



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA



TRABAJO FIN DE GRADO
“VACUNAS DE BACTERIAS RECOMBINANTES VIVAS”

MARINA BLANCO LEÓN



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

“VACUNAS DE BACTERIAS RECOMBINANTES VIVAS”

MARINA BLANCO LEÓN

SEVILLA, 5 DE JULIO DEL 2016

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

TUTOR: IGNACIO RODRÍGUEZ LLORENTE

TRABAJO DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. RESUMEN:

La vacunación es uno de los logros más importantes en la historia de la medicina, que ha ido evolucionando a lo largo de los años permitiendo una reducción significativa de la mortalidad infantil, una disminución de la incidencia de enfermedades e incluso la erradicación de algunas de ellas en países enteros. Las vacunas de nueva generación surgen para reducir o eliminar las carencias de las vacunas “tradicionales”. Técnicas biotecnológicas basadas en el ADN recombinante han dado lugar, entre otras, a las vacunas de bacterias recombinantes vivas. Estas vacunas pueden ser de dos tipos: las bacterias modificadas genéticamente, que proporcionaran inmunidad contra la enfermedad que causan o, bacterias ya sean patógenas o no, que portan ADN heterólogo para la producción de un antígeno contra el que queremos inmunizar. Esta fusión entre la tecnología de ADN recombinante y el uso de vectores bacterianos ofrece múltiples ventajas tanto desde el punto de vista logístico y comercial como inmunológico.

En el presente trabajo se ha realizado una recopilación de los principales vectores bacterianos usados hasta la fecha, además de una selección de los artículos de investigación sobre este tipo de vacunas, en base a las enfermedades consideradas de mayor relevancia.

Palabras clave: Vector, bacteria recombinante viva, vacuna.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1. PRINCIPIOS DE LA VACUNACIÓN.....	7
2.2. TIPOS DE VACUNA.....	9
2.2.1. VACUNAS CLÁSICAS.....	9
2.2.1.1. VACUNAS ATENUADAS.....	9
2.2.1.2. VACUNAS INACTIVADAS.....	10
2.2.1.3. VACUNAS SUBUNIDAD.....	10
2.2.2. VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN.....	10
2.2.2.1. NECESIDAD DE GENERAR NUEVAS VACUNAS.....	10
2.2.2.2. VACUNAS ATENUADAS MEDIANTE MODIFICACIÓN GENÉTICA.....	11
2.2.2.3. VACUNAS ANTI-IDIOTIPO.....	11
2.2.2.4. VACUNAS SINTÉTICAS.....	11
2.2.2.5. VACUNAS DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS RECOMBINANTES.....	11
2.2.2.6. VACUNAS COMESTIBLES.....	11
2.2.2.7. VACUNAS GÉNICAS.....	12
2.2.2.8. VENTAJAS FRENTE A LAS VACUNAS TRADICIONALES.....	14
3. OBJETIVOS.....	14
4. METODOLOGÍA.....	14
5. RESULTADOS.....	14
5.1. PRINCIPALES VECTORES BACTERIANOS USADOS EN VACUNAS RECOMBINANTES.....	14
5.1.1. BACTERIAS PATÓGENAS ATENUADAS.....	14
5.1.1.1. <i>Salmonella</i>	15
5.1.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	16
5.1.1.3. Bacilo Calmette-Guerin.....	17

5.1.1.4. <i>Shigella</i>	18
5.1.1.5. <i>Vibrio cholerae</i>	18
5.1.1.6. <i>Yersinia enterocolitica</i>	19
5.1.1.7. <i>Bacillus anthracis</i>	20
5.1.2. BACTERIAS COMENSALES	20
5.1.2.1. BACTERIAS DE ÁCIDO LÁCTICO	20
5.1.2.2. <i>Streptococcus gordonii</i>	22
5.2. ESTUDIOS DE VACUNAS CON BACTERIAS RECOMBINANTES VIVAS	23
5.2.1. CÁNCER	23
5.2.2. VIH	24
5.2.3. LEISHMANIOSIS	25
5.2.4. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)	26
5.2.5. NEUMONÍA BACTERIANA	27
5.2.6. DIABETES	28
6. CONCLUSIONES	29
7. BIBLIOGRAFÍA	30

2. INTRODUCCIÓN

Para hablar de vacunación tenemos que remontarnos a 1796, cuando Edward Jenner inoculó a un niño de 8 años el virus de la viruela procedente de una lechera contagiada por la viruela bovina. Aunque al principio parecía que el niño empeoraba, al cabo de 9 días se recuperó totalmente, e incluso Jenner, para cerciorarse de que estaba inmunizado, volvió a inocularle el virus y no se produjo ningún tipo de reacción (The college of physicians, 2016).

Pero no fue hasta más de 80 años después, cuando Louis Pasteur (Figura 1) descubrió el método de atenuación de las cepas bacterianas, en concreto, de cepas del cólera aviar, produciendo así la primera vacuna de laboratorio. También se le atribuye la primera vacuna contra la rabia (The college of physicians, 2016).



Figura 1. El químico y bacteriólogo francés Louis Pasteur (Morán, 2014).

El médico español Jaime Ferrán creó en 1885 la primera vacuna en inmunizar a humanos frente a una enfermedad bacteriana, el cólera, producida por *Vibrio cholerae*; dicha vacuna fue preparada cultivando bacterias tomadas de heces de personas enfermas con cólera. Durante toda su carrera también desarrolló vacunas contra el tétanos, tuberculosis o tifus, entre otras (The college of physicians, 2016).

2.1 PRINCIPIOS DE LA VACUNACIÓN

El sistema inmunitario es el encargado de proteger al organismo de la agresión de los microorganismos patógenos, mediante una diversidad de sistemas que se encuentran interrelacionados entre sí y que representan las diferentes barreras frente a la infección (Genoma España, 2004).

Dentro de este sistema inmune encontramos dos tipos de inmunidad:

- ✚ INMUNIDAD INNATA: Es aquella que no necesita contacto previo con el antígeno para ser desarrollada, se trata de una respuesta primaria.
- ✚ INMUNIDAD ADQUIRIDA: Se trata de una inmunidad con memoria, es decir, necesita un contacto previo con el antígeno para poder activarse. Se trata de una respuesta secundaria y es la que nos interesa en el caso de la vacunación (Genoma España, 2004).

La inmunización puede realizarse de manera ACTIVA o PASIVA, dependiendo de si nuestro sistema inmune ha necesitado activarse o se trata de una transferencia directa de anticuerpos (ej.: la transferencia de inmunidad a través de la leche materna) (Genoma España, 2004).

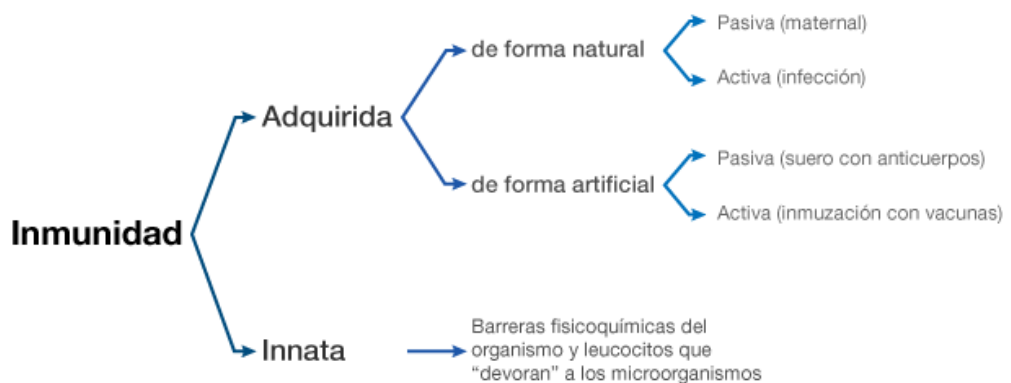


Figura 2. Esquema de la inmunidad (IES, 2016).

La vacunación es el proceso que permite generar una resistencia a una enfermedad infecciosa y consiste en imitar una infección por medio del agente patógeno contra el cual se desea proteger. Para ello, se inocular al hospedador gérmenes atenuados, inactivados o fracciones de estos que simulan el proceso del primer contacto. A partir de ese momento el sujeto quedaría sensibilizado adquiriendo una memoria inmune, por lo tanto, en caso de nuevo contacto con el patógeno se produciría una respuesta de tipo secundario, evitando así todo el proceso de la puesta en marcha de la respuesta adquirida, ya que tenemos los anticuerpos creados (OMS, 2016; Genoma España, 2004).

Hay tres respuestas secuenciales frente a la vacunación:

a) Inducción de cascadas proteolíticas que tratan de aislar el cuerpo extraño (complemento, calicreína y sistema de coagulación).

b) Reconocimiento y captación del microorganismo o el antígeno por las células fagocíticas.

c) Inducción de una respuesta humoral por liberación de péptidos antimicrobianos.

El sistema inmune presenta algunos elementos almacenados y listos para su excreción (proteína C reactiva, sistema del complemento y anticuerpos naturales), aunque hay otros que necesitan una activación para su síntesis (neutrófilos, macrófagos, linfocitos T) (Gil y cols, 2009)

Existen dos conceptos importantes, la inmunogenicidad y la reactogenicidad de las vacunas. El primero hace referencia a como las vacunas son capaces de inducir una respuesta inmunitaria detectable, es decir alcanzar el nivel suficiente de anticuerpos para estar protegidos frente a la enfermedad para la cual nos hemos vacunado. Y el segundo define la seguridad de las vacunas y se mide en función de las reacciones adversas sistémicas y locales que la vacuna puede producir tras su administración (Gil y cols, 2009).

2.2 TIPOS DE VACUNAS

2.2.1. VACUNAS CLÁSICAS

2.2.1.1. ATENUADAS

Son vacunas que están formadas por microorganismos que han perdido su capacidad de virulencia, pero que conservan suficiente carga antigénica como para producir una respuesta inmune. Suelen producir una inmunización duradera y eficaz puesto que la respuesta causada en el organismo es muy similar a la originada en la enfermedad natural (Gil y cols, 2009).

La atenuación de dichos microorganismos debe ser por tanto lo suficientemente fuerte como para que no produzca la enfermedad, pero no tanto

como para que se destruyan los componentes antigénicos que dan lugar a la respuesta inmune. Algunos ejemplos de métodos de atenuación son: utilización de microorganismos que son patógenos en animales pero no en el ser humano y que mantienen una inmunidad cruzada entre ambos, atenuación por mutagénesis, atenuación por reasortado o recombinación, etc. (Salleras, 2002).

2.2.1.2. INACTIVADAS:

Este tipo de vacunas están formadas por la inactivación ya sea química o física de los microorganismos, producen una inmunización más leve que las anteriores, y para mantener un correcto nivel de anticuerpos es necesario varias dosis, pero no se corre el riesgo de contraer la enfermedad después de la vacunación y son más estables (Alfabet, 2003).

2.2.1.3. SUBUNIDAD:

Son aquellas vacunas utilizadas cuando se ha identificado que parte del microorganismo es la que produce la respuesta inmune, por lo tanto se aísla dicha parte y así no se corre el riesgo de desencadenar la enfermedad en el paciente una vez vacunado (INAEI, 2013).

2.2.2. VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN:

2.2.2.1. NECESIDAD DE GENERAR NUEVAS VACUNAS:

Las principales limitaciones para la producción y administración de las vacunas clásicas son:

- ✚ Necesidad de grandes medidas de seguridad, tanto para el personal para no contaminarse, como en la producción en donde la atenuación puede revertirse y se requieren continuos ensayos para evitarlo, además de que existe también el riesgo de que los microorganismos no estén completamente inactivados, lo que conllevaría a la dispersión de la enfermedad.
- ✚ No todos los agentes infecciosos crecen en cultivo.
- ✚ Requiere el cultivo del tejido en células de mamífero para su producción.

- ✚ La gran mayoría de las vacunas requieren refrigeración para mantener su potencia, ello supone un problema en países poco desarrollados (ArgenBio, 2007).

2.2.2.2. VACUNAS ATENUADAS MEDIANTE MODIFICACIÓN GENÉTICA:

Estas vacunas están desarrolladas aislando el fragmento de ADN del microorganismo responsable de su patogenicidad, para que pueda ser modificado o eliminado. Puede realizarse tanto en bacterias como en virus, aunque en las primeras es más difícil puesto que presentan un genoma de mayor tamaño (Genoma España, 2004).

2.2.2.3. VACUNAS ANTIDIOTIPO:

Estas vacunas están basadas en unos anticuerpos que reproducen la morfología del antígeno y por lo tanto, producen la respuesta inmune. Los anticuerpos son obtenidos inyectando a un animal el antígeno elegido, así este reacciona produciendo anticuerpos contra él, que son los llamados anticuerpos anti-idiotipo (Genoma España, 2004).

2.2.2.4. VACUNAS SINTÉTICAS:

Las vacunas sintéticas se desarrollan a través de ingeniería genética, identificando los fragmentos del ADN que presentan suficiente capacidad inmunológica, copiándolos y sintetizándolos con la ayuda de anticuerpos monoclonales (Genoma España, 2004).

2.2.2.5. VACUNAS DE PROTEÍNAS Y PEPTIDOS RECOMBINANTES:

En este tipo de vacunas lo que buscamos es mediante la tecnología del ADN recombinante aislar los genes de las proteínas de superficie del microorganismo contra el que nos queremos inmunizar. Estos genes son introducidos en bacterias, levaduras o plantas para que estas produzcan dicha proteína en grandes cantidades, que luego una vez purificada será empleada como vacuna (Genoma España, 2004).

2.2.2.6. VACUNAS COMESTIBLES:

Se trata de plantas a las que se le ha introducido mediante ingeniería genética los genes para producir a su interior una proteína antigénica. Así pues, las plantas

pueden ser cultivadas de manera normal para posteriormente ser consumidas por humanos y animales quedando en principio inmunizados (Saludemia, 2016).

2.2.2.7. VACUNAS GÉNICAS:

Las vacunas génicas son aquellas en las que los genes que codifican el antígeno que produce la inmunidad son introducidos en vectores gracias a la tecnología del ADN recombinante. Estos vectores pueden ser de dos tipos: vectores vivos (Virus o bacterias atenuadas) o plásmidos (Genoma España, 2004).

Hoy en día existen muchos tipos de microorganismos que pueden ser usados como vectores, los más importantes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de los vectores bacterianos y víricos más usados (Adaptado de Tregnagbi, 2002; Plotkin, 2002).

BACTERIAS	VIRUS
<i>Listeria monocytogenes</i>	Poxvirus aviares
<i>Salmonella spp.</i>	Adenovirus
<i>Vibrio cholerae</i>	Varicela-Zoster
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Vaccinia
<i>Lactobacillus spp.</i>	Influenza
<i>Streptococcus gordonii</i>	Flavivirus
<i>Lactococcus lactis</i>	Virus hepatitis B

Para la elección del vector debemos tener en cuenta ciertos aspectos como el tamaño del genoma, la capacidad replicativa, la patogenicidad del vector recombinante y la estabilidad genética (Salleras, 2002).

2.2.2.8. VENTAJAS FRENTE A LAS VACUNAS TRADICIONALES:

Con las vacunas de nueva generación, y en concreto con vacunas recombinantes, obtenemos varios beneficios tales como: la mayor facilidad de

producción y el bajo coste. Dichas vacunas pertenecen a los grupos génicas y de modificación genética (De Dios, 2014).

Además, con el uso de vectores bacterianos obtenemos el gran beneficio de que pueden administrarse vía oral. Las ventajas en comparación con la administración parenteral se discuten en la Tabla 2.

Tabla 2. Ventajas de la administración oral de vacunas frente a la administración parenteral (Adaptado de Medina y Guzman, 2001).

<u>ADMÓN. ORAL</u>	<u>ADMÓN. PARENTERAL</u>
Fácil administración	Requiere personal especializado para la administración
Sin contaminación cruzada/ Seguridad aumentada	Mayor riesgo de contaminación cruzada
Protección frente a la enfermedad y la infección	Protección principalmente de la enfermedad
Mayor aceptación → Mayor cumplimiento	Dolor=Menor aceptación → Menor cumplimiento
Menor reactogenicidad	Generalmente mayor reactogenicidad
Respuesta tanto sistémica como mucosa estimulada	Únicamente es estimulada la respuesta sistémica

Aparte de los beneficios descritos anteriormente en la tabla se asocian otros a la utilización de vectores bacterianos en vacunas recombinantes tales como el relativo bajo coste de su fabricación, además de que son muy adecuados para la administración a gran escala tanto en países desarrollados como en desarrollo. Los vectores bacterianos actualmente usados en humanos son sensibles a los antibióticos, por lo tanto, si en algún momento se produjera una reacción adversa en el ensayo de vacunación a gran escala, a diferencia de con los vectores virales, tendrían un tratamiento antibiótico (Shata y cols, 2000).

3. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo se van a dividir en:

- ✚ Revisión bibliográfica de los diferentes tipos de vectores bacterianos que existen en la actualidad, haciendo referencia a su utilización como vacunas contra la propia enfermedad que producen y otras futuras aplicaciones como vacunas recombinantes.
- ✚ Revisión bibliográfica de los principales estudios sobre vacunas recombinantes bacterianas que hay en la actualidad, clasificándolo en base a las enfermedades frente a las que se desarrollan.

4. METODOLOGÍA

El presente trabajo de revisión bibliográfica se basa en una búsqueda exhaustiva de artículos científicos, tanto de carácter experimental como de revisión bibliográfica, en buscadores certificados como Pubmed, google académico, Science direct y Medline.

Los principales términos utilizados para la búsqueda han sido: “vaccine”, “recombinant”, “bacterial”, “vector”, “attenuated”. A partir de ellos y su combinación se ha seleccionado la información más importante en base a la fecha de los artículos, el número de veces que ha sido citado, el prestigio de la editorial de publicación, consiguiendo así una completa revisión de tema.

5. RESULTADOS

5.1. PRINCIPALES VECTORES BACTERIANOS UTILIZADOS EN VACUNAS RECOMBINANTES:

Se van a diferenciar los vectores según sean bacterias patógenas atenuadas o bacterias comensales:

5.1.1. BACTERIAS PATÓGENAS ATENUADAS

5.1.1.1. *Salmonella*

Es un grupo amplio de microorganismos de tipo gram negativo, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos móviles, intracelulares facultativos restringidos al compartimento endosomal de las células eucariotas, resistentes a los mecanismos de eliminación no específicos y capaces de producir gastroenteritis en humanos y animales (Medina y Guzmán, 2001).

En una infección por *Salmonella*, que típicamente es contraída al comer o beber alimentos contaminados, el microorganismo sobrevive a los pHs ácidos del estómago consiguiendo llegar con facilidad al intestino, que es donde se produce su absorción y, por lo tanto, el daño. Una vez atravesado el epitelio intestinal, *Salmonella* ha desarrollado dos formas de protegerse frente a los macrófagos: la primera es que consigue sobrevivir dentro de la vacuola fagocítica y la segunda es que induce la apoptosis del macrófago; todo esto consigue una inflamación local y una aumentada respuesta inmune. La característica más importante de *Salmonella* es la capacidad de inducir una respuesta de células CD8+ del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) con un antígeno específico (Figueroa y Verdugo, 2005).

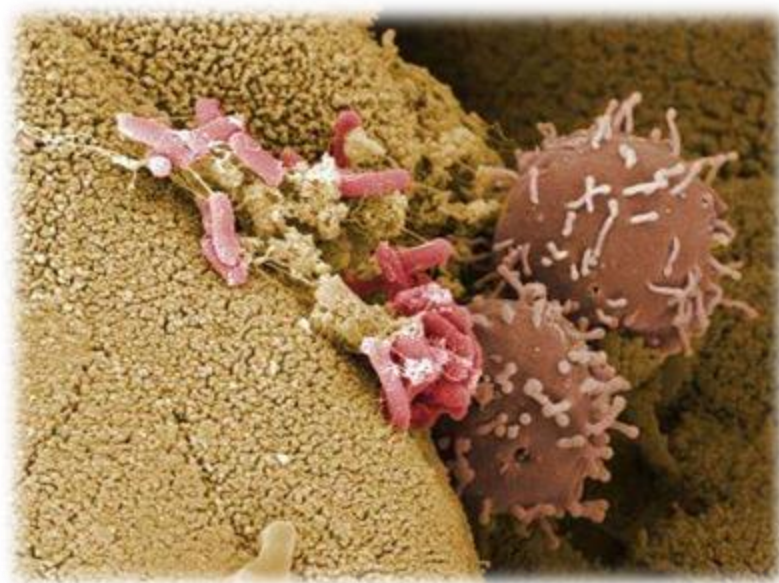


Figura 3. El microorganismo *Salmonella typhimurium* (rosa) en un intestino de ratón infectado (PHYS ORG, 2013).

Los serotipos más estudiados de *Salmonella* son: *Salmonella typhimurium* (Figura 3) y *Salmonella typhi*, y algunas de las mutaciones realizadas para su atenuación son por ejemplo afectar al sistema regulatorio *phoP/phoQ*, que es necesario para la supervivencia de *S.typhimurium* ya que contiene genes de regulación de péptidos antimicrobianos, eliminación de nutrientes o de modificación del lipopolisacárido (Shahabi y cols, 2010). Otros ejemplos son la mutación de los genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos o purinas, en la adenilato ciclasa, en el receptor proteico del AMPc o remover la adenilato metilasa del ADN (Medina y Guzman, 2001).

5.1.1.2. *Listeria monocytogenes*

Se trata de un patógeno intracelular, cocobacilo gram positivo, anaerobio facultativo, móvil, no esporulado con una amplia distribución en la naturaleza (Torres y cols, 2005). Su vía de infección natural es la oral y la translocación se produce a través del epitelio intestinal antes de la diseminación sistémica. La bacteria entra en las células a través de las internalinas, que son unas moléculas de superficie que facilitan la entrada en las células no fagocíticas como las epiteliales y los hepatocitos (Bruhn y cols, 2007).

L.monocytogenes produce una fuerte respuesta inmune tanto innata como adaptativa (Guillén y cols, 2009) y ha sido considerada como el prototipo para inducir una respuesta de clase 1 por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Estimula el sistema inmune tanto para sus proteínas como para antígenos co-expresados, hecho facilitado gracias a su capacidad para romper el citoplasma de las células infectadas (Medina y Guzmán, 2001). Esta capacidad es debida a la listeriolisina O (LLO) codificada por el gen *hyl*, uno de los mejor caracterizados de su virulencia. Otro de los genes que ayuda a la diseminación de *Listeria* en el organismo es el *actA*, que codifica la proteína nucleasa actina A. Existen múltiples estrategias basadas en la mutación de estos genes para construir vectores de *Listeria* que expresen de forma estable antígenos recombinantes (Shahabi y cols, 2010; Portnoy y cols, 1992).

Ha sido ampliamente estudiado contra infecciones virales (Virus del papiloma humano) y en supresión de tumores (Guillén y cols, 2009).

5.1.1.3. Bacilo Calmette-Guerín

Se trata de un bacilo gran positivo perteneciente a la familia *Mycobacteriaceae* (Figura 4), ácido-alcohol resistente, aerobios estrictos, inmóviles, no formadores de esporas ni cápsulas y de crecimiento lento (Instituto nacional, 2012).

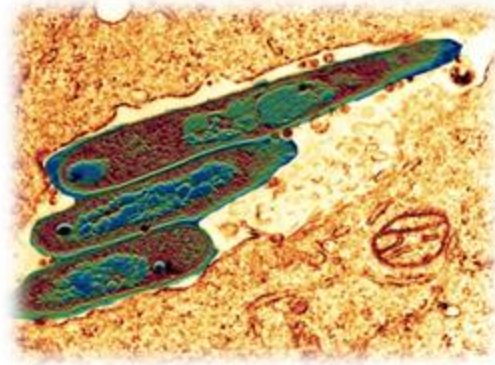


Figura 4. Bacilo Calmette-Guerin en el interior de un macrófago (Max-planck-gesellschaft, 2013)

El principal papel de este microorganismo es como vector para la vacuna contra la tuberculosis, en la que los científicos Albert Calmette y Camille Guérin tardaron más de 13 años de investigación, llamando finalmente a la cepa atenuada bacilo Calmette-Guérin (BCG). Las principales razones por las que esta cepa es un buen vector bacteriano son:

- 1.- Es la vacuna más usada en el mundo, desde 1948 unos 2.500 millones de personas la han tomado con una tasa baja de incidencias graves.
- 2.- Se puede administrar en cualquier momento después del nacimiento y no está afectada por los anticuerpos maternos.
- 3.- Únicamente se requiere una toma y esta puede llegar a proteger entre 5-10 años.
- 4.- Es la más estable al calor de las vacunas vivas.
- 5.- Gran capacidad para albergar grandes fragmentos de ADN extraño.
- 6.- Produce una fuerte respuesta inmune celular y humoral (Shata y cols, 2000).

Están siendo estudiadas vacunas con este microorganismo contra el VIH, la enfermedad de Lyme y la malaria, entre otras. Actualmente se encuentran todas en

fase de ensayo clínico pero la tecnología para realizarlas se encuentra recientemente disponible (Matsuo y Yasutomi, 2011).

5.1.1.4. *Shigella*

Shigella es un género bacteriano perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, integrado por bacterias de forma bacilar, no esporuladas, inmóviles, pero con movimiento pendular (oscilación) *in situ*. Son gram negativos, aerobios-anaerobios facultativos, citocromo-oxidasa negativos y no crecen en el medio cianuro potásico (USAL, 2016).

Aunque ha recibido poca atención como vector en vacunas, el reciente desarrollo de la genética recombinante ha hecho que se vuelva a considerar. Las principales características que lo hacen posible son: su facilidad para escapar del endosoma, entrando directamente en las células hospedadoras y que se tejido diana es la mucosa del colon, lo que produce una fuerte respuesta inmune tanto sistémica como de la propia mucosa (Shata y cols, 2000).

La cepa estudiada y disponible actualmente para vacunas en roedores, primates y humanos es *Shigella flexneri*, en la que múltiples estudios afirman que es capaz de portar ADN eucariótico (Shata y cols, 2000). Algunas de las atenuaciones realizadas en esta cepa son, por ejemplo, mutaciones que alteran la producción citosólica (Hantman y cols, 1999), la capacidad de propagarse de una célula a otra o la capacidad de producir enterotoxinas (Kotton y Hohmann, 2004).

5.1.1.5. *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae (Figura 5) es el agente causal del cólera, forma parte de la familia *Vibrionaceae*, es un bacilo gran negativo aerobio facultativo. Su estructura antigénica consiste en antígeno flagelar H y un antígeno somático O. Este último, permite la diferenciación entre cepas patógenas y no patógenas (Ulloa, 2016).

A diferencia de muchos patógenos entéricos, *V.cholerae* no invade la mucosa sino que coloniza la superficie del intestino delgado donde secreta la toxina del cólera, que es la causante de la diarrea acuosa, este hecho puede considerarse como una debilidad porque disminuye la interacción con los compartimentos inmunes más profundos, o como una ventaja puesto que así se disminuye su patogenicidad. Por ello

V.cholerae puede ser el más adecuado para la presentación de antígenos relevantes para los organismos luminales, en lugar de infecciones que invaden vía sistémica y / o requieren una fuerte respuesta inmune para la presentación del antígeno (Kotton y Hohmann, 2004).



Figura 5. Bacteria *Vibrio cholerae* en una superficie de quinina (École, 2015).

Se han producido numerosas cepas de *V.cholerae* con técnicas de ADN recombinante, un ejemplo es la cepa CVD 103-hgR que no expresa la subunidad que activa enzimáticamente la toxina del cólera y contiene un gen de resistencia al mercurio (lo que permite una fácil identificación de la cepa), esta es utilizada como vacuna oral contra la propia enfermedad del cólera, pero en forma de vacuna inactivada (Ryan y Calderwood, 2000).

Otro ejemplo del uso de *V.cholerae* es en el desarrollo de una vacuna contra la sigelosis, en el que se usó la cepa anteriormente mencionada como vector del fragmento antígeno-O de *Shigella sonnei*. La vacunación con esta cepa recombinante resultó en la obtención de altas concentraciones de anticuerpos antígenos-O específicos en los animales vacunados (Medina y Guzmán, 2001).

5.1.1.6. *Yersinia enterocolitica*

Es un patógeno entérico que invade el tejido intestinal, capaz de resistir a los mecanismos de eliminación del hospedador. Esta invasión depende en gran medida de la presencia de un plásmido de virulencia (Paerregaard y cols, 1991), que es el que

codifica la síntesis de los determinantes de la virulencia, proteínas sintetizadas durante la fase de invasión que son capaces de estimular una fuerte respuesta inmune. Los genes de dichas proteínas son la diana para la atenuación de la bacteria (Medina y Guzmán, 2001).

Algunas de las características que hacen que *Y. enterocolitica* sea un buen vector en vacunas es que es capaz de persistir en el tejido durante varios días después de la inmunización y que se replica el ADN desnudo de la vacuna durante su división lo que aumenta la cantidad de ADN plasmídico (Al-Marini y cols, 2004).

5.1.1.7. *Bacillus anthracis*

Este microorganismo es una bacteria formadora de esporas gram positiva y responsable del ántrax. Se trata de un patógeno extracelular, en el que su virulencia depende de la secreción de dos endotoxinas y la producción de una capsula antifagocitaria, codificados en los plásmidos pOX1 y pOX2, respectivamente (Sirard y cols, 1997b).

Se han estudiado dos modelos en los que *B. anthracis* actúa como vector:

- ✚ El primero fue desarrollado por Sirard y cols (1997b), y en él introducen genes que codifican componentes de *Clostridium perfringens*, lo que conlleva a una protección frente a las toxinas iota de dicha bacteria.
- ✚ En el segundo también realizado por Sirard y cols (1997a), se introducen genes de *L. monocytogenes* para la protección frente a esta bacteria (Brossier y cols, 1999).

Las cepas atenuadas de *B. anthracis* expresando antígenos heterólogos muestra un potencial significativo en el desarrollo de vacunas veterinarias (Medina y Guzmán, 2001).

5.1.2. BACTERIAS COMENSALES:

5.1.2.1. Bacterias de ácido láctico

Las bacterias lácticas son un grupo heterogéneo de microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza, por lo general son bacilos o cocos gram positivos, anaerobios, no esporulados, no móviles y que producen como único y

principal producto de la degradación de los carbohidratos el ácido láctico (Carr y cols, 2002; Vázquez y cols, 2009).

En la década de los 80, cuando comenzó la investigación de los vectores bacterianos, se usaron los microorganismos patógenos atenuados (Curtiss, 2002); pero estos, aunque ya no tienen tanta virulencia, siguen siendo inmunogénicos y para pacientes no inmunocompetentes, tales como bebés, ancianos o inmunodeprimidos, constituye una vía menos segura y por ello comenzaron a investigar con las bacterias de ácido láctico. Ya que estas son ampliamente utilizadas en la industria y presentan una baja inmunogenicidad (Konings, y cols, 2000; Ross y cols, 2002; Schnuren y Magnusson, 2005)

En los últimos 20 años numerosos estudios han demostrado las diferentes aplicaciones de estas bacterias en su utilización como vectores, principalmente como vacunas orales, ya que presentan muy buenas características: no son patógenos y son fácilmente modificables genéticamente (LeBlanc, 2013). Las dos especies por las que se ha mostrado un mayor interés son:

✚ **Lactococcus lactis**: Es un microorganismo ampliamente usado en la industria alimentaria y es considerado como el modelo de las bacterias de ácido láctico, ya que se han desarrollado numerosas herramientas genéticas para que pueda expresar proteínas heterólogas (Bermúdez-Humaran y Langella, 2004).

Las cepas de laboratorio más comúnmente usadas son: MG1363 y IL1403, están libres de plásmidos (Gasson, 1983; Chopin y cols, 1984) y sus genomas han sido completamente secuenciados (Bolotin y cols, 2001; Wegmann y cols, 2007).

La primera investigación del uso de una cepa recombinante de *L. lactis* como una vacuna mucosa fue realizado en 1990 con una bacteria no viable a la que se le introduce los genes del antígeno de superficie de *Streptococcus mutans* (Iwaki y cols, 1990), a partir de ese momento se han escrito una media de 20 artículos por año sobre el tema, lo que revela el gran éxito de este microorganismo como vector (LeBlanc y cols, 2013).

✚ *Lactobacillus spp.*: Existen más de 80 especies diferentes de este género, que difieren en muchas propiedades, lo que produce muchas diferencias de ADN entre sí, esta es una de las razones por las que este género ha sido menos estudiado (LeBlanc y cols, 2013).

Pero a lo largo de los últimos años se ha comenzado a investigar y algunas de las ventajas que encontramos es que pueden permanecer mayor tiempo en el intestino y algunas de las cepas presentan propiedades probióticas (Gareau y cols, 2010; Kechaou y cols, 2013).

Streptococcus gordonii

Se trata de un microorganismo comensal de la cavidad bucal y placa dental humana, además también puede encontrarse en la zona de la faringe y nasofaringe, es uno de las primeras bacterias de la flora dental ya que suele aparecer alrededor de los 6 meses de edad. Esto hace que durante su colonización no tenga prácticamente competencia, y es una característica que puede utilizarse para su uso como vectores y, en concreto, en las vacunas orales (Carlsson y cols, 1970; Smith y Taubman, 1992). Otra de las ventajas que tiene el uso de *S.gordonii* como vector es su fácil administración oral, ya que se eliminan las manifestaciones locales (tales como rojeces, hinchazón...) y que no produce manifestaciones sistémicas (fiebre, malestar general, dolor de cabeza...) (Lee, 2003).

Existen dos formas de expresar antígenos heterologos en *S.gordonii*, el primero se basa en localizar en la superficie el antígeno bien usando la proteína M6 de *Streptococcus pyogenes* (Sharma y cols, 2001) o el antígeno P1 de *Streptococcus mutans* (Lee y cols, 1999), la segunda opción es la de expresar el antígeno en forma de proteína soluble excretada en el medio (Lee, 2003).

Algunos ejemplos del uso de *S.gordonii* como vector puede ser el estudio realizado por Sharma y colaboradores en 2001 en el que usaron una cepa de *S.gordonii* para expresar el antígeno FimA de *Porphyromonas gingivalis* (microorganismo gram negativo causante de la periodontitis) e inducir una respuesta inmune en ratas. Otro estudio fue el de Medaglini y colaboradores (2001) que usaron una *S.gordonii* para expresar el fragmento C de la toxina tetánica (Lee, 2003).

5.3. ESTUDIOS DE VACUNAS CON BACTERIAS RECOMBINANTES VIVAS:

Para que una vacuna pueda ser comercializada es necesario que presente una serie de características (que son llevadas a cabo en los estudios preclínicos y en los ensayos clínicos) que son:

- ✚ Deben ser eficaces y proporcionar una inmunización duradera y completa.
- ✚ Deben ser seguras y no provocar reacciones adversas en el paciente.
- ✚ Tener una producción relativamente fácil y no muy costosa (ArgenBio, 2007).

A continuación se muestran una selección de diferentes enfermedades actuales frente a las cuales se están diseñando vacunas de bacterias recombinantes vivas. Las enfermedades escogidas han sido: cáncer, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), Leishmaniosis, virus del papiloma humano (VPH), neumonía bacteriana y diabetes.

5.3.1. CÁNCER

El cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades relacionadas con una división incontrolada de las células que pueden llegar a diseminarse por otros tejidos del organismo (INC, 2015).

En 2007, Zhang y colaboradores comprobaron la eficacia relativa de una vacuna con únicamente *S.typhimurium* atenuada o de esta bacteria expresando además el ARNip-STAT3, para el tratamiento del cáncer de próstata. El resultado fue una disminución significativa del crecimiento tumoral además de una reducción de los órganos metastásicos en los ratones a los que se les inoculó.

Kim y colaboradores (2009) realizaron un estudio con una cepa de *L.monocytogenes* expresando los genes de la listeriolisina O modificada y de un fragmento de aminoácido (Mage-b). Fue realizado *in vitro* e *in vivo* (en ratones con cáncer de mama), en ambos casos se llegó a la conclusión de que ambas cepas son capaces de infectar células tumorales.

Le y colaboradores (2011) realizaron dos estudios de fase I en el que utilizaban la cepa ANZ-100 de *L.monocytogenes* y esa misma cepa expresando la mesotelina

humana (CRS-207), que es un antígeno que se expresa en numerosos tumores. El estudio fue realizado en pacientes con metástasis de hígado y en otro tipo de cáncer que expresan la mesotelina. Las conclusiones del estudio fueron positivas, ya que ambas vacunas son seguras y tolerables en sujetos con cánceres avanzados refractarios al tratamiento de activación inmune. También se observa un aumento de las citoquinas y quimiocinas, lo que puede servir como un biomarcador para la actividad de la vacuna. Además, *L.monocytogenes* expresando un antígeno antitumoral puede inducir una respuesta de las células T específicas en pacientes con cánceres avanzados.

Por último, Jin y colaboradores (2015), utilizaron una cepa de *S.typhi* para expresar los siguientes genes: *CEACAM6* y *4-1BBL*. Fue suministrado en ratones con cáncer de colon, y tras el estudio quedó demostrado que las cepas que contenían dichos genes producían un aumento de las células natural killers, CD8+ y CD3+, además de una inhibición en el desarrollo del cáncer de colon.

5.3.2. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

Es el virus de la inmunodeficiencia humana (Figura 2), que puede causar el síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA). El VIH ataca al sistema inmune y en concreto a las células T, que al agotarse sus reservas no son capaces de proteger al organismo ante infecciones (CCPE, 2015b).

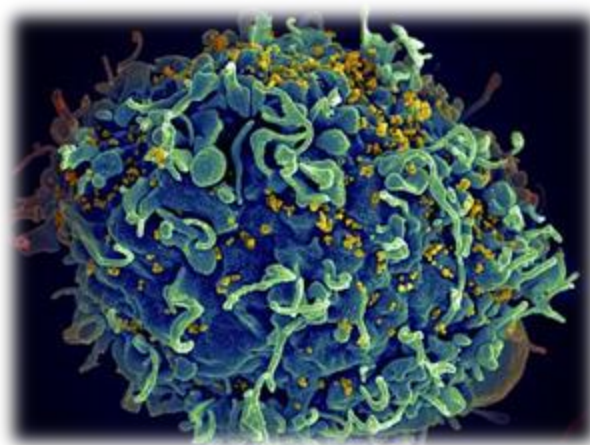


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido de partículas de VIH infectando una célula T humana (National institute of health, 2015).

En 2010, Vangelista y colaboradores pensaron una estrategia para evitar la transmisión sexual de VIH, esta se basaba en el uso de un *Lactobacillus jensenii* como un microbicida natural que produjera inhibidores del VIH-1. Para ello se le introdujeron los genes de la quimiocina RANTES, por ejemplo C1C5 RANTES (antagonistas de CCR5), y así se observó que las quimiocinas secretadas por *L.jensenii* eran capaces de inhibir la infección en células CD4+ y macrófagos.

Kajikawa y colaboradores (2012) realizaron un estudio que tenía por objetivo construir una cepa recombinante de *Lactobacillus* spp. para la administración de una vacuna oral contra el VIH, evaluando también su inmunogenicidad. Dicha cepa expresa el conjunto de genes *Gag* del VIH-1 en la superficie bacteriana, establecido mediante fusión con el péptido señal y una proteína de unión de *L.acidophilus*, que puede contener además la flagelina de *Salmonella enterica*. El estudio proporciona pruebas de que *L.acidophilus* recombinante podría aplicarse como vector bacteriano en el desarrollo de vacunas orales contra VIH-1.

También se han realizados estudios en los que una *Salmonella* recombinante portaba los genes *Gag* del VIH-1 y producía inmunidad en ratones (Chin'ombe, 2013). Y en otro estudio construyeron una *Salmonella*, con los genes *Gag* de VIH-1, expresando también la proteína implicada en la patogenicidad *SopE*, y se administró a humanos (83% de los participantes en dicho estudio) pero únicamente se consiguió inmunizar frente a *Salmonella*. Este resultado pudo ser debido a que únicamente se vacuno a los participantes una vez o porque se utilizó el serotipo typhimurium de *S.enterica* en vez del serotipo typhi (Chin'ombe, 2013).

5.3.3. LEISHMANIOSIS

La leishmaniosis (Figura 3) es una enfermedad infecciosa producida por un protozoo del género *Leishmania* y transmitida por la picadura del mosquito hembra flebotómo. Actualmente su tratamiento se basa en medicamentos y no existe una vacuna (Medline, 2015). Por lo que se ha estudiado la posibilidad de formar una vacuna bacteriana recombinante frente a la Leishmaniosis. En uno de los estudios se expresó una versión modificada del antígeno A2 de *Leishmania donovani* en *L.lactis* en 3 lugares diferentes: citoplasma, de forma secretada y anclado a la pared, y se probó en ratones (Yam y cols, 2011).

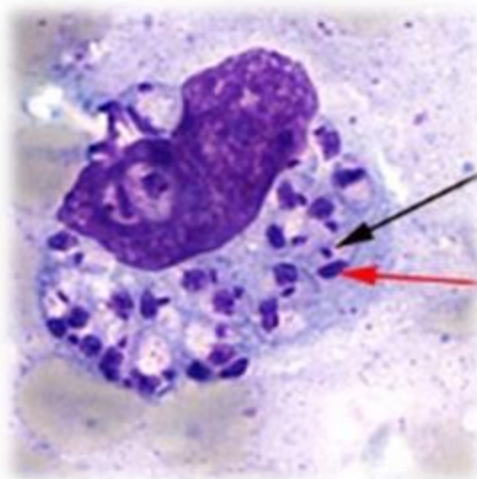


Figura 3. Imagen de una biopsia de médula ósea que muestra un macrófago con amastigotes de *Leishmania* (Medscape, 2016).

Hugentobler y colaboradores (2012a) diseñaron una cepa de *L.lactis* que expresaba el antígeno LACK, el más importante de *Leishmania*, en el citoplasma, de forma secretada y anclado a la pared, además de forma concomitante podía secretar o no una IL-2. Después de su administración oral en ratones, se observó que únicamente la cepa que secretaba tanto el antígeno como la IL-2 producía inmunidad.

Los mismos autores realizaron otro estudio posterior en el que introduciendo la misma cepa pero de forma subcutánea se observa una reducción significativa de la inflamación en los ratones y con ello una reducción significativa de la carga de parásitos en comparación con los animales del grupo control (Hugentobler y cols, 2012b).

5.3.4. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El virus del papiloma humano es un conjunto de virus comunes que pueden causar verrugas genitales, existen unos 100 tipos pero aproximadamente 30 de ellos se relacionan con la aparición de cáncer que afectan a la zona genital en hombres y principalmente en mujeres, en las que puede llegar a producir cáncer del cuello uterino, de vulva, vagina y ano (Medline, 2016).

En 2007, Fraillery y colaboradores inocularon vía nasal a ratones con una cepa de *S.typhi* expresando el plásmido L1 del VPH. Se observó un aumento de los epitopes neutralizantes dependientes de la conformación, además de que esta cepa puede ser

usada también como vacuna contra la fiebre tifoidea, por lo que tendríamos una doble protección.

En otro estudio, realizado por Li y colaboradores en 2009, se construía una cepa de *Shigella* expresando los genes HPV-58L1. En este caso utilizaron la capacidad de *Shigella* para invadir los tejidos corneales del conejillo de indias, lo que les produce queratoconjuntivitis y es una buena forma de comprobar la virulencia de las cepas y la eficacia de las vacunas que forma. Una vez inoculadas no se observó queratoconjuntivitis en ninguno de los conejillos de india, pero si un aumento de las IgA lo que demuestra que esta vacuna es capaz de generar una respuesta inmune.

5.3.5. NEUMONÍA BACTERIANA

Es un tipo de infección bacteriana que afecta a los pulmones, en la que los alveolos se encuentran llenos de pus y liquido lo que dificulta la respiración además de hacerla dolorosa el microorganismo más común que la produce es *Streptococcus pneumoniae* (OMS, 2015). Con la llegada de la vacuna conjugada contra el neumococo se consiguió reducir significativamente la incidencia de neumonía pero algunos serotipos para los que no existe vacuna se están volviendo más prevalentes además de que en ciertos grupos de riesgo la respuesta inmunológica inducida por los polisacáridos de la vacuna es bastante pobre (Wang y Curtiss, 2014).

En 2013, se realizó un estudio de fase I en el que se construían tres tipos de cepas recombinantes de *S.typhi* en las que expresaba la proteína de superficie A de *S.pneumoniae* y se administró en 60 personas. Se concluyó que las tres cepas son seguras y bien toleradas, teniendo efectos secundarios mínimos en los individuos que tomaron la mayor dosis. Aunque no se observara una respuesta inmunológica clara frente a la proteína de superficie A, si hay un aumento de la IgA y podemos decir que *Salmonella* es un vector óptimo para su investigación en posteriores estudios (Frey y cols, 2013; Wang y Curtiss, 2014).

Otra estrategia es la que emplea las bacterias de ácido láctico. En un estudio se expresó la proteína de superficie A en la pared de *L.lactis*, que después de la administración oral en ratones produjo un aumento de las inmunoglobulinas tanto a nivel sistémico como de la mucosa (Villena y cols, 2010). Más tarde, De Lucía y

colaboradores (2011) realizaron otro estudio utilizando *Lactobacillus casei* en el que se expresaba la proteína de superficie C (PspC), y aunque ninguno de los tres protocolos utilizados indujo niveles significativos de anticuerpos anti-PspC, sí que se observó una disminución de la colonización por *S.pneumoniae*, por tanto podemos decir que la vacunación con esta cepa es un coadyuvante en la disminución de la infección.

5.3.6. DIABETES

La diabetes es una enfermedad en la cual el nivel de glucosa se encuentra por encima de lo normal, ya que el páncreas, que es el órgano encargado de secretar la insulina, no produce suficiente o el propio organismo no es capaz de utilizarla de manera adecuada (CCPE, 2015a).

En la diabetes tipo I se produce una destrucción autoinmune de las células β productoras de insulina del páncreas, y viene acompañada por el desarrollo de anticuerpos específicos y linfocitos T citotóxicos. En 2014 se realizó un estudio para la preparación de una vacuna oral que previniera esta enfermedad; en él se preparaba una fusión entre el autoantígeno preproinsulina con la proteína secretora de la isla de patogenicidad 2 de una cepa de *Salmonella*. Además también se utilizó *Salmonella* para la expresión en las células huésped del gen del factor de crecimiento transformante β , que es un inmunomodulador de citoquinas. La vacuna oral fue inoculada en ratones diabéticos no obesos y se observó una reducción significativa del desarrollo de insulina, una mejor respuesta a la glucosa y una reducción de la severidad de la insulinitis en comparación con el grupo control y con los tratados únicamente con el autoantígeno (Husseiny y cols, 2014; Figueroa y Verdugo, 2005).

Durante el mismo año, Ma y colaboradores (2014) realizaron un estudio para el tratamiento de la diabetes tipo I pero esta vez utilizando *Lactococcus lactis*. En este caso la cepa se encuentra expresando el gen *6P277*, y se administró vía oral en ratones diabéticos no obesos. Dio como resultado una prevención de la hiperglucemia, mejora de la tolerancia a la glucosa y reducción de la insulinitis. La función preventiva fue causada por una disminución de la citoquina proinflamatoria INF- γ y un aumento de la citoquina antiinflamatoria IL-10.

6. CONCLUSIONES

La utilización de vacunas de bacterias recombinantes vivas posee muchas ventajas, como la administración oral, la inducción de inmunidad a nivel de la mucosa, su fácil preparación y su bajo coste. También presenta algunos problemas como la reversión de la patogenicidad (aunque este problema quedaría solucionado con el uso de bacterias comensales) y la dificultad de mantener estable el ADN insertado.

Vectores bacterianos como *Salmonella* o las bacterias del ácido láctico que están siendo ampliamente estudiadas, tienen mucho potencial para formar vacunas en un futuro frente a enfermedades en las que no se ha obtenido una vacuna eficaz, presentan un tratamiento obsoleto o no tienen tratamiento.

Existen también ciertos factores problemáticos en referencia a los ensayos clínicos necesarios para desarrollar este tipo de vacunas, y es que, requieren mucho tiempo, infraestructura y financiación.

Queda un largo camino hasta que se pueda demostrar la seguridad y eficacia de este tipo de vacunas, pero se puede concluir que representan una gran alternativa para su aplicación en el futuro desarrollo de vacunas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alfabeta SACIFyS “Vacunas: tipos de vacunas” (2003) [en línea] [Consultado en mayo 2016], Disponible en: <http://web.alfabeta.net/vacunas/vacunas-tipos.xtp>
- Al-Marini A, Tibor A, Lestrade P, Mertens P, De Bolle X & Letesson JJ (2002) “*Yersinia enterocolitica* as a Vehicle for a Naked DNA Vaccine Encoding Brucella abortus Bacterioferritin or P39 Antigen” *Infection and immunity*, **770**; 1915-1923.
- ArgenBio: Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología “Vacunas recombinantes” (2007) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=71>
- Bermúdez-Humaran LG & Langella P (2004) “Recent advances in the use of *Lactococcus lactis* as a live recombinant vector for development of new safe mucosal vaccines” *Recent Res devel microbial*, **8**; 147-160
- Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarne K, Weissenbach J. *et al* (2001) “the complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* spp *lactis* IL1403” *Genome Res*, **11**; 731-753
- Brossier F, Mock M & Sirard J (1999) “Antigen delivery by attenuated *Bacillus anthracis*: new prospects in veterinary vaccines” *J Appl Microbiol*, **87**; 298–302
- Bruhn K, Craft N & Miller J (2007) “*Listeria* as a vaccine vector” *Microbes and Infection*, **9**; 1226-1235
- Carlsson J, Grahnen H, Jonsson G, & Wikner S, (1970) “Early establishment of *Streptococcus salivarius* in the mouth of infants” *J Dent Res*, **49**:415– 418.
- Carr F, Chill D & Maida N (2002) “ The lactic acid bacteria: a literature survey” *Critical reviews in microbiology*, **28**; 281-370
- Centro para el control y la prevención de enfermedades (CCPE) “¿Qué es la diabetes?” (2015a) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://www.cdc.gov/diabetes/spanish/basics/diabetes.html>

- Centro para el control y la prevención de enfermedades (CCPE) “Acerca VIH/SIDA” (2015b) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://www.cdc.gov/hiv/spanish/basics/whatishiv.html>
- Chin’ombe, N (2013) “Recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a vaccine vector for HIV-1 Gag” *Viruses*, **5**; 2062–2078
- Chopin A, Chopin MC, Moillo-Batt A & Langella P (1984) “Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*” *Plasmid*, **11**; 260-263
- Curtiss R (2002) “Bacterial infectious disease control by vaccine development” *Journal of Clinical Investigation*, **110**, 1061–1066.
- De Dios R (2014) “Vacunas recombinantes vivas” *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, **15**; 1-3.
- De Lúcia M, Ferreira PC, Ferreira DM, Miyaji EN, Ho PL & Oliveira ML (2011) “Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the pneumococcal surface protein C primes the immune system and decreases pneumococcal nasopharyngeal colonization in mice” *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, **62**; 263–272
- École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL) “Killing for DNA: a predatory device in the cholera bacterium” (2015) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://actu.epfl.ch/news/killing-for-dna-a-predatory-device-in-the-choler-5/>
- Figueroa IM, Verdugo A (2005) “Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.*” *Revista latinoamericana de microbiología*, **47**; 25-42
- Fraillery D, Baud D, Pang SY, Schiller J, Bobst M, Zosso N *et al* (2007) “*Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing human papillomavirus type 16 L1 as a potential live vaccine against cervical cancer and typhoid fever” *Clin Vaccine Immunol*, **14**; 1285–1295
- Frey SE, Lottenbach KR, Hill H, Blevins TP, Yu Y, Zhang Y *et al* (2013) “A Phase I, dose-escalation trial in adults of three recombinant attenuated *Salmonella typhi* vaccine vectors producing *Streptococcus pneumoniae* surface protein antigen PspA” *Vaccine*, **31**; 4874–4880

- Gareau MG, Sherman PM & Walker WA (2010) "Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease" *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **7**; 503-514
- Gasson MJ (1983) "Plasmid complements os *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplastinduced curing" *J Bacteriol*, **154**; 1-9
- Genoma España/CIBT-FGUAM "Vacunas de nueva generación - Informe de Vigilancia Tecnológica" (2004) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: http://www.uned.es/091279/ingenieria_genetica/PDFs/vacunas.pdf
- Gil A, del Barrio JL, Carrasco P, Gil R, Jiménez R, López AI *et al* (2009) "Guía de vacunación" Consejo general de colegios oficiales de farmacéuticos [en línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://www.portalfarma.com/Ciudadanos/saludpublica/vacunacion/Documents/Vacunas%20Farmacia.pdf>
- Guillen D, Moreno-Mendieta S & Rodriguez-Sanoja R (2009) "Microorganismos y virus: Herramientas clave para el desarrollo de vacunas" *BioTecnología*, **13**(1), 23-40.
- Hantman MJ, Hohmann CG, Murphy D, Knipe DM & Miller SI (1999) "Antigen delivery systems: development of recombinant live vaccines using viral or bacterial vectors" *Mucosal immunology*, **2**; 779-791
- Hugentobler F, Di Roberto RB, Gillard J & Cousineau B (2012a) "Oral immunization using live *Lactococcus lactis* co-expressing LACK and IL-12 protects BALB/c mice against *Leishmania major* infection" *Vaccine*, **30**; 5726–5732
- Hugentobler F, Yam K, Gillard J, Mahbuba R, Olivier M & Cousineau B (2012b) "Immunization against *Leishmania major* infection using LACK and IL-12 expressing *Lactococcus lactis* induces delay in footpad swelling" *PLoS One*, **7**; e30945
- Husseinya M, Rawsona J, Kayea A, Naira I, Todorova I, Henselb M *et al* (2014) "An oral vaccine for type 1 diabetes based on live attenuated *Salmonella*" *Vaccine*, **32**; 2300-2307

- IES Mateo Alemán “Como nos defendemos de los microorganismos” (2016) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: http://www.iesmateoaleman.es/espa/act/unidad3/tema_5/contenido/ODE-647382ca-8448-30f9-b10b-3b66fd025c2f/2_cmo_nos_defendemos_de_los_microorganismos.html
- Instituto nacional de alergias y enfermedades infecciosas (INAEI) “Tipos de vacunas” (2013) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://espanol.vaccines.gov/m%C3%A1s-informaci%C3%B3n/tipos/11jt/%C3%ADndice.html>
- Instituto Nacional de seguridad e higiene en el trabajo (INSHT). “Mycobacterium bovis” DataBio, 2012 [en línea] Consultado el 17/05/16 en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Mycobacterium%20bovis.pdf>
- Instituto nacional del cáncer (INC) “¿Qué es el cáncer?” (2015) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
- Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Sugitakonishi Y, Aibara K *et al* (1990) “Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene” *Infect Immun*, **58**; 2929-2934
- Jin C, Liu Y, Zhu J, Xia T, Zhang B, Fei Y *et al* (2015) “Recombinant Salmonella-based CEACAM6 and 4-1BBL vaccine enhances T-cell immunity and inhibits the development of colorectal cancer in rats: In vivo effects of vaccine containing 4-1BBL and CEACAM6” *Oncology report*, **33**; 2837-2844
- Kajikawa A, Zhang L, Long J, Nordone S, Stoeker L, LaVoy A *et al* (2012) “Construction and Immunological Evaluation of Dual Cell Surface Display of HIV-1 Gag and Salmonella enterica Serovar Typhimurium FliC in Lactobacillus acidophilus for Vaccine Delivery” *Clinical and vaccine immunology*, **19**; 1374 – 1381
- Kechaou N, Chain F, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bertho N, Chevalier C *et al* (2013) “Identification of one novel candidate probiotic Lactobacillus plantarum strain

- active against influenza virus infection in mice” *Appl Environ Microbiol*, **79**; 1491-1499
- Kim SH, Castro F, Paterson Y & Gravekamp C (2009) “High efficacy of a Listeria-based vaccine against metastatic breast cancer reveals a dual mode of action” *Nat Inst Health*, **69**; 5860–5866
 - Konings W, Kok J, Kuipers OS & Poolman B (2000).”Lactic acid bacteria: The bugs of new millennium” *Current Opinion in Microbiology*, **3**; 276–282.
 - Kotton CN & Hohmann EL (2004) “Enteric Pathogens as Vaccine Vectors for Foreign Antigen Delivery” *Infection and immunity*, **72**; 5535–5547
 - Le DT, Brockstedt DG, Nir-paz R, Hampl J, Mathur S, Nemunaitis J *et al* (2012) “A Live-Attenuated Listeria Vaccine (ANZ-100) and a Live-Attenuated Listeria Vaccine Expressing Mesothelin (CRS-207) for Advanced Cancers: Phase I Studies of Safety and Immune Induction” *Clin Cancer Res*, **18**; 858-863
 - LeBlanc JG, Aubry C, Cortes-Perez NG, de Moreno A, Vergnolle N, Langella P *et al* (2013) “Mucosal targeting of therapeutic molecules using genetically modified lactic acid bacteria: an update” *FEMS Microbiol lett*, **344**; 1-9
 - Lee SF (2003) “Oral colonization and immune responses to *Streptococcus gordonii*: Potential use as a vector to induce antibodies against respiratory pathogens” *Curr Opin Infect Dis*, **16**; 231-235.
 - Lee SF, March RJ, Halperin SA, Faulkner G & Lingqio G (1999) “Surface expression of a protective recombinant pertussis toxin S1 subunit fragment in *Streptococcus gordonii*” *Infect Immun*, **67**; 1511–1516
 - Li W, Liu H, Yang X, , Zheng J, Wang Y & Si L (2009)“Development of prophylactic recombinant HPV58-attenuated Shigella live vector vaccine and evaluation of its protective efficacy and immunogenicity in the guinea pig keratoconjunctivitis model” *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. **41**; 137–145
 - Ma Y, Liu J, Hou J, Dong Y, Lu Y, Jin L *et al* (2014) “Oral Administration of Recombinant *Lactococcus lactis* Expressing HSP65 and Tandemly Repeated P277 Reduces the Incidence of Type I Diabetes in Non-Obese Diabetic Mice” *PLoS ONE*, **9**; e105701

- Matsuo K & Yasutomi Y (2011) “Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin as a Vaccine Vector for Global Infectious Disease Control” *Hindawi Publishing Corporation*, 2011, 9 pages
- Max-Planck-Gesellschaft (MPG) “Serum Institute of India acquires rights to tuberculosis vaccine” (2013) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <https://www.mpg.de/7467858/tuberculosis-serum-institute-of-india>
- Medaglini D, Ciabattini A, Spinosa MR, Maggi T, Marcotte H, Oggioni M *et al* (2001) “Immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing tetanus toxin fragment C confers protection from lethal challenge in mice” *Vaccine*, **19**; 1931–1939.
- Medina E & Guzmán CA (2001) “Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: Potential and limitations” *Vaccine*, **19**; 1573-1580.
- Medline, biblioteca nacional de medicina de los EE.UU. “Leishmaniosis” (2015) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001386.htm>
- Medline, biblioteca nacional de medicina de los EE.UU. “Virus del papiloma humano” (2016) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/hpv.html>
- Medscape “Leishmaniasis workup” (2016) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/220298-workup>
- Morán A “Vacunas ¿qué son? Origen parte I” (2014) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://dciencia.es/vacunas-conceptos-basico-origen/>
- National institute of health (NIH) (2015) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <https://www.nih.gov/research-training/advances-hiv/aids-research>
- Organización mundial de la salud (OMS) “Neumonía” (2015) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/es/>

- Organización mundial de la salud (OMS) “Vacunas” (2016) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://www.who.int/topics/vaccines/es/>
- Paerregaard A, Espersen F, Jensen OM & Skurnik M (1991) “Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles” *Infect Immun*, **59**; 253–60.
- PHYS ORG “Teamwork against mutant free riders” (2013) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://phys.org/news/2013-02-teamwork-mutant-free-riders.html>
- Plotkin, SA (2002) “Vacunas en el siglo XXI” *Vacunas*, **3**; 18-28
- Portnoy D, Chakraborty T, Goebel W & Cossart P (1992) “Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* Pathogenesis” *Infection and immunity*, **60**; 1263-1267.
- Ross RP, Morgan S & Hill C (2002). “Preservation and fermentation: Past, present and future” *Int. Journal of Food Microbiology*, **79**; 3–16.
- Ryan ET & Calderwood S (2000) “Cholera Vaccines” *Clin Infect Dis*, **31**; 561-565
- Salleras L (2002) “Tecnología de producción de vacunas (III): vacunas génicas” *Vacunas*, **3**; 145-149.
- Saludemia “Las nuevas vacunas” (2016) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://www.saludemia.com/-/vacunaciones-en-profundidad-las-nuevas-vacunas#seccion4>
- Schnurer J & Magnusson J (2005) “Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives” *Trends in Food Science & Technology*, **16**; 70–78.
- Shahabi V, Maciag PC, Rivera S & Wallecha A (2010) “Live, attenuated strains of *Listeria* and *Salmonella* as vaccine vectors in cancer treatment” *Bioengineered Bugs*, **1**; 237-245
- Sharma A, Honma K, Evans RT, Hruby DE & Genco RJ (2001) “Oral immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing *Porphyromonas gingivalis* FimA domains” *Infect Immun*, **69**; 2928–2934.

- Shata M, Stevceva L, Agwale S, Lewis GK & Hone DM (2000) "Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors" *Molecular medicine today*, **6**; 66-71
- Sirard JC, Weber M, Duflot E, Popoff MR & Mock M (1997a) "A recombinant *Bacillus anthracis* strain producing the *Clostridium perfringens* Ib component induces protection against iota toxin" *Infect Immun*, **65**; 2029–33
- Sirard JC, Fayolle C, de Chastellier C, Mock M, Leclerc C & Berche P (1997b) "Intracytoplasmic delivery of listeriolysin O by a vaccinal strain of *Bacillus anthracis* induces CD8-mediated protection against *Listeria monocytogenes*" *J Immunol*, **159**; 4435–43
- Smith DJ & Taubman MA. (1992) "Ontogeny of immunity to oral microbiota in humans" *Crit Rev Oral Biol Med*, **3**; 109–133.
- The college of physicians of Philadelphia: the history of vaccines "All timelines overview" (2016) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://www.historyofvaccines.org/content/timelines/all>
- Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A & Mercado M (2005) "Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente" *MVZ, Córdoba*, **10**; 511-543.
- Tregnagbi, M (2002) "Presente y futuro de las vacunas" *Arch. Argent. Pediatr*, **100**; 44-49
- Ulloa MT, Universidad de Chile "Vibrio cholerae: caracterización fenotípica y molecular" (2016) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Caracterizacion%20bioquimica%20y%20molecular%20de%20Vibrio%20cholerae.pdf>
- Universidad de Salamanca (USAL). Laboratorio de tecnología educativa "Aislamiento e identificación de *Shigella*" (2016) [En línea] [Consultado en mayo 2016] Disponible en: http://virus.usal.es/web/demo_fundacua/demo1/shigella.html
- Vangelista L, Secchi M, Liu X, Bachi A, Jia L, Xu Q *et al* (2010) "Engineering of *Lactobacillus jensenii* to secrete RANTES and CCR5 antagonist analogue as live HIV-1 blockers" *Antimicrob Agents Chemother*, **54**; 2994-3001

- Vázquez SM, Suárez H & Zapata S (2009) “ Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne” *Revista chilena de nutrición*, **36**; 64-71
- Villena J, Medina M, Racedo S & Alvarez S (2010) “Resistance of young mice to pneumococcal infection can be improved by oral vaccination with recombinant *Lactococcus lactis*” *J Microbiol Immunol Infect*, **43**; 1–10
- Wang S, & Curtis R (2014) “Development of *Streptococcus pneumoniae* Vaccines Using Live Vectors” *Vaccines*, **2**; 49–88
- Wegmann U, O’Connell-Motherway M, Zomer A, Buist G, Shearman C, Canchaya C *et al* (2007) “Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*” *J Bacteriol*, **189**; 3256-3270
- Yam KK, Hungentobler F, Pouliot P, Stern AM, Lalande JD & Matlashewski G (2011) “Generation and evaluation of A2-expressing *Lactococcus lactis* live vaccines against *Leishmania donovani* in BALB/c mice” *J Med Microbiol*, **60**; 1248-1260
- Zhang L, Gao L, Zhao L, Guo B, Ji K, Tian Y *et al* (2007) “Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* carrying plasmid-based small interfering RNAs” *Cancer Res*, **67**; 5859–5864