

Desarrollo de la Vacuna para Prevenir la Infección por el Streptococcus pyogenes del Grupo A (GAS) con Proteína Recombinante

Luiza Guilherme, Raquel Alencar y Jorge Kalil

La fiebre reumática (FR) es una enfermedad auto-inmune post-infecciosa que afecta a alrededor de 20 millones de niños en el mundo. La FR aparece en el 3-4% de los niños o adolescentes infectados por el *Streptococcus pyogenes* del Grupo A (GAS) no tratados. Entre las manifestaciones de la FR la carditis es la más grave, pues desencadena lesiones valvulares graves y permanentes, que resultan en una enfermedad reumática cardíaca crónica (ERCC). La ERCC sigue siendo una de los mayores problemas de salud pública en países en desarrollo y es responsable de 233.000 muertes por año. La incidencia de la ERCC en el mundo es de por lo menos 15,6 millones de casos ¹.

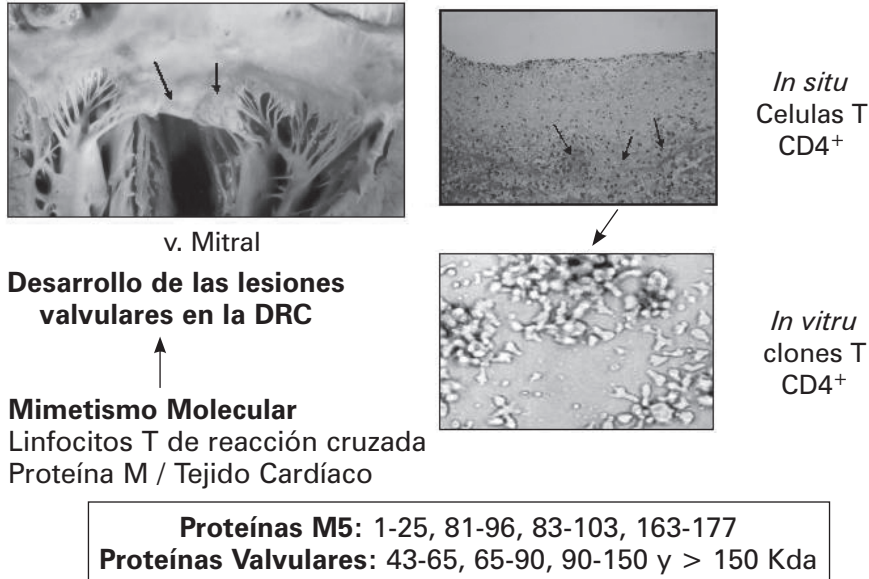
En Brasil, a pesar de que la incidencia de FR aguda ha disminuido en 75% en los últimos 10 años, aún es elevada, sumándose 5000 nuevos casos cada año (datos del Ministerio de Salud)

El GAS posee una pared celular compuesta por unidades repetitivas del carbohidrato N-glucosamina ligado a un esqueleto polimérico de ramnose. Presenta las proteínas M, T y R, y el ácido lipoteicoico (LTA) insertos en su superficie, estas estructuras están relacionadas con la adherencia a las células epiteliales de la orofaringe. La compleja estructura de la superficie celular contribuye con los determinantes de la virulencia del GAS, especialmente aquellos relacionados con la colonización bacteriana en la célula del hospedero, la evasión de la fagocitosis y de la respuesta inmune. La proteína M es particularmente importante como factor de virulencia para la fijación de la bacteria. Esta proteína se proyecta de la pared celular y está compuesta por dos cadenas polipépticas con aproximadamente 450 residuos de aminoácidos dispuestos en alfa hélice. La porción N-terminal contiene la región de repetición A y presenta variaciones en los residuos de aminoácidos que definen los diversos serotipos, de los cuales 130 ya fueron identificados. La región de repetición B también presenta algunas variaciones entre los diversos serotipos. La porción C-terminal se conserva y contiene múltiples regiones de repetición ².

La FR y la ERCC son debidas a una respuesta auto-inmune patológica desencadenada por una respuesta de defensa contra el estreptococo. El mimetismo molecular puede ser definido como el reconocimiento de epítomos compartidos entre las proteínas del GAS y del hospedero, es el mecanismo responsable de las reacciones auto-inmunes. A partir de clones de linfocitos T intralesionales obtenidos de fragmentos quirúrgicos de pacientes portadores de ERCC, nosotros hemos demostrado por primera vez la habilidad de los linfocitos T de reconocer

simultáneamente péptidos de la proteína M y proteínas derivadas del tejido cardiaco. Tres regiones de la proteína M5 (residuos de 1-25, 81-103 y 163-177) presentaron reacción cruzada con fracciones proteicas, principalmente derivadas del tejido valvular con masas moleculares de 95-150 , 43-65 e 30-43 kDa ³ (**Figura 1**).

Figura 1: Células T mediadoras de las lesiones cardíacas reumáticas.



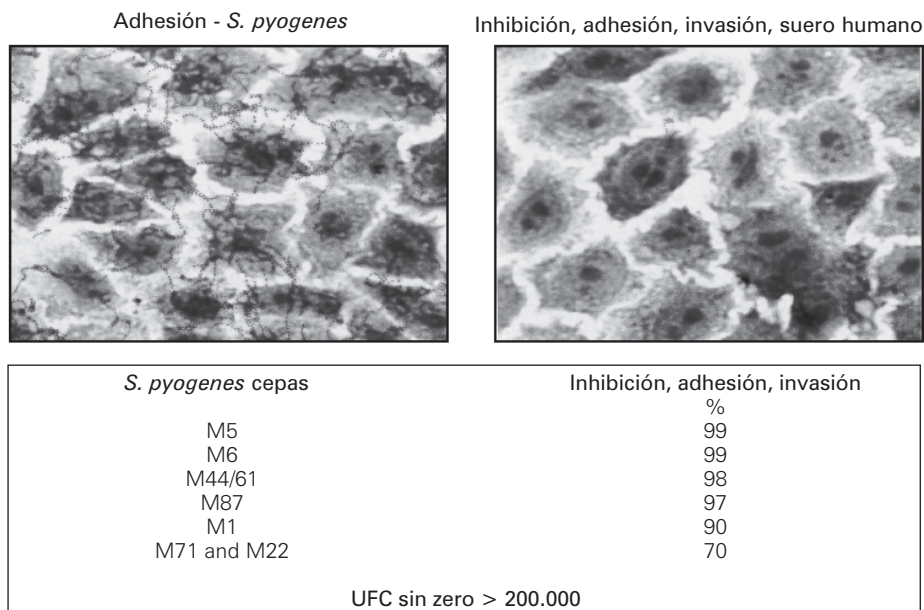
Los linfocitos T CD4⁺ infiltran las lesiones de la válvula mitral. Los clones de linfocitos T aislados de estas lesiones valvulares fueron capaces de reconocer péptidos de la proteína M5 y proteínas derivadas del tejido cardiaco por mimetismo molecular que probablemente desencadenan las lesiones valvulares en la ERCC³. Considerando que FR/ERCC son los prototipos de las enfermedades auto-inmunes post-infecciosas, el gran desafío es desarrollar una vacuna para impedir la infección por el GAS y las enfermedades causadas por esta bacteria, sin inducir reacciones auto-inmunes.

El modelo de la vacuna contra el estreptococo que nos propusimos esta basado en la búsqueda de epítomos protectores reconocidos por linfocitos T y B, no desencadenadores de reacciones auto-inmunes. Nosotros estudiamos la reactividad de linfocitos T en suero en un panel de 620 muestras de sangre humana, examinadas contra 80 péptidos que cubren una región de 100 residuos de aminoácidos de la porción C- terminal de la proteína M del estreptococo, difiriendo apenas en un aminoácido. Esta estrategia nos permitió definir los epítomos T y B compuestos por 22 y 25 residuos de aminoácidos, respectivamente⁴. Las secuencias identificadas fueron depositadas en el Banco Brasileño de Patentes, INPI020050020064.

Un pool de sueros de individuos saludables reactivos al epítomo B inhibió la adhesión y la invasión de varias cepas de estreptococo (**Figura 2**). Por medio de la clonación del gen emm, nosotros obtuvimos una proteína recombinante

que contiene ambos epítomos T y B. Como control de una posible reacción auto-inmune, nosotros usamos los ligandos de los linfocitos T obtenidos de los pacientes con ERCC y examinamos la capacidad de estas células de reconocer los péptidos seleccionados para los epítomos T y B por proliferación celular y producción de citocinas. Los resultados preliminares no mostraron reacciones cruzadas con proteínas cardíacas, indicando que los epítomos seleccionados pueden ser buenos candidatos para la vacuna. La eficacia en inducir la producción de anticuerpos y respuesta de los linfocitos T, del epítomo seleccionado, serán examinados en modelos animales como segunda fase para la validación del epítomo destinado para la confección de la vacuna

Figura 2: Suero humano reactivo al epítomo candidato a vacuna inhibe la adhesión e invasión de varias cepas del *Streptococcus pyogenes* del grupo A (GAS) a la célula HEp2 in vitro.



Referencias bibliográficas

1. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. 2005. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis.* 5(11):685-694.
2. Fischetti VA, Jones KF, Hollingshead SK, Scott JR. 1988 Structure, function, and genetics of streptococcal M protein. *Rev Infect Dis.* 10 Suppl 2:S 356-359.
3. Guilherme, L., E. Cunha-Neto, V. Coelho, R. Snitcowsky, F. Pillegi and J. Kalil. 1995. Human heart-infiltrating T cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation* 92:415-420.
4. Guilherme, L., Fae KC, Higa F, Chaves L, Oshiro SE, Freschi de Barros S, Puschel C, Juliano MA, Tanaka AC, Spina G, Kalil J. 2006. Towards a vaccine against rheumatic fever. *Clin. Immunol. Dev.* (Taylor & Francis Journal). In Press.