

Microorganismos y Virus: Herramientas Clave para el Desarrollo de Vacunas

Daniel Guillén¹, Silvia Moreno-Mendieta y Romina Rodríguez-Sanoja

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510

E-mail: danielguillenx@yahoo.com.mx

Palabras clave: vacuna, antígeno heterólogo, microorganismo como vehículo.

RESUMEN

El uso de microorganismos como sistemas de vacunación ha sido investigado ampliamente en las últimas décadas. En la actualidad, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías, se ha logrado incrementar el potencial de algunas bacterias, virus y levaduras a través de la manipulación fina de eventos como la expresión de antígenos, su localización dentro de la célula, e incluso su liberación sitio específica. En consecuencia, la obtención de microorganismos genéticamente modificados para la expresión o transporte de proteínas antigénicas, así como para la liberación de ADN recombinante, ofrece múltiples ventajas tanto desde el punto de vista inmunológico como logístico y comercial. En este trabajo se analiza el estado actual del uso de microorganismos para el desarrollo de vacunas, sus ventajas y las perspectivas de esta tecnología en el campo de la vacunación.

Key words: vaccine, heterologous antigen, microorganisms as vehicles.

ABSTRACT

Microorganisms based vaccines have been extensively studied during the last decades. Nowadays, new technologies have successfully increased the potential of some bacteria, virus and yeasts through the fine manipulation of events like antigen expression, its subcellular localization and site-specific delivery. Consequently, production of engineered microorganisms for antigen expression and transport, and also for recombinant DNA delivery, offers many advantages not only from the immunological, but also from the logistic and commercial point of view. The aim of this review is to present the current state of microorganisms based vaccine research, its advantages and the technological perspectives in the vaccination field.

¹ Daniel Guillén y Silvia Moreno-Mendieta contribuyeron de forma equivalente a la elaboración de éste trabajo.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos, las bacterias, hongos y levaduras han formado parte de la vida del hombre. Bien porque algunas especies son el agente etiológico de temibles enfermedades infecciosas, o bien porque se han empleado para la fermentación de bebidas y alimentos, en la producción de compuestos de interés industrial como antibióticos, enzimas y aminoácidos o en la bioremediación. Por otra parte, con el desarrollo de las herramientas de la biología molecular, se ha logrado incrementar su potencial como materia prima para el desarrollo de sistemas con aplicación biomédica y/o biotecnológica. Una de las aplicaciones más importantes es la elaboración de vacunas a partir de los microorganismos completos o de sus productos. Para ello, se han empleado principalmente patógenos atenuados y algunos microorganismos reconocidos como seguros (GRAS por sus siglas en inglés) capaces de

actuar como vehículos de macromoléculas heterólogas importantes en profilaxis y terapia.

Una de las principales ventajas que presenta el uso de microorganismos como vehículos de antígenos (Fig. 1), es la posibilidad de su uso por vía oral o nasal, lo cual, además de imitar la ruta de entrada de varios patógenos, evita los problemas relacionados con la administración parenteral (uso de agujas, dolor, empleo de personal calificado y los altos costos de infraestructura), siendo un procedimiento menos invasivo y más atractivo para su uso en niños y en pacientes inmunosuprimidos. Por otra parte, su producción es más simple y de menor costo debido a la relativa facilidad para cultivar un microorganismo y para escalar el proceso a nivel industrial (Medina & Guzmán, 2001; Detmer & Glenting, 2006), criterios muy importantes en países en desarrollo con alto índice de enfermedades infecciosas (Sim *et al*, 2008).

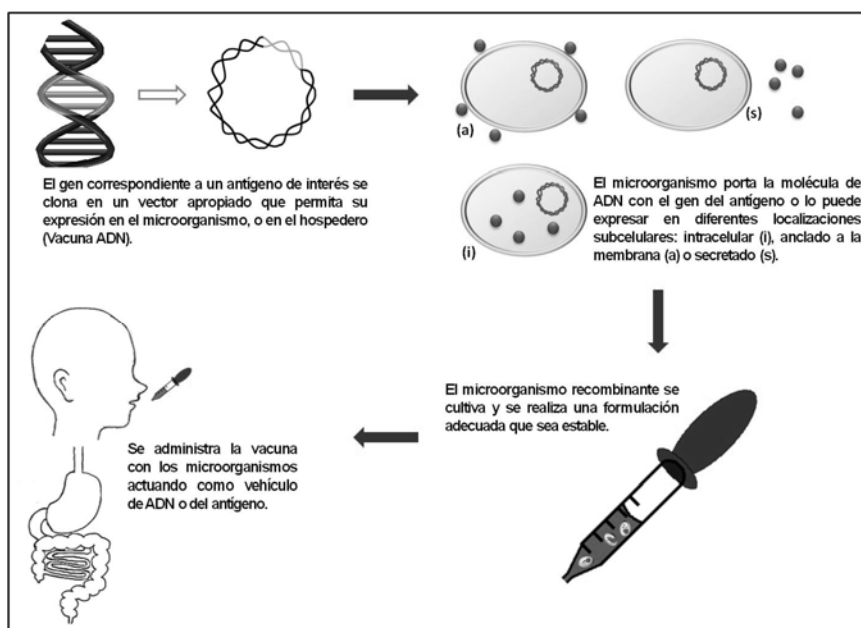


Fig. 1. Esquema representando el uso de microorganismos como vehículo de vacunación.

Se ha demostrado también que inmunizaciones vía oral o nasal no solo estimulan una respuesta inmune local a nivel de mucosa, sino que dan origen a una fuerte producción de anticuerpos en sitios distantes. La protección puede llegar a ser completa ya que se logra inducir a nivel sistémico una eficiente respuesta inmune humoral y celular, fenómeno que no se observa con administraciones parenterales, donde solo se induce una respuesta sistémica y no una respuesta a nivel de mucosa (Medina & Guzmán, 2001; Cortes-Perez *et al.*, 2007).

En consecuencia, el desarrollo de nuevos vehículos para la liberación de antígenos en mucosa (gastrointestinal, respiratoria o genital) es una prioridad. Para lograr que la inmunización por estas rutas sea eficiente, es importante considerar varios factores como son: 1. La liberación efectiva del antígeno en el sitio de inducción de la respuesta inmune, 2. El aumento de dicha respuesta por el uso de adyuvantes seguros, 3. La selección del régimen y ruta de administración que inducirá protección en el sitio deseado y a nivel sistémico y 4. La selección de una adecuada formulación de la vacuna (Gherardi & Esteban, 2005).

En esta revisión se resume el estado actual del uso de microorganismos para la expresión y transporte de antígenos, haciendo énfasis en el uso de bacterias ya que son los microorganismos que más se han estudiado y utilizado en este tipo de sistemas. Virus y microorganismos como levaduras y protozoarios empleados con el mismo propósito, son revisados de manera breve.

VACUNAS BACTERIANAS

Vacunas con bacterias patógenas atenuadas

Como se mencionó previamente, uno de los objetivos en el desarrollo de vacunas es la inducción de respuesta inmune que puede ser mediada por células (celular) o por componentes solubles en sangre como los anticuerpos (humoral) y que puede darse tanto a nivel sistémico como local contra diversos antígenos (Fig. 2). La mayoría de los sistemas en desarrollo involucran microorganismos patógenos para los cuales se han aislado o construido variantes atenuadas (Grangette *et al.*, 2004). El caso más claro es el de *Mycobacterium bovis* en la BCG, que junto con *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae* son de las pocas vacunas con bacterias vivas que han logrado llegar al mercado. La cepa atenuada de *S. typhi* Ty21a es usada contra la tifoidea; y la vacuna registrada contra el cólera emplea la cepa atenuada de *V. cholerae* CVD 103-HgR (Dietrich *et al.*, 2003).

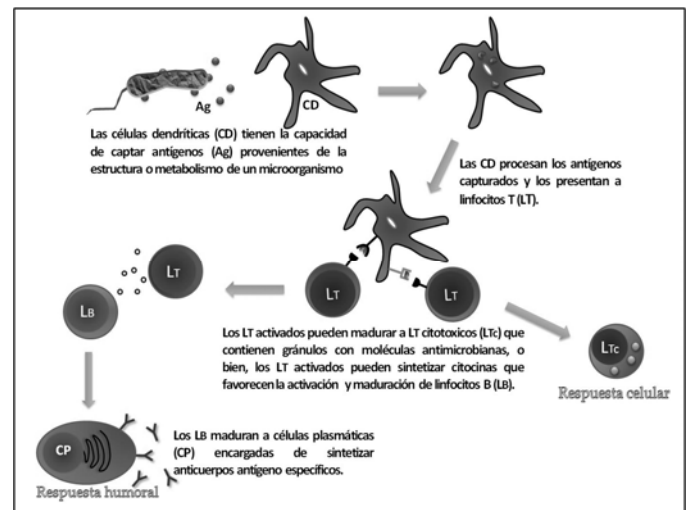


Fig. 2. Modelo simplificado de la activación de respuesta inmune contra un microorganismo.

Las atenuaciones generalmente involucran deleciones de genes que se encuentran relacionados con virulencia o con el metabolismo bacteriano, esto con la finalidad que el microorganismo mantenga una baja tasa replicativa y no supere al sistema inmune del hospedero ya que, la posible aparición de síntomas indeseables o el desarrollo de enfermedad en pacientes inmunocomprometidos así como la reversión a un fenotipo virulento son problemas concernientes al empleo de microorganismos atenuados. Sin embargo, se busca que la bacteria atenuada conserve características intrínsecas como el tropismo celular, la diseminación celular y propiedades adyuvantes gracias a la presencia de moléculas inmunoestimuladoras como lipopolisacárido (LPS), ácido teicoico o motivos CpG (citosina seguida de guanina) no metilados característicos del ADN bacteriano (Grangette *et al.*, 2004; Loessner *et al.*, 2008).

Actualmente se analiza el potencial de otras bacterias patógenas como *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, para despertar respuesta inmune y/o como sistemas de expresión de antígenos heterólogos. La finalidad de este tipo de estudios es mejorar la respuesta dirigida contra un antígeno aprovechando al patógeno atenuado o inactivado como adyuvante. De esta forma, se puede lograr respuesta inmune contra el vehículo (bacteria patógena) y contra el antígeno heterólogo al mismo tiempo, de tal manera que se confiera protección contra dos agentes infecciosos en una sola vacuna.

Osorio *et al.*, (2007), analizaron el potencial inmunogénico y protectorio de distintas especies de *Shigella*, inactivadas con formalina para evitar los problemas asociados al uso de microorganismos atenuados. El estudio

realizado en ratones demostró la producción de anticuerpos específicos contra las distintas especies de *Shigella* utilizadas y protección contra el patógeno después de inmunizar al modelo animal vía intranasal. De manera similar Barry *et al.*, (2006) analizaron el potencial como vacuna multivalente de una mezcla de serotipos importantes de *Shigella* atenuada, expresando cada cepa uno o dos antígenos provenientes de *E. coli* enterotóxigena (ETEC), los resultados demostraron respuesta inmune específica dirigida contra el vector y contra los antígenos heterólogos así como protección contra la infección.

Entre las bacterias patógenas atenuadas que se han utilizado como posibles vacunas, existe evidencia que *L. monocytogenes* despierta una fuerte respuesta inmune tanto innata como adaptativa (Bruhn *et al.*, 2007). Esta bacteria facultativa intracelular, que tiene la capacidad de invadir tanto a células fagocíticas como no fagocíticas, estimula la respuesta inmune celular por lo que ha sido utilizada en ensayos contra infecciones virales y en pruebas supresoras de tumores. Cepas recombinantes de *L. monocytogenes* que expresan y secretan proteínas del virus de papiloma humano han demostrado su eficacia como potenciales antitumorales (Gunn *et al.*, 2001), otros estudios realizados incluyen la expresión de Her-2/neu (un antígeno que se sobreexpresa en algunos cánceres como el de mama) fusionado a listeriolisina O, mostrando efecto terapéutico contra tumores implantados en un modelo murino (Singh *et al.*, 2005).

En algunos casos, la atenuación de una cepa la vuelve más susceptible que la cepa silvestre a las condiciones ambientales *in vivo*, perdiendo la capacidad de colonizar el tejido blanco y por tanto de despertar una adecuada respuesta inmune. Li *et al.*, (2009) utilizaron

cepas atenuadas de *S. enterica* Serovar Typhimurium que expresan como antígeno modelo la región α -helicoidal de la proteína A de superficie de *Streptococcus pneumoniae*. Las propiedades de las cepas utilizadas son fenotípicamente iguales a la cepa silvestre en el momento de administrarse y colonizar al hospedero, pero una vez que el microorganismo se ha establecido, se apagan genes relacionados con virulencia. Las cepas modificadas indujeron fuerte respuesta inmune y fueron capaces de resguardar al modelo murino de la infección con *S. pneumoniae*.

Cepas no virulentas de *S. typhimurium*, se han estudiado también como sistemas para la inducción de inmunidad celular contra tumores, la propuesta es que el sistema de secreción tipo III (SST3) puede ser usado para la translocación de antígenos heterólogos al citosol de las células presentadoras de antígeno (CPA) (Panthel *et al.*, 2008). Pruebas en ratones retados con células de fibrosarcoma que expresan el antígeno p60 y que previamente habían sido inmunizados oralmente con *Salmonella* que expresaba y secretaba dicha proteína, demostraron la eficacia de la actividad antitumoral del sistema (Panthel *et al.*, 2006).

A diferencia de *Salmonella* y *Listeria*, *Yersinia* es un patógeno extracelular, que también es capaz de translocar proteínas vía SST3, siendo este el sistema que emplea para desplegar factores de virulencia (Yops) en el citosol de las células del hospedero. Se han realizado pruebas con cepas de *Yersinia enterocolitica* atenuadas en distintos factores de virulencia (Leibiger *et al.*, 2008). Los antígenos liberados en el citosol de las CPA, son procesados y presentados en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I (MHC I), lo que puede activar la respuesta de linfocitos T CD8⁺ de forma

específica. *Y. enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis* han demostrado tener la capacidad de estimular respuesta celular T CD8⁺ usando como antígeno modelo ovoalbúmina fusionada a un dominio de translocación del factor de virulencia YopE (Wiedig *et al.*, 2005).

Otras bacterias patógenas que se han analizado por su potencial como vehículos de vacunas son *Bordetella pertussis* y *Bordetella bronchiseptica*, patógenos del tracto respiratorio de humanos y animales respectivamente, sin embargo, no han sido tan estudiadas como los otros géneros mencionados. Algunos ejemplos incluyen a *B. pertussis* expresando la proteína HtrA de *Haemophilus influenzae* no-capsulado. La forma en que presenta al antígeno es como una proteína de fusión entre la HtrA y una hemaglutinina filamentosa (FHA), la cual es una adhesina que *B. pertussis* expone en su superficie y además secreta. Infección de ratones vía intranasal con esta cepa modificada demostraron la inducción de altos títulos de anticuerpos anti-HtrA y anti-FHA (Alonso *et al.*, 2005); resultados similares se han obtenido con el péptido neutralizante SP70 de enterovirus 71 (EV71) fusionado a FHA o al dominio pasajero del autotransportador BrkA, las proteínas recombinantes expresadas en *B. pertussis* BPZE1 inducen anticuerpos capaces de neutralizar la infección in vitro por EV71 (Ho *et al.*, 2008).

En cuanto a *B. bronchiseptica*, una cepa mutante *aroA* se utilizó para expresar el fragmento C de la toxina tetánica (TetC) bajo la regulación del promotor de la FHA; inmunización intranasal con este microorganismo indujo anticuerpos séricos contra *B. bronchiseptica* y contra TetC, además al retar al modelo murino con la toxina

tetánica se observó 100% de protección (Stevenson & Roberts, 2004). Trabajos con *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* siguen realizándose ya que al ser microorganismos capaces de colonizar la mucosa del tracto respiratorio tienen gran potencial como vehículos para la presentación de antígenos heterólogos en vías aéreas superiores.

Otra estrategia promisoría utilizando microorganismos atenuados, es la expresión de proteínas inmunogénicas que potencien la respuesta inmune. Tal es el caso del toxoide del tétanos que ha sido ampliamente utilizado como adyuvante. TetC es potencialmente inmunogénico cuando es expresado en cepas de *Salmonella*. Un ejemplo es la expresión de la glutatión S transferasa de 28kDa de *Schistosoma haematobium* (SH28GST) en una cepa atenuada de *S. enterica* Serovar Thypimurium. La expresión del antígeno fusionado a TetC despertó inmunidad protectora contra la esquistosomiasis. De esta forma se puede explotar el potencial inmunoestimador de TetC para la elaboración de vacunas contra enfermedades que requieren una fuerte respuesta protectora (Lee *et al.*, 2000).

Actualmente, pese a que la atenuación de las bacterias patógenas impide sobrevivir a la bacteria fuera del laboratorio y a que existen estrategias para controlar la población como el uso de antibióticos o la introducción de genes suicidas inducibles (Loessner *et al.*, 2008), sigue en controversia el riesgo asociado con la posible reversión al fenotipo virulento de estas bacterias. La inducción de respuestas autoinmunes o tolerancia, la producción de metabolitos tóxicos, la exclusión competitiva de la flora comensal y la transferencia indeseada de genes vía plásmidos que pudieran activar protooncogenes, son otros de las preocupaciones existentes asociadas al uso de

bacterias como vacunas (Detmer & Glenting, 2006; Li *et al.*, 2007).

Vacunas con bacterias ácido lácticas

Una manera de eliminar los problemas relacionados con la seguridad en el uso de patógenos como vacunas, es utilizando microorganismos reconocidos como seguros (GRAS), que son modificados para expresar los antígenos originales de los patógenos.

Una de las alternativas más estudiadas desde la pasada década son las bacterias ácido lácticas (BAL). Estas bacterias Gram positivas, no esporuladas, no patógenas y no invasivas incluyen especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, de los cuales algunas especies son importantes miembros de la microbiota endógena asociada con tejido mucoso. Debido a que son utilizadas en la industria alimentaria, en fermentaciones tradicionales de consumo humano y algunas incluso tienen efectos probióticos (Escalante *et al.*, 2008; Camu *et al.*, 2007; Jokovic *et al.*, 2008), resultan ser una buena alternativa para reemplazar vectores patógenos atenuados como *Mycobacterium*, *Salmonella* y *Shigella* y administrar de forma controlada y dirigida antígenos al sistema inmune vía mucosa (Cortes-Perez *et al.*, 2007; Wells & Mercenier, 2008).

El uso de las BAL como vehículos vivos para la producción y liberación de moléculas terapéuticas como antígenos, presenta varias ventajas, una de las cuales es que provocan menos efectos secundarios que las vacunas de uso sistémico. Además, se ha demostrado que las BAL genéticamente modificadas para producir antígenos de patógenos, son capaces de despertar respuesta inmune sin la inducción de la inmunotolerancia que pueda presentarse posteriormente a la inmunización vía mucosas

Artículos

(Sim *et al.*, 2008; Scavone *et al.*, 2007). Por otra parte, y según lo han demostrado Maassen *et al.* (2000), hay un perfil de citocinas dependiente de la cepa utilizada, de esta manera, es posible obtener fuertes respuestas si el objetivo es la vacunación contra enfermedades infecciosas, o inducir inmunotolerancia si el objetivo es el tratamiento de alergias.

Entre las BAL más estudiadas se encuentran las del género *Lactococcus*, especialmente *Lactococcus lactis*, una bacteria

no comensal, transitoria en el tracto digestivo. Previamente se ha demostrado que esta bacteria expresa eficientemente proteínas heterólogas de varias fuentes (Tabla 1) y es capaz de despertar respuesta inmune específica contra dichas proteínas confiriendo de esta forma protección contra la infección (Sim *et al.*, 2008; Scavone *et al.*, 2007; Morello *et al.*, 2008). Incluso se ha utilizado para la expresión y liberación de citocinas como las IL2-6-10 y 12 en ratones, llegando con éxito a ensayos clínicos fase I (Wells & Mercenier, 2008).

Tabla 1. Expresión de proteínas heterólogas en bacterias ácido lácticas.

| BAL | PROTEÍNA HETERÓLOGA | OBJETIVOS Y RESULTADOS | REFERENCIAS |
|---|--|---|-----------------------------------|
| <i>L. plantarum</i> <i>L. lactis</i> | Proteína verde fluorescente (GFP) | La expresión de GFP permite visualizar su fagocitosis por los macrófagos <i>in vitro</i> y <i>in vivo</i> y rastrear su paso por el tracto GI. | Geoffroy <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>L. plantarum</i> (<i>alr-</i>) | TTC | Mutantes con paredes más permeables mejoran la presentación del antígeno. Las cepas administradas vía intragástrica resultan más inmunogénicas. | Grangette <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>L. casei</i> | Antígeno PspA de <i>S. pneumoniae</i> | Ocurre inducción de anticuerpos específicos después de inmunización nasal y destrucción del pneumococo por deposición de C'. | Campos <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>L. plantarum</i> <i>L. lactis</i> | Antígeno E7 -HPV | La inmunización intranasal es más eficiente para inducir respuesta inmune en mucosa y sistémica que la vía intragástrica. | Cortes-Perez <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>L. lactis</i> | Dominio III del virus del dengue serotipo II (EDIII) | Ocurre inducción de anticuerpos IgG después de la administración vía nasal y oral. La respuesta depende de la ruta de administración y de la cepa de ratones inoculada. | Sim <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>L. lactis</i> | Antígeno MrpA de <i>Proteus mirabilis</i> | Ocurre inducción específica de IgG e IgA y disminución en la colonización de patógenos en riñón después de la inmunización. | Scavone <i>et al.</i> , 2007 |

También han sido investigadas las propiedades adyuvantes de las BAL y se han desarrollado cepas mutantes. En el primer caso por ejemplo, se han evaluado las propiedades adyuvantes de *L. lactis* NZ9000 comparando su efecto proinflamatorio con el de dos bacterias Gram-negativas, *E. coli* DH5 α y *S. typhi* Ty21a ambas no patogénicas y ampliamente estudiadas como vacunas vivas. Los perfiles de expresión de citocinas y la estimulación de células dendríticas (CDs) son indicativos de las propiedades adyuvantes (proinflamatorias) de esta bacteria, condición ideal para potenciar la respuesta inmune (Yam *et al.*, 2008).

En el segundo caso y con el objetivo de establecer si el desarrollo de transportadores bacterianos mutantes puede aumentar el potencial de las BAL como sistema de liberación, se hizo una aproximación tratando de incrementar la liberación *in vivo* de antígeno al interferir con la biosíntesis de la pared celular. Se demostró que mutantes de *Lactobacillus plantarum*, alanina racemasa negativas (*alr*), poseen paredes más permeables y tienen más potencial como sistema liberador siendo mucho más inmunogénicas por vía intragástrica, que las cepas silvestres. Este hallazgo propone pues, que un incremento en la liberación *in vivo* del antígeno, juega un papel importante en el efecto que se observa, sin excluir la posibilidad de una mejor presentación de antígeno (Granette *et al.*, 2004).

Localización de antígenos en bacterias

Existen varios factores que pueden afectar la presencia y/o efectividad de una respuesta inmune, entre estos se encuentra la cantidad de antígeno que se suministra, el esquema de inmunización, la inmunogenicidad del antígeno así como su localización dentro de un vehículo.

La ubicación de un antígeno en un microorganismo es variable, puede ser secretado, intracelular o estar anclado a la membrana, para lo cual se utilizan diferentes estrategias (Lee *et al.*, 2003). Esto es importante ya que un antígeno intracelular puede estar más protegido de la degradación que uno secretado, pero un antígeno secretado puede ser más fácilmente captado por elementos que conforman al sistema inmune y por tanto promover una respuesta más efectiva. De lo anterior se infiere que la localización de un antígeno en un microorganismo puede influir en la respuesta inmune que se obtiene contra dicho antígeno.

En *S. enterica* Serovar Typhimurium se comparó la influencia en la respuesta inmune de un antígeno heterólogo localizado en la superficie celular con respecto a su localización intracelular. El antígeno modelo fue la hemaglutinina B (HagB) de *Porphyromonas gingivalis*. Para poder localizar a HagB en la membrana de *Salmonella* se fusionó a la señal de localización externa de la lipoproteína mayor de *E. coli* (Lpp) y a un dominio de la proteína de membrana OmpA. Cuando se administró oralmente a ratones, la cepa que expresa HagB en su superficie indujo títulos de IgG e IgA mayores que la cepa que expresa HagB intracelularmente (Isoda *et al.*, 2007).

En el caso de las BAL, Bermudez-Humaran *et al.*, (2004) probaron a *L. lactis* expresando el antígeno E7 del virus de papiloma humano en tres distintos compartimentos; intracelular, anclado a pared celular y secretado. La ruta de administración a ratones fue intranasal y se evaluó la producción de IL-12 y de IFN- γ ; la mayor respuesta se obtuvo contra la forma anclada a pared seguida de la intracelular y de la secretada. Los autores refieren que la eficiencia en la respuesta contra el antígeno

localizado en la pared celular puede ser debida a la accesibilidad que tiene el sistema inmune por el antígeno a diferencia del intracelular que solamente se expone cuando la bacteria se lisa. Por otra parte, la respuesta disminuida contra la forma secretada es atribuida a la inestabilidad de E7.

En contraste, Scavone *et al.* (2007) encontraron que al administrar vía intranasal una cepa de *L. lactis* que secretaba la proteína fimbrial de *Proteus mirabilis* o ubicándola en su pared celular se inducía la producción de anticuerpos específicos IgG e IgA séricos respectivamente, pero solo cuando el antígeno era secretado se produjo IFN- γ . Al infectar al modelo murino, se presentó una disminución en la colonización renal por *P. mirabilis* en los ratones que fueron inmunizados con una u otra cepa recombinante de *L. lactis*.

La información que se tiene hasta el momento acerca de la influencia que tiene en el sistema inmune la localización subcelular de un antígeno sigue siendo variada y factores como la inmunogenicidad, estabilidad, tolerancia, ruta de administración y dosis, entre otros, son detalles que hay que tomar en cuenta al diseñar la ubicación en la cual se desea que un microorganismo, que está actuando como vehículo, presente un antígeno.

Vacunas de ADN en vehículos bacterianos

Las vacunas de ADN transfieren genes que codifican para antígenos a las células del hospedero, en el caso de bacterias que portan plásmidos con dichos genes, pueden transferir el ADN cuando se lisan dentro del citosol de la célula hospedera o bien, por otros mecanismos que aún no han sido descrito (Loessner *et al.*, 2008). Los plásmidos recombinantes que se transfieren generalmente se encuentran bajo la

regulación de un promotor eucariota, de tal manera que sean las células del hospedero las que lleven a cabo la expresión del antígeno. Dentro de las ventajas que este tipo de vacunas ofrece es que son fáciles de diseñar gracias a las herramientas existentes para manipular el ADN y son estables, lo que facilita su almacenamiento y transporte. Como la síntesis del antígeno se lleva a cabo *in vivo* en el hospedero, se pueden realizar las modificaciones post-traduccionales necesarias para que un antígeno adquiera una conformación correcta e incluso se pueden expresar múltiples antígenos usando un mismo vector de ADN, también inducen una fuerte respuesta inmune celular, además de humoral, que se correlaciona con la protección contra patógenos intracelulares y tumores, razón por la cual, se han utilizado ampliamente para proteger contra una serie de enfermedades infecciosas como el VIH (Li *et al.*, 2007).

Otras ventajas ofrecidas por este sistema incluyen la coexpresión de moléculas inmunomoduladoras como citocinas o moléculas coestimuladoras y la posibilidad de manipular los antígenos por adición de secuencias como péptidos señal. Estos marcan su destino a determinados compartimentos celulares, para mejorar así su eficacia en la inmunización. Además, pueden utilizarse sistemas de transporte o vectores para su liberación dirigida. En este sentido, el uso de bacterias como vehículos resulta una estrategia simple con múltiples ventajas, entre otras, que pueden invadir casi cualquier célula eucariótica e incluso colonizar ciertas superficies mucosas de órganos internos. Finalmente, una ventaja importante es que la cantidad de ADN que puede ser clonado en un plásmido bacteriano es en varias órdenes de magnitud más grande que la que puede

acomodarse en vectores virales (Darji *et al.*, 2000).

Como se mencionó anteriormente, el uso de microorganismos para transportar el ADN, es una de las alternativas más prometedoras sobretodo en el caso de bacterias enteroinvasivas, ya que pueden administrarse por vía oral y transferir el ADN directamente a células presentadoras de antígeno. Entre estas bacterias se encuentra *L. monocytogenes*, la cual ha sido utilizada para comparar la eficacia como vehículo de ADN, ARNm o bien secretando el antígeno por sí misma. En dicho trabajo se utilizó como antígeno modelo la ovalbumina (OVA) y se observó que de los ratones infectados con *Listeria* portando las diferentes formas de vacuna, la forma expresada y secretada por la misma bacteria fue la más eficiente en la presentación de antígeno seguida del ARNm, mientras que *Listeria* que transfiere el ADN codificante para la OVA falló en generar una respuesta (Loeffler *et al.* 2006).

El hecho de no obtener una respuesta cuando se utilizó *L. monocytogenes* como vehículo de ADN codificante para OVA no implica que sea ineficiente para transportar vacunas de ADN ya que la presencia de una buena respuesta inmune depende de varios factores como la naturaleza del antígeno o la ruta de inmunización, entre otras. Resultados favorables con *L. monocytogenes* se han obtenido portando plásmidos de expresión eucariota con antígenos de *M. tuberculosis*, donde se reportó la inducción de respuesta inmune celular después de su administración vía intraperitoneal en un modelo murino. Se observó también que al inmunizar vía intravenosa con *L. monocytogenes* transportando los plásmidos de expresión eucariota, se obtiene una respuesta protectora

comparable a la inducida por la vacuna BCG (Miki *et al.*, 2004).

Otros ejemplos de bacterias enteropatógenas como vehículos para vacunas de ADN incluyen a *Salmonella*, donde recientemente se reportó su efectividad contra la infección por *Toxoplasma gondii* en ratones (Qu *et al.* 2008) y como terapia antitumoral (Xiang *et al.*, 2008); *Shigella* (Vecino *et al.*, 2004) y *Y. enterocolitica* (Al-Mariri *et al.*, 2002).

Las bacterias lácticas por su parte, no poseen las propiedades de las bacterias patógenas como el tropismo hacia ciertos tejidos o patrones moleculares que estimulan al sistema inmune, pero se ha demostrado su eficacia como vehículos de ADN. En un estudio donde se utilizó una cepa recombinante de *L. lactis* expresando la internalina A de *L. monocytogenes* se demostró que *L. lactis* era capaz de invadir enterocitos *in vivo* y más aún, era capaz de transferir un plásmido con la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor de citomegalovirus (Pcmv) a la línea celular Caco-2, observándose la expresión de la GFP en el 1% de las células infectadas (Guimaraes *et al.*, 2005). En un trabajo subsecuente se incubó a *L. lactis* sin la capacidad de internalizarse y con un plásmido con el gen de la β -lactoglobulina bovina bajo el control del promotor viral Pcmv junto con células Caco-2. Después de la incubación se observó la expresión de la β -lactoglobulina en dicha línea celular (Guimaraes *et al.*, 2006).

Con *Lactobacillus acidophilus* portando un plásmido con el gen VP1 del virus de la fiebre aftosa, se compararon las rutas de inmunización intramuscular, intraperitoneal, intranasal y oral, reportándose que la vía que más impacto tuvo fue la intramuscular ya que se obtuvieron títulos de anticuerpos

semejantes a los que se tienen al emplear la vacuna comercial existente (Li *et al.*, 2007). Todos estos estudios prueban el potencial que tienen las bacterias lácticas como posibles vehículos para la administración de vacunas de ADN.

VACUNAS VIRALES

Las vacunas virales consisten de virus inactivados incapaces de reproducirse dentro del organismo o bien, de virus atenuados con una baja tasa de multiplicación, por lo que causan mínimos o ningún efecto secundario, la vacuna Sabin contra la polio es un ejemplo del último caso.

Desde la década de los 80's hay un creciente interés por utilizar virus como vectores para la presentación de antígenos heterólogos, especialmente por la fuerte respuesta inmune que son capaces de despertar. Se han desarrollado vectores con virus de ADN, tales como adenovirus y herpesvirus y con virus de ARN de cadena positiva como alfavirus y flavivirus. Dentro de los más utilizados se encuentran los adenovirus, virus de doble cadena de ADN que presentan una gran variedad de serotipos y de los cuales se conoce su genoma, además de que se pueden obtener altos títulos virales en cultivos tisulares e inducir respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Para poder usarlos como vectores generalmente se hacen deleciones de regiones que están involucradas con la replicación viral (Tatsis & Ertl, 2004). Estudios actuales, en los que están involucrados como posibles vectores de vacunas, abarcan diferentes agentes infecciosos causantes de enfermedades que tienen impacto a nivel mundial como el SARS y

el VIH (Catanzaro *et al.*, 2006; Kobinger *et al.*, 2007).

Otro virus utilizado es el baculovirus, cuyo genoma es circular de doble cadena e infecta principalmente a insectos, propiedad que es utilizada para la expresión y producción celular *in vitro* de proteínas recombinantes. Estudios con baculovirus como vector, involucran la fusión de un péptido o proteína heteróloga a gp64, glicoproteína de envoltura involucrada en la internalización del virus a la célula, logrando de esta forma que se incorpore la proteína de fusión a la envoltura viral. Este método, ha sido utilizado como plataforma para el transporte de proteínas antigénicas, por ejemplo la glicoproteína E2 del virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), observándose una alta producción de anticuerpos neutralizantes en modelo murino (Xu & Liu, 2008), o la proteína del circumsporozoito de *Plasmodium bergeri*, estudio en el cual se reportó la producción de anticuerpos y protección parcial en los ratones inmunizados vía intramuscular contra la infección por el parásito (Yoshida *et al.*, 2003).

Aunque son promisorios los resultados que se han obtenido hasta el momento, existe preocupación con respecto a la seguridad en la utilización de estos virus como vectores de antígenos en términos de la potente respuesta inmune que son capaces de inducir, la gran cantidad de proteínas que son capaces de sintetizar, que puedan modular o antagonizar la respuesta inmune y la capacidad que tienen algunos para transformar a la célula huésped (Bukreyev *et al.*, 2006).

Como alternativa, recientemente, se ha evaluado el potencial de un grupo de virus de ARN de cadena negativa no segmentada (NNSV) como vectores virales y que comprenden las familias *Rhabdoviridae*,

Paramyxoviridae, *Filoviridae* y *Bornavirida*. A pesar de la infectividad de su ARN genómico en cultivo celular y a la ausencia de un mecanismo ya establecido para la inserción de genes extraños, presentan múltiples características que los hacen candidatos ideales como vectores. Entre las más importantes están que algunos de estos virus son restringidos de forma natural por el huésped, se replican eficientemente en líneas celulares utilizadas para la fabricación de vacunas, pueden infectar vía intranasal induciendo IgA local e IgG sistémica, se replican en el citoplasma, pocas veces se integran al genoma del huésped y codifican de 5 a 11 proteínas, evitando problemas de modulación o antagonismo con la respuesta inmune del huésped. Los que resultan más promisorios son el virus de la parainfluenza humana, el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus de la estomatitis vesicular (Bukreyev *et al.*, 2006).

Bien sean virus de ADN o ARN, entre los diferentes sistemas de liberación de antígenos, los vectores virales recombinantes tienen enorme potencial. Su habilidad para liberar eficientemente al antígeno directamente en el citosol estimula la vía de procesamiento de antígeno en el contexto de MHC-I, induciendo en consecuencia una fuerte respuesta inmune celular y humoral contra los antígenos expresados. Por otra parte, su habilidad para infectar células blanco y tejidos de interés, su fácil liberación en mucosas (oral o nasal) y su efecto adyuvante natural debido a la inducción de citocinas y quimiocinas, los convierten en poderosas herramientas para el desarrollo de vacunas contra patógenos virales respiratorios de uso masivo en la población pediátrica (Gherardi & Esteban, 2005; Bukreyev *et al.*, 2006).

VACUNAS CON LEVADURAS

El uso de levaduras recombinantes representa una de las alternativas más atractivas como vehículo para la liberación de antígenos. Además de ser bastante estables y seguras, poseen propiedades adyuvantes intrínsecas y pueden suministrarse varias veces al huésped sin consecuencias adversas. Las levaduras son capaces de activar a las células dendríticas suministrándoles el antígeno en paquetes concentrados que son ávidamente internalizados. De ésta forma se incrementa la cantidad de antígeno disponible para el procesamiento y la presentación, que ocurre de forma eficiente por ambas vías del MHC, lo que conduce a una inmunidad a células tumorales mediada por células ayudadoras y linfocitos T citotóxicos (Saiki *et al.*, 2005; Haller *et al.*, 2007).

Una de las cepas que genera más interés es *Saccharomyces cerevisiae* ya que los componentes de su pared interactúan con receptores de macrófagos y células dendríticas. Por otra parte, es conocido que la preparación de pared celular cruda (Zymosan) regula positivamente genes proinflamatorios así como moléculas de superficie en macrófagos y células dendríticas y moléculas coestimuladoras (Haller *et al.*, 2007).

Dentro de los diferentes estudios que se han realizado, Bernstein *et al.* (2008) expresaron el antígeno carcinoembrionario humano en *S. cerevisiae* y administraron la levadura recombinante vía subcutánea a un modelo murino. De esta forma se indujo una respuesta inmune celular específica así como un rápido incremento de las moléculas MHC-II y CPAs. También se ha utilizado a *S. cerevisiae* para expresar la proteína NS3 de la envoltura del virus de la hepatitis C. En ratones inmunizados por vía subcutánea, se observó

una fuerte respuesta inmune celular mediada por linfocitos T citotóxicos y se demostró una fuerte respuesta inmune celular tipo Th1 dependiente de la dosis y los refuerzos, así como un efecto profiláctico y terapéutico de la vacuna (Haller *et al.* 2007). Como alternativa para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o cáncer, Saiki *et al.* (2005), demostraron que la levadura recombinante que expresa el autoantígeno asociado a la Degeneración Cerebral Paraneoplásica (PCD) es inmunogénico en modelo murino.

Otro aspecto interesante relacionado con el uso de levaduras para la expresión de antígenos heterólogos, es su capacidad para llevar a cabo modificaciones postraduccionales como la manosilación. Buscando la relación entre dichas modificaciones y la inmunogenicidad, Lam *et al.* (2005), mediante estudios comparativos con ovoalbúmina no manosilada derivada de *E. coli* y ovoalbúmina manosilada derivada de *Pichia pastoris*, demostraron *in vitro*, que la manosilación favorece la captura del antígeno por células dendríticas en función de la presencia de receptores de manosa en su superficie, incrementando a su vez la respuesta inmune celular

VACUNAS CON PROTOZOARIOS

La vacunación utilizando como vehículo a protozoarios no es un campo muy estudiado, probablemente debido a las ventajas que ofrecen los otros microorganismos y virus para desarrollar este tipo de sistemas, aunque es posible encontrar algunos ejemplos. En un ensayo de vacunación utilizando cepas atenuadas de *T. gondii* que expresan el antígeno KMP-11 proveniente de *Leishmania*, Ramírez *et al.*, (2001) demostraron que al

inmunizar vía intraperitoneal con el parásito, se induce la proliferación antígeno específica de células T. Aún más, al infectar al modelo murino con *Leishmania major*, se registró protección parcial contra el desarrollo de lesiones causadas por este patógeno.

De igual forma, *Leishmania tarentolae*, un parásito no patógeno para los humanos que se dirige eficientemente a las células dendríticas y órganos linfoides, fue utilizado por Breton *et al.*, (2005) para expresar la proteína Gag del VIH-1, observándose la producción de IFN- γ y la presencia de anticuerpos anti-Gag en modelo murino. Así mismo, observaron que el tamaño del vector favorece la presentación de antígeno y tiene influencia en la magnitud y calidad de la respuesta de linfocitos T, lo que habla del potencial que pueden tener este tipo de microorganismos en la búsqueda de un vehículo adecuado.

CONCLUSIONES

Actualmente se desarrollan distintos sistemas que pueden ser utilizados como vehículos y/o adyuvantes en la vacunación. Los liposomas, sales de alúmina, micropartículas de ácido poliláctico y las nanopartículas de quitosano, son algunos ejemplos de estos sistemas. Sin embargo, se conoce desde hace tiempo que los mejores estimuladores de la respuesta inmune son por excelencia los microorganismos, gracias a que presentan estructuras moleculares invariantes (LPS, CpG, ácido teicoico, etc) que son el blanco de reconocimiento del sistema inmune innato y por tanto son capaces de inducir respuesta inmune específica, ya sea de tipo celular, humoral o ambas.

Pese a que hoy en día se sigue argumentando el riesgo asociado con el uso de

microorganismos patógenos en la vacunación, la presencia en el mercado de vacunas con patógenos atenuados y los estudios realizados con microorganismos GRAS, resultan esperanzadores para el futuro de las vacunas basadas en microorganismos. Dada su versatilidad, se pueden emplear con una gran variedad de antígenos, el reto consiste en encontrar las condiciones óptimas que permitan un diseño racional de vacunas. La compatibilidad entre el antígeno y la cepa, las condiciones de cultivo, la estabilidad del sistema y su seguridad, son sólo algunos de los aspectos que hay que tener en cuenta para lograr dicho objetivo.

REFERENCIAS

Alonso S, Willery E, Renauld-Mongenie G & Loch C (2005) Production of nontypeable *Haemophilus influenzae* htra by recombinant *Bordetella pertussis* with the use of filamentous hemagglutinin as a carrier. *Infect. Immun.* 73: 4295-4301.

Al-Mariri A, Tibor A, Lestrade P, Mertens P, De Bolle X & Letesson J-J (2002) *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or p39 antigen. *Infect. Immun.* 70: 1915-1923.

Barry EM, Wang J, Wu T, Davis T & Levine MM (2006) Immunogenicity of multivalent *Shigella*-ETEC candidate vaccine strains in a guinea pig model. *Vaccine*, 24: 3727-3734.

Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Le Loir Y, Alcocer-Gonzalez JM, Tamez-Guerra RS, de Oca-Luna RM & Langella P (2004) An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in

mice after nasal administration with recombinant lactococci. *J. Med. Microbiol.* 53: 427-433.

Bernstein MB, Chakrabortya M, Wansleya EK, Guob Z, Franzusoffb A, Mostböck S, Sabzevari H, Schloma J & Hodgea JW (2008) Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (yeast-CEA) as a potent activator of murine dendritic cells. *Vaccine*, 26: 509-521.

Breton M, Tremblay MJ, Ouellette M & Papadopoulou B (2005) Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral Leishmaniasis. *Infect. Immun.* 73: 6372-6382.

Bruhn KW, Craft N & Miller JF (2007) *Listeria* as a vaccine vector. *Microbes Infect.* 9: 1226-1235.

Bukreyev A, Skiadopoulos MH, Murphy BR & Collins PL (2006) Nonsegmented negative-strand viruses as vaccine vectors. *J. Virol.* 80: 10293-10306.

Campos IB, Darrieux M, Ferreira DM, Miyaji EN, Silva DA, Arêas APM, Aires KA, Leite LCC, Ho PL & Oliveira MLS (2008) Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the pneumococcal surface protein A: induction of antibodies, complement deposition and partial protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Microbes Infect.* 10: 481-488.

Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, Cleenwerck I, Vandamme P, Takrama JS, Vancanneyt M & De Vuyst L (2007) Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(6):1809-1824.

Artículos

Catanzaro AT, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Enama ME, Moodie Z, Gu L, Martin JE, Novik L, Chakrabarty BK, Butman BT, Gall JGD, King CR, Andrews CA, Sheets R, Gomez PL, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS & The Vaccine Research Center 006 Study Team (2006) Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade hiv-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. *J. Infect. Dis.* 194: 1638-1649.

Cortes-Perez NG, Lefèvre F, Corthier G, Adel-Patient K, Langella P & Bermúdez-Humarán LG (2007) Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine*, 25: 6581-6588.

Darji A, zur Lage S, Garbe AI, Chakraborty T & Weiss S (2000) Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27: 341-349.

Detmer A & Glenting J (2006) Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards. *Microb. Cell. Fact.* 5:23.

Dietrich G, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Lang AB & Viret J-F (2003) Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine*, 21: 678-683.

Escalante A, Giles-Gómez M, Hernández G, Córdova-Aguilar MS, López-Munguía A, Gosset G & Bolívar F (2008) Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 124:126-134.

Geoffroy MC, Guyard C, Quatannens B, Pavan S, Lange M & Mercenier A (2000) Use

of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 383-391.

Gherardi MM & Esteban M (2005) Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J. Gen. Virol.* 86: 2925-2936.

Grangette C, Müller-Alouf H, Hols P, Goudercourt D, Delcour J, Turneer M & Mercenier A (2004) Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Infect. Immun.* 72: 2731-2737.

Guimaraes VD, Gabriel JE, Lefevre F, Cabanes D, Gruss A, Cossart P, Azevedo V & Langella P (2005) Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes Infect.* 7: 836-844.

Guimaraes VD, Innocentin S, Lefevre F, Azevedo V, Wal JM, Langella P & Chatel JM (2006) Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7091-7097.

Gunn GR, Zubair A, Peters C, Pan ZK, Wu TC & Paterson Y (2001) Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by hpv-16. *J. Immunol.* 167: 6471-6479.

Haller AA, Lauer GM, King TH, Kemmler C, Fiolkoski V, Lu Y, Bellgrau D, Rodell TC, Apelian D, Franzusoff A & Duke RC (2007) Whole recombinant yeast-based immunotherapy induces potent T cell

Artículos

responses targeting HCV NS3 and core proteins. *Vaccine*, 25: 1452-1463.

Ho SY, Chua SQ, Foo DGW, Loch C, Chow VT, Poh CL & Alonso S (2008) Highly attenuated *Bordetella pertussis* strain bpze1 as a potential live vehicle for delivery of heterologous vaccine candidates. *Infect. Immun.* 76: 111-119.

Isoda R, Simanski SP, Pathangey L, Stone AES & Brown TA (2007) Expression of a *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin on the surface of a *Salmonella* vaccine vector. *Vaccine*, 25: 117-126.

Jokovic N, Nikolic M, Begovic J, Jovcic B, Savic D & Topisirovic L (2008) A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. *Int. J. Food Microbiol.* 127: 305.

Kobinger GP, Figueredo JM, Rowe T, Zhi Y, Gao G, Sanmiguel JC, Bell P, Wivel NA, Zitzow LA, Flieder DB, Hohann RJ & Wilson JM (2007) Adenovirus-based vaccine prevents pneumonia in ferrets challenged with the SARS coronavirus and stimulates robust immune responses in macaques. *Vaccine*, 25: 5220-5231.

Lam JS, Mansour MK, Specht CA & Levitz SM (2005) A model vaccine exploiting fungal mannosylation to increase antigen immunogenicity. *J. Immunol.* 175: 7496-7503.

Lee JJ, Sinha KA, Harrison JA, De Hormaeche RD, Riveau G, Pierce RJ, Capron A, Wilson RA & Khan CMA (2000) Tetanus toxin fragment C expressed in live *Salmonella* vaccines enhances antibody responses to its fusion partner *Schistosoma*

haematobium Glutathione S-Transferase. *Infect. Immun.* 68: 2503-2512.

Lee SY, Choi JH & Xu Z (2003) Microbial cell-surface display. *Trends. Biotechnol.* 21: 45-52

Leibiger R, Niedung K, Geginat G, Heesemann J & Trülsch K (2008) *Yersinia enterocolitica* yop mutants as oral live carrier vaccines. *Vaccine*, 26: 6664-6670.

Li YG, Tian FL, Gao FS, Tang XS & Xia C (2007) Immune responses generated by *Lactobacillus* as a carrier in DNA immunization against foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 25: 902-911.

Li Y, Wang S, Scarpellini G, Gunn B, Xin W, Wanda SY, Roland KL & Curtiss R 3rd (2009) Evaluation of new generation *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 13:593-8.

Loeffler DIM, Schoen CU, Goebel W & Pilgrim S (2006) Comparison of different live vaccine strategies in vivo for delivery of protein antigen or antigen-encoding DNA and mRNA by virulence-attenuated *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 74: 3946-3957.

Loessner H, Endmann A, Leschner S, Bauer H, Zelmer A, zur Lage S, Westphal K & Weiss S (2008) Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. *Int. J. Med. Microbiol.* 298: 21-26.

Maassen CB, Holten-Neelen C, Balk F, Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJ, Classen E (2000) Strain-dependent induction of cytokine profiles in

the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine*, 18: 2613-2623.

Medina E & Guzmán CA (2001) Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine*, 19: 1573-1580.

Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M & Koide Y (2004) Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and mpb/mpm51. *Infect. Immun.* 72: 2014-2021.

Morello E, Bermúdez-Humarán LG, V. Solé DL, Miraglio N, Langella P & Poquet I (2008) *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14: 48-58.

Osorio M, Bray MD & Walker RI (2007) Vaccine potential for inactivated shigellae. *Vaccine*, 25: 1581-1592.

Pantheil K, Meinel KM, Domènech VES, Geginat G, Linkemann K, Busch DH & Rüssmann H (2006) Prophylactic anti-tumor immunity against a murine fibrosarcoma triggered by the *Salmonella* type III secretion system. *Microbes Infect.* 8: 2539-2546.

Pantheil K, Meinel KM, Domènech VES, Trülzsch K & Rüssmann H (2008) *Salmonella* type III-mediated heterologous antigen delivery: A versatile oral vaccination strategy to induce cellular immunity against infectious agents and tumors. *Int. J. Med. Microbiol.* 298: 99-103.

Qu D, Wang S, Cai W, Du A (2008) Protective effect of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vaccine*, 26:4541-4548.

Ramírez JR, Gilchrist K, Robledo S, Sepúlveda JC, Moll H, Soldati D & Berberich C (2001) Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the *Leishmania* antigen kmp-11 elicit a specific immune response in balb/c mice. *Vaccine*, 20: 455-461.

Saiki M, Sakai K, Saiki S, Kitagawa Y, Nakanishi M & Hirose G (2005) Induction of humoral responses specific for paraneoplastic cerebellar degeneration-associated antigen by whole recombinant yeast immunization. *J. Autoimm.* 24: 203-208.

Scavone P, Miyoshi A, Rial A, Chabalgoity A, Langella P, Azevedo V & Zunino P (2007) Intranasal immunisation with recombinant *Lactococcus lactis* displaying either anchored or secreted forms of *Proteus mirabilis* MrpA fimbrial protein confers specific immune response and induces a significant reduction of kidney bacterial colonisation in mice. *Microbes Infect.* 9: 821-828.

Sim ACN, Lina W, Tana GKX, Sima MST, Chowb VTK & Alonso AS (2008) Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen. *Vaccine.* 26: 1145-1154.

Singh R, Dominiacki ME, Jaffee EM & Paterson Y (2005) Fusion to listeriolysin O and delivery by *Listeria monocytogenes*

Artículos

enhances the immunogenicity of her-2/neu and reveals subdominant epitopes in the fvb/n mouse. *J. Immunol.* 175: 3663-3673.

Stevenson A & Roberts M (2004) Intranasal immunisation against tetanus with an attenuated *Bordetella bronchiseptica* vector expressing frgc: Improved immunogenicity using a bvg-regulated promoter to express frgc. *Vaccine*, 22: 4300-4305.

Tatsis N & Ertl HCJ (2004) Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol. Ther.* 10: 616-629.

Vecino WH, Quanquin NM, Martinez-Sobrido L, Fernandez-Sesma A, Garcia-Sastre A, Jacobs Jr. WR, Fennelly GJ (2004) Mucosal immunization with attenuated *Shigella flexneri* harboring an influenza hemagglutinin DNA vaccine protects mice against a lethal influenza challenge. *Virology*, 325: 192-199.

Wells JM & Mercenier A (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 349-362.

Wiedig CA, Kramer U, Garbom S, Wolf-Watz H & Autenrieth IB (2005) Induction of CD8⁺ T cell responses by *Yersinia* vaccine carrier strains. *Vaccine*, 23: 4984-4988.

Xiang R, Luo Y, Niethammer AG & Reisfeld RA (2008) Oral DNA vaccines target the tumor vasculature and microenvironment and suppress tumor growth and metastasis. *Immunol. Rev.* 222: 117-128.

Xu XG & Liu HJ (2008) Baculovirus surface display of E2 envelope glycoprotein of classical swine fever virus and

immunogenicity of the displayed proteins in a mouse model. *Vaccine*, 26: 5455-5460.

Yam KK, Pouliot P, N'diaye MM, Fourniera S, Olivier M & Cousineau B (2008) Innate inflammatory responses to the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*. *Vaccine*, 26: 2689-2699.

Yoshida S, Kondoh D, Arai E, Matsuoka H, Seki C & Tanaka T (2003) Baculovirus virions displaying *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein protect mice against malaria sporozoite infection. *Virology*, 316: 161-170.