anexo)**

### ***Transformación Saccharomyces cerevisiae***

Los plasmidios pYES2 y pYES2::*opt-cap*, los cuales corresponden al vector de expresión vacío y al vector que expresa el gen optimizado de la cápside viral de PCV2, respectivamente, fueron usados para transformar la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (genotipo: MATa his3 $\Delta$ 1leu2 trp1 – 289 ura3 – 52/MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 trp1-289 ura3 – fenotipo: His – Leu – Trp – Ura - ) usando el método LIAC/SS carrier DNA/PEG, dando origen a las cepas *S.cerevisiae*/pYES2 y *S.cerevisiae*/pYES2::*opt - cap* (7).

### ***Obtención inóculo oral***

Las levaduras transformadas fueron cultivadas en un medio selectivo (6,7 g de Yeast Nitrogen Base (YNB), 20 g de glucosa, 10 mg de Triptófano, 20 g de Bactoagar en 1000 ml de agua destilada) por 48 horas a 30 °C. Las células recombinantes se recolectaron y trasladaron a 10 ml de medio YNB y fueron cultivadas con agitación vigorosa durante la noche a 30 °C hasta una densidad óptica, DO<sub>600</sub>, de 0.6 – 0.7. Posteriormente, para inducir la síntesis proteica, las células fueron recolectadas y lavadas 2 veces con PBS estéril para posteriormente ser reinoculadas en 50 ml de medio de inducción (0.2 g de Galactosa, 10 mg de Triptófano en 50 ml de Bactoagar) para ser posteriormente cultivadas con agitación a 30 °C por 24 horas hasta una DO<sub>600</sub> de 0.1 – 0.3. Las células se recolectaron por centrifugación a 2000 x g por 5 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de agua estéril para posteriormente ser transferidas a tubos estériles de microcentrifugación. Las células fueron posteriormente resuspendidas en 1 ml de buffer (Tris – HCl 50 mM, glicerol 10%, EDTA 10 mM).

A continuación las células fueron lisadas mediante 3 ciclos de congelación y deshielo, y sonicadas por 5 ciclos de 60 segundos con intervalos de 20 segundos.

Los extractos celulares fueron clarificados por centrifugación a 9000 x g por 5 minutos a 4 °C y analizados por SDS – PAGE y Western Blot usando un suero policlonal porcino anti – PCV2, con el fin de determinar, la presencia de la proteína de la cápside en los extractos. Los extractos crudos sin clarificar y levaduras sin lisar fueron utilizados para los experimentos de inmunización oral, como extracto crudo y cepa viva respectivamente.

### **Análisis Western Blot**

Los extractos clarificados de la levadura recombinante fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%. A continuación, se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa, mediante transferencia húmeda durante 120 minutos a 350 mA. Una vez finalizada la transferencia, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de la membrana con una solución PBT de bloqueo (PBS, Triton 0,05% y leche descremada al 5%) durante toda la noche a 4 °C. Luego, se incubó a 4 °C durante la noche con una dilución 1:100 en PBT de bloqueo de un suero policlonal porcino anti-PCV2 (proveniente de un cerdo afectado por PMWS). Posteriormente, se lavó 3 veces con PBT durante 5 minutos y se incubó con anticuerpo anti-IgG de cerdo acoplado a peroxidasa de rábano (cadena H+L específico, KPL) en una dilución 1:1000 en solución de bloqueo. Se lavó 3 veces durante 5 minutos con PBT. A continuación, se disolvieron 6 mg de 4 – cloro – naftol (Pierce) en 10 ml de metanol (TCL), se tomaron 5 ml de esta solución y se le agregó 45 ml de PBS y 1ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, se incubó la membrana con esta solución por 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez aparecida la coloración, la membrana se lavó con agua destilada y se dejó secar sobre un papel filtro.

### **Modelo de experimentación animal**

Ratones BALB/c de seis a ocho semanas de edad, fueron mantenidos en el bioterio del Centro Biotecnológico Veterinario (BIOVETEC) del Departamento de Ciencias Biológicas Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, con acceso *ad libitum* a alimentos y agua, en un ambiente con temperatura y luz controladas. Los animales se alojaron en jaulas de policarbonato especialmente diseñadas para tal efecto, las cuales fueron provistas de tapas de acero inoxidable con comederos y bebederos. Se supervisó que las jaulas proporcionaran espacio y ventilación adecuadas para cada animal. El cuidado de los ratones (alimentación, hidratación y aseo) fue supervisado como parte formativa de esta memoria de tesis.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos experimentales (A, B, C, D), los grupos A y B, fueron inmunizados oralmente con extractos crudos de levadura y levaduras vivas, respectivamente. Éstos se dividieron en dos subgrupos de tres ratones cada uno, subgrupo A1, A2, B1 y B2.

El subgrupo A1 fue inmunizado con extractos (100 mg) provenientes de la cepa *S. cerevisiae* /pYES2:: opt – cap y el subgrupo A2 fue inmunizado con extractos (100 mg) provenientes de la cepa *S. cerevisiae* /pYES2.

El subgrupo B1 fue inmunizado con células vivas ( $8 \times 10^7$  UFC) de la cepa *S. cerevisiae* /pYES2:: opt – cap, y el subgrupo B2 fue inmunizado con el mismo número de células vivas de la cepa *S. cerevisiae* /pYES2.

El tercer grupo experimental (C) fue inmunizado subcutáneamente para confirmar la inmunogenicidad provocada por los extractos de la cepa de levadura. *S. cerevisiae* /pYES2:: opt – cap. Finalmente un cuarto grupo (D) no inmunizado (inoculado con PBS), fue considerado como control negativo.

Grupos Experimentales	Tratamiento		Número Ratones	Denominación
<b>A</b>	Inmunizados oralmente con extractos de levadura sonicada (100 mg)	Subgrupo A1 <i>S. cerevisiae</i> /pYES2: opt – cap	3	ExtractoSC/pYE S::cap
		Subgrupo A2 <i>S. cerevisiae</i> /pYES2	3	Extracto control SC/pYES
<b>B</b>	Inmunizados oralmente con levaduras vivas ( $8 \times 10^7$ UFC)	Subgrupo B1 <i>S. cerevisiae</i> /pYES2: opt – cap	3	Cepa viva SC/pYES::cap
		Subgrupo B2 <i>S. cerevisiae</i> /pYES2	3	Cepa viva control SC/pYES
<b>C</b>	Grupo control (+) Inmunizados subcutáneamente con extractos de levadura sonicados+ adyuvante de Freud (100 µl)	<i>S. cerevisiae</i> /pYES2: opt – cap	3	Control (+) subcutáneo
<b>D</b>	Grupo control (-) sin inmunizar	PBS	3	Control (-) sin inmunizar

### **Procedimiento de inmunización oral**

En el procedimiento de vacunación oral, los ratones fueron sedados en un recipiente con 200 µl de isoflurano embebido en un algodón por 5 minutos, posteriormente fue introducida una sonda de alimentación oral a través de la cual se administró el inóculo (0.5 ml) (**Fig. 1**).



**Fig. 1. Procedimiento de inmunización oral.**

Este procedimiento se llevó a cabo 5 veces con intervalos de 15 días. Se siguieron las recomendaciones descritas por Olfert *et al.*, 1993 (31) para medicación por sonda gástrica, teniendo en consideración inmovilizar al animal en forma correcta e introducir la sonda hacia la izquierda en forma lenta y suave a lo largo de la rama mandibular derecha, de modo que el ratón comience a tragar y la sonda se inserte dentro del esófago de forma natural (31).

La inmunización subcutánea de los ratones con los antígenos derivados de la levadura, se realizó con una dosis (100 µg de proteína) de cada extracto emulsionado con adyuvante incompleto de Freud's (Sigma). Dos semanas después se realizó una segunda inoculación con la misma cantidad de antígeno emulsionado con adyuvante incompleto de Freud's (Sigma). Todas las inmunizaciones subcutáneas se realizaron bajo medidas de biocontención y bioseguridad nivel I. Finalmente, los ensayos de respuesta de anticuerpos IgG e IgAs anti-PCV2 se llevaron a cabo para evaluar la inmunogenicidad de los antígenos derivados de la levadura bajo los protocolos detallados a continuación. Toda la experimentación en modelo murino se realizó con un número total de 18 animales, lo que concuerda con el principio de reducción recomendado para experimentación animal (35)

### **Medición de la respuesta de anticuerpos en ratones inmunizados**

Las muestras de sangre y heces se recolectaron antes de la primera inmunización y a los días 15, 30, 45, 60 y 75 después de la primera administración, para detectar en suero y heces, a través de ELISA indirecto, anticuerpos específicos IgG anti PCV2. Las muestras de sangre, fueron extraídas desde la vena caudal y las muestras fecales fueron obtenidas directamente desde el recipiente utilizado para la sedación.

La sangre recolectada fue mantenida a 4 °C durante la noche y posteriormente centrifugada a 3200 x g por 20 minutos a 4 °C. Los sueros obtenidos fueron recogidos y almacenados a 20 °C hasta su uso.

Para el análisis de IgA, 100 mg de las muestras fecales fueron suspendidas en 1 ml de PBS, agitadas enérgicamente y luego sedimentadas por 10 minutos a 1500 x g utilizando los sobrenadantes para el análisis anti IgA.

El nivel de anticuerpos específicos IgG e IgA en las muestras de suero y heces, respectivamente, fue determinado usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) estandarizado para PCV2 por Bucarey *et al.*, 2009. Para esto, 40 µg de la proteína *Cap-6xHis*, purificada por cromatografía de afinidad a níquel, la cual se utiliza como sustrato, fue suspendida en 1ml de buffer (14.2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 34.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3.1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 9.6) y añadida en volúmenes de 50 µl por pocillo en microplacas de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc), las cuales se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Luego se incubaron con 100 µl de una dilución 1:10 en PBST de suero o sobrenadantes de muestras fecales, la reacción se incubó a 37 °C por 1 hora para posteriormente ser lavada 4 veces con PBST. A continuación se adicionaron 100 µl de una dilución 1:10.000 en PBST de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (cadena H+L específico, KPL), para suero o anti-IgA de ratón conjugado a HRP (cadena αespecífico, KPL), para las muestras fecales. Esta reacción se incubó por 1 hora a 37 °C. Posteriormente las placas fueron lavadas 3 veces con PBST. Finalmente, la detección se obtuvo añadiendo 100 µl de sustrato colorimétrico TMB (Pierce, Rockford, IL). Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente la reacción fue detenida con 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, y posteriormente se midió la DO a 450 nm usando un lector de microplacas (Bio-Rad, Modelo 680).

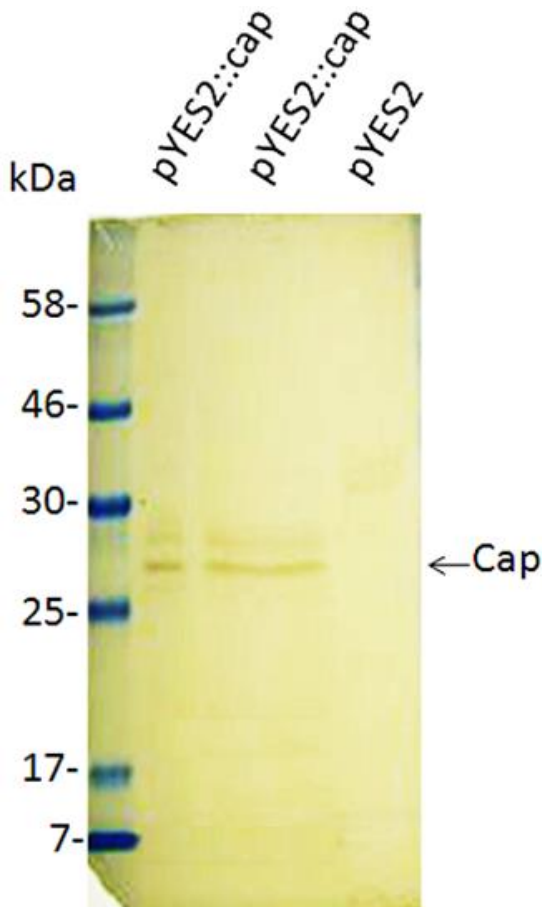
### **Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de datos fue realizado mediante ANOVA de medidas repetidas usando la prueba de Tukey *a posteriori*. El análisis de datos y gráficas fueron efectuados con el software GraphPad Prism 5.

## RESULTADOS

### ***Detección de la proteína Cap producidas por levaduras recombinante***

Para detectar la proteína *Cap* expresada en la cepa *S. cerevisiae/pYES2::opt-cap* (recombinante) las células fueron inducidas por incubación durante 24 horas con galactosa y luego lisadas a través de disrupción ultrasónica. Los extractos celulares clarificados fueron liofilizados y separados en un gel SDS-PAGE 12%, transferidos a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue incubada con suero de cerdo afectado con PMWS y posteriormente fue detectado con un anticuerpo secundario anti-IgG de cerdo conjugado a HRP y revelado con sustrato cromogénico como fue descrito en Materiales y Métodos. Tras la detección, una banda de aproximadamente 28 kDa fue visible sólo en la cepa recombinante, no así en la cepa control (**Fig.2**). Según los datos moleculares de la proteína *Cap* de PCV2 (20), el tamaño de estas bandas fue consistente con el de la proteína *Cap* de circovirus, por lo que se concluyó que la inducción de la síntesis del antígeno de PCV2 en levaduras fue exitosa.



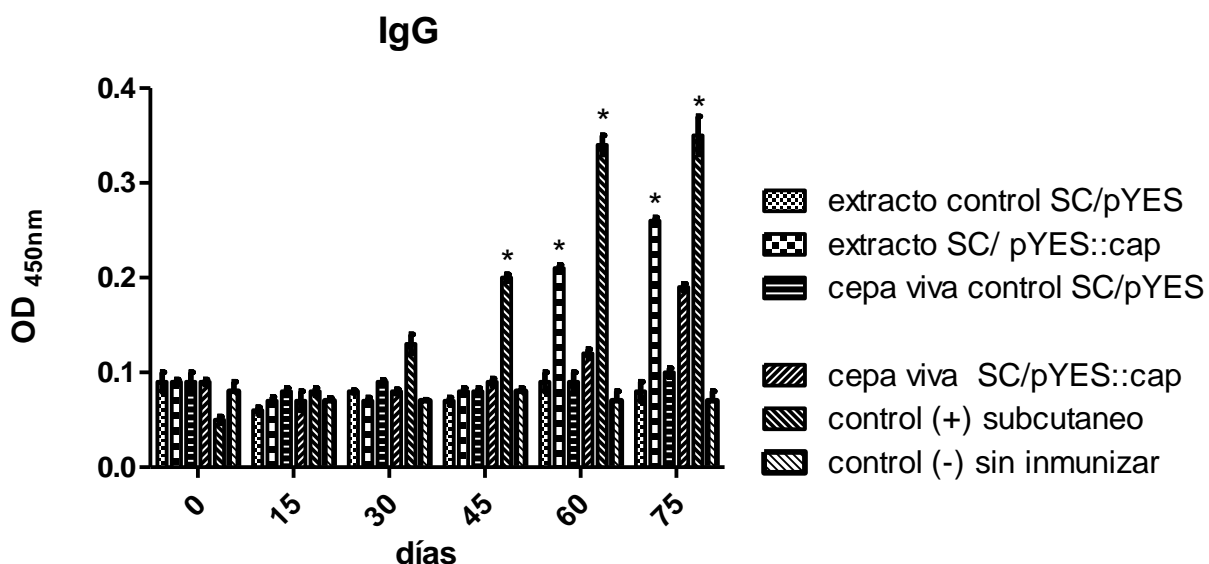
**Fig. 2.** Análisis Western Blot de extractos de levadura provenientes de la cepa que transformada con el plasmidio pYES2::cap y con el vector vacío pYES2. La flecha indica una banda aproximadamente 28 kDa que corresponde al tamaño esperado de la proteína *Cap* de PCV2.



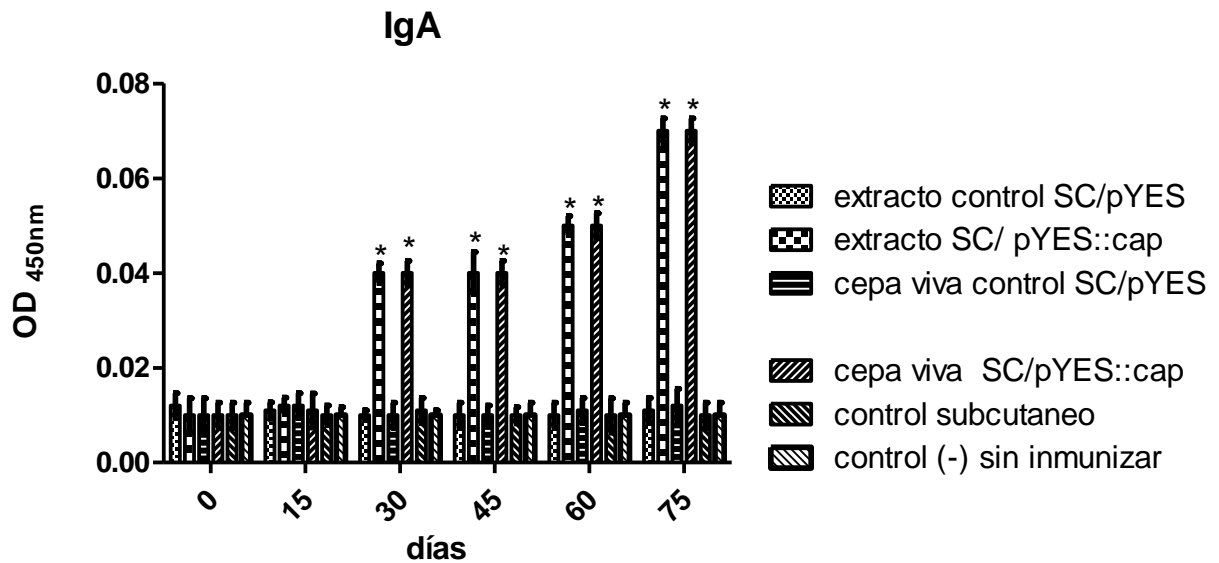
## Inducción de inmunogenicidad en ratones tras administración oral de *S.cerevisiae* recombinante

Posteriormente, se examinó si los antígenos derivados de *S.cerevisiae*/pYES2::*opt - cap* podrían inducir anticuerpos específicos contra PCV2 tras su administración oral en ratones BALB/c. Los anticuerpos anti-*Cap* en suero (**Fig. 3**) y heces (**Fig. 4**) se detectaron a los 60 y 30 días respectivamente, después de la primera administración oral. Cabe destacar que la inmunización subcutánea si bien indujo la generación de anticuerpos séricos en forma relativamente rápida (45 días), no fue capaz de inducir anticuerpos a nivel fecal. Los anticuerpos fecales, tras inmunización oral, aumentaron significativamente después de la tercera inoculación (día 30), sin embargo se mantuvieron sin diferencias significativas entre ellos hasta el final del experimento (día 75), sin mostrar diferencias significativas entre la inmunización con la formulación de extracto de levadura lisada y la levadura viva. En contraste, los anticuerpos séricos más altos se alcanzaron después de la quinta inmunización con la formulación de extracto de levadura lisada no así con la levadura viva, la cual no indujo alzas significativas de anticuerpos a nivel de suero.

Paralelamente, en los ratones inmunizados con *S. cerevisiae*/pYES2 o en el grupo de control sin inmunizar, los anticuerpos contra PCV2 no fueron detectables, lo que sugiere que la inmunidad contra el PCV2 es específica y se produce al inocular oralmente en el animal los antígenos derivadas de *S.cerevisiae*/pYES2::*opt - cap*.



**Fig. 3** Perfiles de anticuerpos específicos anti – *Cap* asociados con IgG de los grupos experimentales. Los resultados de ELISA se expresan como medias aritméticas  $\pm$  SD de los valores de DO medidos a 450 nm. Los asteriscos muestran los puntos donde se observan diferencias significativas ( $p \leq 0.001$ ) con respecto al control sin inmunizar.



**Fig. 4.** Perfiles de anticuerpos fecales anti – *Cap* asociados con IgA de los grupos experimentales. Los resultados de ELISA se expresan como medias aritméticas  $\pm$  SD de los valores de DO medidos a 450 nm. Los asteriscos muestran los puntos donde se observan diferencias significativas ( $p \leq 0.001$ ) con respecto al control sin inmunizar.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El objetivo de la presente memoria fue la continuación de un estudio destinado a establecer una base para estudiar el diseño de una vacuna oral contra PCV2, utilizando ratones como modelo experimental mamífero. En esta tesis, una cepa recombinante de la levadura *S. cerevisiae* fue utilizada como vector y vehículo para entregar el antígeno de la cápside viral proveniente de un aislado nacional de PCV2. De ésta manera se examinó la respuesta de anticuerpos anti PCV2 en suero y heces de ratones alimentados con extractos crudos o la cepa viva de *S. cerevisiae* que expresa la proteína *Cap* de PCV2. Esta proteína fue elegida porque es la proteína viral más inmunogénica disponible y porque es responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes contra PCV2 (17). Además, se ha demostrado en un estudio anterior del laboratorio BIOVETEC, la factibilidad de la utilización de esta levadura recombinante para expresar antígenos de PCV2, ya que como resultado se obtiene la formación de partículas virales vacías (VLPs) de PCV2 (7). Sin embargo es importante destacar que las VLPs producidas por las levaduras son menos homogéneas en tamaño y forma que el virión de PCV2 nativo. Una observación similar fue hecha por los autores del primer informe acerca la proteína *Cap* recombinante de PCV2 expresada por baculovirus en células de insecto, lo que sugiere que estas diferencias pueden deberse a la ausencia de otras

proteínas estructurales del virus o a la ausencia de autorregulación por empaquetamiento de ADN (16).

Los experimentos realizados en esta memoria de título, confirmaron que las levaduras transformadas con el gen optimizado de PCV2 expresan una proteína *Cap* consistente con el peso molecular predicho de la proteína de PCV2 (**Fig. 2**). La proteína fue reconocida en forma específica por sueros obtenidos a partir de cerdos afectados por PMWS, lo que sugiere que la antigenicidad de la proteína PCV2 permaneció después de la optimización y de expresión heteróloga en la levadura.

En ésta investigación, el modelo de ratones se utilizó para evaluar la inmunogenicidad de la levadura recombinante como potencial vacuna contra PCV2, bajo dos formulaciones distintas. Aunque no hay evidencia de infección natural por PCV2 en ratones (33), este modelo fue elegido, porque el virus puede infectar y replicar experimentalmente en ratones (11), además todas las vacunas comerciales disponibles contra PCV2 han sido probadas en sus fases pre clínicas en este modelo, demostrando posteriormente, que proporcionan protección en cerdos (22).

Los ratones inmunizados en repetidas ocasiones a través de sonda oral con extractos de *S.cerevisiae/pYES2::opt - cap* generó anticuerpos anti-PCV2 en materia fecal y suero. Los anticuerpos séricos más altos se alcanzaron después de la quinta inmunización con la formulación de extracto de levadura lisada por sonicación no así con la levadura viva, la cual solo mostró un aumento significativo de anticuerpos a nivel de material fecal. En conjunto, estos resultados sugieren que si bien en este sistema, la inducción de anticuerpos IgG séricos fue específica y se presentó en forma de dosis y tiempo dependiente, la formulación vacunal como extracto crudo es más inmunogénica que la cepa viva, probablemente por el efecto adyuvante de los componentes de la pared celular de la levadura, los cuales estarían más expuestos en la formulación como extracto crudo versus la formulación como cepa viva. Publicaciones anteriores han demostrado que los componentes de la de pared celular de levadura, en especial los  $\beta$  glucanos, son capaces de estimular a nivel de TLRs, tanto la respuesta inmune hacia antígenos específicos y no específicos (25, 32, 38).

En forma paralela se observó que, la inducción de anticuerpos fecales asociados a IgA se incrementó por la inmunización oral con la cepa recombinante tanto en su formulación como extracto crudo y como cepa viva, lo que sugiere que, en este caso, a nivel de mucosa la inmunogenicidad no depende del tipo de formulación. En conclusión, se pudo inducir una respuesta significativa de anticuerpos séricos en ratones por la vacunación repetida con una dosis de aproximadamente 100 mg de extractos de levadura con el antígeno *Cap*, atribuyendo un efecto adyuvante importante, a los restos de pared celular presente en los extractos crudos de la levadura lisada por sonicación, y aparentemente este efecto no sería importante para inducir inmunogenicidad a nivel local en la mucosa intestinal.

En esta memoria, se puede desprender además, que la inmunogenicidad de antígenos a nivel oral depende no sólo de su entrega eficaz y constante a nivel de mucosa intestinal, sino también de dos factores adicionales:

Primero, el plegamiento natural y el autoensamblaje en VLPs de la proteína *Cap* producida por la levadura. Si bien no se realizaron observaciones a través de microscopia electrónica que mostraran la formación de VLPs. Este proceso favorecería el reconocimiento de los antígenos en el intestino y tejidos linfoides asociados, además de las respuestas inmunes tanto humorales, celulares y de mucosas. Asimismo, se cree que el tamaño particulado contribuye a la captación de antígenos por las células presentadoras de antígenos (CPA) a nivel intestinal (41).

Segundo, la naturaleza del material particulado, permite a las células M, que poseen receptores específicos para material antigénico, transportarlo con casi nula degradación enzimática hacia la región linfática (6, 10,12).

Estos resultados sugieren que la entrega oral de antígenos de PCV2 mediante levaduras podría ser utilizada como una estrategia alternativa para desarrollar una nueva generación de vacunas contra la infección por PCV2 y que este sistema requiere mayor investigación en el cerdo, el hospedero natural de PCV2. Varios factores quedan aún por resolver, incluyendo la dosis óptima protectora de extractos de levadura que pudiese ser entregada a través de alimentos en la especie porcina, la viabilidad y análisis de costo y beneficio, así como los efectos de la adición de agentes de estabilización de la fórmula, como polímeros biodegradables derivados de los ácidos láctico y glicólico) (18) u otros elementos que extienden la persistencia de partículas antigénicas en el yeyuno y el íleon terminal de cerdos (34), las regiones principales donde se lleva a cabo la absorción de las vacunas orales en mamíferos.

## REFERENCIAS

1. **ALBINA, E.; TRUONG, C.; HUTET, E.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; L'HOSPITALIER, R.; MAHÉ, D.; ALLÉE, C.; MORVAN, H.; AMENNA, N.; LE DIMNA, M.; MADEC, F.; JESTIN, A.** 2001. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *Journal of Comparative Pathology*. 125: 292 – 303.
2. **ALLAN, G.; ELLIS, J.** 2000. Porcine circoviruses: A review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12: 3 – 14.
3. **ALLNUTT, F.; BOWERS, R.; ROWE, C.; VAKHARIA, V.; LAPATRA, S.; DHAR, A.** 2007. Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast. *Vaccine*. 25: 4880 – 4888.
4. **BAILLIE, L.; RODRIGUEZ, A.; MOORE, S.; ATKINS, H.; FENG, C.; NATARO, J.; PASETTI, M.** 2008. Towards a human oral vaccine for anthrax: the utility of a *Salmonella typhi* Ty21a-based prime-boost immunization strategy. *Vaccine*. 26: 6083 – 6091.
5. **BASSAMI, M.; BERRYMAN, D.; WILCOX, G.; RAIDAL, S.** 1998. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology*. 249: 453 – 459.
6. **BEIER, R.; GEBERT, A.** 1998. Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches. *The American Journal Physiology*. 275:130 – 137.
7. **BUCAREY, S.; NORIEGA, J.; REYES, P.; TAPIA, C.; SÁENZ, L.; ZUÑIGA, A.; TOBAR, J.** 2009. The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine*. 27: 5781 – 5790.
8. **CHEN, F.; CHEN, X.; CHEN, Z.; JIANG, H.; PAN, X.; HU, Z.; LIU, R.; CHEN, X.** 2005. Construction and application of a yeast expression system for thymosin alpha1. *Biocell*. 29: 253 – 259.
9. **CLARK, E.** Post-weaning multisystemic wasting syndrome. 1997. in *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*. 28:499 – 501.
10. **COX, E.; VAN DER STEDE, Y.; VERDONCK, F.; SNOECK, V.; VAN DEN BROECK, W.; GODDEERIS, B.** 2002. Oral immunization of pigs with fimbrial antigens of enterotoxigenic *E. coli*: an interesting model to study mucosal immune mechanisms. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 87: 287 – 290.
11. **CSAGOLA, A.; CADAR, D.; TUBOLY, T.** 2008. Replication and transmission of porcine circovirus type 2 in mice. *Acta Veterinaria Hungarica*. 56: 421 – 427.
12. **DIETRICH, G.; GRIOT-WENK, M.; METCALFE, I.; LANG, A.; VIRET, J.** 2003. Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine*. 21: 678 – 683.
13. **FACHINGER, V.; BISCHOFF, R.; JEDIDIA, S.; SAALMULLER, A.; ELBERS, K.** 2008. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine*. 26: 1488 – 1499.
14. **FAN, H.; JU, C.; TONG, T.; HUANG, H.; LV, J.; CHEN, H.** 2007. Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells. *Veterinary Research Communications*. 31: 487– 496.
15. **FARNÓS O.; FERNÁNDEZ E.; CHIONG M.; PARRA F.; JOGLAR M.; MÉNDEZ L.; RODRÍGUEZ E.; MOYA G.; RODRÍGUEZ D.; LLEONART R.; GONZÁLEZ E.; ALONSO A.; ALFONSO P.; SUÁREZ M.; RODRÍGUEZ M.; TOLEDO J.** 2009. Biochemical and structural characterization of RHDV capsid protein variants produced in *Pichia pastoris*: advantages for immunization strategies and vaccine implementation. *Antiviral Research*. 81: 25 – 36.
16. **FENAUX, M.; HALBUR, P.; HAQSHENAS, G.; ROYER, R.; THOMAS, P.; NAWAGITGUL, P.; GILL, M.; TOTTH, T.; MENG, X.** 2002. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *Journal of Virology*. 76: 541 – 551.

17. **FORT, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M.; SEGALES, J.; MATEU, E.** 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Veterinary Microbiology*. 125: 244 – 255.
18. **GARINOT, M.; FIEVEZ, V.; POURCELLE, V.; STOFFELBACH, F., DES RIEUX, A.; PLAPIED, L.; THEATE, I.; FREICHELS, H.; JÉRÔME, C.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; SCHNEIDER, Y.; PRÉAT, V.** 2007. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *Journal of Controlled Release Society*. 120: 195 – 204.
19. **GARRAIT G, JARRIGE JF, BLANQUET S, BEYSSAC E, ALRIC M.** 2007. Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing a model cytochrome P450 in the rat digestive environment: viability and bioconversion activity. *Applied Environmental Microbiology*. 73: 3566 – 3574.
20. **HAMEL, A.; LIN, L.; NAYAR, G.** 1998. Nucleotide sequence of porcine circoviruses associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*. 72: 5262 – 5267.
21. **HARDING, J.** The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. 2004. *Veterinary Microbiology*. 98:131 – 135.
22. **KIM, T.; TOAN, N.; SEO, J.; JUNG, B.; LEE, J.; LEE, B.** 2009. *Bordetella bronchiseptica* aroA mutant as a live vaccine vehicle for heterologous porcine circovirus type 2 major capsid protein expression. *Veterinary Microbiology*. 138: 318 – 324.
23. **KIXMOLLER, M.; RITZMANN, M.; EDDICKS, M.; SAALMULLER, A.; ELBERS, K.; FACHINGER, V.** 2008. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine*. 26:3443 – 3451.
24. **KOHL, T.; HITZEROTH, I.; CHRISTENSEN, N.; RYBICKI, E.** 2007. Expression of HPV-11 L1 protein in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *BMC Biotechnology*. 7: 56.
25. **LAUTERSLAGER, T.; STOK, W.; HILGERS, L.** 2003. Improvement of the systemic prime/oral boost strategy for systemic and local responses. *Vaccine*. 21: 1391 – 1399.
26. **LI, X.; KONG, X.; SHI, S.; ZHENG, X.; GUO, G.; WEI, Y.; QIAN, Z.** 2008. Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. *BMC Biotechnology*. 8: 89.
27. **LIU, Q.; WILSON, P.; ATTON – POKU, S. AND BABIUK L.** 2001. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Expression and Purification*. 21:115 – 120.
28. **MANKERTZ, A.; MUELLER, B.; STEINFELDT, T.; SCHMITT, C.; FINSTERBUSCH, T.** 2003. New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2. *Journal of Virology*. 77: 9885 – 9893.
29. **NAWAGITGUL, P.; HARMS, P.; MOROZOV, I.; THACKER, B.; SORDEN, S.; LEKCHAROENSUK, C.; PAUL, P.** 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2 - based and recombinant capsid protein (ORF2) - based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology*. 9: 33 – 40.
30. **NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I.; BOLIN, S.; HARMS, P.; SORDEN, S.; PAUL, P.** 2008. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *The Journal of General Virology*. 81: 2281 – 2287.
31. **OLFERT, E.; CROSS, B.; MCWILLIAM, A.** 1993. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. Disponible en: [http://www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/PDFs/ExperimentalAnimals\\_GDL.pdf](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/PDFs/ExperimentalAnimals_GDL.pdf).
32. **OGRA, P.; FADEN, H.; WELLIVER, R.** 2001. Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clinical Microbiology Reviews*. 14: 430 – 445.
33. **OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A.; JONES, D.; JUHAN, N.; MENG, X.; HALBUR, P.** 2009. Limited susceptibility of three different mouse (*Mus musculus*) lines to Porcine Circovirus-2 infection and associated lesions. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 73: 81 – 86.

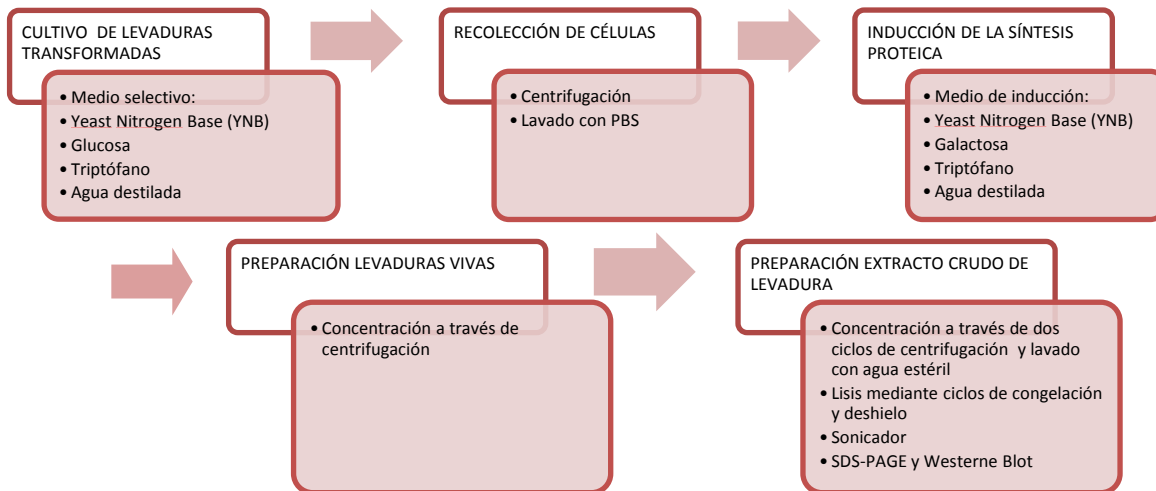
34. **PABST, R.; ROTHKOTTER, H.** 1999. Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 72: 167 – 173.
35. **RUSSELL, W.; BURCH, R.** 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London; Methuen and Co Ltd.
36. **SEGALES, J.; ALLAN, G.; DOMINGO, M.** Porcine circovirus diseases. 2005. *Animal Health Research Review*. 6: 119 – 142.
37. **SHIN, S.; SHIN, S.; CHOI, E.; LEE, D; AHN, J.; YANG, M.; JANG, Y.; YOO, H.** 2005. A predictive model for the level of sIgA based on IgG levels following the oral administration of antigens expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Veterinary Science*. 6: 305 – 309.
38. **SILIN, D.; LYUBOMSKA, V.** 2002. Overcoming immune tolerance during oral vaccination against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Veterinary Medicine B: Infectious Diseases Veterinary Public Health*. 49: 169 – 75.
39. **TISCHER, I.; GELDERBLUM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M.** 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*. 295: 64 – 66.
40. **TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G.** 1974. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A*. 226(2):153 – 167.
41. **TSUNETSUGU-YOKOTA, Y.; MORIKAWA, Y., ISOGAI, M., KAWANA-TACHIKAWA, A., ODAWARA, T.; NAKAMURA, T.; GRASSI, F.; AUTRAN, B.; IWAMOTO, A.** 2003. Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs. *Journal of Virology*. 77: 10250 – 10259.
42. **VALENZUELA, P.; MEDINA, A.; RUTTER, W.; AMMERER, G.; HALL, B.** 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*. 298: 347 – 350.
43. **VENKATESAN, N.; VYAS, S.** 2000. Polysaccharide coated liposomes for oral immunization—development and characterization. *International Journal Pharmaceutics*. 203: 169 – 177.
44. **VINCENT, E.; BALMELLI, C.; MEEHAN, B.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, C.** 2007. Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Veterinary Immunology*. 120: 47 – 56.
45. **VOLPERS, C.; SCHIRMACHER, P., STREECK, R.; SAPP, M.** 1994. Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology*. 200: 504 – 512.
46. **WANG K.; HUANG, L.; KONG, J.; ZHANG, X.** 2008. Expression of the capsid protein of porcine circovirus type 2 in *Lactococcus lactis* for oral vaccination. *Journal of Virological Methods*. 150: 1 – 6.
47. **WEST, K.; BYSTROM, J.; WOJNAROWICZ, C.; SHANTZ, N.; JACOBSON, M.; ALLAN, G.; HAINES, D.; CLARK, E.; KRAKOWKA, S.; MCNEILLY, F.; KONOBY, C.; MARTIN, K.; ELLIS, J.** 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11: 530 – 532.
48. **XIA M.; FARKAS T.; JIANG X.** 2007. Norovirus capsid protein expressed in yeast forms virus-like particles and stimulates systemic and mucosal immunity in mice following an oral administration of raw yeast extracts. *Journal Medical Virology*. 79:74 – 83.
49. **YE, L.; LIN, J.; SUN, Y.; BENNOUNA, S.; LO, M.; WU, Q.; BU, Z.; PULENDRAN, B.; COMPANS, R.; YANG, C.** 2006. Ebola virus-like particles produced in insect cells exhibit dendritic cell stimulating activity and induce neutralizing antibodies. *Virology*. 351: 260 – 270.

## ANEXO 1

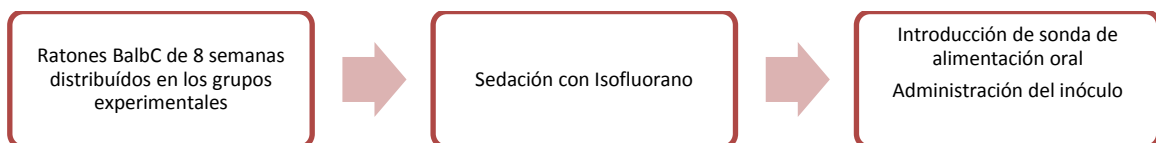
### Transformación *Saccharomyces cerevisiae*



### Obtención Inóculo Oral

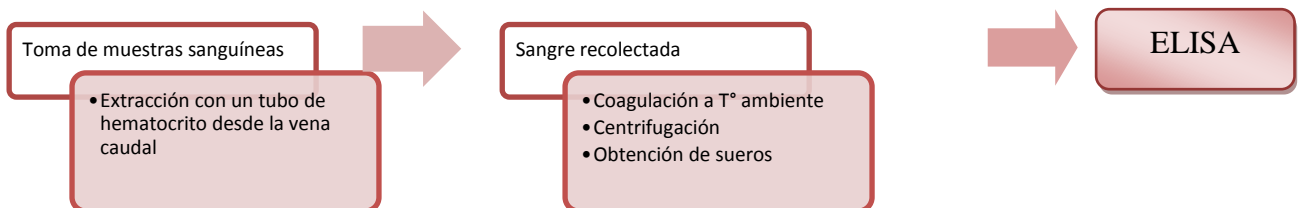


### Inmunización Oral



\*Procedimiento realizado 5 veces cada 15 días

### Medición de la Respuesta Inmune a Nivel Sanguíneo



### Medición Respuesta Inmune a Nivel Fecal

