

## ***Salmonella* como vetor de vacinas vivas orais**

***Luis Gustavo Carvalho Pacheco\****

***Eder Zuconi\*\****

***Alan Lane de Melo\*\*\****

***Sérgio Costa Oliveira\*\*\*\****

***Vasco Azevedo\*\*\*\*\****

### ***Resumo***

Há alguns anos, foram desenvolvidas as primeiras linhagens atenuadas de *Salmonella* para serem utilizadas como candidatas a vacinas vivas orais contra a febre tifóide. No início, ainda eram desconhecidas as mutações responsáveis pelo fenótipo atenuado, mas, com o acúmulo de conhecimento sobre a genética associada à virulência, surgiram novas linhagens com atenuações geneticamente definidas. Muitas linhagens de *S. enterica* sorotipo Typhimurium e *S. enterica* sorotipo Typhi já foram bem estudadas quanto à capacidade de induzir resposta imunológica em modelos animais e em humanos. Com o desenvolvimento de sistemas de clonagem e expressão eficientes, o uso destas linhagens vacinais extrapolou o problema das salmoneloses, uma vez que tornou-se possível a produção e administração de antígenos de diferentes agentes patogênicos. Recentemente, uma nova tecnologia que vem sendo explorada é o uso de *Salmonella* como carreadora de vacinas de DNA. Tais vacinas já se mostraram capazes de induzir potentes respostas humorais e celulares contra antígenos heterólogos nos organismos hospedeiros. Todo este progresso nos estudos com as linhagens vacinais de *Salmonella* demonstra o potencial que elas possuem para a produção das futuras vacinas contra doenças infecciosas, parasitárias e até mesmo contra o câncer.

***Palavras-chave. Salmonella***- Linhagens atenuadas. Vacinas vivas orais. Antígenos heterólogos. Vacinas de DNA. Biossegurança.

### ***INTRODUÇÃO***

As salmonelas são bactérias Gram-negativas e constituem um gênero extremamente heterogêneo, com quase 2000 sorotipos (KAUFMANN; RAUPACH; FINLAY, 2001). Dentre os de maior importância para a saúde humana, destacam-se *Salmonella enterica* sorotipo Typhi (*S. typhi*), que causa infecções

sistêmicas e febre tifóide — doença endêmica em muitos países em desenvolvimento — e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (*S. typhimurium*), um dos agentes causadores das gastroenterites (McCLELLAND et al., 2001; GARMORY; BROWN; TITBALL, 2002).

\* Aluno do Bacharelado em Genética. Curso de Ciências Biológicas. UFMG. Bolsista de Iniciação Científica. FAPEMIG.

\*\* Aluno do Bacharelado em Genética. Curso de Ciências Biológicas. UFMG.

\*\*\* Professor Adjunto. Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados. Departamento de Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas. UFMG.

\*\*\*\* Professor Adjunto. Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas. Departamento de Bioquímica e Imunologia. Instituto de Ciências Biológicas. UFMG.

\*\*\*\*\* Professor Adjunto. Departamento de Biologia Geral. Instituto de Ciências Biológicas. UFMG.

Laboratório de Genética Celular e Molecular.

Av. Antônio Carlos, 6627. Campus Pampulha

31.270-901 - Belo Horizonte. Minas Gerais. Brasil

***E-mail:*** [vasco@icb.ufmg.br](mailto:vasco@icb.ufmg.br)

Por ser um patógeno intracelular, *S. enterica* tem sido um dos organismos preferidos pelos microbiologistas moleculares para identificar e elucidar fatores de virulência bacterianos. Nos últimos anos, acumulam-se informações sobre os mecanismos de interação e patogenia da *Salmonella* com as células hospedeiras (KAUFMANN; RAUPACH; FINLAY, 2001). Esse conhecimento se deve principalmente à grande similaridade dessa bactéria com a *Escherichia coli*, permitindo a utilização de instrumentos e técnicas em genética já desenvolvidos e conhecidos.

Muitos trabalhos já comprovaram a habilidade de linhagens vivas atenuadas de *Salmonella* em induzir potente resposta imunológica, celular e humoral, após vacinação (HORMAECHE, 1991). Além disso, já foram estabelecidos alguns sistemas eficientes para a produção heteróloga de proteínas em *Salmonella*. Isto torna particularmente atrativo o uso dessas bactérias como sistemas de administração de antígenos de diversos patógenos como vírus, bactérias e parasitos, proporcionando uma base para o desenvolvimento de novas vacinas.

### **PROCESSO DE INFECÇÃO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

O processo da infecção por salmonelas inicia-se quando estas bactérias atingem o tecido linfóide associado ao trato digestivo ("gut-associated lymphoid tissue" - GALT) e invadem as células M da placa de Peyer (RAUPACH; KAUFMANN, 2001). Ao contrário de *Shigella* e *Listeria*, que lisam o fagossomo e escapam da fusão com o lisossomo primário, as bactérias do gênero *Salmonella* não possuem este mecanismo de escape, permanecendo restritas ao fagolisossomo, no interior da célula hospedeira (GORVEL; MÉRESSE, 2001; SHATA et al., 2000).

Hopkins e colaboradores (1995) demonstraram que *Salmonella typhimurium* é capaz de induzir resposta sistêmica e de mucosa após única

imunização por quatro diferentes vias: oral, nasal, retal ou vaginal. Além disso, as salmonelas são capazes de estimular resposta imunológica via complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, após atravessarem as células M da mucosa intestinal (WEISS; KRUSCH, 2001). Os antígenos apresentados por estas duas classes de MHC são reconhecidos respectivamente por células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> (YRLID et al., 2001).

### **VACINAS COM SALMONELLA ATENUADAS**

A utilização de *Salmonella* na imunoprofilaxia iniciou-se com a busca de uma formulação que conferisse proteção contra a febre tifóide (ALMEIDA et al., 2002). As primeiras vacinas com esse objetivo consistiam em bactérias inativadas e administradas por via parenteral, que eram excessivamente reativas em humanos e não conferiam proteção completa, sendo, portanto, inviáveis para uso em programas de saúde pública (GARMORY; BROWN; TITBALL, 2002). Por outro lado, muitos autores verificaram uma proteção significativa contra salmoneloses invasivas em homens e animais quando se utilizavam organismos vivos atenuados ao invés de bactérias mortas. Vacinas vivas com *Salmonella* atenuadas têm um potencial invasivo limitado e crescem de forma lenta *in vivo*, causando uma infecção branda. Poucos dias após este processo, as bactérias são removidas do organismo hospedeiro (HORMAECHE, 1991).

Um dos principais objetivos do desenvolvimento racional de vacinas vivas é a atenuação da linhagem pela inativação de *loci* genéticos específicos. Nos últimos anos, foram gerados diversos mutantes de *Salmonella* com virulência reduzida. Os principais genes alvo destas mutações podem ser divididos em três categorias: genes ligados à virulência, genes que participam de processos de regulação gênica e genes envolvidos com o metabolismo biossintético. Dentro desta última categoria, mutações em

genes envolvidos na biossíntese de compostos aromáticos são mais freqüentemente empregados na obtenção de linhagens atenuadas, tanto para *Salmonella* como para outras bactérias Gram-negativas (ALMEIDA et al., 2002).

O bloqueio da via de biossíntese de compostos aromáticos leva à auxotrofia por diversos compostos como: aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano), enteroquilina (um composto quelante de ferro), folato (responsável pela biossíntese de purinas, timina, serina e f-Met-t-RNA), ubiquinona e vitamina K (STOCKER, 2000; ALMEIDA et al., 2002). No entanto, não é esperado que a necessidade de tirosina, fenilalanina ou triptofano impeça o crescimento da *Salmonella*, uma vez que estes aminoácidos estão disponíveis no plasma (STOCKER, 2000). Em contraste, o folato encontra-se presente em quantidades razoáveis em células de mamíferos, mas as salmonelas não possuem um sistema de transporte específico que permita sua assimilação. Desse modo, as linhagens *aro* de *Salmonella* permanecem nos tecidos do hospedeiro por alguns dias e depois são eliminadas pelos mecanismos imunológicos de defesa (ALMEIDA et al., 2002).

### **SALMONELLA ATENUADAS PARA ADMINISTRAÇÃO DE ANTÍGENOS HETERÓLOGOS**

Desde o seu desenvolvimento, as linhagens atenuadas de *Salmonella* têm sido caracterizadas como organismos para expressão de antígenos heterólogos (GARMORY; BROWN; TITBALL, 2002). Isso permitiu que a utilização das vacinas vivas atenuadas extrapolasse o problema das salmoneloses, uma vez que se tornou possível o uso destas bactérias como carreadoras de antígenos vacinais (ALMEIDA et al., 2002). As linhagens atenuadas são interessantes para essa finalidade, pois elas podem ser administradas pela via natural de infecção, isto é, oralmente, apresentando diversas vantagens, como baixo custo de preparação e de aplicação da vacina e diminuição das reações adversas após imunização (GARMORY; BROWN; TITBALL, 2002). Outra característica importante deste sistema de vacinação é a possibilidade de administrar imunógenos contra outros agentes patogênicos, como vírus, bactérias e até mesmo parasitos eucariotos, para os quais a preparação de vacinas pelas formas tradicionais é impraticável (HORMAECHE, 1991).

Sistema usado	Princípios básicos	Exemplos
Sistema letal-balanceado	As células bacterianas que perdem o plasmídeo são incapazes de sobreviver.	Plasmídeos expressando <i>asd</i> em linhagens de <i>Salmonella asd</i>
Promotores indutíveis <i>in vivo</i>	Uso de promotores que são induzidos <i>in vivo</i> , de preferência dentro de fagócitos	Promotores para <i>nirB</i> , <i>htrA</i> , <i>groE</i> e <i>pagC</i>
Direcionamento do antígeno recombinante para localizações não Citoplasmáticas	Reduz a concentração de antígenos potencialmente tóxicos no citoplasma da célula bacteriana,	Fusão dos genes heterólogos com proteínas de superfície ou secretadas (flagelina, MalE)
Integração cromossomal do gene Heterólogo	O gene é integrado no cromossomo, o que resulta em expressão estável.	Insção do gene em <i>aroC</i> ; sistema baseado em <i>his</i>

Quadro 1 - Sistemas utilizados para aumentar a estabilidade da expressão dos antígenos heterólogos em *Salmonella*

Nota: Adaptado de Mastroeni et al., 2000.

Um dos pré-requisitos para o desenvolvimento de uma vacina viva bivalente eficiente, que confira proteção contra salmoneloses e contra outra doença de acordo com o antígeno administrado, é a expressão da proteína heteróloga em níveis suficientes para induzir resposta imunológica. Com esse objetivo, alguns sistemas de expressão foram criados para *Salmonella* e têm sido testados com diferentes antígenos (GARMORY; BROWN; TITBALL, 2002). Já foi demonstrado que uma vacina fracamente imunogênica pode ser melhorada com a utilização de plasmídeos que rendem alto número de cópias e, portanto, aumentam a produção do antígeno recombinante (FOUTS et al., 1995; COVONE et al., 1998). Porém a expressão desses antígenos na linhagem vacinal pode ser instável, o que leva à perda de imunogenicidade. Uma das metodologias para controlar a estabilidade da expressão é a utilização de antibióticos que exercem pressão seletiva para a manutenção do plasmídeo recombinante durante a propagação da bactéria *in vitro*. Outra possibilidade é a utilização do sistema denominado letal-balanceado, que se baseia no uso de plasmídeos, complementando uma deficiência metabólica da linhagem vacinal de *Salmonella*. Alternativamente, pode-se também fazer a integração cromossômica do gene heterólogo ou utilizar promotores indutíveis *in vivo* (QUADRO 1) (ALMEIDA et al., 2002; DUNSTAN; SIMMONS; STRUGNELL, 2003; MASTROENI et al., 2000).

Vários estudos já relataram o uso de linhagens atenuadas de *Salmonella* como carreadoras de antígenos heterólogos na imunização contra diversas doenças infecciosas ou até mesmo parasitárias. Esses trabalhos demonstraram que muitas destas vacinas bivalentes foram eficazes em induzir proteção contra o patógeno do qual a proteína antigênica é derivada (CÁRDENAS; CLEMENTS, 1992; HORMAECHE et al., 1995; HONE et al., 1999). Galen e colaboradores (1997) observaram que a linhagem CVD 908 *aroC aroD* de *Salmonella thyphi* expressando o fragmento C da toxina tetânica é capaz de induzir altos níveis de anticorpos antitoxina tetânica em camundongos imunizados pela via intranasal, além de

proteção após desafio experimental. Ainda mais promissores são os resultados obtidos em trabalhos de imunização contra antígenos de natureza parasitária. Por exemplo, Wu e colaboradores (2000) demonstraram a produção de anticorpos contra a proteína MSP-1 (merozoite surface protein 1) do *Plasmodium falciparum* em camundongos imunizados com linhagem vacinal de *S. typhi* expressando este antígeno. Também já foi observada imunidade protetora contra leishmaniose em camundongos vacinados com linhagem de *S. typhimurium* produtora da proteína gp63 de *Leishmania major* (GARMORY; BROWN; TITBALL, 2002; ALMEIDA, et al., 2002). Atualmente, nosso grupo de trabalho está testando, em camundongos Swiss, uma vacina oral contra esquistossomose utilizando uma linhagem *aro* de *S. typhimurium* expressando a proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni*. Os resultados obtidos até agora sugerem a indução de resposta imunológica específica contra o antígeno heterólogo, além de um índice significativo de proteção em camundongos imunizados e desafiados experimentalmente com o parasito (dados não publicados). Outros exemplos da utilização de *Salmonella* como via de administração de antígenos vacinais estão listados no Quadro 2.

Após a comprovação da capacidade destas vacinas vivas de induzir resposta imunológica contra o antígeno heterólogo, uma questão ainda permanece: qual o efeito da imunidade preexistente à *Salmonella* sobre a potência da resposta gerada contra o imunógeno carreado? Alguns trabalhos sugerem que a imunidade pré-existente pode comprometer a eficácia da vacina, mas são ainda poucos os estudos que tratam deste tema e os resultados obtidos até agora não são totalmente conclusivos (BAO; CLEMENTS, 1991; ROBERTS et al., 1999; KOHLER et al., 2000; MEDINA; GUZMÁN, 2001).

#### **VACINAS DE DNA CARREADAS POR SALMONELLA**

Uma estratégia relativamente recente no campo das vacinas com *Salmonella* envolve seu uso como carreadoras de vacinas de DNA. Essas

vacinas são constituídas de plasmídeos contendo genes que codificam proteínas antigênicas desejadas, além dos elementos necessários para a expressão destes genes no seu hospedeiro, ou seja, em uma célula eucariótica. Diferentemente das vacinas anteriores, muitas das quais foram desenvolvidas para induzir anticorpos como mecanismo de proteção contra doenças causadas por microrganismos, as vacinas gênicas são criadas para gerar tanto resposta imune humoral quanto respostas celulares citotóxicas. Outro objetivo é desenvolver vacinas que podem ser usadas para tratar doenças infecciosas crônicas, alergias e até mesmo câncer (SRIVASTAVA; LIU, 2003).

O fato de muitos vetores bacterianos atenuados serem especificamente direcionados para as células apresentadoras de antígenos (APCs) sugeriu que eles poderiam também ser usados para administrar DNA para estas células de

maneira específica. Microrganismos que têm a capacidade de alcançar o citoplasma das células infectadas, tais como *Shigella* e *Listeria*, foram usados para administrar construções de DNA nas quais a expressão do antígeno recombinante estava sob o controle de um promotor eucarioto (MEDINA; GUZMÁN, 2001). Da mesma forma, linhagens de *Salmonella* também podem ser utilizadas como vetores de vacina de DNA. Após a infecção e a internalização pelas APCs, a *Salmonella* fica restrita a um compartimento celular especializado, o fagolisossomo, porém ainda é desconhecido como o plasmídeo contendo o gene de interesse escapa deste compartimento e atinge o núcleo da célula hospedeira, onde ocorre a expressão gênica (GARMORY; BROWN; TITBALL, 2002).

Darji e colaboradores (1997) imunizaram camundongos por via oral com um mutante *aro* de *S. typhimurium* carregando um plasmídeo

Linhagem	Antígeno expresso	Doença	Imunogenicidade <sup>(1)</sup>
<i>S. typhimurium cya<sup>-</sup> crp<sup>-</sup></i>	SpaA ( <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> )	Cárie	+
<i>S. typhimurium aro<sup>-</sup></i>	CTB ( <i>Vibrio cholerae</i> )	Cólera	+
<i>S. typhi aro<sup>*</sup></i>	Antígeno O ( <i>Vibrio cholerae</i> )	Cólera	+
<i>S. typhi ar<sup>-</sup> *</i>	Antígeno O de <i>Shigella flexneri</i>	Diarréia	+
<i>S. typhimurium cya<sup>-</sup> crp<sup>-</sup> *</i>	Proteína pre-S do vírus da hepatite B	Hepatite B	-
<i>S. typhi phoP phoQ *</i>	Urease de <i>Helicobacter pylori</i>	Infecções gátricas	-
<i>S. typhimurium aro<sup>-</sup></i>	28 Kda OMP ( <i>Neisseria meningitidis</i> )	Meningite	+
<i>S. typhimurium aro<sup>-</sup></i>	Toxina tetânica	Tétano	+
<i>S. typhimurium aro<sup>-</sup></i>	Gp120 (HIV)	AIDS	+
<i>S. typhimurium aro<sup>-</sup></i>	NP (vírus influenza)	Gripe	+
<i>S. typhimurium aro<sup>-</sup></i>	Proteína G (vírus respiratório sincicial)	Pneumonia	-
<i>S. typhimurium crya<sup>-</sup> cryp<sup>-</sup></i>	SREHP ( <i>Entamoeba histolytica</i> )	Amebíase	+
<i>S. typhimurium aro<sup>-</sup></i>	Gp63 ( <i>Leishmania major</i> )	Leishmaniose	+
<i>S. typhi aro<sup>-</sup> *</i>	Proteína circunsporozoíto (CSP) de <i>Plasmodium falciparum</i>	Malária	+

Quadro 2 - Alguns antígenos expressos por linhagens vacinais de *Salmonella*

Nota: Adaptado de Garmory, Brown e Titball, 2002, e de Almeida et al., 2002.

(1) Contra o antígeno heterólogo

\*Testes clínicos em humanos

com o gene *lacZ* de *Escherichia coli* sob o controle do forte promotor citomegalovírus (CMV). Isto induziu forte resposta imunológica específica contra b-gal nos animais vacinados. No mesmo estudo, uma linhagem de *Salmonella* carregando o gene *llo* sob controle do promotor CMV foi capaz de induzir respostas humorais e celulares contra a listeriolisina, em camundongos imunizados pela via oral, proporcionando proteção contra a *Listeria monocytogenes*. Essa possibilidade de administrar vacinas de DNA utilizando *Salmonella* foi confirmada por um estudo de Paglia e colaboradores (1998) no qual a vacinação com uma *S. typhimurium aro* carregando um plasmídeo com o gene *lacZ* induziu proteção contra uma linhagem celular de fibrossarcoma produtora de b-gal. Essa proteína funcionou como um antígeno associado ao tumor, e os camundongos vacinados, que produziram anticorpos específicos contra b-gal, mostraram resistência aumentada após o desafio com o fibrossarcoma *lacZ*<sup>+</sup>.

Embora a *Salmonella* permaneça presa no fagolisossomo, tanto Darji e colaboradores (1997) quanto Paglia e colaboradores (1998) relataram altos níveis de atividade dos genes repórteres *lacZ* ou GFP ("green fluorescent protein"), após a administração de suas respectivas linhagens carreadoras de DNA (SHATA et al., 2000). Nosso grupo de trabalho está realizando, na UFMG, ensaios de imunização oral de camundongos Swiss com uma linhagem *aro*

de *S. typhimurium* carreadora de uma vacina de DNA que contém o gene *Sm14* de *Schistosoma mansoni* sob controle do promotor CMV. As nossas observações preliminares também indicam expressão do antígeno heterólogo nas células hospedeiras infectadas pela *Salmonella* (dados não publicados). Diversos outros trabalhos também vêm utilizando *Salmonella* como carreadora de vacinas de DNA (QUADRO 3).

### BIOSSEGURANÇA ASSOCIADA AO USO DE LINHAGENS VACINAIS DE *SALMONELLA*

As linhagens bacterianas utilizadas para a geração de protótipos vacinais devem exibir um perfil de segurança adequado. Quando são usados patógenos atenuados, existe a possibilidade de reversão à forma virulenta e, portanto, a estabilidade do fenótipo atenuado deve ser garantida. Esta estabilidade pode ser conseguida através da seleção de *loci* gênicos específicos cuja inativação resulte em atenuação da linhagem. Adicionalmente, deleções independentes devem ser introduzidas em dois ou mais destes genes. Isso poderia eliminar o risco de reversão à virulência devido a eventos de recombinação ou de transferência gênica horizontal. A linhagem atenuada Ty21a *galE* de *Salmonella typhi* é licenciada para uso em humanos e, desde seu isolamento por mutagênese química no início da

Linhagem	Antígeno	Doença	Resposta imune
<i>S. typhimurium aro</i> <sup>-</sup>	Listeriolisina ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	Infeco intestinal	Humoral e celular
<i>S. typhimurium aro</i> <sup>-</sup>	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B	Hepatite B	Humoral e celular
<i>S. typhimurium aro</i> <sup>-</sup>	Glicoproteína D do vírus da herpes	Herpes	Humoral e celular
<i>S. typhimurium aro</i> <sup>-</sup>	ESAT-6 ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )	Tuberculose	- - -
<i>S. typhimurium aro</i> <sup>-</sup>	Peptídeo NS3 do vírus da hepatite C	Hepatite C	Celular
<i>S. typhimurium aro</i> <sup>-</sup>	HIV-1 Env	AIDS	Celular

Quadro 3 - Antígenos já testados para o desenvolvimento de vacina de DNA utilizando *Salmonella*

Nota: Adaptado de Garmory, Brown e Titball, 2002.

década de 70, não foram identificadas bactérias que reverteram para a forma selvagem (MEDINA; GUZMÁN, 2001; GARMORY; BROWN; TITBALL, 2002; ALMEIDA, et al., 2002).

Outra questão de segurança a ser considerada é que a expressão de determinados antígenos vacinais por organismos comensais não patogênicos ou microrganismos ambientais poderia aumentar sua virulência para grupos humanos ou animais. Neste contexto, a liberação de um vetor vacinal contendo genes antigênicos poderia representar risco ambiental. Portanto, é necessário estabelecer sistemas que minimizem a possibilidade de transferência gênica horizontal das linhagens vacinais para os membros da microbiota mucosa ou para microrganismos do ambiente. Isto pode ser conseguido utilizando-se diferentes estratégias tais como a incorporação de sistemas letais condicionais (MEDINA; GUZMÁN, 2001).

### CONCLUSÃO

As linhagens atenuadas de *Salmonella* já se mostraram eficazes para a expressão e administração de antígenos heterólogos e como

carreadoras de vacinas de DNA. Com a crescente caracterização de linhagens bem toleradas e o desenvolvimento de sistemas de clonagem e expressão que aumentem a sua imunogenicidade, as salmonelas vêm se tornando cada vez mais promissoras nos ensaios clínicos de novas vacinas.

A demonstração em modelos animais de que as vacinas bivalentes de *Salmonella* possuem a capacidade de induzir resposta imunológica protetora contra uma variedade de patógenos abre um novo espectro de possibilidades para a vacinologia atual, principalmente em relação à busca de vacinas contra parasitos eucariotos. Além disso, já foi observada a habilidade que estas vacinas possuem de induzir imunidade antitumoral.

Atualmente, uma possibilidade que vem sendo vislumbrada é a de produzir linhagens vacinais de *Salmonella* trivalentes. Tais vacinas poderiam conferir imunidade contra as salmoneloses, contra um antígeno heterólogo expresso pela *Salmonella* e contra um antígeno codificado pela vacina de DNA. Desde já, essa tecnologia se mostra promissora e oferece um novo e excitante campo de pesquisa na área das vacinas mucosas.

## ***Live oral vaccines using salmonella***

### ***Abstract***

***The first attenuated Salmonella strains were developed some years ago in order to be used as live oral candidate vaccines against typhoid fever. In the beginning the mutations responsible for the attenuated phenotype were unknown, however; with the accumulation of knowledge about the genetics of virulence, new genetically defined attenuated strains became available. Many strains of S. enterica serovar Typhimurium and S. enterica serovar Typhi were carefully studied concerning their ability to induce immune response in humans and animals. As the use of vaccine strains has expanded with the development of efficient cloning and expressing systems, the production and delivery of antigens from different pathogens have become more and more available. Lately, the use of Salmonella as the DNA carrier has been one of the most promising technologies as far as DNA vaccines are concerned. All this progress in the studies with the Salmonella vaccine strains shows their potential for new vaccines production against infectious disease, parasitic disease and even against cancer; in a near future.***

***Keywords: Salmonell. Attenuated strains Live oral vaccines Heterologous antigens DNA vaccine Biosafety***

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. E. S. et al. *Salmonella* vaciniais. **Biotechnol. Ci. Desenvol.**, Brasília, DF, v.25, p.22-26, 2002.
- BAO, J. X.; CLEMENTS, J. D. Prior immunologic experience potentiates the subsequent antibody response when *Salmonella* strains are used as vaccine carriers. **Infect. Immun.**, Washington, DC, v.59, p.3841-3845, 1991.
- CÁRDENAS, L.; CLEMENTS, J. D. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, DC, v.5, p.328-342, 1992.
- COVONE, M. G. et al. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.**, Washington, DC, v.66, p.224-231, 1998.
- DARJI, A. et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. **Cell**, Cambridge, UK, v.91, p.765-775, 1997.
- DUNSTAN, S. J.; SIMMONS, C. P.; STRUGNELL, R. A. In vitro and in vivo stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. Typhimurium. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.37, n.2/3, p.111-119, July 2003.
- FOUTS, T. R. et al. Construction and immunogenicity of *Salmonella typhimurium* vaccine vectors that express HIV-1 gp120. **Vaccine**, Amsterdam, v.13, p.1697-1705, 1995.
- GALEN, J. E. 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**, Amsterdam, v.15, p.700-708, 1997.
- GARMORY, H.; BROWN, K.; TITBALL, R. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v.26, p.339-353, 2002.
- GORVEL, J. P.; MÉRESSE, S. Maturation steps of the *Salmonella*-containing vacuole. **Microbes Infect.**, Paris, v.3, p.1299-1303, 2001.
- HONE, D. M. et al. Mucosal vaccination with *Salmonella* vaccine vectors. In: PATTERSON, Y. (Ed.). **Intracellular bacterial vaccine vectors**. Immunology, cell biology and genetics. New York: Wiley-Liss, 1999. p.171-222.
- HOPKINS, S. et al. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. **Infect. Immun.**, Washington, DC, v.63, n.9, p.3279-3286, 1995.
- HORMAECHE, Carlos E. Live attenuated salmonella vaccines and their potential as oral combined vaccines carrying heterologous antigens. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.142, p.113-120, 1991.
- HORMAECHE, C. E. et al. Salmonella vaccines: mechanisms of immunity and their use as carriers of recombinant antigens. In: ALA'ALDEEN, D. A. A.; HORMAECHE, C. E. (Ed.). **Molecular and clinical aspects of bacterial vaccine development**. New York: Wiley, 1995. p.119-153.
- KAUFMANN, S.; RAUPACH, B.; FINLAY, B. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. **Microbes Infect.**, Paris, v.3, p.1177-1181, 2001.
- KOHLER, J. J. et al. Effect of preexisting immunity to *Salmonella* on the immune response to recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing a *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin. **Infect. Immun.**, Washington, DC, v.68, p.3116-3120, 2000.
- MASTROENI, P. et al. *Salmonella* immune responses and vaccines. **Vet. J.**, London, v.161, p.132-164, 2000.
- McCLELLAND, M. et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar



- Typhimurium LT2. *Nature*, London, v.413, p.852-856, 2001.
- MEDINA, E.; GUZMÁN, C. A. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine*, Amsterdam, v.19, p.1573-1580, 2001.
- PAGLIA, P. et al. Gene transfer in dendritic cells induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium* results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood*, Washington, DC, v.92, p.3172-3176, 1998.
- RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. E. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to chose the appropriate *Salmonella* vaccine strain? *Microbes Infect.*, Paris, v.3, p.1261-1269, 2001.
- ROBERTS, M. et al. Prior immunity to homologous and heterologous *Salmonella* serotypes supresses local and systemic anti-fragment C antibody responses and protection from tetanus toxin in mice immunized with *Salmonella* strains expressing fragment C. *Infect. Immun.*, Washington, DC, v.67, p.3810-3815, 1999.
- SHATA, M. T. et al. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Mol. Med. Today*, Cambridge, UK, v.6, p.66-71, 2000.
- SRIVASTAVA, I. K.; LIU, M. A. Gene vaccines. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v.138, p.550-559, 2003.
- STOCKER, B. A. D. Aromatic-dependent *Salmonella* as anti-bacterial vaccines and as presenters of heterologous antigens or of DNA encoding them. *J. Biotechnol.*, Amsterdam, v.83, p.45-50, 2000.
- WEISS, S.; KRUSCH, S. Bacteria-mediated transfer of eukaryotic expression plasmids into mammalian host cells. *Biol. Chem.*, Berlin, v.382, p.533-541, 2001.
- WU, S. et al. Construction and immunogenicity in mice of attenuated *Salmonella typhi* expressing *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1) fused to tetanus toxin fragment C. *J. Biotechnol.*, Amsterdam, v.83, p.125-183, 2000.
- YRLID, U. et al. Antigen-presenting cells and anti-*Salmonella* immunity. *Microbes Infect.*, Paris, v.3, p.1239-1248, 2001.

### ***Agradecimentos***

À FAPEMIG, ao CNPq e à CAPES pelo apoio concedido.