

REVISION DE TEMA

Vacuna atenuada de *Salmonella* como vector de antígenos heterólogos

Oscar G. Gómez

Center for Vaccine Development, University of Maryland, Baltimore, Maryland, E.E.U.U.
Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, D. C., Colombia

Salmonella enterica, serotipo Typhi, es el agente etiológico de la fiebre tifoidea de los habitantes de las regiones más pobres del mundo y es, además, el centro de atención de muchos investigadores dados sus fascinantes mecanismos de invasión, multiplicación intracelular y diseminación intercelular que expresa *in vivo* e *in vitro*. Aunque estos mecanismos se asocian directamente con la patogenicidad y la severidad de la enfermedad, las mutaciones definidas en el cromosoma de *Salmonella* han permitido que estos mecanismos de virulencia se puedan utilizar en beneficio del hospedero. Las mutantes atenuadas de *Salmonella* son capaces de invadir las células M de la mucosa intestinal y de migrar a las células linfoides del sistema reticuloendotelial donde, en lugar de causar enfermedad, activan eficazmente las respuestas inmunes humoral y celular no sólo contra el microorganismo mismo sino también contra aquellos antígenos heterólogos recombinantes que la bacteria pueda expresar y transportar.

En la presente revisión, se discutirán los avances más recientes en el campo de las vacunas vivas atenuadas de *Salmonella*, su evaluación preclínica y clínica y, también, su aplicación como vector de antígenos. Se darán a conocer las técnicas biomoleculares de clonación y expresión procariótica de las toxinas diftérica, tetánica y de pertusis, así como de los antígenos de *Helicobacter pylori* y de *Plasmodium falciparum*. Finalmente, se propone el uso de *Salmonella* atenuada como vector de vacunas de ADN para expresión eucariótica de los antígenos recombinantes. Los continuos esfuerzos científicos y tecnológicos en el campo de la vacunación con vectores vivos atenuados sugieren que *Salmonella* es una herramienta potencialmente útil para enfrentar el constante reto de la fiebre tifoidea. Igualmente, los estudios preclínicos y clínicos de fase I demuestran la eficacia de la vacuna de *Salmonella* viva atenuada como vector de antígenos heterólogos. Se requiere un mayor número de estudios clínicos de fase II y III para demostrar que los vectores de *Salmonella* podrán formar parte del arsenal de vacunas para la protección de la población mundial contra el constante acecho de los agentes infecciosos emergentes y reemergentes del presente siglo.

Palabras clave: *Salmonella*, vacuna, DPT, malaria, expresión, antígeno.

Attenuated *Salmonella* vaccine as a vector for heterologous antigens

Salmonella enterica, serotype Typhi, is the causing agent of typhoid fever, a disease that affects the inhabitants of the poorest areas in the world. Many researchers have focused their attention on its fascinating cell invasion mechanisms, intracellular multiplication and bacterial intercellular dissemination expressed *in vivo* and *in vitro*. Although the above mechanisms are directly associated with pathogenicity and disease severity, defined mutations in the *Salmonella* chromosome have allowed the use of these virulence mechanisms in benefit of the mammalian host. Attenuated *Salmonella* mutants are still able to invade M cells of the intestinal mucosa and to migrate to the lymphoid cells of the reticuloendothelial system. Once inside the host, the attenuated *Salmonella* is unable to cause disease, instead, it effectively activates the humoral and cellular immune responses not only towards the *Salmonella* antigens themselves but also to the recombinant heterologous antigens being expressed and delivered by the bacteria. In

the present review, recent advances in the field of live attenuated *Salmonella* vaccines will be discussed; the preclinical and clinical data will be evaluated, and the clinical application as antigen delivery systems will be anticipated. Information will be given on current molecular biology techniques on cloning and prokaryotic expression of tetanus, diphtheria and pertussis toxins, as well as *Helicobacter pylori* and *Plasmodium falciparum* antigens. Similarly, the use of attenuated *Salmonella* as a vector for DNA vaccine delivery and further eukaryotic expression of recombinant antigens will be proposed. Continuous scientific and technological efforts in the field of vaccination with live attenuated vectors suggest that *Salmonella* is a promising weapon to face the challenge imposed by typhoid fever. Similarly, preclinical and phase I clinical studies indicate how efficient live attenuated *Salmonella* vaccines may be as a delivery system for heterologous antigens. More phase II and phase III clinical studies will be necessary to demonstrate that *Salmonella* vectors may be part of the vaccine arsenal capable of protecting the world population against the constant risk of infectious diseases due to emergent and re-emergent microorganisms.

Key words: *Salmonella*, vaccine, DPT, malaria, expression, antigen.

Salmonella es una enterobacteria Gram negativa con una especie patógena para el hombre, *S. enterica*. Un elevado número de serotipos hace parte de esta especie; la mayoría están asociados, principalmente, a patología gastrointestinal, dentro de los cuales se destacan los serotipos Typhimurium, Paratyphi, Enteritidis y Heidelberg (1). Otros serotipos, en cambio, se asocian con bacteremia y septicemia; el representante más importante es *S. enterica*, serotipo Typhi (2,3). El serotipo Typhi es el agente causal de la fiebre tifoidea, una enfermedad que afecta predominantemente a los países en vías de desarrollo, especialmente a niños en edad escolar que viven en sitios con carencia de servicios de acueducto, alcantarillado y agua potable (4). *S. enterica*, serotipo Typhi, ingresa al hospedero por la vía oral e invade y destruye las células M del tejido linfoide de la mucosa intestinal para, luego, diseminarse por vía sanguínea a todos los órganos del sistema reticuloendotelial (5).

El hospedero puede inducir una respuesta inmune contra el microorganismo invasor y, al cabo de varias semanas, eliminarlo completamente o limitar su virulencia y convertirlo en un comensal más de la flora gastrointestinal. O, también, la bacteria invasora continúa diseminándose hasta causar

daño multisistémico que puede causar la muerte del paciente. Se estima una incidencia mundial anual de 30 millones de casos de fiebre tifoidea, con 600.000 muertes (6,7). En algunas regiones de Africa y Asia, la mortalidad puede alcanzar cifras de 30%, mientras que, en Estados Unidos y otros países industrializados, la mortalidad no sobrepasa el 1% (8). Aunque la fiebre tifoidea se puede tratar eficazmente con antibióticos, existe preocupación por el elevado número de cepas resistentes a los antibióticos que se han aislado en países del Medio Oriente, India y el sudeste asiático (9). Las vacunas contra *Salmonella* capaces de prevenir la fiebre tifoidea se han constituido en una prioridad de salud pública para las regiones más pobres del mundo donde la enfermedad es endémica y las medidas que tengan una relación costo-beneficio favorable, constituyen la única alternativa eficaz para proteger a la población contra esta enfermedad.

Varios factores de virulencia le permiten a *Salmonella* colonizar, invadir e, inclusive, eliminar al hospedero. Entre ellos se destacan las dos islas de patogenicidad que le confieren al microorganismo la capacidad invasora y de supervivencia dentro de los macrófagos. Las islas de patogenicidad son fragmentos de ADN de tamaño variable que, al incorporarse al cromosoma bacteriano, aportan información genética que contribuye a la patogenicidad de la bacteria receptora (10). Las islas de patogenicidad se transmiten genéticamente de manera horizontal mediante bacteriófagos provenientes de diversas

Correspondencia:

Center for Vaccine Development, Division of Geographic Medicine, 685 West Baltimore Street, Baltimore, Maryland, U.S.A., 21201-1509

email: ogomez@umppa1.ab.umd.edu

Recibido: 08/02/00; aceptado: 28/04/00

especies bacterianas. Cada una de ellas codifica un sistema de secreción tipo III con funciones definidas. Mientras que una de las islas de patogenicidad, a través del sistema de secreción tipo III, le permite a *Salmonella* transportar factores de invasión bacteriana al espacio extracelular para facilitar la internalización del microorganismo a las células epiteliales *in vivo* e *in vitro* (11-13), la segunda isla de patogenicidad le permite multiplicarse dentro de los macrófagos (14,15) y evadir la respuesta inmune del hospedero.

Respuesta inmune contra la infección por *Salmonella*

La afinidad de *Salmonella* por las células del sistema inmune es responsable, en gran parte, de la inducción de la respuesta inmune que le permite a los individuos infectados sobrevivir a la infección. Se ha informado que las cepas vivas de *Salmonella* atenuada inducen eficientemente la respuesta humoral inmune y la inmunidad celular

no sólo a nivel sistémico sino también a nivel local, en las mucosas (16-19). La respuesta celular inmune restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II y mediada por linfocitos T CD4-positivos, puede ser de tipo T1 ayudadora (Th1) o T2 ayudadora (Th2). La respuesta Th1 se caracteriza por la liberación de interferón gamma (20) e IL-2, mientras que la de tipo Th2 se caracteriza por la liberación de IL-10. La actividad de estas citocinas permite la producción de títulos elevados de anticuerpos séricos y en mucosas durante los procesos infecciosos (19,21). Además de la respuesta celular restringida por CMH clase II, se ha informado sobre la respuesta inmune restringida por el CMH clase I mediada por linfocitos T CD8, los cuales dan lugar al desarrollo de T citotóxicos (CTL) asociados con la inmunoprotección contra *Salmonella* en ratones y en humanos (figura 1) (18,22). Una buena respuesta Th1 con memoria inmunológica contra la infección por *Salmonella*,

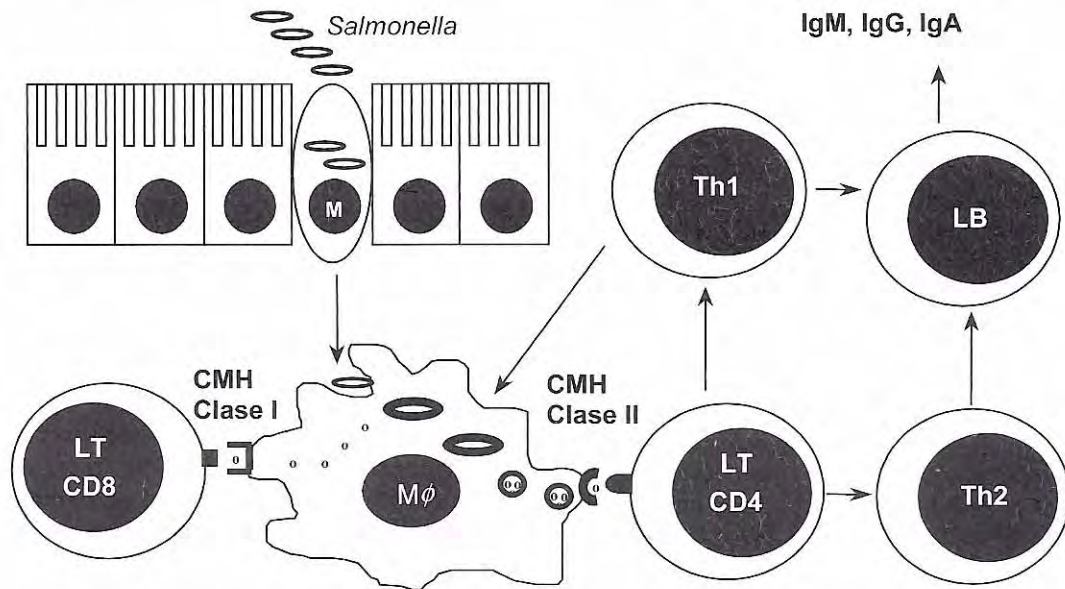


Figura 1. Diagrama de la respuesta inmune inducida por *Salmonella*. *Salmonella* invade las células M de la mucosa intestinal y migra posteriormente a los macrófagos, donde se procesan los antígenos bacterianos. Los antígenos procesados dentro de los fagolisosomas forman péptidos que son presentados por moléculas del CMH de clase II a linfocitos T CD4, los cuales, a su vez, activan el desarrollo de linfocitos T ayudadores Th1 y Th2. Los linfocitos Th1 y Th2 producen citocinas específicas y estimulan la secreción de anticuerpos específicos de diversos isotipos a partir de linfocitos B. Algunos antígenos procesados son liberados fuera de los fagolisosomas para ser presentados por moléculas CMH clase I a linfocitos T CD8 y, así, inducir la producción de linfocitos T citotóxicos específicos.

LT: linfocitos T; LB: linfocitos B; CPA: células presentadoras de antígeno; M: células M; Mφ: macrófago; CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.

requiere la integridad de la respuesta inmune mediada por linfocitos B. Los ratones transgénicos con mutaciones en genes esenciales para la respuesta inmune tipo B, son incapaces de generar una respuesta protectora duradera contra *Salmonella* (23).

Vacuna contra *Salmonella*

La alta incidencia de infecciones por *Salmonella* en los países en vías de desarrollo y el alto riesgo de infección para viajeros y microbiólogos clínicos, ha incrementado el interés en desarrollar vacunas contra *Salmonella*. Se han desarrollado dos tipos de vacuna para inducir protección contra la fiebre tifoidea: las vacunas parenterales de bacteria muerta y las vacunas orales vivas (24).

Vacunas parenterales de bacteria muerta

Las vacunas de bacterias muertas, inactivadas por calor y preservadas en fenol, fueron una de las primeras vacunas contra *Salmonella* desarrolladas para uso parenteral. La protección inducida por esta vacuna fue de 60 a 67%, con una duración hasta de 7 años. Sus mayores desventajas fueron las reacciones adversas severas con manifestaciones locales y sistémicas en 25% de los vacunados (25), lo que motivó su abandono.

Otro tipo de vacuna es la de antígenos capsulares de polisacáridos, cuyos altos niveles de protección y efectos adversos insignificantes le ha garantizado una alta aceptación (26). Su mayor desventaja es la corta duración de la respuesta humoral en niños de 2 a 5 años y su ineficacia en los menores de 2 años. En la actualidad, se están evaluando los conjugados del polisacárido con proteínas recombinantes capaces de activar la respuesta celular de linfocitos T y de inducir memoria inmunológica (27). Actualmente, la vacuna de polisacáridos capsulares ya ha sido aprobada para su uso parenteral.

Vacunas orales con bacteria viva

La nueva generación de vacunas orales contra *Salmonella* utilizan cepas vivas atenuadas. La primera vacuna oral viva atenuada, serotipo Typhi, en obtener licencia para uso en humanos fue la vacuna Ty21a. Esta vacuna es un derivado de la cepa Ty2, un aislamiento clínico de *S. enterica*,

serotipo Typhi, la cual fue mutada químicamente para obtener un fenotipo atenuado. Varios estudios clínicos indicaron que esta cepa atenuada era capaz de conferir protección en un alto número de voluntarios, en quienes se usó el placebo como control. Igualmente, la Ty21a indujo protección en extensos estudios de campo controlados con placebo en Egipto, Chile e Indonesia (28-30). La protección conferida por esta vacuna puede durar de 5 a 7 años a pesar de la modesta respuesta inmune que induce. Además, es una vacuna bien tolerada con un bajo índice de reacciones adversas. Las nuevas vacunas de *Salmonella* atenuada incluyen mutaciones definidas molecularmente en genes necesarios para el metabolismo de la bacteria (31,32), como también en genes de virulencia (33).

Tipo de vacunas vivas atenuadas de *Salmonella*

Las cepas de *Salmonella* atenuada se obtienen a partir de mutantes en genes involucrados en el metabolismo bacteriano y en la replicación del ADN. Dichas mutaciones afectan la capacidad de la bacteria de multiplicarse dentro del hospedero, convirtiéndola en una cepa avirulenta. Sin embargo, la atenuación no afecta la capacidad invasora de la bacteria ni su diseminación en el sistema reticuloendotelial, ni su habilidad de inducir respuestas inmunes en el hospedero. La bacteria atenuada tiene poca capacidad de multiplicarse y, una vez dentro del hospedero, es rápidamente eliminada de la circulación sin que tenga oportunidad de inducir enfermedad. Los genes blanco más comúnmente mutados con el fin de lograr atenuación bacteriana son los genes aromáticos (*aro*) (32). Estos genes codifican enzimas necesarias para la síntesis de aminoácidos, vitaminas y agentes quelantes de hierro. Debido a que muchos de estos componentes son limitados en el hospedero mamífero, la falta de estas enzimas biosintéticas limitan el crecimiento bacteriano postinfección.

La cepa de *S. enterica*, serotipo Typhimurium, SL3261 es una mutante en el gen *aroA*, con virulencia atenuada en ratones y con capacidad de inducir protección contra un reto letal con la cepa silvestre de serotipo Typhimurium (31). La vacuna SL3261 se ha usado extensamente como

vector de diversos genes heterólogos. Un representante de las vacunas de *S. enterica*, serotipo Typhi, es la cepa CVD 908*htrA*, un doble mutante de genes aromáticos *aroC* y *aroD* con una mutación adicional en el gen *htrA* (32,34). Ambas mutaciones *aro* generan una cepa atenuada que, al ser administrada oralmente a voluntarios, induce una respuesta inmune humoral y celular fuerte asociada con protección. La mutación en *htrA* bloquea la expresión de la serin-proteasa HtrA, una proteína de estrés que contribuye a la patogenicidad de la bacteria. La vacuna CVD 908*htrA*, que se está utilizando como vector de antígenos heterólogos, ha mostrado un buen nivel de tolerancia en las pruebas con voluntarios.

Otras mutaciones en genes metabólicos evaluados *in vivo* incluyen los genes *cya*, *crp*, *phoP*, *phoQ* y *htrA*. Los genes *cya* y *crp* son necesarios para la síntesis del AMP cíclico y su receptor, respectivamente, y participan en la regulación de múltiples vías metabólicas y en el control de la expresión genética de los diversos genes y operones. En forma similar, los genes *phoP* y *phoQ*, miembros del sistema de regulación de dos componentes, han sido mutados para la creación de cepas atenuadas. Este sistema activa la expresión genética de la transcripción de los múltiples genes, incluidos los genes de virulencia en la respuesta a cambios en el nivel de fosfato (2).

Uso de *Salmonella* viva atenuada como vector de antígenos

Se han utilizado exitosamente antígenos de origen viral, bacteriano y parasitario en *Salmonella* en modelos animales como activadores de respuesta inmune para inducir la protección contra diversos patógenos (36). En esta sección, se describe la expresión de antígenos procedentes de patógenos humanos en *Salmonella*, su evaluación en modelos animales como agentes inmunoprotectores y su bioseguridad e inmunogenicidad en estudios clínicos de fase I.

***Salmonella* como vector en la vacunación contra tétanos, difteria y pertusis**

La vacuna de DPT es un combinado de toxoide tetánico, diftérico y antígenos de *Bordetella*

pertusis. La vacuna se da por vía parenteral y requiere de más de 3 refuerzos para la protección apropiada del individuo. Aunque la vacuna es efectiva y de bajo costo, presenta efectos colaterales locales y sistémicos, algunos severos, relacionados principalmente con los antígenos de *B. pertusis*. Además, la inmunización parenteral crea riesgos de transmisión de otras enfermedades infecciosas como la hepatitis B y el virus de la inmunodeficiencia humana, en especial, en países donde aún prevalece la reutilización de las agujas hipodérmicas.

Una vacuna ideal contra estas enfermedades sería aquella que pudiera administrarse oralmente, de bajo costo y que no requiriera más de dos refuerzos. Durante los últimos años se ha explorado la posibilidad de crear tal vacuna, utilizando *Salmonella* como vector de estos antígenos. El fragmento C de la toxina tetánica, una porción altamente inmunogénica y carente de toxicidad, ha sido clonado y expresado en *Salmonella* bajo el control de diversos promotores inducibles *in vivo*, los promotores *nirB*, *pagC* y *katG* (37). La inmunización de ratones con *Salmonella* que expresa este antígeno, induce elevados niveles de anticuerpos neutralizantes capaces de proteger contra un reto experimental de toxina tetánica (16,38). La inmunogenicidad del fragmento C que expresa *S. enterica*, serotipo Typhi, ha sido altamente eficiente cuando se inmunizan los ratones por vía intranasal (16). Esta vía de inmunización activa principalmente el tejido linfóide nasal y, también, alcanza a estimular el tejido linfóide pulmonar, las placas de Peyer y el bazo (39).

Mientras que la expresión del fragmento C de la toxina tetánica (TT) en *Salmonella* ha sido indiscutiblemente exitosa, la expresión procariótica de porciones no toxigénicas de la toxina diftérica ha sido extremadamente difícil. La toxina diftérica (TD) es una proteína de 535 aminoácidos con tres dominios y una región carboxilo terminal responsable de la unión a los receptores de membrana de la células eucarióticas, capaz de inducir la endocitosis de la toxina en la célula (40). Con el fin de expresar la región C-terminal de la TD con la misma eficiencia que el fragmento C de la TT, se creó un sistema de expresión basado en

el plásmido pTETnir15, el cual porta el gen para el fragmento C de la TT bajo el control del promotor nirB. La porción 3' del fragmento C se modificó adicionando una región bisagra consistente en codones de Gln y Pro y dos sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. El plásmido resultante, denominado pOG214 (figura 2), se utilizó para crear una fusión de traducción entre el fragmento C de TT y la región C-terminal de TD, que expresara una sola proteína con ambas regiones toxigénicas bajo el control del promotor nirB. El plásmido resultante, pOG215, expresó la fusión de fragmento C de TT y la región C-terminal de DT no sólo en *E. coli* sino también en *Salmonella* (41). La fusión proteica fue reconocida en *immuno-*

blots no sólo con anticuerpos específicos contra la TT sino también con anticuerpos contra la TD.

El sistema de expresión de fusión con fragmento C (figura 2), se utilizó en forma similar para expresar la subunidad S1 de la toxina de *B. pertusis* (TP) (41,42). La TP es un factor de virulencia esencial en la patogénesis de la enfermedad y se considera un componente imprescindible para el desarrollo de la nueva vacuna acelular de DPT. La toxina está compuesta de cinco subunidades, S1 a S5, siendo la subunidad S1 la región portadora de la actividad adeniladora, responsable directa de la toxicidad celular. Las subunidades S2 a S5 forman la región

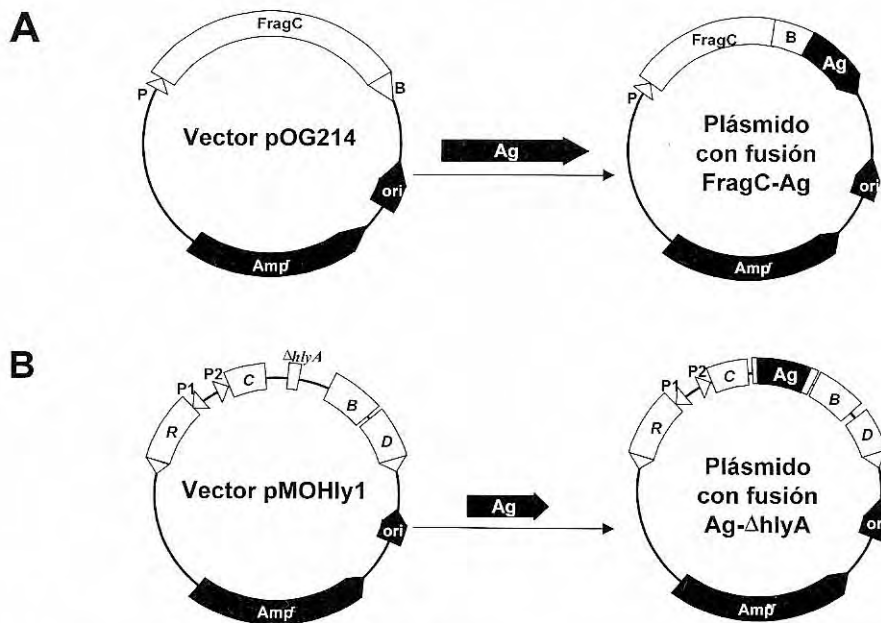


Figura 2. Vectores para expresión de antígenos. **Panel A.** Sistema de expresión intracitosólica de antígenos. El sistema consiste en un vector llamado pOG214 que posee el gen del fragmento C de la TT con una región bisagra (B) en la porción 3' terminal, a la cual se le pueden clonar, en marco de lectura, genes que codifiquen para antígenos heterólogos (Ag). La región bisagra (B), que codifica residuos de Gln y Pro, le permitirá a la proteína fusionada (Ag) movilizarse libremente mientras esté unida al fragmento C. Como el fragmento C y la región B carecen de señales de secreción, la proteína de fusión expresada por el plásmido permanecerá dentro del citosol bacteriano. P es el promotor para el gen fragmento C o su fusión. **Panel B.** Sistema para expresión y secreción de antígenos. El vector pMOHly1 contiene el operón de la hemolisina de *E. coli*, el cual codifica un sistema de secreción tipo I. Las proteínas codificadas por los genes *hlyB* (B) y *hlyD* (D) permiten, junto con la proteína de *Salmonella* TolC, la translocación de la HlyA o de proteínas que contengan la señal de secreción de la HlyA (Δ HlyA) al espacio extracelular bacteriano (69). El gen que codifica el antígeno heterólogo (Ag) deberá clonarse en marco de lectura con la señal de secreción Δ HlyA en la región 3' terminal. HlyR (R) es el activador del promotor P2 que permite la transcripción de los genes *hlyB* (B), *hlyC* (C), Δ hlyA, y *hlyD* (D). P1 es el promotor para el gen *hlyR* (R). Amp^r es el gen que codifica para beta-lactamasa, el marcador de resistencia antibiótica de los plásmidos. Ori es un origen de replicación ColE1 presente en ambos vectores.

que se une a los receptores de membrana de las células eucariotas blanco y que permite la internalización de la subunidad S1. La fusión TT-S1 se expresó en *Salmonella* bajo el control del promotor nirB, como se demostró en los *immunoblots*. La *Salmonella* que expresa la fusión se utilizó para inmunizar ratones y se demostró que el suero de los ratones inmunizados presentaba anticuerpos neutralizantes específicos contra la subunidad S1. El desarrollo de nuevas vacunas de *Salmonella* como vector de DPT y su posterior evaluación en voluntarios permitirá concluir si es posible contar en el futuro con vacunas más eficaces, más seguras y menos costosas contra la difteria, el tétanos y la Tos ferina.

Vacuna de *Salmonella* contra infecciones por *Helicobacter pylori*

Las infecciones por *H. pylori* se asocian con un significativo número de enfermedades gastro-intestinales, entre las cuales se destacan la gastritis crónica, la úlcera péptica, el adenocarcinoma gástrico y el linfoma gástrico (43-46). El elevado número de individuos infectados, el incremento de la resistencia de las cepas a los antibióticos y el alto costo del tratamiento antibiótico, en especial en los países en vías de desarrollo, son factores preocupantes que justifican el desarrollo de alternativas costo-efectivas, para el control y la prevención de la infección por *H. pylori*, como son las vacunas.

La ureasa, una enzima esencial para el proceso de colonización de *H. pylori*, ha sido evaluada como vacuna en ratones en forma de proteína purificada en combinación con la toxina colérica (47,48). Varios estudios informan que dicha combinación es inmunoprotectora contra la colonización de la mucosa gástrica murina por *H. pylori* (49-51). Las subunidades A y B, que conforman la ureasa de *H. pylori* (52), fueron clonadas y expresadas en la cepa atenuada de *S. enterica*, serotipo Typhimurium, SL3261. El plásmido pYZ97, donde los genes de la ureasa A y B fueron clonados, es un derivado del vector pBR322, el cual demostró ser altamente estable tanto *in vitro* como *in vivo*.

Igualmente, la vacuna atenuada SL3261(pYZ97) expresó un nivel significativamente alto de ambas subunidades como se demostró en los

immunoblots (53-54). La inmunogenicidad de esta vacuna se evaluó inmunizando dos tipos de cepas de ratones, BALB/c y C57BL6, por vía oral, con una dosis única de 1×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) en un volumen total de 100 ul. Los *immunoblots* y los ensayos de ELISA mostraron que ambas cepas de ratones inmunizados con la vacuna SL3261 (pYZ97) respondían con anticuerpos antiureasa A y antiureasa B de tipo IgG e IgA. Se encontró que la respuesta humoral fue comparable en ambas cepas de ratones no sólo en las mucosas sino también a nivel sistémico.

No se observaron anticuerpos antiureasa en ratones inmunizados con la cepa control SL3261. Aquellos ratones inmunizados con la cepa SL3261(pYZ97) mostraron un nivel de protección de 100% contra la colonización gástrica por una cepa silvestre de *H. pylori* adaptada a ratones. La alta efectividad de la vacuna en la protección contra la colonización gástrica por *H. pylori* en el modelo murino, la alta inmunogenicidad y los efectos colaterales insignificantes, hacen de la vacuna viva atenuada recombinante de *Salmonella* una buena alternativa para el control de las enfermedades en los humanos asociadas con la infección por *H. pylori*.

Vacunas de *Salmonella* contra malaria

La malaria es una enfermedad de reconocida importancia en la salud pública de los países tropicales, ya que es responsable de 2 millones de muertes anuales, aproximadamente, y cerca de 300 millones de casos nuevos anuales de infección (55). La diseminación de cepas de *Plasmodium falciparum* con resistencia a la nueva generación de drogas antimaláricas ha generado un serio problema para el tratamiento de pacientes y para el control de la malaria, especialmente en el suroriente asiático (56,57).

Las vacunas, desde el punto de vista de la salud pública, constituyen el método más eficaz de prevención y control de enfermedades infecciosas. Infortunadamente, las dificultades en el desarrollo de vacunas antimaláricas se ha hecho evidente como consecuencia del complejo ciclo de vida del parásito, la expresión alternante de genes para cada fase de desarrollo y la diversidad antigénica debida a la variación de fase (58), así como al

intercambio genético durante el ciclo sexual del parásito en el mosquito (59).

Dentro del hospedero humano, el parásito transita por el hígado donde se lleva a cabo la fase preeritrocítica. Posteriormente, el parásito migra a la sangre periférica, donde tiene lugar la fase eritrocítica, la cual se manifiesta clínicamente en el paciente con rangos de severidad que van desde la fiebre y los escalofríos hasta el bloqueo de la red capilar, el daño multisistémico y la muerte del paciente (60).

Los mecanismos de respuesta inmune antimalárica no se han dilucidado completamente; pero se sabe que juegan un papel primordial para el control de la enfermedad, como se evidencia en los estudios epidemiológicos experimentales. Estos informan que la inmunidad natural en la población adulta de áreas hiperendémicas es capaz de inducir un alto grado de protección contra la malaria (61). Los estudios experimentales han mostrado, igualmente, que la inmunización de individuos con esporozoítos irradiados es efectiva para inducir protección contra el reto experimental con cepas silvestres de *P. falciparum* (62,63). Estas evidencias clínicas indican que la vacunación contra la malaria es posible y que constituye una alternativa ideal para su control (64).

El tipo de respuesta inmune que posiblemente participa en la protección antimalárica durante la fase preeritrocítica es la respuesta celular inmune de tipo citotóxico (65). Las células citotóxicas destruyen las células hepáticas infectadas, liberan el parásito al espacio extracelular y lo exponen directamente a la acción de macrófagos y anticuerpos específicos para su posterior eliminación. Además, la respuesta inmune de anticuerpos se considera esencial para la inhibición de la invasión de hepatocitos por los esporozoítos y el consecuente bloqueo de las fases sucesivas de desarrollo parasitario. Durante la fase eritrocítica, la respuesta de anticuerpos juega un papel primordial en la inhibición de la invasión de los eritrocitos por los merozoítos mediante el bloqueo de las proteínas de superficie del merozoito que se unen a los receptores de la membrana del eritrocito (66). Dichos anticuerpos también podrían eliminar los merozoítos

circulantes por medio de la fijación del complemento o a través de un mecanismo de citotoxicidad mediada por anticuerpos.

Expresión y secreción de antígenos preeritrocíticos de *P. falciparum*

La proteína 2 de superficie del esporozoito de *P. falciparum* (SSP-2) se informó como un antígeno protector en ratones contra la infección experimental por malaria. La proteína induce linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos, responsables de la protección contra la infección experimental con parásitos virulentos (65). Los CTL específicos contra SSP-2 han sido detectados también en voluntarios inmunizados con esporozoítos irradiados de *P. falciparum* y se cree que pueden participar en la inmunoprotección antimalárica en las áreas endémicas (67).

Con el objetivo de inducir CTL específicos para SSP-2, se clonó y expresó la SSP-2 de *P. falciparum* en la vacuna de *S. enterica*, serotipo Typhi, CVD 908*htrA* (68). El sistema de expresión utilizado fue el de secreción tipo I de la hemolisina, derivado originalmente de una cepa de *E. Scherichia coli* uropatogénica (69) (figura 2, panel B). A través de este sistema, la proteína SSP-2 se fusiona a una secuencia de la señal de secreción que es reconocida por proteínas del sistema de secreción localizadas en la pared celular bacteriana, las cuales transportan la SSP-2 al espacio extracelular. Se ha informado que la secreción de antígenos mediante este sistema de expresión induce una fuerte respuesta específica de CTL, esencial para la inmunoprotección contra los parásitos intracelulares (70).

El antígeno de fase hepática (LSA-1) de *P. falciparum* contiene epítopes inductores de respuesta inmune T y B en individuos expuestos a malaria, los cuales se cree que participan activamente en la inmunoprotección (71,72). Este antígeno también ha sido expresado en *Salmonella*, no sólo a través del sistema de secreción tipo I sino también como fusión con el fragmento C de la toxina tetánica (73) (figura 2). Los experimentos en el modelo murino mostraron que la inmunización con *Salmonella*, que expresa LSA, induce no sólo anticuerpos específicos contra LSA-1 sino también CTL.

Otra proteína preeritrocítica de interés es la proteína circunsporozoítica (CSP), expresada en la vacuna viva *S. enterica*, serotipo Typhi, CVD 908 a partir de una inserción en el cromosoma bacteriano bajo el control de un promotor pTac. Tres de doce voluntarios inmunizados con esta cepa respondieron con anticuerpos o con CTL. Aunque el número de voluntarios que respondió al CSP fue bajo, el estudio demostró que *Salmonella* no sólo expresaba CSP *in vivo* sino que también tenía la posibilidad de estimular respuestas inmunes de tipo humoral y celular (22). En la actualidad, nuestro laboratorio evalúa la expresión de CSP a partir de plásmidos multicopia y promotores para inducción *in vivo*, con el fin de incrementar la expresión de CSP y estimular una mejor respuesta inmune en el hospedero.

Expresión de proteínas de la fase eritrocítica de *P. falciparum*

La proteína de superficie del merozoíto (MSP-1) tiene 200 kDa y es una buena candidata para ser incluida en la vacuna antimalárica multivalente (74-76). La proteína es procesada por una enzima matorasa que genera un fragmento de 19 kDa que permanece asociado con la membrana del merozoíto (77). Este fragmento, denominado MSP-1₁₉, contiene dos motivos presentes también en el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que le permiten al merozoíto adherirse y, posteriormente, invadir el eritrocito. Los anticuerpos neutralizantes anti-MSP-1₁₉ previenen el proceso de invasión de eritrocitos *in vitro* y protegen a los ratones contra la infección experimental por malaria (75,78).

En nuestro laboratorio, hemos clonado y expresado exitosamente la proteína MSP-1₁₉ fusionada al fragmento C de la toxina tetánica bajo el control del promotor nirB en *Salmonella* (79) (figura 2, panel A). La inmunogenicidad de la vacuna viva CVD 908/*htrA* que expresa el fragmento C-MSP-1, se evaluó en ratones BALB/c mediante inmunización intranasal de $1,0 \times 10^9$ UFC de la vacuna. Los ensayos de ELISA del suero de los ratones evaluados indicaron que los ratones elaboraban anticuerpos anti-MSP-1₁₉ y anti-fragmento C de la TT, los cuales aumentaron en título después de un refuerzo con la misma dosis

intranasal de la vacuna. Los sueros se evaluaron, además, por inmunofluorescencia y se demostró que los anticuerpos presentes en dichos sueros reconocían la estructura nativa del MSP-1 sobre la superficie de los merozoítos (79). Estos resultados indican que la proteína MSP-1 expresada en *Salmonella*, lo hace también *in vivo* e induce una respuesta inmune de anticuerpos contra epítopes nativos de MSP-1. Estos resultados crean la posibilidad de explorar el potencial de esta vacuna como componente eritrocítico de una vacuna polivalente de *Salmonella* contra malaria.

Conclusiones y perspectivas

La atenuación de agentes patógenos ha sido el concepto central a lo largo de la historia de la vacunación. El uso del agente agresor sin poder virulento es el paradigma en el cual se basan muchas de las vacunas de uso en la actualidad. Algunos ejemplos incluyen las vacunas vivas contra la poliomielitis, la rabia y la fiebre tifoidea, como también toxinas atenuadas o toxoides contra el tétanos, la difteria y, próximamente, contra la tos ferina.

Las vacunas de *Salmonella* atenuada son un sistema versátil para el transporte de antígenos heterólogos de origen viral, bacteriano y parasitario, para la inducción de respuestas inmunoprotectoras de tipo humoral y celular en el hospedero humano. Igualmente, se ha propuesto el uso de *Salmonella* para expresar antígenos tumorales y agentes modificadores de la respuesta inmune, como las citocinas, con el fin de explorar su utilidad en el tratamiento de cáncer. Sistemas novedosos de expresión procariótica han permitido la expresión de antígenos dentro del citosol bacteriano, como también en el espacio extracelular mediante un sistema de secreción a través de membrana. Cada sistema presenta el antígeno al sistema inmunitario en forma particular e induce la activación de subpoblaciones linfocíticas divergentes de tipo Th1, Th2 o CTL. Según el agente infeccioso, se podrían elegir sistemas de expresión y secreción que indujeran respuestas predominantemente humorales tendientes a la eliminación del microorganismo extracelular, o respuestas predominantemente celulares para la eliminación del microorganismo intracelular.

Actualmente se evalúan nuevas estrategias para el uso de *Salmonella* como vector y, entre las más prometedoras, se incluye el transporte de vacunas de ADN con *Salmonella* (80). Las vacunas de ADN son, por lo general, plásmidos que portan un gen bajo el control de un promotor eucariote, el cual codifica un antígeno recombinante. *Salmonella* atenuada transporta dicho plásmido al sistema reticuloendotelial donde es liberado intracelularmente para iniciar la expresión eucariótica del antígeno recombinante. El antígeno expresado es procesado y presentado por moléculas clase I del CMH a los receptores celulares T de linfocitos T CD8. La activación de los linfocitos T CD8 induce la estimulación de células CTL específicas, capaces de eliminar aquellas células que presenten sobre su superficie epítopes del mismo antígeno. Este sistema de inmunización será útil en la elaboración de vacunas contra parásitos intracelulares como la malaria en la fase preeritrocítica, la tuberculosis o los agentes virales, entre otros.

El constante avance tecnológico y científico permitirá determinar si *Salmonella* atenuada podrá constituirse en un vector eficaz de vacunas para la protección contra diversos patógenos microbianos. El alto nivel de seguridad para el vacunado, la ventaja de su administración oral, la inducción eficaz de la respuesta inmune y el bajo costo de producción son factores contundentes en favor del desarrollo de vacunas de *Salmonella*, en especial para aquellas regiones del mundo donde el índice de enfermedades infecciosas es elevado y donde los recursos para la salud son limitados o casi inexistentes.

Agradecimientos

Al doctor Myron M. Levine por su invaluable apoyo en el desarrollo del presente trabajo, el cual fue financiado parcialmente con los fondos RO 1AI40292 y RO 1AI29471 del NIAI de los *National Institutes of Health*.

Referencias

1. **Khakhria R, Woodward D, Johnson WM, Poppe C.** *Salmonella* isolated from humans, animals and other sources in Canada, 1983-92. *Epidemiol Infect* 1997; 119:15-23.
2. **Hohmann EL, Oletta CA, Killeen KP, Miller SI.** *phoP*/*phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J Infect Dis* 1996;173:1408-14.
3. **Hoa NT, Diep TS, Wain J, Parry CM, Hien TT, Smith MD, et al.** Community-acquired septicaemia in southern Viet Nam: the importance of multidrug-resistant *Salmonella typhi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998;92: 503-8.
4. **Levine MM, Taylor DN, Ferrecio C.** Typhoid vaccines come of age. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:374-81.
5. **Jones B, Falkow S.** Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Ann Rev Immunol* 1996;14:533-61.
6. **Ivanoff B, Levine MM, Lambert PH.** Vaccination against typhoid fever: present status. *Bull WHO* 1994; 72:957.
7. **Sinha A, Sazawal S, Kumar R, Sood S, Reddaiah VP, Singh B, et al.** Typhoid fever in children aged less than 5 years. *Lancet* 1999;354:734-7.
8. **Martin SM, Hardgrett-Bean N, Tauxe RV.** An atlas of *Salmonella* in the United States: serotype-specific surveillance 1968-1986. Atlanta, GA: Centers for Disease Control; 1987.
9. **Rowe B, Ward LR, Threlfall EJ.** Spread of multiresistant *Salmonella typhi*. *Lancet* 1990;336:1065.
10. **Lee C.** Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. *Infect Agents Dis* 1996;5:1-7.
11. **Darwin KH, Miller VL.** Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:405-28.
12. **Mills DM, Bajaj V, Lee CA.** A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* 1995;15:749-59.
13. **Groissman EA, Ochman H.** Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *Embo J* 1993;12:3779-87.
14. **Beuzen CR, Banks G, Deiwick J, Hensel M, Holden DW.** pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 1999;33:806-16.
15. **Vásquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC, et al.** *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 2000;238:1655-8.
16. **Galen JE, Gómez-Duarte OG, Losonsky GA, Halpern JL, Lauderbaugh, CS, Kaintuck S, et al.** A murine model of intranasal immunization to assess the immunogenicity of attenuated *Salmonella typhi* live vector vaccines in stimulating serum antibody responses to expressed foreign antigens. *Vaccine* 1997;15:700-8.

17. Hopkins S, Kraehenbuhl J, Schöedel F, Potts A, Peterson D, de Grandi P, et al. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infect Immun* 1995;63:3279-86.
18. Sztejn MB, Tanner MK, Polotsky Y, Orenstein JM, Levine MM. Cytotoxic T lymphocytes after oral immunization with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi* in humans *J Immunol* 1995;155:3987-93.
19. VanCott JL, Staats HF, Pascual DW, Roberts M, Chatfield SN, Yamamoto M, et al. Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper subsets, macrophages, and derived cytokines following oral immunization with live recombinant *Salmonella*. *J Immunol* 1997;156:1504-14.
20. Sztejn MB, Wasserman SS, Tacket CO, Edelman R, Hone D, Lindberg AA, et al. Cytokine production patterns and lymphoproliferative responses in volunteers orally immunized with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi*. *J Infect Dis* 1994;170:1508-17.
21. Comoy EE, Capron A, Thyphronitis G. *In vivo* induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *Inter Immunol* 1997;9:523-31.
22. González C, Hone D, Noriega F, Tacket CO, Davis JR, Losonsky G, et al. *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J Infect Dis* 1994;169:927-31.
23. Mastroeni P, Simmons C, Fowler R, Hormaeche CE, Dougan G. Igh-6-/- (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and show impaired Th1 T-cell responses to *Salmonella* antigens. *Infect Immun* 2000;68:46-53.
24. Levine MM, Tacket CO, Galen JE, Barry EM, Noreiga F, Sztejn MB. Progress in development of new attenuated strains of *Salmonella typhi* as live oral vaccines against typhoid fever. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, editors. *New generation vaccines*. New York: Marcel Dekker; 1997. p.437-46.
25. Bodhidatta L, Taylor DN, Thisyakorn U, Echeverria P. Control of typhoid fever in Bangkok, Thailand, by annual immunization of school children with parenteral typhoid vaccine. *Rev Infect Dis* 1987;9:841-5.
26. Hessel L, Debois H, Fletcher M, Dumas R. Experience with *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:609-20.
27. Kossaczka Z, Lin FC, Ho VA, Thuy NT, Bay PV, Thanh TC, et al. Safety and immunogenicity of Vi conjugate vaccines for typhoid fever in adults, teenagers, and 2- to 4-year-old children in Vietnam. *Infect Immun* 1999; 67:5806-10.
28. Levine MM, Ferrecio C, Black RE, Germanier R. Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet* 1987; 1:1049-52.
29. Levine MM, Ferrecio C, Cryz S, Ortiz E. Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty21a typhoid vaccine in randomised controlled field trial. *Lancet* 1990;336:891-4.
30. Simunjuntak C, Paleologo F, Punjabi NH, Darmo-wigoto R, Soeprawoto, Totosudirjo H, et al. Oral immunization against typhoid fever in Indonesia with Ty21a vaccine. *Lancet* 1991;338:1055-9.
31. Hoiseth S, Stocker BAD. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 1981;292:238-9.
32. Hone DM, Harris AM, Chatfield SN, Dougan G, Levine MM. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 1991;9:810-6.
33. Medina E, Paglia P, Nikolaus T, Müller A, Hensel M, Guzman CA. Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella typhimurium* are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. *Infect Immun* 1999;67:1093-9.
34. Tacket CO, Sztejn MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Nataro JP, Edelman R, et al. Safety and immune response in humans of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains deleted in *htrA* and *aroC*, *aroD*. *Infect Immun* 1997; 65:452-6.
35. Curtiss RIII, Kelly SM. *Salmonella typhimurium* deletion mutant lacking adenylated cyclase and cyclin AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect Immun* 1987;55:3035-43.
36. Chatfield SN, Strugnelli RA, Dougan G. Live *Salmonella* as vaccines and carries of foreign antigenic determinants. *Vaccine* 1989;7:495-8.
37. Dunstan SJ, Simmons CP, Strugnelli RA. Use of *in vivo*-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *Infect Immun* 1999;67:5133-41.
38. Chatfield SN, Charles IG, Makoff AF, Oxe MD, Dougan G, Pickard D, et al. Use of the *nirB* promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Biotechnology* 1992;10:888-92.
39. Pickett TE, Pasetti MF, Galen JE, Sztejn MB, Levine MM. *In vivo* characterization of the murine intranasal model for assessing the immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi strains as live mucosal vaccines and as live vectors. *Infect Immun* 2000;68:205-13.

40. **Rolf JM, Gaudin HM, Eidels L.** Localization of the diphtheria toxin receptor-binding domain to the carboxyl terminal Mr 6000 region of the toxin. *J Biol Chem* 1990; 265:7331-7.
41. **Gómez-Duarte OG, Galen JE, Chatfield SN, Rappuoli R, Eidels L, Levine MM.** Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain. *Vaccine* 1995;13:1596-602.
42. **Barry EM, Gómez-Duarte OG, Chatfield SN, Pizza M, Rappuoli R, Losonsky GA, et al.** Expression and immunogenicity of pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908. *Infect Immun* 1996;64:4172-81.
43. **NIH consensus development on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease.** *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA* 1994;272:65.
44. **Parsonet J, Hanssen S, Rodríguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, et al.** *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 1994; 330:1267-71.
45. **Hussel T, Isacson PG, Crabtree JE, Spencer J.** The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993;342:571-4.
46. **Wotherspoon AC, Doglioni C, Cooper M, Robinson J.** Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993;342:575-7.
47. **Eaton KA, Krakowaka S.** Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994;62:3604-7.
48. **Tsuda M, Karita M, Morshed MG, Okita K, Nakasaki TA.** A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mice stomach. *Infect Immun* 1994;62:3586-9.
49. **Marchetti M, Aricò B, Burrioni D, Figura N, Rapuoli R, Ghiara P.** Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995;655-8.
50. **Michetti P, Corthésy-Theulaz I, Davin C, Haas R, Vaney AC, Heitz M, et al.** Immunization of BALB/c mice against *Helicobacter felis* infection with *Helicobacter pylori* urease. *Gastroenterology* 1994;107:1002-11.
51. **Pappo J, Thomas WD, Kabok Z, Taylor NS, Murphy JC, Fox JG.** Effect of oral immunization with recombinant urease on murine *Helicobacter felis* gastritis. *Infect Immun* 1995;63:1246-52.
52. **Mobley HL, Island MD, Hausinger RP.** Molecular biology of microbial ureases. *Microbial Rev* 1995;59:451-80.
53. **Gómez-Duarte OG, Lucas B, Yan Z, Panthel K, Haas R, Meyer TF.** Urease subunits A and B delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain protects mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori*. *Vaccine* 1998;16:460-71.
54. **Gómez-Duarte OG, Bumann D, Meyer T.** The attenuated *Salmonella* vaccine approach for the control of *Helicobacter pylori*-related diseases. *Vaccine* 1999; 17:1667-73.
55. **World Health Organization.** Malaria fact sheet no. 94. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1994.
56. **Su X, Kirkman LA, Fujioka H, Wellems TE.** Complex polymorphisms in an 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell* 1997;91:593-603.
57. **Wernsdorfer WH.** Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Trop* 1994;56:143-56.
58. **Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, Pinches R, Nash G, Marsh K, et al.** Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* 1992;357:689-92.
59. **Conway DJ, Roper C, Oduola AM, Arnot DE, Krensner PG, Grobush MP, et al.** High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4506-11.
60. **Miller LH, Good MF, Milon G.** Malaria pathogenesis. *Science* 1994;264:1878-83.
61. **Christophers SR.** The mechanism of immunity against malaria in communities living under hyper-endemic conditions. *Indian J Med Res* 1924;12:273-94.
62. **Clyde DF, Most H, McCarthy V, Vandenberg JP.** Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci* 1973;266:169-77.
63. **Herrington D, Davis J, Nardin E, Beier M, Cortese J, Eddy H, et al.** Successful immunization of humans with irradiated malaria sporozoites: humoral and cellular responses of the protected individuals. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45:539-47.
64. **Nussenzweig RS, Long CA.** Malaria vaccines: multiple targets. *Science* 1994;265:1381-3.
65. **Khusmith S, Charoenvit Y, Kumar S, Sedegah M, Beaudoin RL, Hoffmann SL.** Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. *Science* 1991;252:715-8.
66. **Daly TM, Long CA.** Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria. *J Immunol* 1995;155:236-43.
67. **Krzych U, Lyon AJ, Jareed T, Schneider I, Hollingdale MR, Gordon DM, et al.** T lymphocytes from volunteers immunized with irradiated *P. falciparum*

- sporozoites recognize liver and blood stage malaria antigens. *J Immunol* 1995;155:4072-7.
68. **Santiago A, Gómez-Duarte OG, Levine MM.** Expression and secretion of the *Plasmodium falciparum* SSP-2 protein in *Salmonella* vaccine strains by a type I secretion system. Chicago: American Society for Microbiology; 1999.
 69. **Gentschev I, Mollenkopf H, Sokolovic Z, Hess J, Kaufmann SH, Goebel W.** Development of antigen-delivery systems based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway. *Gene* 1996;179:133-40.
 70. **Hess J, Gentschev I, Miko D, Welzel M, Ladel C, Goebel W, et al.** Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1458-63.
 71. **Connelly M, King CL, Bucci K, Walters S, Genton B, Alpers MP, et al.** T-cell immunity to peptide epitopes of liver-stage antigen 1 in an area of Papua, New Guinea, in which malaria is holoendemic. *Infect Immun* 1997;65:5082-7.
 72. **Fidock DA, Gras-Masse H, Leppers J, Brahimi K, Benmohamed L, Mellouk S, et al.** *Plasmodium falciparum* liver stage antigen-1 is well conserved and contains potent B and T cell determinants. *J Immunol* 1994;153:190-204.
 73. **Gómez-Duarte OG, Pasetti MF, Santiago A, Hoffman S, Sztein MB, Levine MM.** Expression of LSA-1 of *Plasmodium falciparum* in attenuated *Salmonella* vectors induce cellular and humoral immune responses in mice. *Memoirs, XV International Congress for Tropical Medicine and Malaria*; 2000; en prensa.
 74. **Becker SI, Wang R, Hedstrom RC, Aguiar JC, Jones TR, Hoffman SL, et al.** Protection of mice against *Plasmodium yoelii* sporozoite challenge with *P. yoelii* merozoite surface protein 1 DNA vaccines. *Infect Immun* 1998;66:3457-61.
 75. **Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA.** A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med* 1990;172:379-82.
 76. **Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA.** Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J Exp Med* 1994;180:389-93.
 77. **Barale J, Blisnick T, Fujioka H, Alzari PM, Aikawa M, Braun-Breton C, et al.** *Plasmodium falciparum* subtilisin-like protease 2, a merozoite candidate for the merozoite surface protein 1-42 maturase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6445-50.
 78. **Holder AA, Freeman RR.** The three major antigens on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites are derived from a single high molecular weight precursor. *J Exp Med* 1984;160:624-9.
 79. **Wu S, Beier M, Sztein MB, Galen JE, Pickett T, Holder A, et al.** Construction and immunogenicity in mice of an attenuated *Salmonella typhi* expressing *Plasmodium falciparum* merozoite protein-1 (MSP-1) fused to fragment C of tetanus toxin. *J Biotechnol* 2000; en prensa.
 80. **Darji A, Guzmán CA, Gerstel B, Wachholz P, Timmis KN, Wehland J, et al.** Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* 1997;91:765-75.